



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

**SISTEMA DE EVALUACIÓN BIOLÓGICO
PARA LA BÚSQUEDA DE NUEVOS
COMPUESTOS CON ACTIVIDAD
ANTILEISHMANIA**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOQUIMICA Y BIOLOGIA
MOLECULAR**

DENIS HELAN CASTILLO PAREJA

LIMA – PERU

2018

ASESOR:

Dr. PhD MICHEL SAUVAIN

**Director del Laboratorio Mixto Internacional LAVI “Laboratorio Andino Amazónico
de Química de la Vida” IRD-UPCH.**

Director de investigación en el IRD

DEDICATORIA

*A mi esposa quien constantemente me alienta a seguir mejorando como persona, esposo,
padre y científico.*

*A mis hijos Mathías, Stephanía y María Fernanda quienes me brindan toda su alegría todos
los días desde que los tengo a mi lado.*

*A mis padres José y Teófila quienes con mucho esfuerzo me apoyaron desde muy joven y lo
siguen haciendo sin mostrar signos de agotamiento y a mis hermanos que con sus
experiencias me han mostrado el camino menos difícil que debo recorrer en esta aventura
llamada “vida”.*

AGRADECIMIENTOS

El desarrollo del trabajo presentado en esta memoria de tesis ha sido posible gracias a la financiación recibida por el Laboratorio Mixto Internacional LMI-LaVi que fue creado bajo un convenio entre el Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD) y la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH).

Agradezco a mi buen amigo, el Dr. Michel Sauvain, Director de Laboratorio Mixto internacional LMI-LaVi por brindarme su paciencia y confianza de trabajar en su grupo de investigación.

A la Biol. Elsa Rengifo, la Dra. Joaquina Alban, la Dra. Céline Valadeau, el Dr. Guillaume Odonne y la Dra. Geneviève Bourdy por la recolección de las plantas con potencial actividad anti-*Leishmania* de los pueblos de Yanapari, Yanesha y de la comunidad Chayahuita.

A la Dra Rosario Rojas, el Dr. Billy Cabanillas y la Magister Candy Ruiz por el apoyo en la producción de extractos etanólicos y compuestos aislados de las plantas recolectadas.

A los Doctores José Carlos Aponte y G. Hammond de la Universidad de Louisville-USA por proporcionarme 81 compuestos sintéticos derivados de Chalconas y Tetrahidrobenzotienopirimidinas (BTPs).

A los Doctores Asunción Burguete y Antonio Monge de la Universidad de Navarra en Pamplona, España, por proporcionarme 13 compuestos sintéticos derivados de Quinoxalinas.

A la Doctora Valerie Jullian integrante de nuestra unidad de investigación UMR-152 (IRD-Francia) por proporcionarme 3 compuestos pertenecientes a la familia de las benzo[c]fenantridinas.

A mis amigos Yannick Estevez, German Gonzales, Katherine Torres y Vanessa Adai.

INDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACION	4
2.1. Planteamiento del problema	4
III. MARCO TEORICO	6
3.1. Generalidades	6
3.2. Filogenia y taxonomía	7
3.3. Morfología y ciclo biológico del parásito del género <i>Leishmania</i>	7
3.4. Diversidad clínica	10
3.4.1. Leishmaniosis visceral o Kala-azar (LV).	10
3.4.2. Leishmaniosis cutánea (LC).	11
3.4.3. Leishmaniosis mucocutánea (LMC).	11
3.5. Leishmaniosis en el Perú	12
3.6. Tratamiento de la leishmaniosis	15
3.6.1. Tratamiento con antimoniales pentavalentes	16
3.6.2. Resistencia al tratamiento con antimoniales	17
3.7. Plantas medicinales contra la leishmaniosis	19
3.8. Comunidades indígenas	22
3.8.1. Comunidad Chayahuita	22
3.8.2. Comunidad Yanesha	22
3.8.3. Pueblo Iñapari	23
IV. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO	24
V. OBJETIVOS	27

5.1. General	27
5.2. Específicos	27
VI. METODOLOGIA	28
6.1. Diseño de estudio	28
6.2. Población y muestra	28
6.3. Operación de variables	28
6.3.1. Variable dependiente	28
6.3.2. Variable independiente	28
6.4. Procedimientos y técnicas	29
6.4.1. Colecta de Plantas	29
6.4.2. Producción de los extractos crudos y obtención de compuestos naturales	29
6.4.2.1. Extracción	30
6.4.2.1.1. Fracción Diclorometano	30
6.4.2.1.2. Fracción Acuosa	30
6.4.2.2. Métodos cromatográficos	30
6.4.2.2.1. Cromatografía en capa fina (TLC)	30
6.4.2.2.2. Cromatografía en columna abierta	31
6.4.2.2.3. Cromatografía líquida de mediana presión (MPLC)	31
6.4.3. Obtención de compuestos derivados de síntesis	31
6.4.4. Evaluación <i>in vitro</i>	32
6.4.4.1. Cultivo de parásitos	32
6.4.4.2. Extracción y cultivo de macrófagos peritoneales de ratón BALB/c	33

6.4.4.3. Fraccionamiento guiado por bioensayo	33
6.4.4.4. Evaluación de la citotoxicidad	35
6.4.4.5. Cálculo del índice de selectividad	37
6.4.4.6. Evaluación de los compuestos naturales aislados y de síntesis sobre amastigotes intracelulares de <i>L. amazonensis</i> .	37
6.4.5. Evaluación <i>in vivo</i>	40
6.4.5.1. Mantenimiento de ratones BALB/c	40
6.4.5.2. Evaluación de la carga parasitaria inicial	41
6.4.5.3. Pruebas de toxicidad del solvente en el modelo animal de ratón BALB/c	42
6.4.5.4. Evaluación de la actividad anti- <i>Leishmania</i> de los compuestos candidatos	42
6.4.5.4.1. Infección	42
6.4.5.4.2. Tratamiento	43
6.4.5.4.3. Medida de la progresión de la enfermedad experimental	43
6.4.5.4.4. Evaluación de la carga parasitaria	44
6.5. Consideraciones éticas	45
6.6. Plan de análisis	45
VII. RESULTADOS	46
7.1 Trabajos de campo	46
7.2. Implementación de un modelo de evaluación <i>in vitro</i>	46
7.2.1. Sistema de evaluación biológico para la evaluación de extractos etanólicos de plantas con potencial actividad anti- <i>Leishmania</i> utilizando amastigotes axénicos de <i>L. amazonensis</i>	47

7.2.1.1. Actividad de extractos etanólicos de plantas peruanas sobre amastigotes axénicos de <i>L. amazonensis</i>	47
7.2.2. Evaluación de compuestos naturales y de síntesis sobre amastigotes axénicos de <i>L. amazonensis</i>	49
7.2.2.1. Evaluación de compuestos naturales sobre el modelo de amastigotes axénicos de <i>L. amazonensis</i> .	49
7.2.2.2. Evaluación de compuestos derivados de síntesis sobre el modelo de amastigotes axénicos de <i>L. amazonensis</i>	51
7.2.3. Evaluación de la citotoxicidad y determinación del índice de selectividad de compuestos naturales y de síntesis sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c	54
7.2.3.1. Evaluación de la citotoxicidad y determinación del índice de selectividad de compuestos naturales utilizando el modelo de macrófagos peritoneales de ratón BALB/c	54
7.2.3.2. Evaluación de la citotoxicidad y determinación del índice de selectividad de compuestos derivados de síntesis sobre el modelo de macrófagos peritoneales de ratón BALB/c	56
7.2.3. Evaluación de la actividad de compuestos naturales y de síntesis sobre el modelo de amastigotes intracelulares de <i>Leishmania amazonensis</i> .	59
7.3. Evaluación <i>in vivo</i> .	61
7.3.1 Evaluación de la toxicidad de las formulaciones sobre ratones BALB/c	61
7.3.2 Estandarización de parámetros de infección <i>in vivo</i>	62

7.3.3 Evaluación de la actividad anti- <i>Leishmania</i> de los compuestos candidatos en un modelo de infección <i>in vivo</i>	64
7.3.3.1 Evaluación del tratamiento de compuestos anti- <i>Leishmania</i> a nivel del diámetro de la inflamación en la almohadilla plantar de ratones infectados con <i>L. amazonensis</i>	65
7.3.3.2 Evaluación del tratamiento de compuestos anti- <i>Leishmania</i> a nivel de la carga parasitaria en la almohadilla plantar de ratones infectados con <i>L. amazonensis</i>	66
VIII. DISCUSIÓN	70
IX. CONCLUSIONES	79
X. PERSPECTIVAS	80
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
XII. ANEXOS	96

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Extractos de plantas y compuestos aislados con actividad anti- <i>Leishmania</i> evaluados en modelos biológicos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	21
Tabla 2. Concentración inhibitoria media (CI ₅₀) menor a 10µg/mL de extractos etanólicos de 6 especies de plantas.	51
Tabla 3: Determinación de la CI ₅₀ (µM) de 10 compuestos naturales sobre amastigotes axénicos de <i>L. amazonensis</i> .	54
Tabla 4: Determinación de la CI ₅₀ (µM) de compuestos derivados de síntesis sobre amastigotes axénicos de <i>L. amazonensis</i>	56
Tabla 5: Determinación de la concentración citotóxica media (CC ₅₀) e índice de selectividad de compuestos naturales aislados a partir de 6 especies de plantas de la Amazonía.	59
Tabla 6: Determinación de la concentración citotóxica media (CC ₅₀) e índice de selectividad de compuestos sintéticos sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c	61
Tabla 7: Determinación de la concentración inhibitoria media (CI ₅₀) de compuestos naturales y de síntesis sobre amastigotes intracelulares de <i>Leishmania amazonensis</i> .	63
Tabla 8: Porcentaje de reducción de la carga parasitaria en ratones BALB/c infectados con <i>L. amazonensis</i> y tratados con 11 compuestos naturales y sintéticos.	72

ANEXOS

Anexo 1. Evaluación de la actividad leishmanicida de extractos etanólicos de 149 especies de plantas del Perú utilizadas en la medicina tradicional como remedios anti-*Leishmania* sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*.

Anexo 1a. Determinación de la CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de extractos etanólicos de plantas provenientes de la comunidad Yanesha.

Anexo 1b. Determinación de la CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de extractos etanólicos de plantas provenientes del pueblo Yanapari.

Anexo 1c. Determinación de la CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de extractos etanólicos de plantas provenientes de la comunidad Chayahuita.

Anexo 2. Evaluación de la actividad leishmanicida de 35 compuestos naturales sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*.

Anexo 3. Evaluación de la actividad leishmanicida de 43 compuestos de la familia de las chalconas sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis* y ubicación de los sustituyentes en la estructura general de la chalcona

Anexo 3a. Actividad *in vitro* de 43 compuestos de la familia de las chalconas sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*

Anexo 3b. Ubicación del anillo A y el anillo B dentro de la estructura general de la chalcona

Anexo 4. Evaluación de la actividad leishmanicida de 38 compuestos de la familia de las Tetrahydrobenzotienopirimidinas (BTP) sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis* y ubicación de los sustituyentes en la estructura general de la BTP.

Anexo 4a. Actividad *in vitro* de 38 compuestos de la familia de las tetrahydrobenzotienopirimidinas sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*

Anexo 4b. Estructura general del compuesto D y ubicación de los sustituyentes R1 y R2 de los compuestos sintéticos derivados de las BTPs

Anexo 5. Evaluación de la actividad leishmanicida de 13 compuestos de la familia de las quinoxalinas sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis* y ubicación de los sustituyentes en la estructura general.

Anexo 5a. Actividad *in vitro* de 13 compuestos de la familia de las quinoxalinas sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*

Anexo 5b. Estructura general de la quinoxalina y ubicación de los sustituyentes R₃', R₄', R₅', R₆ y R₇ de los compuestos sintéticos derivados.

Anexo 6. Evaluación de la actividad leishmanicida de 3 compuestos de la familia de las benzo[c]fenantridinas sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis* y ubicación de los sustituyentes en la estructura general.

Anexo 6a. Actividad *in vitro* de 3 compuestos de la familia de las benzo[c]fenantridinas sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*

Anexo 6b. Estructura general de las benzo[c]fenantridinas sintéticas y ubicación de los sustituyentes R1, R2, R3 y R4.

Anexo 7. Evaluación *in vitro* de la concentración citotóxica media (CC₅₀) e índice de selectividad de 32 compuestos de la familia de las chalconas sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c

Anexo 8. Evaluación *in vitro* de la concentración citotóxica media (CC₅₀) e índice de selectividad de 38 compuestos de la familia de las BTPs sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c

Anexo 9. Evaluación *in vitro* de la concentración citotóxica media (CC₅₀) e índice de selectividad de 13 compuestos de la familia de las quinoxalinas sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c

Anexo 10. Determinación de la concentración inhibitoria media (CI₅₀) de compuestos naturales y de síntesis sobre amastigotes intracelulares de 2 especies de *Leishmania*

Anexo 11. Protocolos de evaluación aprobados por el comité de ética indicando el número de ratones a utilizar en cada protocolo.

ABREVIATURAS

MPLC: Cromatografía líquida de mediana presión

L. amazonensis: *Leishmania amazonensis*

L. peruviana: *Leishmania peruviana*

L. braziliensis: *Leishmania braziliensis*

LC: Leishmaniosis cutánea

LMC: Leishmaniosis mucocutánea

LV: Leishmaniosis visceral o Kala-azar

ATL: Leishmaniosis tegumentaria americana

TIA: Tasa de incidencia acumulada

NaCl: Cloruro de sodio

M199: Medio de cultivo celular M199

SFB: Suero Fetal Bovino

CI₅₀: Concentración inhibitoria media

CC₅₀: Concentración citotóxica media

DMSO: Dimetil sulfóxido

Anf B: Anfotericina B

MTT: Sal de Bromuro de Dimetiltiazol difenil tetrazolio

SDS: Dodecil sulfato de sodio

CO₂: Dióxido de carbono

IS: Índice de selectividad

BTP: Tetrahidrobenzotienopirimidinas

FDA: Fluoresceína de diacetato

ADN: Ácido desoxirribonucleico

RESUMEN

En este trabajo, presentamos el desarrollo y la implementación de un algoritmo biológico para la evaluación de extractos de plantas, compuesto naturales aislados y compuestos análogos sintéticos sobre modelos de infección *in vitro* e *in vivo* de *Leishmania*. Este algoritmo inició con la implementación *in vitro* de un sistema de cribado biológico de alto rendimiento para evaluar la actividad anti-*Leishmania* de 97 compuestos sintéticos y 149 especies de plantas utilizadas en la Amazonia sobre amastigotes axénicos de *Leishmania amazonensis*. Esto permitió seleccionar a 8 especies de plantas activas que por fraccionamiento biodirigido permitió aislar a 35 compuestos naturales. La actividad sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis* y la evaluación de la citotoxicidad sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c de 35 compuestos naturales y 97 compuestos sintéticos permitió seleccionar a 22 compuestos con un índice de selectividad mayor a 10.

La evaluación de la actividad anti-*Leishmania* de 22 compuestos sobre amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* permitió seleccionar 10 compuestos activos que fueron evaluados sobre el modelo biológico *in vivo* utilizando ratones BALB/c infectados con parásitos de *L. amazonensis*.

Finalmente, la implementación de este algoritmo permitió seleccionar a la chalcona 42, chalcona 43 y la fagaridina como los compuestos más activos sobre parásitos de *Leishmania* en modelos de infección *in vitro* e *in vivo*.

Palabras claves: Fraccionamiento biodirigido, amastigotes axénicos, macrófagos, plantas medicinales peruanas, compuestos naturales, compuestos sintéticos, *Leishmania amazonensis*, *in vitro*, *in vivo*.

ABSTRACT

In this work, we present the development and implementation of a biological algorithm for the evaluation of plant extracts, isolated natural compounds and synthetic analogs on *in vitro* and *in vivo* infection models of *Leishmania*. This algorithm began with the *in vitro* implementation of a high-performance biological screening system to evaluate the anti-*Leishmania* activity on axenic amastigote of *Leishmania amazonensis* of 97 synthetic compounds and 149 plant species used in the Peruvian Amazon. This made it possible to select 8 species of active plants, from which by bioguided fractionation were isolated 35 natural compounds. The activity on axenic amastigotes of *L. amazonensis* and the evaluation of cytotoxicity on peritoneal macrophages of BALB/c mouse of 35 natural compounds and 97 synthetic compounds allowed the selection of 22 compounds with a selectivity index greater than 10.

The evaluation of the anti-*Leishmania* activity of 22 compounds on intracellular amastigotes of *L. amazonensis* allowed to select 10 active compounds that were evaluated on the biological model *in vivo* using BALB/c mice infected with *L. amazonensis* parasites.

Finally, the implementation of this algorithm made it possible to select chalcone 42, chalcone 43 and fagaridine as the most active compounds on *Leishmania* parasites in *in vitro* and *in vivo* models of infection.

Key words: Bioguided fractionation, axenic amastigote, macrophages, Peruvian medicinal plants, natural compounds, synthetic compounds, *Leishmania amazonensis*, *in vitro*, *in vivo*.

I. INTRODUCCION

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios del género *Leishmania* (familia Trypanosomatidae) que afecta al hombre y algunas especies de mamíferos. Es una de las principales enfermedades citadas por la Organización Mundial de la Salud como una plaga para la humanidad que hay que combatir. La enfermedad es transmitida por insectos de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*. La saliva del insecto vector contiene al promastigote, la forma extracelular flagelada del parásito. En el hospedero vertebrado, los parásitos son diferenciados en amastigotes, la forma intracelular no flagelada que invade el macrófago (Nagle *et al.* 2014).

La infección causada por este parásito abarca a nivel mundial aproximadamente a 15 millones de personas infectadas, con una incidencia de dos millones de nuevos casos y 350 millones de personas en riesgo de infección (Torres-Guerrero *et al.* 2017).

Las especies más presentes en nuestro país son *L. braziliensis* que causa leishmaniosis mucocutánea (LMC) afectando tejidos mucosos como la nariz y el paladar, *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni* y *L. amazonensis* que causan leishmaniosis cutánea (LC) (Valencia *et al.* 2012; Arévalo *et al.* 2007).

El tratamiento de primera línea consiste en inyecciones intramusculares de sales de antimonio V (Glucantime® o Pentostam®) a una dosis diaria de 20mg/kg de peso del paciente durante 20 días. Cuando el tratamiento fracasa, el paciente es sometido a tratamientos más severos como la Anfotericina B (Nagle *et al.* 2014).

En la naturaleza hay una vasta diversidad de compuestos bioactivos y es por lo tanto una amplia fuente de recursos potenciales beneficiosos para el tratamiento de diversas enfermedades.

Las plantas medicinales son el legado de la medicina tradicional peruana desde tiempos precolombinos. Diversas comunidades indígenas utilizan el conocimiento tradicional heredado para curar diferentes enfermedades. Además, la mayoría de los fármacos activos contra agentes infecciosos son derivados de productos naturales o a partir de estructuras sugeridas por productos naturales. En la actualidad, los productos naturales (y sus derivados y análogos) representan más del 50% de todas las drogas en uso clínico, en las que los productos naturales derivados de plantas superiores representan aproximadamente el 25% del total (**Maridass & De Britto. 2008**). En el Perú desde tiempos precolombinos se han utilizado tradicionalmente a las plantas como tratamiento frente a la Leishmaniosis. En la actualidad diversas comunidades indígenas preservan este conocimiento tradicional y ancestral

El proceso de descubrimiento de nuevos compuestos candidatos activos contra parásitos de *Leishmania* empieza con el cribado de un gran número de plantas, seguido del aislamiento y purificación de los compuestos activos. Este proceso es guiado por un bioensayo de alto rendimiento el cual permite evaluar en corto tiempo un gran número de plantas potencialmente activas contra la leishmaniosis.

En el caso de *Leishmania*, diversos grupos de investigación utilizan al estadio promastigote como el sistema biológico de alto rendimiento para preseleccionar a un grupo de posibles candidatos (**Siqueira-Neto et al. 2010; San George et al. 2006; Sharlow et al. 2009; Grogl et al. 2013**). La ventaja de usar este modelo es que es fácil de realizar y se dispone de cantidades abundantes del parásito en cultivo. La limitación de este estadio es que no refleja directamente lo que ocurre en la infección natural. Es por ello que es preferible utilizar al estadio de amastigote ya que este estadio del parásito de *Leishmania* está presente en el humano y es responsable de la patogenicidad debido a su multiplicación en el macrófago. Sin embargo, la forma de amastigote requiere de cultivos en estos macrófagos. Este modelo es más difícil de

llevar a cabo y no es viable para la evaluación de un gran número de muestras y para el bioguiaje de compuestos activos presentes en plantas medicinales. Una alternativa para la realización de cribados masivos de compuestos puros o extractos de plantas sobre amastigotes intracelulares es la microscopia confocal utilizando parásitos de *Leishmania* que expresan la proteína verde fluorescente (De Rycker *et al.* 2013). Sin embargo, este método es complejo, aún no está estandarizado en nuestro laboratorio y es de alto costo. Para el éxito de las estrategias de cribado, es fundamental diseñar adecuadamente el ensayo, lo que a menudo implica un compromiso entre la facilidad, velocidad y una configuración biológicamente relevante.

Como alternativa al uso de promastigotes, Sereno y Lemesre 1997a lograron implementar el cultivo de amastigotes de *Leishmania* en forma extracelular (cultivo axénico). Esta estrategia de cribado fue desarrollada inicialmente por Callahan *et al.* 1997 quienes encontraron similitudes en la actividad de las drogas de referencia Anfotericina B, Pentamidina, Glucantime y Pentostam sobre amastigotes axénicos y amastigotes intracelulares de *L. amazonensis*.

Nuestro estudio marca un punto de partida para la implementación de un sistema biológico para la evaluación de plantas medicinales con potencial actividad anti-*Leishmania* y la identificación de compuestos naturales o sintéticos activos y de baja citotoxicidad sobre células de mamíferos.

II. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACION

2.1. Planteamiento del problema

La Leishmaniosis es una enfermedad parasitaria causada por el parásito intracelular *Leishmania*. Esta enfermedad desarrolla formas clínicas que atacan a tejidos cutáneos como la piel, mucosas como las fosas nasales y paladar y viscerales como el hígado y el bazo.

En el Perú, particularmente en niveles socioeconómicos bajos, se observa la presencia de dos formas diferentes de leishmaniosis más prevalentes: La leishmaniosis cutánea o uta, causada por *L. peruviana*, cuya manifestación clínica es una mácula cutánea que evoluciona en una pápula y la leishmaniosis amazónica o espundia, causada por la especie *L. braziliensis*, cuya manifestación clínica se caracteriza por la presencia de lesiones cutáneas que involucran las mucosas (**Kato et al. 2010, Koarashi et al. 2016**).

El tratamiento de primera línea de la leishmaniosis consiste la administración vía intramuscular de sales de Antimonio bajo la presentación de Glucantime® o Pentostam®. Sin embargo, las altas tasas de resistencia reportados han disminuido el éxito de erradicación de este parásito.

En un trabajo realizado por **Arévalo et al. 2007**, reportaron en pacientes con LC tratados por 20 días con 20mg/kg de Pentostam® una tasa de resistencia variable dependiendo de la especie de *Leishmania* que infecta al paciente. Se encontró para los pacientes infectados con *L. braziliensis*, *L. peruviana* y *L. guyanensis* una tasa de resistencia del 30%, 25% y 8% respectivamente. Este estudio demostró que las especies de *Leishmania* pueden influir en el tratamiento con antimoniales en pacientes con LC. En otro trabajo **Yardley et al. 2006**, reportaron una tasa de resistencia del 63% en pacientes con LC infectados con *L. braziliensis* luego del tratamiento por 20 días con 20mg/kg de antimoniato de meglumina (Glucantime®). En pacientes con LMC tratados por 30 días con 20mg/kg de Glucantime® se encontró una tasa

de resistencia del 33%. Cabe resaltar de este estudio que en pacientes con LC y LMC hubo una correspondencia muy alta de la falla clínica al tratamiento con la resistencia *in vitro* de las cepas de *L. braziliensis* aisladas.

Estos problemas de resistencia sumado a otros factores como los efectos secundarios del tratamiento con sales de antimonio (mialgia, pancreatitis, dolores musculares, insuficiencia renal, neuropatía periférica, hepatotoxicidad, cardiotoxicidad), la eficacia variable frente a enfermedades mucocutáneas y el alto costo de las drogas, dificulta que los pacientes de bajos recursos económicos puedan resolver la enfermedad rápidamente y así evitar que esta progrese en algunos casos a metástasis y produzca deformaciones. (**Arevalo et al. 2007, Yardley et al. 2006, Sundar & Chakravarty 2015**)

Todo esto ha generado la necesidad de implementar una metodología de cribado de plantas medicinales y nuevos compuestos con potencial actividad anti-*Leishmania* que sea rápido y eficaz. Esta metodología por pasos sucesivos usará los modelos biológicos *in vitro* de amastigotes axénicos y amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* (estadios biológicamente relevantes) y modelos *in vivo* de infección y tratamiento de ratones parasitados con *L. amazonensis*. La implementación de esta metodología pretende permitir el descubrimiento de nuevos compuestos o “Lead compounds” activos y así conocer su potencial farmacológico comparando a los usados actualmente en la práctica clínica.

III. MARCO TEORICO

3.1. Generalidades

La leishmaniosis se encuentra mayormente distribuida en las zonas tropicales de cuatro continentes, Centro y Sur América, África, Asia y el Sur de Europa (anillo mediterráneo). La leishmaniosis abarca distintas manifestaciones clínicas cuyos síntomas varían mucho de acuerdo con la especie del parásito, de la respuesta inmune y de factores genéticos del hospedero mamífero, así como de la relación de estos factores con la ubicación geográfica. Dentro de las enfermedades más comunes tenemos la leishmaniosis visceral (LV), causada principalmente por las especies *L. infantum*, *L. chagasi* y *L. donovani* (Singh & Sundar 2014), la leishmaniosis cutánea (LC) que es causada principalmente por las especies *L. peruviana*, *L. mexicana*, *L. trópica* y *L. major* y, por último, la leishmaniosis mucocutánea (LMC), causada principalmente por *L. braziliensis* (Hepburn 2003, Koarashi et al. 2016)

La leishmaniosis en América Latina es un problema de salud pública. Está presente principalmente en la forma clínica cutánea donde la piel y los tejidos mucosos son afectados, por esta razón es llamada leishmaniosis tegumentaria americana (ATL). La forma clínica visceral, que afecta el hígado y/o bazo, es restringida sólo a ciertas áreas en Brasil y Venezuela (Rocha et al. 2018, Traviezo Valles 2012).

Los parásitos del género *Leishmania* son parásitos protozoarios intracelulares obligatorios que infectan y se replican dentro de las células mononucleares del sistema fagocítico de sus hospederos vertebrados produciendo un amplio espectro de manifestaciones clínicas en humanos y animales (Cunningham 2002). Estas manifestaciones clínicas abarcan desde lesiones cutáneas benignas hasta lesiones severas y mucoinvasivas, con ocurrencia a desarrollar una LMC crónica.

3.2. Filogenia y taxonomía

Leishmania es un parásito protozooario flagelado que cuenta con una única mitocondria que está asociada al kinetoplasto, una masa de ADN circular que está siempre presente en el Orden Kinetoplastida. Dentro de este Orden también podemos encontrar a los tripanosomas que pertenecen a la Familia Trypanosomatidae a la que pertenecen los parásitos de *Leishmania*. El Género *Leishmania*, está dividido en dos Subgéneros en función de en qué lugar del tracto digestivo del vector se multiplique. De este modo, encontramos a los representantes del Subgénero *Leishmania* siendo las siguientes especies: *L. donovani*, *L. infantum* (también llamada *L. chagasi*), *L. tropica*, *L. major*, *L. mexicana* (también llamada *L. pifanoi*), *L. amazonensis*, *L. arabica*, *L. killicki*, *L. turanica*, *L. gerbilli*, *L. archibaldi*, *L. aristidesi*, *L. enrietti*, *L. hertigi*, *L. venezuelensis* y *L. deanei* (Rodrigues *et al.* 2014). Dentro del Subgénero *Viannia* tenemos a los complejos *L. guyanensis* y *L. braziliensis*, representando a este último tenemos principalmente a *L. (Viannia) braziliensis* y *L. (Viannia) peruviana*, aquellas especies más predominantes en nuestro país.

3.3. Morfología y ciclo biológico del parásito del género *Leishmania*

El parásito *Leishmania* tiene un ciclo de vida digenético que alterna entre la colonización de un insecto vector en la forma flagelada promastigote y la colonización del hospedero mamífero en la forma aflagelada amastigote (figura 1). El promastigote es de forma fusiforme, el cual tiene aproximadamente de 15-20 μm de diámetro mayor, constando de un núcleo situado cerca de la parte central del parásito y un flagelo anteronuclear que nace de un cuerpo basal situado por delante del kinetoplasto, llamado el bolsillo flagelar. El amastigote intracelular obligatorio es aflagelado, y presenta una forma redondeada u oval de 2-5 μm de diámetro con un gran núcleo central y un kinetoplasto lateral.

Los promastigotes son liberados dentro de la piel humana por la picadura del insecto vector flebótomo hembra infectado (Paso 1). Los vectores naturales de todas las especies de *Leishmania* son cerca de 30 especies de insectos de la Subfamilia Phlebotomiae. Los vectores principales del “Viejo Mundo” pertenecen al género *Phlebotomus* y los del “Nuevo Mundo” al género *Lutzomyia*. En el hospedero se encuentran los promastigotes metacíclicos más infectivos. Luego de un proceso de transición dentro del tubo digestivo del insecto vector, son reconocidos por receptores en la superficie de la célula fagocítica e ingeridos por fagocitosis dentro del macrófago (Paso 2).

En el interior del macrófago se fusiona el fagosoma conteniendo al promastigote con el lisosoma. Seguidamente se lleva a cabo la diferenciación del promastigote a la forma redondeada y aflagelada de amastigote (Paso 3). El amastigote se multiplica dentro de la vacuola parasitófora (Paso 4). La gran cantidad de amastigotes intracelulares son liberados debido a la ruptura de la membrana celular del macrófago (Paso 5). Los amastigotes liberados se expanden invadiendo tejidos y/o colonizando otros macrófagos no infectados.

Posteriormente, otro mosquito, al picar a un animal mamífero infectado (persona o animal), ingiere los macrófagos infectados. Los amastigotes intracelulares son liberados en la cavidad abdominal del insecto vector (Paso 6). Los amastigotes se diferencian en promastigotes (Paso 7). Dos formas evolutivas de promastigotes, los promastigotes procíclicos y metacíclicos se desarrollan en el tubo digestivo del insecto vector. Los promastigotes procíclicos se multiplican asexualmente por división binaria longitudinal en la cavidad media intestinal e insertan sus flagelos en las microvellosidades de las células intestinales del insecto vector. Los promastigotes metacíclicos son más activos y diferenciados para adaptarse al parasitismo intracelular en el hospedero mamífero, son encontrados en la proboscis o parte bucal del insecto

vector (Paso 8). Finalmente, el ciclo continúa cuando el insecto al alimentarse realiza una picadura a una persona u otro animal reservorio sano.

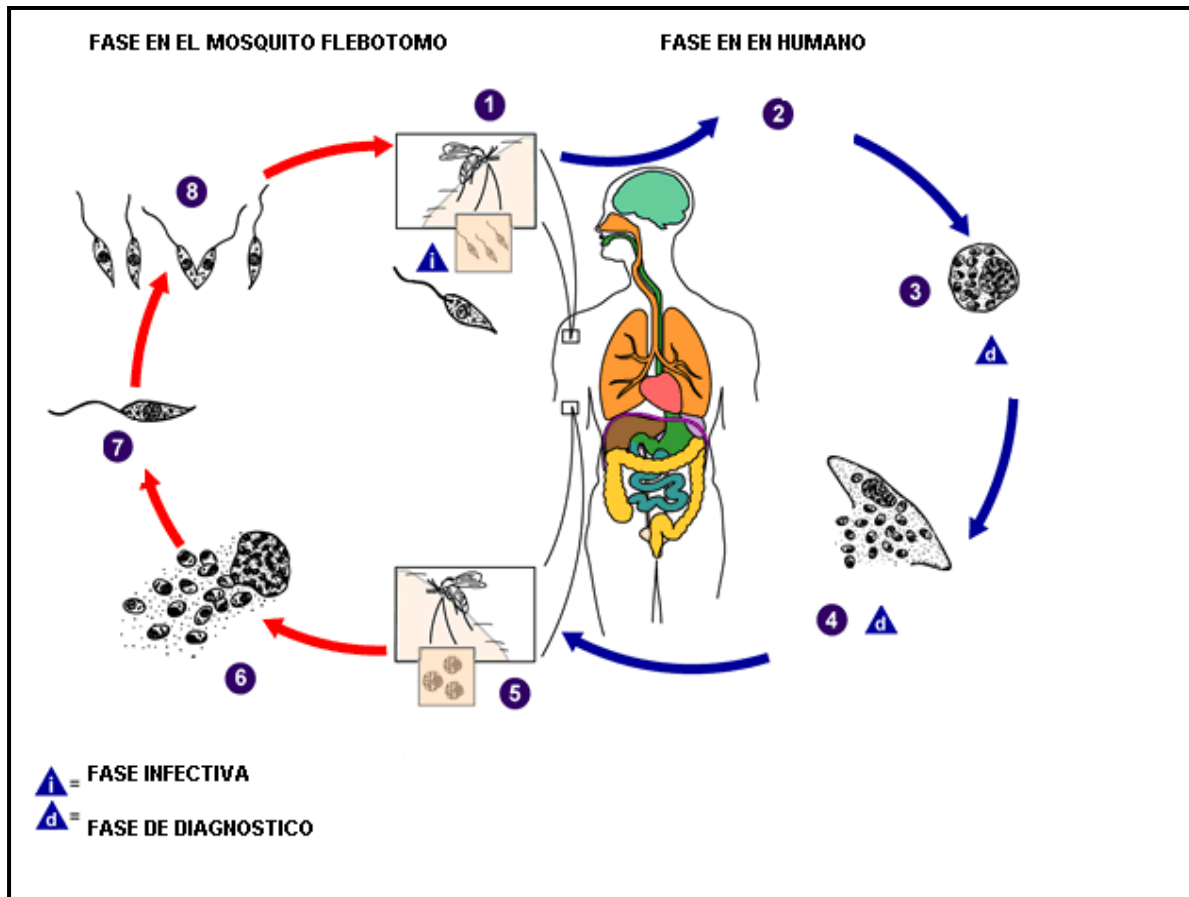


Figura 1: Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Gráfico obtenido en la www.cdc.org

3.4. Diversidad clínica

Una de las características más notables de las leishmaniosis es la diversidad de enfermedades causada por agentes morfológicamente similares. Esta diversidad no está totalmente explicada por la diversidad genética de los parásitos, sin embargo, se sabe que las especies de *Leishmania* muestran un tropismo preferencial (viscerotropismo, dermatotropismo y tropismo mucocutáneo) que se genera además por la variedad en la respuesta del hospedero a la infección y por la restricción de los parásitos a partes u órganos específicos del cuerpo (**Rodrigues et al. 2014**). En experimentación animal se ha visto que la genética tiene un gran efecto en la respuesta del hospedero a la infección. Hay evidencias considerables de que el parásito más virulento de *Leishmania* puede causar enfermedades no detectables en ciertos individuos (**Bern et al. 2007**).

Las principales variedades clínicas de las leishmaniosis en humanos son las siguientes:

3.4.1. Leishmaniosis visceral o Kala-azar (LV).

Esta variedad clínica puede estar ampliamente restringida a menores de edad, es causada generalmente por *L. infantum*. Esta variedad clínica también se ha visto que está muy presente en personas inmunosuprimidas independientemente de su edad. Diversos estudios han evidenciado que un estado de malnutrición exagera la enfermedad causada por *L. infantum*. Luego de un tiempo de incubación variable la leishmaniosis visceral se acompaña por fiebre irregular y persistente. Cuando la enfermedad se ha establecido, su desarrollo puede ser muy variable. Los síntomas severos pueden ser muy agudos con un desarrollo rápido de la enfermedad (dos semanas) o la progresión puede no notarse, confundándose con la enfermedad malaria hasta que se detectan síntomas abdominales como la esplenomegalia donde se observa que el bazo aumenta su tamaño provocando una disfunción. Otro síntoma abdominal es la inflamación del hígado (hepatomegalia), este síntoma, que se presenta

comúnmente en caso terminales, está asociado con anemia y leucopenia. (**Sundar & Agarwal 2017**)

3.4.2. Leishmaniosis cutánea (LC).

Esta variedad clínica es causada por las especies, *L. aethiopica*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. peruviana* o, *L. tropica*. Esta enfermedad se caracteriza por presentar una lesión cutánea simple en el sitio donde ocurrió la picadura del zancudo. Normalmente presenta una curación espontánea, considerándose como un problema trivial y no presenta manifestaciones clínicas sistémicas (**Campos et al. 2017**).

Una variante de este cuadro clínico es la leishmaniosis cutánea difusa que es causado por parásitos de las especies *L. amazonensis* o *L. aethiopica*. En la leishmaniosis cutánea difusa se ha observado que los parásitos se distribuyen por toda la superficie de la piel formando ulceraciones superficiales a manera de placas o nódulos. Este cuadro clínico es difícil de tratar y puede permanecer en el paciente durante toda su vida.

3.4.3. Leishmaniosis mucocutánea (LMC).

Esta variedad clínica es causada por parásitos de la especie *L. braziliensis*, suele aparecer luego de que un paciente infectado con *L. braziliensis* se haya curado superficialmente de una leishmaniosis cutánea inicial, pudiendo aparecer después de meses o incluso algunos años de una lesión cutánea “curada”. Durante el curso de esta enfermedad se ha observado que los parásitos se movilizan por vía linfática preferentemente hacia la zona de la oronasofaringe. En este lugar se forman lesiones nodulares generándose úlceras. En una fase más avanzada se observa que el tabique es perforado y se produce una deformación de la nariz llamada “nariz de tapir”. En otros estudios se ha observado que la lesión mucosa inicia en el paladar blando

con posterior destrucción de la úvula. Otras lesiones pueden aparecer en la epiglotis y producen disfonías (**Eichner et al. 2013**).

3.5. Leishmaniosis en el Perú

La leishmaniosis es una zoonosis silvestre de presentación frecuente en la Amazonía Peruana. Esta característica constituye un problema de tratamiento por las recaídas que presentan los pacientes debido a una reinfección y por la presentación de cuadros clínicos más severos.

Los primeros indicios de la presencia de leishmaniosis en el Perú se remontan a épocas preincas, culturas Mochica y Nazca específicamente, en las que existieron representaciones humanas (huacos) con lesiones en el rostro, muy similares a las producidas por la leishmaniosis cutánea y mucocutánea. Posteriormente, con la llegada de los españoles al Perú, se describieron casos en los que los pobladores padecían de heridas incurables en la piel, afección denominada “Mal de los Andes”; no fue hasta fines del siglo XIX y comienzos del siglo XX que se reportaron los primeros casos clínicos de leishmaniosis en el Perú (**Sanchez et al. 2004**)

La leishmaniosis origina importantes problemas de salud pública y producen un gran impacto social, aspecto que se hace más latente en poblaciones expuestas a zonas endémicas, con la consecuente repercusión laboral y económica por los altos costos que ocasionan la hospitalización, el tratamiento y el rechazo de los enfermos por el resto de la comunidad especialmente gente de las regiones andinas que se contaminan en zonas bajas (colonos) y vuelven en las zonas altas con la enfermedad.

En el Perú, el área endémica abarca aproximadamente al 74% (951,820 Km²) del territorio nacional. El patrón de distribución endémica de la leishmaniosis cutánea se extiende a través de los valles Andinos e Interandinos y para la leishmaniosis mucocutánea se extiende a través la selva lluviosa tropical (Selva Alta y Selva Baja) (**Sanchez et al. 2004**). Esta enfermedad ha

mostrado un constante incremento tanto en el Perú como en el resto de los países de la región. En el año 2007, esta enfermedad presentó el pico más alto de infección con más de 10 000 casos anuales notificados al sistema de vigilancia entre la forma cutánea y la forma mucocutánea, con una tasa de incidencia acumulada (TIA) para la forma cutánea de 35 casos por cada 100 000 habitantes. La leishmaniosis cutánea en el Perú muestra un comportamiento cíclico con picos a intervalos de 2 a 3 años, lo que podría deberse a la especie de *Leishmania* involucrada en la transmisión, factores climáticos, densidad de los reservorios, altitud y actividades económicas. El incremento de incidencia es usualmente atribuido a cambios en el cultivo de la tierra y cambios en el patrón de actividad humana como la colonización, que conducen a un incremento en el riesgo de exposición al ciclo de vida zoonótico de la *Leishmania* (Sanchez *et al.* 2004).

En el Perú existen dos formas diferentes de leishmaniosis más prevalentes: La leishmaniosis cutánea andina, llamada también uta, tiene como especie responsable a *L. peruviana*. Esta enfermedad es prevalente en los valles oeste andinos e interandinos de la cordillera de los andes. La primera manifestación clínica de la uta es una mácula cutánea que evoluciona en una pápula, también se pueden producir pequeñas lesiones cutáneas generalmente benignas. Usualmente no presenta dolor y luego de un tiempo puede curarse espontáneamente quedando una cicatriz. Los niños son los más afectados especialmente en la zona de la cara y labios inferiores. La uta usualmente responde bien al tratamiento de primera línea con sales de antimonio (Glucantime® o Pentostam®) (Llanos-Cuentas *et al.* 2008, Arévalo *et al.* 2007).

La leishmaniosis amazónica llamada también espundia es ocasionada por la especie *L. braziliensis*. Esta enfermedad es encontrada principalmente en la selva amazónica. Se caracteriza por la presencia de lesiones cutáneas que en algunos casos incurren en metástasis, involucrando las mucosas. La espundia comienza al igual que la uta en una mácula o lesión

popular, el progreso de la lesión ulcerativa es aparentemente más rápida y más severa que en la uta. La espundia en algunos casos producirá lesiones metastásicas que involucrarán la invasión de las mucosas. La zona frecuentemente afectada es la zona de la mucosa nasal con una destrucción gradual del septum cartilaginoso y perforación del tejido.

Se sabe que la especie *L. braziliensis* es responsable del mayor número de casos reportados (49% del total), mientras el 27% es debido a *L. panamensis* y el restante 24% entre las demás especies de *Leishmania*. En términos geográficos *L. braziliensis* también es la más expandida seguida de *L. peruviana* y *L. guyanensis* (Sanchez *et al.* 2004).

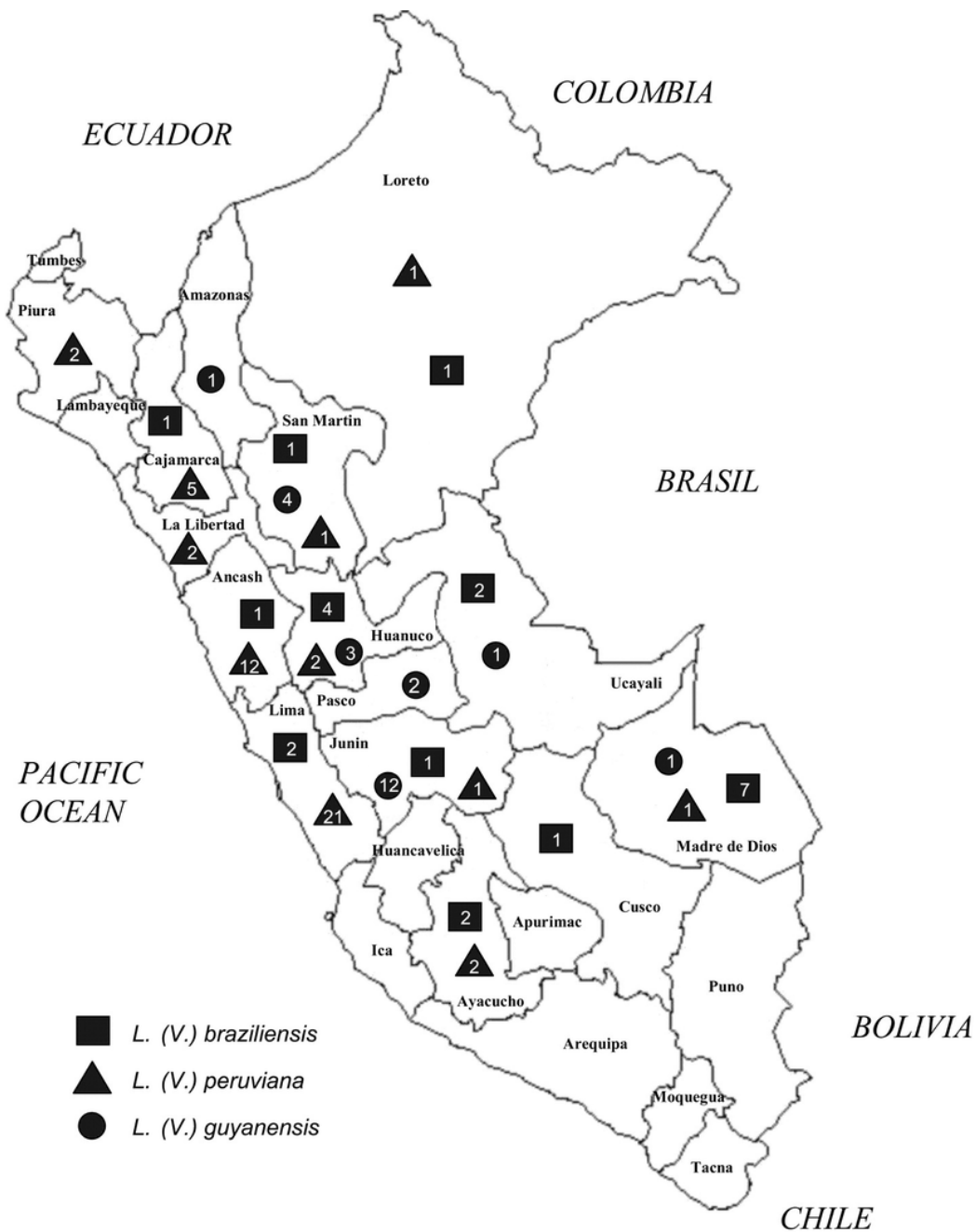


Figura 2: Distribución de especies de *Leishmania* en el Perú. Figura obtenida de Arévalo *et al.* (2007).

3.6. Tratamiento de la leishmaniosis

Actualmente las medidas de prevención o medidas de control contra la leishmaniosis no son completamente eficientes debido a muchos factores, entre ellos, la presencia de reservorios

animales no controlables. El tratamiento quimioterapéutico tiene como drogas de primera elección a los antimoniales pentavalentes (Sb V), en forma de estibogluconato de sodio (Pentostam®, Wellcome) y antimoniato de meglumine (Glucantime®, Rhône Poulenc) (**Decuypere et al 2005, Croft et al 2006**). Estos compuestos son los recomendados por la Organización Mundial de la Salud, sin embargo, estos tratamientos y otros hasta ahora ensayados no son del todo satisfactorios. Por otro lado, la Anfotericina B es una droga alternativa que es utilizada en los pacientes que no responden a la terapia con antimoniales pentavalentes. Muchos autores reportan una mayor eficacia de esta droga, sin embargo, debido a su alta toxicidad se requiere de hospitalización y monitorización cercana de estos pacientes (**Croft et al 2006**). Estos problemas de elevada toxicidad o de baja tasa de curación hacen necesaria la búsqueda de nuevas drogas o esquemas terapéuticos, priorizando la investigación en esta área.

Los métodos actuales de evaluación de una nueva droga o esquema de tratamiento implican seguir clínicamente a los pacientes tratados por periodos largos debido a la naturaleza crónica de la enfermedad y la lenta cicatrización de las úlceras (**Galvao et al. 2017**). El problema se agrava cuando se trata de poblaciones rurales dispersas. Todo ello determina un costo elevado de los estudios de evaluación de quimioterapias y que una proporción de pacientes en estudio se pierdan por migración a otros lugares.

3.6.1. Tratamiento con antimoniales pentavalentes

Los pacientes con Uta o leishmaniosis cutánea andina responden bien el tratamiento con antimoniales pentavalentes, aun cuando el tratamiento no es indispensable, ya que frecuentemente las lesiones de uta se curan espontáneamente sin haber recibido tratamiento alguno. La reactivación de estos casos es poco frecuente, pero es posible que puedan presentar lesiones mucosas por contigüidad de una lesión cutánea en el rostro como en los casos

reportados para otras especies de *Leishmania* que producen lesiones cutáneas como *L. major* y *L. aethiopica* (Hepburn 2003).

Por otro lado, los pacientes que sufren de leishmaniosis selvática con lesiones cutáneas y que hayan recibido tratamiento con antimoniales pentavalentes, pueden presentar luego de meses o incluso años, una reactivación de sus lesiones cutáneas iniciales o incluso desarrollar lesiones que comprometen las mucosas nasales. Este último caso es el resultado de una metástasis (Reveiz *et al.* 2013). Los parásitos presentes en los tejidos infectados viajan por vía linfática hacia el conducto torácico y luego por vía sanguínea hacia los tejidos mucosos. Algunos autores consideran que los parásitos responsables de las lesiones mucosas presentan cierta predilección por los tejidos mucosos.

Frecuentemente, el tratamiento con antimoniales pentavalentes que reciben los pacientes con leishmaniosis selvática o espundia es incompleto, debido a la falta de medicamento en las zonas endémicas o a los escasos recursos económicos de los pacientes para cubrir el costo. Aproximadamente el 30% de los pacientes recaen y vuelven para recibir un segundo tratamiento completo, presentando entonces una mejoría del estado de sus lesiones. Los pacientes que no responden a este segundo tratamiento son considerados como refractarios. Es importante aclarar aquí que la mejoría inicial o incluso la curación clínica a la que pueden llegar la mayoría de los pacientes al final del tratamiento no necesariamente corresponde a una curación parasitológica. En un alto porcentaje de pacientes quienes aparentemente responden al tratamiento, sus lesiones vuelven a reactivarse en menos de un año.

3.6.2. Resistencia al tratamiento con antimoniales

Existe un hecho que ha venido causando preocupación en los últimos años y es la creciente aparición de falla clínica al tratamiento de la leishmaniosis con antimoniales pentavalentes

(Rojas *et al.* 2006, Ponte sucre *et al.* 2017). Este hecho se convierte en un problema de salud público importante sobre todo en zonas endémicas, donde estas especies pueden empezar a circular en la población.

En un estudio realizado en nuestro país se reportó diferentes tasas de resistencia en pacientes con LMC tratados por 28 días con 20 mg/kg de estibogluconato de sodio (Pentostam®). En los casos de LMC leve limitado a la nariz y LMC grave que implican la cavidad oral y la nariz se encontraron 25% y 90% de resistencia respectivamente (Franke *et al.* 1990). En otro estudio realizado por el mismo grupo reportaron en pacientes con LMC grave tratados por 40 días con 20 mg/kg de Pentostam®, una tasa de resistencia del 37% (Franke *et al.* 1994). Estos trabajos describen que la tasa de resistencia de pacientes con LMC tratados con Pentostam fue del 49% (Amato *et al.* 2007). Estos hallazgos dan a entender que el único tratamiento recomendado para la leishmaniosis mucosa no es eficaz en los pacientes con enfermedad grave. Se sugiere que cursos más largos de tratamiento con antimonio o que ensayos con otros agentes anti-*Leishmania* solos o combinados con el antimonio se evalúen como terapia inicial para esta enfermedad.

Por otro lado, se reporta que la susceptibilidad intrínseca de las especies de *Leishmania* a antimonio V varía según las especies. Estudios *in vitro* utilizando el modelo de amastigote intracelular han mostrado que *L. donovani* y *L. braziliensis* son 3-5 veces más susceptibles al SbV que los amastigotes intracelulares de *L. major*, *L. tropica* y *L. mexicana* (Allen y Neal, 1989). Sin embargo, se ha reportado que las especies resistentes al tratamiento muestran una disminución en la habilidad de reducir el SbV a SbIII. Además, evidencias experimentales sugieren que existe un incremento en la concentración intracelular de glutatión y tripanotión en amastigotes intracelulares. Estos factores son importantes para la resistencia *in vitro* a SbIII y esta mediado por la sobreexpresión o amplificación de un número de diferentes genes

involucrados en la síntesis de glutatión y espermidina, dos moléculas importantes para la formación del tripanotión (**Lucas et al. 1998, Wyllie et al. 2004, Legare et al. 2001, Zhou et al. 2004, Decuypere et al. 2005**).

3.7. Plantas medicinales contra la leishmaniosis

Se estima que aproximadamente el 80% de la población mundial utiliza las plantas medicinales como la única fuente de tratamiento terapéutico frente a diversas enfermedades (**Ekor 2013**). A pesar del gran avance de los últimos años en la industria farmacéutica, drogas modernas no están disponibles o ellas son demasiado caras para la gran mayoría de las personas de bajos recursos económicos.

Las plantas son claramente una fuente potencial de nuevos fármacos antiprotozoarios. La actividad biológica de los extractos de plantas ha sido atribuida a compuestos que pertenecen a diversos grupos químicos que incluyen alcaloides, flavonoides, fenilpropanoides, esteroides y terpenoides (**Rocha et al. 2005, Wang et al. 2009**). Diferentes estrategias de investigación se han empleado con el fin de obtener una medicina herbal o un compuesto activo aislado, entre ellas podemos citar a la investigación del uso tradicional, la composición química, la toxicidad de las plantas o la combinación de estos criterios (**Rates 2001**).

En el proceso de extracción generalmente se utilizan diferentes partes de la planta y son empleados solventes de diferente polaridad. Para la purificación y el aislamiento, los extractos activos de la planta son secuencialmente fraccionados y cada fracción y / o compuesto puro puede ser evaluados a nivel de su actividad biológica y su toxicidad. Esta estrategia se denomina fraccionamiento guiado por bioensayo y permite realizar pruebas que son simples, reproducibles, rápidas y de bajo costo (**Beutler 2009, Sereno et al. 2007**).

Diversos estadios del parásito han sido utilizados para la detección de sustancias naturales biológicamente activas. Inicialmente era usual evaluar la actividad anti-*Leishmania* sobre el estadio promastigote, sin embargo, está cambiando el esquema de evaluación dado que se está utilizando con más frecuencia amastigotes axénicos o amastigotes intracelulares. Diversas pruebas utilizando drogas de referencia han mostrado que las pruebas *in vitro* en amastigotes axénicos no sólo producen resultados significativos cuando se compara con las pruebas en promastigotes, sino también son fáciles de manipular y cuantificar (**Sereno *et al.* 2007, Croft *et al.* 2006**). Esto puede lograrse utilizando varias técnicas de cuantificación como el uso de un contador de células, un método colorimétrico con alamar blue o la actividad de la fosfatasa ácida, la evaluación de la viabilidad de la población celular con un método basado en una sal de tetrazolio (MTT), la determinación de la actividad de la ornitina descarboxilasa, o el uso de un colorante fluorescente como el yoduro de propidio (**Sereno *et al.* 2007, Callahan *et al.* 1997, Mikus and Steverding 2000, Ganguly *et al.* 2006**).

Existe un gran esfuerzo por parte de los investigadores de todo el mundo para encontrar productos naturales (extractos crudos de plantas, fracciones, compuestos aislados y aceites esenciales) con actividad contra diferentes especies de *Leishmania*. Estos esfuerzos están dando sus frutos, obteniendo buenos resultados y validación de productos naturales como fuentes genuinas para el descubrimiento de fármacos (Tabla 1) (**Adebayo *et al.* 2013**).

En la tabla 1 se describe una lista de algunos compuestos naturales aislados de plantas que fueron evaluados a nivel de su actividad sobre *Leishmania* utilizando diferentes modelos biológicos.

Tabla 1: Extractos de plantas y compuestos aislados con actividad anti-*Leishmania* evaluados en modelos biológicos *in vitro* e *in vivo*

Especies de plantas	Extracto o compuesto	Modelos biológicos para evaluar la actividad <i>in vitro</i> (CI ₅₀)	Modelos biológicos para evaluar la actividad <i>in vivo</i> en ratones	Referencia
<i>Baccharis uncinella</i>	Extracto crudo	<i>L. amazonensis</i> Promastigotes (29µg/mL)	Ratones BALB/c machos infectados con 1x10 ⁶ promastigotes de <i>L. amazonensis</i> . Infección por 15 días Tratamiento intraperitoneal x 5 días a 1 y 5mg/kg peso de fracción conteniendo AO y AU Obtuvieron inhibición de carga parasitaria significativa para ambas dosis (p<0.05)	Passero <i>et al.</i> 2011 Yamamoto <i>et al.</i> 2014
	Ácido oleanólico (AO), ácido ursólico (AU), ácido cafeico (AC)	Promastigotes (AC=190µg/mL) Citotoxicidad en células J774 (AC= 500µg/mL) Índice de selectividad: 3 Amastigotes intracelulares de <i>L. amazonensis</i> (mezcla AO y AU=20µg/mL, AC=410µg/mL) y <i>L. braziliensis</i> (mezcla AO y AU=210µg/mL)		
<i>Tanacetum parthenium</i>	Extracto crudo	<i>L. amazonensis</i> Promastigotes (29µg/mL)	-	Tiuman <i>et al.</i> 2005
	Partenolida	Promastigotes (0.37µg/mL) Citotoxicidad en células J774 (14µg/mL) Índice de selectividad: 38 Amastigotes intracelulares (0.81µg/mL)		
<i>Vitis vinifera</i>	Resveratrol	<i>L. amazonensis</i> Promastigotes (27µM) Citotoxicidad en macrófagos peritoneales de ratón BALB/c (>600µM) Índice de selectividad: >22 Amastigotes intracelulares <i>L. amazonensis</i> (42µM)	-	Ferreira <i>et al.</i> 2014
<i>Piper nigrum</i>	Alcaloides (piperina y fenilamida análoga)	<i>L. amazonensis</i> Promastigotes (Piperina=14.2µM, Fenilamida=28.9µM) Citotoxicidad en macrófagos peritoneales de ratón BALB/c (>150µM) Índice de selectividad: Piperina: >10, Fenilamida: >5 Amastigotes intracelulares <i>L. amazonensis</i> (Piperina=28µM, Fenilamida=24.5µM)	-	Ferreira <i>et al.</i> 2011
<i>Dictyota paffii</i>	Dolabelladienetriol	<i>L. amazonensis</i> Promastigotes ND (a 50µM inhibe el 84%) Citotoxicidad en Raw Cells (>200µM) Amastigotes intracelulares (43.9µM)	-	Soares <i>et al.</i> 2012

3.8. Comunidades indígenas

De acuerdo con el censo del año 1993 las comunidades indígenas del Perú presentan una población de 299,218 habitantes, distribuida en 1450 comunidades pertenecientes a 65 pueblos étnicos. El departamento de Loreto presenta la mayor diversidad de pueblos étnicos. En este departamento, las comunidades con mayor población son los Chayahuita (22%), los Quichua-Napo-Pastaza (17%), los Cocama-Cocamilla (15%) y los Aguaruna (8%).

Los lugares de colecta para la ejecución del presente trabajo fueron: Comunidad Chayahuita, Comunidad Yanesha y el pueblo Iñapari (Yanapari). Las 3 zonas estudiadas se ubican en áreas endémicas de leishmaniasis cutánea y mucocutánea. Los diferentes hábitats permitieron una búsqueda más amplia de nuevas plantas bioactivas. Etnofarmacológicamente no se había trabajado hasta ahora en las comunidades nativas Chayahuita y Yanesha.

3.8.1. Comunidad Chayahuita

La comunidad Chayahuita (Shawi) se ubica al Noreste del Perú, en el departamento de Loreto, provincia de Balsapuerto y distrito de Cahuapanas. Debido a su alta exposición a leishmaniosis (**Lucas et al. 1998**), ellos utilizan fitomedicinas para tratar o para aliviar los síntomas asociados con esta parasitosis. Trabajos previos sobre este grupo étnico mostraron la importancia de la evaluación de diversas plantas utilizadas contra la leishmaniosis y la malaria. **Kvist et al. (2006)** reportaron el uso de 47 plantas útiles para combatir la leishmaniosis o Wayani (en lengua Shawi). **Odonne et al. (2014)** indican que el látex de la planta *Copaifera paupera* colocado a manera de emplasto es útil para combatir la Uta.

3.8.2. Comunidad Yanesha

Sobre la comunidad Yanesha solo se tienen reportes de su sistema agrícola y nutrición (**Halim y Salick 2003**). Parece que en esta comunidad no hay evidencias de casos de leishmaniosis

mucocutánea. Sin embargo, existe un reporte que indica que esta comunidad si conoce a la leishmaniosis cutánea o uta y se le nombra a la enfermedad con un nombre propio de Yanasha: Mareñets (**Bourdy *et al.* 2008**).

Debido a que la farmacopea Yanasha ha sido poco estudiada y por ser un área endémica de malaria y leishmaniosis, es importante documentar y validar el uso tradicional de sus plantas utilizadas contra estas enfermedades.

3.8.3. Pueblo Iñapari

El pueblo de Iñapari se ubica en la provincia Tahuamanu, en el departamento de Madre de Dios. En el Departamento de Madre de Dios el número de casos diagnosticados en el año 2015, según su clasificación clínica, se observa un incremento en los dos últimos años de la forma cutánea que es predominante sobre la forma mucocutánea. Esta enfermedad está relacionada a las actividades económicas extractivas como la madera y castaña principalmente.

El pueblo de Iñapari ha presentado un incremento de casos de Leishmaniosis cutánea siendo reportados 14 casos en el año 2008 y 21 casos en el año 2015, Se cree que este valor puede seguir incrementándose debido a las deficiencias de atención medica en la zona (**Morales & Manrique 2016**).

IV. JUSTIFICACION DEL ESTUDIO

El uso de sales de antimonio V ha sido recomendada desde hace varias décadas como la mejor opción para el tratamiento de la leishmaniosis causada por parásitos de *Leishmania sp.* Sin embargo, el incumplimiento del tratamiento por parte del paciente, el desarrollo de resistencia y la falta de nuevas opciones de tratamientos han limitado drásticamente el éxito en la erradicación de la enfermedad.

En muchas áreas endémicas a leishmaniosis, la enfermedad es bien conocida y las personas locales utilizan métodos folklóricos para prevenir y tratar la enfermedad (**Passero et al. 2014**). Cierta número de estas plantas usadas en la medicina tradicional han sido evaluadas desde el punto de vista científico. Diversos trabajos han reportado el uso de diferentes ensayos de alto rendimiento para evaluar nuevas moléculas con potencial actividad anti-*Leishmania*. (**Siqueira-Neto et al. 2010, De Muylder et al. 2011**). Las evaluaciones primarias a menudo se dirigen a la etapa del estadio promastigote debido a su facilidad del cultivo y manipulación. Sin embargo, el promastigote al ser la forma del parásito que habita en el insecto vector, no es el blanco apropiado para un posible compuesto anti-*Leishmania*. (**Fumarola et al. 2004 Siqueira-Neto et al. 2010, San George et al. 2006, Sharlow et al. 2009, Grogl et al. 2013**). Es debido a ello que está cambiando el esquema de evaluación dado que se está aplicando con más frecuencia ensayos de alto rendimiento que utilizan amastigotes axénicos o amastigotes intracelulares (**Callahan et al, 1997, Buckner y Wilson 2005**). Diversas pruebas utilizando drogas de referencia han mostrado que las pruebas *in vitro* en amastigotes axénicos no sólo producen resultados significativos cuando se compara con las pruebas en promastigotes, sino también son fáciles de manipular y cuantificar (**Sereno et al. 2007, Hodgkinson et al. 1996, Croft et al. 2006**).

Los algoritmos de evaluación de nuevas moléculas con potencial actividad anti-*Leishmania* descritos hasta la actualidad describen el uso de promastigotes o amastigotes axénicos de las especies de *L. major*, *L. donovani* y *L. infantum* (Siqueira-Neto *et al.* 2010, De Muylder *et al.* 2011, De Rycker *et al.* 2013, Vermeersch *et al.* 2009). En especies de *Leishmania* del nuevo mundo se ha descrito el uso de promastigotes de *L. braziliensis* y *L. amazonensis* como punto de partida para realizar cribados de alto rendimiento. Aquellos compuestos más activos son luego evaluados sobre macrófagos murinos o líneas celulares infectados con promastigotes de *L. braziliensis* o amastigotes de *L. amazonensis* aislados de lesión (Zauli-Nascimento *et al.* 2010, Veiga *et al.* 2017, Garcia *et al.* 2017, Farias *et al.* 2017). Las limitaciones en el uso de macrófagos infectados con promastigotes es el elevado número de parásitos para infectarlos y más aún si se utilizan líneas celulares de macrófagos. Por otro lado, el uso de amastigotes aislados de lesión aportan un estadio muy virulento por lo que se necesitaría menos parásitos para infectar macrófagos murinos o líneas celulares de macrófagos. Sin embargo, la limitante es que se necesitaría una reserva constante de animales de laboratorio infectados para proveer las cantidades necesarias de parásitos para abordar este tipo de experimentos, especialmente si se van a hacer cribados de alto rendimiento.

En vista a las limitantes que tienen las metodologías antes mencionadas es que se implementó un algoritmo de evaluación anti-*Leishmania* de alto rendimiento utilizando amastigotes axénicos de *L. amazonensis*. Este modelo biológico permitió evaluar diversas plantas medicinales utilizadas en la Amazonia como tratamiento contra la leishmaniosis. Además, el modelo de amastigote axénico permitió realizar un bioguiaje con el fin de seleccionar los compuestos activos anti-*Leishmania*. Aquellos compuestos más activos y menos citotóxicos fueron evaluados sobre macrófagos murinos infectados con cultivos continuos de amastigotes axénicos de *L. amazonensis*. Finalmente, aquellas moléculas más activas sirvieron para

implementar el modelo de evaluación *in vivo* utilizando ratones BALB/c infectados con amastigotes de *L. amazonensis* obtenidos de lesión.

V. OBJETIVOS

5.1. General:

Establecer un algoritmo de evaluación biológico *in vitro* e *in vivo* para evaluar compuestos con actividad anti-*Leishmania* aislados a partir de plantas del Perú.

5.2. Específicos:

Implementar un bioensayo de actividad anti-*Leishmania in vitro* basado en el uso de amastigotes axénicos de *L. amazonensis* para evaluar la actividad de extractos de plantas peruanas, compuestos naturales y de síntesis.

Utilizar un modelo de macrófagos peritoneales de ratón BALB/c para evaluar la citotoxicidad y el índice de selectividad de los compuestos naturales y derivados de síntesis.

Implementar un modelo de evaluación de compuestos con mejor índice de selectividad sobre macrófagos murinos infectados con amastigotes axénicos de *L. amazonensis*.

Evaluar los mejores candidatos en el modelo de infección *in vivo* utilizando ratones BALB/c infectados con amastigotes intralesionales de *L. amazonensis*.

VI. METODOLOGIA

6.1. Diseño de estudio

El estudio *in vitro* del presente trabajo es un estudio experimental de tipo transversal prospectivo. Se evaluó de manera experimental los valores de concentración inhibitoria media (IC₅₀) y la concentración citotóxica media (CC₅₀) de los compuestos naturales aislados y sintéticos activos contra el parasito intracelular *Leishmania*.

El estudio *in vivo* del presente trabajo es un estudio experimental de tipo longitudinal prospectivo. Se evaluó de manera experimental los valores de carga parasitaria y tamaño de lesión en las almohadillas plantares de ratones infectados con 3 especies de *Leishmania*.

6.2. Población y muestra

Se evaluó la actividad anti-*Leishmania* de compuestos naturales y de síntesis en modelos de infección *in vitro* e *in vivo* utilizando parásitos de la especie *L. amazonensis*.

6.3. Operación de variables

6.3.1. Variable dependiente

La inhibición del crecimiento de los parásitos del género *Leishmania* en los modelos de infección *in vitro* e *in vivo*.

6.3.2. Variable independiente

Compuestos naturales aislados e identificados o compuestos derivados de síntesis.

6.4. Procedimientos y técnicas

6.4.1. Colecta de Plantas

Un grupo de biólogos especialistas en etnobotánica compuesto por los doctores Céline Valadeau, Guillaume Odonne y Geneviève Bourdy del Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD), la Dra. Joaquina Alban del Museo de Historia Natural de la UNMSM y la bióloga Elsa Rengifo del Instituto de Investigación de la Amazonia Peruana (IIAP) colectaron las plantas con potencial actividad anti-*Leishmania* del pueblo de Yanapari ubicado en el departamento de Madre de Dios, de la comunidad Yanesha ubicada en el departamento de Pasco y de la comunidad Chayahuita ubicada en el departamento de Loreto; se utilizaron técnicas de colección, herborización y prensado estandarizadas y se anotó la información detallada sobre los conceptos nativos de la enfermedad, la manera de usar las plantas, la parte de la planta utilizada, su(s) nombre común(es), lugar y fecha de recolección. Se prepararon los ejemplares respectivos y se depositaron en el Herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y el IIAP.

Se colectaron 149 especies de plantas con potencial actividad anti-*Leishmania* de la Amazonía. Se colectó 82 especies de plantas de la Comunidad Yanesha, 56 especies de plantas de la Comunidad Chayahuita y 7 especies de plantas del pueblo Yanapari. Las plantas y los órganos que fueron colectados se describen en las tablas 2, 3 y 4 respectivamente.

6.4.2. Producción de los extractos crudos y obtención de compuestos naturales

La producción de extractos etanólicos fueron realizados por el Dr. Billy Cabanillas y la MsC. Candy Ruiz dirigidos por la Dra. Rosario Rojas y el Dr. Michel Sauvain en la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), para ello se entregaron las plantas para el secado, pulverizado y macerado en etanol absoluto, posteriormente se procedió con el fraccionamiento

utilizando inicialmente diferentes solventes, seguido de fraccionamiento en columna y métodos cromatográficos.

6.4.2.1. Extracción

Las plantas fueron secadas y molidas, posteriormente fueron mezcladas con etanol en una relación de 1/10 (1 gramo de la planta seca pulverizada con 10ml de etanol absoluto), maceró por 7 días a temperatura ambiente, posteriormente se filtró y el etanol se evaporó utilizando un rota evaporador bajo presión reducida a 40°C. Posteriormente el extracto etanólico fue fraccionado utilizando solventes de polaridad diferente (éter de petróleo, diclorometano, metanol y agua)

6.4.2.1.1. Fracción Diclorometano

Se disolvió 20 gramos del extracto etanólico seco en un volumen de agua-diclorometano en una relación de 1:1 en una pera de decantación. Se dejó reposar por un día hasta la formación de las fases bien definidas. Se separó la fase orgánica (diclorometano) de la fase acuosa. Luego la fracción diclorometano fue disuelto en metanol y particionado con éter de petróleo.

6.4.2.1.2. Fracción Acuosa

La fase acuosa fue fraccionada otra vez con diclorometano. Se juntaron las fases orgánicas y se concentraron hasta sequedad en un rotavapor.

6.4.2.2. Métodos cromatográficos

6.4.2.2.1. Cromatografía en capa fina (TLC)

Los extractos y fracciones se analizaron en placas de capa fina de aluminio en fase normal recubiertas con sílica gel 60 F254 (Merck) y fase inversa recubiertas con sílica gel 60 RP-18

F254S (Merck). Las placas se colocaron sobre cubetas saturadas con un eluyente apropiado. Se revelaron las placas con vainillina sulfúrica al 1%.

6.4.2.2.2. Cromatografía en columna abierta

Las cromatografías en columna se llevaron a cabo con diferentes tipos de fases estacionarias sobre columnas de vidrio. El tamaño y diámetro de la columna se seleccionó de acuerdo con la cantidad de muestra a ser purificada y la resolución deseada.

La fase estacionaria utilizada fue de sílica gel 60 Å 40-63 micras (Merck) y sílica gel 60 Å RP-18 40-60µm (Merck). La cantidad de sílica usada fue 30 a 40 veces la cantidad de muestra extraída. Muestras de fraccionamiento se depositaron en forma sólida o en mezcla con la sílica en forma líquida.

Las cromatografías de exclusión se realizaron en Sephadex ® LH20 de gel (Sigma Aldrich).

6.4.2.2.3. Cromatografía líquida de mediana presión (MPLC)

La cromatografía líquida de mediana presión (MPLC) se realizó utilizando una bomba de Büchi 688, sobre columnas de cromatografía mediana presión en vidrio Büchi ®.

Como fase estacionaria, se utilizó un sílica gel 60 Å 6-35 µm (SDS). Las muestras se colocaron en forma sólida y se mezclaron con la fase estacionaria. La columna se eluyó con un caudal de entre 10 y 20mL / min bajo una presión de 2 bar.

6.4.3. Obtención de compuestos derivados de síntesis

El Dr. José Carlos Aponte bajo la tutela del Dr. G. Hammond de la Universidad de Louisville-USA sintetizó 43 compuestos pertenecientes a la familia de las Chalconas y 38 compuestos pertenecientes a la familia de las Tetrahidrobenzotienopirimidinas (BTPs).

El Doctor Asunción Burguete bajo la supervisión del Dr. Antonio Monge de la Universidad de Navarra en Pamplona, España, sintetizó 13 compuestos sintéticos derivados de quinoxalinas.

Finalmente, la Doctora Valérie Jullian integrante de nuestra unidad de investigación UMR-152 (IRD-Francia) sintetizó 3 compuestos pertenecientes a la familia de las benzo[c]fenantridinas en el Laboratorio Pharmadev de la Facultad de Farmacia en la Universidad de Toulouse, Francia.

Todos los compuestos fueron enviados al Laboratorio de Parasitología Celular ubicado en los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) en la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

6.4.4. Evaluación *in vitro*

6.4.4.1. Cultivo de parásitos

Leishmania (Leishmania) amazonensis (cepa MHOM/BR/76/LTB-12), fue mantenida como amastigotes axénicos a 32°C, con sub-pasajes cada 4 días para obtener parásitos en fase de crecimiento exponencial. El cultivo fue iniciado con un inóculo de 3×10^6 amastigotes/mL en medio de cultivo MAA (medio para el crecimiento de amastigotes axénicos) suplementado con 20% de suero fetal bovino (SFB, DE 14-801F, BioWhittaker Cambrex) en frasco de cultivo celular de 25cm² (Serenio and Lemesre, 1997a).

Leishmania (Viannia) peruviana (cepa MHOM/PE/--/LCA08) y *Leishmania (Viannia) braziliensis* (cepa PER006), fueron mantenidas en estadio promastigote en un medio bifásico, compuesto de una fase sólida de agar sangre y una fase líquida de 0.89% NaCl (Sigma) a pH 7.4 y 24°C, con sub-pasajes cada 4 días. El cultivo de promastigotes fue realizado en 5mL de medio M199 (Invitrogen), pH 7.4, suplementado con 10% de SFB, en un frasco de cultivo celular de 25cm². El cultivo se inició con un inóculo de 5×10^6 promastigotes/mL, en fase de crecimiento exponencial, alcanzando la fase estacionaria después de 4 días de incubación a

24°C. Los promastigotes en fase estacionaria de la curva de crecimiento fueron centrifugados por 10 minutos, a 1500g (4°C), el sobrenadante fue descartado y reemplazado por 5mL de medio M199, pH 5.5, suplementado con 20% SFB en un frasco de cultivo celular de 25cm². La transformación a amastigotes axénicos se logró incubando los frascos de cultivo celular de 25cm² a 34°C por 96 horas en una atmósfera normal (**Sereno & Lemesre, 1997a**).

6.4.4.2. Extracción y cultivo de macrófagos peritoneales de ratón BALB/c

Los macrófagos fueron colectados de la cavidad peritoneal de ratones hembras de la cepa BALB/c de 6-8 semanas de edad en medio M199 a 4°C, suplementado con 10% de SFB (**Sauvain et al, 1993**). La viabilidad y la concentración de células recuperadas fueron determinadas por el método del colorante rojo neutro (Sigma). Este método se utilizó para discriminar entre los macrófagos y otras células, debido a que solo los macrófagos fagocitan este reactivo (debido a su propiedad fagocítica de estas células) tornándose de un color rojo. Los macrófagos peritoneales de ratón fueron colocados sobre laminillas estériles (dispuestas previamente de manera individual por pozo) en las microplacas de 96 pozos a una concentración de 5×10^4 macrófagos/ml y luego fueron incubados a 37°C bajo una atmósfera de 5% CO₂ por 2 horas. Las células no-adheridas fueron removidas lavando dos veces con medio M199 pre-temperado a 37°C, y seguidamente se colocaron 100µL de medio M199 suplementado con 10% de SFB por pozo y se incubó por 24 horas a 37°C bajo una atmósfera de 5% CO₂.

6.4.4.3. Fraccionamiento guiado por bioensayo

Todos los extractos etanólicos de plantas provenientes de las colectas realizadas en el pueblo de Yanapari y las comunidades Chayahuita y Yanesha fueron evaluados en el bioensayo de actividad anti-*Leishmania* utilizando el modelo biológico del amastigote axénico. Los extractos

etanólicos que mostraron actividad anti-*Leishmania* fueron sometidos a un proceso de fraccionamiento biodirigido utilizando solventes de diferente polaridad. Una vez obtenidas las fracciones, cada una de ellas fue evaluada nuevamente en el bioensayo de actividad anti-*Leishmania*. Aquellas fracciones que mostraron actividad en el modelo biológico de amastigote axénico fueron sometidas a más fraccionamientos y se procedió así sucesivamente hasta aislar los principios activos. Los principales parámetros para realizar el fraccionamiento guiado por bioensayo fueron la actividad de los extractos etanólicos sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis* (Concentración inhibitoria media menor de 10µg/mL), la novedad de la especie vegetal a nivel de la actividad anti-*Leishmania*, la cantidad disponible del material vegetal para continuar con el fraccionamiento biodirigido, la naturaleza físico-química de las fracciones a separar, la capacidad de las fracciones de solubilizarse en solventes apropiados para realizar pruebas biológicas (principalmente DMSO) y la cantidad de material químico disponible para continuar con el fraccionamiento.

Se determinó la concentración inhibitoria media (CI₅₀) de los compuestos que tienen actividad anti-*Leishmania* utilizando el micrométodo enzimático descrito por **Sereno & Lemesre (1997b)**. Este método consistió en colocar 100µL (2×10^5 parásitos totales) de amastigotes axénicos de *L. amazonensis* en fase de crecimiento logarítmico por pozo en una microplaca de 96 pozos de fondo plano. Luego se adicionaron los extractos, fracciones o compuestos, disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma), en un rango de concentración final entre 0,1µg/mL a 100µg/mL. La concentración final máxima de DMSO fue de 1% en todos los experimentos realizados. El compuesto de referencia usado fue la anfotericina B (Sigma) en un rango de concentración entre 0.01µM y 1µM y el solvente DMSO a las concentraciones de 0.1% y 1%. Después de 72h de incubación a 32°C, se agregaron 10µL de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (10mg/ml; Sigma) a cada pozo y las

placas fueron incubadas 32°C por 4h. La reducción enzimática de las moléculas de MTT por enzimas deshidrogenasas mitocondriales (presentes en los parásitos viables) se evidenció por la formación de una sal de color azul insoluble llamada Formazán. La reacción fue detenida adicionando 100µL de 50% isopropanol (Sigma)-10% dodecil sulfato de sodio (SDS, Sigma) e incubando por 30 minutos, bajo agitación a temperatura ambiente. Finalmente, se leyó la absorbancia a 595nm, con el lector de microplacas Chameleon V(Hidex).

El porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \left(\frac{\text{Abs. control} - \text{Abs. compuestos}}{\text{Abs. control}} \right) \times 100$$

La concentración que inhibió el 50% del crecimiento del parásito (CI₅₀) fue calculado utilizando el programa Probit como modelo de regresión. El análisis se realizó con el paquete de software Excel 2016 para Windows (Araya *et al.* 2003).

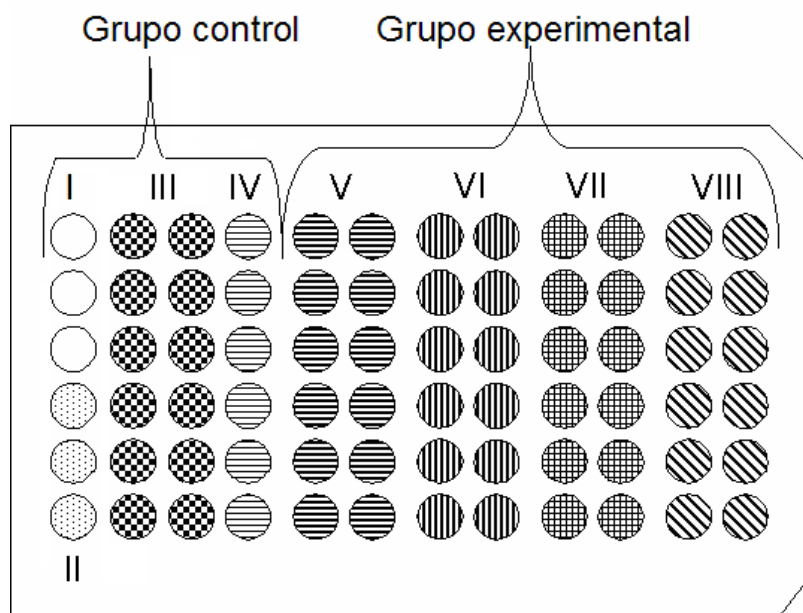
6.4.4.4. Evaluación de la citotoxicidad

Los macrófagos murinos extraídos y cultivados (descritos en el punto 6.4.4.2) fueron expuestos a diluciones seriadas de cada compuesto por triplicado y se comparó la viabilidad con el método de exclusión del colorante azul de tripán. La exclusión de dicho colorante por las células vivas fue visible bajo la luz del microscopio óptico con un objetivo de 40X, seguido de la determinación y comparación de la citotoxicidad de la actividad de los compuestos (Castillo *et al.* 2007). Esto permitió obtener la concentración citotóxica que ocasionó la muerte celular del 50% de la población de macrófagos murinos (CC₅₀) para cada compuesto.

Los macrófagos murinos adheridos sobre láminas dentro de las placas de 96 pozos fueron incubados por 24h a 37°C en presencia de 5% de CO₂. Se realizaron diluciones seriadas de los

compuestos en un rango entre 0.1µg/mL - 100µg/mL. Los compuestos fueron diluidos en medio completo a un volumen final de 100µL y se añadieron sobre las células. El cultivo se mantuvo por 48h a 37°C en presencia de 5% de CO₂. Los controles fueron la Anfotericina B en un rango de concentración entre 1µM y 10µM y el solvente DMSO a una concentración de 0,1% y 1%. Después de la incubación, las láminas fueron colocadas sobre el hemocitómetro de Neubauer con 0.4% de una solución de azul de tripán en PBS 0.01M. Se determinó el número de células viables en cada laminilla a 40X de aumento en un microscopio de luz óptica. Se calcularon los porcentajes de supervivencia relativa a las células control de crecimiento y se determinó la CC₅₀ usando el programa Probit.

El esquema de trabajo se describe a continuación:



Dónde:

- I = Medio de cultivo
- II = Macrófagos
- III = Macrófagos + Droga de referencia (Anfotericina B)

IV = Macrófagos + DMSO (Diluyente de los compuestos)

V - VIII = Macrófagos + Compuestos a evaluar

6.4.4.5. Cálculo del índice de selectividad

El índice de selectividad (IS) permitió determinar la potencia de un compuesto. El IS se calculó dividiendo la concentración citotóxica media (CC₅₀), que es la cantidad de un compuesto necesaria para ocasionar la muerte celular del 50% de las células mamíferas no infectadas, sobre, la concentración inhibitoria media (CI₅₀), que es la cantidad de compuesto necesario para causar el 50% de inhibición del crecimiento del amastigote axénico. Un IS superior a 10 demostró una baja toxicidad celular con actividad específica sobre el parásito (**Ribeiro *et al.* 2014, Ndjakou Lenta *et al.* 2007**).

6.4.4.6. Evaluación de los compuestos naturales aislados y de síntesis sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania*.

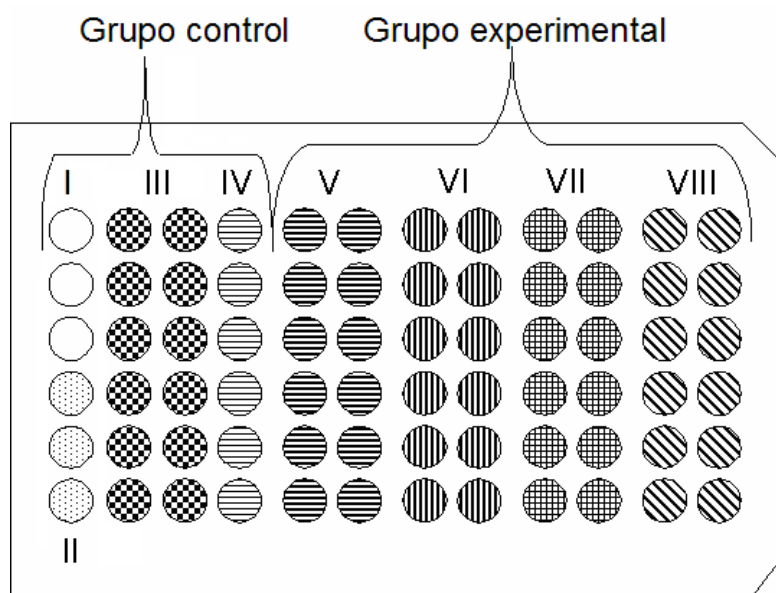
Los compuestos purificados naturales y derivados de síntesis que tuvieron un índice de selectividad mayor a 10 fueron evaluados en el modelo biológico de amastigotes intracelulares en macrófagos peritoneales de ratón BALB/c previamente validado por nuestro grupo de investigación (**Gonzales *et al.* 2009**). Este ensayo es importante puesto que es el que más se aproxima a la situación real en la infección en el hospedero mamífero y que permite confirmar la selectividad del compuesto en contra del parásito intracelular.

La evaluación de los compuestos sobre el modelo biológico de amastigotes intracelulares se realizó mediante la infección de macrófagos peritoneales de ratón con amastigotes axénicos de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. peruviana*. Este modelo se realizó en microplacas de 96 pozos permitiendo evaluar 3 compuestos a 4 concentraciones por triplicado. Se colocó controles apropiados del solvente de extractos (DMSO) y el control positivo Anfotericina B.

Los macrófagos murinos extraídos y cultivados (descritos en el punto 6.4.4.2) fueron infectados con amastigotes axénicos de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. peruviana* a una relación o ratio de 3 amastigotes por cada macrófago. Se cultivaron en 100µL de medio M199 suplementado con 10% de SFB por 4 horas a 33°C en presencia de 5% de CO₂. Los parásitos no adheridos a los macrófagos fueron eliminados mediante dos lavados con medio M199 simple atemperado a 33°C para evitar el desprendimiento celular. Posteriormente se incubó en medio M199 suplementado con 10% de SFB por 24 horas a 33°C en presencia de 5% de CO₂. Luego de 24 horas de cultivo se colocó medio M199 10% de SFB fresco conteniendo los compuestos naturales o derivados de síntesis y la droga de referencia Anfotericina B a concentraciones apropiadas por 48 horas. Finalmente, las láminas fueron teñidas con el colorante Giemsa y evaluadas en un microscopio de luz óptico a 100X de magnificación.

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado en una placa de 96 pozos y se repitió el ensayo 3 veces para tener replicas experimentales independientes.

El esquema de trabajo se describe a continuación:



Dónde:

I = Control de Macrófagos no infectados

II = Control de Macrófagos Infectados

III = Macrófagos Infectados + Droga de referencia (Anfotericina B)

IV = Macrófagos Infectados + DMSO (Diluyente de los compuestos)

V – VIII = Macrófagos Infectados + Compuestos a evaluar

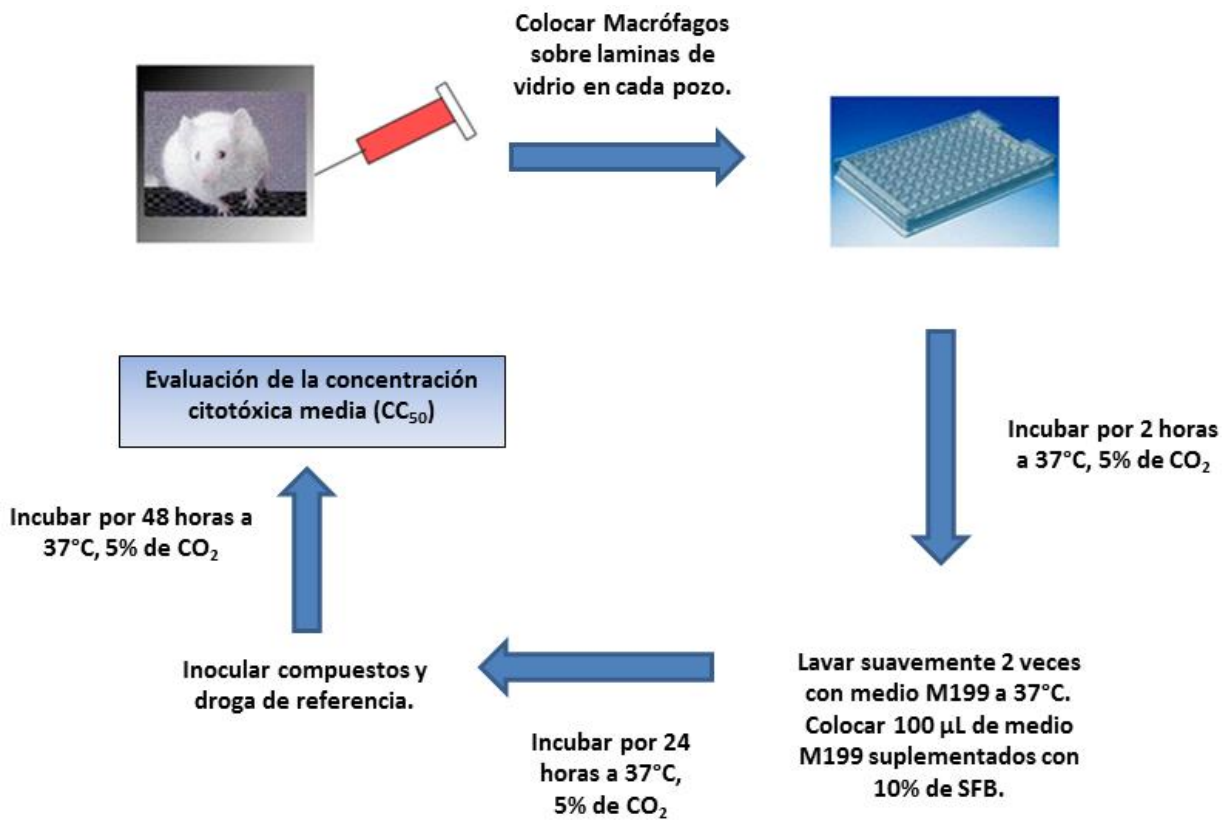


Figura 3: Diagrama de extracción de células e inoculación de compuestos y droga de referencia.

6.4.5. Evaluación *in vivo*

Los compuestos naturales y de síntesis candidatos que fueron seleccionados mediante los modelos de evaluación *in vitro* establecidos en este trabajo, fueron finalmente evaluados en un modelo *in vivo* de infección de *Leishmania* en el ratón BALB/c. Este modelo ha sido utilizado para reproducir el desarrollo de la infección en etapas tempranas de infección. El desarrollo de este modelo es de larga duración (8 semanas de seguimiento) y su costo por lo tanto es elevado. Para asegurar la robustez estadística de los resultados obtenidos en una sola repetición, se decidió que cada grupo esté conformado por 10 ratones.

La evaluación *in vivo* consistió en 3 eventos. El primer evento consistió en evaluar la dosis inicial de parásitos de *L. amazonensis* para infectar de manera controlada a los ratones BALB/c. El segundo evento consistió en evaluar los parámetros de toxicidad del solvente utilizado para disolver los compuestos. Finalmente, el tercer evento consistió en evaluar la actividad anti-*Leishmania* de los compuestos candidatos ($IS \geq 10$ en el modelo *in vitro*) utilizando las técnicas de medida de la progresión de la lesión y la carga parasitaria. Los criterios de selección de los compuestos que se evaluaron en este modelo *in vivo* son: i) La actividad del compuesto puro en los modelos de evaluación *in vitro*, ii) La relevancia del compuesto a evaluar tomando en cuenta la bibliografía actual y iii) la cantidad del compuesto puro disponible para realizar el tratamiento a los ratones infectados con *L. amazonensis*. Este último factor es relevante cuando se trata de compuestos aislados de plantas medicinales que son generalmente aislados en cantidades reducidas.

6.4.5.1. Mantenimiento de ratones BALB/c

Se utilizaron ratones BALB/c adquiridos del bioterio de la UPCH. Se utilizaron criterios adecuados para la crianza, mantenimiento y sanidad de los ratones. Los parámetros de

temperatura fueron de 25°C con una humedad relativa de 65% durante todo el tiempo que duraron los experimentos. La alimentación balanceada y el recambio de agua potable se realizaron 3 veces por semana.

Al finalizar los experimentos los animales fueron eutanizados siguiendo las normas establecidas por el comité de ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

6.4.5.2. Evaluación de la carga parasitaria inicial

Este método consistió en estandarizar los parámetros de infección *in vivo* utilizando como modelo de infección murino al ratón BALB/c. Para ello, se inocularon amastigotes de *L. amazonensis* en 3 dosis de infección inicial administrados a 3 grupos de 10 ratones cada uno. Las dosis fueron administradas por vía subcutánea sobre la almohadilla plantar de ambas patas posteriores.

Para realizar el experimento se eutanizó un ratón reservorio con una infección de 6 semanas con *L. amazonensis*. El tejido infectado se extrajo de la almohadilla plantar y se homogenizó en una malla de disgregación celular de 40µm (BD Falcon) con 1mL de medio Schneider a 4°C. Una alícuota del homogenizado conteniendo los amastigotes provenientes de la lesión (amastigotes intra-lesionales) fueron cuantificados mediante la microscopia de fluorescencia que consiste en utilizar el reactivo de Kovac's (PBS 0.01M conteniendo 30µg/ml de diacetato de fluoresceína (FDA), 600µg/ml de bromuro de etidio y 200µg/ml de naranja de acridina) como buffer de dilución de parásitos. El FDA luego de ingresar en células vivas, por ser permeable a la membrana celular, es cortado por las enzimas esterases ubicadas en el citosol produciendo fluorescencia verde (**Palomino et al. 1991**). La naranja de acridina es una molécula que se intercala en el ácido desoxirribonucleico (ADN) permitiendo diferenciar el núcleo y el kinetoplasto del parásito *Leishmania* (**Lopez et al. 2003**). El Bromuro de etidio

permite diferenciar a las células muertas dado que, al no haber integridad de membrana, esta molécula ingresa y se tornan las células de color rojo.

La dosis de infección inoculada a cada grupo fue de 5×10^4 amastigotes/ratón, 5×10^5 amastigotes/ratón y 5×10^6 amastigotes/ratón. Un grupo control de ratones fueron inoculados con el vehículo PBS 0.01M.

Se evaluó la progresión de la infección midiendo el diámetro de la lesión sobre ambas patas posteriores infectadas utilizando un calíper digital. Esta medida se realizó 1 vez por semana durante todo el experimento (6 semanas).

6.4.5.3. Pruebas de toxicidad del solvente en el modelo animal de ratón BALB/c

Este método consistió en la evaluación del solvente orgánico compuesto por 4% de Tween 20 y 5% de DMSO mezclado con el tampón fosfato salino (PBS) 0.01M, a nivel de su toxicidad aguda sobre ratones BALB/c de 6 semanas de edad.

A un grupo de 10 ratones sanos se inoculó 20 μ L de la mezcla, 3 días a la semana durante un periodo de 4 semanas (12 inoculaciones en total).

6.4.5.4. Evaluación de la actividad anti-*Leishmania* de los compuestos candidatos

Este experimento permitió observar el efecto que tiene la administración por vía intralesional de 11 compuestos sobre ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis*.

6.4.5.4.1. Infección

Se formaron 13 grupos de 10 ratones BALB/c cada uno. Todos los ratones fueron infectados con 5×10^4 amastigotes sobre la almohadilla plantar de ambas patas posteriores utilizando amastigotes intra-lesionales provenientes de un ratón BALB/c reservorio descrito en el punto 6.4.5.2.

6.4.5.4.2. Tratamiento

Los ratones infectados fueron tratados con 5 compuestos pertenecientes a la familia de las chalconas, 3 compuestos pertenecientes a la familia de las tetrahydrobenzotienopirimidinas (BTP) y 3 compuestos pertenecientes a la familia de las benzo[*c*]fenantridinas.

El tratamiento intralesional se inició una semana post-infección y consistió en la administración de 20µL de la solución a una dosis de 5mg/kg de peso por vía intralesional en la almohadilla plantar de la pata posterior derecha de los ratones infectados, la pata posterior izquierda fue el control y no se trató. Este tratamiento se realizó 3 veces por semana durante 3 semanas.

El tratamiento con Glucantime® (control positivo) consistió en la administración de 20µL de Glucantime® a 100mg/kg de peso por vía intralesional en la almohadilla plantar de la pata posterior derecha de los ratones infectados, la pata posterior izquierda fue el control y no se trató con Glucantime®. Este tratamiento se realizó 3 veces por semana durante 3 semanas.

El grupo control se inició una semana post-infección y consistió en la administración de 20 µL del vehículo (PBS 0.01M conteniendo 4% de Tween20 y 2% de DMSO) por vía intralesional en la almohadilla plantar de la pata posterior derecha de los ratones infectados, la pata posterior izquierda fue el control y no se trató. Este tratamiento se realizó 3 veces por semana durante 3 semanas.

6.4.5.4.3. Medida de la progresión de la enfermedad experimental

En todos los tratamientos se evaluó la progresión de la lesión midiendo el diámetro de la lesión sobre ambas patas posteriores infectadas utilizando un calíper digital. Esta medida se realizó 1 vez por semana durante todo el experimento (7 semanas).

6.5.5.4.4. Evaluación de la carga parasitaria

Tres ratones de cada grupo experimental fueron eutanizados al finalizar el tratamiento (4ta semana post infección) y en la 3ra semana post tratamiento (7ma semana post infección) para la evaluación de la carga parasitaria. Esta evaluación se realizó utilizando el método descrito por **Correa *et al.* 1990**, que consistió en la cuantificación del número de amastigotes intralesionales obtenidos de los tejidos infectados de ambas patas posteriores mediante la técnica de microscopía en fluorescencia utilizando el reactivo de Kovac's. Esta técnica permitió expresar la carga parasitaria como el número de amastigotes por miligramo de tejido infectado.

6.5. Consideraciones éticas

El proyecto de tesis fue aprobado por el Comité Institucional de Ética para el Uso de Animales (CIEA-UPCH) con código de registro 40-04-16 y código SIDISI 66680.

6.6. Plan de análisis

Todos los experimentos de evaluación biológico en modelos *in vitro* fueron realizados por triplicado en 3 repeticiones independientes. Los resultados de promedio de porcentaje de inhibición, concentración inhibitoria media (CI₅₀) y concentración citotóxica media (CC₅₀) fueron expresados como promedios con desviación estándar.

Todos los experimentos de evaluación biológico en el modelo *in vivo* fueron realizados en una repetición incluyendo 10 individuos. Los resultados del diámetro de las lesiones y la carga parasitaria fueron expresados como promedios con desviación estándar. Se realizó el análisis de varianza para datos no paramétricos utilizando el test de Mann-Whitney para ver diferencias significativas entre los grupos. Se utilizó el programa estadístico SPSS (versión 24.0 para Windows; SPSS).

VII. RESULTADOS

7.1 Trabajos de campo

En el Perú habitan más de 70 comunidades distintas donde la leishmaniosis es endémica. Los estudios etnobotánicos de nuestro laboratorio se realizaron en tres lugares distintos, una en la alta Amazonía: Yanasha y dos en selva baja: Chayahuita y Yanapari. Las tres comunidades viven en ecosistemas distintos y en zonas endémicas distintas (Chayahuita presentan casos de LMC mientras que los Yanasha y Yanapari presentan casos de LC). Este hecho favoreció la probabilidad de encontrar compuestos naturales que permitan validar el modelo de evaluación biológico para la búsqueda de compuesto con actividad anti-*Leishmania*.

Las identificaciones botánicas de las plantas colectadas fueron realizadas por las Dras. Genevieve Bourdy y Joaquina Alban en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

7.2. Implementación de un modelo de evaluación *in vitro*

La implementación de un modelo de evaluación biológico *in vitro* permitió establecer un algoritmo para la evaluación de moléculas naturales y/o de síntesis con potencial actividad anti-*Leishmania*. Este algoritmo consistió primero en establecer el uso de un sistema de bioguiaje de alto rendimiento utilizando amastigotes axénicos de *L. amazonensis* de crecimiento exponencial para la evaluación de extractos etanólicos de 149 especies de plantas y sus fracciones más activas hasta llegar a los compuestos naturales purificados. Asimismo, se utilizó este modelo de bioguiaje para la evaluación de 97 compuestos derivados de síntesis que fueron otorgados por laboratorios de USA, España y Francia. Una vez encontrado los compuestos más activos mediante la determinación de la concentración inhibitoria media (CI₅₀) sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*, se procedió a la evaluación de la citotoxicidad sobre

macrófagos peritoneales de ratón BALB/c con el fin de obtener la concentración citotóxica media (CC₅₀). Ambos parámetros (IC₅₀ y CC₅₀) permitieron realizar el cálculo del índice de selectividad (IS) de los compuestos naturales y de síntesis ($IS = CC_{50} / IC_{50}$).

Una vez completada la evaluación del índice de selectividad de los compuestos naturales y de síntesis, se seleccionó a aquellos compuestos con un $IS > 10$ para ser evaluados sobre el modelo de evaluación biológico utilizando amastigotes intracelulares de *Leishmania amazonensis*. Este paso es determinante para evaluar posibles compuestos candidatos para ser evaluados en un modelo de infección *in vivo*.

7.2.1. Sistema de evaluación biológico para la evaluación de extractos etanólicos de plantas con potencial actividad anti-*Leishmania* utilizando amastigotes axénicos de *L. amazonensis*.

Este primer esquema de evaluación biológico consistió en el uso de un sistema de bioguiaje de alto rendimiento utilizando el modelo de amastigote axénico de *L. amazonensis*. Se utilizó la Anfotericina B como droga de referencia obteniéndose valores semejantes en todos los trabajos.

7.2.1.1. Actividad de extractos etanólicos de plantas peruanas sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*.

Se realizó el análisis de 149 especies de plantas peruanas utilizadas como remedio tradicional contra la leishmaniosis (Anexo 1a, 1b y 1c). Se seleccionaron 6 especies de plantas por tener una CI₅₀ < 10µg/ml sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*, estas plantas corresponden a las especies *Cestrum racemosum*, *Piper dennisii*, *Renalmia alpinia*, *Piper hispidum*, *Piper strigosum* y *H. sucuuba* con valores de CI₅₀ de 9.8, 9.9, 9, 5, 7.8 y 5µg/ml respectivamente (Tabla 2). Además 17 especies de plantas mostraron una CI₅₀ entre 10 – 20µg/ml sobre

amastigotes axénicos de *L. amazonensis*. Estas plantas corresponden a las especies *Begonia parviflora*, *Calea montana*, *Carica papaya*, *Hedychium coronarium*, *Hedyosmum lechleri*, *Hyptis lacustris*, *Jacaranda copaia*, *Lantana sp.*, *Munnozia hastifolia*, *Phoradendron crassifolium*, *Renealmia thyrsoidea*, *Solanum peruvianum*, *Clibadium sylvestre*, *Cybianthus anthuriophyllus*, *Desmodium axillare*, *Piper loretoanum* y *Piper sanguineispicum* (Anexo 1a, 1b y 1c)

Además de ello también se puede observar que para cada especie se utiliza una parte de la planta en especial (hoja, tallo, corteza o raíz). Esta información se obtuvo mediante encuestas a personas que padecieron de la enfermedad, así como a curanderos y chamanes quienes han referido el uso tradicional que se le da a una especie de planta dentro de la comunidad Yanasha.

La droga de referencia Anfotericina B, mostró una actividad de 0.1 μ M durante todos los experimentos realizados.

Tabla 2. Concentración inhibitoria media (CI₅₀) menor a 10 μ g/mL de extractos etanólicos de 6 especies de plantas.

Especie	Parte de la planta	CI₅₀ (μg/ml)	SD
<i>Cestrum racemosum</i>	hojas	9.8	0.8
<i>Piper dennisii</i>	hojas	9.9	0.5
<i>Renealmia alpinia</i>	rizoma	9	1.5
<i>Piper hispidum</i>	hojas	5	0.1
<i>Piper strigosum</i>	hojas	7.8	1.3
<i>Himatanthus sucuuba</i>	Corteza	5	0.09

CI₅₀: Concentración inhibitoria media determinada sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*, SD: Desviación estándar. Los ensayos fueron realizados por triplicado en tres experimentos independientes.

7.2.2. Evaluación de compuestos naturales y de síntesis sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*.

El modelo biológico de amastigote axénico permitió evaluar la actividad anti-*Leishmania* de las fracciones y sub-fracciones obtenidas a partir de los extractos etanólicos de las plantas más activas. De esta manera se logró hacer un cribado de todas las fracciones contra amastigotes axénicos de *Leishmania amazonensis* hasta llegar a aislar un compuesto natural puro activo. Los criterios de selección de las plantas para seguir un fraccionamiento biodirigido fueron su actividad anti-*Leishmania* ($CI_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ descritas en la tablas 2) y la novedad en la literatura científica de la especie vegetal sobre la actividad anti-*Leishmania*. Tomando en cuenta estos criterios se logró aislar 35 compuestos naturales. Finalmente, el modelo de evaluación biológico utilizando amastigotes axénicos de *L. amazonensis* permitió además evaluar la actividad de 97 compuestos derivados de síntesis obtenidos gracias a la colaboración del Instituto de Investigación para el desarrollo (IRD-Francia) con el Dr. Gerald B. Hammond del Departamento de Química de la Universidad de Louisville-USA, el Dr. Antonio Monge del Centro de Investigación en Farmacobiología Aplicada de la Universidad de Navarra en Pamplona, España y la Doctora Valerie Jullian integrante de nuestra unidad de investigación UMR-152 del Laboratorio Pharmadev de la Facultad de Farmacia en la Universidad de Toulouse, Francia.

7.2.2.1. Evaluación de compuestos naturales sobre el modelo de amastigotes axénicos de *L. amazonensis*.

Se escogieron a las especies vegetales *Himatanthus sucuuba*, *Piper sanguineispicum*, *Piper dennisii*, *Piper hispidum*, *Ambrosia peruviana*, *Zanthoxylum rhoifolium*, *Plagiochila disticha* y *Mikania decora* para hacer el fraccionamiento biodirigido. Se aislaron un total de 35

compuestos naturales y se evaluaron su actividad sobre el modelo de amastigotes axénicos de *Leishmania amazonensis* (Anexo 2).

En la tabla 3 se observa el análisis de la actividad anti-*Leishmania* sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis* de los compuestos más activos. A partir de *H. sucuuba* se aislaron 2 compuestos, siendo la plumericina la molécula más activa con una CI_{50} de $0.2\mu M$.

A partir de *P. sanguineispicum* y *P. dennisii* se aislaron 10 compuestos de cada planta. Los compuestos más activos sobre amastigotes axénicos fueron el 1-metilbutilcafeato aislado de *P. sanguineispicum* y el ácido 3-(3',7'-dimetil-2',6'-octadienil)-4-metoxibenzoico aislado de *P. dennisii* con una CI_{50} de $2\mu M$ y $20.8\mu M$ respectivamente.

A partir de *P. hispidum* se aislaron 4 compuestos que fueron evaluados a nivel de la actividad anti-*Leishmania* sobre amastigotes axénicos. El compuesto 2'-hidroxi-3',4',6'-trimetoxichalcona fue el más activo con una CI_{50} de $0.8\mu M$. Mientras que a partir de *A. peruviana* se aislaron 2 compuestos, la Damsina y la Confertina con una CI_{50} de $1.9\mu M$ y $3.3\mu M$ respectivamente.

Finalmente, a partir de *Z. rhoifolium* se aislaron 4 compuestos, Avicine, Nitidine, Fagaridine y Chelerythrine. El compuesto Chelerythrine fue más activo (CI_{50} de $0.03\mu M$) que la droga de referencia Anfotericina B (CI_{50} de $0.10\mu M$).

Tabla 3: Determinación de la CI_{50} (μM) de 10 compuestos naturales sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*.

Especie	Compuestos	CI_{50} (μM)	SD
<i>H. sucuuba</i>	Plumericina	0.2	0.01
<i>P. sanguineispicum</i>	1-metilbutil cafeato	2.0	0.11
<i>P. dennisii</i>	Acido 3-(3',7'-dimetil-2',6'-octadienil)-4-metoxibenzoico	20.8	8.7
<i>P. hispidum</i>	2'-Hidroxi-3',4',6'-trimetoxichalcona	0.8	0.01
<i>A. peruviana</i>	Damsina	1.9	0.03
	Confertina	3.3	0.52
<i>Z. rhoifolium</i>	Avicine	0.3	0.1
	Nitidine	0.5	0.1
	Fagaridine	0.5	0.02
	Chelerythrine	0.03	0.005
Control positivo	Anfotericina B	0.1	0.01

CI_{50} : Concentración inhibitoria media determinada sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*, SD: Desviación estándar. Los ensayos fueron realizados por triplicado en tres experimentos independientes.

7.2.2.2. Evaluación de compuestos derivados de síntesis sobre el modelo de amastigotes axénicos de *L. amazonensis*.

El establecimiento de un modelo de evaluación biológico para el cribado de extractos de plantas, fracciones y/o compuestos utilizando al amastigote axénico de *L. amazonensis* permitió crear las bases para evaluar cualquier tipo de compuesto con potencial actividad anti-*Leishmania*. Es debido a ello que 3 laboratorios internacionales especialistas en síntesis química de compuestos decidieron colaborar con nosotros y nos entregaron en total 97 compuestos sintetizados tomando en cuenta pequeñas variaciones en sus estructuras. Estos compuestos se dividieron en 43 compuestos pertenecientes a la familia de las Chalconas y 38 compuestos pertenecientes a la familia de las Tetrahydrobenzotienopirimidinas (BTPs) sintetizados por el Dr. José C. Aponte, 13 compuestos pertenecientes a la familia de las

Quinoxalinas sintetizados por el Dr. Asunción Burguete y 3 compuestos pertenecientes a la familia de las benzo[c]fenantridinas sintetizadas por la Dra. Valerie Jullian.

La evaluación de la actividad anti-*Leishmania* de 43 compuestos pertenecientes a la familia de las chalconas sobre el modelo de amastigote axénico de *L. amazonensis* mostró 32 compuestos sintéticos con una CI_{50} menor a $20\mu M$ (Anexo 3a), siendo la chalcona 20 más activa con una CI_{50} de $0.6\mu M$ (Tabla 4). Las diferencias en la actividad anti-*Leishmania* sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis* se debió a los diferentes patrones de sustitución en el anillo A y B de las 43 chalconas (Anexo 3b).

Se evaluó la actividad anti-*Leishmania* de 38 Tetrahydrobenzotienopirimidinas con diferentes patrones de sustitución sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis* (Anexo 4a y 4b). En la tabla 4 se observa que los compuestos 21 y 30 son los más activos con una CI_{50} de $0.5\mu M$ y $0.9\mu M$ respectivamente.

La actividad anti-*Leishmania* de 13 quinoxalinas sintéticas derivadas de 1,4-di-*N*-óxido con diferentes patrones de sustitución sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis* es mostrada en el Anexo 5a y 5b. En la tabla 4 se observa que cinco compuestos sintéticos (compuestos de la serie 2 y 4) tuvieron una CI_{50} menor a $10\mu M$, siendo el compuesto 2d el más activo con una CI_{50} de $2.7\mu M$.

Se evaluó la actividad anti-*Leishmania* de 3 benzo[c]fenantridinas derivadas de síntesis Fagaronine, Nornitidine y Norfagaronine (Anexo 6a). En la tabla 4 se observa la actividad del compuesto más activo Fagaronine con una CI_{50} de $0.4\mu M$.

Tabla 4: Determinación de la CI_{50} (μM) de compuestos derivados de síntesis sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*

Compuestos	CI_{50} (μM)	SD
Chalcona 20	0.6	0.1
Chalcona 21	1.1	0.3
Chalcona 26	10	0.1
Chalcona 30	4.1	1.2
Chalcona 31	6.4	0.9
Chalcona 38	1.1	0.1
Chalcona 40	4.6	1.1
Chalcona 41	1.3	0.2
Chalcona 42	11.7	4.1
Chalcona 43	6.2	0.7
BTP 6	15.7	4.34
BTP 21	0.5	0.02
BTP 28	1.7	0.06
BTP 30	0.9	0.02
BTP 36	19.0	1.13
Quinoxalina 2a	4.9	2.1
Quinoxalina 2b	65.6	22.9
Quinoxalina 2c	37.0	7.8
Quinoxalina 2d	2.7	0.6
Quinoxalina 2e	4.1	0.5
Quinoxalina 4b	5.3	2.3
Quinoxalina 4d	6.7	1.3
Fagaronine	0.4	0.2
Anfotericina B	0.1	0.01

CI_{50} : Concentración inhibitoria media determinada sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*, SD: Desviación estándar. Los ensayos fueron realizados por triplicado en tres experimentos independientes.

7.2.3. Evaluación de la citotoxicidad y determinación del índice de selectividad de compuestos naturales y de síntesis sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c

Se implementó un modelo de evaluación biológico para determinar la concentración citotóxica media (CC₅₀) de compuestos naturales y de síntesis con actividad anti-*Leishmania* sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c. Este método toma en cuenta el uso de la célula huésped del parásito intracelular *Leishmania* cuando habita dentro del hospedero mamífero.

Una vez culminada la evaluación de los compuestos a nivel de su actividad anti-*Leishmania* sobre el modelo de amastigotes axénicos de *L. amazonensis* y a nivel de su toxicidad sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c se determinó el índice de selectividad (IS). El índice de selectividad se obtiene dividiendo la concentración citotóxica media en macrófagos peritoneales de ratón (CC₅₀) sobre la concentración inhibitoria media (CI₅₀) en amastigotes axénicos de *L. amazonensis*. Un IS *in vitro* igual o mayor a 10 indica que el compuesto tiene una actividad específica sobre el parásito intracelular *Leishmania*. De esta manera pudimos seleccionar a los compuestos más activos y de manera específica sobre el amastigote axénico de *L. amazonensis*. Esta metodología evita perder tiempo tratando de evaluar compuestos tóxicos en el modelo del macrófago infectado.

7.2.3.1. Evaluación de la citotoxicidad y determinación del índice de selectividad de compuestos naturales utilizando el modelo de macrófagos peritoneales de ratón BALB/c

Se evaluó la citotoxicidad de 35 compuestos naturales aislados de las especies vegetales *Himatanthus sucuuba*, *Piper dennisii*, *Piper sanguineispicum*, *Piper hispidum*, *Plagiochila disticha*, *Ambrosia peruviana*, *Mikania decora* y *Zanthoxylum rhoifolium* (Tabla 5).

Los resultados mostraron que los compuestos (8S,7'S,8'R)-3,3',4,4'-bis(metilendioxi)-7'-hidroxi-7-oxolignano-9,9'-lactona (aislado de *P. sanguineispicum*), Acido 3-(3',7'-dimetil-

2',6'-octadienil)-4-metoxibenzoico (aislado de *P. dennisii*) y la Damsina (aislados de *A. peruviana*) tuvieron una CC_{50} de $>260\mu\text{M}$, $180\mu\text{M}$ y $216\mu\text{M}$ respectivamente. Estos 3 compuestos al tener actividad sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis* permitió obtener índices de selectividad de >7 , 9 y 114 respectivamente.

El compuesto 1-metilbutil cafeato aislado de *P. sanguineispicum* fue moderadamente citotóxicos con una CC_{50} de $72\mu\text{M}$. Sin embargo, tomando en cuenta la actividad sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis* observamos que el compuesto tuvo un índice de selectividad de 36 semejante a la droga de referencia Anfotericina B.

Los compuestos naturales Avicine, Nitidine, Fagaridine y Chelerythrine aislados de *Z. rhoifolium* tuvieron una CC_{50} de $25.6\mu\text{M}$, $4.9\mu\text{M}$, $19.4\mu\text{M}$ y $3\mu\text{M}$ respectivamente. Los 4 compuestos mostraron un IS mayor a 10 siendo la Chelerythrine el compuesto con mayor IS (IS=100).

Tabla 5: Determinación de la concentración citotóxica media (CC₅₀) e índice de selectividad de compuestos naturales aislados a partir de 6 especies de plantas de la Amazonía.

Especie	Compuestos	CC ₅₀ (μM) ± SD	IS
<i>H. succuba</i>	Plumericina	1.9 ± 0.1	10
<i>P. sanguineispicum</i>	1-metilbutil cafeato	72 ± 1.9	36
<i>P. dennisii</i>	Acido 3-(3',7'-dimetil-2',6'-octadienil)-4-metoxibenzoico	179.6 ± 11.4	9
<i>P. hispidum</i>	2'-Hydroxy-3',4',6'-trimethoxychalcone	1.6 ± 0.1	2
<i>A. peruviana</i>	Damsina	216.2 ± 35.6	114
	Confertina	22.6 ± 4.9	7
<i>Z. rhoifolium</i>	Avicine	25.6 ± 0.4	86
	Nitidine	4.9 ± 0.2	10
	Fagaridine	19.4 ± 0.3	39
	Chelerythrine	3.0 ± 0.1	100
Control positivo	Anfotericina B	3.6 ± 0.2	36

CC₅₀: Concentración citotóxica media determinada sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c, SD: Desviación estándar. IS: Índice de selectividad (CC₅₀/IC₅₀). Los ensayos fueron realizados por triplicado en tres experimentos independientes.

7.2.3.2. Evaluación de la citotoxicidad y determinación del índice de selectividad de compuestos derivados de síntesis sobre el modelo de macrófagos peritoneales de ratón BALB/c

Los compuestos sintéticos previamente descritos en el punto 7.2.2.2 fueron evaluados a nivel de su citotoxicidad sobre macrófagos extraídos de la cavidad peritoneal de ratón BALB/c. Posteriormente se realizó el cálculo del índice de selectividad dividiendo los valores de concentración citotóxica media obtenidos sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c (CC₅₀ reportado en la tabla 6) sobre la concentración inhibitoria media obtenidos sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis* (CI₅₀ reportado previamente en la tabla 4).

Se evaluó la citotoxicidad de 32 compuestos pertenecientes a la familia de las chalconas (Anexo 7). En la tabla 6 se observa que las chalconas 26, 30, 31, 40, 41, 42 y 43 tuvieron una CC_{50} mayor a $100\mu\text{M}$ con un IS mayor a 10. Las chalconas 31, 40 y 41 tuvieron los IS más altos con valores de > 50 , 84 y >200 respectivamente. También observamos que las chalconas 21 y 38 tuvieron una CC_{50} de $12.5\mu\text{M}$ y $11.5\mu\text{M}$ respectivamente con un IS igual a 11.

Además, se evaluó la citotoxicidad de 38 compuestos pertenecientes a la familia de las BTPs (Anexo 8). En la tabla 6 se observa que las BTPs 6, 28 y 36 fueron poco tóxicos obteniéndose valores de IS de 10, 85 y 9 respectivamente. Igualmente, la citotoxicidad de 13 compuestos pertenecientes a la familia de las quinoxalinas (Anexo 9) mostró que los compuestos 2c, 4b y 4d tuvieron una CC_{50} de $159.1\mu\text{M}$, $133.6\mu\text{M}$ y $138.7\mu\text{M}$ respectivamente. Los compuestos 4b y 4d tuvieron un IS igual a 25 y 21 respectivamente.

Finalmente, se evaluó la citotoxicidad de 3 compuestos pertenecientes a la familia de las benzo[c]fenantridinas. En la tabla 6 se observa que el compuesto sintético Fagaronine tuvo una CC_{50} de $19.5\mu\text{M}$ con un IS igual a 49. Los compuestos Nornitidine y Norfagaronine no fueron evaluados a nivel de su citotoxicidad por ser compuestos poco activos sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis* (Anexo 6a).

Tabla 6: Determinación de la concentración citotóxica media (CC₅₀) e índice de selectividad de compuestos sintéticos sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c

Compuestos	CC₅₀ (μM)	SD	IS
Chalcona 20	ND	-	-
Chalcona 21	12.5	0.8	11
Chalcona 26	166.2	4.7	17
Chalcona 30	157.2	0.9	38
Chalcona 31	>300	-	>50
Chalcona 38	11.5	2.0	11
Chalcona 40	384.3	13.2	84
Chalcona 41	>250	-	>200
Chalcona 42	142.9	11.0	12
Chalcona 43	132.5	31.3	21
BTP 6	150.7	17.0	10
BTP 21	6.5	0.6	13
BTP 28	144.8	29.5	85
BTP 30	7.9	0.1	9
BTP 36	161.5	5.9	9
Quinoxalina 2a	13.7	8.2	3
Quinoxalina 2b	78.7	19.8	1
Quinoxalina 2c	159.1	34.2	4
Quinoxalina 2d	13.8	2.1	5
Quinoxalina 2e	>23.4	-	>6
Quinoxalina 4b	133.6	22.7	25
Quinoxalina 4d	138.7	18.6	21
Fagaronine	19.5	0.8	49
Anfotericina B	5.4	0.2	54

CC₅₀: Concentración citotóxica media determinada sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c, SD: Desviación estándar. IS: Índice de selectividad (CC₅₀/IC₅₀). Los ensayos fueron realizados por triplicado en tres experimentos independientes.

7.2.4. Evaluación de la actividad de compuestos naturales y de síntesis sobre el modelo de amastigotes intracelulares de *Leishmania amazonensis*.

Se implementó un modelo de biológico para evaluar la actividad anti-*Leishmania* (concentración inhibitoria media CI_{50}) de compuestos naturales y de síntesis sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania amazonensis* (estadío equivalente al encontrado en el hospedero mamífero). Este modelo toma en cuenta la infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón BALB/c con amastigotes axénicos de *L. amazonensis*.

La evaluación de la actividad anti-*Leishmania* se realizó a aquellos compuestos que presentaron un índice de selectividad mayor o igual a 10. De esta manera seleccionamos los compuestos naturales Plumericina, el Ácido 3-(3',7'-dimetil-2',6'-octadienil)-4-metoxibenzoico, la Damsina, la Avicine, la Nitidine, Fagaridine y Chelerythrine. Además, seleccionamos 9 Chalconas sintéticas (compuestos 21, 26, 30, 31, 38, 40, 41, 42 y 43), 5 BTPs sintéticos (compuestos 6, 21, 28, 30 y 36), 7 quinoxalinas sintéticas (compuestos 4b y 4d) y una benzo[c]fenantridina sintética (Fagaronine).

Los resultados observados en la tabla 7 muestran que la plumericina, la Chelerythrine y la chalcona 21 fueron los compuestos más activos contra amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* obteniendo una CI_{50} de 0.9 μ M, 0.5 μ M y 0.9 μ M respectivamente, semejante a la Anfotericina B ($CI_{50} = 0.5\mu$ M).

Los compuestos ácido 3-(3',7'-dimetil-2',6'-octadienil)-4-metoxibenzoico, Nitidine, Fagaronine, chalcona 38 y BTP 6 tuvieron una moderada actividad sobre amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* con una CI_{50} entre 1-10 μ M, mientras que la chalcona 26, 30, 40, 41 y las quinoxalinas 2a y 2e mostraron una actividad anti-*Leishmania* con una CI_{50} entre 10-20 μ M.

Tabla 7: Determinación de la concentración inhibitoria media (CI₅₀) de compuestos naturales y de síntesis sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania amazonensis*.

Compuestos	<i>L. amazonensis</i> CI ₅₀ (μM) ± SD
Plumericina	0.9 ± 0.2
Acido 3-(3',7'-dimetil-2',6'-octadienil)-4-metoxibenzoico	4.2 ± 1.0
Damsina	22.6 ± 3.1
Avicine	>13.6
Nitidine	1.6 ± 0.8
Fagaridine	>13.6
Chelerythrine	0.5 ± 0.02
Chacona 21	0.9 ± 0.03
Chacona 26	14.3 ± 4.6
Chacona 30	16.6 ± 3.1
Chacona 31	28.5 ± 1.9
Chacona 38	4.1 ± 0.3
Chacona 40	16.9 ± 6.2
Chacona 41	12.1 ± 1.1
Chacona 42	24.0 ± 0.9
Chacona 43	29.7 ± 3.9
BTP 6	8.2 ± 0.5
BTP 21	>2.0
BTP 28	>30
BTP 30	>2.0
BTP 36	10.9 ± 1.6
Quinoxalina 4b	43.7 ± 2.5
Quinoxalina 4d	42.9 ± 6.4
Fagaronine	10.0 ± 0.4
Anfotericina B	0.5 ± 0.07

CI₅₀: Concentración inhibitoria media determinada sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*, SD: Desviación estándar. Los ensayos fueron realizados por triplicado en tres experimentos independientes.

7.3. Evaluación *in vivo*.

Se estableció un modelo de infección *in vivo* de ratones BALB/c con amastigotes de *L. amazonensis* provenientes de una lesión de un ratón reservorio (amastigotes intralesionales). El propósito de infectar con amastigotes intralesionales está relacionado con el hecho de aprovechar la mayor virulencia que tiene el estadio amastigote comparado con el estadio promastigote.

Este modelo se utilizó para la evaluación de nuevos compuestos naturales o sintéticos con potencial actividad anti-*Leishmania*. Tomando en cuenta los resultados de citotoxicidad y la actividad de los compuestos naturales y derivados de síntesis sobre amastigotes axénicos e intracelulares a nivel *in vitro* se decidió analizar la actividad de los compuestos con mayor índice de selectividad en un modelo de infección *in vivo* utilizando ratones BALB/c. De esa manera se ha logrado evaluar 11 compuestos de diferente naturaleza en un modelo de infección *in vivo* donde se mantiene una evolución controlada de la inflamación durante el desarrollo de la infección y el tratamiento.

Los pasos que se siguieron en el desarrollo del modelo *in vivo* fueron: i) Se evaluó la toxicidad del vehículo utilizado como solvente de los compuestos, ii) Se estandarizó la carga parasitaria inicial para la infección *in vivo* utilizando 3 dosis de infección con amastigotes intralesionales de *L. amazonensis* y iii) Se realizó una primera exploración de actividad anti-*Leishmania* de 11 compuestos en un modelo de infección *in vivo*.

7.3.1 Evaluación de la toxicidad de las formulaciones sobre ratones BALB/c

Se evaluó la toxicidad del vehículo utilizado para disolver los compuestos, para ello, se inoculó 20µL del vehículo que contiene una mezcla de Tween 20 al 4%, DMSO al 5% y PBS 0.01M en la almohadilla plantar de la pata posterior derecha. El promedio del diámetro de la pata

derecha tratada no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) al ser comparado con el diámetro de la pata izquierda no tratada. El tratamiento finalizó luego de 6 semanas y no se observó ningún signo de toxicidad aguda en los ratones.

7.3.2 Estandarización de parámetros de infección *in vivo*

Se estandarizó los parámetros de infección *in vivo* utilizando como modelo de infección murino al ratón BALB/c. Para ello, se inocularon 3 dosis de parásitos administrados a 3 grupos de 10 ratones cada uno. Las dosis administradas fueron 3 cargas parasitarias iniciales de amastigotes de *L. amazonensis* (obtenidos de una lesión en ratón BALB/c) que fueron inoculadas por vía subcutánea sobre la almohadilla plantar de ambas patas posteriores. A partir de la segunda semana de infección se evaluó la progresión de la inflamación mediante la medición del diámetro de las patas posteriores con un calíper digital.

Las dosis de infección inicial empleadas fueron las siguientes:

Grupo 1: 5×10^6 amastigotes intralesionales inoculados en ambas patas posteriores de 10 ratones BALB/c.

Grupo 2: 5×10^5 amastigotes intralesionales inoculados en ambas patas posteriores de 10 ratones BALB/c.

Grupo 3: 5×10^4 amastigotes intralesionales inoculados en ambas patas posteriores de 10 ratones BALB/c.

Grupo control: Se inoculó el vehículo de administración de los amastigotes intralesionales (tampón fosfato salino, PBS 0.01M) en ambas patas posteriores de 10 ratones BALB/c.

La duración del experimento fue de 6 semanas.

En la figura 4 se observa los promedios y la desviación estándar de las medidas de la inflamación en las almohadillas plantares posteriores de 10 ratones/grupo infectados con *L. amazonensis*. El experimento fue realizado en una repetición de 10 individuos por grupo experimental. Los resultados mostraron en los grupos 1 (5×10^6 amastigotes/ratón) y 2 (5×10^5 amastigotes/ratón) un aumento rápido de la inflamación conllevando a la formación de lesiones abiertas a partir de la cuarta semana.

El grupo 3 infectado con 5×10^4 amastigotes intralesionales mostró un aumento controlado de la inflamación (sin formación de lesiones abiertas) de manera constante durante las 6 semanas de evaluación. Esto permitió determinar que la carga parasitaria inicial apropiada de amastigotes intralesionales de *L. amazonensis* para inocular a los ratones BALB/c es de 5×10^4 amastigotes.

Se utilizó el inóculo de 5×10^4 amastigotes intralesionales por ratón para la evaluación *in vivo* de compuestos con potencial actividad *anti-Leishmania*.

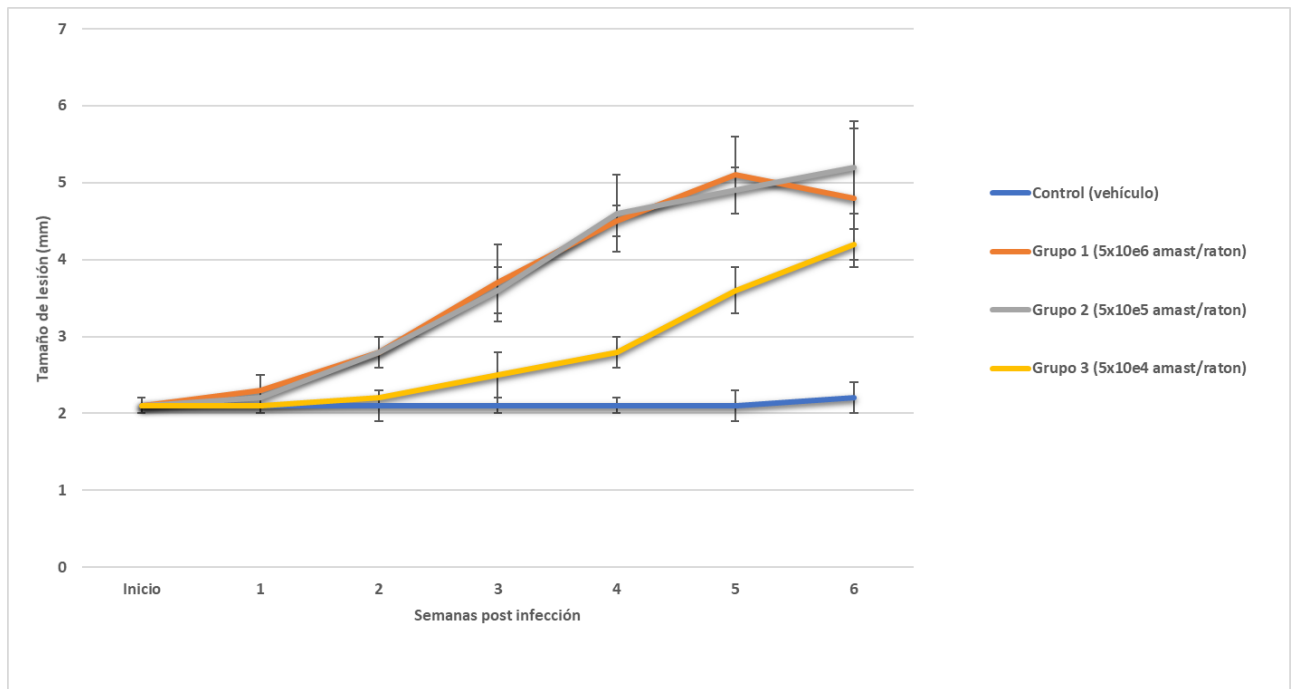


Figura 4: Evolución del diámetro de la inflamación de ratones BALB/c inoculados con 3 cargas parasitarias.

7.3.3 Evaluación de la actividad anti-*Leishmania* de los compuestos candidatos en un modelo de infección *in vivo*.

A partir del experimento anterior se estableció que la carga parasitaria inicial para inocular ratones BALB/c fue de 5×10^4 amastigotes intralesionales en cada almohadilla plantar posterior.

Se utilizó el modelo *in vivo* de infección murino en el cual 5×10^4 amastigotes de *L. amazonensis* fueron inoculados en 13 grupos de 10 ratones, 1 semana post-infección se procedió con el tratamiento por vía intralesional sobre la pata posterior derecha de los ratones. La pata posterior izquierda no fue tratada.

El tratamiento duró 3 semanas y se evaluó el efecto antiparasitario por dos métodos: la evolución semanal del diámetro de la lesión en las almohadillas plantares durante todo el experimento y la cuantificación de la carga parasitaria en la zona infectada al finalizar el

tratamiento (4ta semana post infección) y en la 3ra semana post tratamiento (7ma semana post infección).

7.3.3.1 Evaluación del tratamiento de compuestos anti-*Leishmania* a nivel del diámetro de la inflamación en la almohadilla plantar de ratones infectados con *L. amazonensis*.

La evaluación del diámetro de la inflamación en la almohadilla plantar de las patas posteriores derechas tratadas con los compuestos purificados a una dosis de 5mg/kg de peso fue realizado una vez a la semana en un periodo de 7 semanas utilizando un calíper digital. Los valores fueron reportados como promedios con desviación estándar del diámetro de la inflamación (en milímetros) de 10 ratones.

Los resultados obtenidos en la 3ra semana post tratamiento (figura 5) indican que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) en la progresión de la inflamación de los ratones tratados con los 11 compuestos anti-*Leishmania* comparados con el grupo control sin tratamiento. Sin embargo, se observa que el grupo tratado con la droga de referencia Glucantime® a una dosis de 100mg/kg peso por día generó una disminución significativa del tamaño de la inflamación comparado con el grupo control ($p < 0.05$).

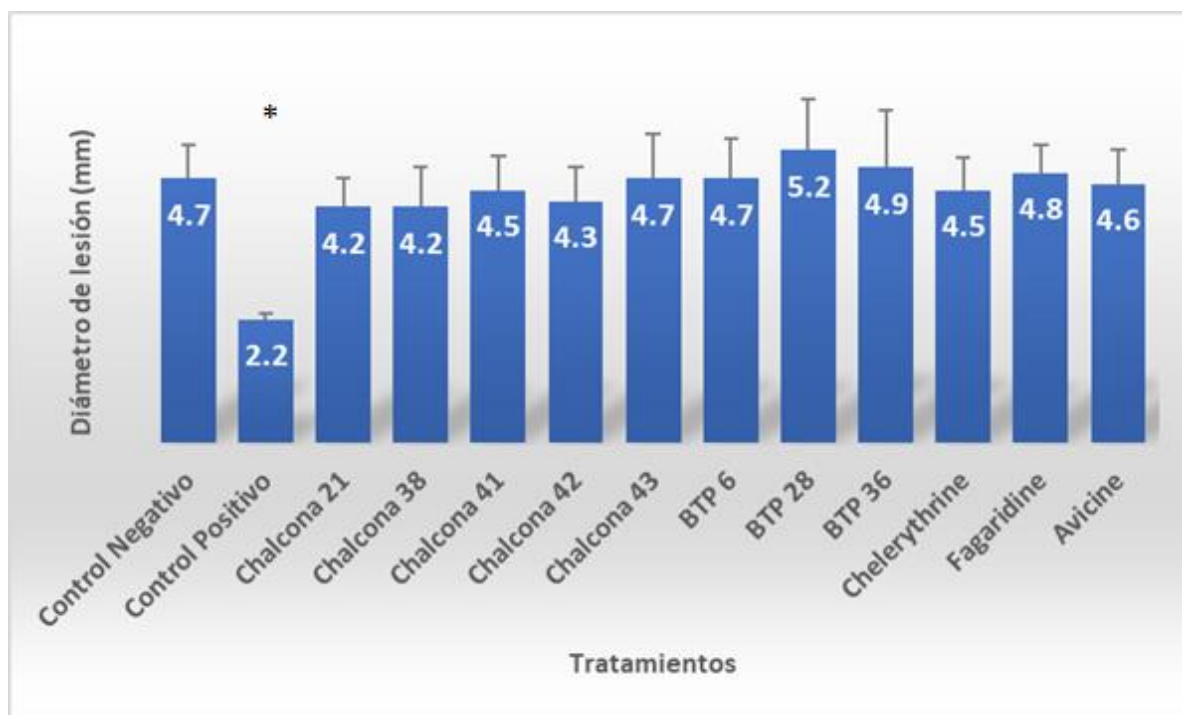


Figura 5: Diámetro de la inflamación de la pata posterior derecha de ratones BALB/c tratados con 11 compuestos obtenido en la 3ra semana post tratamiento. (*: $p < 0.05$).

7.3.3.2 Evaluación del tratamiento de compuestos anti-*Leishmania* a nivel de la carga parasitaria en la almohadilla plantar de ratones infectados con *L. amazonensis*.

La evaluación de la carga parasitaria en la almohadilla plantar de las patas posteriores derechas tratadas con 11 compuestos purificados a una dosis de 5mg/kg de peso fue realizado en la 1ra semana post tratamiento y en la 3ra semana post tratamiento mediante la técnica de microscopia de fluorescencia. Los valores fueron reportados como promedios con desviación estándar del número de amastigotes intralesionales por miligramo de tejido infectado a partir de 3 ratones por punto de evaluación.

En la Figura 6 se observan los promedios de la carga parasitaria con desviación estándar de la actividad *in vivo* de 11 compuestos que fueron seleccionados como los mejores candidatos en los modelos de evaluación *in vitro* (IS mayor a 10). En esta figura se observa que los

compuestos Fagaridine y las Chalconas 42 y 43 mantuvieron una disminución significativa ($p < 0.005$) con respecto al control hasta la 3ra semana post tratamiento. Los compuestos Chelerythrine y BTP 28 mostraron una disminución significativa con respecto al control en la 3ra semana post tratamiento. Así mismo la droga de referencia Glucantime mantuvo una disminución significativa de la carga parasitaria con respecto al control hasta la 3ra semana post tratamiento.

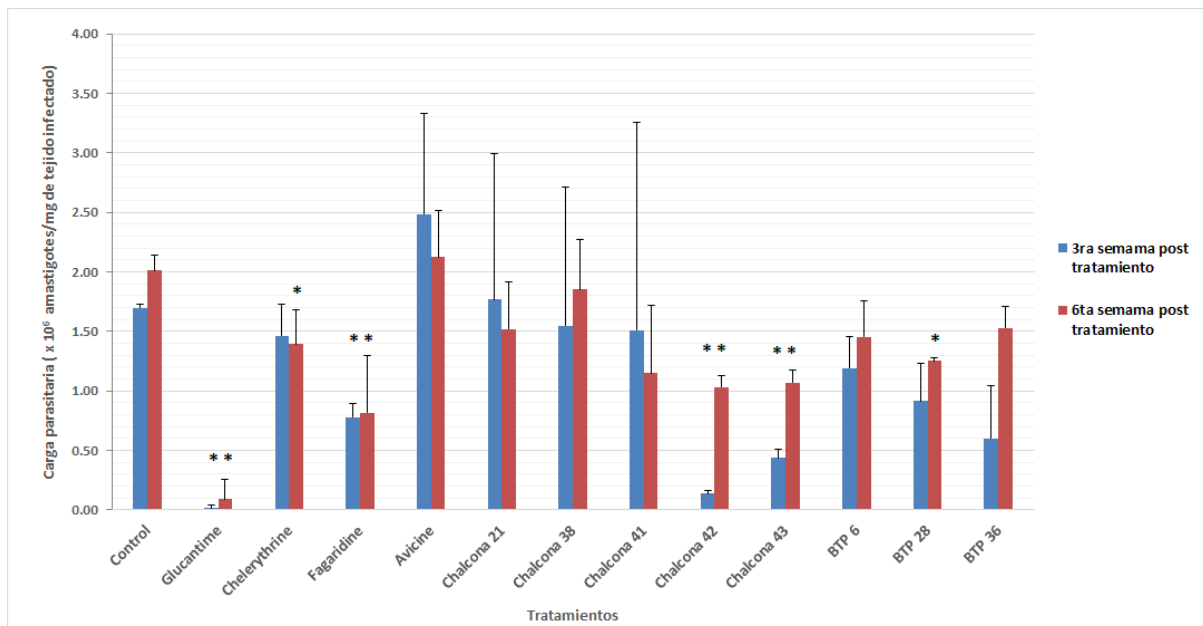


Figura 6: Evaluación de la carga parasitaria (\pm SD) de ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis* y tratados con 11 compuestos. (*: $p < 0.05$)

Tomando como referencia el grupo de ratones control se calculó el porcentaje de la reducción de la carga parasitaria de un tratamiento mediante la siguiente fórmula:

Porcentaje de reducción de carga parasitaria

$$= \left(\frac{\text{Carga parasitaria control} - \text{Carga parasitaria Tratamientos}}{\text{Carga parasitaria control}} \right) \times 100$$

En la tabla 8 se observa que las chalconas 42 y 43 mostraron una actividad antiparasitaria contra amastigotes de *L. amazonensis* obteniéndose una reducción de la carga parasitaria del 92% y 74% respectivamente en la primera semana post tratamiento ($p = 0.0004$ y $p = 0.002$ respectivamente), esta actividad antiparasitaria se mantuvo hasta la tercera semana post tratamiento obteniendo un 35% y 41% de reducción de la carga parasitaria respectivamente ($p = 0.01$). Se observó también que el compuesto 21 no fue activo en la primera semana post tratamiento, sin embargo, esta actividad se incrementó en la tercera semana post tratamiento logrando reducir en un 25% la carga parasitaria comparado con el control. Por otro lado, los compuestos 38 y 41 tuvieron una actividad moderada en la primera y tercera semana post tratamiento.

En el grupo de las BTPs sintéticas se observó que los compuestos fueron más activos en la primera semana post tratamiento obteniéndose valores de 30%, 46% y 65% de inhibición de la carga parasitaria para los compuestos 6, 28 y 36 respectivamente, sin embargo, cabe resaltar que ninguno de ellos tuvo diferencias significativas con respecto al control ($p > 0.05$). Luego en la tercera semana post tratamiento se observó una disminución de la inhibición de la carga parasitaria en una razón de 2 a 15 veces, comparado con la primera semana post tratamiento; sin embargo, se observó que el compuesto 28 al tener el menor ratio (ratio = 2) fue el único que tuvo diferencias significativas con respecto al control ($p = 0.01$) a nivel de la carga parasitaria en la tercera semana post tratamiento.

En el grupo de las benzo[*c*]fenantridinas se observa que la Fagaridine es el compuesto natural más activo, disminuyendo la carga parasitaria en más del 50% en la 1ra y 3ra semana post tratamiento ($P = 0.003$ y $P = 0.002$ respectivamente). El compuesto Chelerythrine es menos activo mostrando una reducción de la carga parasitaria del 29% en la 3ra semana post tratamiento ($P = 0.006$).

Tabla 8: Porcentaje de reducción de la carga parasitaria en ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis* y tratados con 11 compuestos naturales y sintéticos.

Compuestos	Reducción de la carga parasitaria (porcentaje \pm SD)	
	1ra semana Post tratamiento	3ra semana Post tratamiento
Glucantime (100mg/kg)	98 \pm 4 **	99 \pm 2
Chelerythrine	14 \pm 16	29 \pm 2 *
Fagaridine	53 \pm 14 **	60 \pm 3 **
Avicine	-42 \pm 44	-6 \pm 12
Chalcona 21	-4 \pm 6	25 \pm 21
Chalcona 38	9 \pm 3	8 \pm 5
Chalcona 41	11 \pm 24	17 \pm 15
Chalcona 42	92 \pm 1 ***	35 \pm 2 *
Chalcona 43	74 \pm 5 **	41 \pm 9 *
BTP 6	30 \pm 17	2 \pm 11
BTP 28	46 \pm 17	25 \pm 3 *
BTP36	65 \pm 25	17 \pm 14

Los compuestos fueron administrados a 5mg/kg de peso. SD: Desviación estándar. (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.005$, ***: $p < 0.0005$) El experimento fue realizado en una repetición incluyendo a 3 ratones para la 1ra semana post tratamiento y 3 ratones para la 3ra semana post tratamiento.

VIII. DISCUSIÓN

Los amastigotes de *Leishmania* son los mejores candidatos para ser utilizados en sistemas de cribados de alto rendimiento por ser el estadio que se encuentra en el huésped mamífero incluido el hombre. Diversos trabajos de investigación utilizan con frecuencia a los promastigotes de *Leishmania* para evaluar la actividad de posibles agentes leishmanicidas (Grogl *et al.* 2013, Sharlow *et al.* 2009, De Myulder *et al.* 2011, Vermeersch *et al.* 2009). Sin embargo, el promastigote es el estadio que se encuentra en el insecto vector y no es el blanco apropiado para desarrollar un posible medicamento anti-*Leishmania*.

En el presente trabajo se diseñó un algoritmo biológico para la evaluación anti-*Leishmania* de compuestos sintéticos, extractos de plantas medicinales peruanas y compuestos aislados a partir de los extractos activos. Este algoritmo consideró poner en práctica una serie de pasos que conducen a obtener un compuesto activo contra la leishmaniosis.

El primer paso de este algoritmo consideró el uso de un sistema de cribado de alto rendimiento utilizando amastigotes axénicos de *Leishmania amazonensis* para la evaluación de 132 compuestos divididos en 35 compuestos naturales aislados a partir de un fraccionamiento biodirigido de 8 especies de plantas descrito en el anexo 1 (Castillo *et al.* 2007, Valadeau *et al.* 2009, Estevez *et al.* 2007, Odonne *et al.* 2009, Cabanillas *et al.* 2010, Cabanillas *et al.* 2012, Ruiz *et al.* 2011, Aponte *et al.* 2010a, Aponte *et al.* 2011) y 97 compuestos sintéticos (43 chalconas, 38 BTPs, 13 quinoxalinas, 3 benzo[c]fenantridinas) descritos en los anexos 2 al 6 (Aponte *et al.* 2010b, Aponte *et al.* 2010c, Burguete *et al.* 2008, Castillo *et al.* 2014). El segundo paso consideró la evaluación de la citotoxicidad sobre macrófagos murinos de los compuestos más activos descritos en el paso anterior y el cálculo del índice de selectividad descritos en los anexos 7, 8 y 9. A partir de este trabajo se obtuvo un total de 25 compuestos

con un índice de selectividad mayor a 10 (Tablas 5 y 6). Posteriormente en un tercer paso, 24 compuestos fueron evaluados sobre amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* (Tabla 7) y amastigotes intracelulares de 2 especies de *Leishmania* prevalentes en nuestro país, *L. braziliensis* y *L. peruviana* (anexo 10). En este punto se infectaron macrófagos murinos con amastigotes axénicos de las 3 especies de *Leishmania* y luego fueron tratados con diferentes concentraciones sub tóxicas para la célula huésped.

Los resultados de este tercer paso mostraron que la chelerythrine (benzo[*c*]fenantridina cuaternaria) fue el compuesto más activo sobre amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* comparado con otras moléculas de la misma familia de las benzo[*c*]fenantridinas (avicine, nitidine, fagaridine y fagaronine). Comparando con la droga de referencia Anfotericina B, la chelerythrine tuvo una actividad 5 veces mayor (**Castillo *et al.* 2014**). Esta diferencia a nivel de la actividad entre benzo[*c*]fenantridinas terciarias y cuaternarias fue también observado en otros modelos biológicos (**Arisawa *et al.* 1984**). Además, estos hallazgos también fueron observados por **Fuchino *et al.* 2010** quienes reportaron a chelerythrine como la molécula más activa sobre promastigotes de *L. major* (CI₅₀ igual a 0.016μM). A nivel de la citotoxicidad, los compuestos avicine, nitidine, fagaridine y chelerythrine mostraron ser poco tóxicos y con mayor índice de selectividad (IS entre 10 y 100). Sin embargo, en un estudio realizado por **Nakanishi *et al.* 1999** reportaron sobre una línea celular de hepatoma (HTC 15) una CI₅₀ de 1.2 μM. A nivel de amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* (tabla 15), se observó que los compuestos nitidine y chelerythrine fueron activos (CI₅₀ de 1.6 y 0.5μM respectivamente), teniendo este último compuesto una actividad semejante a la droga de referencia Anfotericina B (CI₅₀ 0.4μM). La actividad de las benzo[*c*]fenantridinas en amastigotes axénicos fue más alta que en los amastigotes intracelulares. Esto puede deberse a la diferencia en el metabolismo o biodisponibilidad (**Vermeersch *et al.* 2009**).

Con respecto a las chalconas se observó que la chalcona 21 fue más activa en las 3 especies de *Leishmania* sugiriendo que este compuesto podría afectar una misma vía metabólica (Aponte *et al.* 2010b). Con respecto a los compuestos BTPs observamos que las BTPs 6 y 36 son activos en las 3 especies de *Leishmania*, mientras que la BTP 21 solo muestra una actividad sobre amastigotes intracelulares de *L. braziliensis* y *L. peruviana* (Aponte *et al.* 2010c). Estos hallazgos nos sugieren que tener un algoritmo de alto rendimiento para el tamizaje de compuestos utilizando amastigotes axénicos de *L. amazonensis* podría conducirnos a obtener compuestos activos para amastigotes intracelulares de otras especies de *Leishmania*.

Finalmente, aquellos compuestos más activos a nivel *in vitro* fueron seleccionados para ser evaluados a nivel *in vivo* (cuarto paso). En este punto se infectaron ratones BALB/c con amastigotes obtenidos de un ratón reservorio y luego fueron tratados con los compuestos descritos en la figura 5. Siguiendo este procedimiento se evaluó la actividad antiparasitaria de las chalconas 21, 38, 41, 42, 43, BTP6, BTP 28, BTP 36, Chelerythrine, fagaridine y avicine sobre ratones BALB/c infectados con amastigotes de *L. amazonensis* provenientes de una lesión de un ratón reservorio. Los resultados del tratamiento con los 5 compuestos sintéticos a nivel de la progresión del tamaño de la inflamación (Figura 5) no mostraron diferencias significativas comparado con el control ($P > 0.05$). La droga de referencia Glucantime® mostró una disminución significativa de la inflamación comparado con el grupo control ($P < 0.05$).

Por otro lado, a nivel de la carga parasitaria se observó que las chalconas 42 y 43 (administrados a una concentración 7 veces menor que el control positivo) mostraron una reducción de la carga parasitaria del 92% y 74% respectivamente en la 1ra semana post tratamiento (Tabla 8). Estos resultados fueron confirmados en la 3ra semana post tratamiento obteniéndose una reducción de la carga parasitaria del 35% y 41% respectivamente. Con respecto a los BTPs se observó que los compuestos 28 y 36 mostraron una moderada reducción de la carga parasitaria con una

reducción de la infección del 46% y 65% respectivamente en la 1ra semana post tratamiento (Tabla 8). Este efecto antiparasitario disminuyó en la 3ra semana post tratamiento obteniéndose una reducción de la carga parasitaria del 25% y 17% respectivamente. Finalmente, se evaluó la actividad antiparasitaria *in vivo* de los compuestos chelerythrine, fagaridine y avicine. En este grupo se observó que el compuesto chelerythrine tuvo una moderada reducción de la carga parasitaria con una reducción de la infección del 14% y 29% en la 1ra y 3ra semana post tratamiento respectivamente. El compuesto fagaridine mostró una reducción de la carga parasitaria del 53% en la primera semana post tratamiento. Este efecto antiparasitario aumentó en la 3ra semana post tratamiento obteniéndose una reducción de la carga parasitaria del 60% (Tabla 8). Estos hallazgos en la Chelerythrine y Fagaridine muestran que hay un efecto residual que podría mejorar al suministrar dosis mayores en los ratones infectados. Para ello se propondría un estudio robusto de toxicidad aguda y evaluación de la dosis letal media tomando en cuenta el trabajo realizado por **Nakanishi et al. 1999** donde observaron que la fagaridine administrada por vía intravenosa en ratones CDF a la dosis de 75mg/kg de peso presentaba toxicidad general y la muerte a las 24 horas de administración (**Sandor et al. 2016**).

De manera similar se utilizó este algoritmo para el cribado de alto rendimiento de extractos etanólicos de 149 especies de plantas medicinales utilizando amastigotes axénicos de *Leishmania amazonensis* (Anexo 1). Este cribado de alto rendimiento permitió seleccionar a 6 extractos etanólicos de 6 especies de plantas con una CI_{50} menor a 10 μ g/ml (Tabla 2) para seguir un fraccionamiento biodirigido hasta obtener compuestos activos. Estas plantas pertenecieron al género *Cestrum sp.* de la familia Solanaceae conocidos por tener altos contenidos de saponinas (**Fouad et al. 2008, Germonpres et al. 2005**), *Piper sp.* de la familia Piperaceae conocidos por tener altos contenidos de chalconas responsables de la actividad anti-*Leishmania* (**Chen et al. 1993, Hermoso et al. 2003**), *Renealmia sp.* de la familia

Zingiberaceae conocidos por tener curcumina, un derivado diarilheptano, cuya acción se ha descrito como un potente activador del receptor nuclear PPAR γ , responsable de la defensa del hospedero contra patógenos (Lefevre *et al.* 2015) e *Himatanthus sucuuba* de la familia Apocinaceae.

El fraccionamiento biodirigido de *H. sucuuba* utilizando amastigotes axénicos de *L. amazonensis* permitió aislar e identificar dos isómeros estructurales, la plumericina e isoplumericina con una CI₅₀ de 0.2 y 0.3 μ g/ml respectivamente (Castillo *et al.* 2007). Ambos compuestos fueron semejantes a nivel de su citotoxicidad sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c con una CC₅₀ de 1.9 μ M para ambos isómeros (ver tabla 5). Esta similitud entre ambos isómeros estructurales también fue reportado por Sharma *et al.* 2011, en donde demuestran que la plumericina y la isoplumericina son muy semejantes a nivel de su citotoxicidad sobre una línea celular de macrófago murino J774G8, con valores de CC₅₀ de 24 y 20 μ M respectivamente. El cálculo del índice de selectividad para la plumericina (IS igual a 10) demuestra que la acción del compuesto aislado es específica para *Leishmania amazonensis* y no tóxico para células mamíferas. El análisis sobre amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* (tabla 7) demostró que la plumericina, a diferencia de la isoplumericina, tuvo una actividad leishmanicida semejante al control positivo Anfotericina B (CI₅₀ igual a 0.9 μ M para plumericina y 0.5 μ M para Anfotericina B). Esta diferencia a nivel de su actividad entre ambos isómeros muestra ser de gran interés ya que se conoce que la orientación de grupos radicales influye en la actividad antiparasitaria de algunos compuestos (Montero-Torres *et al.* 2005). Este tipo de iridoide espirolactona no se encuentra comúnmente en la naturaleza, sólo alrededor de 10 compuestos estructuralmente relacionados han sido aislados de los géneros *Himatanthus*, *Plumeria* y *Allamanda* (Abdel-Kader *et al.* 1997). Sharma *et al.* 2011 evaluaron la actividad de plumericina e isoplumericina aislada a partir de *Plumeria bicolor* sobre amastigotes

intracelulares de *L. donovani*, encontrando una CI_{50} de 1.41 y 4.1 μ M respectivamente. Estos datos son semejantes a los reportados por nosotros demostrando que la plumericina tiene una potente actividad sobre parásitos de *Leishmania sp.*

El fraccionamiento biodirigido de *P. sanguineispicum* permitió aislar e identificar 10 compuestos naturales (**Cabanillas et al. 2010**). El compuesto 1-metilbutil cafeato, un derivado del ácido cafeico tuvo una CI_{50} de 2 μ g/ml y una CC_{50} de 72 μ g/ml mostrando un IS igual a 35 similar a la Anfotericina B (ver tablas 3 y 5 respectivamente). Actualmente no se encuentran reportes de actividad antiparasitaria de esta molécula.

El fraccionamiento biodirigido de *P. dennisii* permitió aislar e identificar 10 compuestos naturales (**Cabanillas et al. 2012**). Se encontraron 2 nuevas moléculas que combinan estructuras de derivados de ácido benzoico prenilado y dihidrochalconas. Se encontró también 3 ácidos benzoicos prenilados, 3 dihidrochalconas, un cromeno y un ácido benzoico geranilado denominado como ácido 3-(3',7'-dimetil-2',6'-octadienil)-4-metoxibenzoico el cual fue más activo contra amastigotes axénicos de *L. amazonensis* obteniéndose una CI_{50} de 20.8 μ M (ver tabla 3), este valor es semejante al reportado por **Flores et al. 2009**, quienes observan la actividad antiparasitaria sobre promastigotes de *L. braziliensis* mostrando un CI_{50} de 6.5 μ g/ml (22.5 μ M), ambos sistemas comprenden la evaluación antiparasitaria directa. A nivel de la toxicidad se observa que el ácido benzoico geranilado fue 49 veces menos tóxico sobre macrófagos peritoneales de ratón comparado con el control positivo Anfotericina B (ver tabla 5). Cabe resaltar que este es el primer reporte de aislamiento del ácido 3-(3',7'-dimetil-2',6'-octadienil)-4-metoxibenzoico a partir de *P. dennisii*. Estudios previos reportan el aislamiento de este mismo compuesto a partir de hojas de *P. adundum* (**Baldoqui et al. 1999, Flores et al. 2009 y Orjala et al. 1993**). A nivel de amastigotes intracelulares se observó que el ácido 3-(3',7'-dimetil-2',6'-octadienil)-4-metoxibenzoico fue más activo sobre parásitos de *L.*

amazonensis (tabla 7) con una CI_{50} igual a $4\mu M$, probablemente debido a una actividad inmunomoduladora. Generalmente la actividad anti-amastigote de una droga puede ser selectiva y directa contra el parásito, o esta puede actuar indirectamente, por activación de mecanismos microbicidas en el macrófago como la producción de óxido nítrico (NO) que es considerado como el mecanismo leishmanicida más importante del macrófago. Por ejemplo, la activación de la vía de la NO sintasa está implicada en el efecto protector del extracto de la hoja de *Kalanchoe pinnata* contra la infección de ratones BALB/c con *L. amazonensis* (**Da Silva et al. 1999**), un efecto que es reversible con el inhibidor del NO (L-NG-monometil-arginina) disminuyendo el efecto antiparasitario.

El fraccionamiento biodirigido de *P. hispidum* permitió aislar e identificar 4 compuestos naturales. Se encontró 1 nueva amida (N-2-(3',4',5'-trimethoxyphenyl)ethyl-2-hydroxybenzamide) y una conocida flavanona (pinocembrin) con poca actividad anti-*Leishmania*. Además, se encontró dos chalconas siendo la más activa el 2'-hydroxy-3',4',6'-trimethoxychalcone contra amastigotes axénicos de *L. amazonensis* obteniéndose una CI_{50} de $0.8\mu M$ (ver tabla 3). La actividad citotóxica evaluada sobre macrófagos de ratón BALB/c mostró una CC_{50} de $1.6\mu M$, demostrando tener una elevada toxicidad sobre células diferenciadas (**Ruiz et al. 2011**). En un trabajo publicado por **Nyandoro et al. 2012** sobre *Toussaintia orientalis* (Annonaceae) aislaron el 2'-hydroxy-3',4',6'-trimethoxychalcone y fue evaluado sobre 3 líneas celulares, la línea celular de fibroblastos de ratón (L-929), línea celular de leucemia mielocítica humana (K-562) y la línea de carcinoma de cuello uterino (HeLa) con CC_{50} de 9.5, 11.2 y $15\mu g/ml$ respectivamente (30.2 , 35.6 y $47.7\mu M$ respectivamente). Estos resultados demostraron que la molécula presenta una actividad anti proliferativa y citotóxica por lo que es un potencial agente quimioterapéutico.

El fraccionamiento biodirigido de *A. peruviana* permitió aislar e identificar 2 compuestos naturales (ver tabla 3), damsina y confertina, ambos activos ($CI_{50} < 10\mu M$) sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis* (Aponte *et al.* 2010a). En un estudio realizado por Lee *et al.* 1971 demostraron que la damsina es un agente citotóxico sobre las líneas celulares WI-38 (fibroblastos humanos normales), H.Ep.2 (células de carcinoma laríngeo humano) y W-18 Va2 (células humanas transformadas con el virus 40) con CC_{50} de 0.85, 9.4 y $8.7\mu M$ respectivamente, sin embargo, los resultados obtenidos sobre macrófagos murinos (tabla 5) muestran que la damsina es poco toxica con una CC_{50} de $216\mu M$ con un IS igual a 114. La confertina, un isómero de la damsina, mostró una menor actividad sobre amastigotes axénicos y una elevada toxicidad. Esto apoya la noción de que isómeros estructurales no tienen igual comportamiento debido a la diferente disponibilidad espacial de sus átomos o regiones de la molécula activas (zonas con aceptores nucleofílicos). La alta selectividad de la damsina permitió evaluar la actividad sobre amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* obteniendo una CI_{50} de $22.6\mu M$. En este trabajo se observó que la damsina fue 12 veces menos activo en amastigotes intracelulares comparado con amastigotes axénicos (CI_{50} igual a $1.9\mu M$) de la misma especie, esto puede deberse a la barrera (macrófago murino) que tiene que atravesar la molécula para llegar a su blanco y ejercer su poder antiparasitario.

El diseño de este algoritmo dividido en 4 pasos nos permitió cribar un total de 149 especies de plantas medicinales y 97 compuestos sintéticos en amastigotes axénicos de *L. amazonensis*, Macrófagos murinos, amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* y ratones BALB/c infectados con amastigotes de *L. amazonensis* derivados de lesión. De esa manera se obtuvo 3 compuestos activos (fagaridine, chalcona 42 y chalcona 43) a partir de 132 compuestos. Estos 3 compuestos son candidatos para seguir un estudio más robusto de actividad anti-*Leishmania*.

Finalmente, los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran el diseño de un algoritmo que sigue pasos lógicos para la evaluación de compuestos con potencial actividad anti-*Leishmania*. Además, la implementación de este algoritmo podría ayudar a obtener compuestos que aumenten los efectos de los medicamentos actuales con productos naturales utilizados en la medicina tradicional o drogas sintéticas. Algunos de los nuevos proyectos tienen como objetivo desarrollar una nueva generación de fitoquímicos a base de plantas, que puedan ser utilizadas solas o en combinación con las drogas de síntesis. Estas nuevas formulaciones de combinaciones de medicamentos deberán ser más seguras, más baratas y menos tóxicas que los recetados actualmente. Por ello, el desarrollo de un algoritmo para la identificación rápida de moléculas activas relacionadas con la capacidad de disminuir la infección ocasionada por diferentes especies de *Leishmania* continúa siendo estudiada en nuestro laboratorio.

IX. CONCLUSIONES

- Se diseñó un algoritmo biológico para el descubrimiento de nuevas moléculas activas contra la leishmaniosis cutánea.
- Se implementó un sistema de cribado de alto rendimiento utilizando el modelo de amastigotes axénicos de *L. amazonensis* para evaluar 148 especies de plantas reportadas por las comunidades y pueblos indígenas para el tratamiento de la leishmaniosis en el Perú.
- Las plantas activas sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis* pertenecieron a las especies *Cestrum racemosum*, *Renealmia alpinia*, *Piper dennisii*, *Piper hispidum*, *Piper strigosum* e *Himatanthus sucuuba* con una CI_{50} menor a $10\mu\text{g/ml}$.
- Se utilizó el modelo de macrófagos peritoneales de ratón BALB/c para evaluar la citotoxicidad de 117 compuestos naturales y derivados de síntesis. permitiendo seleccionar a 22 compuestos con un índice de selectividad mayor a 10.
- Los compuestos naturales con mejor actividad anti-*Leishmania* y mayor selectividad fueron el 1-metilbutil cafeato, la damsina y 3 benzo[*c*]fenantridinas (avicine, fagaridine y chelerythrine) aislados a partir de *Piper sanguineispicum*, *Ambrosia peruviana* y *Zanthoxylum rhoifolium* respectivamente.
- El compuesto natural Fagaridine y los compuestos 42 y 43 del grupo de las chalconas sintéticas fueron los más activos en el modelo de infección *in vivo* a la dosis de 5 mg/kg.

X. PERSPECTIVAS

- El algoritmo biológico propuesto en este trabajo puede ser complementado con estudios de toxicidad aguda y evaluación de la dosis letal media (DL_{50}) de los compuestos puros fagaridine, Chalcona 42 y Chalcona 43 en un modelo *in vivo* utilizando ratones BALB/c.
- Realizar estudios de farmacodinámica y farmacocinética de los compuestos más activos para entender cuál es la dosis más alta (no toxica) que pueda mantener una presencia constante y estable del compuesto en la zona de la lesión generada por los parásitos de *Leishmania*.
- Evaluar el efecto leishmanicida de los compuestos en un modelo de infección *in vivo* utilizando ratones BALB/c infectados con *L. peruviana* y *L. braziliensis*.
- Tomando en cuenta la metabolización de los compuestos cuando ingresan al huésped mamífero se propone evaluar diferentes vías de administración del compuesto en ratones infectados con parásitos de *Leishmania*. Estas vías de administración pueden ser oral, intraperitoneal o tópica.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Kader MS, Wisse J, Evans R, van der Werff H, Kingston DG. Bioactive iridoids and a new lignan from *Allamanda cathartica* and *Himatanthus fallax* from the Suriname rainforest. *J Nat Prod.* 1997; 60(12):1294-7.
- Adebayo OL, Suleman D, Samsom AA. Natural products in antileishmanial drug discovery: a review. *Journal of Asian Scientific Research*, 2013; 3(2):157-173.
- Allen S. and Neal R. The in vitro Susceptibility of Macrophages Infected with Amastigotes of *Leishmania spp.* to Pentavalent Antimonial Drugs and Other Compounds with Special Relevance to Cutaneous Isolates. *Leishmaniasis.* 1989; 171: 711-720.
- Amato VS, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(2):266-74.
- Aponte JC, Castillo D, Estevez Y, Gonzalez G, Arevalo J, Hammond GB, Sauvain M. *In vitro* and *in vivo* anti-*Leishmania* activity of polysubstituted synthetic chalcones. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010b; 20(1):100-3.
- Aponte JC, Jin Z, Vaisberg AJ, Castillo D, Málaga E, Lewis WH, Sauvain M, Gilman RH, Hammond GB. Cytotoxic and anti-infective phenolic compounds isolated from *Mikania decora* and *Crematosperma microcarpum*. *Planta Med.* 2011; 77(14):1597-9.
- Aponte JC, Vaisberg AJ, Castillo D, Gonzalez G, Estevez Y, Arevalo J, Quiliano M, Zimic M, Verástegui M, Málaga E, Gilman RH, Bustamante JM, Tarleton RL, Wang Y, Franzblau SG, Pauli GF, Sauvain M, Hammond GB. Trypanoside, anti-tuberculosis,

leishmanicidal, and cytotoxic activities of tetrahydrobenzothienopyrimidines. *Bioorg Med Chem.* 2010c; 18(8):2880-6.

- Aponte JC, Yang H, Vaisberg AJ, Castillo D, Málaga E, Verástegui M, Casson LK, Stivers N, Bates PJ, Rojas R, Fernandez I, Lewis WH, Sarasara C, Sauvain M, Gilman RH, Hammond GB. Cytotoxic and anti-infective sesquiterpenes present in *Plagiochila disticha* (Plagiochilaceae) and *Ambrosia peruviana* (Asteraceae). *Planta Med.* 2010a; 76(7):705-7.
- Araya JE, Neira I, da Silva S, Mortara RA, Manque P, Cordero E, Sagua H, Loyola A, Bórquez J, Morales G, González J. Diterpenoids from *Azorella compacta* (Umbelliferae) active on *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(3):413-8
- Arevalo J, Ramirez L, Adai V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, Lazo M, Loayza-Muro R, De Doncker S, Maurer A, Chappuis F, Dujardin JC, Llanos-Cuentas A. Influence of *Leishmania* (Viannia) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2007;195(12):1846-51.
- Arisawa, M.; Pezzuto, J. M.; Bevelle, C.; Cordell, G. A., Potential Anticancer Agents XXXI. N-Demethylation of Fagaronine. *Journal of Natural Products.* 1984, 47 (3), 453-458
- Baldoqui DC, Kato MJ, Cavalheiro AJ, Bolzani Vda S, Young MC, Furlan M. A chromene and prenylated benzoic acid from *Piper aduncum*. *Phytochemistry.* 1999;51(7):899-902.
- Bern C, Haque R, Chowdhury R, Ali M, Kurkjian KM, Vaz L, Amann J, Wahed MA, Wagatsuma Y, Breiman RF, Williamson J, Secor WE, Maguire JH. The epidemiology

of visceral leishmaniasis and asymptomatic leishmanial infection in a highly endemic Bangladeshi village. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 76, 909–914.

- Beutler JA. Natural products as a foundation for drug discovery. *Curr Protoc Pharmacol.* 2009; 46:9.11.1
- Bourdy G, Valadeau C, Albán J. *Yato´ Ramuesh: Plantas Medicinales Yaneshas.* IRD, 2008. 1: p 129-131.
- Buckner FS, Wilson AJ. Colorimetric assay for screening compounds against *Leishmania* amastigotes grown in macrophages. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72(5):600-5.
- Burguete A, Estevez Y, Castillo D, González G, Villar R, Solano B, Vicente E, Silanes SP, Aldana I, Monge A, Sauvain M, Deharo E. Anti-leishmanial and structure-activity relationship of ring substituted 3-phenyl-1-(1,4-di-N-oxide quinoxalin-2-yl)-2-propen-1-one derivatives. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103(8):778-80.
- Cabanillas BJ, Le Lamer AC, Castillo D, Arevalo J, Estevez Y, Rojas R, Valadeau C, Bourdy G, Sauvain M, Fabre N. Dihydrochalcones and benzoic acid derivatives from *Piper dennisii*. *Planta Med.* 2012; 78(9):914-8.
- Cabanillas BJ1, Le Lamer AC, Castillo D, Arevalo J, Rojas R, Odonne G, Bourdy G, Moukarzel B, Sauvain M, Fabre N. Caffeic acid esters and lignans from *Piper sanguineispicum*. *J Nat Prod.* 2010; 73(11):1884-90.
- Callahan HL, Portal AC, Devereaux R, Grogl M. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41:818–822.
- Campos TM, Costa R, Passos S, Carvalho LP. Cytotoxic activity in cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2017;112(11):733-740.

- Castillo D, Arevalo J, Herrera F, et al. Spirolactone iridoids might be responsible for the antileishmanial activity of a Peruvian traditional remedy made with *Himatanthus sucuuba* (Apocynaceae). *J Ethnopharmacol* 2007; 112:410-4.
- Castillo D, Sauvain M, Rivaud M, Jullian V. *In vitro* and *in vivo* activity of benzo[c]phenanthridines against *Leishmania amazonensis*. *Planta Med* . 2014; 80 (11): 902-6
- Chen, M., et al., Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993. 37(12): p. 2550-6.
- Correa B, Purchio A, Paula CR, Gambale W, Shikanai-Yasuda MA. Fluorescent method (fluorescein diacetate and ethidium bromide) to study the viability of *Cryptococcus neoformans* in liquor. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1990; 32(1):46-50.
- Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res*. 2006; 123:399–410.
- Cunningham, A. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp. Mol. Path*; 2002; 72:132-41.
- Da Silva ER, Maquiaveli Cdo C, Magalhães PP. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. *Exp Parasitol*. 2012;130(3):183-8.
- De Muylder G, Ang KKH, Chen S, Arkin MR, Engel JC, McKerrow JH. A Screen against *Leishmania* Intracellular Amastigotes: Comparison to a Promastigote Screen and Identification of a Host Cell-Specific Hit. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2011; 5(7): e1253.

- De Rycker M, Hallyburton I, Thomas J, et al. Comparison of a High-Throughput High-Content Intracellular *Leishmania donovani* Assay with an Axenic Amastigote Assay. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013; 57(7):2913-2922.
- Decuypere S, Rijal S, Yardley V, De Doncker S, Laurent T, Khanal B, Chappuis F, Dujardin JC. Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb(V) resistance in *Leishmania donovani* isolates from Nepal. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005; 49: 4616-21.
- Eichner S, Thoma-Uszynski S, Herrgott I, Sebald H, Debus A, Tsianakas A, Ehrchen J, Harms G, Simon M, Sunderkötter C, Bogdan C. Clinical complexity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infections amongst travelers. *Eur J Dermatol*. 2013; 1;23(2):218-23.
- Ekor M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. *Frontiers in Pharmacology*. 2013; 4:177.
- Farias LHS, Rodrigues APD, Coêlho EC, Santos MF, Sampaio SC, Silva EO. Crotoxin stimulates an M1 activation profile in murine macrophages during *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitology*. 2017; 144(11):1458-1467.
- Estevez Y, Castillo D, Pisango MT, Arevalo J, Rojas R, Alban J, Deharo E, Bourdy G, Sauvain M. Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group. *J Ethnopharmacol*. 2007; 114(2):254-9.
- Ferreira C, Soares DC, Barreto-Junior CB, Nascimento MT, Freire-de-Lima L, Delorenzi JC, Lima ME, Atella GC, Folly E, Carvalho TM, Saraiva EM, Pinto-da-Silva LH. Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*. *Phytochemistry*. 2011; 72(17):2155-64.

- Ferreira C, Soares DC, do Nascimento MTC, et al. Resveratrol is active against *Leishmania amazonensis*: *In vitro* effect of its association with Amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014; 58(10):6197-6208.
- Flores N, Jiménez IA, Giménez A, Ruiz G, Gutiérrez D, Bourdy G, Bazzocchi IL. Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species. *Phytochemistry*. 2009;70(5):621-7.
- Fouad, M.A., Mohamed, K.M., Kamel, M.S., Matsunami, K., Otsuka, H. Cesdiurins I–III, steroidal saponins from *Cestrum diurnum* L. *Nature Medicine (Tokyo)*. 2008; 62, 168–173.
- Franke E, Llanos-Cuentas A, Echevarría J, et al. Efficacy of 28-day and 40-day regimens of sodium stibogluconate (Pentostam) in the treatment of mucosal leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1994; 51:77–82.
- Franke ED, Wignall FS, Cruz ME, Rosales E, Tovar AA, Lucas CM, Llanos-Cuentas A, Berman JD. Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. *Ann Intern Med*. 1990; 113, 934-940.
- Fuchino, H.; Kawano, M.; Mori-Yasumoto, K.; Sekita, S.; Satake, M.; Ishikawa, T.; Kiuchi, F.; Kawahara, N., *In Vitro* Leishmanicidal Activity of Benzophenanthridine Alkaloids from *Bocconia pearcei* and Related Compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2010, 58 (8), 1047-1050.
- Fumarola L, Spinelli R, Brandonisio O. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Res Microbiol*. 2004;155(4):224-30.
- Galvão EL, Rabello A, Cota GF. Efficacy of azole therapy for tegumentary leishmaniasis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017;12(10): e0186117.

- Ganguly S, Bandyopadhyay S, Sarkar A, Chatterjee M. Development of a semi-automated colorimetric assay for screening anti-leishmanial agents. *J Microbiol Methods*. 2006; 66:79–86.
- Garcia AR, Amaral ACF, Azevedo MMB, Corte-Real S, Lopes RC, Alviano CS, Pinheiro AS, Vermelho AB, Rodrigues IA. Cytotoxicity and anti-*Leishmania amazonensis* activity of *Citrus sinensis* leaf extracts. *Pharm Biol*. 2017; 55(1):1780-1786.
- Germonprez, N., Maes, L., Van Puyvelde, L., Van Tri, M., Tuan, D.A., De Kimpe, N. *In vitro* and *in vivo* anti-leishmanial activity of triterpenoid saponins isolated from *Maesa balansae* and some chemical derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2005; 48, 32–37.
- González G, Castillo D, Estevez Y, Grentzinger T, Deharo E. *Leishmania (Viannia) peruviana* (MHOM/PE/LCA08): comparison of THP-1 cell and murine macrophage susceptibility to axenic amastigotes for the screening of leishmanicidal compounds. *Exp Parasitol*. 2009;122(4):353-6.
- Grogl M, Hickman M, Ellis W, et al. Drug Discovery Algorithm for Cutaneous Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2013;88(2):216-221.
- Hamlin, C.C. and J. Salick, Yanasha agriculture in the upper Peruvian amazon: persistence and change fifteen years down the ‘road’. *Economic Botany*, 2003. 57(2): p. 163-180.
- Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis: an overview. *J Postgrad Med*. 2003; 49(1):50-4.

- Hermoso, A., et al., Antileishmanial activities of dihydrochalcones from *Piper elongatum* and synthetic related compounds. Structural requirements for activity. *Bioorg Med Chem*, 2003. 11(18): p. 3975-80.
- Hodgkinson VH, Soong L, Duboise SM, McMahon-Pratt D. *Leishmania amazonensis*: cultivation and characterization of axenic amastigote-like organisms. *Exp Parasitol*. 1996; 83:94–105.
- Kato H, Cáceres AG, Mimori T, et al. Use of FTA Cards for Direct Sampling of Patients' Lesions in the Ecological Study of Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48(10):3661-3665.
- Koarashi Y, Cáceres AG, Saca FM, Flores EE, Trujillo AC, Alvares JL, Yoshimatsu K, Arikawa J, Katakura K, Hashiguchi Y, Kato H. Identification of causative *Leishmania* species in Giemsa-stained smears prepared from patients with cutaneous leishmaniasis in Peru using PCR-RFLP. *Acta Trop*. 2016; 158:83-7.
- Kvist LP, Christensen SB, Rasmussen HB, Mejia K, Gonzalez A. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006; 106, 390–402.
- Lee KH, Huang E-S, Pianadosi C, Pagano JS, Geissman TA. Cytotoxicity of sesquiterpene lactones. *Cancer Res* 1971; 31: 1649–1654.
- Lefèvre L, Authier H, Stein S, et al. LRH-1 mediates anti-inflammatory and antifungal phenotype of IL-13-activated macrophages through the PPAR γ ligand synthesis. *Nature Communications*. 2015; 6:6801.
- Legare D, Richard D, Mukhopadhyay R, Stierhof YD, Rosen BP, Haimeur A, Papadopoulou B, Ouellette M. The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J Biol Chem*. 2001; 276: 26301-7.

- Llanos-Cuentas A, Tulliano G, Araujo-Castillo R, Miranda-Verastegui C, Santamaria-Castrellon G, Ramirez L, Lazo M, De Doncker S, Boelaert M, Robays J, Dujardin JC, Arevalo J, Chappuis F. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis*. 2008;46(2):223-31.
- Lopes MA, Fischman O, Gambale W, Corrêa B. Fluorescent method for studying the morphogenesis and viability of dermatophyte cells. *Mycopathologia*. 2003;156(2):61-6.
- Lucas C, Franke E, Cachay M, Tejada A, Cruz M, Kreutzer R, *et al*. Geographic distribution and clinical description of Leishmaniasis cases in Peru. *Am J Trop Med Hyg*. 1998; 59:312-317.
- Maridass M, De Brito AJ. Origins of Plant Derived Medicines. *Ethnobotanical Leaflets*2008; 12: 373-387.
- Mikus J, Steverding D. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue. *Parasitol Int*. 2000; 48:265–269.
- Montero-Torres A, Vega MC, Marrero-Ponce Y, Rolón M, Gómez-Barrio A, Escario JA, Arán VJ, Martínez-Fernández AR, Meneses-Marcel A. A novel non-stochastic quadratic fingerprints-based approach for the 'in silico' discovery of new antitrypanosomal compounds. *Bioorg Med Chem*. 2005;13(22):6264-75.
- Morales B, Manrique C. *Análisis de situación de salud*. Madre de Dios: Dirección de epidemiología, Prevención y Control de Emergencias y Desastres; 2016 [revisado 2018, citado 27 febrero 2018]. Disponible en http://dge.gob.pe/portal/Asis/indreg/asis_madrededios.pdf

- Nagle AS, Khare S, Kumar AB, et al. Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. *Chemical Reviews*. 2014;114(22):11305-11347.
- Nakanishi, T.; Suzuki, M.; Saimoto, A.; Kabasawa, T., Structural Considerations of NK109, an Antitumor Benzo[c]phenanthridine Alkaloid. *Journal of Natural Products* 1999, 62 (6), 864-867.
- Ndjakou Lenta B, Vonthron-Sénécheau C, Fongang Soh R, Tantangmo F, Ngouela S, Kaiser M, Tsamo E, Anton R, Weniger B. *In vitro* antiprotozoal activities and cytotoxicity of some selected Cameroonian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 2007; 111, 8–12.
- Nyandoro SS, Nkunya MHH, Joseph CC, Odalo JO, Sattler I. New Glucopyranosylglyceryl-N-Octenyl Adipate and Bioactivity of Retro and Condensed Chalcones from *Toussaintia orientalis*. *Tanz. J. Sci.* 2012; 38(3).
- Odonne G, Bourdy G , Castillo D , Estevez Y , Lancha-Tangoa A , Alban-Castillo J , Deharo E , Rojas R , Stien D , Sauvain M . Ta'ta', Huayani: perception of leishmaniasis and evaluation of medicinal plants used by the Chayahuita in Peru. Part II. *J Ethnopharmacol.* 2009; 126 (1): 149-58
- Odonne G. Bourdy G, Ochoa N, Albán J., *Plantas medicinales y de otros usos de los Shawi*. Concytec/Fondecyt, IRD, 2014. 1: p. 167-168.
- Orjala J1, Erdelmeier CA, Wright AD, Rali T, Sticher O. Five new prenylated p-hydroxybenzoic acid derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. *Planta Med.* 1993;59(6):546-51.
- Palomino JC, Falconi E, Marin D, Guerra H. Assessing the viability of *Mycobacterium leprae* by the fluorescein diacetate/ethidium bromide staining technique. *Indian J Lepr.* 1991;63(2):203-8.

- Passero LF, Bonfim-Melo A, Corbett CE, Laurenti MD, Toyama MH, de Toyama DO, Romoff P, Fávero OA, dos Grecco SS, Zalewsky CA, Lago JH. Anti-leishmanial effects of purified compounds from aerial parts of *Baccharis uncinella* C. DC. (Asteraceae). *Parasitol Res.* 2011; 108(3):529-36.
- Passero LF, Laurenti MD, Santos-Gomes G, Soares Campos BL, Sartorelli P, Lago JH. Plants used in traditional medicine: extracts and secondary metabolites exhibiting antileishmanial activity. *Curr Clin Pharmacol.* 2014;9(3):187-204.
- Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, Barrett M, López-Vélez R, García-Hernández R, Pountain A, Mwenechanya R, Papadopoulou B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; 11(12): e0006052.
- Rates SM. Plants as source of drugs. *Toxicon.* 2001; 39:603–613
- Reveiz L, Maia-Elkhoury AN, Nicholls RS, Romero GA, Yadon ZE. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: a systematic review update. *PLoS One.* 2013;8(4): e61843.
- Ribeiro TG, Chávez-Fumagalli MA, Valadares DG, Franca JR, Lage PS, Duarte MC, Andrade PH, Martins VT, Costa LE, Arruda AL, Faraco AA, Coelho EA, Castilho RO. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. *Exp Parasitol.* 2014; 143:60-8.
- Rocha LG, Almeida JR, Macêdo RO, Barbosa-Filho JM. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine.* 2005; 12:514-535.
- Rocha MAN, Matos-Rocha TJ, Ribeiro CMB, Abreu SRO. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in State of Alagoas, Northeast, Brazil. *Braz J Biol.* 2018 Feb 5:0. [Epub ahead of print]

- Rodrigues JC, Godinho JL, de Souza W. Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. *Subcell Biochem.* 2014; 74:1-42.
- Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, Varona MX, Ouellette M, Saravia NG. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *J Infect Dis.* 2006; 193: 1375-83.
- Ruiz C., Haddad Mohamed, Alban J., Bourdy Geneviève, Reategui R., Castillo D., Sauvain Michel, Deharo Eric, Estevez Yannick, Arevalo J., Rojas R. Activity-guided isolation of antileishmanial compounds from *Piper hispidum*. *Phytochemistry Letters*, 2011, 4 (3), p. 363-366.
- Sánchez L, Sáenz E, Pancorbo J, Zegarra R, Garcés N, Regis A. Leishmaniasis. *Dermatología Peruana.* 2004; 14 (2): 82-98
- Sandor R, Midlik A, Sebrlova K, Dovrtelova G, Noskova K, Jurica J, Slaninova I, Taborska E, Pes O. Identification of metabolites of selected benzophenanthridine alkaloids and their toxicity evaluation. *J Pharm Biomed Anal.* 2016; 121: 174-180
- Sauvain, M., Dedet, J.P., Kunesch, N., Poisson, J., Gayral, P., Gantier, J.C., Kunesch, G. *In vitro* and *in vivo* leishmanicidal activities of natural and synthetic quinoids. *Phytotherapy Research*, 1993; 7, 167–171.
- San George S, Bishop JV, Titus RG, Selitrennikoff CP. Novel compounds active against *Leishmania major*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(2):474-9.
- Sereno D, Cordeiro da Silva A, Mathieu-Daude F, Ouaisi A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell-based drug-screening procedures. *Parasitol Int.* 2007; 56:3–7

- Sereno D, Lemesre JL. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1997a; 41:972-6.
- Sereno D, Lemesre JL. Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis* in vitro. *Parasitol Res* 1997b; 83:401-3.
- Sharlow ER, Close D, Shun T, Leimgruber S, Reed R, Mustata G, Wipf P, Johnson J, O'Neil M, Grögl M, Magill AJ, Lazo JS. Identification of potent chemotypes targeting *Leishmania major* using a high-throughput, low-stringency, computationally enhanced, small molecule screen. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009; 3(11): e540
- Sharma U, Singh D, Kumar P, Dobhal MP, Singh S. Antiparasitic activity of plumericin & isoplumericin isolated from *Plumeria bicolor* against *Leishmania donovani*. *Indian J Med Res*. 2011; 134(5):709-16.
- Singh OP, Sundar S. Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: current status and future prospects. *Front Immunol*. 2014; 5:296
- Siqueira-Neto JL, Song O-R, Oh H, et al. Antileishmanial High-Throughput Drug Screening Reveals Drug Candidates with New Scaffolds. Buffet P, ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2010;4(5): e675.
- Soares DC, Calegari-Silva TC, Lopes UG, et al. Dolabelladienetriol, a Compound from *Dictyota pfaffii* Algae, Inhibits the Infection by *Leishmania amazonensis*. Raper J, ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2012; 6(9): e1787.
- Sundar S, Agarwal D. Visceral Leishmaniasis - Optimum Treatment Options in Children. *Pediatr Infect Dis J*. 2017 Dec 26. [Epub ahead of print]
- Sundar S, Chakravarty J. An Update on Pharmacotherapy for Leishmaniasis. Expert opinion on pharmacotherapy. 2015;16(2):237-252.

- Tiuman TS, Ueda-Nakamura T, Garcia Cortez DA, et al. Antileishmanial Activity of Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone Isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005; 49(1):176-182.
- Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Research*. 2017; 6:750.
- Traviezo Valles LE. [Diversity of phlebotominae in an endemic zone of american visceral leishmaniasis in Venezuela]. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2012;29(4):503-8.
- Valadeau C, Pabón A, Deharo E, Albán-Castillo J, Estevez Y, Lores FA, Rojas R, Gamboa D, Sauvain M, Castillo D, Bourdy G. Medicinal plants from the Yanesha (Peru): evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts.. *J Ethnopharmacol* . 2009; 123 (3): 413-22.
- Valencia BM, Veland N, Alba M, et al. Non-Invasive Cytology Brush PCR for the Diagnosis and Causative Species Identification of American Cutaneous Leishmaniasis in Peru. *PLoS ONE*. 2012;7(11): e49738.
- Veiga A, Albuquerque K, Corrêa ME, Brigido H, Silva E Silva J, Campos M, Silveira F, Santos L, Dolabela M. *Leishmania amazonensis* and *Leishmania chagasi*: *In vitro* leishmanicide activity of *Virola surinamensis* (rol.) warb. *Exp Parasitol*. 2017; 175:68-73.
- Vermeersch M, da Luz RI, Toté K, Timmermans JP, Cos P, Maes L. *In vitro* susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(9):3855-9.
- Wang J, Peng Q, Li G. New compounds of natural resources in 2008. *Afr J Biotechnol*. 2009; 8:4299–4307

- Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. J Biol Chem. 2004; 279: 39925-32.
- Yamamoto ES, Campos BL, Laurenti MD, Lago JH, Grecco Sdos S, Corbett CE, Passero LF. Treatment with triterpenic fraction purified from *Baccharis uncinella* leaves inhibits *Leishmania (Leishmania) amazonensis* spreading and improves Th1 immune response in infected mice. Parasitol Res. 2014; 113(1):333-9.
- Yardley V, Ortuno N, Llanos-Cuentas A, Chappuis F, Doncker SD, Ramirez L, Croft S, Arevalo J, Adauí V, Bermudez H, Decuypere S, Dujardin JC. American tegumentary leishmaniasis: Is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? J Infect Dis. 2006;194(8):1168-75.
- Zauli-Nascimento RC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JK, Pereira LI, Pelli de Oliveira MA, Ribeiro-Dias F, Dorta ML, Uliana SR. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. Trop Med Int Health. 2010;15(1):68-76.
- Zhou Y, Messier N, Ouellette M, Rosen BP, Mukhopadhyay R. *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. J Biol Chem. 2004; 279: 37445-51.

XI. ANEXOS

ANEXO 1

Evaluación de la actividad leishmanicida de extractos etanólicos de 149 especies de plantas del Perú utilizadas en la medicina tradicional como remedios anti-*Leishmania* sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*.

Anexo 1a. Determinación de la CI₅₀ (µg/mL) de extractos etanólicos de plantas provenientes de la comunidad Yanasha.

Especie	Parte de la planta utilizada	CI₅₀ (µg/ml)
<i>Acalypha macrostachya</i>	hojas	32.9
<i>Acalypha mapirensis</i>	parte aérea	32.7
<i>Acrocarpus fraxinifolius</i>	corteza	93.2
<i>Anthurium croatii</i>	tallo	ND
<i>Anthurium ernestii</i>	hojas	31.7
<i>Anthurium ernestii</i>	raíz	23.1
<i>Begonia glabra</i>	hojas	>100
<i>Begonia parviflora</i>	hojas	18.1
<i>Brunfelsia grandiflora</i>	corteza	>100
<i>Calea montana</i>	hojas	10
<i>Capirona decorticans</i>	corteza	>100
<i>Carica papaya</i>	hojas	11
<i>Cecropia latiloba</i>	hojas	>100
<i>Cestrum racemosum</i>	hojas	9.8
<i>Clusia hammeliana</i>	hojas	50.8
<i>Clusia trochiformis</i>	hojas	>100
<i>Columnea guttata</i>	hojas	28.8
<i>Cyathea sp</i>	corteza	>100
<i>Daucus montanus</i>	raíz	50.8
<i>Desmodium adscendens</i>	planta entera	33.1
<i>Dieffenbachia williamsii</i>	tallo	>100
<i>Dracontium lorentense</i>	tubérculo	60
<i>Euphorbia heterophylla</i>	hojas	25.6
<i>Gloxinia sylvatica</i>	hojas	>100
<i>Gurania lobata</i>	hojas	>100

Especie	Parte de la planta utilizada	CI₅₀ (µg/ml)
<i>Hamelia patens</i>	hojas	>100
<i>Hedychium coronarium</i>	rizoma	10
<i>Hedyosmum lechleri</i>	hojas	17.9
<i>Heliocarpus americanus</i>	corteza	>100
<i>Hyptis lacustris</i>	hojas	10
<i>Iresine diffusa</i>	hojas	63.3
<i>Irlbachia alata</i>	hojas	37.4
<i>Jacaranda copaia</i>	hojas	16.5
<i>Lantana sp.</i>	hojas	10
<i>Liabum eriocaulon</i>	hojas	>100
<i>Mansoa alliacea</i>	corteza	21.8
<i>Munnozia hastifolia</i>	corteza	14.1
<i>Nectandra cuspidata</i>	corteza	>100
<i>Oreocallis grandiflora</i>	hojas	23.7
<i>Oxalis boliviana</i>	hojas	>100
<i>Paullinia bracteosa</i>	corteza	60
<i>Peperomia distachya</i>	hojas	25.9
<i>Persea peruviana</i>	corteza	>100
<i>Philodendron ernestii</i>	tallo	>100
<i>Phoradendron crassifolium</i>	hojas	14.2
<i>Phthirusa robusta</i>	hojas	37.7
<i>Phthirusa stelis</i>	hojas	28.5
<i>Phytolacca rivinoides</i>	frutos	26.3
<i>Piper aduncum</i>	hojas	ND
<i>Piper crassinervium</i>	hojas	25.8
<i>Piper dennisii</i>	hojas	9.9
<i>Piper politaereum</i>	hojas	50.3
<i>Piper sp</i>	hojas	29.5
<i>Piper sp</i>	hojas	19.9
<i>Piper umbellatum</i>	hojas	39.5
<i>Pityrogramma calomelanos</i>	hojas	88
<i>Pseudolmedia laevis</i>	hojas	32
<i>Psychotria poeppigiana</i>	hojas	>100
<i>Renealmia alpinia</i>	rizoma	9
<i>Renealmia thyrsoidea</i>	rizoma	10
<i>Rollinia mucosa</i>	hojas	25.2
<i>Ruellia ruiziana</i>	hojas	>100
<i>Sanchezia oblonga</i>	hojas	>100
<i>Satyria panurensis</i>	hojas	>100
<i>Selaginella conduplicata</i>	hojas	86.1

Especie	Parte de la planta utilizada	CI₅₀ (µg/ml)
<i>Senna ruiziana</i>	hojas	>100
<i>Siparuna aspera</i>	hojas	ND
<i>Siparuna radiata</i>	hojas	>100
<i>Solanum peruvianum</i>	parte aérea	14.2
<i>Stachytarpheta cayennensis</i>	parte aérea	>100
<i>Tabernaemontana sananho</i>	corteza	30.9
<i>Tetragastris panamensis</i>	corteza	>100
<i>Tripogandra serrulata</i>	hojas	>100
<i>Urera baccifera</i>	hojas	48.6
<i>Verbena littoralis</i>	parte aérea	33.3
<i>Vernonanthura patens</i>	hojas	>100
<i>Viola sp.</i>	corteza	>100
<i>Vismia baccifera</i>	corteza	>100
<i>Vismia pozuzoensis</i>	hojas	>100
<i>Vismia sp</i>	Tallo	54.3
<i>Warszewiczia coccinea</i>	corteza	>100
<i>Xiphidium caeruleum</i>	tallo	>100
<i>Zamia sp</i>	rizoma	>100

ND: No determinado

En gris se resalta las plantas con una CI₅₀ < 10µg/mL sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*.

Datos publicados en **Valadeau et al. 2009**

Anexo 1b. Determinación de la CI₅₀ (µg/mL) de extractos etanólicos de plantas provenientes del pueblo Yanapari.

Especie	Parte de la planta utilizada	CI₅₀ (µg/ml)
<i>Brunfelsia grandiflora</i>	Corteza	>100
<i>Capirona decorticans</i>	Corteza	>100
<i>Cyathea sp.</i>	Corteza	>100
<i>Dracontium loretense</i>	tubérculo	60
<i>Himatanthus sucuuba</i>	Corteza	5
<i>Paullinia bracteosa</i>	Corteza	60
<i>Zamia sp.</i>	rizoma	>100

En gris se resalta las plantas con una CI₅₀ < 10µg/mL sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*.

Datos publicados en **Castillo et al. 2007**

Anexo 1c. Determinación de la CI₅₀ (µg/mL) de extractos etanólicos de plantas provenientes de la comunidad Chayahuita.

Especie	Parte de la planta utilizada	CI₅₀ (µg/ml)
<i>Abuta sp.</i>	tallo	>100
<i>Arrabidaea chica</i>	hojas	>100
<i>Bauhinia hirsutissima</i>	hojas	>100
<i>Bellucia pentamera</i>	corteza	>100
<i>Caladium picturatum</i>	raíz	>100
<i>Caladium steudneriifolium</i>	raíz	>100
<i>Calycophyllum spruceanum</i>	corteza	>100
<i>Capirona decorticans</i>	corteza	>100
<i>Capsicum sp.</i>	hojas	28.2
<i>Clibadium sylvestre</i>	parte aérea	15.7
<i>Clusia amazonica</i>	ramas	32.9
<i>Clusia amazonica</i>	hojas	34.7
<i>Copaifera paupera</i>	corteza	>100
<i>Cordia nodosa</i>	raíz	>100
<i>Crematosperma longicuspe</i>	corteza	>100
<i>Croton lechleri</i>	corteza	31.3
<i>Cybianthus anthuriophyllus</i>	raíz	12.3
<i>Desmodium axillare</i>	parte aérea	17
<i>Dieffenbachia costata</i>	hojas	>100
<i>Dracontium spruceanum</i>	raíz	>100
<i>Garcinia macrophylla</i>	corteza	>100
<i>Garcinia macrophylla</i>	hojas	>100
<i>Geophila repens</i>	frutos	87
<i>Grias peruviana</i>	corteza	>100
<i>Hebeclinium macrophyllum</i>	parte aérea	31.5
<i>Iryanthera juruensis</i>	corteza	>100
<i>Iryanthera sp.</i>	corteza	>100
<i>Isertia hypoleuca</i>	tallo	>100
<i>Klarobelia cauliflora</i>	corteza	>100
<i>Lacmellea oblongata</i>	hojas	>100
<i>Lacmellea oblongata</i>	corteza	>100
<i>Macrocnemum roseum</i>	hojas	22.4
<i>Macrocnemum roseum</i>	ramas	37.2
<i>Mussatia hyacinthina</i>	corteza	>100
<i>Perebea guianensis</i>	corteza	>100
<i>Philodendron solimoesense</i>	hojas	>100

Especie	Parte de la planta utilizada	CI₅₀ (µg/ml)
<i>Philodendron surinamense</i>	raíz	>100
<i>Phytolacca rivinoides</i>	hojas	91
<i>Piper hispidum</i>	hojas	5
<i>Piper loretoanum</i>	parte aérea	13.6
<i>Piper sanguineispicum</i>	tallo	15.3
<i>Piper sp</i>	hojas	26.2
<i>Piper sp</i>	hojas	35.2
<i>Piper strigosum</i>	hojas	7.8
<i>Pseudoelephantopus spicatus</i>	parte aérea	27.1
<i>Rudgea loretensis</i>	corteza	34.2
<i>Rudgea loretensis</i>	hojas	39.6
<i>Salacia juruana</i>	corteza	41
<i>Siparuna sp</i>	tallo	>100
<i>Smilax papyracea</i>	tallo	>100
<i>Solanum stramonifolium</i>	frutos	56.9
<i>Spondias mombin</i>	corteza	>100
<i>Swartzia simplex</i>	hojas	>100
<i>Tabernaemontana sananho</i>	raíz	58
<i>Talinum paniculatum</i>	raíz	>100
<i>Tilesia baccata</i>	hojas	27.3
<i>Triplaris americana</i>	corteza	>100
<i>Vismia tomentosa</i>	corteza	52.4
<i>Warszewiczia cordata</i>	tallo	60.6
<i>Zamia amazonum</i>	raíz	81
<i>Zamia lindenii</i>	tallo	33

En gris se resalta las plantas con una CI₅₀ < 10µg/mL sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*.

Datos publicados en **Estevez et al. 2007** y **Odonne et al. 2009**

ANEXO 2

Evaluación de la actividad leishmanicida de 35 compuestos naturales sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*.

Espece	Compuestos	CI ₅₀ (μM)	SD
<i>H. sucuuba</i>	Plumericina	0.2	0.01
	Isoplumericina	0.3	0.01
<i>P. sanguineispicum</i>	1-metilbutil cafeato	2.0	0.11
	1-metilhexil cafeato	10.0	0.37
	1-metiloctil cafeato	1.8	0.08
	(8S,7'S,8'R)-3,3',4,4'-bis(metilendioxi)-7'-hidroxi-7-oxolignano-9,9'-lactona	36.7	3.08
	(8S,7'S,8'S)-3,3',4,4'-bis(metilendioxi)-7'-hidroxi-7-oxolignano-9,9'-lactona	>130	-
	(8S,7'S,8'R)-7'-acetoxi-3,4-metilendioxi-3',4'-dimetoxi-7-oxolignano-9,9'-lactona	105.4	2.4
	(8R,7'S,8'S)-7'-acetoxi-3,3',4,4'-bis(metilendioxi)-7-oxolignano-9,9'-lactona	69.7	2.8
	(7'S)-Parabenzolactona	79.4	0.68
	Dihidrocubebin	>140	-
Justiflorinol	>140	-	
<i>P. dennisii</i>	Acido 4-hidroxi-3,5-bis(3-metil-2-butenil)-benzoico	261.5	21.5
	Acido 3,5-bis(3-metil-2-butenil)-4-metoxibenzoico	244.6	27.4
	Acido 4-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-5-(3-metil-2-butenil)-benzoico	112.1	10.4
	2',6'-Dihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona	183.4	15.4
	4,2',6'-Trihidroxi-4'-metoxidihidrochalcona	61.4	13.1
	Ácido dennisiico A	56.9	7.1
	Ácido dennisiico B	>89	-
	Piperaduncin C	39.7	4.0
	Acido 2,2-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-2H-1-cromeno-6-carboxílico	199.9	0.7
Acido 3-(3',7'-dimetil-2',6'-octadienil)-4-metoxibenzoico	20.8	8.7	
<i>P. hispidum</i>	N-2-(3',4',5'-Trimethoxyphenyl)ethyl-2-hydroxybenzamide	>40	-
	2'-Hydroxy-3',4',6'-trimethoxychalcone	0.8	0.01
	Cardamomin (2',4'-dihydroxy-6'-methoxychalcone)	8	0.54
	Pinocembrin (5,7-dihydroxyflavanone)	>40	-
<i>P. disticha</i>	Plagiochilina A	7.1	0.43

<i>A. peruviana</i>	Damsina	1.9	0.03
	Confertina	3.3	0.52
<i>M. decora</i>	10-acetoxy-8,9-epoxy-6-methoxythymol isobutyrate	29.5	1.26
	Acetylschizogynol	3.2	0.31
<i>Z. rhoifolium</i>	Avicine	0.3	0.1
	Nitidine	0.5	0.1
	Fagaridine	0.5	0.02
	Chelerythrine	0.03	0.00
Control positivo	Anfotericina B	0.1	0.01

CI₅₀: Concentración inhibitoria media determinada sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*, SD: Desviación estándar. Los ensayos fueron realizados por triplicado en tres experimentos independientes.

Datos publicados en **Castillo *et al.* 2007, Cabanillas *et al.* 2010, Cabanillas *et al.* 2012, Ruiz *et al.* 2011, Aponte *et al.* 2010a, Aponte *et al.* 2011 y Castillo *et al.* 2014**

ANEXO 3

Evaluación de la actividad leishmanicida de 43 compuestos de la familia de las chalconas sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis* y ubicación de los sustituyentes en la estructura general de la chalcona.

Anexo 3a. Actividad *in vitro* de 43 compuestos de la familia de las chalconas sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*

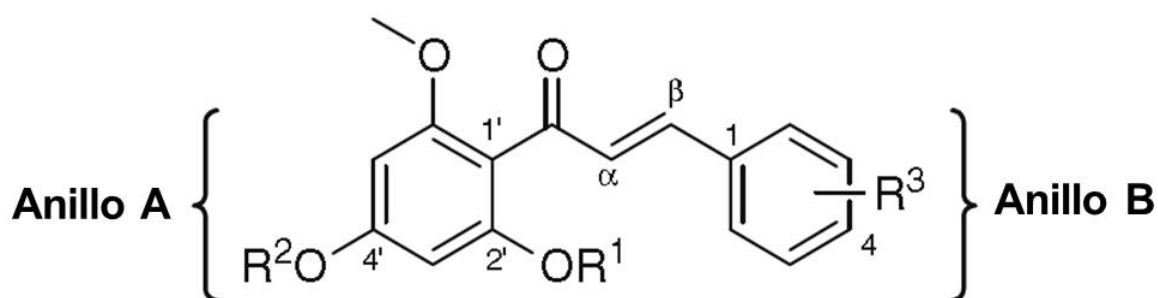
Compuesto	Sustituyentes del anillo A	Sustituyentes del anillo B	CI ₅₀ (μM) ± SD
1	2'-Hidroxi,4'-metoxi	4-Metoxi	17.2 ± 12.3
2		3,4-Metilenedioxi	>300
3	2',4'-Dialiloxi	Benzil	9.4 ± 1.5
4		4-Metil	79.8 ± 5.2
5		4-Metoxi	5.5 ± 1.0
6		3-Metoxi	8.7 ± 0.8
7		4-Hidroxi	85.2 ± 3.3
8		4-Hidroxi-3-Metoxi	107.2 ± 5.1
9		3,4-Metilenedioxi	6.6 ± 4.2
10		2,4-Dimetoxi	134.5 ± 9.7
11		3,4,5-Trimetoxi	8.2 ± 3.9
12		4-Trifluorometil	127.6 ± 5.6
13		4-Cloro	9.4 ± 4.3
14		4-Fluoro	9.5 ± 1.8
15		2-Fluoro	9.5 ± 0.8
16		2-Bromo	7.9 ± 2.4
17		4-Nitro	8.3 ± 1.0
18		4-Bromo-3,5-Dialiloxi	>180
19		Cinnamil	75.2 ± 10.3
20		4-Piridinil	0.6 ± 0.1
21		2-Piridinil	1.1 ± 0.3
22		2-Pirrolil	94.3 ± 11.4
23		2-Funanil	>300
24	2',4'-Dihidroxi	Benzil	15.9 ± 1.7
25		4-Metil	7.4 ± 1.9
26		4-Metoxi	10 ± 0.1
27		3-Metoxi	12 ± 0.2

Compuesto	Sustituyentes del anillo A	Sustituyentes del anillo B	CI ₅₀ (μM) ± SD
28		4-Hidroxi	15.7 ± 3.6
29		4-Hidroxi-3-Metoxi	14.9 ± 1.7
30		3,4-Metilenedioxi	4.1 ± 1.2
31		2,4-Dimetoxi	6.4 ± 0.9
32		3,4,5-Trimetoxi	9.7 ± 1.2
33		4-Trifluorometil	8.6 ± 2.0
34		4-Cloro	11.2 ± 1.6
35		4-Fluoro	11.8 ± 0.3
36		2-Fluoro	11.8 ± 0.5
37		2-Bromo	10.6 ± 2.4
38		4-Bromo-3,5-Dimetoxi	1.1 ± 0.1
39		Cinnamil	52.6 ± 4.8
40		2-Funamil	4.6 ± 1.1
41	2',4'-Dimetoxi metil	4-Metoxi	1.3 ± 0.2
42		3,4-Metilenedioxi	11.7 ± 4.1
43	2'-Hidroxi-4'-	3,4,5-Trimetoxi	6.2 ± 0.7
Anf. B	-	-	0.1 ± 0.01

CI₅₀: Concentración inhibitoria media determinada sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*, SD: Desviación estándar. Los ensayos fueron realizados por triplicado en tres experimentos independientes.

Datos publicados en **Aponte et al. 2010b**

Anexo 3b. Ubicación del anillo A y el anillo B dentro de la estructura general de la chalcona



ANEXO 4

Evaluación de la actividad leishmanicida de 38 compuestos de la familia de las Tetrahydrobenzotienopirimidinas (BTP) sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis* y ubicación de los sustituyentes en la estructura general de la BTP.

Anexo 4a. Actividad *in vitro* de 38 compuestos de la familia de las tetrahydrobenzotienopirimidinas sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*

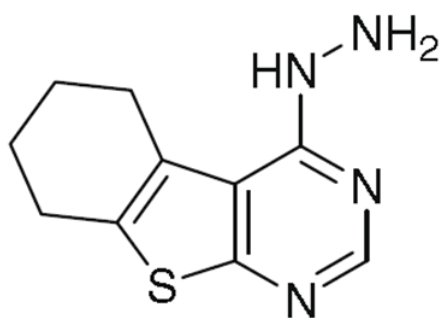
Compuesto	Sustituyentes R1 y R2	CI ₅₀ (μM)	SD
D	-	54.4	8.56
1	R1 = H, R2 = C ₆ H ₅	43.7	6.31
2	R1 = H, R2 = 1-Naftalenil	12.7	1.03
3	R1 = H, R2 = 2-Naftalenil	39.0	4.04
4	R1 = H, R2 = Cinnamil	16.6	0.95
5	R1 = H, R2 = C ₆ H ₄ -4-CH ₃	42.6	6.52
6	R1 = H, R2 = C ₆ H ₄ -4-CH ₂ CH ₃	15.7	4.34
7	R1 = H, R2 = C ₆ H ₄ -4-CH(C ₂ H ₆)	3.6	0.41
8	R1 = H, R2 = C ₆ H ₄ -4-CH(C ₃ H ₉)	1.7	0.15
9	R1 = H, R2 = C ₆ H ₄ -4-OH	41.6	9.91
10	R1 = H, R2 = C ₆ H ₄ -4-OCH ₃	47.5	8.38
11	R1 = H, R2 = C ₆ H ₄ -3-OCH ₃	36.1	4.67
12	R1 = H, R2 = C ₆ H ₃ -3,4-O-CH ₂ -O	29.4	13.49
13	R1 = H, R2 = C ₆ H ₃ -2,4-OCH ₃	33.2	9.24
14	R1 = H, R2 = C ₆ H ₂ -3,4,5-OCH ₃	7.2	0.41
15	R1 = H, R2 = C ₆ H ₃ -3-OCH ₃ , 4-OH	7.2	0.67
16	R1 = H, R2 = C ₆ H ₂ -3,5-OCH ₃ , 4-OH	40.8	8.24
17	R1 = H, R2 = C ₆ H ₂ -3,5-Alliloxi, 4-Br	5.3	2.55
18	R1 = H, R2 = 2-Furil	4.2	0.66
19	R1 = H, R2 = 2-Pirrolil	10.1	1.17
20	R1 = H, R2 = 4-Piridinil	232.6	35.99
21	R1 = H, R2 = 2-Piridinil	0.5	0.02
22	R1 = H, R2 = C ₆ H ₄ -4-NO ₂	38.5	4.96
23	R1 = H, R2 = C ₆ H ₄ -2-NO ₂	107.8	19.64
24	R1 = H, R2 = C ₆ H ₄ -4-CF ₃	2.0	0.01
25	R1 = H, R2 = C ₆ H ₄ -2-CF ₃	1.2	0.11
26	R1 = H, R2 = C ₆ H ₄ -4-F	9.7	0.84

Compuesto	Sustituyentes R1 y R2	CI ₅₀ (μM)	SD
27	R1 = H, R2 = C ₆ H ₄ -2-F	3.3	0.18
28	R1 = H, R2 = C ₆ H ₄ -4-Cl	1.7	0.06
29	R1 = H, R2 = C ₆ H ₄ -2-Cl	2.2	0.16
30	R1 = H, R2 = C ₆ H ₄ -4-Br	0.9	0.02
31	R1 = H, R2 = C ₆ H ₄ -2-Br	1.3	0.12
32	R1 = H, R2 = C ₆ H ₄ -4-CN	32.3	6.99
33	R1 = H, R2 = C(CH ₃) ₃	112.6	26.94
34	R1, R2 = CH ₃	40.6	10.56
35	R1 = CH ₃ , R2 = C ₆ H ₅	28.5	4.65
36	R1, R2 = CH ₂ CH ₃	19.0	1.13
37	R1, R2 = C ₆ H ₅	182.3	15.64
Anf B	-	0.1	0.01

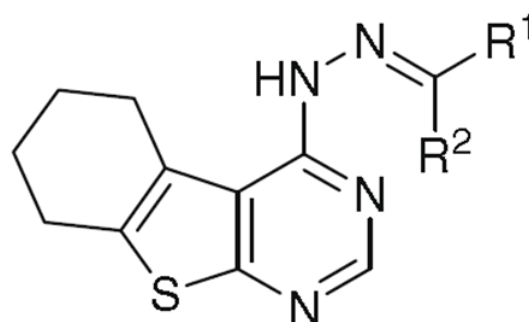
CI₅₀: Concentración inhibitoria media determinada sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*, SD: Desviación estándar. Los ensayos fueron realizados por triplicado en tres experimentos independientes.

Datos publicados en **Aponte *et al.* 2010c**

Anexo 4b. Estructura general del compuesto D y ubicación de los sustituyentes R1 y R2 de los compuestos sintéticos derivados de las BTPs



Compuesto D



**Compuestos
1-37**

ANEXO 5

Evaluación de la actividad leishmanicida de 13 compuestos de la familia de las quinoxalinas sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis* y ubicación de los sustituyentes en la estructura general.

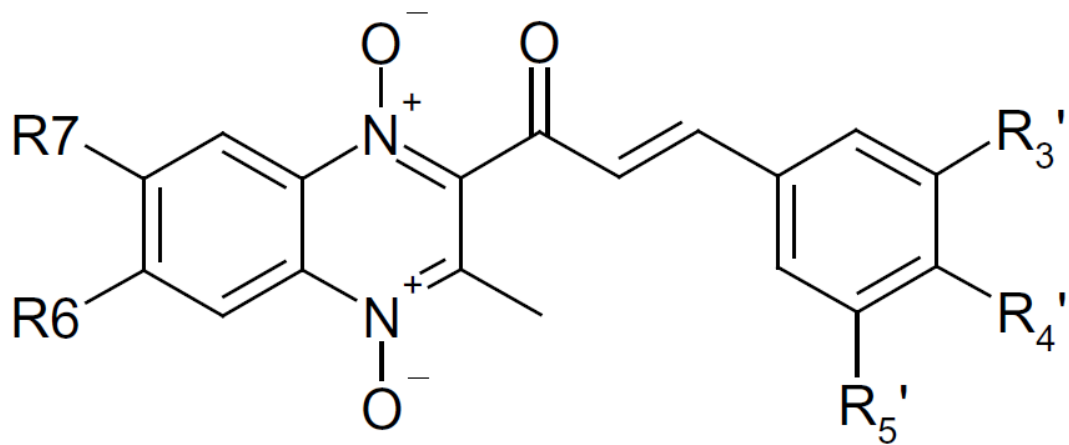
Anexo 5a. Actividad *in vitro* de 13 compuestos de la familia de las quinoxalinas sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*

Compuesto	Sustituyentes					CI ₅₀ (μ M)	SD
	R ₃ '	R ₄ '	R ₅ '	R ₆	R ₇		
2a	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	4.9	2.1
2b	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	65.6	22.9
2c	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	Cl	37.0	7.8
2d	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	F	2.7	0.6
2e	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	CH ₃	CH ₃	4.1	0.5
3a	O-CH ₂ -O	O-CH ₂ -O	H	H	H	>100	-
3b	O-CH ₂ -O	O-CH ₂ -O	H	H	OCH ₃	>100	-
3c	O-CH ₂ -O	O-CH ₂ -O	H	H	Cl	>100	-
3d	O-CH ₂ -O	O-CH ₂ -O	H	H	F	>100	-
3e	O-CH ₂ -O	O-CH ₂ -O	H	CH ₃	CH ₃	>100	-
3f	O-CH ₂ -O	O-CH ₂ -O	H	H	CH ₃	>100	-
4b	OCH ₃	OH	H	H	OCH ₃	5.3	2.3
4d	OCH ₃	OH	H	H	F	6.7	1.3
Anf. B	-	-	-	-	-	0.1	0.01

CI₅₀: Concentración inhibitoria media determinada sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*, SD: Desviación estándar. Los ensayos fueron realizados por triplicado en tres experimentos independientes.

Datos publicados en **Burguete et al. 2008**

Anexo 5b. Estructura general de la quinoxalina y ubicación de los sustituyentes R₃', R₄', R₅', R₆ y R₇ de los compuestos sintéticos derivados.



ANEXO 6

Evaluación de la actividad leishmanicida de 3 compuestos de la familia de las benzo[*c*]fenantridinas sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis* y ubicación de los sustituyentes en la estructura general.

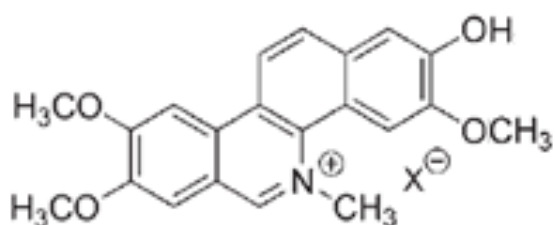
Anexo 6a. Actividad *in vitro* de 3 compuestos de la familia de las benzo[*c*]fenantridinas sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*

Compuestos	Sustituyentes				CI ₅₀ (μM)	SD
	R1	R2	R3	R4		
Fagaronine	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	0.4	0.2
Nornitidine	-	-	-CH ₂ -	-CH ₂ -	>150	-
Norfagaronine	-	-	H	CH ₃	>150	-
Anf. B	-	-	-	-	0.15	0.01

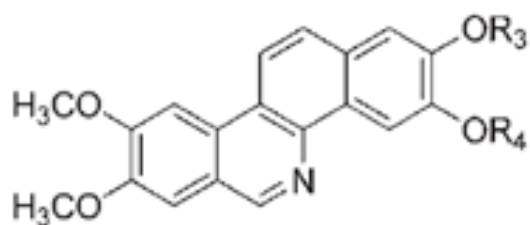
CI₅₀: Concentración inhibitoria media determinada sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*, SD: Desviación estándar. Los ensayos fueron realizados por triplicado en tres experimentos independientes.

Datos publicados en **Castillo *et al.* 2014**

Anexo 6b. Estructura general de las benzo[*c*]fenantridinas sintéticas y ubicación de los sustituyentes R1, R2, R3 y R4.



Fagaronine



Nornitidine
Norfagaronine

ANEXO 7

Evaluación *in vitro* de la concentración citotóxica media (CC₅₀) e índice de selectividad de 32 compuestos de la familia de las chalconas sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c

Compuesto	CC₅₀ (µM)	SD	IS
1	ND	-	-
3	14.8	2.5	2
5	18.7	0.7	1
6	13.1	1.1	2
9	ND	-	-
11	12	0.6	2
13	13	2.0	1
14	13.8	0.9	2
15	13.3	5.3	1
16	5.4	1.0	1
17	13.2	0.4	2
20	ND	-	-
21	12.5	0.8	11
24	27	2.0	2
25	16.5	4.8	2
26	166.2	4.7	17
27	17.6	2.9	2
28	21.7	0.7	1
29	ND	-	-
30	157.2	0.9	38
31	>300	-	>50
32	ND	-	-
33	17.1	1.8	2
34	19	4.2	2
35	28.8	2.6	2
36	16	1.1	1
37	14.6	5.5	1
38	11.5	2.0	11
40	384.3	13.2	84
41	>250	-	>200
42	142.9	11.0	12
43	132.5	31.3	21
Anf. B	5.3	0.2	53

CC₅₀: Concentración citotóxica media determinada sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c, SD: Desviación estándar. IS: Índice de selectividad (CC₅₀/IC₅₀). Los ensayos fueron realizados por triplicado en tres experimentos independientes.

ANEXO 8

Evaluación *in vitro* de la concentración citotóxica media (CC₅₀) e índice de selectividad de 38 compuestos de la familia de las BTPs sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c

Compuesto	CC₅₀ (μM)	SD	IS
D	32.6	3.8	1
1	26.2	2.7	1
2	16.5	4.5	1
3	15.6	2.1	0
4	1.7	0.4	0
5	21.3	3.8	1
6	150.7	17.0	10
7	8.3	2.9	2
8	6.5	0.6	4
9	178.9	10.6	4
10	61.8	2.1	1
11	18.1	1.3	1
12	17.6	0.9	1
13	142.8	2.3	4
14	8.6	6.2	1
15	23.8	4.9	3
16	122.4	5.9	3
17	3.7	4.3	1
18	2.5	0.2	1
19	10.1	1.4	1
20	162.8	10.3	1
21	6.5	0.6	13
22	200.2	2.1	5
23	ND	-	ND
24	8.2	0.8	4
25	3.1	0.3	3
26	9.7	0.5	1
27	10.2	1.3	3
28	144.8	29.5	85
29	11.0	0.9	5
30	7.9	0.1	9
31	7.5	1.0	6
32	161.5	9.3	5
33	180.2	10.9	2
34	239.5	28.5	6
35	159.6	13.2	6
36	161.5	5.9	9

Compuesto	CC₅₀ (μM)	SD	IS
37	164.1	27.1	1
Anf B	5.4	0.2	54

CC₅₀: Concentración citotóxica media determinada sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c, SD: Desviación estándar. IS: Índice de selectividad (CC₅₀/IC₅₀). Los ensayos fueron realizados por triplicado en tres experimentos independientes.

ANEXO 9

Evaluación *in vitro* de la concentración citotóxica media (CC₅₀) e índice de selectividad de 13 compuestos de la familia de las quinoxalinas sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c

Compuesto	CC₅₀ (µM)	SD	IS
2a	13.7	8.2	3
2b	78.7	19.8	1
2c	159.1	34.2	4
2d	13.8	2.1	5
2e	>23.4	-	>6
4b	133.6	22.7	25
4d	138.7	18.6	21
Anf. B	4.4	0.2	44

CC₅₀: Concentración citotóxica media determinada sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c, SD: Desviación estándar. IS: Índice de selectividad (CC₅₀/IC₅₀). Los ensayos fueron realizados por triplicado en tres experimentos independientes

ANEXO 10

Determinación de la concentración inhibitoria media (CI₅₀) de compuestos naturales y de síntesis sobre amastigotes intracelulares de 2 especies de *Leishmania*

Compuestos	<i>L. braziliensis</i> CI₅₀ (μM) ± SD	<i>L. peruviana</i> CI₅₀ (μM) ± SD
Damsina	18.6 ± 0.9	29.2 ± 1.9
Chacona 21	1.4 ± 0.1	4.0 ± 0.6
Chacona 26	7.6 ± 0.5	23.0 ± 6.8
Chacona 30	8.6 ± 1.6	19.7 ± 4.6
Chacona 31	237.0 ± 10.6	290.2 ± 20.8
Chacona 38	14.4 ± 0.9	ND
Chacona 40	30.4 ± 5.4	34.2 ± 3.1
Chacona 41	5.2 ± 0.3	110.8 ± 19.8
Chacona 42	17.2 ± 1.2	34.8 ± 3.5
Chacona 43	13.1 ± 2.1	19.3 ± 3.4
BTP 6	10.5 ± 1.1	9.5 ± 3.1
BTP 21	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.2
BTP 28	17.3 ± 2.2	>30.0
BTP 30	>2.0	>2.0
BTP 36	11.1 ± 0.8	7.0 ± 1.1
Anfotericina B	0.4 ± 0.05	0.3 ± 0.03

CI₅₀: Concentración inhibitoria media determinada sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*, SD: Desviación estándar. Los ensayos fueron realizados por triplicado en tres experimentos independientes.

ANEXO 11

Protocolos de evaluación aprobados por el comité de ética indicando el número de ratones a utilizar en cada protocolo.

Modelo de evaluación biológico	Protocolo de evaluación	N.º de ratones	Justificación
<i>In vitro</i>	Evaluación de citotoxicidad (descrito en punto 6.4.4.4)	5 ratones	Se evaluó la citotoxicidad sobre macrófagos de ratón BALB/c. se considera utilizar 5 ratones de los cuales se colectará alrededor de 1×10^7 macrófagos totales. Esta cantidad de células fue suficiente para evaluar la citotoxicidad de los compuestos candidatos.
	Evaluación de la actividad de compuestos sobre amastigotes intracelulares (descrito es punto 6.4.4.6)	10 ratones	Se evaluó la citotoxicidad sobre macrófagos de ratón BALB/c. se considera utilizar 10 ratones de los cuales se colectará alrededor de 2×10^7 macrófagos totales. Esta cantidad de células fue suficiente para evaluar la actividad de los compuestos candidatos sobre macrófagos infectados con amastigotes intracelulares.

Modelo de evaluación biológico	Protocolo de evaluación	N.º de ratones	Justificación
<i>In vivo</i>	Prueba de toxicidad aguda (descrito en el punto 6.4.5.3)	5 ratones	Se evaluó la citotoxicidad del vehículo Dimetil sulfóxido (DMSO) sobre 10 ratones sanos.
	Evaluación de la actividad anti- <i>Leishmania</i> de los compuestos candidatos (descrito en el punto 6.4.5.4)	130 ratones	Se evaluó la actividad de los compuestos candidatos sobre ratones infectados con <i>L. amazonensis</i> . Se utilizó 140 ratones separados en 12 grupos de 10 ratones cada uno.
	Mantenimiento del reservorio de parásitos de <i>L. amazonensis</i> en ratones BALB/c	20 ratones	Se destinó 20 ratones para mantener el parásito intracelular en su forma virulenta durante toda la ejecución de la tesis.

El tamaño muestral de ratones BALB/c fue de 170 ratones hembras de 6-8 semanas de edad.

Los ratones fueron mantenidos en jaulas ventiladas bajo condiciones libres de patógenos con comida y agua *Ad libitum*.

Para los ensayos *in vitro*, los ratones fueron eutanizados mediante la inoculación por vía intraperitoneal de una sobredosis del anestésico Ketamina a 300mg/kg de peso y luego se procedió a la extracción de macrófagos de la zona intraperitoneal colectados con medio M199 - 10% SFB. Los macrófagos fueron incubados por 24h a 37°C en presencia de 5% de CO₂, cuantificados y colocados en placas de 96 pozos hasta su utilización.

Para los ensayos *in vivo*, los ratones fueron infectados con el parásito intracelular *L. amazonensis* en la almohadilla plantar de las patas posteriores (modelo *in vivo* de leishmaniosis cutánea) con una aguja 30G que no genera lesión. Los tratamientos con los compuestos fueron administrados empleando el mismo tipo de aguja. El tratamiento anti-*Leishmania* consistió en administrar el compuesto por vía intralesional a la dosis de 5mg/kg de peso 3 veces por semana durante 3 semanas. Al término del tratamiento los ratones fueron eutanizados mediante sobredosis de anestesia y se procedió a la extracción de las lesiones de las almohadillas plantares de los miembros posteriores. Las muestras fueron destinadas para la evaluación de la carga parasitaria mediante las técnicas de Dilución Limitante (LDA) y microscopía de fluorescencia.