



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Compuestos tipo alcaloides quinolínicos y limonoides (triterpenos) sintéticos con potencial anti-leishmania: Una aproximación al mecanismo de acción**

**Francy Elaine Torres Suarez**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias  
Medellín, Colombia

2021

# **Compuestos tipo alcaloides quinolínicos y limonoides (triterpenos) sintéticos con potencial anti-leishmania: Una aproximación al mecanismo de acción**

**Francy Elaine Torres Suarez**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Doctora en Biotecnología**

Director (a):

Ph.D. Lucy Gabriela Delgado Murcia

Línea de Investigación:

Desarrollo de alternativas terapéuticas frente a enfermedades tropicales

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Inmunotoxicología

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Escuela de Biociencias  
Medellín, Colombia

2021

# **Synthetic quinoline alkaloid and limonoid (triterpene) -type compounds with anti-leishmania potential: An approach to the mechanism of action**

**A Thesis Submitted in partial Requirements for  
PhD Degree in Biotechnology**

By

**FRANCY ELIANE TORRES SUAREZ**

**Advisor**

**Ph.D. Lucy Gabriela Delgado Murcia**

A Professor of Pharmacy Department

Faculty of Sciences

Research Topic:

Development of therapeutic alternatives against tropical diseases

Universidad Nacional de Colombia  
Faculty of Sciences, School of Biosciences  
Medellín, Colombia

2021

*Un Hombre del pueblo de Neguá, en la costa de Colombia,  
Pudo subir al alto cielo.  
A la vuelta, contó. Dijo que había contemplado, la vida humana.  
Y dijo que somos un mar de fueguitos.  
Cada persona brilla con luz propia entre todas las demás.  
No hay dos fuegos iguales. Hay fuegos grandes y fuegos chicos y fuegos  
de todos los colores.  
Hay gente de fuego sereno, que ni se entera del viento y gente de  
fuego loco, que llena el aire de chispas.  
Algunos fuegos, fuegos bobos no alumbran ni quemar; pero otros arden  
la vida con tantas ganas que no se puede mirarlos  
sin parpadear, y quien se acerca, se enciende.  
Eduardo Galeano – El mundo*

## Agradecimientos

Le agradezco a mis papás Maria Isabel y Rafael, por darme todo su apoyo, su amor y fuerza para seguir adelante, a pesar de los momentos difíciles, sin ustedes no hubiera sido posible llegar hasta este momento. A mi hermano Nicolas y mis primos Rafa, Cami, Andrew y Alex, los cuales fueron buenos consejeros. A mis abuelitos Rafael, Elvira y Lucila y mis tías Sandy, Mago y Patty, su respaldo fue esencial para la culminación de este proceso. A mis amigas Meli, la persona que me acompañó y me dio su apoyo incondicional durante todo este camino y mis secuases en esta arriesgada aventura Yulita, Les, Adri, Caro, Vivi, Dianita, Liss, las cuales me acompañaron con su amistad, soporte y sus sabios consejos y me hicieron la vida un poco mas divertida.

Al grupo de Investigación en inmunotoxicología de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá y a mi directora Gabriela Delgado, por el respaldo dado durante el desarrollo de mi tesis doctoral, así como por las oportunidades para crecer personal y profesionalmente. A la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, por su acompañamiento y apoyo en todas las actividades académicas y administrativas.

A PECET, en cabeza de la Doctora Sara Robledo y a su equipo de trabajo, por su apoyo en todas las actividades académicas y experimentales que se llevaron a cabo en en su laboratorio. Siempre agradeceré su dedicación, jalones de oreja y trasnochadas en en el laboratorio, los cuales contribuyeron al avance de trabajo de investigación.

Al Ministerio de Ciencia y tecnología, por el crédito-beca de la convocatoria 727 de doctorados nacional, por el cual pude realizar las actividades planteadas en la tesis doctoral y continuar parte de mis estudios doctorales.

## Resumen

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria antropozoonótica, causada por el protozoo del género *Leishmania* spp. y transmitida por el mosquito del género *Lutzomya*. Dentro de las formas clínicas de la enfermedad, la cutánea, constituye la manifestación más frecuente en el mundo, y corresponde a más del 90% de los casos reportados en Colombia y en el mundo. Una de las dificultades más evidentes en el control de esta enfermedad, ha sido el tratamiento, el cual además de haber reportado pérdida de eficacia, presenta efectos adversos, largos esquemas de tratamiento y formas de administración de baja adherencia por parte del paciente, que generan el abandono del mismo y la generación de cepas resistentes. Por esta razón, la búsqueda de alternativas terapéuticas de aplicación tópica constituye una necesidad de alta prioridad, para disminuir el problema de salud pública que conlleva esta enfermedad.

De este modo, en estudios previos realizados en el Grupo de Investigación en Inmunotoxicología se identificaron dos moléculas de origen vegetal con propiedades antileishmaniales, correspondientes a alcaloides quinolínicos (N-metil-8-metoxiflindersina) y triterpenoides de tipo limonoide (11 $\alpha$ ,19 $\beta$ -dihidroxi-7-acetoxi-7-deoxoichangina), con efecto directo frente al parásito y propiedades inmunomoduladoras en células humanas infectadas por el parásito; sin embargo, el origen (a partir de material vegetal de *Raputia heptaphylla*) y las dificultades que conllevan la extracción y la purificación, conllevó al diseño de estrategias para encontrar moléculas con características estructurales afines, bajo el principio de propiedades similares (PPS).

Entre los hallazgos más relevantes obtenidos en este trabajo, se encuentran los resultados obtenidos con compuestos de origen sintético y análogos a las moléculas naturales, los cuales fueron seleccionados por medio de estrategias *In silico*: triterpenoides [ácido oleanólico (**5**), glicirizato de amonio (**7**) y ácido 18B-glicirretínico (**8**)] y alcaloides quinolínicos [1,2,3,4-tetrahidro-(benzo)-3-quinolin-ol (**13**) y 2-amino-8-hidroxi-quinolina (**19**)] los cuales presentaron actividad anti-leishmanial *In vitro* [sobre promastigotes (**13** y **19**) y amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* (**5**, **7**, **8**, **13** y **19**)] e *In vivo* [promoviendo la cura clínica (entre un 20% (**8**), 33,3% (**13**) y 50% (**19**) los animales cicatrizan completamente la lesión) y mejoría clínica (100% (**5**), 80% (**7**), 60% (**8**), 66,6% (**13**) y 33,3% (**19**), reducción en al menos un 20% el tamaño de la lesión), de los animales tratados con los compuestos, administrados de forma tópica].

De acuerdo con los efectos de cada compuesto, se propusieron modelos de aproximación al modo de acción de cada molécula. Los triterpenoides **5** y **7** mostraron característica de pro-fármacos (actividad evidente sobre la forma amastigote en MdMhu infectados), pero con afectaciones diferenciales en el amastigote intracelular para el triterpenoide 5 [causa muerte de tipo necrosis (presencia de membranas hinchadas o alteradas, acidocalcisomas y daño nuclear)] y saponina 7 [(afinidad por la mitocondria de MdMhu y parásitos (causando en *Leishmania* spp. estrés celular, la aparición de acidocalcisomas e hinchamiento de membranas celulares)]. El triterpenoide **8** indujo el incremento diferencial de NO, a través

de la modulación de iNOS vía NF-κB en macrófagos infectados y modificaciones en los amastigotes (citoquinesis alterada y señales de apoptosis).

Se resaltan los hallazgos de los compuestos alcaloides (**13** y **19**), los cuales fueron activos frente a los dos estadios del parásito (promastigotes y amastigotes). El alcaloide **13**, actúa sobre reservas de lípidos y componentes de membrana [(reflejado en el aumento de cuerpos lipídicos y vacuolas parasitóforas comunales en MdMhu)], causando el estrés celular de los parásitos (presencia de acidocalcisomas y citoquinesis alterada) y la disminución de la carga parasitaria en estas células, induciendo el aumento temprano de ROS en MI, contribuyendo así con el control temprano del parásito. Mientras que el efecto del compuesto **19** está dirigido hacia la modulación de procesos de generación de energía y respiración oxidativa (producción de especies reactivas en promastigotes y despolarización de la mitocondria), los cuales conducen a los parásitos a la muerte de tipo apoptosis (hinchamiento de membranas celulares, presencia de acidocalcisomas y distribución anormal de cromatina) y que se asocian con la expresión diferencial de proteínas (spots) en amastigotes expuestos al alcaloide; mientras que en las células hospederas infectadas, se induce apoptosis, mostrando la selectividad del compuesto.

Estos resultados permiten soportar nuestro modelo de búsqueda de compuestos, en donde a partir de moléculas de difícil obtención (origen vegetal), se pueden encontrar antileishmaniales promisorios. Se destaca, que para cada molécula antiparasitaria encontrada en este proyecto, se identificó un posible modo de acción en el modelo de células primarias, así como su efectividad terapéutica en un modelo *In vivo*; estos hallazgos contribuyen al entendimiento de la forma de actuación de este tipo de compuestos y abre el camino para la optimización y tratamiento de la leishmaniasis cutánea en el país.

**Palabras clave:** Triterpenoides, alcaloides quinolínicos, antileishmaniales, modo de acción, efecto terapéutico, *L. (V.) panamensis*.

## Abstract

Leishmaniasis is an anthroponotic parasitic disease, caused by the protozoan of the genus *Leishmania* spp. and transmitted by the mosquito of the genus *Lutzomyia*. This disease has been classified as a neglected pathology by the WHO because its presence is established in tropical and sub-tropical areas and mainly in developing countries. Within the clinical forms of the disease, the cutaneous form constitutes the most frequent manifestation in the world, which corresponds to more than 90% of the cases reported in Colombia and the world. One of the most obvious difficulties in the control of this disease has been treated, which is accompanied by adverse effects, long treatment schedules, and forms of administration that are not very friendly to the patient, which generate the abandonment of treatment and the generation of resistant strains. For this reason, the search for therapeutic alternatives for topical application constitutes an imperative need to mitigate the public health problem that this disease entails.

Thus, in previous studies carried out by the Immunotoxicology research group, two molecules with antileishmanial properties were identified, corresponding to quinolinic alkaloids (N-methyl-8-methoxyflindersine) and limonoid-type triterpenoids (11 $\alpha$ , 19 $\beta$ -dihydroxy-7-acetoxy-7-deoxoichangin), with direct effect against the parasite and immunomodulatory properties in human cells infected by the parasite; however, the origin (from *Raputia heptaphylla* plant material) and the difficulties involved in extraction and purification, led to the design of strategies to find molecules with similar structural characteristics, under the principle of similar properties (PPS).

Among the most relevant findings obtained in this work, are the results obtained with the five compounds of synthetic origin and analogous to natural molecules (previously evaluated by the research group), which were selected through the *In silico* strategies: Triterpenoid compounds [oleanolic acid (5), ammonium glycyrrhizate (7) and 18B-glycyrrhetic acid (8)] and quinolinic alkaloids [1,2,3,4-tetrahydro- (benzo) -3-quinolin-ol (13) and 2-amino-8-hydroxyquinoline (19); which presented anti-leishmanial activity *In vitro* [on promastigotes (13 and 19) and intracellular amastigotes of *L. (V.) panamensis* (5, 7, 8, 13 and 19)] and *In vivo* [promoting clinical cure (between 20% (8), 33.3% (13) and 50% (19) the animals completely heal the lesion) and clinical improvement (100% (5), 80% (7), 60% (8), 66,6% (13) and 33.3% (19), reduction of lesion size by at least 20%), of the animals treated with the compounds, administered topically].

Each synthetic antileishmanial compound showed evident effects in the model used, giving rise to models of approximation to its mode of action. Triterpenoids 5 and 7 showed pro-drug activity [(Activity in the amastigote form), in addition to causing necrosis-type death in the intracellular parasite (presence of swollen or altered membranes, acidocalcisomes, and nuclear damage) by the compound 5, while saponin 7 had an evident affinity for the mitochondria of *MdMhu* and parasites (causing cellular stress, the calving of acidocalcisomes and swelling of cell membranes in *Leishmania* spp.)]. Triterpenoid 8 (synthetic pentacyclic) revealed immunomodulatory properties by inducing the differential increase in NO, through modulation of iNOS via NF- $\kappa$ B in infected macrophages and evident alterations in amastigotes (altered cytokinesis and apoptosis signals), possibly as an effect of NO.

The findings of the alkaloid compounds (13 and 19) are highlighted, which had evident activity against the two stages of the parasite (promastigotes and amastigotes). The alkaloid



13 acts on lipid reserves and membrane components [(reflected in the increase of lipid bodies and communal parasitophorous vacuoles in MdMhu)], causing cellular stress of the parasites (presence of acidocalcisomes and altered cytokinesis) and the decrease of the parasite load in these cells inducing the early increase of ROS in MI, contributing to the early control of the parasite. The effect of compound 19 evidenced in intracellular promastigotes and amastigotes is directed towards the modulation of processes of energy generation and oxidative respiration (production of reactive species in promastigotes and depolarization of the mitochondria), which lead parasites to death of the type apoptosis (swelling of cell membranes, presence of acidocalcisomes and abnormal chromatin distribution) and that are associated with the differential expression of proteins (spots) in amastigotes exposed to the alkaloid; while in host cells, the induction of early apoptosis was differentially evidenced in infected cells, showing the selectivity of the compound.

These results allow us to support our compound search model, where promising antileishmanial can be found from difficult-to-obtain molecules (plant origin). It should be noted that for each antiparasitic molecule found in this project, a possible mode of action was identified in the primary cell model, as well as its therapeutic effectiveness in an In vivo model; These findings contribute to the understanding of how this type of compound works and opens the way for the optimization and treatment of cutaneous leishmaniasis in the country.

**Keywords:** Triterpenoids, Quinoline alkaloids, antileishmanials, mode of action, thepareutic effect, *L. (V.) panamensis*

# Contenido

	Pág.
	<b>Introducción</b> 1
	<b>Marco teórico</b> 4
1.1. Leishmaniasis .....	4
1.2. Epidemiología leishmaniasis.....	5
1.3 Biología de <i>Leishmania</i> spp.....	6
1.4 Ciclo de vida <i>Leishmania</i> spp. ....	8
1.5 Inmunobiología de la infección por <i>Leishmania</i> spp.....	8
1.6 Inmunopatología de leishmaniasis cutánea.....	10
1.7 Tratamiento antileishmanial .....	12
1.7.1 Administración tópica de tratamiento frente a la leishmaniasis cutánea ....	14
1.8 Búsqueda de compuestos con actividad antiparasitaria .....	15
1.8.1 Triterpenoides.....	16
1.8.2 Alcaloides quinolínicos.....	19
1.9 Aproximación a modos de acción de los compuestos leishmanicidas .....	21
	<b>2 Objetivos</b> 25
2.1 Objetivo general .....	25
2.2 Objetivos específicos .....	25
<b>3 Evaluación <i>In silico</i> .....</b>	<b>26</b>
3.1 Diseño experimental .....	27
3.2 Metodología .....	27
3.2.1 Selección de compuestos análogos sintéticos tipo triterpenoides y alcaloides quinolínicos .....	27
3.2.2 Medida de comparación entre estructuras .....	28
3.2.3 Clasificación y análisis estructural de los compuestos análogos.....	29
3.2.4 Determinación de propiedades Físico-químicas de los compuestos .....	29

<b>3.3</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>29</b>
	Búsqueda de compuestos sintéticos análogos de las moléculas naturales de tipo triterpenoides y alcaloides quinolínicos .....	29
3.3.1	Selección de compuestos análogos de tipo triterpenoide.....	30
3.3.2	Propiedades físico-químicas de compuestos sintéticos y naturales .....	33
<b>3.4</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>Evaluación de la efectividad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de compuestos sintéticos</b> .....	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Diseño experimental Actividad <i>In vitro</i></b> .....	<b>42</b>
<b>4.2</b>	<b>Metodología</b> .....	<b>43</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Efectividad <i>in vitro</i></b> .....	<b>43</b>
4.2.1.1	Parásitos .....	43
4.2.1.2	Obtención de macrófagos derivados de monocitos humanos (MdMhu) a partir de la porción leucoplaquetaria (Buffy-coat) .....	43
4.2.1.3	Evaluación de la actividad citotóxica en MdMhu (Macrófagos derivados de monocitos humanos).....	44
4.2.1.4	Evaluación de la actividad antileishmanial <i>in vitro</i> en promastigotes de <i>L. (V.) panamensis</i> .....	45
4.2.1.5	Actividad antileishmanial <i>in vitro</i> en amastigotes intracelulares de <i>L. (V.) panamensis</i> .....	46
4.2.1.6	Evaluación de la actividad antileishmanial <i>in vitro</i> en amastigotes intracelulares de <i>L. (V.) panamensis</i> por microscopía de fluorescencia.....	46
4.2.1.7	Evaluación de la actividad antileishmanial <i>in vitro</i> en amastigotes intracelulares de <i>L. (V.) panamensis</i> por citometría de flujo .....	47
<b>4.2.2</b>	<b>Efectividad <i>in vivo</i></b> .....	<b>48</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Diseño experimental Actividad <i>In vivo</i></b> .....	<b>49</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Evaluación de la respuesta terapéutica <i>in vivo</i> en Hámsteres (<i>Mesocricetus aureatus</i>)</b> .....	<b>49</b>
<b>4.2.4.3</b>	<b>Análisis estadístico</b> .....	<b>51</b>
<b>4.3</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>52</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Efectividad <i>in vitro</i></b> .....	<b>52</b>
4.3.1.1	Actividad citotóxica sobre macrófagos derivados de monocitos humanos y células J774 de compuestos análogos.....	52

4.3.1.2	Actividad antileishmanial de compuestos sintéticos y naturales frente a promastigotes de <i>L. (V.) panamensis</i> .....	53
4.3.1.3	Evaluación de la actividad antileishmanial de compuestos sintéticos y naturales frente a amastigotes intracelulares de <i>L. (V.) panamensis</i> por medio de microscopía de fluorescencia .....	54
4.3.1.4	Confirmación de la actividad antileishmanial de compuestos sintéticos y naturales frente a amastigotes intracelulares de <i>L. (V.) panamensis</i> por medio de citometría de flujo .....	59
4.3.1.5	Comparación de actividad antileishmanial entre grupos de compuestos sintéticos	61
<b>4.3.2</b>	<b>Efectividad <i>in vivo</i></b> .....	<b>62</b>
<b>4.4</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>69</b>
<b>5</b>	<b>Evaluación del efecto de los análogos estructurales que tienen actividad antileishmania en la respuesta microbicida de los macrófagos infectados con <i>Leishmania (V.) panamensis</i></b> .....	<b>75</b>
<b>5.1</b>	<b>Diseño experimental</b> .....	<b>76</b>
<b>5.2</b>	<b>Metodología</b> .....	<b>77</b>
5.2.1	Evaluación de la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en macrófagos infectados y no infectados con <i>L. (V.) panamensis</i> y expuestos a los compuestos antileishmaniales.....	77
5.2.2	Determinación de modulación de la producción de óxido nítrico en macrófagos infectados y no infectados con <i>L. (V.) panamensis</i> y expuestos a los compuestos antileishmaniales.....	78
5.2.3	Expresión de moléculas co-estimuladoras en macrófagos infectados con <i>L. (V.) panamensis</i> y expuestos a los compuestos activos.....	79
5.2.4	Presencia de citoquinas pro y anti- inflamatorias en sobrenadante de cultivo de macrófagos infectados con <i>L. (V.) panamensis</i> y expuestos a los compuestos antileishmaniales.....	80
<b>5.2.4.1</b>	<b>Análisis estadístico</b> .....	<b>80</b>
<b>5.3</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>81</b>
5.3.1	Producción de ROS (Especies reactivas de oxígeno).....	81
5.3.2	Inducción de la producción de óxido nítrico en macrófagos infectados por <i>L. (V.) panamensis</i> .....	83

5.3.3 Evaluación de la expresión de HLA-DR, CD80 y CD83 en macrófagos infectados.....	87
5.3.4 Producción de citoquinas pro y anti-inflamatorias en macrófagos infectados y expuestos a compuestos naturales sus sintéticos análogos.....	91
<b>5.4 Discusión.....</b>	<b>94</b>
<b>6 Explorar el efecto de los análogos estructurales que tienen actividad antileishmanial en estructuras parasitarias esenciales para su sobrevivencia (Membrana celular, núcleo, mitocondrion y kinetoplasto). .....</b>	<b>98</b>
<b>6.1 Diseño experimental .....</b>	<b>99</b>
<b>6.2 Metodología.....</b>	<b>99</b>
6.2.1 Alteración ultraestructural de MdMhu infectados por <i>L. (V.) panamensis</i> y expuestos a moléculas antileishmaniales por medio de microscopía de transmisión electrónica.....	99
6.2.2 Evaluación de la inducción de muerte celular de MdMhu infectados y no infectados y expuestos a compuestos análogos antileishmaniales.....	100
6.2.3 Evaluación de la integridad de membrana e integridad de membrana mitocondrial de MdMhu infectados y no infectados y expuestos a los compuestos naturales y sintéticos antileishmaniales.....	101
6.2.4 Efecto de los compuestos análogos antileishmaniales en la presencia de Cuerpos Lipídicos de MdMhu infectados y no infectados .....	102
<b>6.2.5 Alteración ultraestructural en promastigotes y amastigotes intracelulares expuestos a los compuestos sintéticos antileishmaniales .....</b>	<b>103</b>
6.2.5.1 Determinación el efecto de compuestos sintéticos y naturales activos, en la membrana celular de promastigotes de <i>L. (V.) panamensis</i> .....	103
6.2.5.2 Evaluación del efecto antiparasitario de los compuestos sintéticos y naturales activos, en la inducción de especies reactivas de oxígeno en promastigotes de <i>L. (V.) panamensis</i> .....	103
6.2.5.3 Alteración ultraestructural de amastigotes intracelulares de <i>L. (V.) panamensis</i> por medio de microscopía de transmisión electrónica .....	104
6.2.5.4 Evaluación de la integridad de Mitocondria en amastigotes intracelulares aislados de MdMhu y expuestos a los compuestos naturales y sintéticos antileishmaniales.....	104
<b>6.2.5.5 Análisis estadístico.....</b>	<b>106</b>
6.3 Resultados.....	106

6.3.1	Evaluación en MdMhu infectados y sin infectar por <i>L. (V.) panamensis</i> .....	106
6.3.1.1	Alteraciones Ultraestructurales de MdMhu infectados por <i>L. (V.) panamensis</i> y expuestos a compuestos naturales y sintéticos antileishmaniales ...	106
6.3.1.2	MdMhu Infectados vs. MdMhu infectados y expuestos a compuestos antileishmaniales.....	108
6.3.1.3	Evaluación del tipo de muerte celular en MdMhu y MdMhu infectados y expuestos a compuestos naturales y sintéticos.....	112
6.3.2	Efecto de compuestos en la integridad de membrana celular y mitocondrial de MdMhu expuestos a compuestos antileishmaniales.....	115
6.3.2.1	Efecto de los compuestos en la Integridad de Membrana celular de MdMhu	115
6.3.2.2	Alteración del potencial de mitocondria $\Delta\psi$ M en MdMhu.....	115
6.3.2.3	Inducción de Cuerpos lipídicos en MdMhu infectados y no infectados y expuestos a compuestos naturales y sintéticos.....	116
6.3.2.4	Alteración estructural de promastigotes de <i>L. (V.) panamensis</i> expuestos a compuestos antileishmaniales.....	119
6.3.2.4.1	Efecto en la Integridad de Membrana celular y en el potencial $\Delta\psi$ mitocondrial de promastigotes de <i>L. (V.) panamensis</i> .....	119
6.3.2.4.2	Inducción de especies reactivas de oxígeno en promastigotes de <i>L. (V.) panamensis</i> expuestos a compuestos naturales y sintéticos antileishmaniales.....	120
<b>6.3.3</b>	<b>Alteración estructuras y Ultra-estructural de amastigotes intracelulares expuestos a compuestos naturales y sintéticos.....</b>	<b>121</b>
6.3.3.1	Despolarización de la mitocondria de amastigotes intracelulares.....	126
<b>6.4</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>127</b>
<b>7</b>	<b>Determinación del perfil protéico de amastigotes intracelular.....</b>	<b>131</b>
7.1	Diseño experimental.....	132
7.2	Metodología.....	133
7.2.1	Obtención de amastigotes intracelulares de <i>L. (V.) panamensis</i> .....	133
7.2.2	Cuantificación y evaluación de la integridad de las proteínas totales de amastigotes intracelulares de <i>L. (V.) panamensis</i> .....	134
7.2.3	Condiciones experimentales de la electroforesis bi-dimensional con tirillas de 18 cm	134
7.2.3.1	Primera dimensión.....	134

7.2.3.2	Segunda dimensión .....	135
7.2.4	Análisis de imágenes (Geles 2D).....	135
<b>7.2.4.1</b>	<b>Análisis estadístico.....</b>	<b>137</b>
<b>7.3</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>137</b>
	Estandarización de cultivo de células J774 y de los parásitos <i>L. (V.) panamensis</i> .	137
7.3.1	Extracción y cuantificación de proteínas totales de amastigotes de <i>L. (V.) panamensis</i> .....	138
7.3.2	Determinación de la integridad de las proteínas extraídas por medio de SDS-PAGE	138
7.3.3	Comparación proteómica de amastigotes tratados con alcaloides sintéticos vs. Sin tratar Análisis de los geles obtenidos por 2D-PAGE.....	139
7.3.4	Selección de spots y análisis del %volumen normalizado en amastigotes intracelulares expuestos al alcaloide 19 .....	142
<b>7.4</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>146</b>
<b>8</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>149</b>
<b>9</b>	<b>. Recomendaciones y perspectivas .....</b>	<b>157</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Distribución geográfica de <i>Leishmania</i> spp. en 327 aislados de pacientes con LC en Colombia. Referencia tomada de Ramirez, J et al., 2016 (31). .....	6
<b>Figura 2.</b> Poblaciones celulares involucradas en las diferentes manifestaciones clínicas de leishmaniasis cutánea y mucocutánea. Ilustración tomada de Oliveira et al., 2014 (54). .....	11
<b>Figura 3.</b> Compuesto seco-limonoide 11,19-dihydroxy-7-acetoxy-7-deoxoichangin(14)...	17
<b>Figura 4.</b> Alcaloide quinolínico N-metil-8-metoxiflindersina(91).....	19
<b>Figura 5.</b> Diagrama de flujo del diseño experimental para búsqueda de moléculas análogas a los compuestos naturales de tipo triterpenoides y alcaloides quinolínicos.....	27
<b>Figura 6.</b> Diagrama de Flujo de la búsqueda de compuestos triterpenoides y alcaloides quinolínicos sintéticos.....	28
<b>Figura 7.</b> Matriz de agrupamiento y clasificación por jerarquía de compuestos triterpenoides. ....	31
<b>Figura 8.</b> Matriz de agrupamiento por jerarquía de compuestos alcaloides quinolínicos. ....	32
<b>Figura 9.</b> Diseño experimental de la evaluación In vitro de compuestos análogos sintéticos a compuestos a triterpenoides y alcaloides quinolínicos.....	42
<b>Figura 10.</b> Diseño experimental de la evaluación In vivo de compuestos sintéticos antileishmaniales frente a Hamster dorado.....	49
<b>Figura 11.</b> Evaluación de la infección de MdMhu con <i>L. (V.) panamensis</i> (MHOM/88/CO/UA140) en el tiempo. a. Carga parasitaria (Número de parásitos/MdMhu). b. Porcentaje de macrófagos infectados.....	55
<b>Figura 12.</b> Citometría de flujo de la evaluación de la infección de <i>L. (V.) panamensis</i> UA140 transfectados con EGFP. <i>Histograma del porcentaje de células infectadas con L.(V.) panamensis UA140-EGFP (azul) vs. Células sin infectar (gris), por medio de citometría de flujo. (FL1: FITC)</i> .....	60
<b>Figura 13.</b> Efectividad en amastigotes intracelulares de compuestos naturales y sintéticos antileishmaniales.....	62
<b>Figura 14.</b> Comportamiento terapéutico del tratamiento de hámsteres ( <i>Mesocricetus aureatus</i> ) con compuestos triterpenoides sintéticos antileishmaniales. ....	64
<b>Figura 15.</b> Efecto del tratamiento con los compuestos <b>5</b> , <b>7</b> y <b>8</b> en hámsteres con LC ....	65
<b>Figura 16.</b> Comportamiento terapéutico del tratamiento de hámsteres ( <i>Mesocricetus aureatus</i> ) tratados con alcaloide <b>13</b> . ....	66



<b>Figura 17.</b> Efecto del tratamiento con los compuestos <b>13</b> y <b>19</b> en hámsteres con LC.....	67
<b>Figura 18.</b> Peso (g), niveles de ALT, creatinina y BUN en suero de animales tratados con los compuestos <b>13</b> y <b>19</b> antes y después de tratamiento. ....	69
<b>Figura 19.</b> Diseño experimental de la identificación de efecto de los compuestos sintéticos sobre funciones microbicidas de MdMhu infectados y no infectados.....	76
<b>Figura 20.</b> Producción de especies reactivas de oxígeno en MdMhu infectados y no infectados por <i>L. (V.) panamensis</i> y expuestos a triterpenoides antileishmaniales.....	82
<b>Figura 21.</b> Producción de especies reactivas de oxígeno en MdMhu infectados y no infectados por <i>L. (V.) panamensis</i> y expuestos a Alcaloides quinolínicos antileishmaniales.....	83
<b>Figura 22.</b> Producción de óxido nítrico en MdMhu infectados y no infectados por <i>L. (V.) panamensis</i> y expuestos a triterpenoides antileishmaniales.....	85
<b>Figura 23.</b> Producción de óxido nítrico en MdMhu infectados y no infectados por <i>L. (V.) panamensis</i> y expuestos a triterpenoides antileishmaniales.....	86
<b>Figura 24.</b> Expresión de moléculas co-estimuladoras en MdMhu infectados por <i>L. (V.) panamensis</i> y expuestos a triterpenoides.....	89
<b>Figura 25.</b> Expresión de moléculas co-estimuladoras en MdMhu infectados por <i>L. (V.) panamensis</i> y expuestos a Alcaloides quinolínicos.....	90
<b>Figura 26.</b> Citoquinas pro y anti-inflamatorias en MdMhu infectados por <i>L. (V.) panamensis</i> y expuestos a compuestos triterpenoides.....	92
<b>Figura 27.</b> Citoquinas pro y anti-inflamatorias en MdMhu infectados por <i>L. (V.) panamensis</i> y expuestos a compuestos alcaloides quinolínicos.....	93
<b>Figura 28.</b> Diagrama de flujo de diseño experimental de la identificación del efecto de los compuestos sobre organelos y procesos del parásito y MdMhu.....	99
<b>Figura 29.</b> Comparación de la ultraestructura de MdMhu sin infectar e infectados por <i>L. (V.) panamensis</i> .....	107
<b>Figura 30.</b> Comparación de la ultraestructura de MdMhu infectados por <i>L. (V.) panamensis</i> y expuestos a compuestos triterpenoides.....	110
<b>Figura 31.</b> Comparación de la ultraestructura de MdMhu infectados por <i>L. (V.) panamensis</i> y expuestos a compuestos alcaloides quinolínicos.....	112
<b>Figura 32.</b> Inducción de muerte celular en MdMhu no infectados e infectados y expuestos a compuestos triterpenoides antileishmaniales.....	113
<b>Figura 33.</b> Inducción de muerte celular en MdMhu no infectados e infectados y expuestos a compuestos alcaloides quinolínicos antileishmaniales.....	114
<b>Figura 34.</b> Integridad de membrana celular de MdMhu infectados y expuestos a compuestos antileishmaniales.....	115
<b>Figura 35.</b> Despolarización de membrana mitocondrial de MdMhu infectados por <i>L. (V.) panamensis</i> y expuestos a compuestos antileishmaniales.....	116
<b>Figura 36.</b> Vacuolas lipídicas en MdMhu infectados y no infectados por <i>L. (V.) panamensis</i> y expuestos a compuestos antileishmaniales.....	117
<b>Figura 37.</b> Alteración de la membrana celular y en el potencial de membrana mitocondrial de promastigotes de <i>L. (V.) panamensis</i> expuestos a alcaloides quinolínicos.....	120
<b>Figura 38.</b> Inducción de estrés oxidativo en promastigotes de <i>L. (V.) panamensis</i> expuestos a alcaloides quinolínicos.....	121

<b>Figura 39.</b> Alteraciones ultraestructurales en amastigotes intracelulares expuestos a compuestos triterpenoides. <i>Microscopia de transmisión electrónica (TEM)</i> . A. Amastigotes intracelulares. B. compuesto 1. C. 5. D.7. E.8. Magnificación 10.000X.....	123
<b>Figura 40.</b> Alteraciones ultraestructurales en amastigotes intracelulares expuestos a compuestos Alcaloides quinolínicos. ....	125
<b>Figura 41.</b> Alteración de potencial de membrana mitocondrial $\Delta\psi_M$ de amastigotes intracelulares aislados y tratados con compuestos antileishmaniales.....	127
<b>Figura 42.</b> Diseño experimental de la búsqueda de proteínas expresadas diferencialmente entre amastigotes tratados con el compuesto vs. No tratados.....	132
<b>Figura 43.</b> Integridad de proteínas de amastigotes aislados y expuestos a los alcaloides quinolínicos sintéticos.....	139
<b>Figura 44.</b> Alineamiento de geles 2D para cada uno de los tratamientos.....	140
<b>Figura 45.</b> Geles 2D con strips pH 3-10.....	141
<b>Figura 46.</b> Anotación automática y manual de spots presentes en los geles 2D.....	142
<b>Figura 47.</b> Alineamiento y normalización de spots detectados en geles comparados. ....	143
<b>Figura 48.</b> Detección de spots, validación y comparación entre spots expresados diferencialmente entre tratamientos.....	144
<b>Figura 49.</b> Análisis comparativo de spots expresados diferencialmente entre los tratamientos ST vs. <b>19</b> .....	145
<b>Figura 50.</b> Visualización spots 3D expresados diferencialmente entre ST vs. <b>19</b> .....	146
<b>Figura 51.</b> Infección de MdMhu por <i>L. (V.) panamensis</i> después de establecida la infección (72 horas).....	151
<b>Figura 52.</b> Células (MdMhu) infectadas por <i>L. (V.) panamensis</i> y expuestas al triterpenoide pentacíclico 5 (Ácido oleanólico). ....	152
<b>Figura 53.</b> Modo de acción del compuesto saponina 7 (glicirrizato de amonio), en MdMhu infectados por <i>L. (V.) panamensis</i> . ....	153
<b>Figura 54.</b> Células (MdMhu) infectadas por <i>L. (V.) panamensis</i> y expuestas al triterpenoide pentacíclico 8 (Ácido 18 $\beta$ -glicirretínico). ....	154
<b>Figura 55.</b> Células (MdMhu) infectadas por <i>L. (V.) panamensis</i> y expuestas al alcaloide quinolínico 13 (1,2,3,4-tetrahidro-(benzo)-3-quinolin-ol).....	155
<b>Figura 56.</b> Células (MdMhu) infectadas por <i>L. (V.) panamensis</i> y expuestas al alcaloide quinolínico 19 (2-amino-8-hidroxiquinolina) .....	156

## Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Compuestos triterpenoides con actividad antileishmanial .....	17
Tabla 2. Actividad antileishmanial de compuestos alcaloides quinolínicos .....	20
<b>Tabla 3.</b> Descripción estructural, de clasificación y físico-química de compuestos naturales y sintéticos triterpenoides.....	35
<b>Tabla 4.</b> Descripción estructural, de clasificación y físico-química de compuestos naturales y sintéticos alcaloides quinolínicos.....	37
<b>Tabla 5.</b> Actividad citotóxica frente a MdMhu y J774, efectividad en promastigotes y amastigotes intracelulares de <i>L. (V.) panamensis</i> de compuestos triterpenoides de origen natural y sintético .....	56
<b>Tabla 6.</b> Actividad citotóxica frente a MdMhu y J774, efectividad en promastigotes y amastigotes intracelulares de <i>L. (V.) panamensis</i> de compuestos triterpenoides de origen natural y sintético. ....	57
<b>Tabla 7.</b> Actividad citotóxica frente a MdMhu y J774, efectividad en promastigotes y amastigotes intracelulares de <i>L. (V.) panamensis</i> de compuestos alcaloides quinolínicos de origen natural y sintéticos .....	58
<b>Tabla 8.</b> Actividad citotóxica frente a MdMhu y J774, efectividad en promastigotes y amastigotes intracelulares de <i>L. (V.) panamensis</i> de compuestos alcaloides quinolínicos de origen natural y sintéticos .....	59
<b>Tabla 9.</b> Actividad antileishmanial de compuestos Triterpenoides frente a amastigotes intracelulares de <i>Leishmania (V.) panamensis</i> .....	60
<b>Tabla 10.</b> Actividad antileishmanial de compuestos alcaloides quinolínicos frente a amastigotes intracelulares de <i>Leishmania (V.) panamensis</i> .....	61
<b>Tabla 11.</b> Seguimiento de tamaño de lesiones de leishmaniasis cutánea en hámsteres dorados, tratados con compuestos sintéticos. ....	68
<b>Tabla 12.</b> Resumen de modificaciones ultra-estructurales de MdMhu infectados y no infectados y expuestos a <b>triterpenoides</b> .....	118
<b>Tabla 13.</b> Resumen de modificaciones ultra-estructurales de MdMhu infectados y no infectados y expuestos a <b>Alcaloides quinolínicos</b> .....	119
<b>Tabla 14.</b> Concentración proteínas de amastigotes aislados y expuestos a compuestos alcaloides .....	138

## Lista de Símbolos y abreviaturas

7AAD	:	7-actinomicina D
ADN	:	Ácido desoxirribonucléico
ALT	:	Alanina aminotransferasa
APC	:	Apocianina
APS	:	Amonio persulfato
ATP	:	Acido trifosfato
Buffy-coat	:	Capa leucoplaquetaria
BUN	:	Nitrógeno en urea y sangre
CD	:	Cluster de diferenciación
CE50	:	Concentración efectiva media
CL50	:	Concentración letal media
DAF-FM	:	Diaminofluoresceína -FM
DCF	:	fluorescente 2,7-diclorofluoresceína
DMSO	:	Dimetil sulfoxido
EGFP	:	Proteína verde fluorescente
FITC	:	Isotiocianato de fluoresceína
FL	:	Flow channel
H <sub>2</sub> DC-FDA:		2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	:	Peróxido de oxígeno
HLA-DR:		Antígeno leucocitario humano
IAA	:	Yodoacetamida
IL	:	Interluquina
IMF	:	Intensidad media de fluorescencia
IS	:	Índice de selectividad
IT	:	Índice de tanimoto
LC	:	Leishmaniasis cutánea
LMC	:	Leishmaniasis mucocutánea
L-NMMA:		N G-Methyl-L-arginine, acetate salt
LogD	:	Coeficiente partición especies ionizadas
LogP	:	Coeficiente de partición
LPS	:	Lipopolisacárido
LT	:	Linfocito T
LV	:	Leishmaniasis visceral
mA	:	Miliamperios
MdMhu	:	Macrófagos derivado de monocitos humanos
OMS	:	Organización mundial de la salud
ON	:	óxido nítrico
PBMC	:	Cmononucleares de sangre periférica
PBS	:	Solución tampon de fosfato

PE	:	Ficoeritrina
pH	:	Potencial de hidrogeniones
PHA	:	Fitohemaglutinina
pKa	:	Constante de disociación ácida
PMA	:	Porbol miristato acetato
PSA	:	Area de superficie polar
ROS	:	Especies reactivas de oxígeno
SDS-PAGE	:	:electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SFB	:	Suero fetal bovino
VL	:	Vacuola lipídica
VP	:	Vacuola parasitófora



# Introducción

La leishmaniasis constituye un amplio grupo de enfermedades que han sido categorizadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como tropicales desatendidas u olvidadas, lo cual significa que generan poco interés político y farmacéutico, afectando especialmente a habitantes de las zonas tropicales y subtropicales del planeta. En la actualidad, más de 300 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la infección y anualmente se generan 700.000 a 1 millón millones de casos, dentro de los cuales el 90 % pertenecen a casos de leishmaniasis cutánea (LC) (1,2). Colombia, no es ajena a esta situación, ya que en el último año se reportaron 4994 casos (Semana 53-2020), situándose como el tercer país de Latinoamérica con mayor incidencia de casos de la enfermedad (Instituto Nacional de Salud 2019).

La LC se caracteriza por la presencia una o varias estructuras tipo máculas, secundaria a la picadura del vector, transformándose en granulomas dérmicos (pápula) que evolucionan a nódulos indoloros y redondeados, aumentando progresivamente a úlceras cutáneas. Es transmitida por la picadura de insectos flebótomos del género *Lutzomyia*, al hospedero mamífero. En Colombia se han identificado más de 9 especies de *Leishmania* spp. circulantes en el territorio, siendo *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis* las más prevalentes en el territorio(3,4).

El tratamiento recomendado para pacientes con LC se basa en la administración intramuscular o endovenosa de antimonio de meglumina durante 20 días y si persiste la falla terapéutica, la administración oral de Miltefosina durante 28 días (5). Estos medicamentos pueden generar efectos adversos, como dolor en el sitio de administración, fiebre, cardiotoxicidad, hepatogenicidad, hasta efectos teratogénicos; sumado a los amplios esquemas de tratamiento y la forma de administración pueden inducir al abandono del tratamiento y como consecuencia, la generación de parásitos resistentes (6,7).

Con todo esto, se hace necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas, que incluyan nuevas formas de administración, que disminuyan la toxicidad para el paciente, sean eficaces en la eliminación del parásito y que resuelvan la enfermedad (8,9). Todo lo anterior viene acompañado de la identificación de los posibles mecanismos de acción de cada tratamiento, contribuyendo a la optimización de la terapia y maximizando su potencial farmacéutico(10).

Una de las estrategias más usadas ha sido la búsqueda y uso de moléculas de origen natural y sintético, las cuales han sido caracterizadas como compuestos antiparasitarios (11,12). Debido a los reportes de actividad frente a protozoarios del género *Leishmania*, los triterpenoides y alcaloides quinolínicos han cobrado importancia en la búsqueda de terapias farmacológicas para el manejo de la enfermedad.

En estudios anteriores llevados a cabo por el grupo de investigación, se identificaron dos moléculas de origen natural con actividad antileishmanial, pero con aparente forma de acción diferente. El triterpenoide (limonoide) indujo aumento en la producción de óxido nítrico (ON), HLA-DR y citoquinas inflamatorias en las células hospederas, mientras que el alcaloide quinolínico tuvo efecto directo sobre el parásito(13–15); sin embargo, el bajo rendimiento de extracción, sumado a la complejidad de estructuras y la heterogeneidad de los extractos, no hizo posible la obtención de las cantidades necesarias para ensayos posteriores y la consecuente extrapolación de los resultados, a ensayos pre-clínicos y clínicos(16).

Teniendo en cuenta que la asertividad de un tratamiento antileishmanial, se fundamenta en la eficacia y seguridad de las moléculas antileishmaniales (las cuales están soportadas en los estudios *In vitro* e *In vivo*)(17,18), la aproximación a los efectos sobre los modelos estudiados (contribuyen a la optimización de blancos terapéuticos)(19,20) y a las formas de formulación para el tratamiento (menores efectos adversos) (9,21), se planteó y desarrolló el presente trabajo de investigación, en el marco de la tesis doctoral.

Para alcanzar los objetivos determinados dentro del diseño racional de medicamentos antileishmaniales (22), el trabajo contempló el desarrollo de actividades experimentales en 5 fases de estudio, en donde se planteó: (i) la búsqueda de compuestos sintéticos, análogos a las moléculas naturales, a partir de herramientas *In silico* [Estas herramientas bioinformáticas, se basan en la comparación estructural (predictores moleculares) en dos



dimensiones y mapas de bits, los cuales se adjudican a las estructuras núcleo (core) de cada compuesto (23)]; (ii) la evaluación de la actividad *In vitro* de los compuestos sintéticos (Mdmhu, J774, promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis*), con el fin de obtener moléculas selectivas frente al patógeno (IS>2); para consecuentemente, determinar la efectividad terapéutica en el modelo *In vivo*, por medio del tratamiento por administración tópica con los compuestos seleccionados. (iii) La tercera fase se basó en la determinación del efecto de los compuestos previamente seleccionados (IS>2), sobre las funciones microbicidas de Mdmhu [moléculas microbicidas (producción de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico), expresión de moléculas co-estimuladoras (HLA-DR, CD80 y CD83) y producción de citoquinas pro y anti-inflamatorias (IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$  y IL-12p70)]; de forma paralela se realizó (iv) la evaluación del efecto de los compuestos antileishmaniales (IS>2), sobre las ultraestructuras y procesos celulares de Mdmhu infectados, amastigotes intracelulares (vacuolas, integridad de organelos, procesos de muerte celular) y promastigotes (integridad de los organelos y daño oxidativo), con el fin de poder dirigir la búsqueda de blancos terapéuticos y seleccionar el compuesto con el que se buscó (v) determinar la expresión diferencial de proteínas de amastigotes intracelulares.

# Marco teórico

## 1.1. Leishmaniasis

Al menos 21 especies de *Leishmania* causan la leishmaniasis las cuales son transmitidas al vertebrado por especies de insectos del género *Phlebotomus* o *Lutzomyia* (7,24) Las especies de *Leishmania* están divididas en dos sub-géneros: *Leishmania* y *Viannia*, las cuales son responsables de manifestaciones clínicas variadas como leishmaniasis visceral (LV), leishmaniasis mucocutánea (LMC), LC difusa (LCD), leishmaniasis dérmica post-kala-azar (LDPK) y LC (25,26)

La forma clínica más frecuente es la LC, la cual se caracteriza por presentar lesiones únicas o múltiples. Las lesiones pueden ocurrir en cualquier parte del cuerpo, pero comúnmente, se originan en el sitio de la inoculación donde inicialmente se forman lesiones maculares, seguidas por pápulas y luego por nódulos que progresivamente incrementan en tamaño y se convierte en úlceras. Estas lesiones pueden desarrollarse en semanas, meses o incluso años después de la infección (27–29).

La LM o LMC es el resultado de la diseminación linfo-hematógena del parásito. Afecta las mucosas de las vías aéreas superiores nariz, faringe, boca, faringe y boca. Solo del 3 a 5 % de los pacientes con leishmaniosis cutánea desarrollan lesiones mucosas y están relacionados con la especie *L. (V.) braziliensis*. La forma mucocutánea puede causar mortalidad y se presenta en algunos casos simultáneamente con lesiones cutáneas o, en periodos de tiempo subsiguientes a las lesiones en piel (29).

La LV es la forma más letal de la enfermedad y puede presentarse de forma abrupta, gradual o silenciosa, es causada por *L. (L.) infantum*. Su periodo de incubación puede ser de semanas o meses, luego de la picadura del vector. Puede ser asintomático manifestarse inicialmente con un cuadro clínico leve, moderado o grave. Se da por la invasión de los

parásitos a órganos y tejidos hematopoyéticos (hígado, bazo, médula ósea, ganglios linfáticos, etc), originando hepatoesplenomegalia, pancitopenia y linfadenopatias (17).

Muchos de los reservorios del parásito están referidos a mamíferos domésticos, como perros, así también como mamíferos salvajes, los cuales son portadores del parásito que previamente ha sido inoculado por medio de la picadura de insectos del género *Lutzomyia*; durante la picadura, el parásito es introducido en la epidermis y dermis de los huéspedes vertebrados (reservorios) perpetuando el ciclo del parásito, ya que los reservorios constituyen una fuente de infección activa para los humanos(30,31).

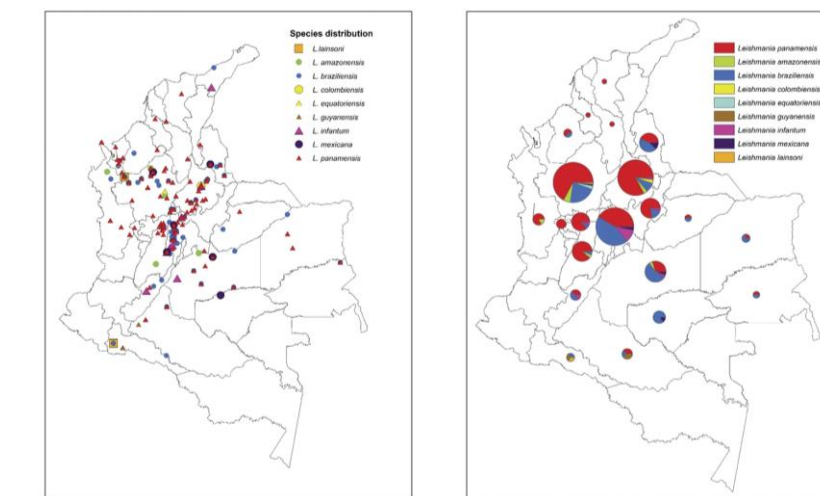
## 1.2. Epidemiología leishmaniasis

La leishmaniasis está incluida en la lista de enfermedades tropicales desatendidas y asociadas con la pobreza, ya que estas reciben poca atención y se ven postergadas en las prioridades de la salud pública (2,32,33).

La enfermedad ha sido reportada en 98 países en los 5 continentes. Aproximadamente 350 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad, 20 millones de personas están infectadas y un estimado de 700 mil a 1 millón de casos nuevos ocurren cada año. Un estimado de 0.2-0.4 y 0.7-1.2 millones de casos de leishmaniosis visceral y cutánea respectivamente, ocurren cada año. Más del 90 % de los casos de leishmaniosis visceral están concentrados en seis países: India, Bangladesh, Sudan, Sudan del sur, Etiopía y Brasil. Sin embargo, la distribución de leishmaniosis cutánea se concentra principalmente en 10 países: Afganistán, Algeria, Brasil, Iran Siria, Etiopía, Sudan del norte, Costa Rica, Perú y Colombia. Estos países son responsables del 70-75 % de los casos globales de Leishmaniasis cutánea (34–36).

En Colombia para el año 2020, se reportaron al menos 4994 casos, en donde el 98.4 % de los casos reportados son LC, 1.27% LM y 0.27 % LV, predominando su incidencia y prevalencia en una gran parte del territorio, especialmente en focos selváticos y zonas montañosas (plantaciones de café). Estudios de la distribución geográfica de *Leishmania* spp. en Colombia, han determinado la presencia de al menos 8 especies en todo el país; en donde se han identificado a dos especies - *L. (V.) panamensis* y (74,5 %) *L. (V.) braziliensis* (15,33 %)- con mayor frecuencia y circulación en el país (Figura 1) (37,38).

Esta variabilidad de especies, constituye un reto adicional para el tratamiento de la enfermedad, debido a la variabilidad en la sensibilidad de los parásitos a los medicamentos antileishmaniales (39,40).



**Figura 1.** Distribución geográfica de *Leishmania* spp. en 327 aislados de pacientes con LC en Colombia. Referencia tomada de Ramirez, J et al., 2016 (38).

### 1.3 Biología de *Leishmania* spp.

El agente causante de la leishmaniasis, es el protozoo del género *Leishmania* y pertenece al grupo de protozoarios flagelados de la familia *Trypanosomatidae*, orden Kinetoplastida, que contienen el kinetoplasto, el cual es una red compleja interconectada de moléculas de DNA mitocondrial circulares, único para la familia tripanosomatide (41).

Tienen dos formas morfológicas, en su ciclo de vida (amastigote y promastigote). Las formas amastigotes del parásito sobreviven dentro de vacuolas lisosomales presentes en células fagocíticas del vertebrado (Monocitos y macrófagos), los cuales son ingeridos por un insecto hembra de la familia Phlebotominae, la cual toma sangre infectada del huésped, perpetuando el ciclo infeccioso (24,42).

Este parásito, puede adaptarse metabólicamente al huésped. En su forma infecciosa intracelular se reducen sus requerimientos nutricionales, cambiando su propio metabolismo (catabolismo de carbohidratos a aminoácidos) de acuerdo con las condiciones del ambiente(43). Asimismo, este parásito posee mecanismos de protección contra el estrés

oxidativo, los cambios de temperatura y la respuesta inflamatoria originadas por los macrófagos principalmente (44,45)

En *Leishmania* la superficie celular se caracteriza por la presencia de tres estructuras fundamentales en su potencial patogenicidad: membrana plasmática, glicocálix y microtúbulos sub-peliculares. El glicocálix tiene función de sostenimiento además de estar asociado a la interacción con la superficie de las células del huésped o las células del epitelio intestinal del insecto; bioquímicamente el glicocálix se compone de proteínas periféricas, glicoproteínas, glicolípidos y algunos glicosil-fosfatidil inositol anclados a glicoproteínas (31). La membrana plasmática de los parásitos está dividida en tres macrodominios mayores: cuerpo celular, flagelo y bolsillo flagelar. Por otro lado, cada macrodominio también contiene regiones especializadas como el cuello flagelar, localizado en la porción basal del flagelo y la zona de anclaje del flagelo al cuerpo celular (7).

Adicionalmente, este grupo de parásitos tiene estructuras especializadas en su citoesqueleto que le permiten mantener su forma en cada etapa del desarrollo y participan en su movilidad y adhesión. Los microtúbulos sub-peliculares están asociados con la membrana plasmática del cuerpo celular y otros organelos, especialmente el retículo endoplasmático, por pequeños filamentos, los cuales se encuentran cerca a la mitocondria, ya que contiene monómeros de tubulina acetilada y tirosinada (31,46). En el promastigote, el flagelo consiste en un axonema que se conecta a las inclusiones citoplasmáticas paraflagelares (PFR), un complejo para-cristalino de filamentos que está conectado al axonema. El flagelo se origina en el cuerpo basal y pasa a través de una larga membrana llamada el bolsillo flagelar (47).

Otra estructura relevante es *Leishmania* es la mitocondria, el único organelo ramificado que ocupa una gran proporción del citoplasma del parásito. Éste, es de gran importancia ya que está involucrado en la producción de energía a través de la fosforilación oxidativa, síntesis de metabolitos y reservorio de hierro y sulfuro. En *Leishmania*, la mitocondria tiene variaciones en el desarrollo, siendo un organelo esencial para su sobrevivencia en el huésped humano (46). Igualmente, un organelo característico de *Leishmania* y asociado a la mitocondria es el kinetoplásto. Esta región es una pequeña parte de proteínas codificadas y producidas en la mitocondria, la cual representa componentes específicos de la cadena respiratoria y de la maquinaria de transducción mitocondrial. La información genómica está

contenida en el ADN del kinetoplasto (ADNk) representando el 30% del total de ADN celular del parásito (48).

#### **1.4 Ciclo de vida *Leishmania* spp.**

Durante el complejo ciclo de vida de *Leishmania* spp. los parásitos alternan entre promastigotes -los cuales se encuentran en espacios extracelulares intestinales del vector (Insecto-) y amastigotes -que se adaptan a la sobrevivencia en un hábitat intracelular, dentro de macrófagos mamíferos. En el insecto vector, *Leishmania* spp. está en una forma infectiva (promastigote). Sin embargo, en huéspedes vertebrados, se pueden encontrar de forma amastigote, donde se replica e infecta en células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos y células dendríticas) desencadenando la enfermedad (24,49).

Cuando el insecto hematófago pica al huésped vertebrado, introduce diferentes enzimas en la dermis, lacerando los vasos sanguíneos, causando hemorragias de las cuales se va a alimentar el artrópodo. En este proceso, están involucradas diferentes enzimas provenientes de la saliva del insecto, como la hialuronidasa; este vasodilatador perfora capilares dérmicos y es usado por el vector como una estrategia para poder tomar la sangre. Los promastigotes metacíclicos en su etapa infectiva, son inoculados dentro del huésped por insectos de la familia Phlebotomidae, los cuales se encuentran en las proboscidas, durante la ingestión de sangre. La presencia de proteínas de membrana en los promastigotes, le permite adherirse a los macrófagos y desencadenar procesos fagocíticos. Los protozoos son fagocitados por macrófagos; ya internalizados permanecen dentro de la vacuola parasitófora donde se desarrolla y replica (7,24). En este ambiente, el promastigote se diferencia a amastigote, el cual puede sobrevivir en pH ácido donde puede dividirse por fisión binaria. Después de la múltiple división, un gran número de amastigotes inducen la lisis de los macrófagos, por incremento de la densidad, liberando los parásitos, los cuales pueden infectar nuevos macrófagos o ser ingeridos por el vector (insecto) durante un nuevo consumo de sangre.

#### **1.5 Inmunobiología de la infección por *Leishmania* spp.**

La interacción inicial que conlleva a la leishmaniasis depende de los mecanismos de acción de la proboscis del insecto y, de la acción enzimática de la saliva del insecto(49).

En el sitio de la inoculación factores del huésped como el sistema del complemento, las trombinas, las quininas, las plaquetas, los anticuerpos y las células fagocíticas, determinan los mecanismos de prevención contra los parásitos (43).

En el macrófago, los parásitos se depositan en vacuolas parasitóforas que tienen muchas características típicas de fagolisosomas, incluyendo la presencia de marcadores lisosomales como LAMP-1, LAMP-2 y Rab7. La diferenciación de promastigotes a amastigotes, se inicia por el incremento de la temperatura y la disminución de pH. El proceso de diferenciación se asocia con la reducción de la tasa de crecimiento y la inducción de un estado metabólico diferente, caracterizado por la disminución del consumo y utilización de glucosa y aminoácidos, reducción de la secreción de ácidos orgánicos y el incremento de la beta-oxidación de ácidos grasos (43,44). Una vez el parásito establece la infección en el macrófago, la multiplicación del parásito requiere una fuente de nutrientes, la cual se establece por la interacción con las proteínas del retículo endoplásmico, a través de vías secretoras y de intercambio con el exterior de la VP(50,51) .

Durante este proceso, los macrófagos emplean muchas estrategias de defensa contra los parásitos. La fagocitosis de cuerpos extraños por los macrófagos resulta en el estallido oxidativo. NAD(P)H oxidasa en la membrana plasmática es activada, transfiriendo protones al oxígeno molecular, formando superóxido reactivo, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos que, interactúan con los fosfolípidos de la membrana del parásito (52,53). Sin embargo, la infección incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno por macrófagos residentes y estimula la producción de óxido nítrico, por medio de la activación de iNOS vía MyD88. En adición, la infección también aumenta la activación de proteínas de estrés (c-Jun/Kinasa) y la expresión de moléculas de membrana y FasL (54) .

La activación de macrófagos es otra estrategia de control de la infección; ya que a través de la secreción de IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-12p70, induce un ambiente pro-inflamatorio, en donde participan linfocitos CD4+ con fenotipo predominante Th1. En este proceso de presentación antigénica se produce INF- $\gamma$  por parte de linfocitos T CD4+, resultando en la respuesta pro-inflamatoria y en la inhibición del crecimiento del parásito mediado por la inducción de óxido nítrico, mientras que la activación alternativa, por IL-4, inhibe la inflamación a través de IL-10 y conlleva a la supervivencia del patógeno(49,55) .

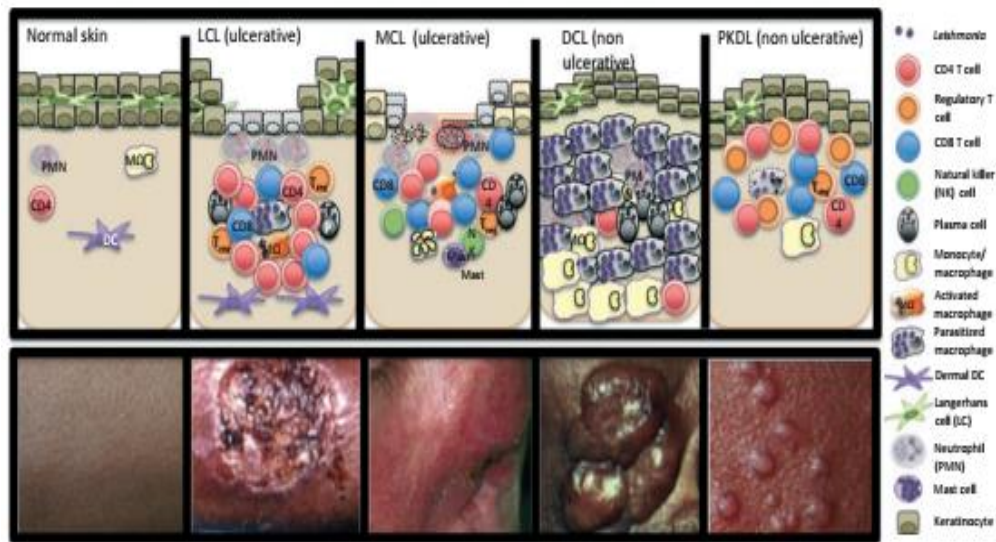
Aunque las estrategias de eliminación del macrófago son eficaces, el parásito utiliza herramientas que contrarrestan los mecanismos efectores de la célula presentadora de antígeno-CPA y aumentan su sobrevivencia. El parásito utiliza factores de supervivencia como el LPG (lipofosfoglicano) que activa la vía MAPK, disminuye la expresión de TLR9 y aumenta la expresión de *scavengers* de ROS; GP63 (metaloproteasa dependiente de zinc), que contribuye a la activación de la Proteína tirosina fosfatasa (PTP), a la disminución de caspasa 3 (mediador en apoptosis) y la bajo-regulación de TNF $\alpha$ , IL-12 y ON, por parte del macrófago. La fosfolipasa inositol fosfoesfigolípido (ISCL) que promueve la sobrevivencia y replicación del parásito (49,56,57).

### **1.6 Inmunopatología de leishmaniasis cutánea**

Teniendo en cuenta que la aparición de la enfermedad se debe a varios factores como la especie infectante, el componente genético y la inmunocompetencia del paciente, la respuesta inmune juega un papel relevante en la resolución o progresión de la leishmaniasis (58). En la LC se ha observado que los parásitos al entrar en contacto con la piel son tomados inmediatamente por neutrófilos, los cuales actúan como primer hospedero. Posteriormente los macrófagos (hospederos definitivos), llegan en una segunda instancia de células infiltrantes (2 días), acompañado de un ambiente inflamatorio. Seguida de la inflamación aguda inicial, la infección por *Leishmania* se desarrolla de manera silente durante varias semanas o meses; en donde el parásito prolifera, sin generar lesiones visibles(59). La fase silente culmina cuando existe inflamación excesiva del tejido infectado y hay formación de una lesión, en el sitio de la picadura. En lesiones de LC, se ha encontrado infiltración de neutrófilos, macrófagos y eosinófilos, la que coincide con la eliminación de parásitos. El desarrollo de la lesión puede ser detectado por la aparición de pequeñas pápulas rojas. Dependiendo de la especie de parásito, las lesiones pueden progresar a nódulos eritematosos, plaquetas induradas o úlceras (28).

La infiltración y activación de leucocitos y fibroblastos, conlleva a la destrucción de la arquitectura del tejido normal. Como el hospedero responde a la infección, la epidermis se hipertrofia con la proliferación de keratinocitos en la epidermis basal. La ulceración de la piel está unida a la activación de la inflamación local alrededor de los macrófagos infectados y la necrosis de la dermis, que precede la ulceración y que usualmente ocurre después de varias semanas de la picadura (44,59,60) (Figura 2).





**Figura 2.** Poblaciones celulares involucradas en las diferentes manifestaciones clínicas de leishmaniasis cutánea y mucocutánea. Ilustración tomada de Oliveira et al., 2014 (61).

Sumado a las poblaciones celulares implicadas a nivel tisular, existen otras células importantes en la patología del tejido (Linfocitos T), las cuales pueden determinar el tipo de respuesta inmune y daño en el tejido, inducido por la infección. Estas células han sido encontradas de manera abundante en lesiones cutáneas y en especial linfocitos T reguladores, que median la producción de citoquinas como IL-10 y TGF- $\beta$  y están asociadas con el curso de la enfermedad y la patología (61).

Las respuestas de las células T, la activación de citoquinas inducidas por macrófagos, la inmunidad mediada por determinantes celulares, la expresión de la enfermedad y los mecanismos de patogenicidad del parásito, son particularmente variables. La hipersensibilidad retardada (asociada con el test de leishmanina), la reactividad antígeno-específico de células T y la activación y secreción de citoquinas, son características de infecciones asintomáticas y LC localizada, presentes pero ineficientes en leishmaniasis visceral y, exuberantes pero aparentemente patológicas, en la infección mucosa (28). En pacientes con LC y mucocutánea tienen una potente respuesta inmune hacia *Leishmania*, con alta producción de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , así como la disminución de IL-10, regulada por las citoquinas pro-inflamatorias. Aunque existen mecanismos responsables del control de *Leishmania*, como la producción de ROS (generado por el estallido oxidativo) ocurrido

durante la fagocitosis y la producción de ON, son insuficientes para la eliminación del parásito (44).

Por otra parte, la respuesta adaptativa temprana es importante en la determinación del curso de la infección por *Leishmania* en la piel, ya sea para la auto resolución o cronicidad de enfermedad. Se ha identificado que en diferentes cepas de ratones infectados por *L. major* se pueden evidenciar dos fenotipos celulares característicos. Uno de ellos es el perfil  $T_H1$ , el cual media la resistencia del hospedero y contribuye a la cura, y el perfil  $T_H2$ , el cual induce a la susceptibilidad del hospedero a la infección y posterior progresión de la enfermedad (55,60).

Estos fenotipos ( $Th1$  o  $Th2$ ) se asocian con las poblaciones de la respuesta inmune presentes en el momento de la infección. La expansión de clones  $Th1$  (T helper) protegen durante la infección, mientras que la expansión de  $Th2$ , exacerba la infección. La producción de IL-12 por células dendríticas y macrófagos causan la diferenciación de células T naive a células  $Th1$ , induciendo la producción de interferón gamma ( $INF-\gamma$ ) producido por células natural killer (NK). Igualmente la conjunción de  $INF-\gamma$  y factor de necrosis tumoral beta ( $TNF-\beta$ ) producido por macrófagos infectados, activan el NO inducible (NO), tóxico para el parásito (28) .

De acuerdo con lo anterior, es necesario el desarrollo de medicamentos que tengan la capacidad de erradicar el parásito intracelular, modular la respuesta inmune del hospedero a favor de la activación de las células efectoras y contribuya a la remodelación y curación del tejido afectado.

## **1.7 Tratamiento antileishmanial**

Según los lineamientos generales para el tratamiento de la Leishmaniasis en Colombia, el esquema terapéutico consiste en el uso de antimoniatos pentavalentes, de 20 a 28 días y administrado generalmente por vía intramuscular (5). Sin embargo, este medicamento genera efectos adversos como el aumento de enzimas hepáticas (alanina aminotransferasa (ATL) y aspartato aminotransferasa (AST), carditoxicidad y por la baja adherencia, la emergencia de cepas resistentes (10). Este medicamento ha sido usado para el tratamiento de la leishmaniosis en el mundo, desde 1903, siendo la primera alternativa terapéutica para

esta enfermedad. La depleción de los niveles de ATP, la interferencia del glicocálix y la  $\beta$ -oxidación en amastigotes, son los mecanismos de acción descritos(41).

Como medicamentos de segunda línea, se recomienda el uso de miltefosina (1-O-hexadecylphosphocholine), administrado vía oral, durante 28 días (5). La miltefosina es un alquilfosfocolina y un análogo sintético de lípidos que fue desarrollado para el tratamiento de carcinoma de seno y ha sido usado para el tratamiento contra la leishmaniasis visceral (62). Estas moléculas han sido particularmente útiles en casos de no respuesta a antimoniatos o en casos de reacciones individuales a la hipersensibilidad al medicamento; sin embargo, su alta toxicidad se convierte en un factor limitante, debido a sus efectos cardíacos, a la nefrotoxicidad, a la teratogenicidad y a las repentinas muertes (63).

Opcionalmente, el isetionato de pentamidina, la cual pertenece al grupo de diaminas aromáticas, que fueron sintetizadas como medicamentos hipoglicemiantes, se puede administrar de forma intramuscular, sin embargo, se describió su uso como antiparasitario después de algún tiempo. Las diaminas han sido usadas en infecciones por *Leishmania* desde 1.939, por su estabilidad química (Le Pape, 2008), aunque el mecanismo de acción no está completamente descrito. La estructura catiónica de esta molécula es similar a la naturaleza catiónica del pH fisiológico, por esto es responsable de tener una interacción con varios blancos, siendo tóxico tanto frente al parásito, como para el huésped (19,63).

En Colombia, según las guías del ministerio de salud y protección social se recomienda el tratamiento con anfotericina B liposomal en pacientes con LM y LV (5) Este es un antifúngico tipo macrólido polieno, cuyo mecanismo de acción, está basado en la predilección del medicamento por los esteroides de *Leishmania*. A diferencia con el huésped mamífero, el ergosterol es el esteroide sintetizado en la membrana de *Leishmania*. El macrólido se une a estas moléculas, creando poros que quelan iones. La anfotericina B cambia la composición de los esteroides de membrana, permeabilizando y destruyendo al parásito (64).

De acuerdo con lo anterior, el tratamiento para leishmaniosis es complicado, ya que el protozooario *Leishmania* es un parásito intracelular obligado dentro de macrófagos en la forma amastigote. Además, no hay vacunas disponibles y los medicamentos de primera elección, son tóxicos y su forma de administración, se realiza exclusivamente de forma parenteral, lo que se asocia con una baja adherencia. Sumado a lo anterior, la resistencia a

estos medicamentos ha sido reportada, un hecho que se ha incrementado en todas las formas de leishmaniosis y, especialmente en áreas endémicas (10,65).

### **1.7.1 Administración tópica de tratamiento frente a la leishmaniasis cutánea**

Teniendo en cuenta que la leishmaniasis cutánea es la forma clínica más prevalente en el territorio colombiano y que se caracteriza por la afectación directa sobre la dermis, epidermis y de los sistemas que regulan estos tejidos, se hace necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas que conlleven a la disminución de la incidencia de la esta enfermedad en el país.

Una de las características más relevantes de leishmaniasis cutánea es la aparición de lesiones de tipo nódulo, que progresan a úlceras y conllevan a cambios epidermales, reflejo de la respuesta inmune de la infección; estas alteraciones son la hiperplasia y daño de tejidos, la ruptura de la matriz de colágeno en la dermis y el reclutamiento de fibroblastos, así como la disolución epidérmica, que da origen a la úlcera localizada con una depresión central, en donde se encuentran macrófagos epidermales infectados con *Leishmania* spp. (9,66).

El tropismo y la ubicación de los parásitos en la piel, es un factor a considerar para el desarrollo de tratamientos localizados, los cuales minimizan los eventos adversos y las interacciones no deseadas sistémicas del medicamento (9,21). Sin embargo, existen retos propios de la forma de administración tópica, tales como el desarrollo de formulaciones que permitan la retención y liberación del compuesto activo, la permisividad de las barreras fisiológicas al paso del ingrediente farmacéutico y la acumulación de este en las células blanco (macrófagos infectados), para completar su efecto sobre el patógeno (21,67,68).

En la actualidad se han llevado a cabo estudios enfocados al desarrollo de tratamientos tópicos, en diferentes vehículos, tales como crema, ungüentos y geles. De acuerdo con esto, principios activos como la paramomicina (molécula hidrofílica, insoluble en lípidos y alto peso molecular), el cual tiene propiedades antileishmaniales pero tiene baja biodisponibilidad cuando se administra de manera oral y demuestra efectos tóxicos al ser administrado de manera parenteral; sin embargo, al ser desarrollado como tratamiento tópico, demuestra efecto curativo en lesiones de ratones BALB/c y la absorción

sistemática en los animales (9,68,69). Adicionalmente, compuestos como Imiquimod 5% en crema (Aldara®), demuestra actividad antileishmanial en diferentes modelos animales y en humanos (actividad limitada)(66,70).

Considerando estos antecedentes y tomando en cuenta la limitada oferta de principios activos con propiedades antileishmaniales, se hace necesaria la búsqueda con compuestos con propiedades físico-químicas que cumplan los requisitos de bajo peso molecular (< 600 Da), solubilidad y lipofilicidad estable (Solubilidad/ LogP) y bajo punto de fusión, permitiendo la absorción del medicamento a través de la piel (9,21,71), pretendiendo mejores antileishmaniales con superiores seguridad y eficacia, sumado a una máxima de adherencia al tratamiento.

### **1.8 Búsqueda de compuestos con actividad antiparasitaria**

El desarrollo de nuevos fármacos antiparasitarios no ha sido una prioridad de la industria farmacéutica multinacional, ya que muchas de estas enfermedades parasitarias ocurren en países en vías de desarrollo, cuya población no puede acceder a éstas por problemas económicos, lo cual hace más difícil la producción de nuevos medicamentos(72).

Sin embargo, la investigación en leishmaniasis ha tenido un progreso significativo, aunque el desarrollo de medicamentos antileishmaniales seguros, efectivos y de bajo costo, no ha sido desarrollado con éxito. Por esta razón la caracterización de terapias alternativas, así como la identificación de nuevos medicamentos, son un factor importante para la medicina y la bioquímica alrededor del mundo, ya que los productos naturales son una potencial fuente para agentes selectivos para enfermedades tropicales (73).

Los compuestos naturales son una promisoría fuente de agentes nuevos y selectivos, para el tratamiento de enfermedades tropicales, especialmente las causadas por parásitos. Los metabolitos secundarios de las plantas son efectivos frente a diversos grupos de patógenos como virus, bacterias y hongos(30).

Estos proveen protección en herbívoros, artrópodos y vertebrados. Varios metabolitos secundarios de las plantas como quinonas, terpenos, saponinas, fenoles y sus derivados son benéficos para los humanos por sus propiedades antiparasitarias y su mecanismo de acción selectivo. Adicionalmente, la aplicabilidad directa de metabolitos secundarios como

la quinina entre otras, han sido diseñadas farmacológicamente para incrementar su actividad (74–76).

Varios grupos de productos naturales, los cuales incluyen alcaloides, terpenoides, flavonoides, oxilipinas, lactonas, quinonas y cumarinas, han sido recientemente reportadas por mostrar actividad antileishmanial, los cuales han reportado un amplio espectro de actividad frente a diferentes especies del parásito (75,77–79)

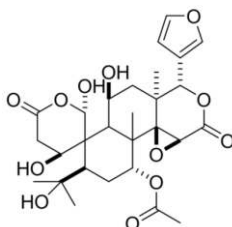
### 1.8.1 Triterpenoides

Los triterpenoides constituyen una gran familia de productos naturales, de los cuales se han podido aislar cerca de 22.000 compuestos individuales, desde 1.970. Los terpenoides pueden tener diferentes funciones en las plantas como hormonas, pigmentos fotosintéticos, transportadores de electrones, mediadores de polisacáridos y componentes estructurales de membranas, entre otros. Adicionalmente estos compuestos (Familias C15 y C20) sirven como señal de comunicación y defensa en las plantas(74,75) y provienen principalmente del precursor 2,3-oxidoescualeno, a través de la vía mevalónica (80).

Estos compuestos hacen parte de aceites esenciales de varias plantas y flores, los cuales solo contienen carbono, hidrógeno y átomos de oxígeno. Los terpenoides tienen funciones quimo-atrayentes o quimo-repelentes, además de dar fragancia en las plantas. Muchos monoterpenoides han demostrado actividad antitumoral y han servido como compuestos para la prevención del cáncer (78,81). En adición, los terpenoides han mostrado actividad antibacteriana, antifúngica, antiparasítica, antiviral, antialérgica y anti-inflamatoria (16,79,82).

Dentro de los triterpenoides se encuentran los compuestos *seco-limonoides* provenientes de las familias Rutaceae y Meliaceae, hacen parte de un grupo con actividad antiparasitaria comprobada (13–15). También se han evaluado compuestos limonoides a partir de material vegetal, los cuales demostraron actividad frente a *L. major* tales como kotschyienone A y B, 7-deacelgedunina y 7-deacetil-7-oxogedunina, los cuales reportaron EC<sub>50</sub> entre 2,86 - 14,9 uM (83). Este grupo en particular, cobra importancia farmacológica, ya que en estudios llevados a cabo por el grupo de Investigación en Inmunotoxicología, se identificó una molécula *seco-limonoide* (1S,5R,9S,7R,8S,9R,10S,11R,13S,14R,15R,17R)-11,19-dihydroxy-7-acetoxy-7-deoxoichangin (Figura 3), proveniente de *Raputia heptaphylla*, la cual posee actividad antileishmanial frente a amastigotes intracelulares de *L. (V.)*

*panamensis* (14) y efectos inmunomoduladores frente a CDh (células dendríticas humanas), como la inducción de la expresión de moléculas co-estimuladora, producción de ON y citoquinas pro-inflamatorias (15) (Tabla 1).



**Figura 3.** Compuesto seco-limonoides 11,19-dihidroxy-7-acetoxy-7-deoxoichangin(14).

Por otra parte, los triterpenos pentacíclicos como el ácido ursólico y el betulinaldehído, los cuales se obtienen de *Jacaranda copaia* y *Doliocarpus dentatus*, mostraron efecto contra amastigotes de *L. (L.) amazonensis* (6). La actividad antileishmanial de estas moléculas se ha descrito en el cambio de las dinámicas de la membrana del parásito, afectando el potencial mitocondrial e induciendo la muerte de *L. (L.) amazonensis*, generando especies reactivas de oxígeno y activando la respuesta inmune del huésped (84) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Compuestos triterpenoides con actividad antileishmanial y modos de acción reportados

Grupo	Compuestos	Fuente	CL <sub>50</sub>	CE <sub>50</sub>	In vivo	Modo de acción	Referencia
Limonoides	rel-(1S,5R,9S,7R,8S,9R,10S,11R,13S,14R,15R,17R)-11,19-dihidroxy-7-acetoxy-7-deoxoichangin	Material vegetal ( <i>Raputia heptaphylla</i> )		<i>L. (V) panamensis</i> Amastigotes 8.7 µg/m		Inducción producción de ON, expresión HLA-DR, CD83 y CD80	(15,85)
	kotschyenone A and B 7-deacetylgedunin 7-deacetyl-7-oxogedunin andirobin methyl angolensate		HL-60 cells 100 µM and 31.5–46.2 µM	<i>L. major</i> 10 µM (promastigotes) 1.5 µM (amastigotes)			(83)
	7-deacetoxy-7-hydroxygedunin, deacetyldihydrogedunin, deoxygedunin, andirobin, gedunin, 11 β -hydroxygedunin, 17-glycolydeoxygedunin, 6 α -acetoxypedunin, and 6 α ,11 β -diacetoxypedunin	Material vegetal ( <i>Carapa guianensis</i> )	Macrófagos peritoneales 78.55±1.406, 139.0±1.523 y 607.7±1.217 µg/mL	<i>L. amazonensis</i> (promastigotes) 10.53±0.050, 25.3±0.057 56.9±0.043 µg/mL (Amastigotes) 27.31±0.091, 78.42±0.086, 352.2±0.145 µg/mL			(86)

	18 $\beta$ -glycyrrhetic acid	Material vegetal ( <i>Glycyrrhiza glabra</i> )	Macrófagos peritoneales ratón 4.6 ug/mg	L.V 50 mg/kg/day	Inducción de ON a través fosforilación ikKb	(87)
	Ácido glicirricico	Material vegetal ( <i>Glycyrrhiza glabra</i> )		<i>L. donovani</i> (promastigotes) 34 $\pm$ 3.0 $\mu$ M (amastigotes) 20 $\pm$ 4.2 $\mu$ M	Inhibición HMG-CoA reductasa en promastigotes (depleción niveles de colesterol)	(88)
Pentacíclicos	Ácido oleanólico, ácido ursólico	Síntesis	Macrófagos peritoneales ratón 50235.80 $\pm$ 36.95 $\mu$ M	(Promastigotes) <i>L. braziliensis</i> 30.47 $\pm$ 6.35 $\mu$ M <i>L. amazonensis</i> 40.46 $\pm$ 14.21 $\mu$ M <i>L. infantum</i> 65.93 $\pm$ 15.12 $\mu$ M (Amastigotes) <i>L. braziliensis</i> 68.75 $\pm$ 16.55 $\mu$ M <i>L. amazonensis</i> 38.45 $\pm$ 12.05 $\mu$ M <i>L. infantum</i> 64.08 $\pm$ 23.52 $\mu$ M	Ensayos In silico Interacción con CYP51 ( <i>Leishmania</i> )	(89)
	Ácido lantanilico, ácido lantoico	Material vegetal ( <i>Lantara camara</i> )		<i>L. major</i> Promastigotes 53 - 21.3 uM		(75)
	Ácido tormentico ácido 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ - dihydroxyursan-12-en-28-oic Acido 2 $\alpha$ ,3 $\beta$ -dihydroxyolean-12-en-28-oic Ácido oleanolico ácido ursolico	Material vegetal ( <i>Pourouma guianensis</i> )	Macrófagos peritoneales ratón 40 $\mu$ g/ml	<i>L. amazonensis</i> (promastigotes) 100 $\mu$ g/m (amastigotes) 27 $\mu$ g/ml - 11 $\mu$ g/m		(90)
	Lupano, betulina, ácido betulínico	Semi-síntesis	THP-1 50 uM	<i>L. donovani</i> (Amastigotes) 14.6 uM		(91)
Lupanos	Lupeol	Material vegetal ( <i>Sterculia villosa</i> )		<i>L. donovani</i> (promastigotes) 65 $\pm$ 0.41 $\mu$ g/mL (amastigotes) 15 $\pm$ 0.45 $\mu$ g/mL	Regulación de citoquinas pro-inflamatorias	(92)

Compuestos de tipo triterpenoides antileishmaniales. CL50 (concentración letal 50), Concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>).ROS (especies reactivas de oxígeno). ON (Óxido nítrico).

Compuestos con el mismo core (núcleo) estructural a los triterpenoides pentacíclicos, de tipo lupanos, también mostraron efectividades frente a *L. donovani* (50,8 – 25,8 uM) y actividades sinérgicas con el tratamiento convencional miltefosina (93).

Otros compuestos perteneciente a este amplio grupo, son los triterpenoides derivados de *Gliciriza glabra*, como ácido glicirretínico y glicirricina, los cuales han sido evaluados for su eficacia como antileishmanial, en amastigotes intracelulares de *L. donovani* a CE<sub>50</sub> entre 34 a 20 uM (94); así como por sus propiedades inmunomoduladoras en el modelo de leishmaniasis visceral, induciendo respuestas de tipo Th1 en ratones infectados (95,96).

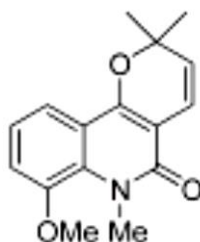


### 1.8.2 Alcaloides quinolínicos

Los alcaloides quinolínicos son parte de los metabolitos secundarios encontrados en plantas de la familia *Rutaceae*, los cuales son biosintetizados a partir del ácido antranílico; la estructura de estos compuestos se basa en grupos carboxilo del ácido antranílico con un grupo acetato (malonato) y su subsecuente ciclación del anillo quinolínico (18,97).

Los alcaloides quinolínicos han sido efectivos contra LC (*L. (L.) amazonensis* y *L. (L.) venezuelensis*) en ratones BALB/c. Compuestos como chimanina-D y B han sido aislados de *Galipea longiflora*, la cual hace parte de la familia Rutacea y ha demostrado que tiene una actividad antiparasitaria contra promastigotes de *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) donovani* (98). Asimismo, extractos de *Helietta apiculata* también han demostrado su capacidad antiparasitaria contra promastigotes de *L. (V.) braziliensis*, similar al efecto de anfotericina B (99). En estudios químicos y biológicos de compuestos sintéticos derivados de quinolinas substituidas en C-2, se observó aumento de índices terapéuticos en ratones BALB/c (100) y posteriormente en ensayos clínicos, se evaluó frente a leishmaniasis visceral. En investigaciones realizadas en nitroquinolinas sintéticas, se observó el efecto leishmanicida frente a amastigotes intracelulares y promastigotes de *L. donovani* (100). La síntesis de quinolinas nitradas en C-2, conllevó a la evaluación de “leads” en células hospederas (J774 y HepG2) y parásitos (*L. (L.) donovani* y *L. (L.) infantum*), lo que resultó en la selección de compuestos derivatizados a partir de la molécula plantilla y la identificación del posible mecanismo de acción de las moléculas quinolínicas (101) (Tabla 2).

Adicionalmente, la molécula N-metil-8-metoxiflindersina (Figura 4), perteneciente al grupo de alcaloides quinolínicos y aislada de *Raputa heptaphylla* mostró efectividad frente a la forma promastigote de *L. (V.) panamensis*  $EC_{50} = 14,3 \mu\text{M}$  (14), así como la inducción de mejoría clínica en el 83% de los animales tratados con el compuesto (15) (Tabla 2).



**Figura 4.** Alcaloide quinolínico N-metil-8-metoxiflindersina(85)

Aunque los compuestos naturales son una fuente inagotable de moléculas con actividad biológica, aún existen limitantes que involucran la poca información sobre el material vegetal, las pocas cantidades del producto a estudiar y la variabilidad en la recolección de especímenes. La calidad y uniformidad de los constituyentes químicos, además de sus concentraciones en los productos naturales, pueden afectarse por características como la edad de la planta, variaciones estacionales y geográficas, tiempo y método de colección, entre otros (16,102).

**Tabla 2.** Actividad antileishmanial de compuestos alcaloides quinolínicos

Grupo	Compuestos	Fuente	CL <sub>50</sub>	CE <sub>50</sub>	<i>In vivo</i>	Modo de acción	Referencia
	Moléculas derivadas de quinolinas	Semi-síntesis	Macrófagos peritoneales ratón	<i>L. amazonensis</i> - <i>L. braziliensis</i> (promastigotes) 0.0911 µM		Daño oxidativo en mitocondria. Inducción de ROS	(103)
	Quinolinas 3-sustituidas	Semi-síntesis	RAW 264.7 31.6 - 12.77 ug/mL	<i>L. chagasi</i> (promastigotes) 18.78 - 0.79 ug/mL (amastigotes) 3.55 ug/mL		Daño ultra-estructural mitocondria	(104)
	Moléculas derivadas de quinolinas (sales)	Semi-síntesis		<i>L. amazonensis</i> (amastigotes) 5.48 µM		Apoptosis-daño en mitocondria Inducción ROS	(105)
Quinolinas	N-metil-8-metoxiflinderina	Material Vegetal (Raputia heptaphylla)		<i>L. panamensis</i> (promastigotes) 14.3 µg/ml			(15,85)
	Quinolinas 2-sustituidas Chimanine B Skimmianina	Semi-síntesis		<i>L. amazonensis</i>	Balb/c 100 mg/Kg disminución de lesión		(106,107)
	Derivados quinolínicos	Semi-síntesis		<i>L. amazonensis</i> - <i>L. braziliensis</i> (amastigotes) 0.0911 µM		Inducción de ROS en promastigotes	(103)
	Quinolinas 2-sustituidas	Semi-síntesis		<i>L. donovani</i> (Amastigotes) 0.2 µM	Disminución de lesión en Hamster 50 mg/Kg		(108)

Compuestos de tipo alcaloides quinolínicos antileishmaniales. CL<sub>50</sub> (concentración letal 50), Concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>).ROS (especies reactivas de oxígeno). ON (Óxido nítrico).

Uno de los inconvenientes más importantes es el aislamiento de compuestos puros a partir de mezclas complejas, en donde la actividad biológica puede estar concomitantemente actuando sobre el organismo patógeno(6). Por esta razón, el estudio de moléculas análogas a las encontradas en material vegetal, se convierte en una alternativa para asegurar la homogeneidad de los resultados de la investigación. Los compuestos sintéticos por su parte, ofrecen a los investigadores la posibilidad de análisis y búsqueda de blancos intracelulares. Su principal ventaja es la obtención de grandes cantidades de moléculas,

con pureza mayor al 90%, asegurando su actividad intrínseca y no relacionada con factores externos, como su variabilidad estructural o la presencia de otros componentes (109).

Muchos de estos compuestos sintéticos han partido de moléculas naturales con actividad biológica importante. Por esta razón, la articulación entre el conocimiento etnofarmacológico y el desarrollo de medicamentos, juega un papel importante en la optimización de nuevas alternativas terapéuticas.

### **1.9 Aproximación a modos de acción de los compuestos leishmanicidas**

Descubrir y desarrollar un medicamento implica encontrar un compuesto con actividad biológica, selectivo, biodisponible y no tóxico. Ese proceso conlleva al estudio, no solo de la actividad antileishmanial en modelos *in vitro* e *in vivo*, sino también a la dilucidación de posibles modos de acción, los cuales pueden conllevar al descubrimiento de blancos terapéuticos y el desarrollo de fármacos selectivos y seguros (22).

Diferentes investigaciones apuntan a la elucidación de mecanismos de acción por métodos,es que incluyen el estudio de las proteínas afectadas por el tratamiento con diferentes compuestos, métodos para determinar el daño fisiológico del parásito y la descripción de la modulación del sistema inmune del huésped (84,103,110) . Estas herramientas además de ser útiles para describir el comportamiento del compuesto no solo sobre el parásito, sino también en la célula blanco, también pueden conllevar a la explicación e identificación de proteínas blancos de las moléculas activas, la susceptibilidad o resistencia a medicamentos antileishmaniales y la modulación a nivel molecular de la célula blanco (88,111).

Por esta razón, se han podido describir los efectos a nivel fisiológico y molecular de moléculas con actividad antileishmania e inmunomoduladora, tanto en el parásito como en la célula blanco de infección (112,113). Uno de los modos descritos es la modulación del sistema inmune, asociado con el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno, la estimulación de la respuesta inmune Th1 y el consecuente daño de la membrana mitocondrial del parásito, por medio de la inhibición de proteínas que actúan como defensa frente a agentes externos (84).

De igual manera, también se ha evidenciado que diferentes moléculas intervienen en la disminución del nivel de ATP, el cual aumenta la apoptosis y conlleva al estrés oxidativo, seguido de la fragmentación de DNA, causando la muerte del parásito; la descripción del mecanismo previamente mencionado determina el papel de algunos organelos esenciales en la muerte celular programada (apoptosis) de *Leishmania*, así como el diseño de medicamentos antiparasitarios, cuyo blanco terapéutico sea la maquinaria mitocondrial del protozoo (114,115).

La sitamaquina, un candidato antileishmanial usado en el tratamiento de leishmaniasis visceral (ensayos clínicos etapa III), ha sido estudiado en profundidad para determinar su mecanismo de acción. Dicha acción se enfoca en la interacción con fosfolípidos de membrana (aniónica), debido a su carga positiva; su entrada en la membrana se le atribuye a la interacción de la estructura hidrofílica de la molécula con las cadenas acilo (116).

De acuerdo a lo anterior, es de vital importancia la determinación de las propiedades físico-químicas de los compuestos candidatos; ya que el conocimiento de este tipo de determinantes químicos, puede conllevar a la aproximación del efecto de los compuestos sobre estructuras específicas del hospedero o patógeno. La comprensión de las propiedades del sistema (célula infectada-compuesto) y las características propias del compuesto antileishmanial, pueden dar información relevante acerca de los mecanismos de acción de los compuestos candidatos y el inicio al desarrollo de compuestos líderes (cabezas de serie), que conllevarán a la optimización de estos potenciales candidatos terapéuticos(117,118).

Hay que mencionar que uno de los mayores retos en el desarrollo de medicamentos para el tratamiento de enfermedades causadas por patógenos intracelulares es el diseño de fármacos con especificidad por el patógeno intracelular y seguridad frente a la célula hospedera. En este sentido, es necesario el aporte desde todas las áreas de investigación (farmacéutica, biológica y bioquímica, entre otras), ya que la actividad de los compuestos no solo depende de sus características físicoquímicas y farmacológicas, sino también de propiedades bioquímicas de los sistemas biológicos en donde se va a aplicar este tratamiento.

Dentro de las indicaciones de varias entidades mundiales, incluidas la OMS, la iniciativa para el desarrollo de medicamentos contra enfermedades desatendidas DNDi, entre otras,

se han propuesto estrategias para el desarrollo de medicamentos antiparasitarios. Estas estrategias, se dividen en varias fases de desarrollo (22):(1) Ensayos de tamizaje, basados en la evaluación de la actividad de moléculas cabezas de serie (hits), los cuales resultan en la determinación de blancos moleculares desde diversos campos de acción (biológico, químico y farmacéutico) y la aproximación a: (i) su mecanismo de acción, (ii) Expansión de moléculas Hits, (iii) optimización de compuestos hits, en donde se tienen en cuenta las propiedades farmacológicas de la molécula (Administración, Distribución, Metabolismo y Eliminación-ADME, farmacocinética, toxicología y farmacodinámica) por medio de ensayos *in vivo* y (iv) finalmente ensayos clínicos, los cuales se basan en la evaluación de seguridad y efectividad de la molécula candidata en pacientes con la enfermedad(22,119).

Desde esta perspectiva, es necesario conocer las propiedades físico-químicas de cada uno de los candidatos terapéuticos (de los compuestos antileishmaniales), ya que sumadas a las propiedades bioquímicas de la membrana, se puede establecer el nivel de permeabilidad de las moléculas a través de los sistemas biológicos evaluados. El potencial de acción de candidatos terapéuticos podría estar relacionado a la capacidad de atravesar diferentes barreras biológicas, dadas en el contexto del macrófago como célula hospedera, vacuola parasitófora (lugar de diferenciación y sobrevivencia del parásito) y el amastigote intracelular (blanco terapéutico específico) (120,121).

Dado que el mecanismo de transporte más frecuente de diferentes tipos de moléculas (nutrientes, pequeñas proteínas o xenobióticos) para atravesar las membranas celulares y cumplir con procesos celulares es la difusión pasiva (Yang & Hinner, 2015). Los factores que determinan en mayor parte, la migración o el paso de los compuestos a través de las membranas celulares, se deben a los determinantes propios de las moléculas (propiedades físico-químicas) (122). Estas propiedades fisicoquímicas son la lipofilicidad (LogP o LogD), tamaño molecular y polaridad (carga contribuye a la atracción o repulsión del compuesto a través de la superficie de la membrana) de los compuestos(121) .

En estudios previos, nuestro grupo de investigación demostró que compuestos naturales de tipo triterpenoide y limonoide, derivados de *Raputia heptaphylla* tuvieron actividad antileishmanial (13–15). El compuesto tipo limonoide (11 $\alpha$ ,19 $\beta$ -dihydroxy-7-acetoxy-7-de-oxoichangina) mostró actividad inmunomoduladora frente a células dendríticas infectadas, aumentando la expresión de moléculas involucradas en la presentación antigénica (CD83

y HLA-DR), la producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-12p e INF- $\gamma$ ) y la expresión de quemoquinas importantes en la respuesta inmune (RANTES y MCP-1). Mientras que el alcaloide quinolónico (N-metil-8-metoxi-flindersina) tuvo un efecto directo en promastigotes, amastigotes axénicos y amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* (15). Sin embargo, debido a las dificultades propias de los compuestos naturales (extracción, rendimientos y homogeneidad del compuesto), el presente trabajo se basó en la evaluación de actividad y posterior mecanismo de acción de moléculas de origen sintético, que tuvieran estructuras y actividades similares a las de estos dos compuestos naturales.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Identificar la actividad *In vitro* e *In vivo* frente a la infección por *L. (V.) panamensis*, así como la aproximación al modo de acción de compuestos análogos a 11 $\alpha$ ,19 $\beta$ -dihydroxy-7-acetoxy-7-de-oxoichangina y N-metil-8-metoxiflindersina.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Identificar compuestos análogos al triterpenoide 11 $\alpha$ ,19 $\beta$ -dihydroxy-7-acetoxy-7-de-oxoichangina y alcaloide quinolínico N-metil-8-metoxiflindersina y sus propiedades físico-químicas, por medio de herramientas bioinformáticas.
2. Evaluar la citotoxicidad y actividad antileishmanial de los compuestos análogos estructurales en promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis*; así como su eficacia *In vivo* (*Mesocricetus auratus*).
3. Evaluar el efecto de los análogos estructurales que tienen actividad antileishmania en la respuesta microbiciada mediada por ON, ROS, HLA-DR, CD80, CD83 Y citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos infectados con *L. (V.) panamensis*.
4. Explorar el efecto de los análogos estructurales que tienen actividad antileishmania en estructuras parasitarias esenciales para su sobrevivencia (Membrana celular, núcleo, mitocondrión y kinetoplasto).
5. Determinar el perfil protético de los amastigotes intracelulares tratados o no con el compuesto elegido.

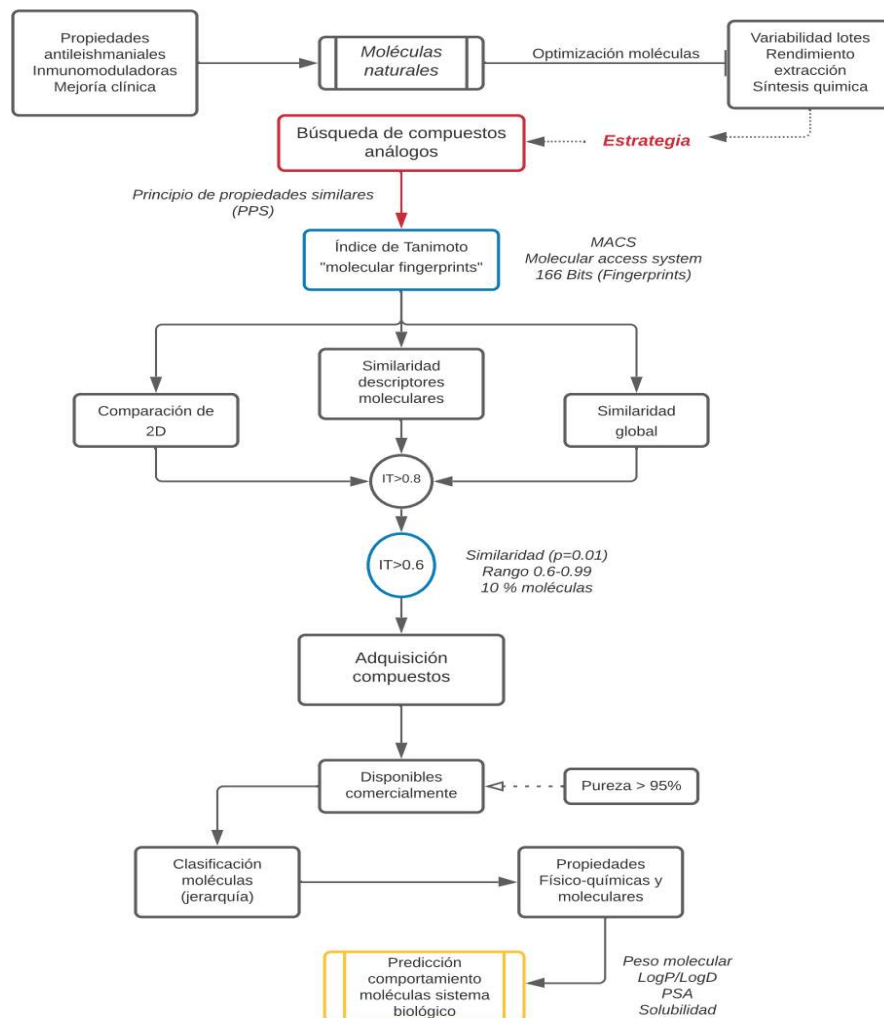
### **3 Evaluación *In silico***

La búsqueda de nuevos medicamentos para el tratamiento de la leishmaniasis, cobra importancia, debido a la prevalencia e incidencia de la enfermedad en Colombia. Una de las estrategias usadas dentro del diseño racional de medicamentos, es la búsqueda de activos con propiedades similares, que puedan convertirse en moléculas líderes, para su optimización y utilidad proyectada como potencial medicamento antileishmanial (123).

Una de las estrategias que apoyan este diseño de medicamentos, es la búsqueda de moléculas a partir compuestos líderes "lead", tomando como medida, coeficientes de similaridad, así como la identificación de propiedades físico-químicas, que favorecen el tipo de formulación y la eficacia terapéutica (124). Por esta razón, en este proyecto, se realizó la búsqueda racional de moléculas sintéticas, análogas estructuralmente (sub-estructuras, topologías y sistemas de anillos) a compuestos naturales previamente identificados por el Grupo de investigación en Inmunotoxicología (15,85) (Figura 5).



### 3.1 Diseño experimental

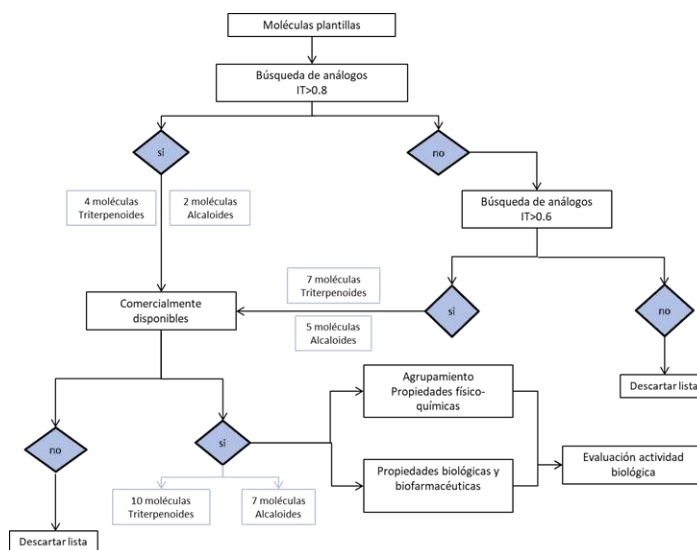


**Figura 5.** Diagrama de flujo del diseño experimental para búsqueda de moléculas análogas a los compuestos naturales de tipo triterpenoides y alcaloides quinolínicos.

### 3.2 Metodología

#### 3.2.1 Selección de compuestos análogos sintéticos tipo triterpenoides y alcaloides quinolínicos

Para la selección de compuestos análogos, se realizó la búsqueda de compuestos siguiendo un diseño metodológico que contempló todas las dificultades de obtención de estas moléculas.



**Figura 6.** Diagrama de Flujo de la búsqueda de compuestos triterpenoides y alcaloides quinolínicos sintéticos

Los compuestos de origen natural (**1**)  $11\alpha$ - $19\beta$ -dihidroxi-7-acetoxi-7-deoxoichangina (11'-(furan-3-yl)-4-hydroxy-5'-(2-hydroxypropan-2-yl)-2',10'-dimethyl-12',15' dioxaspiro[oxane - 3,6'-tetracyclo[8.5.0.0<sup>1</sup>,<sup>14</sup>.0<sup>2</sup>,<sup>7</sup>]pentadecane]-3',6,13'-trione) (Triterpeno-limonoide) y (**12**) N-metil-8-metoxiflindersina (7-methoxy-2,2-dimethyl-2H,5H,6H-pyrano[3,2-c]quinolin-5-one) (Alcaloide quinolínico), fueron usados como plantilla de comparación estructural. En las bases de datos químicas ChemSpider, PubChem y ZincDatabase, fueron puestos los códigos SMILES de cada una de las moléculas y las estructuras fueron revisadas manualmente, para su correspondiente comparación con los compuestos sintéticos (Figura 5 y 6).

### 3.2.2 Medida de comparación entre estructuras

El método de comparación usado para seleccionar los compuestos se basó en el principio de propiedad de similaridad (PPS), a partir de descriptores moleculares (Sub-estructuras, sistema de anillos, topologías). El descriptor seleccionado para cuantificar la similaridad fue el coeficiente de similaridad de Tanimoto, el cual compara las estructuras en dos dimensiones, por medio de la proximidad entre bits (MACS) (Maggiora, Vogt, Stumpfe, & Bajorath, 2014).

En primera instancia, se seleccionaron los compuestos con índices de Tanimoto (similaridad)  $IT > 0.8$ , sin embargo se amplió el rango de similaridad a  $IT > 0.6$ , debido a

posibilidad de encontrar moléculas activas, disponibles comercialmente y con estructuras próximas a las moléculas de referencia (Martin, Kofron, & Traphagen, 2002) (Figura 5).

### 3.2.3 Clasificación y análisis estructural de los compuestos análogos

Se realizó la descripción estructural de los compuestos químicos y se clasificaron de acuerdo al análisis por agrupamiento de jerarquía, por medio del uso de la herramienta bioinformática *Chemmine Tools clustering* (<http://chemmine.ucr.edu/tools/Clustering/>). Este análisis se basa en la correlación de similaridad y propiedades físico-químicas, donde valores cercanos a 0 predicen estructuras similares y valores cercanos a 1, representan poca similaridad entre estructuras.

En contexto, cada una de las estructuras químicas, fue representada en formato SMILES, teniendo cuidado en la anotación correcta de grupos funcionales, así como en la presencia de enlaces C-C, C-H y C-N. Después de esto, se seleccionó la herramienta Clustering para determinar el agrupamiento para cada tipo de compuestos (triterpenoides y alcaloides quinolínicos).

### 3.2.4 Determinación de propiedades Físico-químicas de los compuestos

A los compuestos previamente seleccionados, les fueron calculados sus propiedades físico-químicas por medio de la búsqueda en la base de datos ChemSpider. Para esto, se definieron las siguientes propiedades: coeficiente de partición (CLogP), coeficiente de partición dependiente de pH (LogD), peso molecular (MW), pKa, área de superficie polar (PSA) y solubilidad en agua 25°C(mg/mL), de cada uno de ellos. Estas propiedades fueron analizadas, para plantear el comportamiento de las moléculas en el sistema biológico a evaluar (Guo & Shen, 2009; Lee et al, 2016).

## 3.3 Resultados

### Búsqueda de compuestos sintéticos análogos de las moléculas naturales de tipo triterpenoides y alcaloides quinolínicos

Se usó como método de comparación y selección de compuestos similares entre estructuras en 2D el Índice de Tanimoto (IT), que se basa en la medición entre la distancia

y similitud de dos superestructuras a través de bits adjudicados por el mismo software bioinformático (125), Este método de comparación se basa en la proximidad entre bits (valores adjudicados por la herramienta a cada componente estructural). El valor usado como límite de búsqueda en principio fue  $IT > 0,8$ , tomando como parámetros de selección, la similitud de estructuras y la disponibilidad comercial de las moléculas.

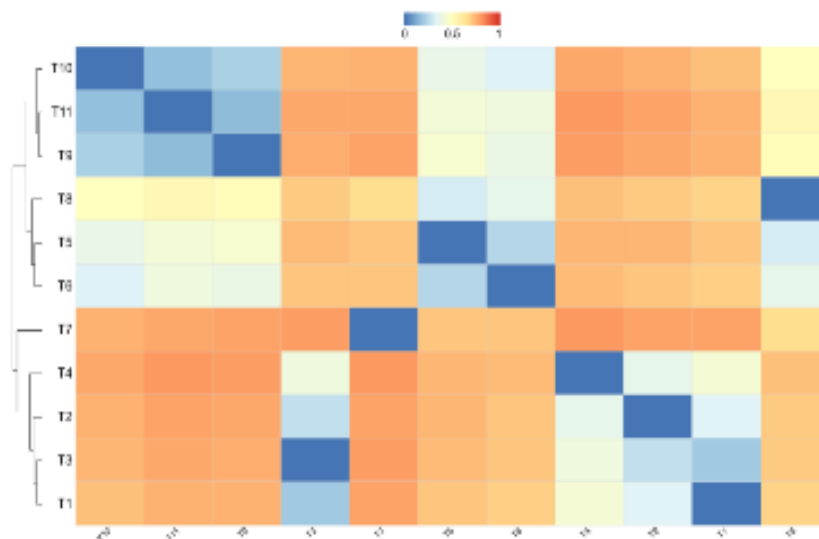
Para esto, se realizó la búsqueda de compuestos en librerías químicas como PubChem, ChemSpider y ZincDatabase, basado en el índice de similitud IT (126). Se propuso escoger moléculas con  $IT > 0.8$ , que cumplieran específicamente con su disponibilidad comercial y porcentaje de pureza  $> 95\%$ . Sin embargo, durante esta primera búsqueda, resultaron 12 moléculas triterpenoides y 2 alcaloides, de las cuales solo 4 triterpenoides y los 2 alcaloides quinolínicos, cumplían con los criterios definidos. Por esta razón, y basándonos en el principio de similitud entre estructuras (se respeta la estructura núcleo de la molécula plantilla)(125), se estableció éste, como nuevo criterio  $IT > 0.6$ , para obtener mayor número de moléculas similares y disponibles comercialmente. Después de esta decisión, la búsqueda arrojó un total de 78 moléculas triterpenoides y 25 alcaloides quinolínicos, de las cuales, se seleccionaron 7 triterpenoides y 5 alcaloides, que cumplieron con el criterio previamente establecido.

### 3.3.1 Selección de compuestos análogos de tipo triterpenoide

Basado en lo anterior, las moléculas seleccionadas fueron: Triterpenos:  $11\alpha$ ,  $19\beta$ -dihydroxy-7-acetoxy-7-de-oxoichangina (compuesto plantilla) (**1**), Nomilina (CAS: 1063-77-0) (**2**), Limonina (CAS: 1180-71-8) (**3**), Gedunina (CAS: 2753-30-2) (**4**), ácido oleanólico (**5**), ácido ursólico (CAS: 77-52-1) (**6**), Amonio de glicirricina (CAS: 53956-04-0) (**7**), ácido  $18\beta$ -glicirretínico (CAS: 471-53-4) (**8**), Lupeol (CAS: 545-47-1) (**9**), Betulina (CAS: 18211-63-7) (**10**), ácido betulínico (CAS:472-15-1) (**11**). En este sentido, se encontraron moléculas triterpenoides, disponibles comercialmente (Sigma-Aldrich, NY, USA y SantaCruz Biotechnology, (Santacruz Biotechnology, CA, USA).

La clasificación de los triterpenoides se realizó de acuerdo con la matriz de agrupamiento por jerarquía. En este sentido, los compuestos se clasificaron en cuatro grupos definidos de esta manera: limonoides, pentacíclicos, lupanos y saponina. De acuerdo con la matriz de jerarquía por agrupamiento, los compuestos triterpenoides se clasificaron en cuatro grupos: limonoides (compuestos **1**, **2**, **3** y **4**), pentacíclicos (**5**, **6** y **8**), Lupanos (**9**, **10** y **11**)

y saponina (7). En este sentido, se puede observar la similitud entre los grupos pentacíclicos y lupanos (Z value), mientras que los limonoides son altamente similares entre ellos mismos, pero no frente a los demás grupos evaluados. Este comportamiento, también se observa con la saponina, ya que la matriz demuestra la di-similaridad con todos los grupos triterpenoides (Figura 7).



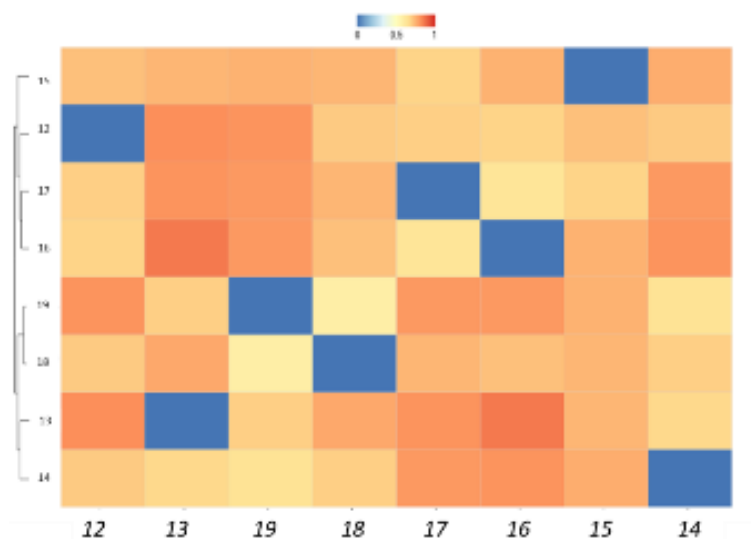
**Figura 7.** Matriz de agrupamiento y clasificación por jerarquía de compuestos triterpenoides. Matriz de clasificación según similitud de compuestos. Eje Y= dendrograma de agrupamiento de compuestos vs. Eje X= compuestos. Color azul: Mayor similitud estructural. Color rojo: Menos similitud estructural.

El grupo limonoide está compuesto por los compuestos **1**, **2**, **3** y **4**. Estos se caracterizan por ser compuestos heterocíclicos, con presencia de un anillo furano en C17, anillo pirano (anillo D) y grupos epoxi en C10 y C15. Las diferencias entre estos radican en la modificación del anillo A y la presencia de grupos oxigenados de tipo carboxilo. El grupo de triterpenoides pentacíclicos está conformado por los compuestos **5**, **6** y **8**. Estos compuestos, tienen estructuras pentacíclicas de 5 anillos y la presencia de grupos oxigenados en el C-21 de la estructura. Los lupanos están conformados por los compuestos **9**, **10** y **11**. Estos compuestos también se pueden identificar por ser heterocíclicos de 5 anillos, de tipo esterol. La diferencia entre estos compuestos se basa en la presencia de grupos oxigenados en C1-C12 y C5. Finalmente, el triterpenoide saponina está conformado por una molécula aglicona (ácido  $18\beta$ -glicirretínico) y un dímero D-glucorónico, por la unión glicosídica en C3. La matriz de jerarquía muestra la di-similaridad con los demás grupos evaluados (Tabla 1).

Por otra parte, se encontraron 12 moléculas tipo alcaloides quinolínicos, con  $IT > 0.8$ , de los cuales, 2 alcaloides quinolínicos se pudieron adquirir comercialmente. Teniendo en cuenta la limitación de encontrar análogos comercialmente disponibles, se buscaron moléculas similares con  $IT > 0.6$ , aumentando la probabilidad de encontrar compuestos comerciales. En este sentido, se encontraron 5 alcaloides quinolínicos disponibles comercialmente (Sigma-Aldrich, NY, USA y SantaCruz Biotechnology, Santacruz Biotechnology, CA, USA).

Alcaloides quinolínicos: N-metil-8-metoxiflindersina (**12**), 1,2,3,4-tetrahidro(Benzo)-3-quinolin-ol (CAS: 5423-67-6) (**13**), 4-metil-2-(1H)-quinolinone (CAS: 84909-43-3) (**14**), ácido carboxílico 2-etil-3-propil-4-quinolínina (CAS: 74960-58-0) (**15**), 4,7,8-trimetoxifuro [2,3-b]-quinolina (CAS: 5255-76-5) (**16**), ácido carboxílico-7,8-tetrahidro-quinolina (CAS: 895966-42-4) (**17**), 3,4-dimetil-3H-imidazol [4.5f]-quinolin-2-amina (CAS: 77094-11-2) (**18**) y 2-amino-8-hidroxiquinolina (CAS: 70125-16-5) (**19**), fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (MO, USA) y SantaCruz Biotechnology (CA,USA).

Al analizar la matriz de agrupamiento de alcaloides quinolínicos, se identificaron tres grupos principalmente: Grupo 1 (compuestos **12**, **15**, **16** y **17**), Grupo 2 (compuestos **13** y **14**) y Grupo 3 (compuestos **18** y **19**) (Figura 8).



**Figura 8.** Matriz de agrupamiento por jerarquía de compuestos alcaloides quinolínicos. Matriz de clasificación según similitud de compuestos. Eje Y= dendograma de agrupamiento de compuestos vs. Eje X= compuestos. Color azul: Mayor similitud estructural. Color rojo: Menos similitud estructural

Según la matriz de agrupamiento de jerarquía, se pudo observar la di-similaridad entre los compuestos de los grupos y entre grupos de alcaloides. Este tipo de moléculas se caracterizan por tener en su esqueleto central al 1-azanaftaleno y sustituyentes en los carbonos de la estructura (Tabla 3).

### 3.3.2 Propiedades físico-químicas de compuestos sintéticos y naturales

Las propiedades físico-químicas y estructurales de los compuestos suponen un punto de inicio para la búsqueda y desarrollo de nuevos medicamentos, toda vez que estos predicen el comportamiento del nuevo medicamento, en el organismo. Por ello, se realizó el análisis de las propiedades estructurales como: peso molecular (g/mol), coeficiente de partición de especies neutras (LogP), coeficiente de partición de especies ionizadas a pH 7.4 (LogD pH 7.4), área de superficie polar (PSA), coeficiente de ionización (pKa) y solubilidad acuosa (mg/mL).

Teniendo en cuenta lo anterior, el grupo de limonoides mostró pesos moleculares similares entre 400-500 g/mol, así como coeficientes de partición  $\text{LogP} > 1$ . La superficie de área polar (interacción con moléculas de agua) mostrada por los limonoides es cercano a 100 amstrongs, resultando en la solubilidad de estos en medios acuosos.

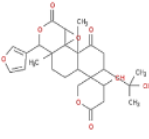
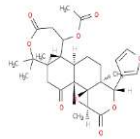
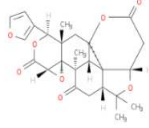
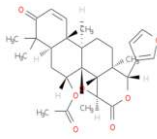
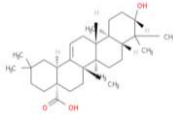
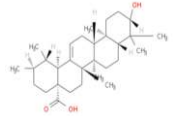
Los compuestos pentacíclicos y lupanos mostraron valores de  $\text{LogP} > 5$ , sugiriendo una alta permeabilidad; las características están relacionadas con el PSA ( $\text{PSA} < 60$ ) el cual sugiere una pobre interacción con moléculas de agua y con la baja solubilidad de cada uno de estos triterpenoides (lipofílicos). Contrario a los demás triterpenos, el compuesto **7** mostró características poco lipofílicas ( $\text{LogP} < 1$ ) e hidrofílicas (Tabla 3).

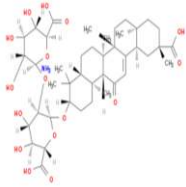
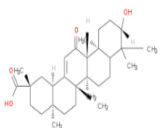
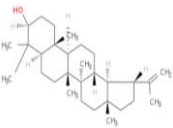
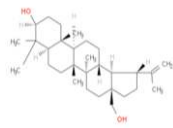
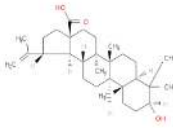
Respecto a los alcaloides, al analizar las propiedades físico-químicas de los quinolínicos, se pudo observar que todos los compuestos presentaron  $\text{LogP} > 1$  y  $< 4$ . Dentro del grupo 1, se evidenció que la molécula plantilla **12**, presentó propiedades similares a los demás compuestos de este grupo: una solubilidad moderada, disminuyendo su lipofilidad en ambientes de carácter ácido. Al comparar la molécula **12** con los compuestos del grupo 2, no se evidencian diferencias entre las propiedades de estas moléculas (Tabla 4).

Finalmente, se analizaron las moléculas con sustituyentes nitrogenados en su estructura y se observó que éstas, presentan LogP menores a la molécula plantilla y los demás compuestos quinolínicos. Estas diferencias, se pueden deber a la presencia de grupos imidazol y aminos, los cuales disminuyen el carácter lipofílico de los compuestos (Tabla 4).



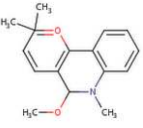
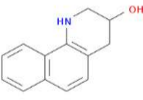
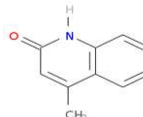
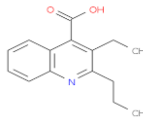
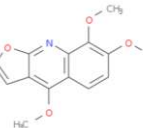
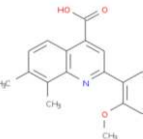
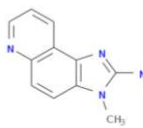
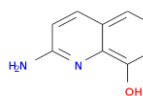
**Tabla 3.** Descripción estructural, de clasificación y físico-química de compuestos naturales y sintéticos triterpenoides

Compuesto	IT	Grupo	Estructura	Peso molecular (g/mol)	PSA	LogP	LogD pH 7,4	Solubilidad
1	N.A			564,58		1,37	2,39	Soluble
					135,8			
2	0,975			514,56	121,6	3	2,66	Moderadamenre soluble
		<b>Limonoides</b>						
3	0,983			470,52	104,6	2,54	1,6	Soluble
4	0,893			482,57	93,3	3,7	3,57	Moderadamenre soluble
5	0,762			456,51	57,3	6,1	5,9	Poco soluble
		<b>Pentacíclico</b>						
6	0,762			456,7	57,3	5,9	5,88	Poco soluble

Compuesto	IT	Grupo	Estructura	Peso molecular (g/mol)	PSA	LogP	LogD pH 7,4	Solubilidad
7	0,6	Saponina		822,93	270,8	0,4	-2,06	Moderadamenre soluble
8	0,721	Pentacíclico		470,68	74,6	5,1	3,18	Poco soluble
9	0,7			426,72	20,3	7,2	9,41	Poco soluble
10	0,68	Lupanos		442,73	57,5	6,1	7,7	Poco soluble
11	0,63			456,7	40,4	6,3	5,1	Poco soluble

**Propiedades Físico-químicas de compuestos triterpenoides.** IT (índice de similaridad-Tanimoto). Grupo (clasificación según sub-estructuras). PSA (Área de superficie polar). LogP (Coeficiente de partición especies no ionizadas). LogD pH 7.2 (Coeficiente de partición especies ionizadas). Solubilidad en agua.

**Tabla 4.** Descripción estructural, de clasificación y físico-química de compuestos naturales y sintéticos alcaloides quinolínicos

Compuesto	IT	Grupo	Estructura	Peso molecular (g/mol)	PSA	LogP	LogD pH 7,4	Solubilidad
12	N.A	1		241,29	31,23	2,65	2,73	Moderadamente soluble
13	0,731	2		199,25	32,26	2,11	2,63	Moderadamente soluble
14	0,724			159,18	32,86	1,97	2,04	Soluble
15	0,791	1		243,39	50,19	2,98	2,33	Moderadamente soluble
16	0,821			259,26	53,72	2,58	2,34	Moderadamente soluble
17	0,8			307,34	59,42	3,4	1,65	Moderadamente soluble
18	0,67	3		198,22	56,73	1,41	1,73	Soluble
19	0,704			160,17	59,14	1,33	1,09	Soluble

**Propiedades Físico-químicas de compuestos alcaloides quinolínicos.** IT (índice de similaridad-Tanimoto). Grupo (clasificación según sub-estructuras). PSA (Área de superficie polar). LogP (Coeficiente de partición especies no ionizadas). LogD pH 7.2 (Coeficiente de partición especies ionizadas). Solubilidad en agua.

### 3.4 Discusión

De acuerdo con los antecedentes de las moléculas naturales, las cuales incluyen actividad frente a *Leishmania* spp, así como en su efecto inmunomodulador en células dendríticas humanas (14,15), se estableció el camino para identificar posibles compuestos con características estructurales similares, sintéticos y con porcentajes de pureza >95 %.

De acuerdo a esto, se seleccionaron moléculas de origen natural usadas como patrón de comparación. Una de las plantillas fue el compuesto 11 $\alpha$ ,19 $\beta$ -7- acetoxi-7-deoxoichangina (**1**) (Figura 3), que pertenece al grupo de tetranortriterpenoide (Limonoides); su estructura central se basa en el esqueleto carbonado de 4 heterociclos, acompañados de un grupo furano y la presencia de abundantes grupos oxigenados (Tabla 3). La otra plantilla usada fue la del compuesto N-metil-8-metoxiflindersina (**12**) (Figura 4), el cual pertenece al grupo de alcaloides quinolínicos, conteniendo en su estructura un anillo quinolínic, junto con sustituyentes cíclicos y alifáticos, los cuales fueron aislados de la planta *Raputia Heptaphylla* (127).

Para identificar moléculas con estructuras similares, se usó el coeficiente de distancia, llamado índice de Tanimoto o Jaccard, el cual cuantifica el grado de diferencia entre dos compuestos o estructuras químicas (128) usado ampliamente en la química medicinal como método de comparación de descriptores moleculares (126); este índice se basa en el principio de propiedades similares (PPS) y su estrategia se enfoca en la comparación global de estructuras (sub-estructuras, características estructurales); lo que amplía la probabilidad de encontrar moléculas que pueden compartir núcleos estructurales(126,129). Como punto referencia, se compararon las estructuras en 2D, debido a la facilidad para identificar los heterociclos fundamentales y los sustituyentes (excluyendo los grados de libertad y flexibilidad) de las estructuras (130).

Aunque en principio la selección se llevó a cabo a partir de IT>0.8 ( en donde se encontraron moléculas con alta similaridad, pero no disponibles comercialmente), se tomaron en cuenta los estudios bioinformáticos realizados por Martin, C en 2002 y Eckert,H en 2007, en donde sugieren un rango entre IT>0.6 - IT>0.99, para la búsqueda de la mayoría de compuestos con algún tipo de cercanía estructural (al menos 10% de moléculas similares bajo los predictores MCCS)(131,132); por esta razón se amplió el rango de selección a IT>0.6, en

---

donde fue posible la identificación de compuestos que cumplieran con los criterios de selección (Tabla 3-Tabla 4).

Bajo este rango de selección, se identificaron dentro de los compuestos triterpenoides 10 moléculas clasificadas dentro de 4 subgrupos: limonoides, pentacíclicos, lupanos y saponinas, las cuales comparten la estructura central de la plantilla. Para los alcaloides quinolínicos se establecieron 3 grupos principales, para las 8 moléculas disponibles con anillos quinolínicos similares entre ellos (Tabla 3).

Las propiedades de los medicamentos comprenden las características estructurales, físico-químicas, bioquímicas y farmacocinéticas (PK)(76,133). Partiendo del objetivo de encontrar moléculas que pudieran afectar a diversos blancos terapéuticos del parásito intracelular, que está protegido por varias membranas celulares (macrófago, vacuóla parasitófora y membrana celular del parásito), y su uso terapéutico por medio de un tratamiento de administración tópica, nos basamos en las propiedades estructurales y físico-químicas, como una primera aproximación a su modo de acción, de manera predictiva.

Dentro de las propiedades estructurales, el tamaño de la molécula, el MW, el PSA y la lipofilicidad, teniendo como parámetro CLogP y CLogD pH7,4, juegan un papel determinante en el paso del compuesto a través de membranas celulares (134), ya que moléculas relativamente pequeñas MW<500 g/mol y lipofílicas LogP y LogD>1y <5, pueden permear membranas celulares por medio de difusión pasiva y actuar directamente sobre componentes internos, que estaban retenidos por esa membrana bilipídica (135).

La solubilidad cumple un papel relevante en la forma de dispensación de los compuestos en los ensayos *In vitro* e *In vivo*, ya que de esta, depende la tasa de disolución de la molécula en ambientes acuosos, así como el gradiente de concentración de moléculas libres, en un ambiente rodeado de células y por ende, su actividad (133,136). Esta propiedad (solubilidad), se relaciona con el nivel de lipofilicidad y el coeficiente de partición, las cuales son propiedades indispensables para el tipo de formulación usada en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea; ya que se ha definido que moléculas con bajo peso molecular, LogP >1 y <5 y solubles en ambientes oleosos, permiten la absorción de la molécula a través de la piel (9,71).

De acuerdo con lo anterior, los subgrupos de los triterpenoides, tienen diferentes solubilidades, ya que solo el grupo limonoide y saponina (debido a su sal de amonio), son solubles o moderadamente solubles en ambientes acuosos (133), mientras que el grupo pentacíclico y lupano muestran baja solubilidad en agua (soluciones acuosas)(133,136,137). Esto indica, que para los lupanos y pentacíclicos, es necesario el uso de solventes (DMSO) que faciliten esta tasa de disolución en los ensayos *in vitro*.

Para los alcaloides se observó un comportamiento homogéneo, ya que las moléculas son solubles en ambientes acuosos, poseen pesos moleculares  $PM < 500$  g/mlo y  $\text{LogP} > 1$ , sugiriendo que los alcaloides que presenten actividad antileishmanial, podrían ser formulados como tratamiento tópico (138) (Tabla 3-4).

Teniendo en cuenta estos parámetros, la mayoría de los compuestos triterpenoides y alcaloides, cumplen con los requisitos de tamaño molecular  $MW < 500$  g/mol y  $\text{LogP/LogD} > 1$ , sugiriendo un posible paso a través de membranas celulares (difusión pasiva).

Lo anterior, aumentaría las posibilidades de encontrar moléculas activas frente al patógeno intracelular y posiblemente frente a componentes internos de éste. Algunos compuestos triterpenoides de tipo pentacíclico y lupano, poseen  $\text{LogP}$  y  $\text{LogD} > 5$  (Tabla 3), lo que sugiere, no solo su facilidad para permear membranas celulares, sino también la facultad de interactuar con componentes internos de esas membranas, afectando procesos y organelos de manera diferencial [a los demás compuestos (121,139)]. La excepción a estas propiedades, es el compuesto **7** (triterpenoide saponina), ya que posee una estructura compuesta por dos moléculas (aglicona y azúcar), sugiriendo un modo de acción diferencial a las demás moléculas evaluadas, ya que su naturaleza anfifílica puede estar correlacionada con la afectación directa a membranas celulares y su paso restringido al interior de esta barrera (140).

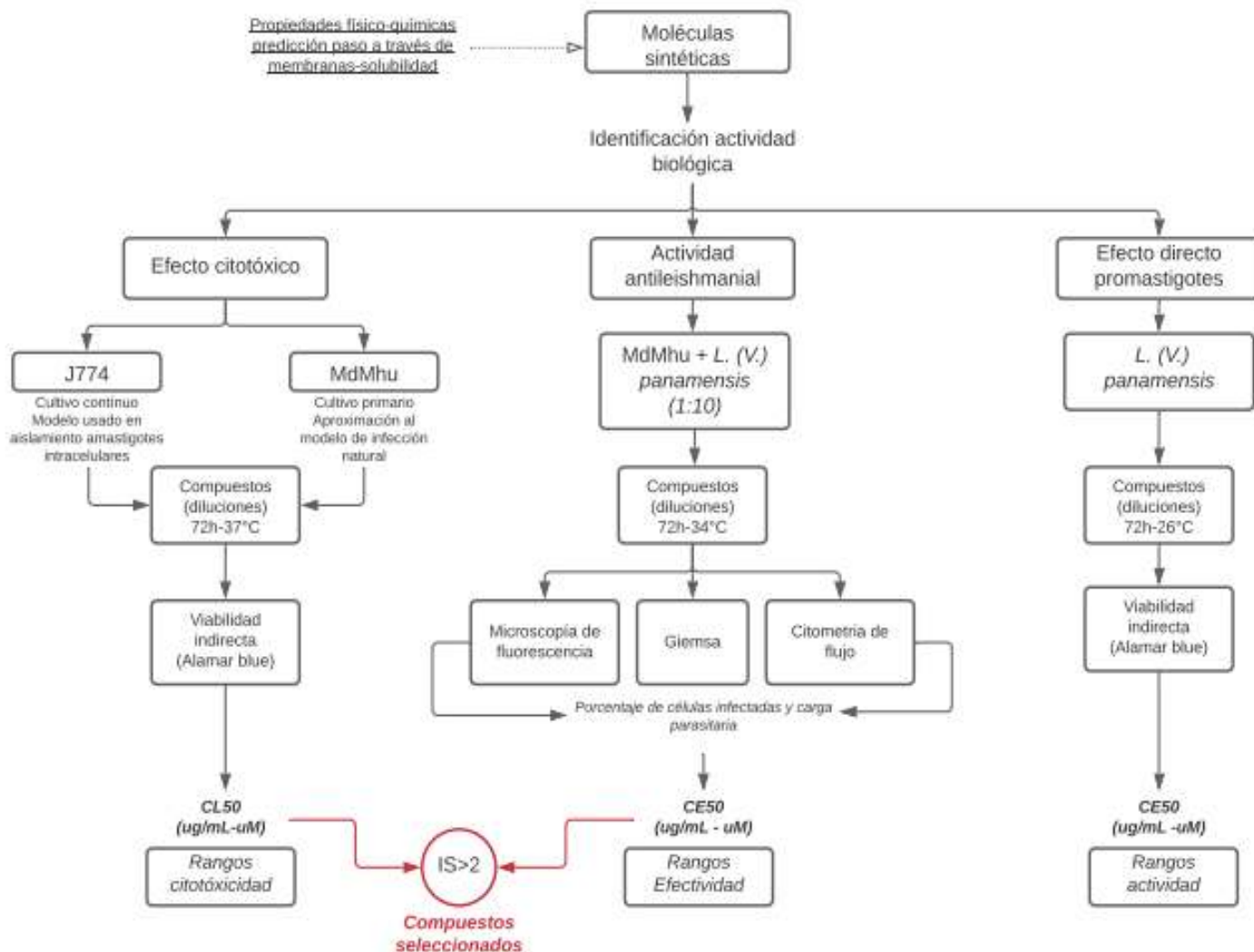
De acuerdo con las características físico-químicas de las moléculas sintéticas, se puede inferir que compuestos con actividad antileishmanial seleccionados (Triterpenos y/o alcaloides), podrían formularse en soluciones o emulsiones semi-sólidas de tipo aceite/agua (O/W), los cuales poseen propiedades que permiten la absorción y liberación de compuestos apolares y polares, en la piel (70,141).

#### **4 Evaluación de la efectividad *in vitro* e *in vivo* de compuestos sintéticos**

El desarrollo de medicamentos contra el parásito, el cual sobrevive en ambientes con bajo pH, dentro de la célula hospedera, resulta difícil. Por esta razón es necesario desarrollar medicamentos que sean capaces de eliminar el parásito en el macrófago o activar esta célula para recuperar las funciones microbicidas bajo-reguladas por la infección (22,123). Por esta razón, se hace necesaria la evaluación de diferentes moléculas en modelos *In vitro*, para definir la actividad biológica y la selectividad de estos compuestos hacia el parásito exclusivamente.

Teniendo en cuenta lo anterior, las moléculas sintéticas adquiridas comercialmente y con sus propiedades físico-químicas identificadas, fueron testeadas para determinar su actividad biológica frente a MdMhu y MdMhu infectados con parásitos de *L. (V.) panamensis* y que de acuerdo con su índice de selectividad, fueron seleccionadas (- solo las moléculas con IS>2) (Figura 9).

## 4.1 Diseño experimental Actividad *In vitro*



**Figura 9.** Diseño experimental de la evaluación *In vitro* de compuestos análogos sintéticos a compuestos a triterpenoides y alcaloides quinolínicos.



---

## 4.2 Metodología

### 4.2.1 Efectividad *in vitro*

#### 4.2.1.1 Parásitos

Los parásitos usados en este trabajo fueron donados por la Doctora Sara Maria Robledo del Programa de Estudios y Control de Enfermedades Tropicales (Universidad de Antioquia-UdeA, Medellín-Colombia) y corresponden a la especie de mayor prevalencia en Colombia, *L. (V.) panamensis* (MHOM/CO/87/UA140), referida en el texto y figuras como *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) panamensis* (MHOM/CO/87/UA140/EGFP) transfectada con la proteína verde fluorescente, referida como *L. (V.) panamensis*. Los parásitos fueron cultivados en medio RPMI-1640 (Gibco, MA, USA), suplementado al 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB) (HyClone, GE HealthCare, LC, UK) a 26°C. Los cultivos fueron monitoreados cada tres días y los parásitos fueron tomados en la fase exponencial (ensayos en promastigotes) y fase estacionaria para la infección *in vitro*.

#### 4.2.1.2 Obtención de macrófagos derivados de monocitos humanos (MdMhu) a partir de la porción leucoplaquetaria (Buffy-coat)

MdMhu derivados de unidades de la porción leuco-plaquetaria (donadas amablemente por el Instituto Distrital de Ciencia, Biotecnología e Innovación en Salud-IDCBIS, Bogotá, Colombia), fueron obtenidos luego de la separación de células mononucleares, por medio de gradiente de densidad (StemCell, Vancouver, Canadá). En detalle, las muestras de sangre fueron centrifugadas a 2200 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos, tiempo al cabo del cual, la capa leuco-plaquetaria (Buffy coat) fue recolectada y diluida (1:1) en solución salina (cloruro de sodio 0.9%) (Baxter, Illinois, USA), para ser colocada (proporción 3:1) en tubos de 15 mL, los cuales contenían 5 mL de Lymphoprerp (StemCell, Vancouver, Canadá). Los gradientes fueron centrifugados durante 30 minutos a 2500 rpm a temperatura ambiente, obteniéndose la capa de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), la cual se centrifugó a 1800 rpm durante 10 minutos y dos lavados a 500 rpm por 15 minutos, para descartar el contenido plaquetario de la muestra.

Finalmente, los PBMCs fueron cultivados en medio RPMI-1640 (Gibco, MA, USA), suplementado al 1 % SFB (Hyclone, GE Healthcare, LC, UK), durante 2 h a 37°C. Pasado este tiempo, se removió la fracción no adherente y se recuperó la fracción adherente por medio del uso de rastrillos (scraper); las células fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Gibco, MA, USA), suplementado 10 % de SFB. El rendimiento y viabilidad celular fueron evaluados por medio del uso de azul de Tripán (Lonza, Basilea, Suiza). Las células fueron contadas en cámara de Neubauer y su número fue ajustado, de acuerdo con los experimentos llevados a cabo posteriormente.

Cabe la pena resaltar que la selección de Mdmh fue determinada por la caracterización de la diferenciación de esta población celular en el tiempo; la cual, fue evaluada por la expresión de marcadores de superficie CD14 acoplado a PerCP-Cy5.5 (Beckton-Dickinson, NJ, USA), HLA-DR acoplado a APC (Beckton-Dickinson, NJ, USA) y CD80 acoplado a FITC (Beckton-Dickinson, NJ, USA) durante 4, 24 y 72 h; por medio de citometría de flujo, en el citómetro de flujo FACS-Canto II (Beckton-Dickinson, NJ, USA).

#### **4.2.1.3 Evaluación de la actividad citotóxica en Mdmh (Macrófagos derivados de monocitos humanos)**

La citotoxicidad de los compuestos triterpenoides y alcaloides quinolínicos, fue evaluada por medio del método indirecto de viabilidad de Resazurina, el cual se basa en la reducción del colorante por medio de enzimas de tipo reductasas al interior de las células, demostrando la actividad metabólica (O'Brien, Wilson, Orton, & Pognan, 2000).

Las células ( $5 \times 10^5$  células/mL) fueron cultivadas en placas de 96 pozos y expuestas a distintas concentraciones de los compuestos de origen natural y sintéticos, durante 72 h a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Para esto, se realizaron diluciones seriadas 1:4 a partir de una concentración stock de 200 µg/mL (Compuestos naturales y sintéticos) y 10 µg/mL (Anfotericina B), por duplicado y al menos 4 diluciones consecutivas. Después de este tiempo, se adicionó solución de rezasurina (4,4 µM/pozo, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) y se incubó durante 4 h a 37°C. Transcurrido este tiempo, se realizó la lectura en espectrofluorómetro a  $\lambda_{exc}$  535 nm y  $\lambda_{em}$  590 nm (Genios, Tecan Group Ltd, Suiza).

Se usaron como controles, células expuestas a dimetilsulfóxido-DMSO (reactivo de solubilización 0,1%, concentración final) y células sin tratamiento. Cada uno de los ensayos, fue realizado por duplicado en seis experimentos independientes.

Al obtener los datos, se realizó el análisis por medio de la eliminación de IMF del medio de cultivo con la normalización de la fluorescencia emitida por células sin tratamiento (Tomado como 100 % de viabilidad) (ver Ecuación 1).

$$\% \text{ viabilidad células tratadas} = \left[ \frac{(IMF \text{ tto} - IMF \text{ Medio}) \times 100}{(IMF \text{ células control} - IMF \text{ medio})} \right] \quad (1)$$

Para determinar las CL<sub>50</sub> (concentraciones letales 50) se usó la regresión no lineal y el ajuste al modelo sigmoideal de máxima respuesta (Log [X]), el cual se representará por curvas concentración-respuesta. Se usó el programa estadístico GraphPad Prism (GraphPad Software, CA, USA). Los datos mostrados en las tablas de resultados se reportan como el promedio de los experimentos realizados y de su desviación estándar.

#### **4.2.1.4 Evaluación de la actividad antileishmanial *in vitro* en promastigotes de *L. (V.) panamensis***

La actividad antileishmanial de los compuestos triterpenoides y alcaloides quinolínicos, fue evaluada por medio del método indirecto de viabilidad de Resazurina, el cual se basa en la reducción del colorante por medio de enzimas de tipo reductasas al interior de los parásitos (si están viable), demostrando la actividad metabólica (O'Brien et al, 2000)

Para esto, se cultivaron  $5 \times 10^6$  promastigotes de *L. (V.) panamensis* los cuales fueron expuestos a diferentes concentraciones de las moléculas naturales y sintéticas (a partir de las CL<sub>50</sub> obtenidas previamente), usando diluciones 1:4 por duplicado, para cada experimento. Se usaron como control positivo anfotericina B, partiendo de concentraciones stock de 5 µg/mL, durante 72 h a 26°C. Se usaron como control negativo, parásitos expuestos a reactivos de solubilización (DMSO) y se realizaron al menos 5 experimentos de manera independiente.

Al cabo del tiempo de incubación se adicionó solución de rezasurina (4,4 uM/pozo, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) y se incubó durante 4 h a 37°C. Transcurrido este tiempo, se realizó

la lectura en espectrofluorómetro a  $\lambda_{exc}$  535 nm y  $\lambda_{em}$  590 nm (Genios, Tecan Group Ltd, Suiza) (ver ecuación 2).

$$[\%mortalidad\ normalizado = \frac{100-(IMF\ muestra-IMF\ medio)\times 100}{IMF\ células\ control-IMF\ medio}] \quad (2)$$

Para lo cual se tuvo en cuenta la fluorescencia de los parásitos sin tratar como el 100 % de viabilidad; a partir de esto, se calcularon los porcentajes de mortalidad de cada una de las propiedades tratadas. Con los datos, se determinaron las concentraciones efectivas 50 de los compuestos ( $CE_{50}$ ). Los datos mostrados en las tablas de resultados se reportan como el promedio de los experimentos realizados y de su desviación estándar.

#### **4.2.1.5 Actividad antileishmanial *in vitro* en amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis***

#### **4.2.1.6 Evaluación de la actividad antileishmanial *in vitro* en amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* por microscopía de fluorescencia**

Macrófagos derivados de Buffy-coat (Mdmh,  $5 \times 10^5$ /mL) RPMI-1640 (Gibco, MA, USA), fueron adheridos por 24 h a 37°C y 5 % de  $CO_2$ . Luego de esto, las células fueron infectadas con promastigotes de *L. (V.) panamensis* en una proporción 10:1 (parásitos:células). Posteriormente, fueron incubados a 36°C, 5 %  $CO_2$  y 4 h después, se removieron parásitos no internalizados, para una segunda incubación a por 24 h a 36°C y 5 % de  $CO_2$ . Pasado este tiempo, los macrófagos infectados fueron expuestos a diferentes concentraciones de los compuestos (1:4) por duplicado, a partir de concentraciones stock de los compuestos (100  $\mu$ g/mL) y anfotericina B (5  $\mu$ g/mL), e incubadas a 36°C al 5 % de  $CO_2$ .

Después de 72 h, las células fueron lavadas con PBS, marcadas con solución 5X de SYBR-SAFE (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) e incubadas durante 1 hora a 36°C y 5 %  $CO_2$ . Las células se observaron por medio de microscopía de fluorescencia (Pérez-Cordero, Sánchez-Suárez, & Delgado, 2011). El porcentaje de células infectadas fue calculado por medio del conteo de al menos 100 células infectadas vs. no infectadas y su correspondiente carga parasitaria. Se usaron como control, macrófagos infectados sin exponer a ningún tratamiento (Ver Ecuación 3).

$$\% \text{ infección tratamiento} = \left[ \frac{\#células\ infectadas \times 100}{\#células\ control} \right] \quad (3)$$

---

Por medio de la regresión no lineal se obtuvieron % infección vs. concentración y de acuerdo con las curvas sigmoidales y el programa GraphPad Prisma, se pudieron calcular las concentraciones efectivas 50 (CE<sub>50</sub>) para cada tratamiento. Los datos mostrados en las tablas de resultados se reportan como el promedio de los experimentos realizados y de su desviación estándar.

#### **4.2.1.7 Evaluación de la actividad antileishmanial *in vitro* en amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* por citometría de flujo**

Macrófagos humanos, derivados de sangre periférica (Mdmh, 10<sup>5</sup>/mL) RPMI-1640 (Gibco, MA, USA) fueron aislados por medio del método Ficoll-Hypaque, usando el reactivo Linfoprep (StemCell technologies, Vancouver, Canadá) a partir de sangre periférica venosa. Después de 72 h post-adhesión, las células fueron infectadas con promastigotes de *L. (V.) panamensis* en una proporción 30:1 (parásitos:células). Posteriormente, fueron incubados a 35°C, 5 % CO<sub>2</sub> y 3 h después, se removieron los parásitos no internalizados por medio de lavados con PBS. Las células se incubaron por 24 h para después ser expuestas a las concentraciones efectivas 50 (CE<sub>50</sub>) de los compuestos previamente seleccionados, e incubadas a 36°C al 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de 72 h las células fueron lavadas con PBS por centrifugación a 1800 rpm durante 5 minutos y analizadas por citometría de flujo (Cytomics FC 500MPL (Brea, CA, USA)).

El porcentaje de células infectadas fue calculado por análisis de dot-plot de acuerdo con los eventos positivos para fluorescencia; la carga parasitaria fue calculada por el análisis de histograma de acuerdo con la intensidad media de fluorescencia (142). Células infectadas y re-suspendidas en medio RPMI-1640 (Gibco, MA, USA) fueron usadas como control de infección (control negativo) y células infectadas y expuestas a anfotericina B, como control positivo.

Los resultados fueron reportados como la CE<sub>50</sub> calculada por análisis Probit. Paralelo a esto, se tomaron alícuotas de cada uno de los tratamientos, se fijaron y se realizó la tinción Giemsa; para contar el número de macrófagos infectados, así como el número de parásitos intracelulares. La actividad antileishmanial fue determinada de acuerdo con la infección (cantidad de parásitos en las células infectadas) obtenidas para cada condición

experimental, de acuerdo con el análisis dotplot para células infectadas e histogramas por intensidad media de fluorescencia (MFI) en parásitos fluorescentes. La inhibición parasitaria fue calculada por medio de la ecuación 1, donde el MFI del control fue usada como 100% de los parásitos (Ver Ecuación 4):

$$\%Inhibición\ de\ la\ infección = 100 - \left[ \frac{MFI\ parásitos\ expuestos}{MFI\ parásitos\ no\ expuestos} \right] \times 100 \quad (4)$$

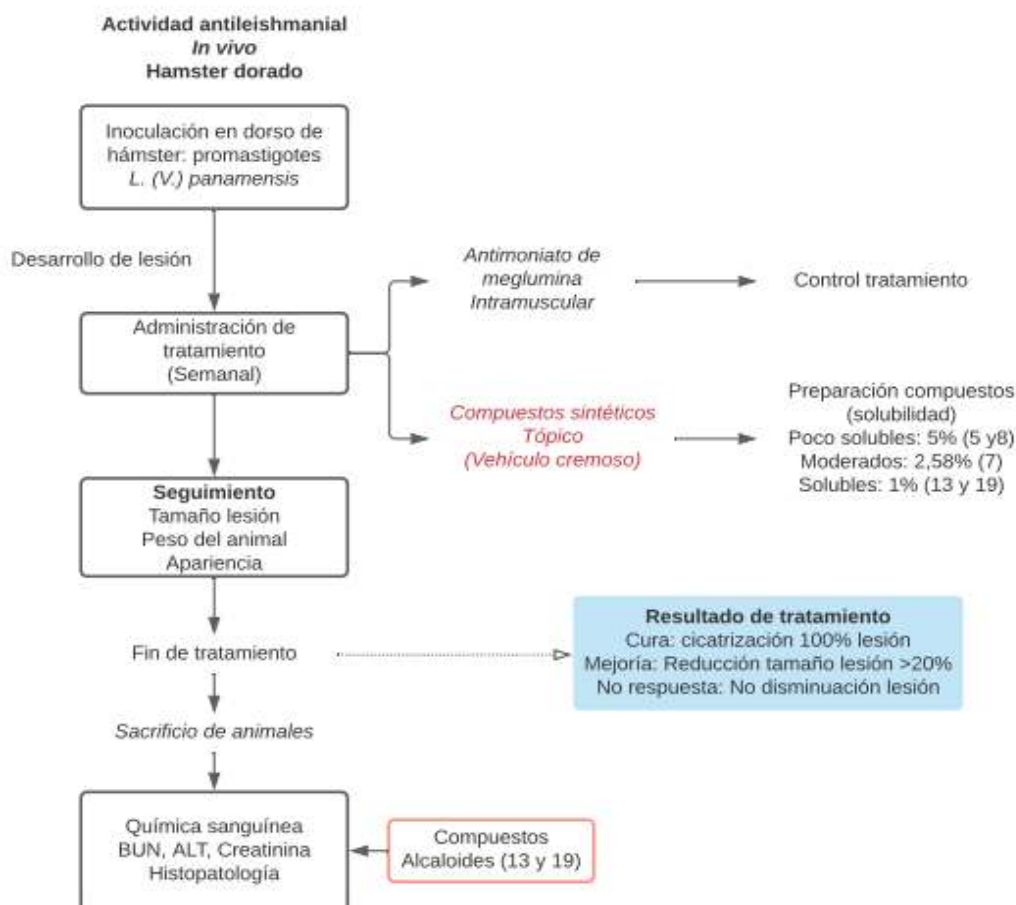
El porcentaje de inhibición de la infección fue usado para calcular la EC<sub>50</sub>, determinada por el análisis Probit, y basado en los valores de EC<sub>50</sub>, la actividad fue nominada como alta cuando EC<sub>50</sub> < 25 µg/mL, moderada con EC<sub>50</sub> > 25 y < 50 µg/mL y bajo cuando EC<sub>50</sub> > 50 µg/mL (Murillo et al, 2019). Los datos mostrados en las tablas de resultados se reportan como el promedio de los experimentos realizados y de su desviación estándar.

#### 4.2.2 Efectividad *in vivo*

Para analizar si la actividad antileishmanial observada *In vitro* en los compuestos sintéticos análogos (Selectivos frente a amastigotes intracelulares IS>2), se realizaron ensayos usando hámsteres dorados infectados experimentalmente con *L. (V.) panamensis* (una especie dermatrópica) y circulante en la mayoría del territorio colombiano(143). El hámster dorado fue seleccionado por que es considerado como un adecuado bio-modelo para evaluar potenciales medicamentos contra la leishmaniasis, debido a su susceptibilidad a la infección por diferentes especies de *Leishmania* spp y por que además presenta una fisiopatología de la leishmaniasis muy similar a la del humano (144).

Estos ensayos, estuvieron encaminados a la determinación de la eficacia terapéutica de los compuestos, por medio de la administración tópica del tratamiento (aproximándose a un uso clínico de la formulación) y siguiendo el esquema de tratamiento similar a los medicamentos de referencia (28 días, tratamiento diario) (144)(Figura 10). Todos los animales empleados, fueron manejados bajo las mismas condiciones ambientales, con alimentación y agua *ad libitum* y fueron alojados en el bioterio del PECET de la Universidad de Antioquia.

### 4.2.3 Diseño experimental Actividad *In vivo*



**Figura 10.** Diseño experimental ensayo evaluación de la actividad anti-leishmanial *in vivo* utilizando hámsteres dorados *M. auratus* infectados experimentalmente con *L. panamensis* y tratados vía tópica diariamente durante 28 días .

### 4.2.4 Evaluación de la respuesta terapéutica *in vivo* en Hámsteres (*Mesocricetus auratus*)

#### 4.2.4.1 Animales

Los animales (Hámsteres dorados) de ambos sexos (hembras y machos) de seis semanas de edad, con pesos en promedio de 120g, criados en colonias endogámicas del PECET, fueron usados en estos experimentos. Los animales fueron alojados en las instalaciones de ensayos biológicos de PECET, bajo condiciones experimentales y temperatura controladas, con comida y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos que involucran manejo de

animales, fueron aprobados por el comité de ética institucional para uso de animales experimentales (Anexo 1).

#### **4.2.4.1 Infección de Hámsteres con *Leishmania (V.) panamensis***

Promastigotes de *L. (V.) panamensis* (MHOM/88/CO/UA140) fueron cultivados en medio bi-fásico Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) a 26°C. Los parásitos metacíclicos (Fase estacionaria) fueron usados para infectar los animales. De manera breve, los parásitos fueron resuspendidos en buffer salino fosfato (PBS) y fueron ajustados a  $1 \times 10^7$  (machos) y  $1,5 \times 10^7$  (Hembras) parásitos en 0,1 mL de PBS para inocularlos en hámsteres machos y hembras.

Para infectar a los animales, se afeitó el área a inocular. Los animales fueron anesteciados y la inoculación de forma intradérmica de los parásitos se llevó a cabo aproximadamente a 2 pulgadas de la parte de la base de la cola, hasta la formación de la pápula. Los animales fueron monitoreados semanalmente días durante 4-6 semanas después de la inoculación y aparición de la lesión, en donde se palpó el área de inoculación y a la posterior aparición de la lesión fue medida con caliper.

#### **4.2.4.2 Tratamiento tópico de los animales**

El esquema de tratamiento inició cuando los animales desarrollaron la lesión ulcerantes (4-6 semanas post-inoculación). Los animales fueron distribuidos en grupos de 5 a 6 animales para cada compuesto evaluado.

La formulación y las dosis empleadas se basaron en las propiedades físico-químicas de los compuestos, para ser cargadas en la crema base [cuyos componentes son objeto de protección (por lo cual no fueron revelados en este trabajo)]; estos ensayos fueron llevados a cabo dentro de la unidad de ensayos biológicos e inmunología del PECET- Universidad de Antioquia.

La efectividad de los compuestos sintéticos con IS>2 (selectividad en amastigotes), fue evaluada en el modelo hámster dorado (*Mesocricetus aureatus*). Después del desarrollo de la úlcera, los hámsteres fueron distribuidos aleatoriamente en 5 grupos (n=5 triterpenoides; n=6 alcaloides quinolínicos) y tratados tópicamente diariamente durante 28 días, con los respectivos compuestos formulados en crema a concentraciones de 5 % (Triterpenoide 5



y 8), 2.58 % (Triterpenoide 7) y 1 % (Alcaloides quinolínicos 13 y 19). Mientras que la administración de antimonio de meglumina se realizó vía intramuscular (120mg/Kg).

Se realizó el seguimiento de los animales semanalmente, para determinar el tamaño de lesión, apariencia y peso. La efectividad de cada compuesto fue comparada con el tamaño de lesión antes y después del tratamiento, y se categorizó como cura clínica (curación del 100 % del área y cicatrización completa de la lesión), mejoría clínica (reducción del tamaño de la lesión >10 % del área) y falla terapéutica o no respuesta (incremento del tamaño de la lesión).

La condición de los animales fue monitoreada durante tres meses (90 días) después de finalizado el tratamiento. Se evaluó la toxicidad de la administración de tratamiento por medio del monitoreo del peso, así como los parámetros de laboratorio, alanina aminotransferasa (ALT), creatinina y nitrógeno en urea y sangre (BUN) pre-tratamiento y 45 días después de tratamiento.

La eficacia *in vivo* de los compuestos fue expresada como el porcentaje de curación clínica, mejoría clínica o no respuesta comparado con el inicio de tratamiento. La evaluación paramédica y no-paramédica fue llevada a cabo para comparar los porcentajes y frecuencias de cambios y toxicidad de los tratamientos en el modelo hámster (*Mesocricetus aureatus*). La efectividad se estimó comparando el tamaño de las lesiones antes y después del tratamiento, para cada hámster.

La respuesta terapéutica se determinó como el porcentaje de reducción del área de la úlcera, se midió como cura clínica (cicatrización del 100 % del área de la lesión), mejoría clínica (reducción del tamaño de la lesión <20 %), falla (Incremento del tamaño de la lesión), recaída (reactivación de la lesión después de la cura) y no respuesta (No reducción de lesión).

#### **4.2.4.3 Análisis estadístico**

Los resultados de este proyecto, fueron analizados de acuerdo con los parámetros de cada método, y cada resultado se validó por la comparación frente a los controles establecidos para cada ensayo. Dependiendo del set de datos de cada ensayo, se realizó el análisis de normalidad de los datos y dependiendo de esto, se llevó a cabo el análisis de ANOVA de

una o dos vías o Kruskal wallis. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo por el programa GraphPad Prism versión 6.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

La eficacia terapéutica *In vivo*, se expresó en términos de tamaño de la lesión ( $\text{mm}^2$ ), y porcentaje de animales, estableciendo de este modo la existencia de cura clínica, mejoría clínica o no respuesta frente a los tratamiento (144). La significancia estadística en todos los casos, se estableció usando valores de significancia ( $P < 0.05$ ). En donde  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.005$ (\*\*\*) y  $p < 0.001$ (\*\*\*).

## 4.3 Resultados

### 4.3.1 Efectividad *in vitro*

#### 4.3.1.1 Actividad citotóxica sobre macrófagos derivados de monocitos humanos y células J774 de compuestos análogos

La actividad citotóxica de los compuestos triterpenoides y alcaloides quinolínicos fue evaluada en MdMhu, debido a la cercanía del modelo, con lo que sucede en células de pacientes humanos. Para identificar el grado de toxicidad de los compuestos, se categorizaron según el valor de la  $CL_{50}$  en: citotoxicidad alta para valores de  $CL_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$  ( $CL_{50} < 100 \mu\text{M}$ ), toxicidad moderada para valores de  $CL_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$  y  $< 200 \mu\text{g/mL}$  ( $CL_{50} > 100 \mu\text{M}$  y  $< 200 \mu\text{M}$ ) y toxicidad baja (potencialmente no tóxico) para valores de  $CL_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$  ( $CL_{50} > 200 \mu\text{M}$ ) (Meza et al. 2010).

La citotoxicidad generada por los compuestos triterpenoides, en general fue de tóxica a moderada frente al cultivo primario MdMhu con valores  $CL_{50} < 169,2 \mu\text{g/mL}$ ; sin embargo, en células J774 (línea celular), los compuestos limonoides (**1**, **2** y **3**), saponina (**7**) y lupanos (**9** y **10**), mostraron ser potencialmente inocuos (no tóxicos). En general, los triterpenoides pentacíclicos mostraron  $CL_{50} < 42,1 \mu\text{g/mL}$ , constituyendo el grupo estructural con efectos citotóxicos evidentes en los dos tipos de células evaluadas, mientras que los demás grupos mostraron  $CL_{50}$  cercanas o mayores a  $CL_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$  (Tabla 5). Al evaluar el efecto tóxico de estos compuestos en  $\mu\text{M}$ , se pudo evidenciar que solo los triterpenoides pentacíclicos **6** y **8**, reportaron  $CE_{50} < 100 \mu\text{M}$ , siendo las moléculas con mayor toxicidad dentro del grupo trieterpenoide (Tabla 6).

Los compuestos alcaloides, en general mostraron citotoxicidad de alta a moderada en MdMhu<sub>7</sub> con  $CL_{50} < 154,6 \mu\text{g/mL}$  (Tabla 7). Sin embargo, al medir la actividad de los compuestos en  $\mu\text{M}$ , se pudo establecer que los compuestos 13 (perteneciente al grupo 2) y 19 (grupo 3), demostraron ser las únicas moléculas con perfil tóxico frente a la línea celular J774 y la línea primaria MdMhu, mientras que los demás compuestos tuvieron citotoxicidades que los clasificaron dentro de moderados o no citotóxicos para las dos líneas celulares (Tabla 8).

Para descartar una posible actividad citotóxica de los compuestos debido al reactivo de solubilización (DMSO) utilizado en nuestros ensayos, se evaluó el efecto del DMSO en MdMhu a una concentración de 1 % a 0,01 % y pudiendo observar que este reactivo no tiene efectos citotóxicos significativos, en comparación con células basales sin tratar (Datos no mostrados). El efecto citotóxico de los compuestos evaluados a diferentes concentraciones, es inducido por los tratamientos y no corresponden a efectos residuales causados por la solubilización.

#### **4.3.1.2 Actividad antileishmanial de compuestos sintéticos y naturales frente a promastigotes de *L. (V.) panamensis***

Para tratar de identificar si los compuestos son activos frente a la forma extracelular del parásito, se realizó la determinación de la actividad, calculada a partir de las  $CL_{50}$  de cada molécula, en donde se seleccionaron como activos, moléculas con  $CE_{50}$  menores a las concentraciones citotóxicas reportadas. Por esta razón, aunque se observan diferencias significativas entre los compuestos naturales (plantillas) y los demás compuestos, se tomaron en cuenta los compuestos activos frente a la forma extracelular del parásito y la comparación con la actividad de las moléculas plantilla.

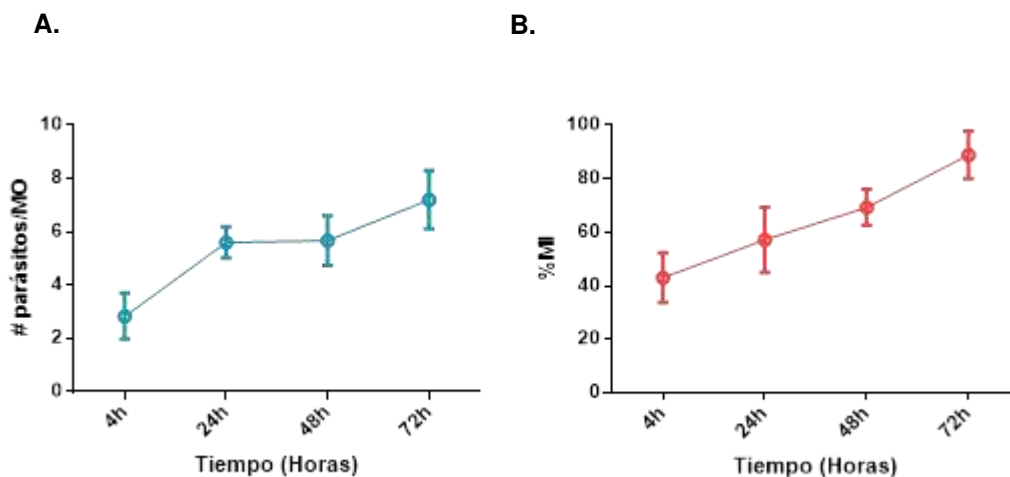
En general, los triterpenoides no tuvieron actividad frente al parásito extracelular ( $CE_{50} > 100 \mu\text{M}$ ), de manera que al calcular la selectividad de estos, frente al promastigote, se pudo establecer, que sus concentraciones efectivas y citotóxicas eran cercanas, resultando en  $IS < 2$ . Este mismo comportamiento, fue determinado para los compuestos lupanos y la mayoría de compuestos pentacíclicos. Mostrando que estos tres grupos de triterpenos (limonoides, lupanos y pentacíclicos) no ejercen un efecto antileishmanial en el parásito extracelular. De manera particular, solo uno de los limonoides (**4**) fue activo frente al

promastigote, lo cual se vio reflejado en las  $CE_{50} < 50 \mu M$  y en la selectividad ( $IS = 7,38$ ), el compuesto saponina (7), que mostró actividad moderada ( $CE_{50} = 61,9 \mu M \pm 27,3 \mu M$ ) e  $IS > 2$  (Tabla 3-4).

Al evaluar la actividad de los alcaloides quinolínicos, se pudo establecer que los compuestos 12, 13 y 19 (pertenecientes a sub-grupos diferentes) tuvieron  $CE_{50} < 50 \mu M$  e  $IS > 4$  para el parásito extracelular. Mientras que los demás compuestos (**14-18**) mostraron poca actividad  $CE_{50} > 50 \mu g/mL$  ( $CE_{50} > 100 \mu M$ ) (Tabla 5-6).

#### **4.3.1.3 Evaluación de la actividad antileishmanial de compuestos sintéticos y naturales frente a amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* por medio de microscopía de fluorescencia**

Para evaluar la actividad de los compuestos sobre amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* en MdMhu, se determinó en primer lugar, el comportamiento de la infección en esta línea primaria (MdMhu) en el tiempo (Figura 11); en donde se pudo comprobar que a las 72 horas de contacto entre las células hospederas y los parásitos, entre el 70-90% de las células se encontraban infectadas (Figura 11b), permitiendo la proliferación de los parásitos de entre 6 a 8 amastigotes por célula (Figura 11a). Estos resultados demostraron la permisividad a la infección de las células provenientes de cultivos primarios y nos permitió evaluar la disminución de células infectadas (actividad antileishmanial), producto de los compuestos seleccionados previamente.



**Figura 11.** Evaluación de la infección de MdMhu con *L. (V.) panamensis* (MHOM/88/CO/UA140) en el tiempo. a. Carga parasitaria (Número de parásitos/MdMhu). b. Porcentaje de macrófagos infectados.

Después de establecer el tiempo y los porcentajes de infección, por parte de *L. (V.) panamensis* en MdMhu, se evaluó la actividad antileishmanial de los compuestos triterpenoides y alcaloides quinolínicos, enfocándonos en dos parámetros esenciales para el cálculo de las  $CE_{50}$ : porcentaje de inhibición de la infección y disminución de la carga parasitaria. Adicionalmente, la actividad antileishmanial fue clasificada, de la siguiente manera: Alta efectividad  $CE_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$  ( $CE_{50} < 50 \mu\text{M}$ ), efectividad moderada  $CE_{50} > 20 \mu\text{g/mL}$  y  $< 70 \mu\text{g/mL}$  ( $CE_{50} > 50 \mu\text{M}$  y  $< 100 \mu\text{M}$ ) y baja efectividad  $CE_{50} > 70 \mu\text{g/mL}$  ( $CE_{50} > 100 \mu\text{M}$ ) (145).

Por medio de la técnica de microscopia de fluorescencia, los triterpenoides mostraron actividades variables, con  $CE_{50}$  entre 143,8 a 4,8  $\mu\text{g/mL}$ . El compuesto **1** (limonoides), mostró actividad moderada  $CE_{50}$  28,32  $\mu\text{g/mL}$  ( $50,2 \pm 1,47 \mu\text{M}$ ) y selectividad (IS) frente a amastigotes intracelulares de 4,1. Los compuestos pentacíclicos tuvieron efectividades entre moderadas y altas con  $CE_{50} < 32,4 \mu\text{g/mL}$ , en donde las moléculas 5 y 8 exhibieron selectividades (IS)  $> 3$ . Los compuestos lupanos en general, fueron no efectivos frente al parásito intracelular  $CE_{50} > 81 \mu\text{g/mL}$ , ni selectivos, ya que se reportaron  $IS < 2$ . Finalmente el compuesto **7** (saponina), fue efectivo de manera moderada  $CE_{50}$  41,2  $\mu\text{g/mL}$ , sin embargo se demostró su selectividad por el parásito intracelular  $IS = 3,4$  (Tabla 3-4). Estos resultados

demonstraron la variabilidad de la actividad biológica entre compuestos pertenecientes al mismo grupo químico.

Los compuestos alcaloides quinolínicos **1**, **2** y **8** tuvieron efectividades altas  $CE_{50} < 7,42$   $\mu\text{g/mL}$  y selectividades  $IS > 3,6$ . Los demás compuestos alcaloides, presentaron actividades moderadas, pero sin selectividad hacia el patógeno intracelular, ya que las  $CE_{50} > 46,4$   $\mu\text{g/mL}$  y las  $IS < 2$  (Tablas 4-6), mostrando que solo el 37.5 % de las moléculas de tipo alcaloides evaluadas, pueden ser potenciales medicamentos antileishmaniales (Tabla 4).

**Tabla 5.** Actividad citotóxica frente a MdMhu y J774, efectividad en promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* de compuestos triterpenoides de origen natural y sintético

COMPUESTOS	Grupo	IT	Macrófagos		Promastigotes	Amastigotes Intracelulares	IS
			$CL_{50}$ $\mu\text{g/mL}$ MdMhu	$CL_{50}$ $\mu\text{g/mL}$ J774	$CE_{50}$ $\mu\text{g/mL}$	$CE_{50}$ $\mu\text{g/mL}$	
1	Limonoides	N.A	115,2 $\pm$ 9,7	>200 $\pm$ N.A	66,2 $\pm$ 33,4	28,32 $\pm$ 0,83	4,1
2		0,905	118,1 $\pm$ 5,1	>200 $\pm$ N.A	107 $\pm$ 7,1	87,2 $\pm$ 15,12	1,4
3		0,902	141,8 $\pm$ 11,6	>200 $\pm$ N.A	57,4 $\pm$ 19	75,8 $\pm$ 9,28	1,9
4		0,893	97,3 $\pm$ 12,6	100,3 $\pm$ 7,8	13,2 $\pm$ 6	65,6 $\pm$ 1,63	1,5
5	Pentacíclicos	0,762	95,8 $\pm$ 6	104,3 $\pm$ 12,3	53,3 $\pm$ 3,3	32,4 $\pm$ 9,43	3
6		0,731	6,2 $\pm$ 0,38	17,34 $\pm$ 2,89	5,4 $\pm$ 3,1	4,8 $\pm$ 5,02	1,3
7	Saponina	0,62	139,2 $\pm$ 19,5	>200 $\pm$ N.A	51 $\pm$ 6,4	41,2 $\pm$ 4,11	3,4
8	Pentacíclicos	0,721	42,1 $\pm$ 4,3	10,24 $\pm$ 1,04	23,7 $\pm$ 3	13,5 $\pm$ 1,82	3,1
9	Lupanos	0,701	169,2 $\pm$ 22	>200 $\pm$ N.A	64,4 $\pm$ 15,3	143,8 $\pm$ 22,3	1,2
10		0,682	156,7 $\pm$ 16,7	>200 $\pm$ N.A	62,8 $\pm$ 21,1	81 $\pm$ 6,99	1,9
11		0,682	86,2 $\pm$ 5,5	>200 $\pm$ N.A	58,8 $\pm$ 16,6	81,1 $\pm$ 8,94	1,1
AnfB	N.A	-	4,5 $\pm$ 0,6	1,89 $\pm$ 0,33	0,3 $\pm$ 0,2	0,35 $\pm$ 0,14	12,9

La Tabla resume los hallazgos obtenidos en los ensayos de evaluación de actividad antileishmanial en  $\mu\text{g/mL}$ , frente a células hospederas (MdMhu y J774), promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* mostrando la media (de al menos tres (5) experimentos independientes) y su correspondiente desviación estándar. Se consideraron selectivos los compuestos con  $IS > 2$ .

**Tabla 6.** Actividad citotóxica frente a MdMhu y J774, efectividad en promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* de compuestos triterpenoides de origen natural y sintético.

Compuestos	Grupo	Macrófagos		Promastigotes	Amastigotes Intracelulares	Promastigotes	Amastigotes Intracelulares
		MdMhu CL50 (µM)	J774 CL50 (µM)	CE50 (µM)	CE50 (µM)	IS (CL50/CE50)	IS (CL50/CE50)
1	Limonoides	204,3 ± 27,2	>300 ± N.A	>200 ± N.A	50,2 ± 1,47	-	<b>4,07</b>
2		229,5 ± 19,9	>300 ± N.A	>200 ± N.A	169,2 ± 29,4	-	1,35
3		>300 ± N.A	>300 ± N.A	122 ± 24,6	161,1 ± 19,7	-	-
4		201,5 ± 25,1	207,8 ± 16,6	27,3 ± 16,6	135,9 ± 3,4	<b>7,38</b>	1,48
5	Pentacíclicos	209,9 ± 13,1	228,5 ± 26,9	116,8 ± 26,9	70,9 ± 12,2	1,78	<b>2,96</b>
6		13,6 ± 0,8	12,4 ± 6,8	11,8 ± 6,8	11,8 ± 1,09	1,15	1,15
7	Saponina	169,2 ± 21,5	243,1 ± 12,9	61,9 ± 23,7	50,7 ± 3,8	<b>2,73</b>	<b>3,34</b>
8	Pentacíclicos	89,5 ± 9,1	21,8 ± 9,4	50,3 ± 6,34	28,7 ± 3,8	1,78	<b>3,12</b>
9	Lupanos	>300 ± N.A	>300 ± N.A	141 ± 46,2	>200 ± N.A	-	-
10		>300 ± N.A	>300 ± N.A	116,8 ± 34,5	177,4 ± 15,3	-	-
11		202 ± 12,9	>300 ± N.A	137,8 ± 18,9	190,1 ± 20,9	1,46	1,06
AnfB	N.A	4,9 ± 0,7	2,09 ± 0,32	0,32 ± 0,22	0,379 ± 0,15	<b>15,31</b>	<b>12,93</b>

La Tabla resume los hallazgos obtenidos en los ensayos de evaluación de actividad antileishmanial en uM, frente a células hospederas (MdMhu y J774), promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* mostrando la media (de al menos tres (5) experimentos independientes) y su correspondiente desviación estándar. Se consideraron selectivos los compuestos con IS>2.

**Tabla 7.** Actividad citotóxica frente a MdMhu y J774, efectividad en promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* de compuestos alcaloides quinolínicos de origen natural y sintéticos

Compuesto	Grupo	IT	Macrófagos		Promastigotes	Amastigotes intracelulares	IS
			CL50 µg/mL ± DE MdMhu	CL50 µg/mL ± DE J774	CE50 µg/mL ± DE	CE50 µg/mL ± DE	
12	1	N.A	43,6 ± 3,2	34,1 ± 5,8	9,9 ± 3	7,42 ± 1,95	5,88
13	2	0,731	18,9 ± 0,9	9,1 ± 1,1	3,4 ± 1,1	5,19 ± 0,95	3,64
14		0,724	154,6 ± 6,1	169,3 ± 20,2	93,8 ± 6,3	121,86 ± 6,16	1,27
15	1	0,791	95,2 ± 3,3	174,6 ± 13,1	62,3 ± 5,3	57,14 ± 5,04	1,67
16		0,821	106,5 ± 7	168,3 ± 17,4	66,4 ± 13	61,69 ± 1,11	1,73
17		0,808	88 ± 13,4	53,4 ± 4,7	61,3 ± 29,6	46,48 ± 9,37	1,89
18	3	0,674	95,2 ± 4,3	183,7 ± 20,2	26,5 ± 5,8	55,84 ± 8,34	1,70
19		0,704	5,5 ± 1,1	15,6 ± 2,1	1,6 ± 0,8	1,01 ± 0,43	5,45
AnfB	-	N.A	4,5 ± 0,6	1,89 ± 0,33	0,3 ± 0,2	0,35 ± 0,14	12,86

La Tabla resume los hallazgos obtenidos en los ensayos de evaluación de actividad antileishmanial en µg/mL, frente a células hospederas (MdMhu y J774), promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* mostrando la media (de al menos tres (5) experimentos independientes) y su correspondiente desviación estándar. Se consideraron selectivos los compuestos con IS>2.



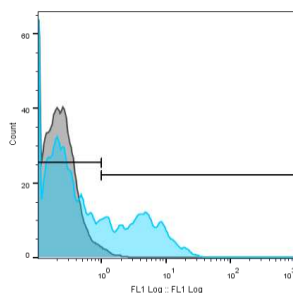
**Tabla 8.** Actividad citotóxica frente a MdMhu y J774, efectividad en promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* de compuestos alcaloides quinolínicos de origen natural y sintéticos

Compuestos	Grupo	Macrófagos		Promastigotes	Amastigotes Intracelulares	Promastigotes	Amastigotes Intracelulares
		MdMhu CL50 (µM)	J774 CL50 (µM)	CE <sub>50</sub> (µM)	CE <sub>50</sub> (µM)	IS (CL <sub>50</sub> /CE <sub>50</sub> )	IS (CL <sub>50</sub> /CE <sub>50</sub> )
12	1	160,7 ± 11,79	125,6 ± 21,4	36,5 ± 11,1	27,34 ± 7,18	<b>4,40</b>	<b>5,88</b>
13	2	94,8 ± 4,51	45,6 ± 5,52	17,1 ± 5,21	26,05 ± 4,7	<b>5,54</b>	<b>3,64</b>
14		>300 ± N.A	>300 ± N.A	>100 ± N.A	>100 ± N.A	-	-
15	1	>300 ± N.A	>300 ± N.A	>100 ± N.A	>100 ± N.A	-	-
16		>300 ± N.A	>300 ± N.A	>100 ± N.A	>100 ± N.A	-	-
17		219,4 ± 15,29	>300 ± N.A	>100 ± N.A	>100 ± N.A	-	-
18	3	>300 ± N.A	>300 ± N.A	>100 ± N.A	>100 ± N.A	-	-
19		34,33 ± 6,86	97,3 ± 13,1	9,98 ± 4,9	6,31 ± 2,68	<b>3,44</b>	<b>5,44</b>
AnfB	N.A	4,9 ± 0,7	2,09 ± 0,32	0,32 ± 0,22	0,379 ± 0,15	<b>15,31</b>	<b>12,93</b>

La Tabla resume los hallazgos obtenidos en los ensayos de evaluación de actividad antileishmanial en uM, frente a células hospederas (MdMhu y J774), promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* mostrando la media (de al menos tres (5) experimentos independientes) y su correspondiente desviación estándar. Se consideraron selectivos los compuestos con IS>2.

#### 4.3.1.4 Confirmación de la actividad antileishmanial de compuestos sintéticos y naturales frente a amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* por medio de citometría de flujo

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos por microscopía de fluorescencia y Giemsa, se evaluó la actividad antileishmanial de los compuestos con IS>2, por medio de citometría de flujo. La evaluación de la actividad antileishmanial por medio de esta tecnología, mostró un porcentaje de infección de MdMhu del 30 % (Figura 12). Bajo este parámetro, se evaluaron las CE<sub>50</sub> los compuestos seleccionados (IS>2), a partir de los ensayos por microscopía de fluorescencia (SYBR-safe) y Giemsa.



**Figura 12.** Citometría de flujo de la evaluación de la infección de *L. (V.) panamensis* UA140 transfectados con EGFP. Histograma del porcentaje de células infectadas con *L.(V.) panamensis* UA140-EGFP (azul) vs. Células sin infectar (gris), por medio de citometría de flujo. (FL1: FITC).

Teniendo en cuenta lo anterior, el porcentaje de células infectadas (eventos positivos) dadas para cada tratamiento, se realizó el cálculo de las  $CE_{50}$  resultantes de este método de evaluación. Mostrando que las  $CE_{50}$  de los compuestos triterpenoides, fueron consistentes en los métodos de evaluación (Tabla 9).

**Tabla 9.** Actividad antileishmanial de compuestos Triterpenoides frente a amastigotes intracelulares de *Leishmania (V.) panamensis*

Compuestos	Grupo	IT	$CE_{50}$ $\mu\text{g/mL}$	IS
1	Limonoide	N.A	26,95 $\pm$ 4,67	4,3
5	Pentacíclico	0,762	28,67 $\pm$ 2,51	3,3
7	Saponina	0,62	41,2 $\pm$ 1,75	3,4
8	Pentacíclico	0,721	18,03 $\pm$ 4,86	2,3
ANF		-	0,35 $\pm$ 0,14	12

La Tabla resume los hallazgos obtenidos en los ensayos de evaluación de actividad antileishmanial frente a amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis*, mostrando el índice de Tanimoto (IT), la media (de al menos tres (3) experimentos independientes), su correspondiente desviación estándar.

Al evaluar la efectividad de los compuestos por medio de citometría de flujo de los alcaloides con  $IS > 2$ , se pudo demostrar que las moléculas selectivas para el amastigote intracelular (seleccionadas por el método de microscopía de fluorescencia), también presentaron evidente selectividad frente al parásito, por medio de la metodología de citometría de flujo (Tabla 10).

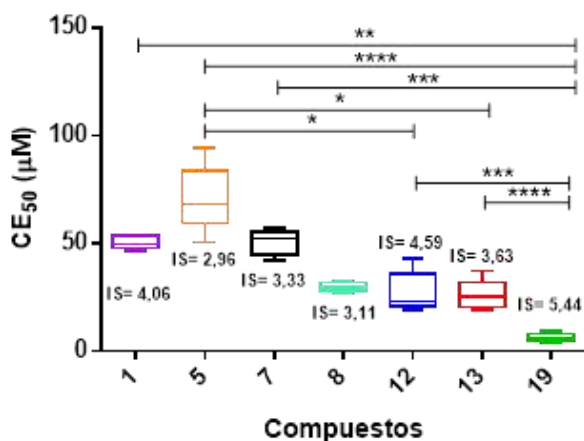
**Tabla 10.** Actividad antileishmanial de compuestos alcaloides quinolínicos frente a amastigotes intracelulares de *Leishmania (V.) panamensis*

Compuesto	Grupo	IT	CE <sub>50</sub> µg/mL			IS
12	1	N.A	5,07	±	3,98	8,6
13	2	0,731	7,94	±	1,97	2,4
19	3	0,704	1,91	±	0,33	2,9
ANF		-	0,35	±	0,14	12

La Tabla resume los hallazgos obtenidos en los ensayos de evaluación de actividad antileishmanial frente a amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis*, mostrando el índice de Tanimoto (IT), la media (de al menos tres (3) experimentos independientes), su correspondiente desviación estándar.

#### 4.3.1.5 Comparación de actividad antileishmanial entre grupos de compuestos sintéticos

Al comparar las CE<sub>50</sub> (amastigotes intracelulares) de los compuestos entre grupos, se demostró que los alcaloides fueron significativamente más potentes (CE<sub>50</sub><50 µM) que los compuestos triterpenoides 1,5 y 7 (los cuales reportaron CE<sub>50</sub>>50 µM). Al analizar las efectividades entre los alcaloides, se denota que el compuesto 19 muestra de manera evidente, mayor efectividad (CE<sub>50</sub><10 µM) en comparación a las otras moléculas evaluadas, dentro del mismo grupo de alcaloides (12 y 13) (Figura 13).



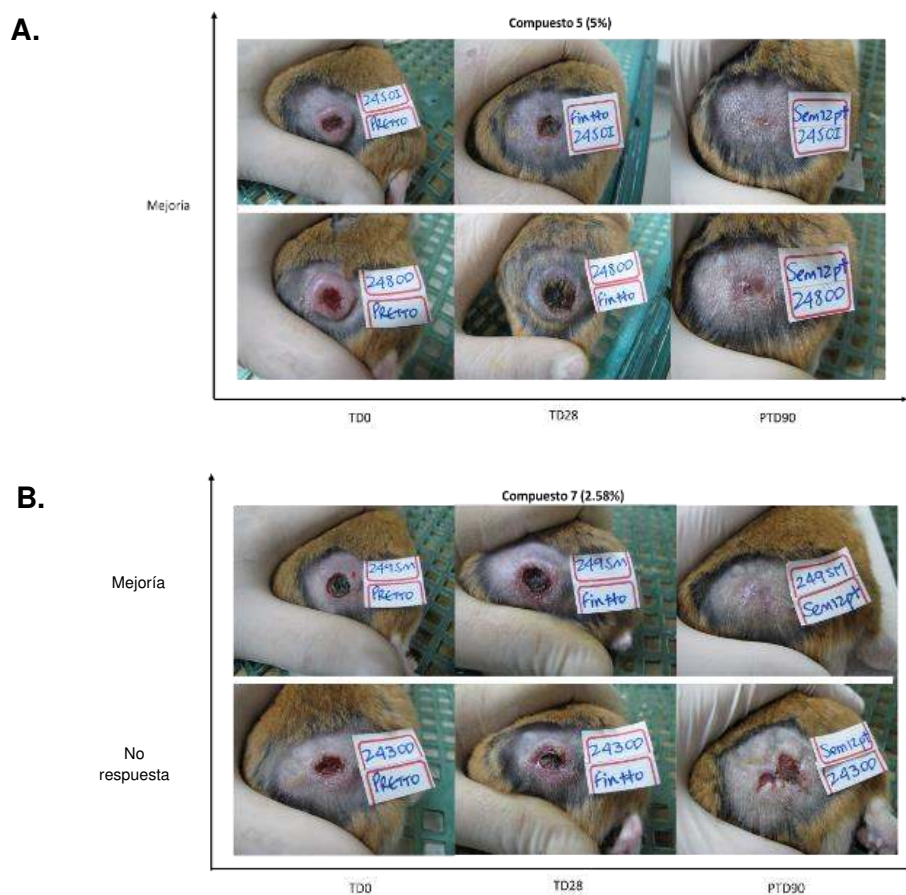
**Figura 13.** Efectividad en amastigotes intracelulares de compuestos naturales y sintéticos antileishmaniales. *Diferencias significativas entre compuestos ( $p < 0.05$ ).*

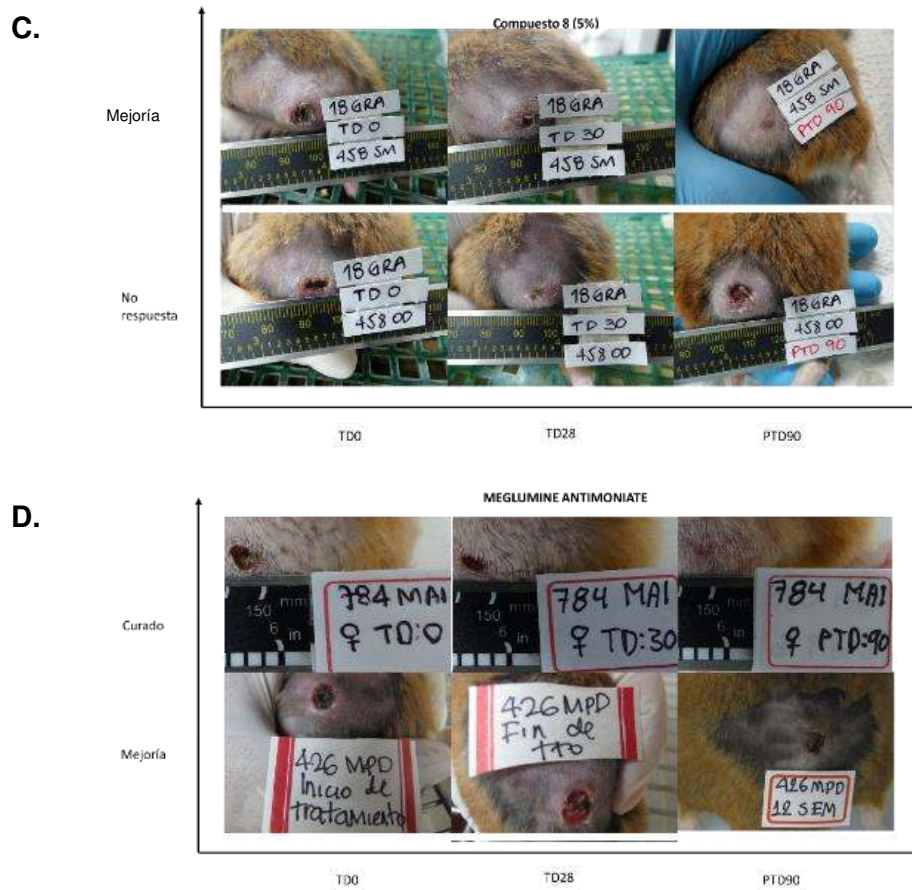
#### 4.3.2 Efectividad *in vivo*

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se determinó el potencial terapéutico de los compuestos sintéticos alcaloides y triterpenoides ( $IS > 2$ ), se evaluaron parámetros clínicos, así como la toxicidad del tratamiento con los compuestos sintéticos antileishmaniales efectivos, en el modelo de Hámster dorado con LC causada por *L. (V.) panamensis*. Para esto, se realizó la infección de los animales con *L. (V.) panamensis*, haciendo seguimiento antes, durante y después del tratamiento.

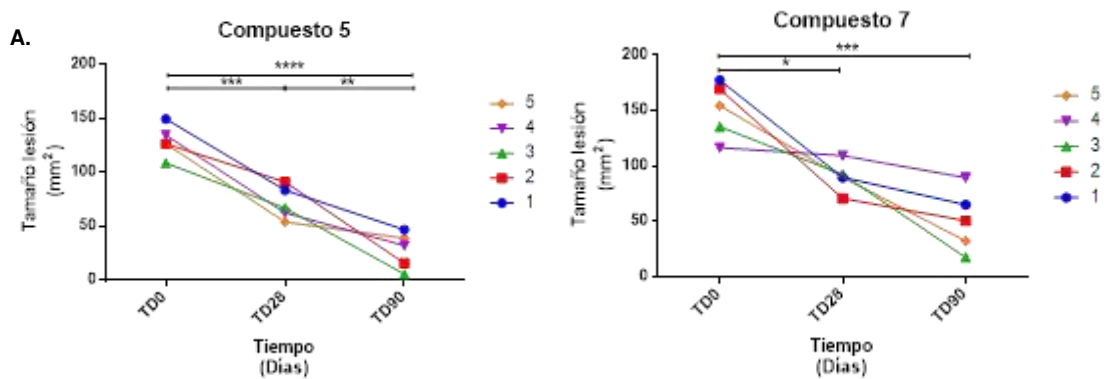
Para determinar las formulaciones de los compuestos antileishmaniales y su administración tópica en los animales infectados con *L. (V.) panamensis*, fueron tomadas consideradas las propiedades físico-químicas de las moléculas antileishmaniales ( $IS > 2$ ) sintéticas, seleccionadas previamente en los ensayos *In vitro*, así como las  $CE_{50}$  reportadas en amastigotes intracelulares. En este sentido, compuestos con solubilidad baja y alta lipofilicidad ( $\text{LogP} > 5$ ), como los triterpenoides pentacíclicos 5 y 7, fueron formulados al 5%; los moderadamente solubles y con características anfifílicas de tipo Saponina (7), se formularon al 2,58% y los compuestos solubles y con  $\text{LogP} > 1$  de tipo alcaloides quinolínicos, fueron formulados al 1% en crema (la composición no se muestra debido a que es objeto de protección).

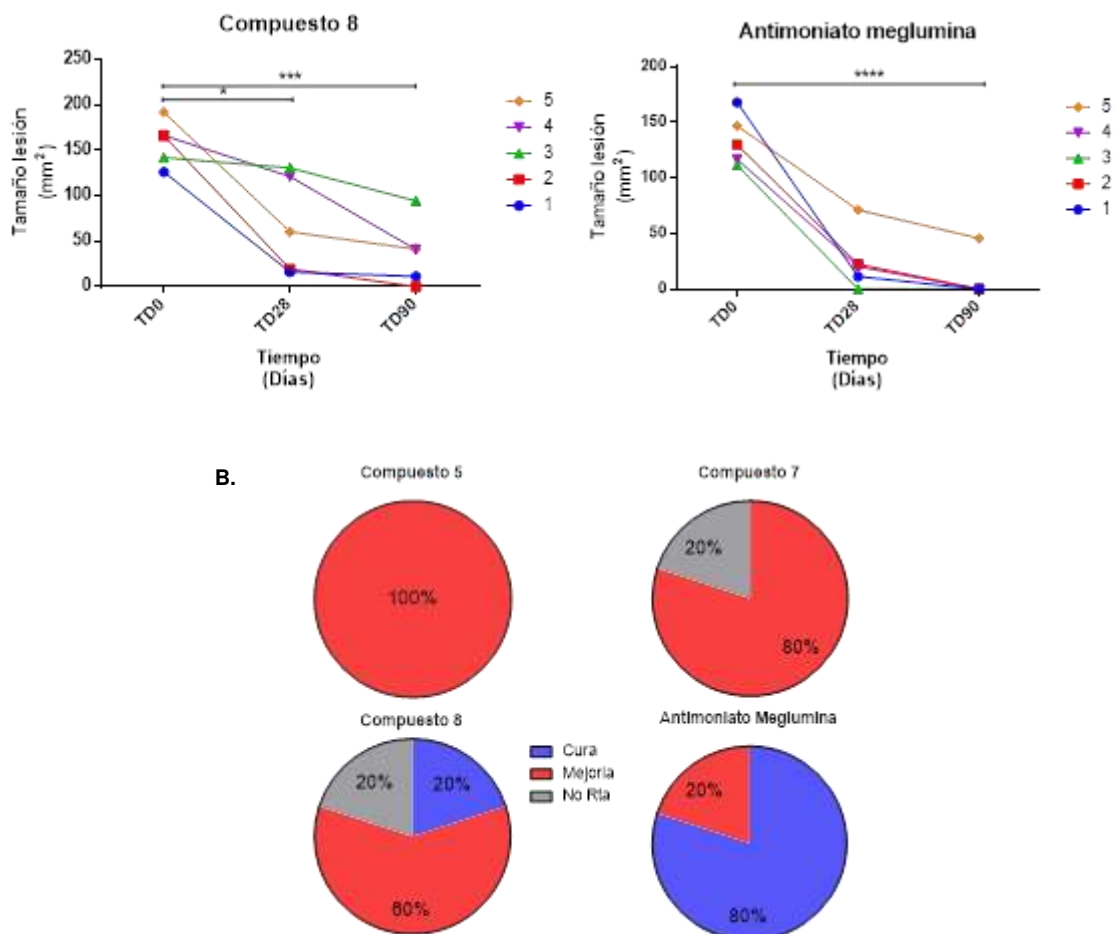
En este ensayo, los animales con LC experimental ocasionados por *L. (V.) panamensis*, mostraron lesiones específicas para esta forma clínica de la enfermedad. En general, todos los compuestos evaluados disminuyeron el tamaño de las lesiones. Todos los animales expuestos al compuesto **5**, mostraron mejoría clínica con porcentajes de reducción en el tamaño de las lesiones entre el 68 % y 75 % (Figura 14A y Figura 15 A-B) . Mientras que el compuesto **7** (saponina), indujo en los hámsteres tratados, entre el 23 % y 87 % de reducción de las lesiones y en donde el 80 % de los animales mostraron mejoría clínica (Figura 14B y Figura 15 A-B). Los hámsteres expuestos al compuesto **8** tuvieron reducción de lesiones entre 33 % y 90 %, en donde el 60 % de estos animales mostraron mejoría clínica, 20 % no respuesta y el 20 % restante cura clínica (Figura 14C y Figura 15 A-B).





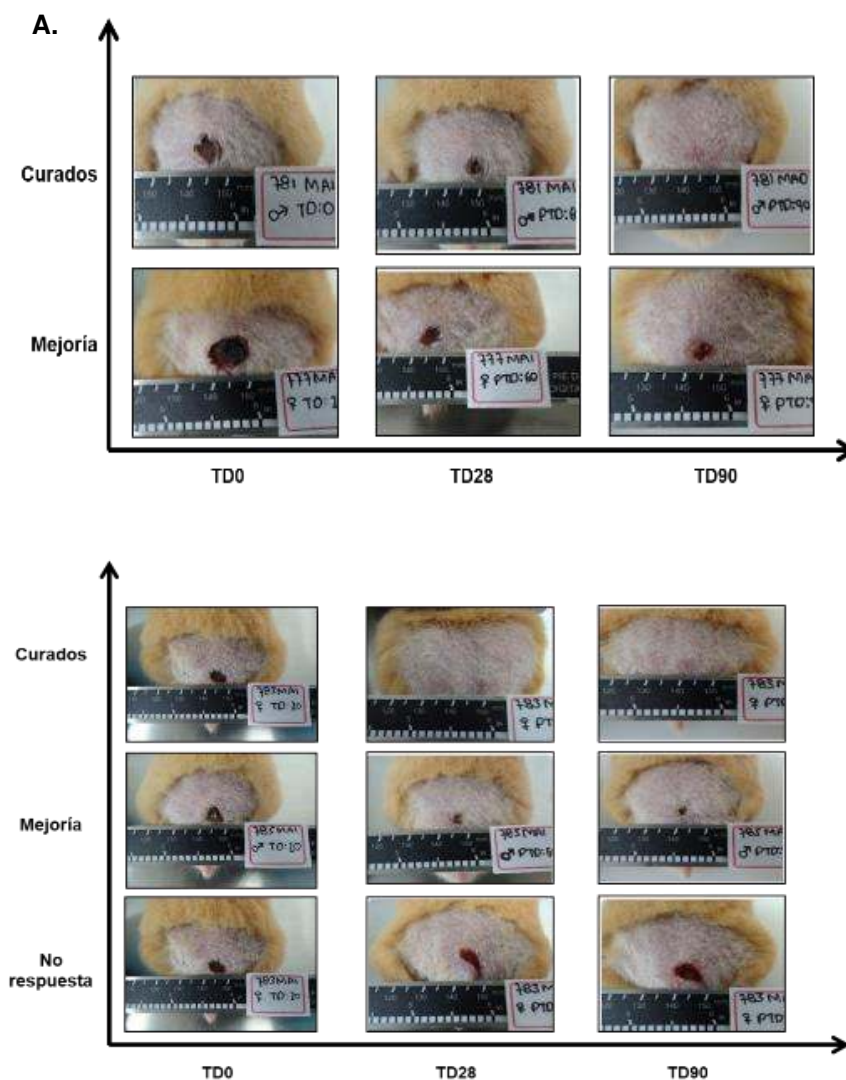
**Figura 14.** Comportamiento terapéutico del tratamiento de hámsteres (*Mesocricetus aureatus*) con compuestos triterpenoides sintéticos antileishmaniales. *Curados:* Cierre total de la lesión, re-epitelización. *Mejoría:* Disminución de  $\geq 20\%$  de tamaño de la lesión. *No respuesta:* Disminución  $< 20\%$  del tamaño de lesión. *TD:* Días de experimento.





**Figura 15.** Efecto del tratamiento con los compuestos **5**, **7** y **8** en hámsteres con LC *A.* Medición del tamaño de lesión (mm<sup>2</sup>) durante tiempo de tratamiento (Inicio-Fin) en los 5 animales tratados *B.* Desenlace de tratamiento (cura clínica, mejoría clínica y no respuesta) (n=5 para cada tratamiento). Diferencias significativas entre grupos (p<0.05).

Los animales infectados con *L. (V.) panamensis* y con lesiones características de LC, al ser tratados con el alcaloide **13** mostraron respuestas positivas (3 animales curados y 3 con mejoría clínica); en donde los curados mostraron cicatrización y remodelamiento completo de la dermis afectada, así como una evidente reducción de la lesión durante el tiempo de exposición al alcaloide, mientras que los animales con mejoría disminuyeron notablemente la lesión al final de la semana 12 de tratamiento (Figura 16 A y Figura 17 A-B).



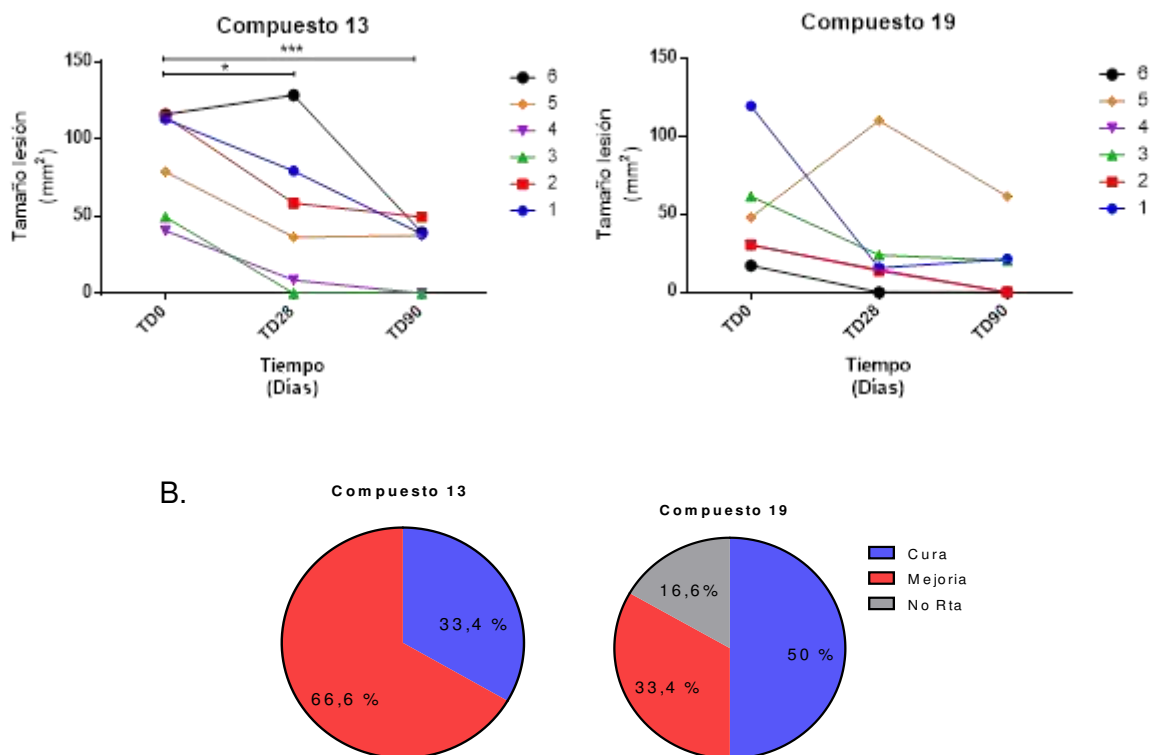
**Figura 16.** Comportamiento terapéutico del tratamiento de hámsteres (*Mesocricetus aureatus*) tratados con alcaloide **13**. *Curados*: Cierre total de la lesión, re-epitelización. *Mejoría*: Disminución de  $\geq 20$  % de tamaño de la lesión. *TD*. Días de experimento.

Por otra parte, los hámsteres con leishmaniasis cutánea y expuestos al compuesto **19**, mostraron que dos de los animales curaron sus lesiones, evidenciadas en una cicatrización completa de esta, al final de tratamiento, los animales con mejoría clínica (2) disminuyeron sus lesiones en el tiempo de tratamiento significativo, en comparación con el inicio de tratamiento, aunque uno de los animales no mostró una respuesta terapéutica como los otros expuestos al tratamiento, se pudo observar una leve reducción de la lesión al final de tratamiento, sugiriendo la eficacia del compuesto pudo ser mejor a mayor tiempo de tratamiento (Figura 16B y Figura 17 A-B) .



Los hámsteres tratados con los triterpenos, no mostraron síntomas asociados con toxicidad de los tratamientos **5**, **7** y **8**. Se mantuvo la estabilidad del peso de los animales tratados, sin cambios aparentes durante el tiempo de tratamiento (Datos no mostrados).

Teniendo en cuenta lo anterior, se evaluó cuantitativamente el progreso de las lesiones en hámsteres con LC experimental por *L. panamensis*. Los tratamientos con los compuestos **13** y **19** redujeron de forma notable la lesión, durante el tiempo de tratamiento (Figura 16 A-B). Los alcaloides **13** y **19**, mostraron que dos de los seis animales (33,3 %) redujeron el 100 % del tamaño de la lesión tres meses después del tratamiento. En el grupo tratado con el compuesto **13**, cuatro (66,6 %) de los seis animales mejoraron satisfactoriamente, mostrando reducción en el tamaño de la lesión, mientras que el tratamiento con el compuesto **19**, tres (50 %) animales mostraron cura clínica, dos (33,3 %) animales mejoraron y uno (16,7 %) de los seis animales no tuvo respuesta al tratamiento (Figura 17 A-B).



**Figura 17.** Efecto del tratamiento con los compuestos **13** y **19** en hámsteres con LC. A. Medición del tamaño de lesión (mm<sup>2</sup>) durante tiempo de tratamiento (Inicio-Fin) y post-tratamiento (Semana 4 -12). B. Número de animales curados clínicamente, con mejoría (**13**) y no respuesta al tratamiento C. (**19**). (n=6 para cada tratamiento). Diferencias significativas entre grupos ( $p < 0.05$ ).

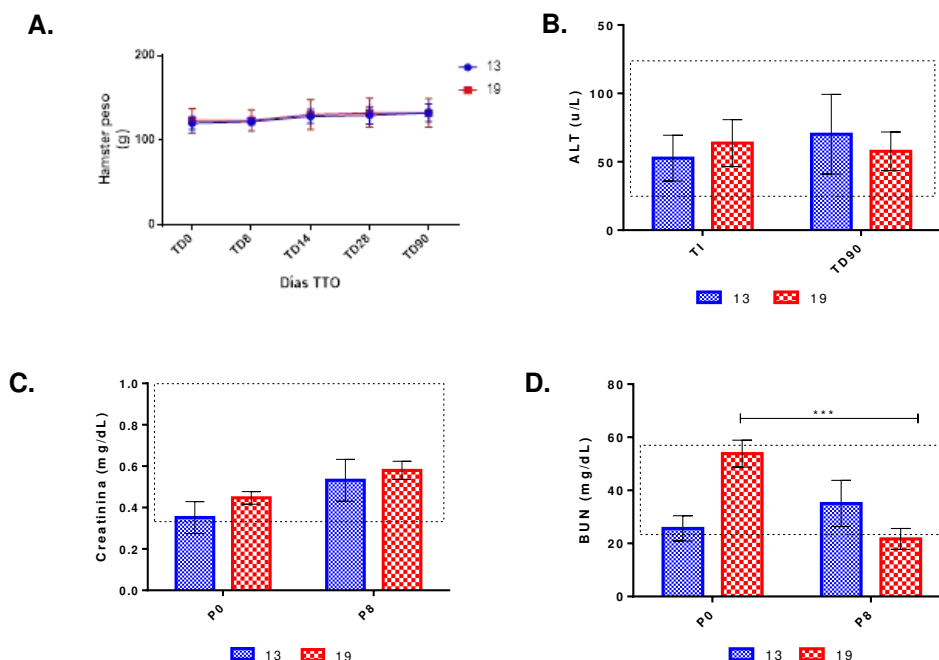
De acuerdo con el seguimiento de tamaño de la lesión durante y después del tiempo de tratamiento, se pudo observar que todos los compuestos indujeron de manera general, la reducción de entre el 40-61% del tamaño de la lesión, en comparación con el tiempo TD0 de seguimiento (Tabla 11). Cabe la pena resaltar, que durante el tratamiento, se observó el aumento leve del tamaño de las lesiones (entre 18 - 30%) en animales tratados con la mayoría de compuestos antileishmaniales y medicamento de control; sin embargo, los animales expuestos al alcaloide 19, mostraron aumento de lesiones solo en un 7 %, indicando con esto, que el alcaloide pudo ejercer la actividad antileishmanial durante el tiempo de tratamiento (Datos no mostrados).

**Tabla 11.** Seguimiento de tamaño de lesiones de leishmaniasis cutánea en hámsteres dorados, tratados con compuestos sintéticos.

Tratamiento	% Compuesto	Seguimiento tamaño lesión (mm <sup>2</sup> ±DE)		
		TD0	TD28	TD90
5	5	129,13 ± 14,85	71,57 ± 15,33	27,75 ± 16,99
7	2,58	150,77 ± 24,95	90,41 ± 13,72	51,04 ± 28,06
8	5	158,91 ± 25,27	69,84 ± 54,57	37,79 ± 36,63
13	1	85,52 ± 34,36	51,93 ± 47,89	27,53 ± 21,76
19	1	51,2 ± 36,96	29,72 ± 40,22	17,2 ± 23,99
Antimoniato de meglumina	N.A	134,57 ± 23,037	25,13 ± 27,31	9,146 ± 20,45

La Tabla resume los hallazgos obtenidos en los ensayos de evaluación In vivo. Mostrando la media de al menos 5 animales (Triterpenoides y Antimoniato de meglumina) y 6 animales (Alcaloides quinolínicos) y su correspondiente desviación estándar. TD0 (Fin de tratamiento), TD28-TD90 (Seguimiento después de tratamiento); DE (Desviación estándar)

Al analizar el peso de los animales antes, durante y después del tratamiento no se observan cambios significativos respecto al peso de cada animal para ninguno de los tratamientos con los alcaloides **13** y **19** (Figura 18A). La química sanguínea de cada uno de los animales tratados con los dos compuestos en estudio, muestran niveles normales de creatinina y alanina aminotransferasa (ALT) sin cambios aparentes en respecto a los valores de referencia para cada parámetro (Figura 18B-D); mientras que los niveles de nitrógeno uréico sanguíneo (BUN) en animales tratados con **19**, mostraron la disminución significativa en **19**, en comparación con el inicio de tratamiento. Estos resultados, fueron similares a los reportados en animales expuestos a los compuestos triterpenoides (**5,7** y **8**), en donde no se observaron efectos tóxicos evidentes, en referencia a los valores de ALT, BUN y creatinina (Datos no mostrados).



**Figura 18.** Peso (g), niveles de ALT, creatinina y BUN en suero de animales tratados con los compuestos **13** y **19** antes y después de tratamiento. Los datos corresponden a la media  $\pm$  DE de (a). Peso, (b) ALT, (c) Creatinina y (d) BUN, en suero de los hamsteres con LC antes del tratamiento P0 (T1) y después de tratamiento P8 (T90). Diferencias significativas entre grupos ( $p < 0.05$ ). Área punteada corresponde a valores de referencia para cada parámetro.

#### 4.4 Discusión

Dentro del desarrollo de medicamentos, la fase de identificación de candidatos terapéuticos y su evaluación *in vitro* y posterior *in vivo*, constituye la base para el diseño de tratamientos frente a *Leishmania* (22). Para cumplir con este fin, se evaluó la eficacia de los compuestos triterpenoides y alcaloides quinolínicos en el parásito libre (promastigote) e intracelular y de acuerdo a su selectividad frente al parásito, se seleccionaron para analizar su modo de acción y efecto terapéutico en Hamsteres.

Las terapias antileishmaniales a partir de moléculas triterpenoides y alcaloides quinolínicos se han estudiado ampliamente, en diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* de leishmaniasis (19,79,146), mostrando resultados prometedores, los cuales incluso, han alcanzado ensayos clínicos en fase II (Sitamaquina)(110,116).

El tamizaje de moléculas triterpenoides y alcaloides quinolínicos sintéticos inició con la evaluación de la citotoxicidad frente a varias líneas celulares (Mdmhu y J774) (Tabla 4-1 y

4-2). Partiendo de las moléculas de origen natural, se pudo establecer la reproducibilidad del método usado y la estabilidad de la actividad de los compuestos naturales, ya que estos mostraron valores en concordancia con lo reportado por Granados en 2013 (15). Los resultados mostraron que para los dos grupos de moléculas, las células que presentan mayor susceptibilidad a la exposición de estas moléculas son MdMhu, las cuales se caracterizan por ser células con cortos tiempos de vida, asemejándose a un escenario mas real de la enfermedad (147).

De acuerdo con lo anterior, dentro del grupo de triterpenoides se identificaron tres compuestos: dos pentacíclicos (**5** y **8**) y un compuesto tipo saponina (**7**); en donde los pentacíclicos **5** y **8** fueron al igual que la molécula plantilla (**1**), efectivos frente al amastigote de *L. (V.) panamensis*, pero no frente a la forma extracelular del parásito; lo cual se observo al comparar los IS en amastigotes (donde los compuestos fueron  $IS > 2$ ) en comparación a los promastigotes; sin embargo el compuesto **7** mostró algún tipo de selectividad, pero que al compararlo con los rangos de actividad fue categorizado como una molécula moderadamente efectiva para este estadio parasitario, reportando  $CE_{50} > 50$  y  $< 100 \mu M$  ( $61,9 \pm 28,7 \mu M$ ). Aunque el efecto citotóxico entre todos los compuestos pentacíclicos fue heterogenea, [donde el compuesto pentacíclico (**8**), mostró  $CL_{50}$  citotóxicas en macrófagos humanos y en la línea celular J774), mientras que los compuestos **5** y **7** reportaron toxicidades moderadas o bajas], la selectividad frente a macrófagos infectados (efectivos frente a amastigotes intracelulares), los hacen candidatos antileishmaniales valiosos.

Todos estos resultados, apuntan a posibles modos de acción que involucran la célula hospedera y/o al patógeno intracelular y que confirman los resultados *In vitro*, mostrados por Granados, D, en 2013, en donde la molécula plantilla **1** (15), exhibió comportamientos similares a los encontrados en el presente estudio y los cuales fueron comprobados, por medio de la evaluación de esta molécula en nuestro modelo biológico [ $CE_{50}$  (CDh y macrófagos peritoneales de hámster) entre  $10,7 \mu g/mL$  ( $18,9 \mu M$ ) y  $31 \mu g/mL$  ( $54,8 \mu M$ )].

Adicional a nuestros hallazgos, se ha demostrado el potencial terapéutico de este grupo de moléculas (limonoides, triterpenoides pentacíclicos y agliconas glicosiladas), frente a diferentes tipos de macrófagos (murinos y humanos) infectados con diferentes especies de *Leishmania* (*L. (L.) infantum*, *L. (L.) amazonensis* y *L. (V.) panamensis*), causantes de un amplio espectro de manifestaciones clínicas de la enfermedad (13,84,95); mostrando que

---

este tipo de compuestos podrían ser efectivos frente a diversas especies de *Leishmania*, causantes de LC en Colombia.

Teniendo en cuenta los resultados *In vitro*, fue considerada la evaluación de los compuestos en un modelo *In vivo*, por medio de la aplicación tópica, para el control de la leishmaniasis cutánea. Por esta razón, aunque existe una gran variedad de modelos animales para identificar el potencial terapéutico de diferentes compuestos antileishmaniales(148,149), en el presente trabajo se seleccionó el modelo de Hámster dorado (infección por *Leishmania* spp. en dorso), debido a factores como la heterogenicidad genética (outbreed), el desarrollo de lesiones a causa de especies dermatrópicas (con lesiones crónicas pero controladas) con evolución clínica con signos similares a los observados a humanos (150), la facilidad del seguimiento de tratamientos de administración tópica (la zona de inoculación no se ve perturbada por movimientos ni manipulación por parte del animal)(144) y a la experiencia del grupo de ensayos biológicos e inmunología de PECET y su investigadora principal la doctora Sara María Robledo. Como soporte de formulación, se eligió un vehículo cremoso, debido a su uso frecuente para el tratamiento de afecciones cutáneas, así como sus propiedades generales, que le permiten la absorción y liberación de compuestos polares y apolares, permitiendo que el principio activo este en contacto durante mas tiempo con la piel afectada (141,151).

Debido a la presencia de *L. (V.) panamensis* en la mayoría del territorio Colombiano y parte del continente americano (152), se evaluó el efecto terapéutico en hámsteres infectados por esta especie; mostrando en la mayoría de animales tratados con los compuestos sintéticos, evidente mejoría clínica, reflejado en porcentajes mayores al 60 %, de la reducción de lesiones y sin evidencia de efectos tóxicos luego de 90 días post- tratamiento (Figura 14-17).

Cabe resaltar, que los parámetros usados para categorizar el resultados de tratamiento tópico, se basaron en las guías para el manejo de la leishmaniasis, en donde se consideran criterios clínicos de curación: (i) la epitelización total de la lesión y aplanamiento del borde activo de la úlcera, (ii) la desaparición de la induración de la base, (iii) la cicatrización (5,153) y para el caso del Hamster dorado, (iv) la aparición de pelo en el sitio de la extinta lesión (144). Esto con el fin de aproximarse al seguimiento post-tratamiento sugerido en pacientes humanos, tratados con los medicamentos de primera línea.

Teniendo en cuenta lo anterior, los compuestos pertenecientes al grupo de triterpenoides pentacíclicos mostraron resultados prometedores; para el caso del triterpenoide **5**, se observó que el 100 % los animales tratados tuvieron mejoría clínica (disminución evidente del tamaño de lesión), evidenciado en la reducción de las lesiones entre el 55 a 61,23%, durante el seguimiento después de tratamiento (Tabla 9). Estos resultados (tratamiento tópico frente a *L. (V.) panamensis*), se pueden considerar promisorios, debido a su potencial terapéutico, evaluado en otros modelos *In vivo* [ratones BALB/c infectados con *L. (L.) amazonensis* (84)] y que suponen un amplio rango de actividad.

Por otro lado, el compuesto **8** indujo la curación clínica (cicatrización completa) de las lesiones del dorso del 20 % de los animales, mientras que el 60 % de los hámsteres, mostraron mejoría clínica significativa (evidenciado en la disminución de un 56% a 45,8% de las lesiones después del tiempo de tratamiento); estos resultados se adhieren a otros reportes, en donde se demuestra la actividad del compuesto, frente a otras formas clínicas de la enfermedad (Leishmaniasis Visceral) (95,154). Esto apunta a que el efecto de este pentacíclico, no está limitado a una manifestación clínica y podría servir como potencial tratamiento antileishmanial.

El otro compuesto antileishmanial sintético (**7**), perteneciente al grupo de triterpenoides glicosilados o saponinas, mostró una tasa de recuperación o mejoría clínica en el 80 % de los animales y de no respuesta del 20% en los animales infectados por *L. (V.) panamensis*, señalando su posible uso en el tratamiento de LC, el cual no había sido reportado para esta molécula en especial. Estos resultados, se muestran interesantes, debido a que aunque exhibieron menores índices de selectividad que el compuesto plantilla (**1**), el efecto terapéutico (*In vivo*) de los compuestos sintéticos, fue en general mucho más eficaz que el registrado en los estudios previos, en donde se reportó la mejoría clínica de solamente el 50% de los animales tratados con el limonoide(13,15). Adicionalmente, en la evaluación de los cambios de niveles séricos de ALT, BUN y creatinina, no se evidenciaron efectos tóxicos generados por parte de los compuestos (cambios asociados a tratamiento); lo que refuerza no solo el perfil de eficacia de los compuestos, sino también la seguridad de la administración tópica en el modelo animal.

Dentro de los alcaloides evaluados, se identificaron siete compuestos que comparten la estructura quinolínica, pero que difieren en la presencia de sustituyentes oxigenados y nitrogenados. Mientras que la molécula plantilla (**12**) tuvo citotoxicidad moderada, los

compuestos **13** y **19** fueron citotóxicos frente a los dos tipos de células evaluadas (Mdmhu y J774) ( $CL_{50} < 100 \mu M$ ). Sin embargo, aunque estos compuestos muestran ser citotóxicos en células hospederas, la actividad biológica contra amastigotes intracelulares de *Leishmania spp* fue selectiva, siendo mayor para el parásito que para las células hospederas, demostrado en la disminución de la carga parasitaria en células infectadas y en los índices de selectividad ( $IS > 3$ ). Estos hallazgos, son interesantes, debido a que se muestran  $CE_{50} < 50 \mu M$ , que los clasifican como activos y significativamente menores al triterpenoide **5**. Adicionalmente, se pudo evidenciar que dentro de este grupo de moléculas, se encuentra el compuesto mas potente de todos los evaluados (alcaloide **19**), ya que muestra concentraciones efectivas sustancialmente menores a las de los compuestos (Tabla 7).

Otra característica importante de estos compuestos (**12**, **13** y **19**), fue su efecto sobre promastigotes [reflejado en las  $CE_{50}$  ( $\mu M$ ) para cada uno de ellos- **12** ( $36,5 \pm 11,1 \mu M$ ), **13** ( $17,1 \pm 5,21 \mu M$ ) y **19** ( $9,98 \mu M \pm 4,9 \mu M$ )], reflejado en  $IS > 2$  (Tabla 7). Mostrando actividad similar a lo reportado por Granados, DG en 2011(14), en donde para el compuesto 12 tuvo concentraciones efectivas ( $CE_{50} = 34,5 \mu M$ ) cercanas a nuestro trabajo y sugiriendo la reproducibilidad y estabilidad de la molécula de origen Vegetal. Adicionalmente, se ha podido comprobar que este tipo de compuestos muestran una marcada selectividad por el estadio extracelular del parásito y que incluso se ha determinado el posible modo de acción [la afectación de la ultraestructura de los parásitos (daño a nivel de membrana celular)(155) y generación de estrés celular (daño oxidativo)(156)], mostrando un potencial antiparasitario no explorado para nuestros compuestos sintéticos.

En la validación terapéutica *in vivo*, los hámsteres curados clínicamente (33,3 %) por el compuesto **13**, no solamente redujeron durante el tiempo de seguimiento del 40 a 47% de las lesiones (Tabla 9), si no también en análisis histopatológicos, se observó que la piel de los animales tratados tuvieron procesos de re-epitelialización basado en la fibrosis de tejido mientras que en animales con mejoría clínica (66,6 %), no fue observado este comportamiento. Por otro, lado, en animales tratados con el compuesto **19**, mostraron la mejoría clínica del 33,3 % y cura en el 50 % de los animales tratados con el compuesto. Adicionalmente, el animal que no tuvo respuesta al tratamiento (16,7 %) fue capaz de controlar el tamaño de lesión de manera parcial, indicando que, para este sujeto, el

compuesto fue esencial en la inhibición del aumento del daño tisular por parte del parásito (Datos no mostrados).

Estos hallazgos demuestran que los compuestos **13** y **19** presentaron actividad antileishmanial frente a los dos estadios del parásito; y que el compuesto **19** por su parte, puede tener efecto directo contra el patógeno lo que se refleja en la poca presencia de parásitos en tejido epitelial de animales con mejoría clínica (Datos no mostrados). Adicionalmente, se pudo observar que estos compuestos no inducen cambios significativos en los parámetros de toxicidad en hámsters, ya que no hubo cambios relevantes en el peso de los animales, ni en los valores séricos de ALT, BUN y creatinina, indicando que los alcaloides **13** y **19** pueden ser candidatos terapéuticos -seguros- en el tratamiento de LC en humanos.

En general, los compuestos sintéticos tuvieron mejores tasas de cura clínica y mejoría en animales infectados por *L. (V.) panamensis*, en comparación con lo reportado previamente para el compuesto natural (**1** y **12**), en donde solamente se reportaron mejorías clínicas [83,3% (**12**) y 50% (**1**)] de los animales tratados de forma tópica (15). Todo esto indica que compuestos sintéticos con propiedades antileishmaniales, pueden ser usados como moléculas líderes (Lead-like) o cabeza de serie, para la optimización de la eficacia y seguridad (157) en el tratamiento de LC.

Al comparar la eficacia de los compuestos sintéticos, reflejado en la actividad *In vitro* e *In vivo*, se pudo establecer que los compuestos de tipo alcaloides quinolínicos mostraron mayores índices de selectividad, así como la evidencia de inducción de cura clínica (cicatrización de la lesión) en algunos animales. Sugiriendo que estas dos moléculas provenientes del grupo quinolínico, son en general, más potentes que las moléculas triterpenoides evaluadas.



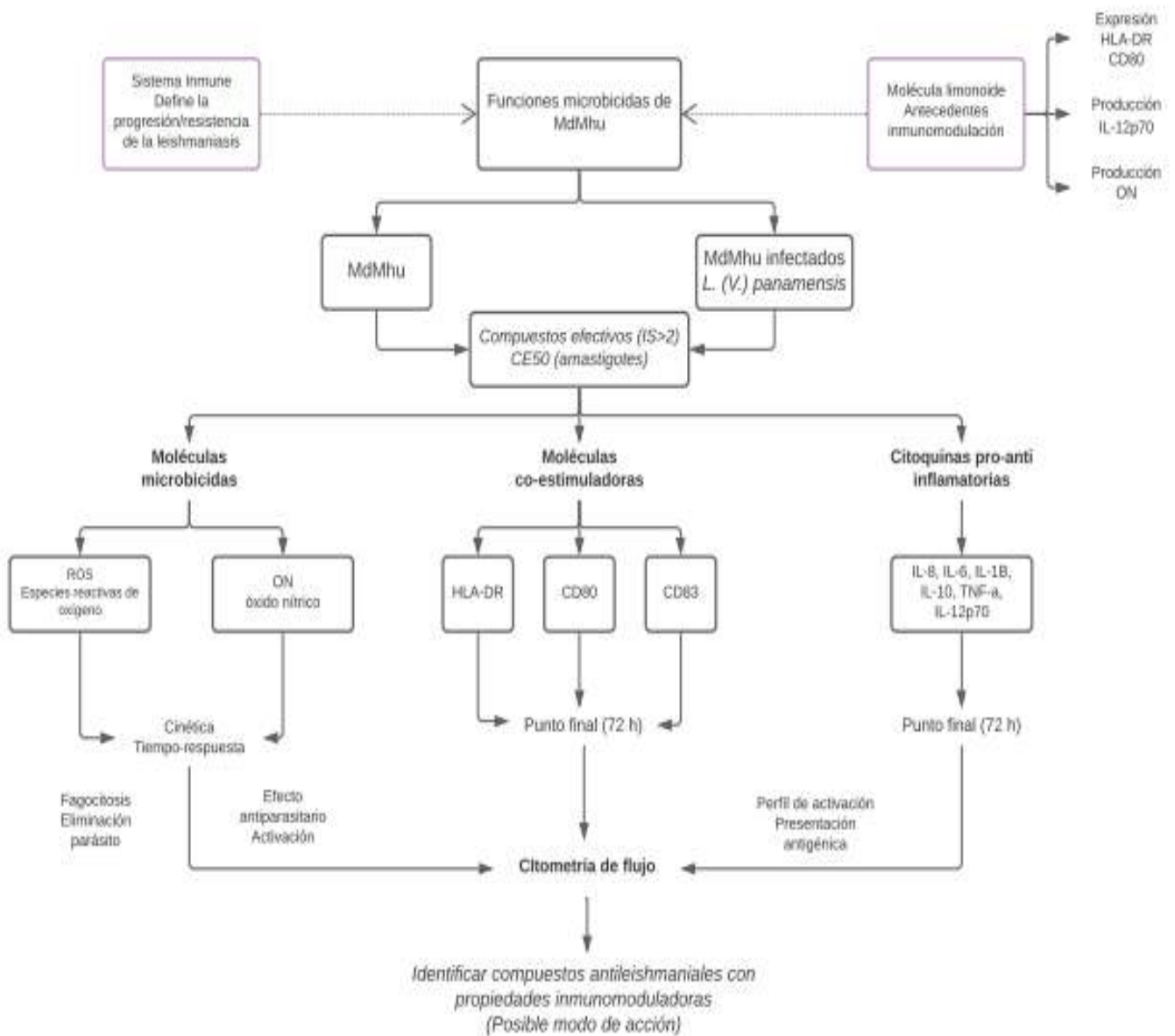
## **5 Evaluación del efecto de los análogos estructurales que tienen actividad antileishmania en la respuesta microbicida de los macrófagos infectados con *Leishmania (V.) panamensis***

Teniendo en cuenta que la leishmaniasis es una enfermedad modulada por varios factores además de la especie de *Leishmania* spp. infectante, como el compromiso inmune del hospedero, la búsqueda de nuevos tratamiento que activen o re-establezcan las funciones paraticidas de las células involucradas en la eliminación del parásito, se hace necesaria (56,123).

En esta búsqueda de compuestos moduladores, el Grupo de Investigación en Inmunotoxicología identificó la molécula de origen natural seco-limonoide 11,19-dihydroxy-7-acetoxy-7-deoxoichangin (Figura 3), la cual inducía de manera diferencial, la producción de óxido nítrico, IL-12p70 y la expresión de HLA-DR, MIP-1 y CD80, resultando en el control de la infección en células humanas(15).

Debido a lo anterior, se evaluó el efecto de los compuestos sintéticos análogos a la plantilla triterpenoide (Figura 3) y alcaloide quinolínico (Figura 4), que fueron previamente escogidos por su índice de selectividad frente a amastigotes intracelulares ( $IS > 2$ ), en la respuesta microbicida en macrófagos derivados de monocitos humanos (Mdmhu). Las funciones efectoras evaluadas de Mdmhu, se dividieron en tres grandes grupos: Moléculas microbicidas (Especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico (ON)), expresión de moléculas co-estimuladoras (HLA-DR, CD83 y CD80) y producción de mediadores solubles anti y pro-inflamatorios del macrófago (IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-12p70) (Figura 19).

## 5.1 Diseño experimental



**Figura 19.** Diseño experimental de la identificación de efecto de los compuestos sintéticos sobre funciones microbicidas de MDMhu infectados y no infectados.

## 5.2 Metodología

### 5.2.1 Evaluación de la inducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en macrófagos infectados y no infectados con *L. (V.) panamensis* y expuestos a los compuestos antileishmaniales

Macrófagos derivados de monocitos humanos fueron mantenidos en RPMI-1640 (Gibco, MA, USA) y suplementado 10 % SFB (HyClone; GE Healthcare, LC, UK) durante 72 h a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub>. Después de esto, las células fueron infectadas con promastigotes de *L. (V.) panamensis* a una relación 15:1 (parásitos: células) durante 24 h, a lo cual fueron expuestos a CE<sub>50</sub> (amastigotes intracelulares) de los compuestos seleccionados, durante 72 h a 36°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Células sin infectar también fueron expuestas a la CE<sub>50</sub> de los compuestos. Después de esto, células fueron despegadas por tripsinización (Stem-Cell, Vancouver, Canadá) y marcadas con 5 µM de la sonda fluorescente H<sub>2</sub>-DAF-FM (Sigma-Aldrich, MA, USA) para identificación de especies reactivas de oxígeno intracelular durante 45 minutos a 35°C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

Para identificar el punto tiempo en la cual los compuestos antileishmaniales inducen la producción de ROS en el macrófago, se realizó la cuantificación de la producción de ROS a las 4, 24, 48 y 72 h post-tratamiento. Para esto, MdmHu infectados con *L. (V.) panamensis* fueron expuestos a CE<sub>50</sub> de los compuestos con IS>2 e incubados en medio RPMI 1640 (Gibco, MA, USA) suplementado al 10 % de SFB (HyClone, GE HealthCare, LC, UK) a 35°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Cada día de lectura, una alícuota de las células infectadas fueron marcadas con 5 µM de H<sub>2</sub>-DAF-FM (Sigma-Aldrich, MA, USA), incubadas durante 45 minutos a 36°C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

La cuantificación de especies reactivas de oxígeno, fue determinada por citometría de flujo FACS-Canto II (Beckton Dickinson, NJ, USA), donde se analizó la fluorescencia en FL-1 por medio de Dot-plot e histograma de células (eventos positivos) e IMF. Células sin exposición a ningún tratamiento fueron usadas como control negativo, mientras que células expuestas a inductores de especies reactivas de oxígeno como 0,001 % de peróxido de oxígeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y 1 µM de Phorbol miristato acetato (PMA), fueron usadas como control positivo. La determinación fue llevada a cabo por duplicado en al menos cuatro experimentos independientes y en donde los datos reportados fueron el promedio y la desviación estándar de los ensayos.

### 5.2.2 Determinación de modulación de la producción de óxido nítrico en macrófagos infectados y no infectados con *L. (V.) panamensis* y expuestos a los compuestos antileishmaniales

Al igual que la determinación de ROS, los Mdmhu fueron mantenidos en RPMI-1640 (Gibco, MA, USA) y suplementado 10 % SFB (HyClone; GE HealthCare, LC, UK) durante 72 h a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub>. Después de esto, las células fueron infectadas con promastigotes de *L. (V.) panamensis* a una relación 15:1 (parásitos: células) durante 24 h, a lo cual fueron expuestos a las CE<sub>50</sub> de los compuestos seleccionados para amastigotes intracelulares, durante 72 h a 35°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Células sin infectar también fueron expuestas (CE<sub>50</sub>) de los compuestos. Después de esto, células fueron despegadas por tripsinización (Stem-Cell, Vancouver, Canadá) y marcadas con 1-10 µM de la sonda fluorescente DAF-FM (Sigma-Aldrich, MA, USA) para identificación de ON intracelular durante 60 minutos a 35°C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

Para identificar el punto tiempo en la cual los compuestos antileishmaniales inducen la producción de óxido nítrico en el macrófago, se realizó la cuantificación de la producción de ROS a las 4, 24, 48 y 72 h post-tratamiento. Para esto, Mdmhu infectados con *L. (V.) panamensis* fueron expuestos a CE<sub>50</sub> de los compuestos con IS>2 e incubados en medio RPMI 1640 (Gibco, MA, USA) suplementado al 10 % de SFB (HyClone, GE HealthCare, LC, UK) a 35°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Cada día de lectura, una alícuota de las células infectadas fueron marcadas con 5 µM de DAF-FM (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), incubadas durante 45 minutos a 35°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Para evaluar el posible modo de acción de los compuestos antileishmaniales, los compuestos con respuesta en la producción de ON, Mdmhu infectados fueron expuestos a las moléculas durante 72 h a 35°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de este tiempo, se expusieron al inhibidor de iNOS L-NMMA (1 mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MS, USA) y se realizó la medición de la producción de ON.

La cuantificación de especies reactivas de oxígeno fue determinada por citometría de flujo FACS-Canto II (Beckton Dickinson, USA), donde se analizó la fluorescencia en FL-1 por medio de Dot-plot e histograma de células (eventos positivos) e IMF. Células sin exposición

a ningún tratamiento fueron usadas como control negativo, mientras que LPS (10 ng/mL) y fito-hemaglutinina (PHA) (10  $\mu$ L/mL), se usaron como control positivo de producción de ON. La determinación fue llevada a cabo por duplicado en al menos cuatro experimentos independientes, en donde los datos reportados fueron el promedio y la desviación estándar de los ensayos.

### **5.2.3 Expresión de moléculas co-estimuladoras en macrófagos infectados con *L. (V.) panamensis* y expuestos a los compuestos activos**

MdMhu se mantuvieron en medio RPMI-1640 (Gibco, MA, USA), suplementado con SFB al 10 % (HyClone; GE Healthcare, LC, UK) durante 72 h a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de esto, la células fueron infectadas con promastigotes de *L. (V.) panamensis* a una relación 15:1 (parásitos: células) durante 24 h, a lo cual fueron expuestos a las CE<sub>50</sub> de los compuestos seleccionados para amastigotes intracelulares, durante 72 h a 36°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Células sin infectar también fueron expuestas a las CE<sub>50</sub> de los compuestos.

Al cabo de este tiempo, las células fueron despegadas por tripsinización, agregando 5 mL de Tripsina EDTA 1X (Lonza, Basilea, Suiza) durante 10 minutos a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>, tiempo al cual se agregaron PBS suplementado al 5 % de SFB (Hyclone, GE-HealthCare, LC, UK) para parar la reacción y se lavaron para realizar la marcación con 1  $\mu$ L del anticuerpo anti-human HLA-DR acoplado a APC (Beckton-Dickinson, NJ, USA), anti-human CD80 acoplado a FITC (Beckton Dickinson, NJ, USA) y anti-human CD83 acoplado a PE (Beckton-Dickinson, NJ, USA) e incubadas a 36°C durante 15 minutos y 5 % de CO<sub>2</sub>. AL cabo de este tiempo, las células fueron centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos y re-suspendidas en solución salina (Baxter, Illinois, USA), para su lectura por citometría de flujo.

La cuantificación de la expresión de HLA-DR-APC, CD80-FITC y CD83-PE en macrófagos, fue determinada por citometría de flujo FACS-Canto II (Beckton Dickinson, NJ, USA), donde se analizó la fluorescencia en FL-3, FL-2 y FL-1 por medio de Dot-plot e histograma de células (eventos positivos) e IMF. Células sin exposición a ningún tratamiento fueron usadas como control negativo, mientras que LPS (10 ng/mL), se usaron como control positivo de la expresión de la molécula. La determinación fue llevada a cabo por duplicado

en al menos tres experimentos independientes y los datos reportados fueron el promedio y la desviación estándar de los ensayos.

#### **5.2.4 Presencia de citoquinas pro y anti- inflamatorias en sobrenadante de cultivo de macrófagos infectados con *L. (V.) panamensis* y expuestos a los compuestos antileishmaniales**

Los sobrenadantes provenientes del cultivo de macrófagos infectados con *L. (V.) panamensis* expuestos a los compuestos antileishmaniales (100  $\mu$ L) fueron puestos en contacto con perlas provenientes al kit de citoquinas inflamatorias (Beckton Dickinson, NJ, USA) y que constituyen citoquinas como IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12p70. Los sobrenadantes fueron incubados a temperatura ambiente durante 3 h en total oscuridad. Después de este tiempo, los tubos fueron centrifugados a 200g por 5 minutos y se descartó el sobrenadante, adicionando 300  $\mu$ L de Wash Buffer (Beckton Dickinson, NJ, USA) para re-suspender el pellet. Las citoquinas fueron cuantificadas por medio de citometría de flujo FACS-Canto II (Beckton Dickinson, NJ, USA) donde se analizó la fluorescencia en FL-2 y FL-3 por medio de Dot-plot e IMF. Sobrenadante de células sin exposición a ningún tratamiento fueron usadas como control negativo, mientras que LPS (10 ng/mL) y PHA (10  $\mu$ L/mL), se usaron como control positivo de la expresión de la molécula. La determinación fue llevada a cabo por duplicado en al menos tres experimentos independientes y los datos reportados fueron el promedio y la desviación estándar de los ensayos.

##### **5.2.4.1 Análisis estadístico**

Los resultados de este proyecto, fueron analizados de acuerdo con los parámetros de cada método, y cada resultado se validó por la comparación frente a los controles establecidos para cada ensayo. Dependiendo del set de datos de cada ensayo, se realizó el análisis de normalidad de los datos y dependiendo de esto, se llevó a cabo el análisis de ANOVA de una o dos vías o Kruskal wallis. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo por el programa GraphPad Prism versión 6.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

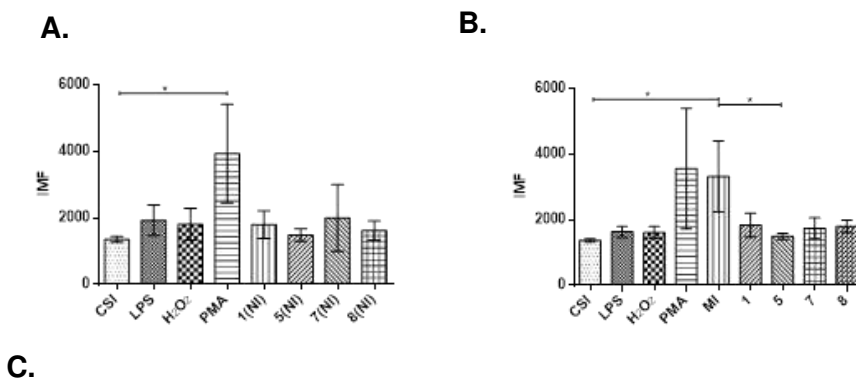
La significancia estadística en todos los casos, se estableció usando valores de significancia ( $P < 0.05$ ). En donde  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.005$ (\*\*\*) y  $p < 0.001$ (\*\*\*).

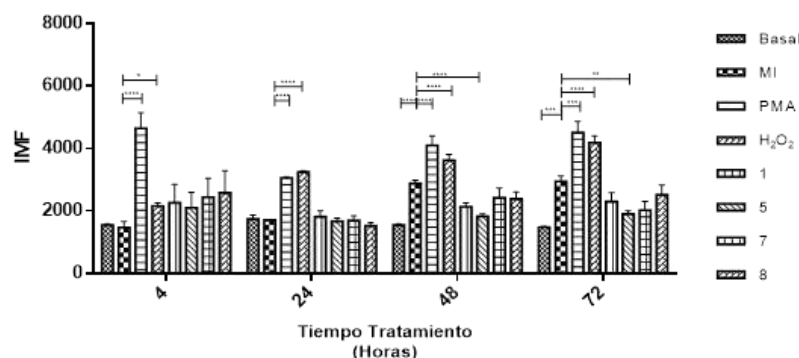
## 5.3 Resultados

### 5.3.1 Producción de ROS (Especies reactivas de oxígeno)

Teniendo en cuenta que la fase inicial de la infección del parásito, conlleva al proceso de fagocitosis, así como la activación de algunos mecanismos efectores de la célula hospedera, como la activación del complejo NADPH oxidasa y producción de especies reactivas de oxígeno(24,55). Se evaluó la modulación de la producción de especies reactivas de oxígeno en macrófagos expuestos a las  $CE_{50}$  de los compuestos con  $IS > 2$  Para esta evaluación se usó la sonda fluorescente diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína ( $H_2DCFDA$ ), la cual es una sonda permeable y que debido a su reducción, puede detectar la generación de intermediarios reactivos de oxígeno en macrófagos. Después del clivaje de grupos acetato por esterasas intracelulares, la sonda no fluorescente  $H_2DCFDA$  se convierte en la sonda altamente fluorescente 2,7-diclorofluoresceína (DCF).

Los compuestos triterpenoides no inujeron significativamente la producción de ROS en macrófagos no infectados, mientras que la exposición al PMA,  $H_2O_2$  y LPS indujeron el estallido oxidativo de forma evidente (Figura 20A). Al evaluar la producción de ROS en macrófagos infectados, fue evidente el aumento de la IMF en macrófagos infectados por *L. (V.) panamensis*, comparado con células sin infectar; al exponer las células infectadas al compuesto **5**, se disminuyó la producción de ROS de manera significativa (Figura 20B).





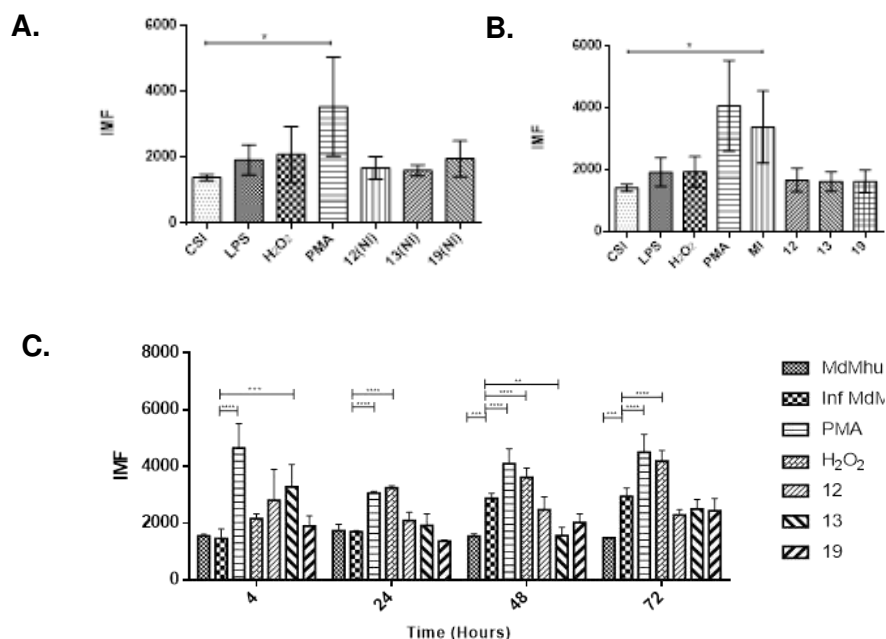
**Figura 20.** Producción de especies reactivas de oxígeno en MDMhu infectados y no infectados por *L. (V.) panamensis* y expuestos a triterpenoides antileishmaniales.

A. MDMhu no infectados y expuestos a triterpenoides a 72 h post-tratamiento. B. MDMhu infectados por *L. (V.) panamensis* y expuestos a triterpenoides a 72 h post-tratamiento. C. Cinética producción de ROS en MDMhu infectados y tratados. MI. Macrófagos infectados. PMA. Phorbol meristato acetato. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Peróxido hidrógeno. Significancia estadística \* $p < 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .

En la cinética de producción de especies reactivas de oxígeno, se evidencia que la infección con *L. (V.) panamensis* induce el aumento de ROS a partir de las 48 post-infección y se mantiene durante las siguientes 24 h. Al evaluar el comportamiento de PMA y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se pudo determinar que a partir de las primeras horas de exposición (4 h), estos inductores, aumentan significativamente la producción de radicales libre de oxígeno, manteniendo esta tendencia después de 72 h. Los compuestos triterpenoides muestran un aumento variable durante las primeras horas de tratamiento, sin embargo, se observa una tendencia a la baja durante los siguientes de tiempos de exposición, siendo mas evidente para el compuesto 5, el cual muestra la reducción significativa de ROS después de las 48 h post-tratamiento (Figura 20C).

La exposición de macrófagos no infectados e infecados a los compuestos alcaloides, no generó la modulación evidente en la producción de especies reactivas de oxígeno a las 72 h de tratamiento (Figura 13A y B).





**Figura 21.** Producción de especies reactivas de oxígeno en MDMhu infectados y no infectados por *L. (V.) panamensis* y expuestos a Alcaloides quinolínicos antileishmaniales.

*A.* MDMhu no infectados y expuestos a Alcaloides quinolínicos a 72 h post-tratamiento. *B.* MDMhu infectados por *L. (V.) panamensis* y expuestos a triterpenoides a 72 h post-tratamiento. *C.* Cinética producción de ROS en MDMhu infectados y tratados. MI. Macrófagos infectados. PMA. Phorbol meristato acetato. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Peróxido hidrógeno. Significancia estadística \* $p < 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .

La evaluación de la cinética del tratamiento mostró que los macrófagos infectados y expuestos al compuesto alcaloide **13** aumentaron la producción de ROS durante las primeras horas post-tratamiento (4h), sin embargo, durante las siguientes horas post-tratamiento (24-48 h) se disminuyó esta producción de radicales libres de oxígeno (Figura 21 C). Para los otros compuestos alcaloides, no se mostró modulación durante el tiempo de experimentación (4 h a 72 h), sugiriendo que el posible efecto antileishmanial de los compuestos alcaloides son independientes a los mecanismos involucrados en estallido oxidativo.

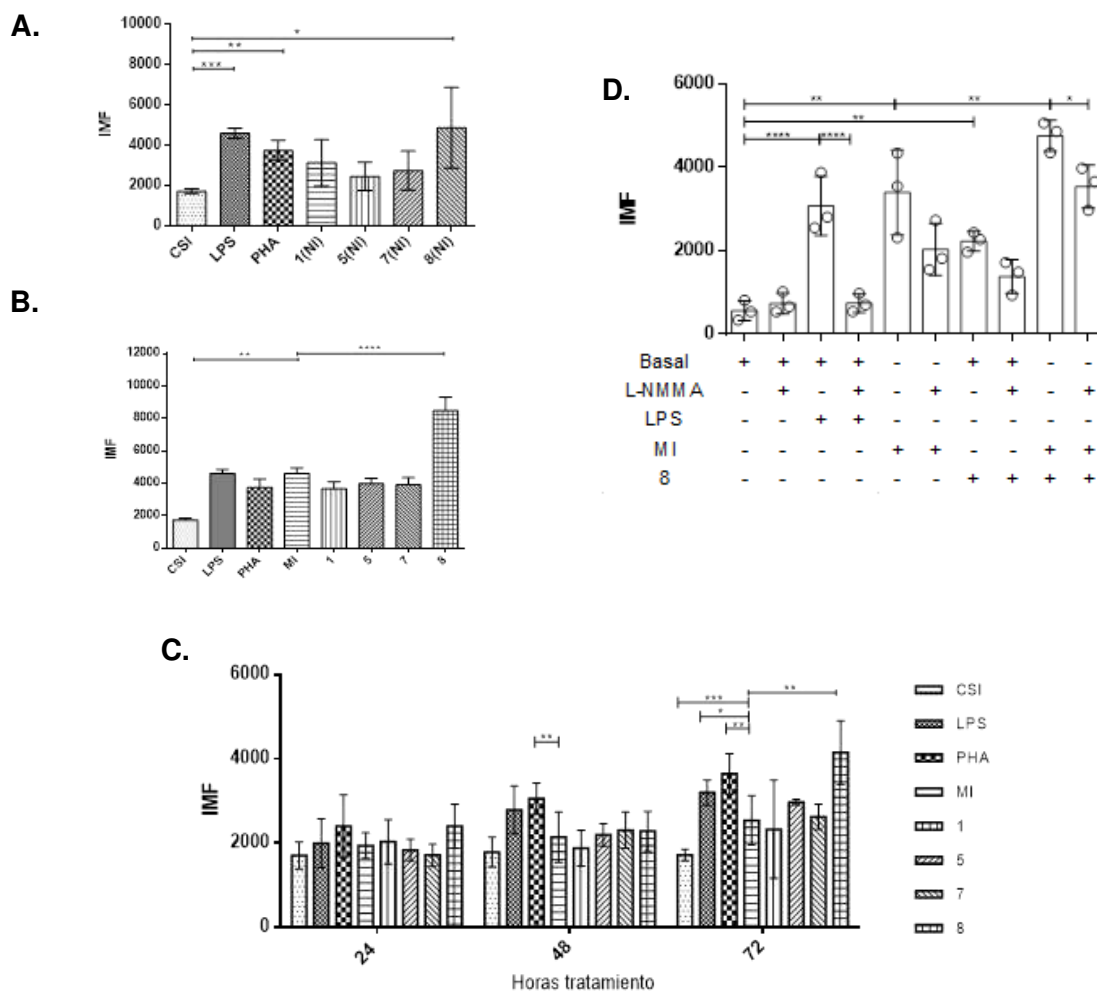
### 5.3.2 Inducción de la producción de óxido nítrico en macrófagos infectados por *L. (V.) panamensis*

Los macrófagos son células capaces de producir no solamente especies reactivas de oxígeno, sino también NO. Paradójicamente, estas células también constituyen células

blanco para *Leishmania*. En leishmaniasis experimental, los macrófagos son cruciales no sólo para la sobrevivencia del parásito, también para su eliminación. De la interacción del patógeno con estas células depende el tipo de activación y la vulnerabilidad del parásito a los mecanismos efectores. Es bien conocido que la producción de ON constituye el mejor mecanismo efector del macrófago frente a *Leishmania*(158); por esta razón se evaluó la capacidad de producción de NO intracelular de MdMhu expuestos a las concentraciones efectivas medias de los compuestos, por medio de DAF-FM.

Considerando que muchos compuestos pueden ejercer efectos no deseados en células hospederas, se evaluó la actividad de los compuestos en MdMhu sin infectar. La exposición a LPS y PHA, indujo de forma significativa la producción de NO. Al evaluar los triterpenoides en MdMhu no infectados, se observó que el compuesto **8** es capaz de inducir el aumento significativo de NO, en comparación con otros compuestos (Figura 22A). La modulación de NO por parte del compuesto **8**, fue evidente en MdMhu infectados, también después de las 72 h de tratamiento (Figura 22B), lo cual fue evidente en la cinética de producción (Figura 22C), sugiriendo que la producción de esta molécula microbicida se da después de establecida la infección.

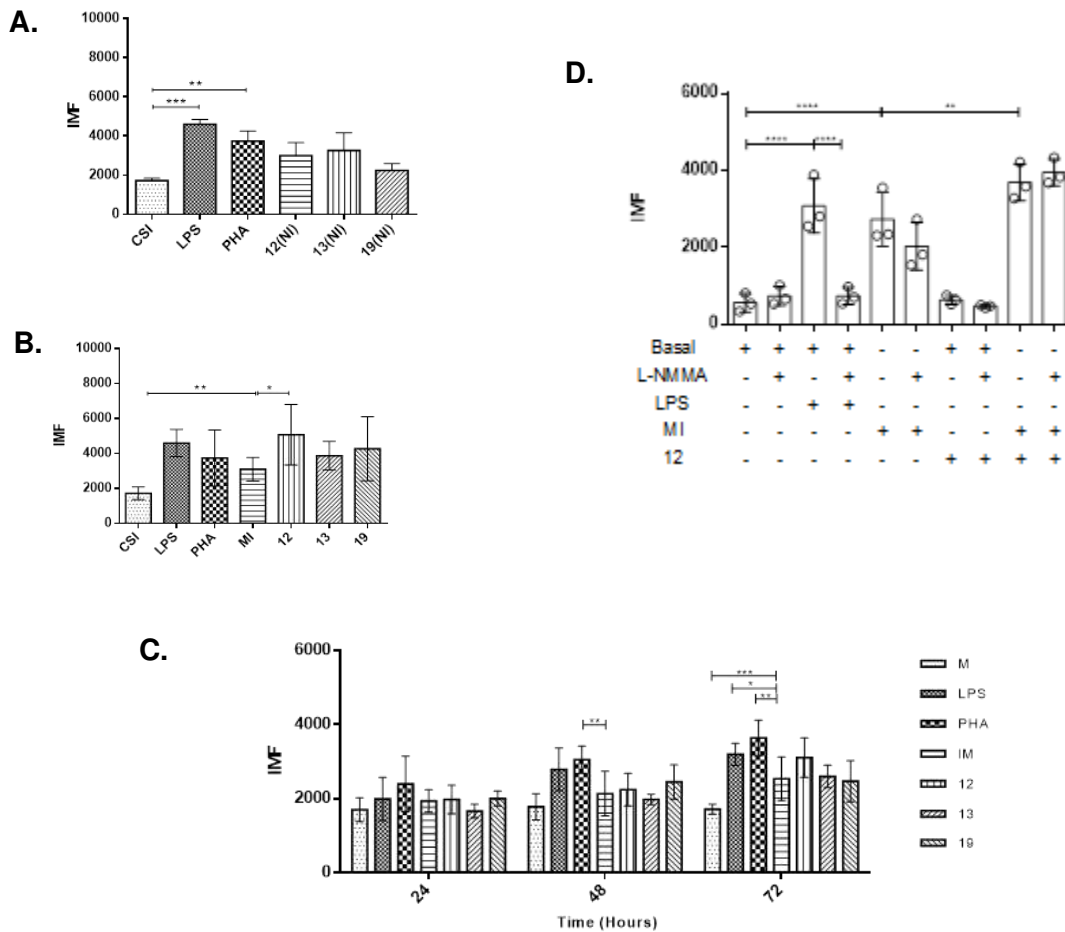
Para aproximarnos al posible modo de acción del compuesto **8**, se usó el inhibidor de iNOS L-NMMA. Las MdMhu sin tratar y expuestas al inhibidor, no mostraron efectos significativos en la producción de ON, mientras que la exposición a LPS, así como la infección por *L. (V.) panamensis* y exposición a L-NMMA mostró la disminución significativa de NO. Este fenómeno fue evidente en MdMhu infectados y tratados con el compuesto **8**, ya que la exposición al inhibidor L-NMMA, mostró una disminución significativa en la producción de NO (Figura 22D).



**Figura 22.** Producción de óxido nítrico (NO) en Mdmhu infectados y no infectados por *L. (V.) panamensis* y expuestos a triterpenoides antileishmaniales

*A.* Mdmhu no infectados y expuestos a triterpenoides 72 h post-tratamiento. *B.* Mdmhu infectados por *L. (V.) panamensis* y expuestos a triterpenoides a 72 h post-tratamiento. *C.* Cinética producción de NO en Mdmhu infectados y tratados. *D.* Inhibición de NO en Mdmhu expuestos a 8. MI. Macrófagos infectados. PMA. Phorbol meristato acetato. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Peróxido hidrógeno. L-NMMA (N-monometil-L-arginina). Significancia estadística \* $p < 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .

Al evaluar la producción de NO en Mdmhu expuestos a los alcaloides quinolínicos, no se observó la producción de NO, mientras que en Mdmhu infectados se pudo evidenciar que la exposición al compuesto **12**, aumentaba significativamente la presencia de NO intracelular (Figura 23A y B). La cinética de producción de ON de esta molécula, mostró que a partir de las 72 h de exposición, hay un aumento significativo respecto a células infectadas (Figura 23C).



**Figura 23.** Producción de óxido nítrico en Mdmhu infectados y no infectados por *L. (V.) panamensis* y expuestos a triterpenoides antileishmaniales

A. Mdmhu no infectados y expuestos a alcaloides quinolínicos 72 h post-tratamiento. B. Mdmhu infectados por *L. (V.) panamensis* y expuestos a triterpenoides a 72 h post-tratamiento. C. Cinética producción de NO en Mdmhu infectados y tratados. D. Inhibición de ON en Mdmhu expuestos a 8. MI. Macrófagos infectados. PMA. Phorbol meristato acetato. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Peróxido hidrógeno. L-NMMA (N-monometil-L-arginina). Significancia estadística \*p < 0.05, \*\*p ≤ 0.01, \*\*\*p ≤ 0.001, \*\*\*\* p ≤ 0.0001

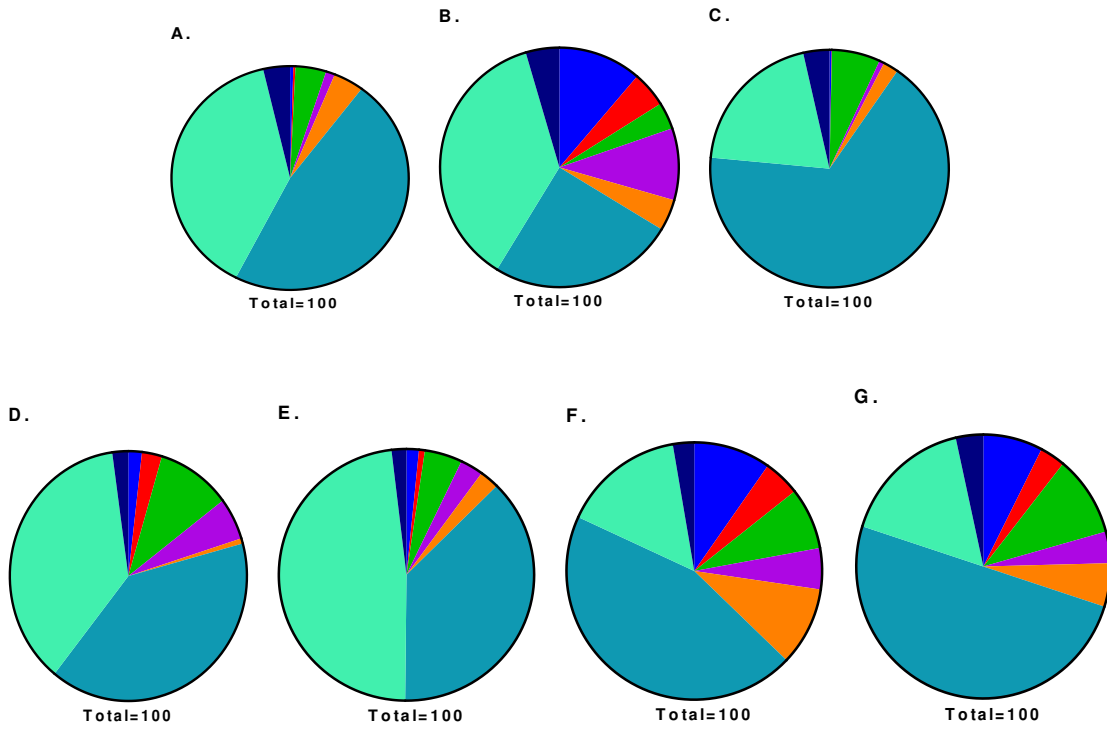
Al usar el inhibidor L-NMMA, se pudo evidenciar que la exposición de Mdmhu infectados y tratados con el alcaloide **12**, y expuestos al inhibidor de iNOS no induce la disminución de ON en estas células, sugiriendo que este compuesto puede tener modos de acción diferentes a los modulados por LPS. Estos resultados sugieren que el alcaloide **12** tiene la propiedad de inducir una mayor producción de ON, cuando se establece la infección dentro de Mdmhu infectados (72 h) y que su efecto es dependiente del antígeno (parásito) (Figura 23D).

### 5.3.3 Evaluación de la expresión de HLA-DR, CD80 y CD83 en macrófagos infectados

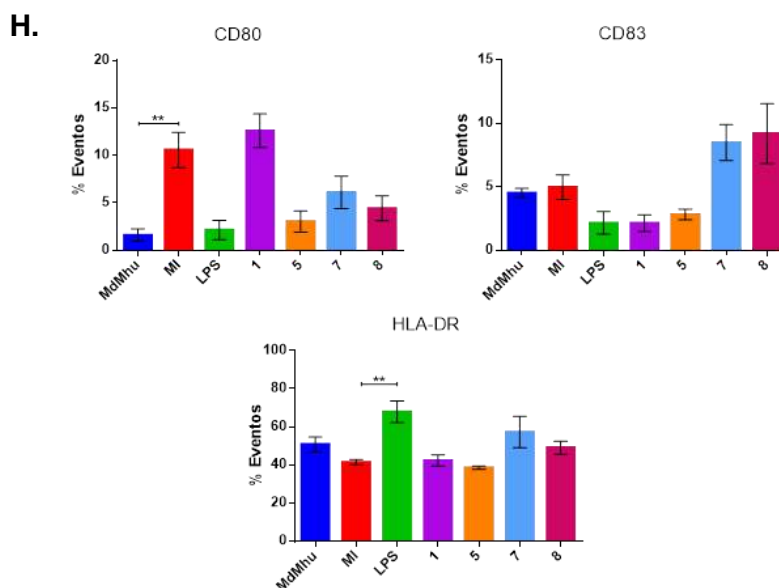
En adición a las actividades microbicidas del macrófago, la presentación antigénica cumple un papel relevante en el control de la enfermedad, ya que constituye una *etapa* de transición entre la respuesta innata y adaptativa en el hospedero. Sin embargo, *Leishmania* puede inhibir la habilidad del huésped de mostrar distintos antígenos del parásito y otros componentes del sistema inmune (Shio et al, 2012). Cuando los macrófagos internalizan al parásito, sus antígenos son procesados y situados en la membrana externa, donde pueden ser reconocidos por células T CD4 ayudadoras, para iniciar una respuesta celular adaptativa(7,56).

El porcentaje de células que expresan en su superficie la molécula HLA-DR, en todos los casos fue mayor al 30 %, en donde los MdMhu que fueron expuestos a LPS, tuvieron porcentajes mayores al 60 %, confirmando la activación por parte de esta molécula, de vías involucradas en la regulación positiva de la molécula. La expresión de moléculas co-estimuladoras CD80 o CD83, fue homogéneo entre los diferentes tratamientos, en donde el porcentaje de células que expresaban estas moléculas no fue mayor al 15 % (Figura 24H).

Al comparar la multi-expresión de moléculas co-estimuladoras entre tratamientos, se pudo observar que en macrófagos sin infectar, así como con la exposición a LPS predominó la expresión de HLA-DR (47.25 % y 66,85 %, respectivamente) (Figura 24A-C); mientras que la exposición al parásito aumentó el porcentaje de células que expresaron HLA-DR, CD80 y CD83, simultáneamente (11,275 %) (Figura 24D). El tratamiento de células infectadas con los compuestos triterpenoides, mostró que los compuestos **1** y **5** tuvieron menor proporción de células que expresaron las tres moléculas (HLA-DR, CD80 y CD83) de forma simultánea (2,18 % y 1,57 %, respectivamente), en comparación con células infectadas y los demás triterpenos (Figura 24D-G).



	Blue	Red	Green	Purple	Orange	Light Blue	Dark Blue	Cyan
HLA-DR	+	-	+	-	-	+	+	-
CD80	+	+	+	+	-	-	-	-
CD83	+	+	-	-	+	-	+	-

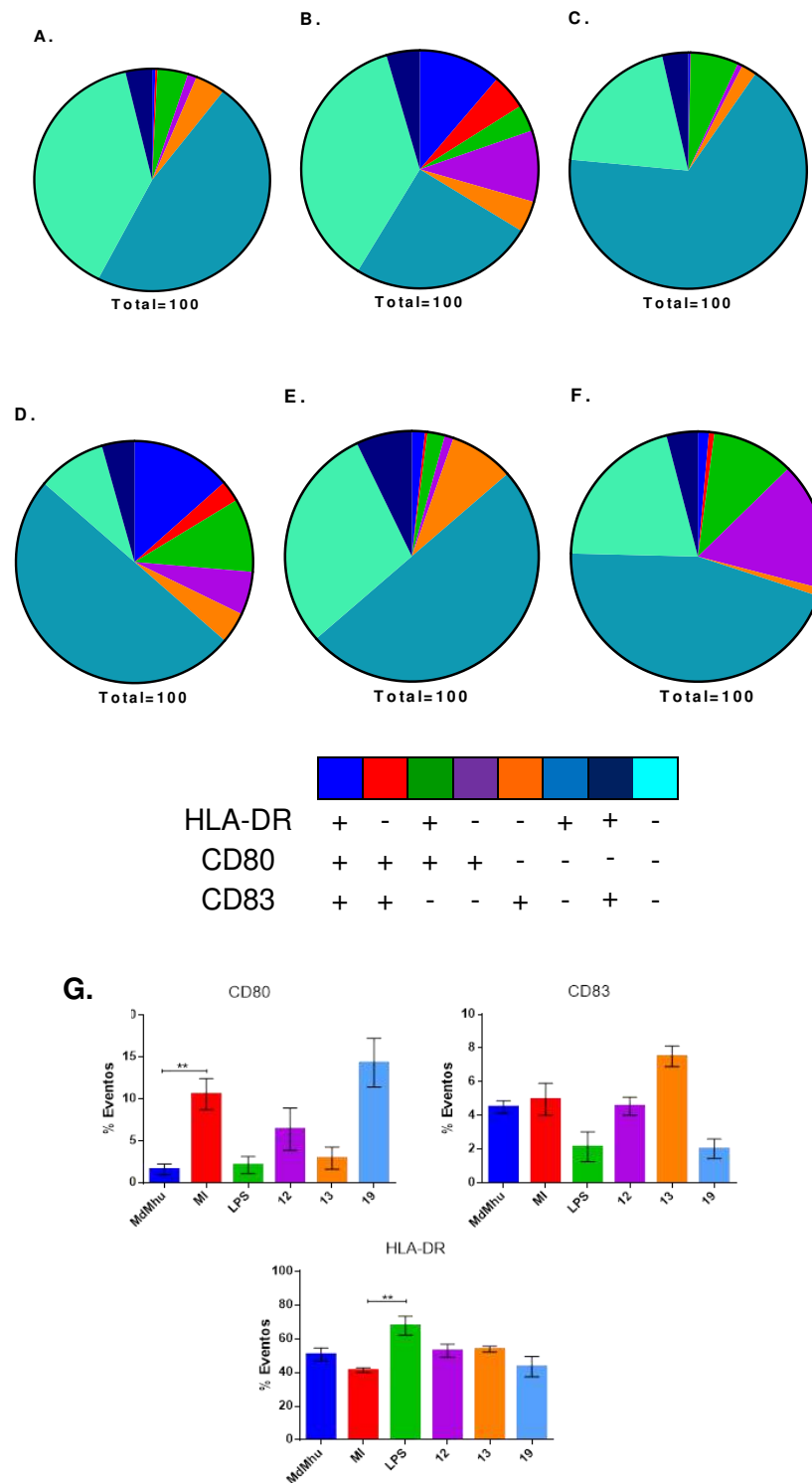


**Figura 24.** Expresión de moléculas co-estimuladoras en MdMhu infectados por *L. (V.) panamensis* y expuestos a triterpenoides.

Expresión múltiple de moléculas co-estimuladoras HLA-DR, CD80 y CD83 en MdMhu infectados. A. MdMhu sin infectar. B. MdMhu infectados por *L. (V.) panamensis*. C. MdMhu + LPS. MdMhu infectados y tratados con. D. 1. E.5. F.7.G.8. H. Expresión individual de marcadores en cada tratamiento. Significancia estadística \* $p < 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$

La expresión de las moléculas HLA-DR, CD80 y CD83 en MdMhu infectados y expuestos a los compuestos alcaloides no mostraron diferencias significativas, respecto a MdMhu infectados. Sin embargo, el compuesto **19** mostro un leve aumento en la expresión de CD80, comparado con los demás tratamientos (Figura 25G).

La multi-expresión de las moléculas co-estimuladoras en MdMhu infectados y tratados con los alcaloides, mostraron que la exposición a los compuestos **13** y **19**, disminuían de forma evidente la expresión de las tres moléculas (HLA-DR, CD80 y CD83) (1,66% y 1,39%, respectivamente), respecto a MdMhu infectados y los tratados con el compuesto **12** (13,6%) (Figura 17D-F). Adicionalmente, MdMhu expuestos a **12**, mostraron un menor porcentaje de células carentes de la expresión de estas moléculas (9,9 %), comparado con el control infectados y los demás alcaloides evaluados (Figura 25D).



**Figura 25.** Expresión de moléculas co-estimuladoras en Mdmhu infectados por *L. (V.) panamensis* y expuestos a Alcaloides quinolínicos.



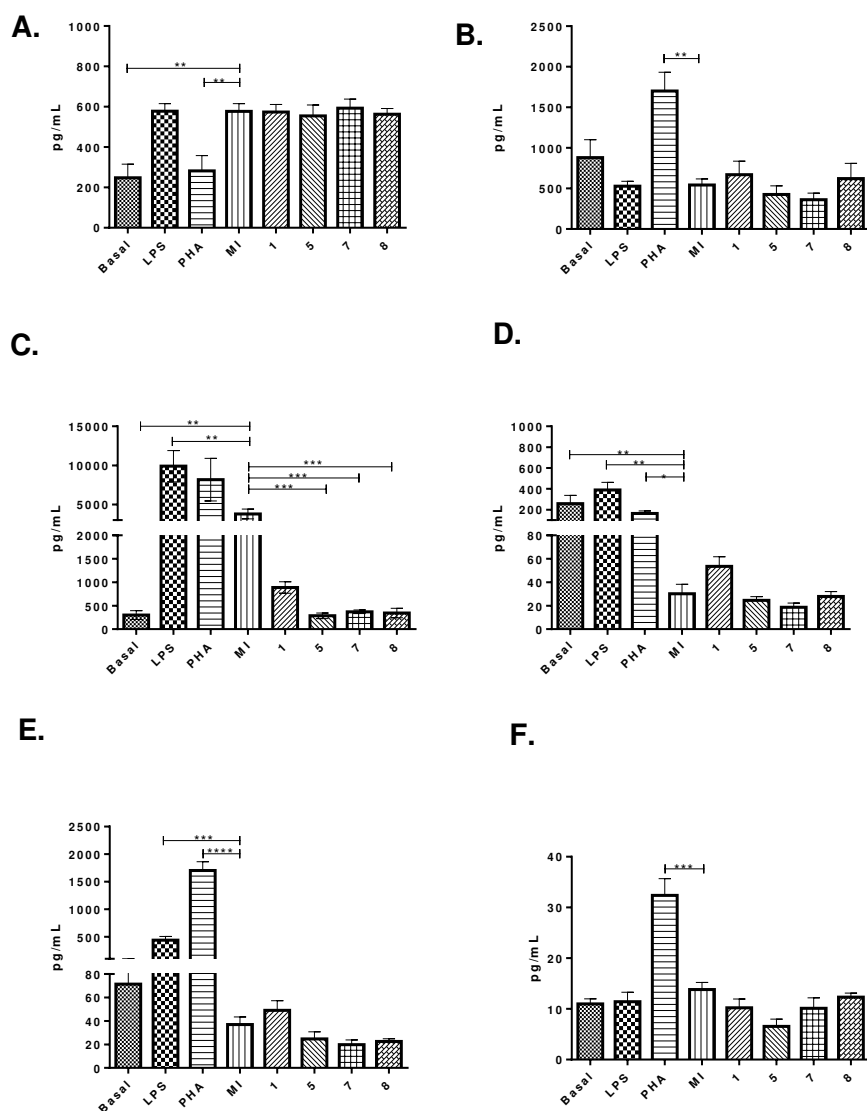
---

Expresión múltiple de moléculas co-estimuladoras HLA-DR, CD80 y CD83 en MdMhu infectados. A. MdMhu sin infectar. B. MdMhu infectados por *L. (V.) panamensis*. C. MdMhu + LPS. MdMhu infectados y tratados con. D. 12. E.13. F.19.G. Expresión individual de marcadores en cada tratamiento. Significancia estadística \* $p < 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .

### 5.3.4 Producción de citoquinas pro y anti-inflamatorias en macrófagos infectados y expuestos a compuestos naturales sus sintéticos análogos

Después del proceso de fagocitosis, la célula hospedera produce moléculas de señalización, las cuales son proteínas de bajo peso molecular y que median la comunicación intracelular. Estas moléculas orquestan una gran variedad de procesos que regulan inflamación, proliferación celular, quimiotaxis y reparación de tejido. La infección por *Leishmania* no es ajena a este proceso, ya que parte del resultado de la enfermedad se debe en gran parte a la presencia producidas durante el proceso de infección (159,160). Por esta razón, fue necesaria la determinación de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  y IL-12p70, anti-inflamatorias IL-10 y quemoquinas como IL-8 (CXCL8) en MdMhu infectados vs. MdMhu infectados expuestos a los compuestos antileishmaniales

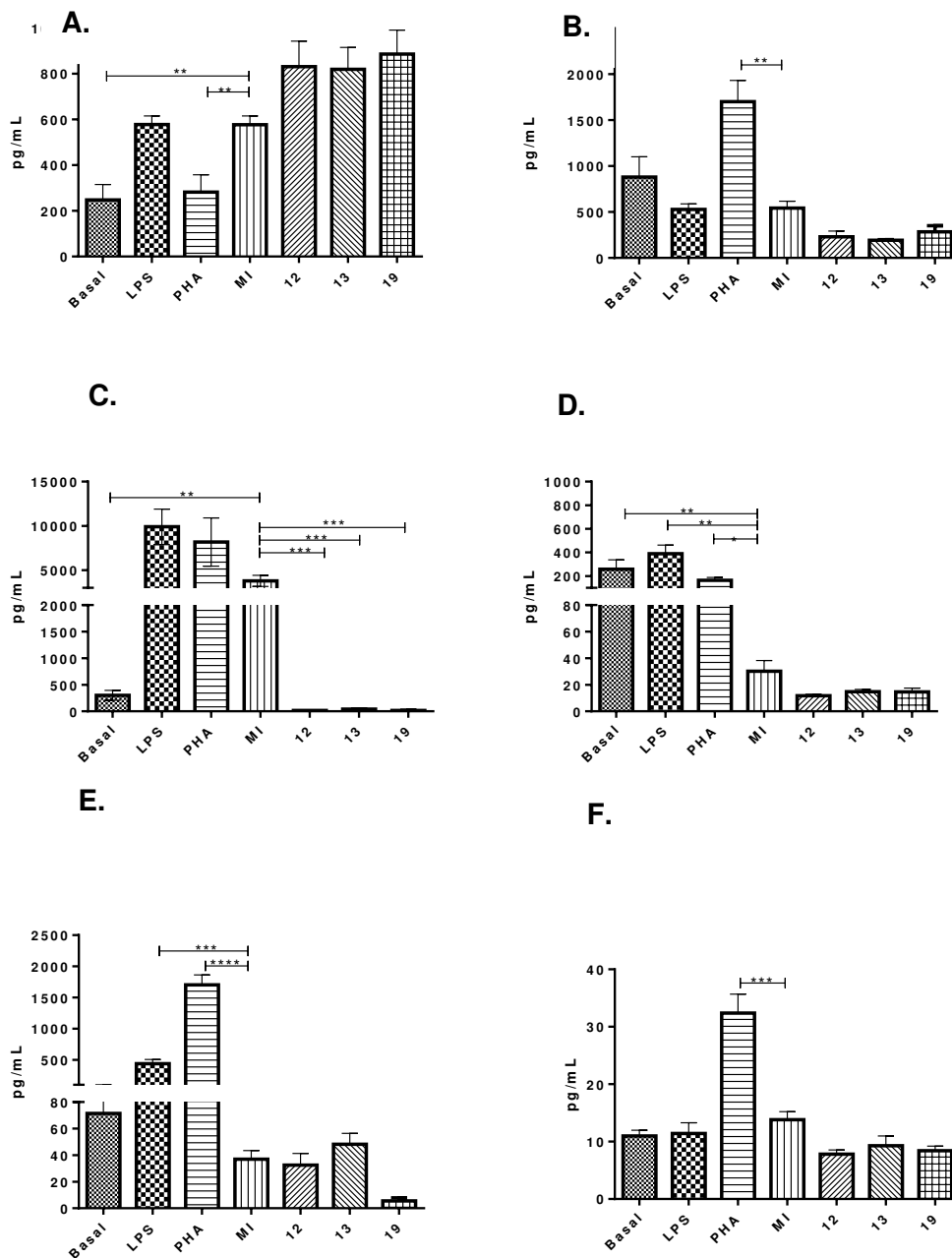
Al exponer MdMhu a LPS y PHA se demostró que estos dos antígenos son capaces de inducir procesos inflamatorios mediados por la producción de IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-12p70, así como la inducción de la citoquinas anti-inflamatoria IL-10, después de 72 h de tratamiento (Figura 26A-D). La infección por *L. (V.) panamensis* indujo el aumento evidente en la producción de las citoquinas IL-8 e IL-6, comparado con macrófagos sin infectar, mientras que las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-10 y TNF- $\alpha$  se vieron disminuidas dramáticamente (Figura 18A-D). Al exponer las células infectadas a los compuestos triterpenoides, se pudo establecer que la exposición a los compuestos 5, 7 y 8 redujo la producción de IL-6, en comparación con macrófagos infectadas y que esta disminución se asemeja al control sin infectar (Figura 26C).



**Figura 26.** Citoquinas pro y anti-inflamatorias en MdMhu infectados por *L. (V.) panamensis* y expuestos a compuestos triterpenoides. Citoquinas provenientes de sobrenadantes de cultivos celulares de MdMhu expuestos a tratamientos. A. IL-8. B. IL-1B. C. IL-6. D. IL-10. E. TNF-a y F. IL-12p70. Significancia estadística \* $p < 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .

La evaluación de los sobrenadantes de MdMhu infectados y expuestos a los alcaloides quinolínicos mostró que los tres alcaloides disminuyeron notoriamente la producción de IL-6 en comparación con MdMhu infectados y los activadores LPS y PHA (Figura 27C), en

donde se hace mas evidente la reducción de IL-6, en MdMhu infectados y tratados con el compuesto alcaloide **19**.



**Figura 27.** Citoquinas pro y anti-inflamatorias en MdMhu infectados por *L. (V.) panamensis* y expuestos a compuestos alcaloides quinolínicos.

Citoquinas provenientes de sobrenadantes de cultivos celulares de MdMhu expuestos a tratamientos. A. IL-8. B. IL-1B. C. IL-6. D. IL-10. E. TNF- $\alpha$  y F. IL-12p70. Significancia estadística \* $p < 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .

## 5.4 Discusión

Los macrófagos son la primera línea de defensa contra diversos patógenos a través de su actividad microbicida y secreción de citoquinas pro-inflamatorias, en orden de establecer la presentación con la respuesta adaptativa. Estas células son las hospederas finales para la proliferación de *Leishmania* y la clave para controlar o exacerbar la respuesta que culmina en manifestaciones clínicas (43,44,60).

Se pudo observar que la infección por *L. (V.) panamensis* desencadenó procesos microbicidas en MdMhu, como la producción de especies reactivas de oxígeno desde las 48 hasta las 72 h post-infección (Figura 20A-B), indicando la generación de ROS mediado por el estallido oxidativo después de establecida la infección en el hospedero. A las 72 h de infección, el macrófago produjo un aumento significativo de ON (Figura 22C) indicando la activación de la célula hospedera hacia un fenotipo M1 (52,53). Esta evidencia está respaldada por la expresión simultánea de 2 a 3 moléculas co-estimuladoras (HLA-DR, CD80 y CD83), las cuales son las encargadas de la presentación antigénica frente a linfocitos CD4<sup>+</sup> (161,162), así como la producción de IL-6 e IL-8 (CXCL8), las cuales hacen parte del fenotipo inflamatorio de los macrófagos M1 (45,159,163). Cabe la pena resaltar, que aunque el macrófago se activa hacia un fenotipo M1 y existe evidencia de los procesos microbicidas de la célula hospedera, estos no fueron suficientes para la eliminación del parásito, ya que a las 72 h de exposición al parásito, se observan porcentajes de infección mayores al 70%.

Teniendo en cuenta lo anterior y la evidencia reportada anteriormente por nuestro grupo de investigación, en donde la molécula triterpenoide **1**, indujo la producción de ON, así como la expresión de moléculas co-estimuladoras y la secreción de citoquinas pro-inflamatorias que provocaron la eliminación y control del parásito en células dendríticas(15); y a los reportes de varios autores, que señalan no solo este grupo de moléculas (triterpenoides), sino también a compuestos nitrogenados de tipo alcaloides quinolínicos, como compuestos antileishmaniales y moduladores de la respuesta inmune para el control del parásito

(95,164–168). En este estudio se evaluó la capacidad inmunomoduladora de las moléculas antileishmaniales previamente seleccionadas ( $IS > 2$ ) en nuestro modelo escogido (MdMhu).

La exposición de MdMhu infectados por *L. (V.) panamensis* a cada uno de los compuestos triterpenoides mostró efectos diferenciales para cada tratamiento utilizado. El potencial inmunomodulador del compuesto plantilla (**1**) solo fue evidente a través de la producción de citoquina IL-6, la cual se vio disminuida y llegó a concentraciones reportadas por el control negativo, así como la expresión de moléculas co-estimuladoras (169). Estos resultados, complementan los hallazgos encontrados por Granados en 2013, indicando que el efecto inmunomodulador está dirigido hacia células presentadoras de antígeno profesionales (células dendríticas) y la activación de la respuesta celular (15). Resultados similares fueron reportados en MdMhu infectados por el compuesto tipo saponina (**7**), el cual indujo la reducción de IL-6 y la expresión simultánea de 2 o más moléculas co-estimuladoras en la superficie de la célula hospedera, limitando la infección en los MdMhu y contribuyendo a la mejoría clínica de los animales expuestos a este compuesto (Figura 14-15C). Estos hallazgos se apoyan en reportes en donde este compuesto juega un papel relevante en la protección de diferentes tipos de células y en la modulación del balance entre los perfiles Th1, Th2, Th17 y Treg (170,171).

De los 4 triterpenoides evaluados, el compuesto **5** (pentacíclico) provocó la reducción evidente, de especies reactivas de oxígeno después de las 48 h de tratamiento y la disminución de IL-6 a las 72 h de tratamiento. Sugiriendo que la actividad del compuesto puede estar involucrada en la protección de la célula hospedera del estallido oxidativo inducido por el establecimiento de la infección (52,56) y posiblemente, en la estimulación de mejoría clínica de los animales tratados con este triterpenoide, previniendo la exacerbación de la inflamación y por lo tanto limitando la severidad de las lesiones (Figura 14-15B). La actividad antioxidante y la ausencia de la producción de ON de este triterpenoide, ha sido encontrada en diferentes modelos de leishmaniasis (84,89,90), lo cual sugiere que su actividad es independiente a los mecanismos efectores del macrófago evaluados en este estudio.

Dentro de estas moléculas antileishmaniales, el único compuesto que mostró potencial inmunomodulador fue el triterpenoide **8**, en donde su efecto indujo el aumento evidente de ON, pero no de ROS, después de las 72 h de exposición. Cabe resaltar, que aunque el

efecto del compuesto no está dirigido específicamente hacia macrófago infectado, se evidencia un mayor aumento de IMF (producción de ON intracelular), comparado con MdMhu sin infectar. Estos resultados son similares a los encontrados por Ukil et al, en el 2011, donde se observa el incremento de ON en macrófagos peritoneales de ratones BALB/C infectados por *L. (L.) donovani* (154) y el efecto curativo en LV experimental causado por la exposición al triterpenoide pentacíclico **8** (95). Teniendo en cuenta nuestros resultados, los cuales incluyen la inhibición de la producción de ON por parte del inhibidor L-NMMA en MdMhu infectados y expuestos al triterpenoide, se podría sugerir, que al igual que los estudios realizados por Jeong, J, 2002 y después Ukil et al, 2011 y Gupta et al, 2017, que la actividad del compuesto, puede estar involucrada en la activación de iNOS a través de regulación positiva de NF-kB (87,154,172). Para nosotros este hallazgo es relevante debido al efecto dilucidado en este estudio sobre MdMhu y la especie infectante *L. (V.) panamensis*, así como los resultados obtenidos en los ensayos *In vivo*, en donde el tratamiento mostró curación del 20% y mejoría del 80% de los animales (Figura 14-15D), cobran gran importancia debido a la relevancia clínica que tiene esta forma clínica causada por esta especie del parásito en el país (152,173).

Por otra parte, decidimos evaluar el potencial inmunomodulador de los alcaloides quinolínicos, debido a estudios realizados por otros investigadores, en donde se ha comprobado el efecto de estos compuestos en la respuesta inmune (6,164,174) y a la necesidad de comprobar el efecto de estos compuestos en nuestro modelo. De acuerdo a lo anterior, al evaluar el efecto de la molécula plantilla (**12**), se esperaba que no tuviera actividades significativas en las propiedades efectoras de la célula, según lo reportado por Granados et al 2013 (15), en donde esta molécula presentaba propiedades antileishmaniales e independientes de la activación de la célula presentadora de antígeno; sin embargo, en el presente estudio, se pudo determinar el aumento de ON después de 72 h de tratamiento, así como la expresión concomitante de moléculas co-estimuladoras, sugiriendo también un potencial inmunomodulador. Al evaluar el posible mecanismo de inducción de ON en el macrófago, por medio del uso del inhibidor L-NMMA, se pudo establecer que esta molécula podría no estar afectando directamente la vía de señalización de NF-kB para la inducción de iNOS y que su modo de acción involucra otro tipo de activación (175). Estos hallazgos, complementan a los reportados por Granados en 2013, ya que nuestro estudio evaluó la producción de ON desde las 24 hasta 72 h en MdMhu, comprobando que la producción de ON, se genera a partir de las últimas horas de

---

tratamiento (72 h), en comparación con los estudios previos, en donde la evaluación se realizó a las 48 h y en células dendríticas(15); lo que sugiere la futura evaluación de este compuesto en CD después de las 48 h de exposición, para comprobar el efecto dual de alcaloide sobre diferentes células presentadoras de antígeno; ya sea como inmunomodulador en hMDM y con efecto directo en el parásito-y que su actividad depende del tipo de células usadas para la evaluación antiparasitaria (MdMhu vs. CD) y el tiempo de experimentación (72 h vs. 48 h)(15).

El compuesto **13** mostró la inducción significativa de la producción de ROS durante las primeras horas de tratamiento (4 h), lo cual está correlacionado con las etapas tempranas de infección, en donde se involucran los procesos de fagocitosis, así como la remodelación del citoesqueleto del macrófago (31,52); sin embargo, a las 48 h post-tratamiento se evidencia la disminución del estallido oxidativo en MdMhu infectados y expuestos a este compuesto, sugiriendo el cambio metabólico del macrófagos, así como a la resolución de la enfermedad, evidenciada en nuestros ensayos *In vivo* (52,53,176).

Dentro de el efecto microbicida mas relevante de los compuestos sintéticos **13** y **19** se pudo determinar que no modulan significativamente la inducción de ON en MdMhu, indicando que el compuesto **13**, puede modular vías intracelulares en el macrófago que involucran el estallido oxidativo, mientras que el compuesto **19** puede tener actividad directa sobre el parásito (promastigote y amastigote intracelular). Cabe la pena resaltar que todos los compuestos evaluados indujeron la reducción de la citoquina IL-6, la cual ha sido reportada en diferentes estudios, como una citoquina involucrada en el desarrollo de respuestas Th2 o Th17, favoreciendo la destrucción de tejido en leishmaniasis cutánea(177,178).

## **6 Explorar el efecto de los análogos estructurales que tienen actividad antileishmanial en estructuras parasitarias esenciales para su sobrevivencia (Membrana celular, núcleo, mitocondrion y kinetoplasto).**

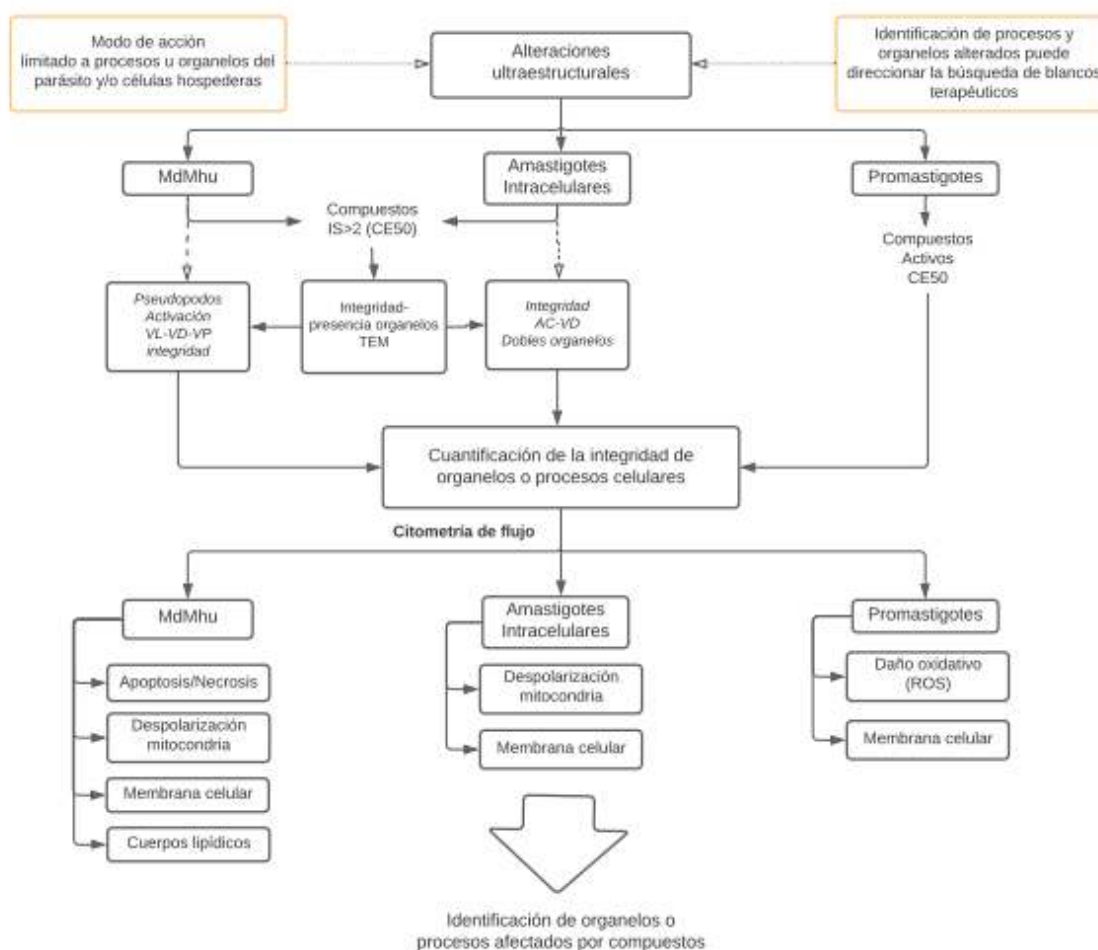
La determinación del efecto de compuestos antileishmaniales sobre estructuras propias del patógeno, ha sido de gran ayuda en la elucidación de modos de acción y la identificación de blancos moleculares, que conllevan a la optimización de moléculas candidatas a tratamiento antileishmanial (179,180).

Teniendo en cuenta la complejidad del modelo (amastigotes intracelulares) y la importancia de identificar, no solo efectos evidentes sobre el patógeno, si no también en la célula hospedera, se evaluaron las alteraciones estructurales en membranas celulares, integridad de organelos (mitocondrias, kinetoplastos y núcleo), presencia de vacuolas (VP, digestivas, autofagosomas, lipídicas y electrodensas) por medio de microscopia de transmisión electrónica.

Para complementar el análisis ultraestructural, evaluamos procesos que involucran el tipo de muerte (apoptosis-necrosis) en MdMhu, presencia de cuerpos lipídicos, despolarización de membrana mitocondrial, daño oxidativo e integridad de membrana celular; con el fin de encontrar posibles efectos de los compuestos, dirigidos hacia estos procesos (Figura 28).



## 6.1 Diseño experimental



**Figura 28.** Diagrama de flujo de diseño experimental de la identificación del efecto de los compuestos sobre organelos y procesos del parásito y Mdmhu

## 6.2 Metodología

### 6.2.1 Alteración ultraestructural de Mdmhu infectados por *L. (V.) panamensis* y expuestos a moléculas antileishmaniales por medio de microscopía de transmisión electrónica

Mdmhu ( $1 \times 10^6$  células/mL), fueron mantenidas en medio RPMI 1640 (Gibco, MA, USA), suplementada con 10% de suero fetal bovino, durante 72 h a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Después, las células fueron infectadas con promastigotes en fase estacionaria de *L. (V.) panamensis*

a una relación de 10:1 (parásitos: célula) durante 4 h a 36°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Luego, los parásitos no internalizados fueron removidos y el porcentaje de células infectadas fue evaluado por medio de tinción de Giemsa y se incubaron a 36°C y CO<sub>2</sub> por 24 h adicionales. Al cabo de este tiempo, las células fueron expuestas a las concentraciones efectivas medias (CE<sub>50</sub>) de los compuestos, durante 72 h a 36°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de las 72 h, las células fueron fijadas al 2.5 % de glutaraldehído y fueron procesadas para su visualización en microscopio de transmisión electrónica.

Este procesamiento se llevó a cabo por medio de la inclusión en resina fresca de la muestra deshidratada, cortes ultrafinos 100-200 nm de grosor y observada en el microscopio electrónico marca HITACHI-HU-12 (Fundación Santafé de Bogotá, Bogotá-Colombia), con aumento de 100X hasta 10.000X.

### **6.2.2 Evaluación de la inducción de muerte celular de MdMhu infectados y no infectados y expuestos a compuestos análogos antileishmaniales.**

MdMhu derivados de monocitos humanos, fueron sembrados en medio RPMI-1640 (Gibco, MA, USA), suplementado a 10 % de SFB (Hyclone, GE Healthcare, LC, UK) durante 72 h a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Después, las células fueron ajustadas a  $2 \times 10^6$  células/mL y expuestas a las concentraciones efectivas medias (CE<sub>50</sub>) de los compuestos, durante 72 h a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>.

Después, las células fueron infectadas con promastigotes en fase estacionaria de *L. (V.) panamensis* a una relación de 10:1 (parásitos: célula) durante 4 h a 36°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Luego, los parásitos no internalizados fueron removidos y el porcentaje de células infectadas fue evaluado por medio de tinción de Giemsa y se incubaron a 36°C y CO<sub>2</sub> por 24 h adicionales. Al cabo de este tiempo, las células fueron expuestas a las concentraciones efectivas medias (CE<sub>50</sub>) de los compuestos, durante 72 h a 36°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Luego, las células fueron fijadas con paraformaldehído 4 % y se evaluó la muerte celular por medio del Kit viabilidad celular Live/dead (Beckton-Dickinson, NJ, USA). MdMhu sin tratamiento fueron usados como control negativo de viabilidad, mientras que células expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.001 %), LPS (10 ug/mL) y DMSO (1 %), fueron usadas como control de mortalidad celular (Control positivo).

La cuantificación de células apoptóticas (apoptosis temprana y tardía) y necróticas, fue llevada a cabo por citometría de flujo (FACS-CANTO II, Beckton-Dickinson, USA); donde la expresión de fosfatidilserina fue evidenciada por annexina V-PE y la pérdida de la permeabilidad membrana fue medida por 7-actinomicina D (7AAD). La determinación fue llevada a cabo por duplicado en al menos tres experimentos independientes y los datos reportados fueron el promedio y la desviación estándar de los ensayos.

### **6.2.3 Evaluación de la integridad de membrana e integridad de membrana mitocondrial de MdMhu infectados y no infectados y expuestos a los compuestos naturales y sintéticos antileishmaniales**

MdMhu derivados de monocitos ( $1 \times 10^6$  células/mL), fueron mantenidas en medio RPMI 1640 (Gibco, MA, USA), suplementada con 10% de suero fetal bovino, durante 72 h a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Después, las células fueron infectadas con promastigotes en fase estacionaria de *L. (V.) panamensis* a una relación de 10:1 (parásitos: célula) durante 4 h a 36°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Luego, los parásitos no internalizados fueron removidos y el porcentaje de células infectadas fue evaluado por medio de tinción de Giemsa y se incubaron a 36°C y CO<sub>2</sub> por 24 h adicionales. Al cabo de este tiempo, las células fueron expuestas a las concentraciones efectivas medias (CE<sub>50</sub>) de los compuestos, durante 72 h a 36°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de este tiempo, las células fueron desprendidas y marcadas con Yoduro de propidio (1 nM) (Sigma-Aldich, ST Louis, USA) o DiOC6 (0,25 µM), durante 15 minutos a 36°C y 5 % de CO<sub>2</sub>; se lavaron y fueron puestas en tubos de citometría de flujo para su correspondiente evaluación.

La medición de la integridad de membrana en MdMhu fue determinada por citometría de flujo FACS-Canto I (Beckton Dickinson, NJ, USA), donde se analizó la fluorescencia en FL-3 por medio de Dot-plot e histograma de células (eventos positivos) e IMF. MdMhu sin exposición a ningún tratamiento fueron usadas como control negativo, mientras que LPS (10 ng/mL), se usaron como control positivo de la expresión de la molécula. La determinación fue llevada a cabo por duplicado en al menos tres experimentos independientes y los datos reportados fueron el promedio y la desviación estándar de los ensayos.

#### **6.2.4 Efecto de los compuestos análogos antileishmaniales en la presencia de Cuerpos Lipídicos de Mdmhu infectados y no infectados**

Considerando, que los cuerpos lipídicos (lipid droplets) juegan un papel relevante como unidades de almacenamiento de lípidos neutros, colesterol (remodelamiento de membrana) y precursores inflamatorios (LB4) en el macrófago (181), así como fuente de almacenaje de lípidos importantes para la biogénesis de nuevas membranas celulares y beta oxidación de ácidos grasos, que repercuten directamente en la sobrevivencia del parásito dentro de la célula hospedera(182,183), nosotros evaluamos la modulación de estas vacuolas en Mdmhu infectados y no infectados, expuestos a los tratamientos antileishmaniales.

Para determinar el efecto de los compuestos en la Inducción de cuerpos lipídicos de las células hospederas, Mdmhu fueron cultivados en medio RPMI-1640 (Gibco, MA, USA) suplementado al 10 % de SFB (Hyclone, GE healthcare, LC, UK) durante 72 h a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Después, las células fueron infectadas con promastigotes en fase estacionaria de *L. (V.) panamensis* a una relación de 10:1 (parásitos: célula) durante 4 h a 36°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Luego, los parásitos no internalizados fueron retirados y el porcentaje de células infectadas fue evaluado por medio de tinción de Giemsa y se incubaron a 36°C y CO<sub>2</sub> por 24 h adicionales. Al cabo de este tiempo, las células fueron expuestas a las concentraciones efectivas medias (CE<sub>50</sub>) de los compuestos, durante 72 h a 36°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Luego, las células fueron fijadas con paraformaldehído 4 % y marcadas con el colorante permeable Rojo nilo (Thermo-Fisher, MA, USA) e incubado a 35°C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 30 minutos. Después, las células fueron lavadas en solución salina, suplementada al 5 % de SFB (Hyclone, GE Healthcare, LC, UK) y se cuantificó la viabilidad de la membrana mitocondrial por medio de citometría de flujo en FACS-CANTO II (Beckton Dickinson, NJ, USA).

La cuantificación de los cuerpos lipídicos, fue determinada por citometría de flujo FACS-Canto II (Beckton Dickinson, NJ, USA), donde se analizó la fluorescencia en FL-3 del colorante rojo Nilo, por medio de Dot-plot e histograma de células (eventos positivos) e IMF. Células sin exposición a ningún tratamiento fueron usadas como control negativo, mientras que LPS (10 ng/mL) y PHA (10 µL/mL), se usaron como controles positivos de la expresión de la molécula. La determinación fue llevada a cabo por duplicado en al menos cuatro experimentos independientes y los datos reportados fueron el promedio y la desviación estándar de los ensayos.

## **6.2.5 Alteración ultraestructural en promastigotes y amastigotes intracelulares expuestos a los compuestos sintéticos antileishmaniales**

### **6.2.5.1 Determinación el efecto de compuestos sintéticos y naturales activos, en la membrana celular de promastigotes de *L. (V.) panamensis***

Para analizar el efecto de los compuestos en la integridad de membrana,  $5 \times 10^5$  promastigotes fueron expuestos a  $CE_{50}$  de las moléculas naturales y sintéticas durante 72 h a 26°C. Se usó como control, la anfotericina B ( $CE_{50}$ ) y peróxido de hidrógeno 1 % y como control de viabilidad, parásitos sin tratar (basal). Se realizaron al menos tres experimentos de manera independiente.

Después, los parásitos fueron lavados con PBS por duplicado y marcados con 0.01  $\mu$ M de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) e incubados por 30 minutos a 26°C. La cuantificación de la integridad de membrana, fue determinada por citometría de flujo (FACS-Canto II, Beckton Dickinson, USA), donde se analizó la fluorescencia en FL-2 por medio de la intensidad de la fluorescencia (IMF). La determinación fue llevada a cabo por duplicado en al menos tres experimentos independientes y los datos reportados fueron el promedio y la desviación estándar de los ensayos.

### **6.2.5.2 Evaluación del efecto antiparasitario de los compuestos sintéticos y naturales activos, en la inducción de especies reactivas de oxígeno en promastigotes de *L. (V.) panamensis***

Promastigotes de *L. (V.) panamensis* a una concentración de  $5 \times 10^6$  fueron expuestos a  $CE_{50}$  de las moléculas naturales y sintéticas (a partir de las obtenidas previamente) durante 72 h a 26°C. Se usaron como control positivo anfotericina B y peróxido de oxígeno 1 %. Se usaron como control negativo, parásitos expuestos a reactivos de solubilización (DMSO) y se realizaron al menos 3 experimentos de manera independiente.

Pasado este tiempo, los parásitos fueron lavados con PBS por duplicado y marcados con 5  $\mu$ M de la sonda fluorescente H2-DAF-FM (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) para

identificación de especies reactivas de oxígeno intracelular durante 45 minutos a 26°C. La cuantificación de especies reactivas de oxígeno, fue determinada por citometría de flujo (FACS-Canto II, Beckton Dickinson, USA), donde se analizó la fluorescencia en FL-1 por medio de Dot-plot e histograma de parásitos (eventos positivos) e intensidad de la fluorescencia (IMF). La determinación fue llevada a cabo por duplicado en al menos tres experimentos independientes y los datos reportados fueron el promedio y la desviación estándar de los ensayos.

### **6.2.5.3 Alteración ultraestructural de amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis* por medio de microscopía de transmisión electrónica**

MdMhu derivados de monocitos ( $1 \times 10^6$  células/mL), fueron mantenidas en medio RPMI 1640 (Gibco, MA, USA), suplementada con 10 % de suero fetal bovino, durante 72 h a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Después, las células fueron infectadas con promastigotes en fase estacionaria de *L. (V.) panamensis* a una relación de 10:1 (parásitos: célula) durante 4 horas a 36°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Luego, los parásitos no internalizados fueron removidos y el porcentaje de células infectadas fue evaluado por medio de tinción de Giemsa y se incubaron a 36°C y CO<sub>2</sub> por 24 h adicionales. Al cabo de este tiempo, las células fueron expuestas a las concentraciones efectivas medias (CE<sub>50</sub>) de los compuestos, durante 72 h a 36°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de las 72 h, las células fueron fijadas al 2.5 % de glutaraldehído y fueron procesadas para su visualización en microscopio de transmisión electrónica.

Este procesamiento se llevó a cabo por medio de la inclusión en resina fresca de la muestra deshidratada, cortes ultrafinos 100-200 nm de grosor y observada en el microscopio electrónico marca HITACHI-HU-12 (Fundación Santafé de Bogotá, Bogotá-Colombia), con aumento de 100X hasta 10.000X.

### **6.2.5.4 Evaluación de la integridad de Mitocondria en amastigotes intracelulares aislados de MdMhu y expuestos a los compuestos naturales y sintéticos antileishmaniales**

Macrófagos murinos de la línea celular J774, fueron usados como modelo para la obtención de amastigotes intracelulares. Para esto  $5 \times 10^5$  macrófagos/ mL fueron sembrados en placas de Petri en medio RPMI 1640 (Gibco, MA, USA), suplementado al 10 % de SFB (HyClone, GE healthCare, LC, UK) durante 1 hora a 37°C, permitiendo la adherencia de las

---

células al plato de cultivo. Después de este tiempo, se realizó la infección con promastigotes metacíclicos de *L. (V.) panamensis* a un ratio de infección 1:20 (Macrófagos:parásitos) durante 4 h a 34°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Al cabo de este tiempo, los parásitos no internalizados fueron removidos por medio de lavados con PBS 1X y las células fueron cultivadas de nuevo en RPMI 1640 (Gibco, MA, USA), suplementado con SFB (Hyclone, GE Healthcare, LC, UK) al 10 % e incubadas a 34°C y 5 % de CO<sub>2</sub>, durante 48 h. Durante este tiempo se monitoreó la infección, comprobando la infección mayor al 80 %. Al cabo de este tiempo, el medio de cultivo fue centrifugado a 1500 rpm durante 5 minutos y re-suspendido en 2 mL de PBS esteril; paralelo a esto, las células adherentes fueron despegadas por medio de cell scraper y suspendidas en 2 mL de PBS. Después de esto, tanto las células del medio de cultivo y las desprendidas fueron pasadas a través de jeringas de 1 mL al menos 10 veces, forzando al rompimiento de los macrófagos y a la liberación de los amastigotes intracelulares.

Después de esto, los parásitos y las células intactas fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos, descartando el pellet (células intactas) y centrifugando de nuevo el sobrenadante a 3500 rpm durante 5 minutos. Se contaron los parásitos intracelulares, evitando la transformación de los parásitos a promastigotes. Un total de  $1 \times 10^7$  amastigotes fueron usados para cada tratamiento, en donde se cultivaron a 34°C y en RPMI 1640 (Gibco, MA, USA) (pH 5.4) y suplementado al 10 % de SFB (HyClone, GE HealthCare, LC, UK).

Finalmente, los parásitos fueron expuestos a las CE<sub>50</sub> de los compuestos seleccionados y cultivados en RPMI 1640 (Gibco, MA, USA) pH 5.4 y suplementado al 10 % de SFB (Hyclone, GE Healthcare, LC, UK) durante 24 h. Al cabo de este tiempo, los amastigotes fueron marcados con DiOC6 (0,125 µg/mL) durante 15 minutos a 34°C, lavados y evaluados por medio de citometría de flujo.

La medición de la integridad de membrana en macrófagos (Mdmhu), fue determinada por citometría de flujo FACS-Canto II (Beckton Dickinson, NJ, USA), donde se analizó la fluorescencia en FL-3 por medio de Dot-plot e histograma de células (eventos positivos) e IMF. Parásitos sin exposición a ningún tratamiento fueron usadas como control negativo, mientras que Pentamidina (1 µg/mL), se usaron como control positivo. La determinación fue

llevada a cabo por duplicado en al menos tres experimentos independientes y los datos reportados fueron el promedio y la desviación estándar de los ensayos.

#### **6.2.5.5 Análisis estadístico**

Los resultados de este proyecto, fueron analizados de acuerdo con los parámetros de cada método, y cada resultado se validó por la comparación frente a los controles establecidos para cada ensayo. Dependiendo del set de datos de cada ensayo, se realizó el análisis de normalidad de los datos y dependiendo de esto, se llevó a cabo el análisis estadístico apropiado [ANOVA de una o dos vías o Kruskal Wallis]. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo por el programa GraphPad Prism versión 6.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

La significancia estadística en todos los casos, se estableció usando valores de significancia ( $P < 0.05$ ). En donde  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.005$  (\*\*\*) y  $p < 0.001$  (\*\*\*)).

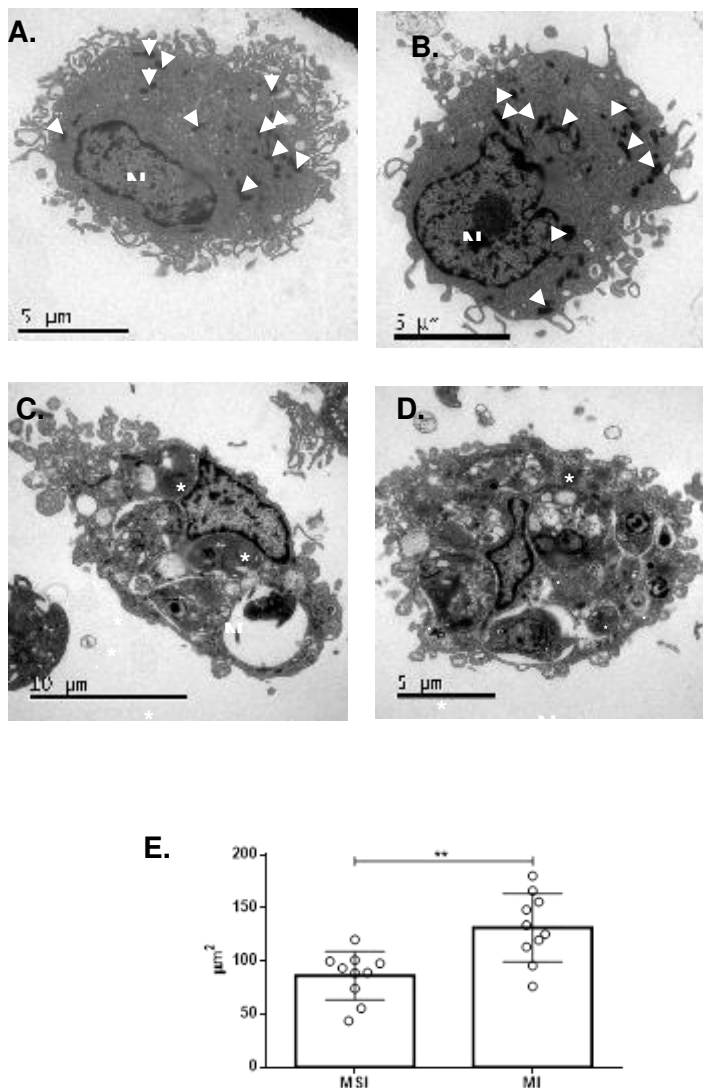
### **6.3 Resultados**

#### **6.3.1 Evaluación en Mdmhu infectados y sin infectar por *L. (V.) panamensis***

##### **6.3.1.1 Alteraciones Ultraestructurales de Mdmhu infectados por *L. (V.) panamensis* y expuestos a compuestos naturales y sintéticos antileishmaniales**

Una de las herramientas más eficaces en la búsqueda de mecanismos de acción de moléculas con actividad antileishmanial, es la visualización de cambios ultraestructurales, así como la evaluación de la modulación de procesos vitales celulares. La identificación de los efectos de los compuestos naturales y sintéticos sobre las células hospederas sin infectar e infectadas, es necesario para la aproximación al modo de acción de las moléculas antileishmaniales. Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó el análisis de las imágenes por medio de microscopía de transmisión electrónica.





**Figura 29.** Comparación de la ultraestructura de Mdmhu sin infectar e infectados por *L. (V.) panamensis*.

TEM de A-B. Mdmhu. C-D. Mdmhu infectados por *L. (V.) panamensis* después de 72 h post-infección. E. Tamaño celular ( $\mu\text{m}^2$ ). MSI, Mdmhu sin infectar. MI, Mdmhu infectados. Significancia estadística \* $p < 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$

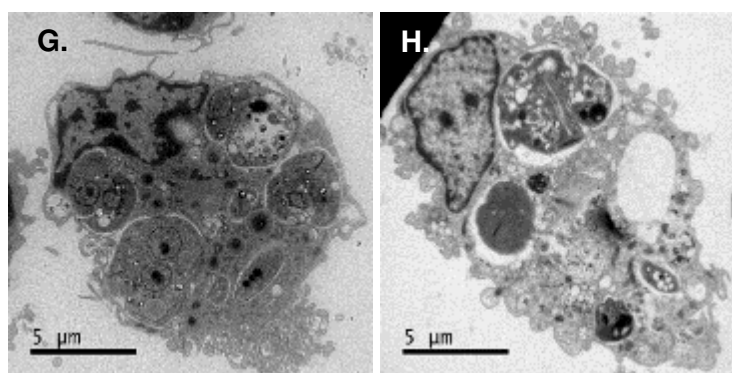
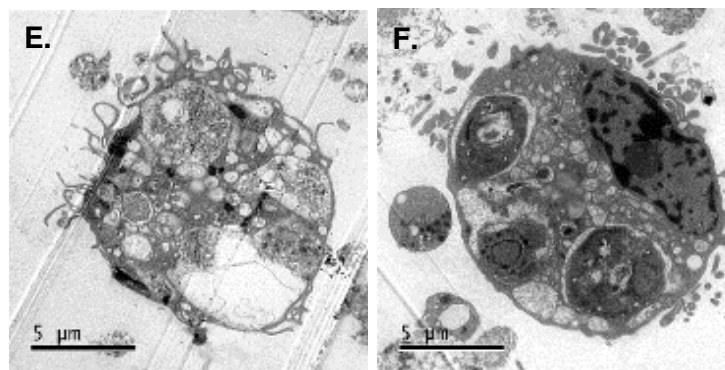
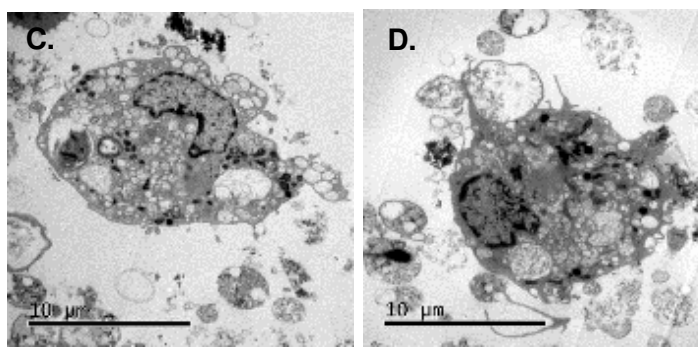
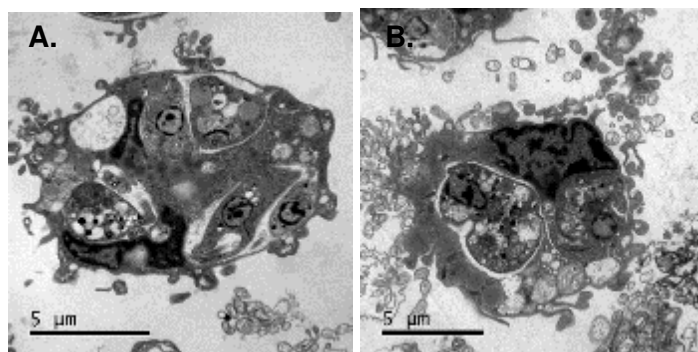
Mdmhu sin infección muestran una estructura redondeada, con abundantes pseudópodos y mitocondrias, un núcleo que ocupa una buena cantidad del espacio dentro de la célula, además de observarse pocas estructuras vacuolares (Figura 29 A-B). Por su parte las TEM de Mdmhu infectados a 72 h post infección, experimentaron una pérdida total de su morfología siendo células mucho más voluminosas, en comparación con Mdmhu no

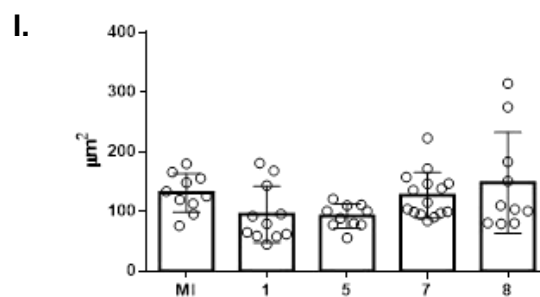
infectados (Figura 29E); al interior de las células infectadas se observan entre 3 a 5 amastigotes, que ocupan la mayoría del espacio citoplasmático, incluso se puede observar como desplazan el espacio ocupado por el núcleo. Cada amastigote está separado por una membrana única que denota el fagolisosoma individual, característico de esta especie de *Leishmania*, en cada amastigote se pueden observar estructuras como núcleo, kinetoplasto e incluso algunas crestas mitocondriales, y abundantes vacuolas (Figura 29C-D).

### **6.3.1.2 MdMhu Infectados vs. MdMhu infectados y expuestos a compuestos antileishmaniales**

Para determinar los posibles efectos de los compuestos triterpenoides, se analizaron las modificaciones ultraestructurales de los triterpenos sobre MdMhu infectados mostrando que los MdMhu infectados y expuestos al limonoide plantilla (**1**), pierden totalmente su morfología, con presencia de protuberancias membranales sin alteración de su volumen (Figura 30A-B); al interior de estos, se observan cuerpos electrodensos de tipo lipídico-oscuras y vacuolas de doble membrana (autofagosomas) y de tipo digestivas-claras. También se evidencian entre 2 a 5 amastigotes, los cuales ocupan la mayor parte del citoplasma y desplazando en muchos casos, el espacio ocupado por el núcleo (Figura 30A-B).

Los MdMhu infectados y expuestos al triterpenoide pentacíclico **5** muestran la pérdida completa de su morfología, con poca alteración de su volumen celular y la presencia de protuberancias membranales de tipo cuerpos apoptóticos. En su interior, se divisan núcleos sin alteración, abundantes mitocondrias, así como vacuolas de doble membrana (autofagosomas) y de tipo digestivo-claras. En estos MdMhu se observaron pocos parásitos con organelos con morfología alterada, rodeados por fagolisosomas individuales (Figura 30C-D).



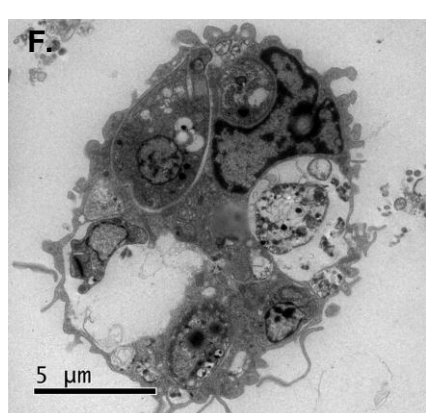
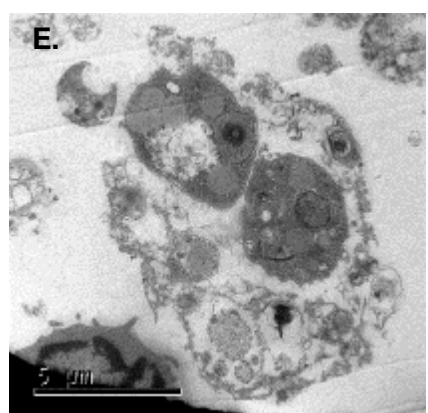
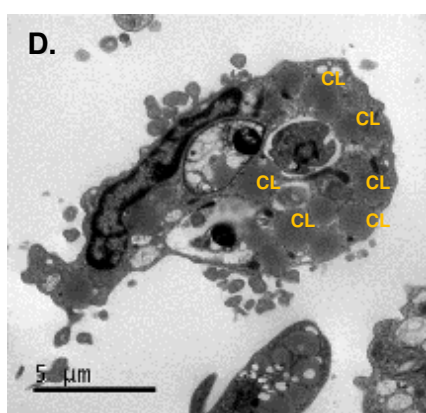
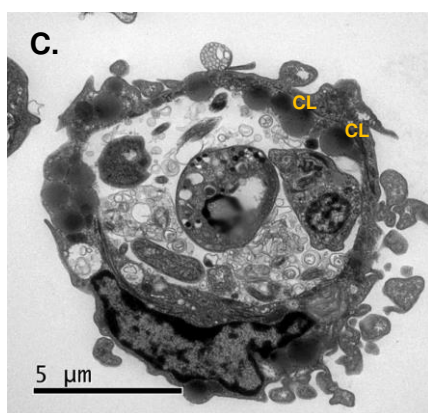
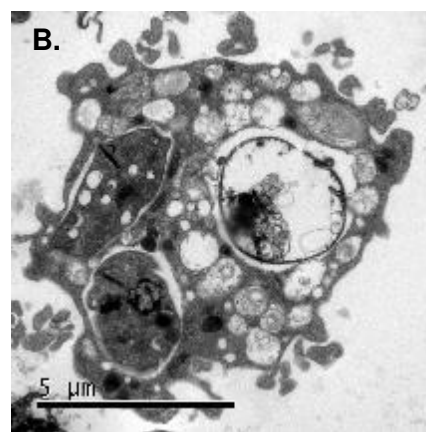
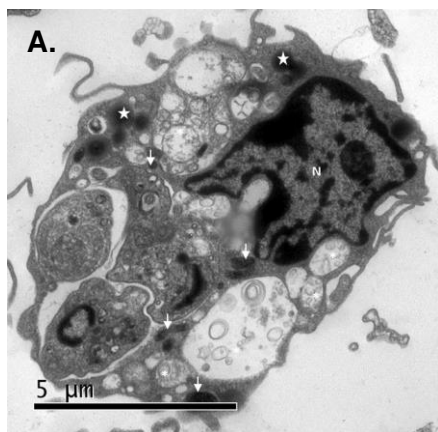


**Figura 30.** Comparación de la ultraestructura de MdMhu infectados por *L. (V.) panamensis* y expuestos a compuestos triterpenoides.

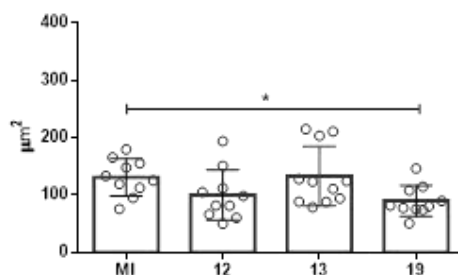
*TEM de MdMhu infectados y expuestos a los triterpenoides A-B.1 . C-D.5. E-F.7. G-H.8 y I. Tamaño celular ( $\mu\text{m}^2$ ). MI, Macrófagos infectados. Significancia estadística \* $p < 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$*

Los MdMhu expuestos a la saponina (**7**), muestran la pérdida de la morfología con presencia de pseudópodos en su superficie, sin alteración evidente del volumen celular; intracelularmente, se divisan abundantes vacuolas de tipo digestivas-claras, un núcleo intacto (sin evidencia de daño) y 2 a 4 parásitos rodeados por fagolisosomas individuales. La exposición al compuesto **8**, muestra MdMhu con pérdida de morfología y la tendencia al aumento de volumen celular, presencia de núcleo sin alteraciones aparentes y vacuolas electrodensas-oscuras en su citoplasma. Se evidencian de 2 a 5 parásitos, rodeados por fagolisosomas individuales (Figura 30G-H) (Tabla 7).

Al analizar el efecto de los alcaloides quinolínicos en MdMhu infectados por *L. (V.) panamensis* se evidenció que la exposición al compuesto plantilla (**12**), cambia la morfología de la célula, sin aumento evidente del volumen celular (Figura 31A-B); induce alteraciones a nivel de citoplasma, observándose abundantes vacuolas digestivas con contenido en su interior, lo cual podría representar posibles restos de parásitos. Hay presencia de fagolisosomas de gran tamaño, cuyo interior alberga entre 2 a 5 parásitos. Los MdMhu infectados y expuestos al compuesto **13**, muestran pérdida de la morfología sin cambios evidentes en el tamaño celular y la presencia de protuberancias en su membrana celular. Induce cambios en el citoplasma, traducido por la presencia de vacuolas electrodensas de tipo lipídico. Se observan múltiples parásitos en vacuolas parasitófotas, que ocupan un gran porcentaje de citoplasma, desplazando el espacio del núcleo (Figura 31C-D).



G.

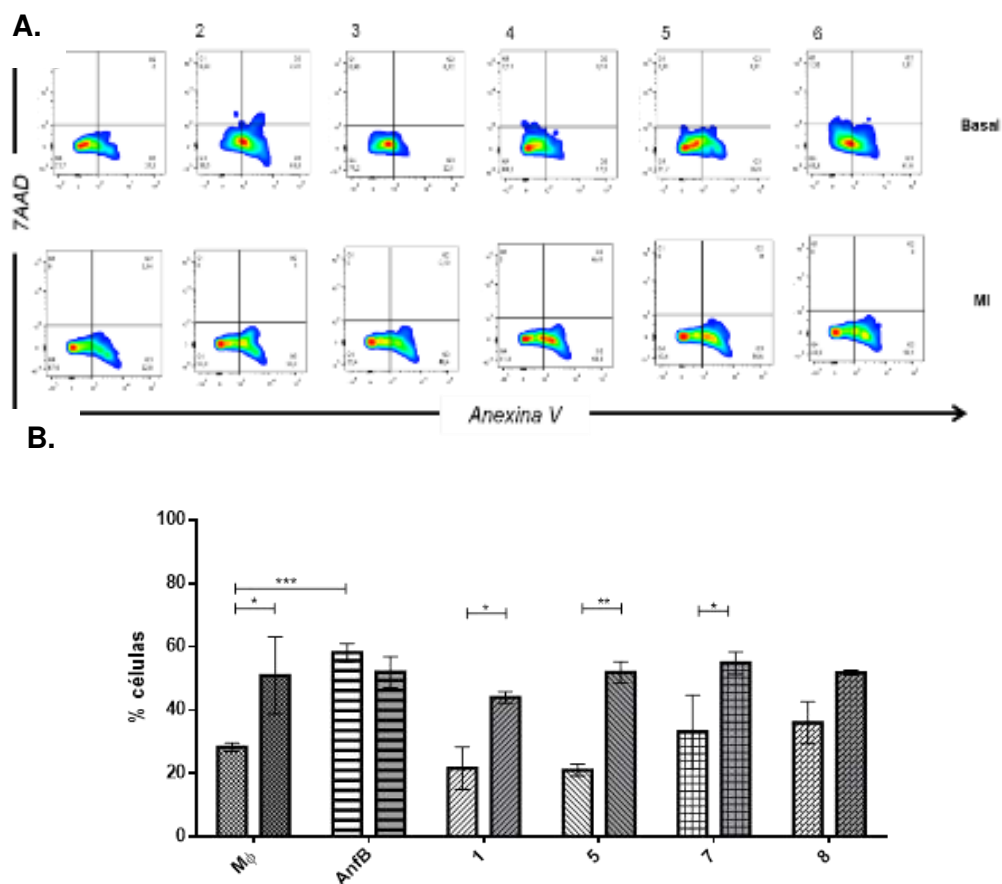


**Figura 31.** Comparación de la ultraestructura de MdMhu infectados por *L. (V.) panamensis* y expuestos a compuestos alcaloides quinolínicos. TEM de MdMhu infectados y expuestos a los Alcaloides quinolínicos A-B.12 . C-D.13. E-F.19. G.. Tamaño celular ( $\mu\text{m}^2$ ). MI, MdMhu infectados. Significancia estadística \* $p < 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .

Los MdMhu infectados y expuestos al alcaloide **19** mostraron pérdida total de su morfología, con evidente daño sobre la membrana celular, desencadenando la disminución del volumen de la célula (Figura 31E-F y Figura 31G). Adicionalmente, se observa la condensación de cromatina en el núcleo del hospedero, la presencia de 2 a 5 parásitos con la pérdida de morfología celular, contenidos en fagolisosomas de gran tamaño y con estructuras de degradación en su interior (Figura 31E-F) (Tabla 8).

### 6.3.1.3 Evaluación del tipo de muerte celular en MdMhu y MdMhu infectados y expuestos a compuestos naturales y sintéticos

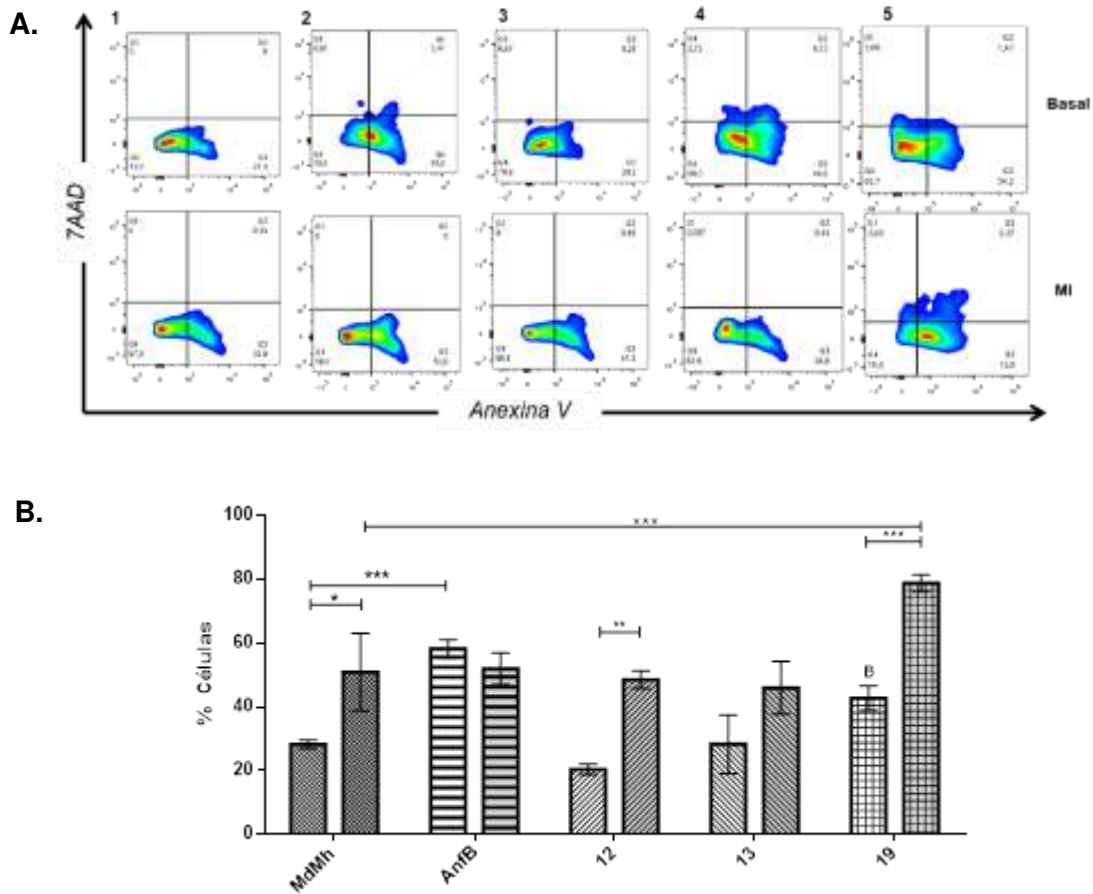
Teniendo en cuenta que uno de los posibles efectos de los compuestos antileishmaniales es la inducción de la muerte celular, ya sea apoptosis o necrosis, como un mecanismo efectivo en la eliminación del parásito, se evaluó este tipo de efectos sobre células no infectadas e infectadas por el parásito. La evaluación de la inducción de muerte en MdMh no infectados por parte de los triterpenoides con actividad antileishmanial mostró, que la anfotericina B puede aumentar el porcentaje de células apoptóticas en fase temprana en MdMhu sin infectar (Figura 32A-2), mientras que la infección per sé, induce la apoptosis temprana en los MdMhu, independiente del tratamiento usado (Figura 32A-1). Cabe la pena resaltar, que ninguno de los compuestos triterpenoides indujo la muerte de células sin infectar e infectadas y que las diferencias significativas entre tratamientos, fue originada por la presencia del parásito y no por los tratamientos (Figura 32B).



**Figura 32.** Inducción de muerte celular en Mdmhu no infectados e infectados y expuestos a compuestos triterpenoides antileishmaniales.

Muerte celular en Mdmhu (Basal) y Mdmhu infectados (MI), expresión de Annexina V y 7AAD. A. Dot-plot de Mdmhu. Q1. Viables. Q2. Apoptosis temprana. Q3. Apoptosis tardía. Q4. Necrosis. 1. Mdmhu. 2. AnfB. 3. T1. 4. T5. 5. T7 y 6. T8. B. Porcentaje de células apoptóticas. Barras grises= MI. Significancia estadística \* $p < 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$

Al evaluar la inducción de muerte sobre Mdmhu no infectados e infectados por parte de los alcaloides quinolínicos, se evidenció que la presencia del parásito *per se*, aumenta el porcentaje de células en apoptosis temprana (Figura 33A). Este comportamiento también se observa en Mdmhu infectados y expuestos a los compuestos **12** y **19**, en donde este último muestra el aumento significativo de Mdmhu infectados apoptóticos (fase temprana) (Figura 33A).



**Figura 33.** Inducción de muerte celular en MdMhu no infectados e infectados y expuestos a compuestos alcaloides quinolínicos antileishmaniales. Muerte celular en MdMhu (Basal) y MdMh infectados (MI), expresión de Annexina V y 7AAD. A. Dot-plot de MdMhu. Q1. Viables. Q2. Apoptosis temprana. Q3. Apoptosis tardía. Q4. Necrosis. 1. MdMhu. 2. AnfB. 3. 12. 4. 13. 5. 19 B. Porcentaje de células apoptóticas. Barras grises= MI. Significancia estadística \*p < 0.05, \*\*p ≤ 0.01, \*\*\*p ≤ 0.001, \*\*\*\*p ≤ 0.0001

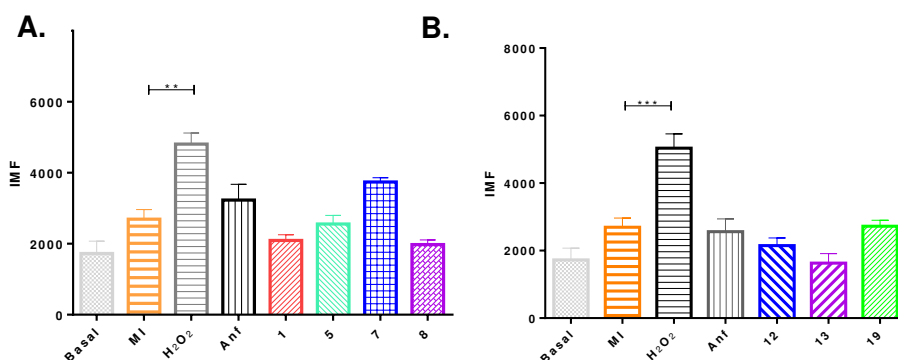
Estos resultados sugieren que la infección *per se*, induce un aumento en células apoptóticas y que la exposición al alcaloide **19** induce el incremento del número de células apoptóticas infectadas en comparación con el control de infección; proponiendo un posible modo de acción del compuesto alcaloide en las proteínas implicadas en muerte celular programada (apoptosis) (Figura 33B).



### 6.3.2 Efecto de compuestos en la integridad de membrana celular y mitocondrial de MdMhu expuestos a compuestos antileishmaniales

#### 6.3.2.1 Efecto de los compuestos en la Integridad de Membrana celular de MdMhu

La exposición de MdMhu infectados y no infectados a los compuestos triterpenoides no generará la alteración evidente de la membrana celular de las células (Figura 34A). Mientras que las exposición con peróxido de hidrógeno, aumentó significativamente la intensidad de fluorescencia de IP (Ioduro de propidio) en MdMhu, indicando que esta molécula, a diferencia de la anfotericina y la propia infección, es capaz de inducir daño a nivel de membrana celular.



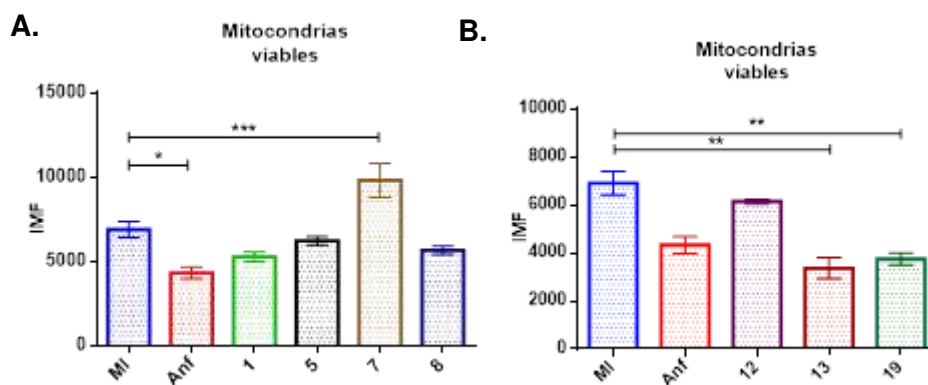
**Figura 34.** Integridad de membrana celular de MdMhu infectados y expuestos a compuestos antileishmaniales. *Integridad de membrana celular de MdMhu infectados. A. expuestos a triterpenoides. B. Alcaloides quinolónicos. IMF. Intensidad media de fluorescencia. IP. Yoduro de propidio, Significancia estadística \* $p < 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .*

Al exponer las células infectadas y no infectadas a los compuestos alcaloides quinolónicos, no se evidenció daño a nivel de membrana celular para ninguna de las dos condiciones experimentales (Figura 34B). Mostrando con esto, que este tipo de compuestos no generan afectaciones relevantes que induzcan la destrucción de la célula.

#### 6.3.2.2 Alteración del potencial de mitocondria $\Delta\psi_M$ en MdMhu

De acuerdo con los resultados de la evaluación del tipo de muerte celular (Apoptosis o necrosis) de MdMhu expuestos a triterpenoides y las causas que pueden desencadenar este tipo de efecto, dentro de los cuales se enmarcan en el daño o la alteración de la mitocondria, así como la poca evidencia visual de la integridad de la mitocondria de los

MdMhu por medio de microscopía, se evaluó el potencial mitocondria por medio de la positivización y aumento de la fluorescencia del marcador mitocondria DiOC6 en células con daño mitocondrial. En MdMhu infectados, no se evidencia un cambio significativo en el  $\Delta\psi$  mitocondria del macrófago; sin embargo, la exposición al compuesto **7** muestra un evidente aumento de DiOC6, indicando que este compuesto puede estar generando un efecto protector en este organelo vital, de manera específica en MdMhu infectados (Figura 35A).



**Figura 35.** Despolarización de membrana mitocondrial de MdMhu infectados *por L. (V.) panamensis* y expuestos a compuestos antielishmaniales. Alteración del potencial de membrana mitocondrial en MdMhu infectados y expuestos a A. triterpenoides y B. Alcaloides quinolínicos. Aumento de IMF de DiOC6 (despolarización). Significancia estadística \* $p < 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$

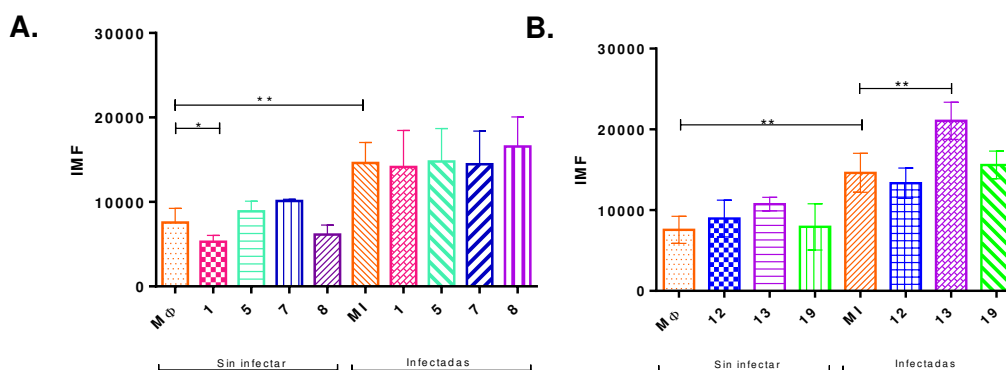
Por otro lado, al evaluar el  $\Delta\psi$  mitocondrial en MdMhu expuestos a los alcaloides, se observan alteraciones en el potencial mitocondrial de MdMhu, en macrófagos expuestos a los alcaloides 13 y 19 sugiriendo que el efecto de estos compuestos, induce la pérdida del colorante DiOC6 -indicando la pérdida del potencial mitocondrial- (Figura 35B).

### 6.3.2.3 Inducción de Cuerpos lipídicos en MdMhu infectados y no infectados y expuestos a compuestos naturales y sintéticos

Teniendo en cuenta que los cuerpos lipídicos son importantes para la sobrevivencia de *Leishmania*, debido al requerimiento de lipidos necesarios para biogénesis de la membrana y fuente de energía (116,181), así como para la célula hospedera, ya que se producen mediadores inflamatorios que pueden estar involucradas en la respuesta inmune (184). Se evaluó la producción de cuerpos lipídicos en MdMhu sin infectar e infectados con *L. (V.) panamensis* y expuestos a los compuestos efectivos y selectivos frente al parásito, por

medio de rojo nilo (9-dietilamino-5H-benzo-alfa-fenoxazina-5-ona), el cual marca de forma diferencial cuerpos lipídicos intracelulares.

La presencia de cuerpos lipídicos en MdMhu sin infectar es significativamente menor a los MdMhu infectados con el parásito. Sin embargo, se puede observar que en MdMhu sin infectar, los compuestos triterpenoides **1** y **8** disminuyen la presencia de estas vacuolas, frente al control basal. En MdMhu infectados, aunque se observa el aumento en todos los tratamientos, incluyendo al control infectado, no hay diferencias estadísticas que sugieren un efecto de los triterpenos sobre los MdMhu infectados (Figura 36A).



**Figura 36.** Vacuolas lipídicas en MdMhu infectados y no infectados por *L. (V.) panamensis* y expuestos a compuestos antileishmaniales. Presencia de vacuolas lipídicas en MdMhu infectados y no infectados marcadas con Rojo Nilo. A. Compuestos triterpenoides. B. alcaloides quinolínicos. Significancia estadística \* $p < 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$

Al evaluar los MdMhu expuestos a los alcaloides, se puede observar que los compuestos no modulan la actividad lipídica de MdMhu sin infectar. Sin embargo, MdMhu infectados y expuestos al alcaloide **13**, aumentan significativamente la presencia de cuerpos lipídicos, en comparación con el control infectado. Estos resultados sugieren que la infección por *Leishmania* aumenta la presencia de cuerpos lipídicos en MdMhu y que la exposición de las células infectadas a el alcaloide **13**, incrementa la expresión de estos depósitos de lípidos en el interior de la célula hospedera (Figura 36B).

**Tabla 12.** Resumen de modificaciones ultra-estructurales de MdMhu infectados y no infectados y expuestos a **triterpenoides**

Tratamiento	Núcleo	Membrana celular	Vacuolas	Mitocondrias	CL	VP	Parásitos
	-	-	++	+++	-	+++	+++
<b>CST</b>		Presencia de pseudópodos	Doble membrana (Autofágicas-digestivas)			Individuales ceñidas al parásito	
	-	-	++	+	++	+	++
<b>1</b>		Presencia de pseudópodos	Doble membrana (Autofágicas-digestivas)			Individuales Ceñidas al parásito	
	-	-	++	+	-	+	++
<b>5</b>		Presencia de pseudópodos Protuberancias	Doble membrana (Autofágicas-digestivas)			Individuales ceñidas al parásito	
	-	-	+++	+	-	++	++
<b>7</b>		Protuberancias	Doble membrana (Autofágicas-digestivas)			Individuales ceñidas al parásito	
	-	-	+	++	-	++	++
<b>8</b>			Electro-densas			Individuales ceñidas al parásito	

CST (Células infectadas sin tratamiento); CL (Cuerpos lipídicos); VP (Vacuolas parasitoforas); (-):no alteración/Ausencia, (+):Alteración leve/poca presencia; (++) : Alteración/presencia moderada.(+++): Alteración grave/abundante presencia

**Tabla 13.** Resumen de modificaciones ultra-estructurales de MdMhu infectados y no infectados y expuestos a **Alcaloides quinolínicos**

Tratamiento	Núcleo	Membrana celular	Vacuolas	Mitocondrias	CL	VP	Parásitos
CST	-	-	++	+++	-	+++	+++
		Presencia de pseudópodos	Doble membrana (Autofágicas-digestivas)			Individuales ceñidas al parásito	
12	-	-	++	+	-	+	+
			Doble membrana (Autofágicas-digestivas)			Individuales Ceñidas al parásito	
13	-	-	-	+	+++	+	++
						Múltiples Varios parásitos por vacuola	
19	+++	-	+++	+	-	+	+
	Distribución anormal de cromatina		Doble membrana (Autofágicas-digestivas)			Individuales ceñidas al parásito	
	Alteración membrana nuclear						

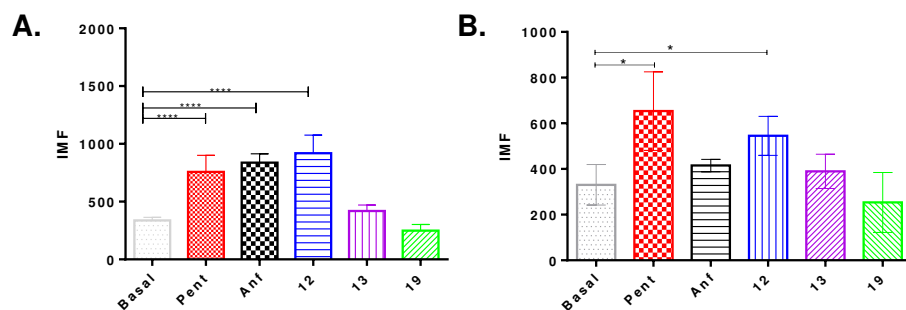
CST (Células infectadas sin tratamiento); CL (Cuerpos lipídicos); VP (Vacuolas parastóforas); (-):no alteración/Ausencia, (+):Alteración leve/poca presencia; (++) : Alteración/presencia moderada.(+++): Alteración grave/abundante presencia

### 6.3.2.4 Alteración estructural de promastigotes de *L. (V.) panamensis* expuestos a compuestos antileishmaniales

Con el fin de aproximarnos al modo de acción de las moléculas antileishmaniales frente al parásito, la facilidad de obtención y cultivo. Se evaluaron los efectos de las moléculas antileishmaniales frente a este parásito en estadio promastigote. Teniendo en cuenta lo anterior, se determinó el efecto de los alcaloides quinolínicos, ya que en los ensayos de actividad, este grupo de compuestos mostró efectividad por el estadio extracelular del parásito.

#### 6.3.2.4.1 Efecto en la Integridad de Membrana celular y en el potencial $\Delta\psi$ mitocondrial de promastigotes de *L. (V.) panamensis*

Al evaluar el efecto de los alcaloides quinolínicos en promastigotes, se observó que los parásitos expuestos al compuesto **12** mostraban el aumento significativo de IMF, sugiriendo un daño a nivel de membrana celular. Mientras que los demás compuestos no generaron cambios significativos en la membrana del promastigote (Figura 37A).



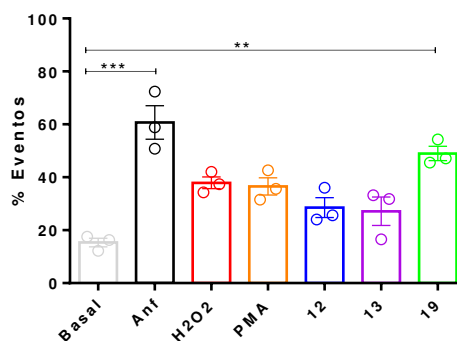
**Figura 37.** Alteración de la membrana celular y en el potencial de membrana mitocondrial de promastigotes de *L. (V.) panamensis* expuestos a alcaloides quinolínicos. A. Daño en membrana celular (yoduro de propidio) y B. despolarización de mitocondria de promastigotes expuestos a alcaloides quinolínicos. Significancia estadística \* $p < 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$

La exposición al compuesto **12** indujo la despolarización de la mitocondria de manera evidente, mientras que los alcaloides **13** y **19** no generaron alteraciones a este proceso mitocondrial. Cabe la pena resaltar, que este efecto (despolarización causado por compuesto **12**), se comportó de manera similar a los controles positivos Pentamidina, Anfotericina B (Figura 37B).

#### 6.3.2.4.2 Inducción de especies reactivas de oxígeno en promastigotes de *L. (V.) panamensis* expuestos a compuestos naturales y sintéticos antileishmaniales

Para identificar si el efecto de los compuestos induce estrés oxidativo en los parásitos en su forma libre, se evaluó la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno) por medio de la marcación con H<sub>2</sub>-DAF-FM y el análisis por citometría de flujo.

La exposición de promastigotes de *L. (V.) panamensis* a la anfotericina B, mostro el aumento evidente de especies reactivas de oxígeno, respecto a parásitos sin tratar. La exposición de promastigotes al compuesto **19**, mostró un aumento significativo de ROS, incluso mayor a los controles de tratamiento H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y PMA; mientras que los demás compuestos alcaloides no mostraron un efecto en la inducción de estrés oxidativo de este tipo de parásitos (Figura 38).



**Figura 38.** Inducción de estrés oxidativo en promastigotes de *L. (V.) panamensis* expuestos a alcaloides quinolínicos. Producción ROS. Promastigotes expuestos a alcaloides quinolínicos. Anf. Anfotericina B. Significancia estadística \* $p < 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$

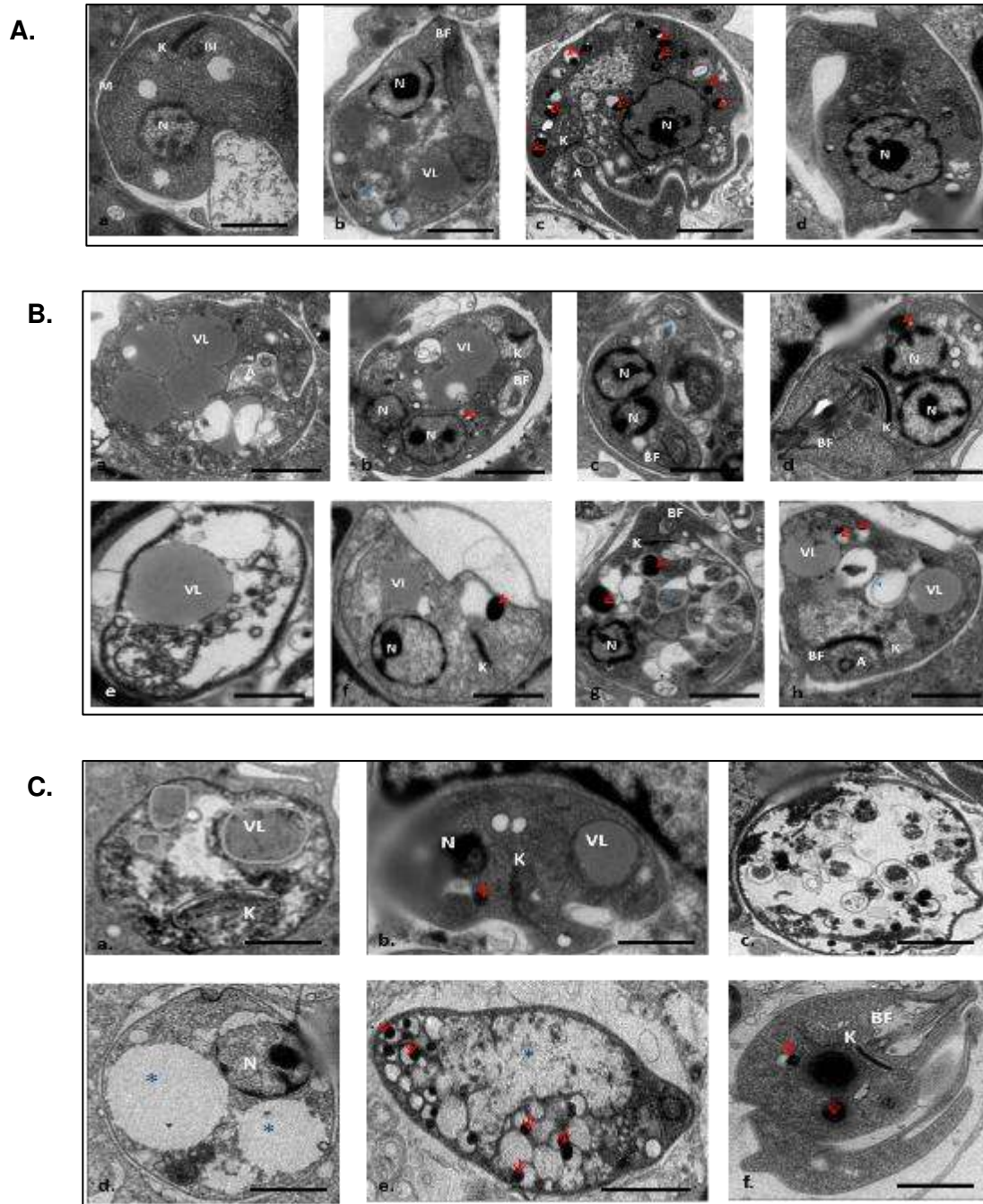
### 6.3.3 Alteración estructuras y Ultra-estructural de amastigotes intracelulares expuestos a compuestos naturales y sintéticos

Con el fin de aproximarse al posible mecanismo de acción de las moléculas activas antileishmaniales, se analizaron las estructuras internas (incluyendo membrana celular) de amastigotes intracelulares expuestos a los compuestos. Las estructuras internas analizadas fueron núcleo, kinetoplasto, bolsillo flagelar (flagelo, axonema), mitocondrion, presencia de acidocalcisomas, integridad de membrana celular, vacuolas de tipo lipídico y fagosomas (doble membrana). En este sentido, se analizaron amastigotes de *L. (V.) panamensis* no expuestos a tratamiento.

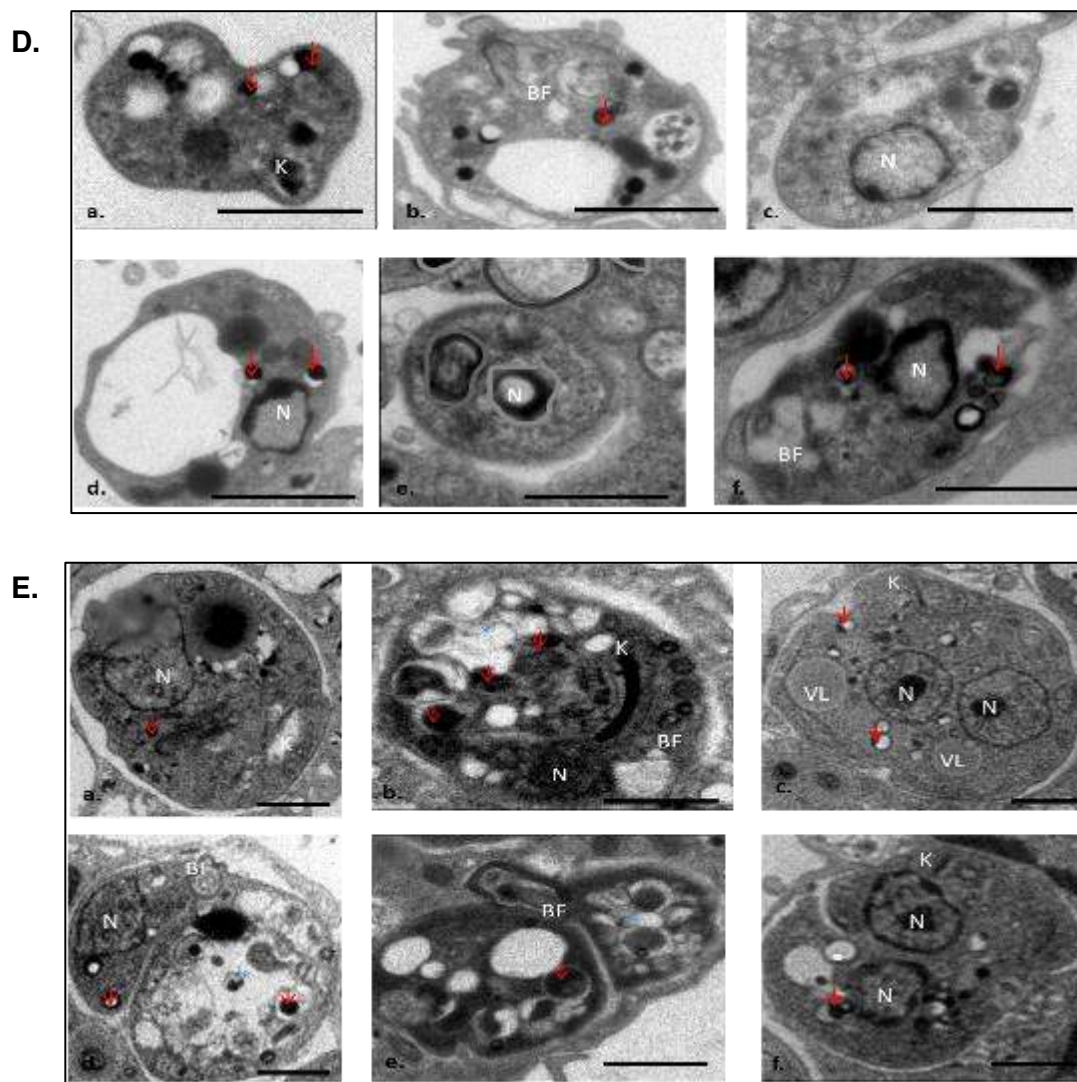
Amastigotes intracelulares muestran morfología ovalada, característica de parásitos del género *Leishmania*, rodeados por fagolisosomas individuales ajustados a cada parásito. En alguno de estos parásitos se observan kinetoplastos y mitocondriones bien definidos (Figura 30-A panel a-d), bolsillos flagelares (Figura 39A-b) y la presencia de diversas vacuolas, las cuales comprenden vacuolas digestivas-claras (Figura 39A-b y c), electrodensas-oscuras de tipo acidocalcisomas (Figura 39A-c) y lipídicas-grises.

La mayoría de amastigotes provenientes del tratamiento con el compuesto plantilla 1, muestran morfología ovalada con poca alteración en su membrana celular (Figura 39B a-d y f-h) y la presencia de kinetoplastos sin alteración evidente. Cabe la pena resaltar, que en algunos parásitos se observa la duplicación de organelos como núcleos (Figura 39B b-d),

axonemas y bolsillos flagelares (Figura 39B-a y c), así como la inflamación de membranas mitocondriales, de kinetoplastos y del bolsillo flagelar (Figura 39B-a,b y h).





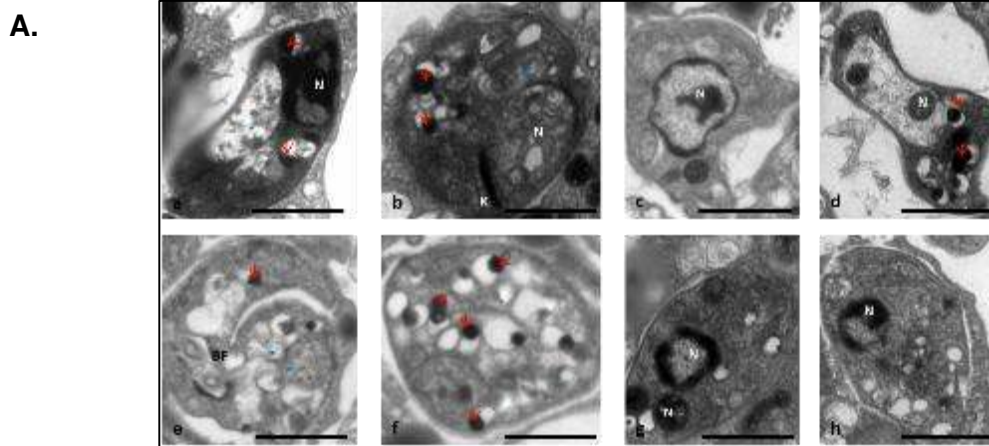


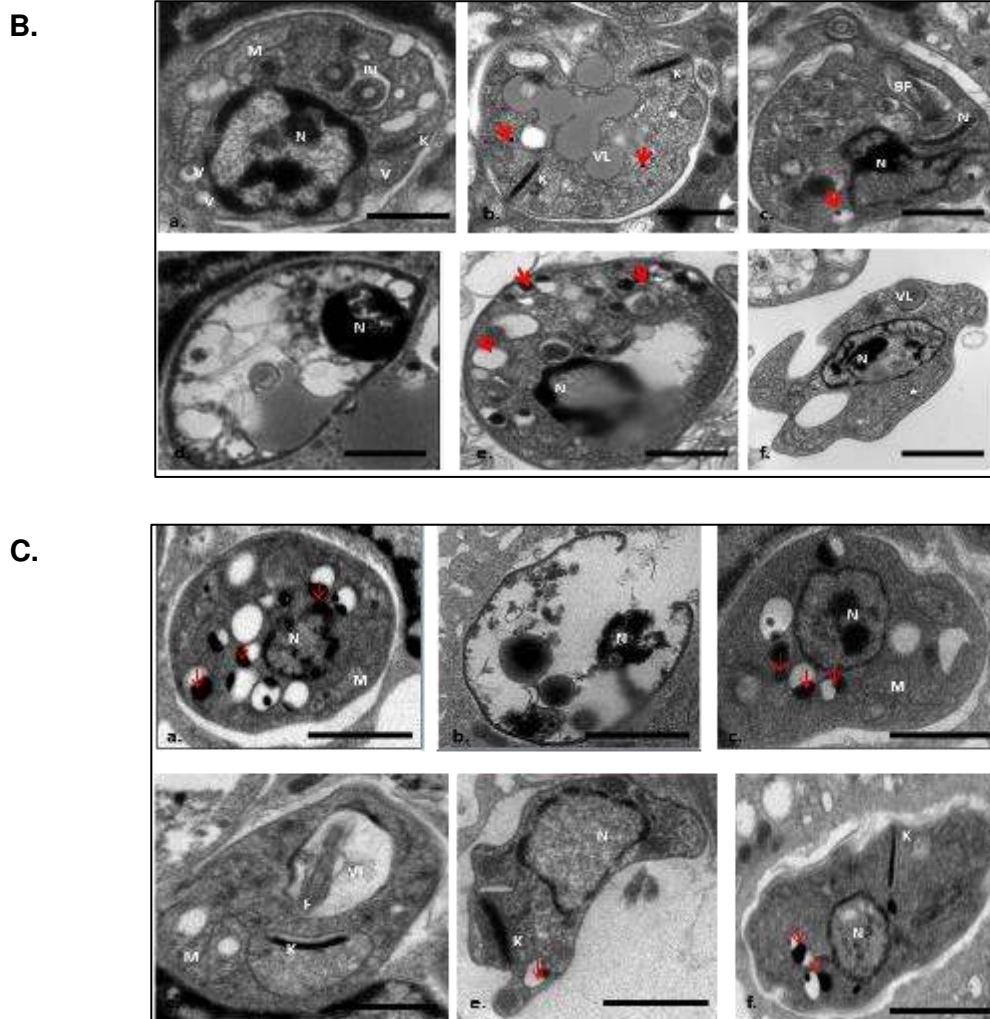
**Figura 39.** Alteraciones ultraestructurales en amastigotes intracelulares expuestos a compuestos triterpenoides. *Microscopia de transmisión electrónica (TEM)*. A. Amastigotes intracelulares. B. compuesto 1. C. 5. D.7. E.8. Magnificación 10.000X.

La exposición al compuesto **5**, mostró amastigotes intracelulares con alteraciones evidentes en su membrana celular como ruptura y pérdida de la forma ovalada de los parásitos intracelulares (Figura 39C-a y c). En algunos parásitos se observa la vacuolación significativa del citoplasma (Figura 30C panel c,d y e), así como la presencia de vacuolas electrodensas-oscuras de tipo acidocalcisomas (Figura 39C-e). En pocos parásitos fue evidente la presencia de organelos íntegros como kinetoplastos y núcleos (Figura 39C-b, d y f). Al analizar los efectos ocasionados por el compuesto (Aglicona) o saponina **7** en amastigotes, se evidenció la pérdida de la morfología ovalada de estos parásitos, la ruptura

de la membrana celular de alguno de ellos (Figura 39D-a,d y f), así como la presencia de vacuolas de electrodensas-oscuras de tipo acidocalcisomas (Figura 39D-a-f) y digestivas (Figura 30D-b y f). Adicionalmente, se observa la alteración de organelos intracelulares como el núcleo, bolsillo flagelar (Figura 39D-b y f). Los amastigotes expuestos al triterpenoide **8** mostraron en su mayoría, morfología asociada con la forma intracelular de *Leishmania* (Figura 39E-a,c,d y f), mientras que unos pocos parásitos cambiaron su forma de manera drástica (Figura 39E-b y e). Algunos de los parásitos tenían núcleos dobles en su citoplasma, así como organelos alterados en su estructura (Figura 39E-a, d y f). El citoplasma de estos amastigotes presentaban vacuolas electrodensas-oscuras de tipo acidocalcisomas y con membranas dobles (empaquetamiento de organelos) (Figura 39E-b,d y f).

Los parásitos expuestos al alcaloide plantilla **12** presentaban morfología irregular en la mayoría de la población (Figura 40A-a-f), evidenciado en la pérdida de la forma ovalada, distintivo de amastigotes intracelulares. Los núcleos de algunos parásitos presentan la pérdida de integridad y concentración anómala de cromatina (Figura 40A panel a,c,g y h), así como el hinchamiento o inflamación de la membrana nuclear (Figura 40A-d). La vacuolación del citoplasma se hace evidente en la mayoría de parásitos, mostrando vacuolas de doble membrana de tipo autofagolisosomas y electrodensas-oscuras tipo acidocalcisomas (Figura 40A-a,b,d y f).





**Figura 40.** Alteraciones ultraestructurales en amastigotes intracelulares expuestos a compuestos Alcaloides quinolínicos. *Microscopía de transmisión electrónica (TEM)*. A.12. B.13 y C.19. *Magnificación 10.000X*.

Por otro lado, los amastigotes tratados con el alcaloide **13** conservaron la morfología ovalada, sin alteraciones evidentes a su membrana celular (Figura 40B-a-f). Algunos pocos parásitos, mostraron daños evidentes en su citoplasma, conservando únicamente la membrana celular. Para los demás amastigotes, se observaron organelos intactos como núcleos, kinetoplastos y mitocondriones (Figura 40B-c,e y f) y en algunos de estos parásitos se evidenciaron axonemas y kinetoplastos duplicados. La presencia de vacuolas lipídicas-grises fueron evidentes en algunos de los parásitos, así como vacuolas electrodensas-oscuras de tipo acidocalcisomas (Figura 40B-e).

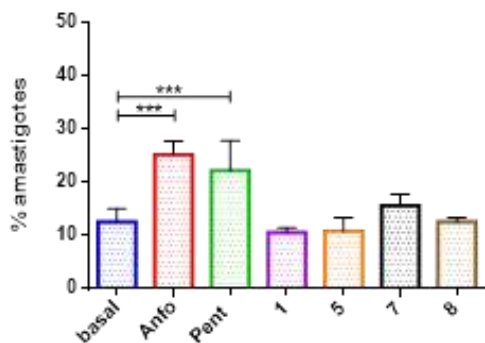
El análisis de parásitos intracelulares expuestos al alcaloide **19** mostró que la mayoría de estos, conserva su morfología ovalada (Figura 40C-a,c,d-f); sin embargo, en algunos parásitos, se observó la pérdida de la integridad de la membrana celular como ruptura y salida de material citoplasmático. El núcleo de algunos parásitos, también evidencia cambios estructurales, debido a la concentración anormal de cromatina (Figura 40C-a y f), así como la inflamación de membranas pertenecientes al bolsillo flagelar y kinetoplasto de los amastigotes (Figura 40 panel d). También se hace evidente, la vacuolación del citoplasma de algunos parásitos, con predominancia de vacuolas electrodensas-oscuras de tipo acidocalcisomas (Figura 40a,c y f).

### 6.3.3.1 Despolarización de la mitocondria de amastigotes intracelulares

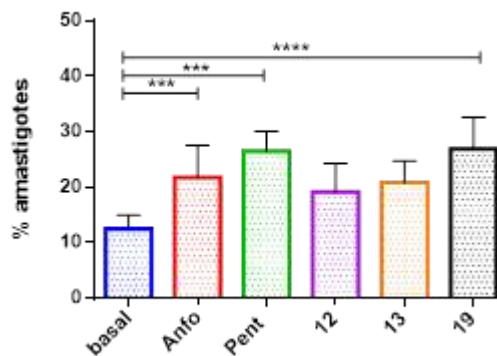
Debido a las alteraciones evidenciadas en los kinetoplastos y mitocondriones de amastigotes intracelulares, se evaluó la despolarización de la membrana mitocondrial en amastigotes aislados y expuestos a los compuestos antileishmaniales. La exposición de amastigotes a los medicamentos de referencia como pentamidina, anfotericina y PMA, causó la pérdida significativa del potencial de membrana mitocondrial tras 24 h de incubación.

Al exponer los parásitos a los compuestos triterpenoides, se observó que el triterpenoide saponina **7** indujo la pérdida del potencial de la mitocondria de forma significativa, en comparación con amastigotes sin tratamiento (Figura 41A). Al exponer estos parásitos a los compuestos alcaloides, se observó el aumento de la IMF en promastigotes tratados con el alcaloide **19**, indicando un efecto dirigido específicamente al organelo (Figura 41B)

**A.**



**B.**



**Figura 41.** Alteración de potencial de membrana mitocondrial  $\Delta\psi_M$  de amastigotes intracelulares aislados y tratados con compuestos antileishmaniales. *Despolarización mitocondria en amastigotes aislados. A. tratados con triterpenoides. B. Alcaloides quinolínicos. Significancia estadística \*p < 0.05, \*\*p ≤ 0.01, \*\*\*p ≤ 0.001, \*\*\*\*p ≤ 0.0001*

## 6.4 Discusión

Para identificar los posibles mecanismos de acción de las moléculas antileishmaniales, no solo es de gran importancia la determinación del efecto de los compuestos en las funciones microbicidas del macrófago, sino también los cambios a nivel estructural y fisiológico de estas moléculas, sobre la célula hospedera; ya que modificaciones en este tipo de células, pueden resultar en el control o exacerbación de la infección por *Leishmania* spp. (163,176,182).

La infección por *L. (V.) panamensis* afectó a MdMhu de manera diferencial a lo reportado para otras especies del género *Viannia* (185); ya que en MdMhu infectados por *L. (V.) panamensis*, se observó el aumento del número de MdMhu apoptóticos (apoptosis temprana), en comparación con MdMhu sin infectar, a las 72 h de tratamiento. Este hallazgo es de gran importancia, ya que este comportamiento ha sido demostrado para *L. amazonensis*, el cual causa lesiones crónicas y exacerbación de la infección en modelos murinos (185). Por otra parte, la presencia del parásito incrementa el volumen celular de los MdMhu infectados, originado por el proceso de infección y la carga parasitaria, que modulan procesos de remodelamiento del citoesqueleto y membrana celular, acompañados del estallido oxidativo sin ocasionar daños evidentes que comprometan la sobrevivencia del parásito (54). Otro fenómeno observado en MdMhu infectados por *L. (V.) panamensis*, fue la presencia de abundantes vacuolas lipídicas en el citoplasma de las células próximas a la vacuola parasitófora y en parásitos intracelulares; indicando que al igual que *L. (L.) major*, el parásito podría estar modulando la producción de este tipo de reservas energética, para su propio bienestar, ya que esta fuente constituye un recurso valioso para la beta-oxidación de ácidos grasos en el amastigote intracelular (183). En general, no se observaron alteraciones evidentes en la membrana u organelos de amastigotes intracelulares, encontrándose en algunos de ellos abundantes gránulos electrodensos, asociados generalmente a compartimentos ácidos (acidocalcisomas), y los cuales se relacionan con procesos de detoxificación y respuesta a estrés osmótico (113,186) en la vacuola parasitófora.

En general, todos los compuestos triterpenoides generaron cambios morfológicos en Mdmhu infectados e indujeron la presencia de protuberancias membranales las cuales se relacionan con procesos de apoptosis (187), propios de la infección por *L. (V.) panamensis* (Figura 23A-B) en donde no se alteró de forma significativa la integridad de la membrana celular de los Mdmhu tratados. De forma particular, la presencia de vacuolas densas de tipo lipídico, fueron visibles en Mdmhu expuestos al limonoide plantilla (**1**), de manera similar a lo observado en células infectadas; lo que indica que este compuesto, no genera cambios significativos en organelos vitales como mitocondria y membrana celular de la célula hospedera (Figura 26). Mientras que en los amastigotes intracelulares fue evidente el hinchamiento de la membrana mitocondrial y del kinetoplasto, así como la presencia de múltiples organelos y vacuolas lipídicas de gran tamaño, que sugieren la alteración de procesos celulares como ciclo celular (citoquinesis disfuncional) e inducción de muerte celular de tipo apoptosis y que se ven reflejados en la actividad antileishmanial reportada.

Los compuestos pentacíclicos **5** y **8** mostraron comportamientos diferenciales, resultando en la aparición de vacuolas de doble membrana (Fagosomas), relacionados con la inducción de procesos de autofagia y apoptosis de la células (187,188) por parte del compuesto **5** y en la presencia de vacuolas electrodensas de tipo lisosomas, en Mdmhu expuestos al triterpenoide **8** y los cuales se relacionan con procesos de fagocitosis y activación de procesos inflamatorios, entre estos la producción de óxido nítrico (188). Los amastigotes intracelulares tratados con estos dos compuestos, mostraron abundantes gránulos electrodensos de tipo acidocalcisosomas, lo cual puede sugerir la inducción de estrés osmótico y pérdida de la homeóstasis dentro de la vacuola parasitófora (189), así como la evidente desintegración de la estructura intracelular de los amastigotes expuestos al compuesto **5**; sugiriendo que el compuesto pentacíclico **5**, tiene propiedades de tipo pro-farmaco, ya que la actividad mas evidente del compuesto se observa específicamente en el amastigote intracelular.

Adicional a esto, los amastigotes expuestos al pentacíclico **8**, muestran características típicas de procesos apoptóticos, como la condensación de cromatina y la desintegración celular, los cuales podrían ser consecuencia del efecto del óxido nítrico producido por el macrófago (190) y sugiriendo el modo de acción del triterpenoide **8** de tipo inmunomodulador.

Mientras que el compuesto **7** de tipo saponina, afectó el potencial de membrana mitocondrial exclusivamente en MdMhu infectados, sin afectar la integridad de membrana celular y acentuando la presencia de vacuolas digestivas (Figura 22G-H), sugiriendo que este compuesto, puede estar involucrado en procesos de autofagia que buscan proteger a la célula de procesos oxidativos e inflamatorios (188,191), y también juegan un papel importante en la modulación de la infección por *Leishmania* en modelos murinos (180,192). En amastigotes intracelulares, fue evidente la pérdida de la integridad de la membrana celular y nuclear de la mayoría de los parásitos, así como el hinchamiento de las membranas que rodean las mitocondrias y kinetoplastos, así como la pérdida del potencial mitocondrial de los parásitos que aún conservan su morfología; evidenciando el daño de múltiples organelos en el parásito intracelular, en especial de compartimentos mitocondriales, los cuales inducen la muerte del parásito. Estos hallazgos podrían suponer que el modo de acción de esta molécula, involucra la mitocondria del macrófago y del parásito de forma diferencial, ya que solo en el amastigote se observa un efecto negativo que causa la posible muerte del parásito.

La evaluación de alcaloides quinolínicos sobre la ultraestructura en primer lugar de MdMhu infectados, indujeron el cambio de morfología en las células, sin daño aparente en mitocondria y membrana celular. La aparición de vacuolas digestivas, así como de doble membrana se hacen evidentes en MdMhu expuestos al compuesto plantilla (**12**); estos hallazgos, junto con la escasa aparición de amastigotes intracelulares en célula, indica un proceso exitoso de eliminación del parásito, el cual se ve reflejado en la alteración evidente de cromatina, la abundante presencia de vacuolas digestivas y el hinchamiento de la membrana mitocondrial de los amastigotes, inducido por la producción de óxido nítrico (190). Todo esto sugiere que el modo de acción de esta molécula tiene un papel dual, debido a su efecto sobre promastigotes (permeabilidad de membrana celular y despolarización de la mitocondria), amastigotes intracelulares, así como su efecto inmunomodulador sobre MdMhu infectados.

El efecto del compuesto **13** generó la aparición y aumento significativo de vacuolas lipídicas, en comparación con los demás compuestos alcaloides, que rodean las vacuolas parasitóforas gigantes y con varios parásitos en su interior. Estas características fenotípicas llaman la atención, debido a que en MdMhu infectados sin tratamiento, se observan vacuolas parasitóforas que rodean a *L. (V.) panamensis*, de forma individual y ajustadas al

parásito(193,194), comparadas con las evidencias mostradas por el compuesto **13**, y que sugieren la posibilidad de fusión entre las diferentes vacuolas parasitóforas y su capacidad digestiva (reflejada en la integridad de los amastigotes intracelulares)(Figura 23B). La presencia de vacuolas lipídicas, también podría suponer un efecto sobre este fenómeno, ya que se ha descrito la correlación entre la la concentración de lípidos (colesterol) y la formación y biogénesis de vacuolas parasitóforas (195,196). En amastigotes, se evidenciaron procesos de apoptosis, los cuales se caracterizan por la citoquinesis alterada (dos axonemas, dos kinetoplastos) (197), hinchamiento de la mitocondria, condensación de cromatina y presencia de organelos rodeados por membranas celulares (estructuras de tipo mileina), lo que apunta a un posible mecanismo de acción dirigido a vías involucradas en apoptosis (198); ocasionadas posiblemente por el favorecimiento de la respuesta oxidativa en las células hospederas, durante las primeras horas de tratamiento y a la modulación del metabolismo lipídico de la célula hospedera y del parásito, que favorece no solo la efectividad *in vitro*, si no también la eficacia terapéutica en modelos *In vivo* (Figura 8-9).

El efecto del alcaloide **19** por otra parte, fue evidente en MdMhu infectados, resultando en el evidente aumento de células apoptóticas y apoptosis tardía (Figura 24A) en comparación con los demás tratamientos (Figura 24B), así como en la disminución del tamaño de las células infectadas y la visualización de algunos MdMhu con notables daños en la membrana de los MdMhu (Figura 22C). Por otra parte, en amastigotes intracelulares se evidenció la presencia de gránulos electrodensos (acidocalcisomas), vacuolación del citoplasma, daño en kinetoplasto y mitocondria (evidenciado en el hinchamiento de la membrana mitocondrial), junto con la despolarización de la membrana mitocondrial, que conllevan a la inducción de procesos de muerte en parásitos intracelulares (104,198). Cabe la pena resaltar, que este efecto (muerte celular) no se limita al parásito intracelular, sino también a hMDM infectados; sugiriendo que su selectividad no solo le permite disminuir el número de células infectadas, sino también inhibir el crecimiento y desarrollo del parásito (evidenciado en la disminución de carga parasitaria).



## **7 Determinación del perfil protéico de amastigotes intracelular**

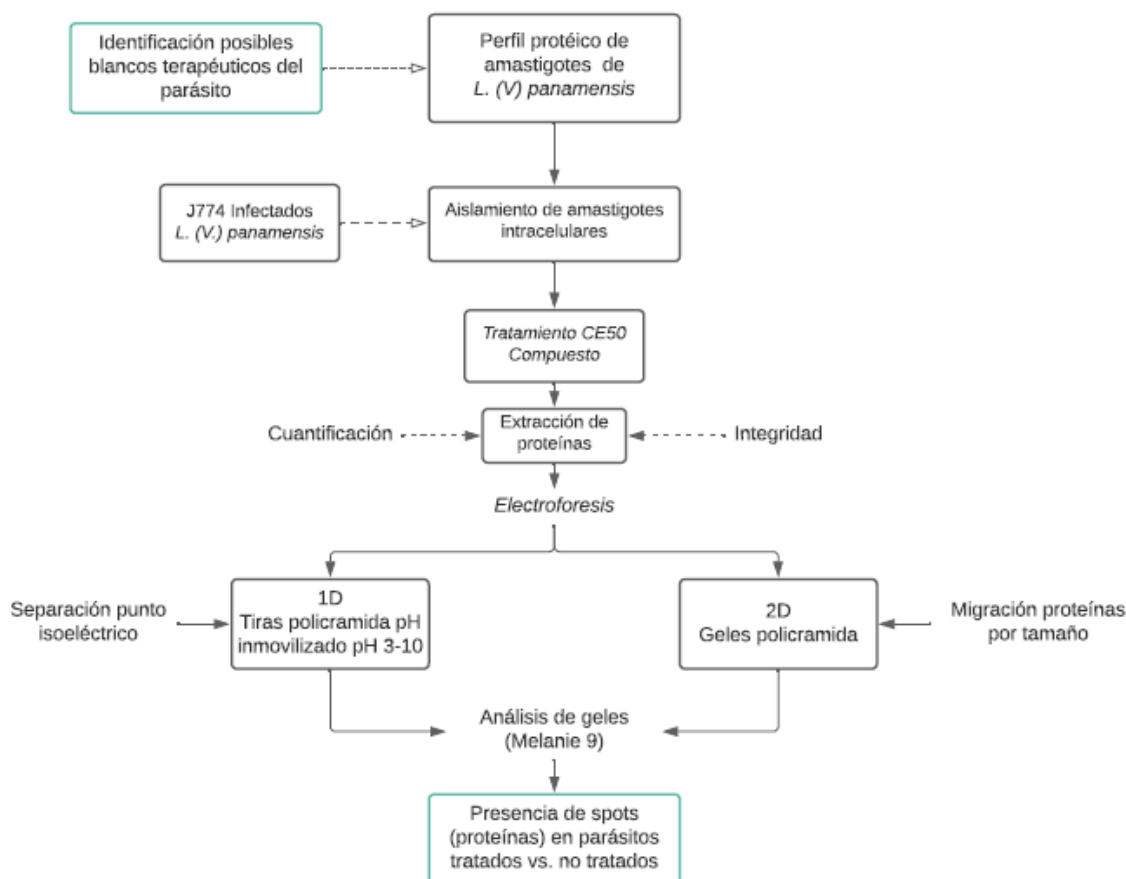
De acuerdo con el diseño racional de medicamentos, la identificación de blancos terapéuticos en el patógeno, constituye uno de los pilares para el desarrollo y optimización de nuevos medicamentos(22,199). Por esta razón, evaluamos la expresión diferencial de proteínas de amastigotes intracelulares expuestos y no expuestos al compuesto antileishmanial que cumpliera con requisitos específicos.

Teniendo en cuenta los anteriores objetivos, en donde se evaluó la actividad In vitro e In vivo, así como la capacidad de afectar organelos y procesos fisiológicos en el parásito

intracelular, se seleccionó el compuesto sintético antileishmanial para identificar proteínas expresadas o no bajo este tratamiento. Estos requisitos fueron: compuesto sintético con  $CE_{50} < 10 \mu\text{M}/10 \mu\text{g/mL}$  (amastigotes y promastigotes),  $IS > 2$  (Selectivos frente a amastigotes intracelulares), efectos evidentes en amastigotes intracelulares en su ultraestructura y evidencia de curación clínica en los hámsteres tratados.

Como una primera aproximación a la identificación de blancos del parásito, usamos la electroforesis en 2 dimensiones, a través del espectro de pH 3-10, para determinar perfiles de expresión de proteínas entre diferentes tratamientos(200) (Figura 42).

### 7.1 Diseño experimental



**Figura 42.** Diseño experimental de la búsqueda de proteínas expresadas diferencialmente entre amastigotes tratados con el compuesto vs. No tratados

## 7.2 Metodología

### 7.2.1 Obtención de amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis*

Macrófagos murinos de la línea celular J774, fueron usados como modelo para la obtención de amastigotes intracelulares. Para esto  $5 \times 10^5$  macrófagos/ mL fueron sembrados en placas de Petri en medio RPMI 1640 (Gibco, MA, USA), suplementado al 10 % de SFB (HyClone, GE healthCare, LC, UK) durante 1 hora a 37°C, permitiendo la adherencia de las células al plato de cultivo. Después de este tiempo, se realizó la infección con promastigotes metacíclicos de *L. (V.) panamensis* a un ratio de infección 1:20 (Macrófagos:parásitos) durante 4 h a 34°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Al cabo de este tiempo, los parásitos no internalizados fueron removidos por medio de lavados con PBS 1X y las células fueron cultivadas de nuevo en RPMI 1640 (Gibco, MA, USA), suplementado con SFB (Hyclone, GE Healthcare, LC, UK) al 10 % e incubadas a 34°C y 5 % de CO<sub>2</sub>, durante 48 h. Durante este tiempo se monitoreó la infección, comprobando la infección mayor al 80 %.

Al cabo de este tiempo, el medio de cultivo fue centrifugado a 1500 rpm durante 5 minutos y re-suspendido en 2 mL de PBS esteril; paralelo a esto, las células adherentes fueron despegadas por medio de cell scraper y suspendidas en 2 mL de PBS. Después de esto, tanto las células del medio de cultivo y las desprendidas fueron pasadas a través de jeringas de 1 mL al menos 10 veces, forzando al rompimiento de los macrófagos y a la liberación de los amastigotes intracelulares. Después de esto, los parásitos y las células intactas fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos, descartando el pellet (células intactas) y centrifugando de nuevo el sobrenadante a 3500 rpm durante 5 minutos. Se contaron los parásitos intracelulares, evitando la transformación de los parásitos a promastigotes. Un total de  $8 \times 10^7$  amastigotes fueron usados para cada tratamiento, en donde se cultivaron a 34°C y en RPMI 1640 (Gibco, MA, USA) (pH 5.4) y suplementado al 10 % de SFB (HyClone, GE HealthCare, LC, UK).

Finalmente, los parásitos fueron expuestos a las CE<sub>50</sub> de los compuestos seleccionados y cultivados en RPMI 1640 (Gibco, MA, USA) pH 5.4 y suplementado al 10 % de SFB (HyClone, GE HealthCare, LC, UK) durante 24 h. Al cabo de este tiempo, los parásitos fueron lavados tres veces con PBS 1X y re-suspendidos en 250 µL de buffer de lisis (Urea 9M, CHAPS 4 %, DTT 40 mM y anfólitos 1 %) y suplementado con 1 µL de inhibidor de proteasas a 4°C. Las muestras fueron sonicadas durante 5 minutos a 4°C y se una alícuota

de esta fue usada para cuantificación de proteínas (BCS protein Quantification) (Invitrogen, MA, USA), mientras que el resto de la muestra fue almacenada a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

## **7.2.2 Cuantificación y evaluación de la integridad de las proteínas totales de amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis***

Una alícuota de las proteínas almacenadas fue usada para este procedimiento. Para cuantificar la concentración de proteínas, fue usado el Kit BCA (ácido binciconílico) (Thermo Scientific, MA, USA), en donde se tomaron  $10\ \mu\text{L}$  de la muestra a evaluar y  $100\ \mu\text{L}$  de la solución de trabajo, e incubados durante 45 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Después de esto, la concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) fue cuantificada por medio de la medición de la absorbancia en el lector de microplacas VariosKan (ThermoFisher, MA, USA). Por otra parte, para validar la integridad de las proteínas se realizó SDS-PAGE, donde se usaron  $10\ \mu\text{L}$  de proteínas. Teniendo en cuenta lo anterior, las muestras fueron sembradas en geles de acrilamida que contenían TRIS-Glicina al 10 %, con 3M TRIS/HCL/SDS, 40 % acrilamida, 50 % glicerol, 10 % APS y TEMED; usando como gen de staking una solución con 3M TRIS/HCL/SDS, 40 % Acrilamida, 10 % APS y TEMED.

Se usó como marcador de peso molecular de 240 MW. El corrido electroforético fue realizado con las condiciones experimentales como 120 V, 300 mA, 300 W durante 90 minutos. Al cabo de este tiempo, se llevó a cabo el revelado del gel con nitrato de plata, la visualización se llevó a cabo en ImageScanner III (GE Healthcare, LC, UK, ) y el análisis de imágenes con el programa Melanie 8.0.

## **7.2.3 Condiciones experimentales de la electroforesis bi-dimensional con tirillas de 18 cm**

### **7.2.3.1 Primera dimensión**

En tiras de policramida de gradiente de pH inmovilizado (IPG) de 18 cm y con rango de pH de 3 - 10 y 4 - 7 (GE Healthcare, LC, UK) fueron separadas las proteínas previamente aisladas y cuantificadas. Para esto las proteínas ( $300\ \mu\text{g}$ ) fueron diluidas en volumen final de  $125\ \mu\text{L}$  de solución de hidratación (8M urea, 2 % (p/v) CHAPS, 40 mM DTT, 1 % (v/v) anfólitos 4-7 y 0.02 % azul de bromofenol). Después de esto, la muestra se aplicó dentro del sarcófago y se colocó en contacto con la tirilla IPG con el gel deshidratado en contacto.

Para evitar la desecación se agregaron 500  $\mu$ L de aceite mineral (DryStrip cover fluid, Amersham) en el sarcófago.

Las muestras se separaron por punto isoeléctrico en un sistema Ettan IPGphor 3 a una temperatura de 20°C a 50  $\mu$ A/tirilla: rehidratación constante de 1 a 200V por una hora (100 Vhr); gradiente desde 200 a 500V por una hora (350 Vhr); gradiente desde 500 a 1000V por una hora (750 Vhr); gradiente desde 1000 a 3500V por 30 minutos (1125 Vhr); 3500 constantes por 5 h o hasta completar un voltaje igual o superior a 12000 Vhr.

### **7.2.3.2 Segunda dimensión**

Las tirillas hidratadas, fueron sometidas a un proceso de reducción en solución de equilibrio: 6 M urea, 2 % (v/v), Tris-HCl 375 mM (pH 8.8) y glicerol 20 % (v/v) y DTT (10 mg/mL), a temperatura ambiente por 20 minutos y después a un proceso de alquilación con la solución de equilibrio y 25 mg/mL de Yodoacetamida (IAA) durante 20 minutos, para alquilar los grupos tiol de las proteínas evitando la reoxidación durante la electroforesis.

A continuación, las tirillas fueron situadas sobre geles de poliacrilamida al 10% de 1 mm de espesor. Para facilitar el contacto entre la tirilla y el gel, así como la visualización y migración de proteínas, se adicionaron 500  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión al 1 % y azul de bromofenol. La migración de las proteínas se realizó en el sistema Ettan IPGphor3 (GE, HealthCare, LC, UK) en solución Tris/Glicina/SDS, empleando 20V/cm durante 6 h.

Después de este tiempo, los geles fueron lavados dos veces con agua destilada y fijados durante 24 h con solución de fijación (50 % metanol, 40 % agua destilada y 10% ácido acético). Después de este tiempo y basados en la resolución de las proteínas visualizadas por SDS-PAGE, se tiñeron los geles con nitrato de plata y se visualizaron por medio del software ImageScanner III (GE HealthCare, LC, UK), para analizarlas por medio de Melanie 9.0.

### **7.2.4 Análisis de imágenes (Geles 2D)**

El análisis de los geles fue llevado a cabo por medio del programa Melanie 9. En donde se llevó a cabo el control de calidad de las imágenes obtenidas de los genes 2D-PAGE. Para esto se cargaron las 6 imágenes correspondientes a cada tratamiento con su respectiva

réplica, agrupandola en dos grupos de comparación respecto al factor A: Grupo 1 (ST) y Grupo 2 (**19**). Adicionalmente, se llevó a cabo la edición de las imágenes de los geles 2D, donde se ajustó el PI, dependiendo de las tirillas usadas para la evaluación proteómica (Immobiline DryStrip pH 3-10) (GE HealthCare, LC, UK). Después de la agrupación la adjudicación de PI (punto isoelectrico) de cada una de los geles, se llevó a cabo la detección de los spots por parte del Software y se revisaron y editaron manualmente para crear un gel de referencia (ST) de comparación.

Adicionalmente, se llevó a cabo la curación manual de los spots, donde cualquier spot con anomalías debido a la distorsión (rayas) o que se considere como artefactos de la técnica (burbujas) se descartó. Adicionalmente, los spots que mostraron alta saturación o distorsión se descartaron, independiente de la expresión diferencial entre los geles; con el fin de eliminar spots falsos y corregir el alineamiento entre los geles. Posteriormente se analizó el perfil de expresión de cada uno de los spots, obteniendo valores de media, desviación estandar, coeficiente de variación, tasa de cambio (Fold) y el valor de p para cada uno de los geles, a partir del análisis estadístico de ANOVA, usando el valor del volumen normalizado. Finalmente, los spots seleccionados para su correspondiente análisis debían cumplir con los resultados del análisis comparativo de las imágenes de los geles con Melanie 9.

Para la comparación de los patrones de expresión de los spots obtenidos para cada individuo se usaron las herramientas integradas de Melanie 9. Se realizó el análisis por selección de spots de interés, donde cada spot fue definido por PI (teórico), ejes (X,Y), imagen 2D e Imagen 3D, lo cual es una primera aproximación para evaluar la calidad de los datos cuantitativos y a la vez identificar spots con un perfil de expresión similar.

Los spots escogidos para la comparación entre geles tuvieron los siguientes criterios de inclusión: -Presencia de los spots en al menos dos geles del mismo tratamiento, - El porcentaje del volumen  $\%vol > 0.01$  o intensidad  $I > 0.01$ , - spots bien definidos, no artefactos de la técnica utilizada. Después de esto, se analizaron los niveles de expresión de cada uno de los spots, en donde se evidenciaron cambios relevantes en el porcentaje del volumen normalizado de las probables proteínas.

#### 7.2.4.1 Análisis estadístico

Los resultados de este proyecto, fueron analizados de acuerdo con los parámetros de cada método, y cada resultado se validó por la comparación frente a los controles establecidos para cada ensayo. Dependiendo del set de datos de cada ensayo, se realizó el análisis de normalidad de los datos y dependiendo de esto, se llevó a cabo el análisis estadístico apropiado [ANOVA de una o dos vías o Kruskal wallis]. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo por el programa GraphPad Prism versión 6.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

La significancia estadística en todos los casos, se estableció usando valores de significancia ( $P < 0.05$ ). En donde  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*),  $p < 0.005$ (\*\*\*) y  $p < 0.001$ (\*\*\*).

### 7.3 Resultados

#### **Estandarización de cultivo de células J774 y de los parásitos *L. (V.) panamensis***

Debido a la variabilidad en la recuperación de amastigotes intracelulares en macrófagos derivados de monocitos humanos (Mdmhu) usados durante los objetivos anteriores de tesis, se usaron macrófagos murinos de la línea celular J774, debido a su facilidad de cultivo, su crecimiento en forma monocapa adherente de forma indefinida y el porcentaje de infección reportado por Mesa, C en el 2010 (>90 % células infectadas a 4H post-infección).

Adicionalmente, se realizó la infección de J774A.1 por *L. (V.) panamensis*, aislada y recuperada de ratones BALB/c en el grupo de Investigación en Inmunotoxicología (Universidad Nacional de Colombia), donde células J774A.1 fueron infectadas por *L. (V.) panamensis* a un ratio de 1 célula por 10 parásitos (1:10), durante 24 h a 3°C. En donde se determinó previamente el porcentaje de células infectadas por medio de la marcación según Giemsa; mostrando el  $67,3 \pm 12,6\%$  de macrófagos contenía al menos un parásito por célula a las 4 h post-infección.

### 7.3.1 Extracción y cuantificación de proteínas totales de amastigotes de *L. (V.) panamensis*

La cuantificación de proteínas fue realizada por medio de ácido binciconínico (BCA) (ThermoFisher, MA, USA). En donde se realizó la curva de concentración vs. Absorbancia (nm) y por medio de regresión lineal se estableció la ecuación lineal para determinar la concentración de las muestras desconocidas.

**Tabla 14.** Concentración proteínas de amastigotes aislados y expuestos a compuestos alcaloides

Muestra	ABS (nm $\pm$ DE)	Concentración $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
AST-Estandarización	1.1295 $\pm$ 0.056	26.28
AST-R1	0.457 $\pm$ 0.003	8.78
AST-R2	0.458 $\pm$ 0.002	9.02
13-R1	0.450 $\pm$ 0.004	8.87
13-R2	0.444 $\pm$ 0.001	8.66
19-R1	0.472 $\pm$ 0.003	10.72
19-R2	0.425 $\pm$ 0.003	8.68
AST-R3	0.782 $\pm$ 0.004	15.08
13-R3	0.792 $\pm$ 0.002	15.35
19-R3	0.697 $\pm$ 0.004	13.30

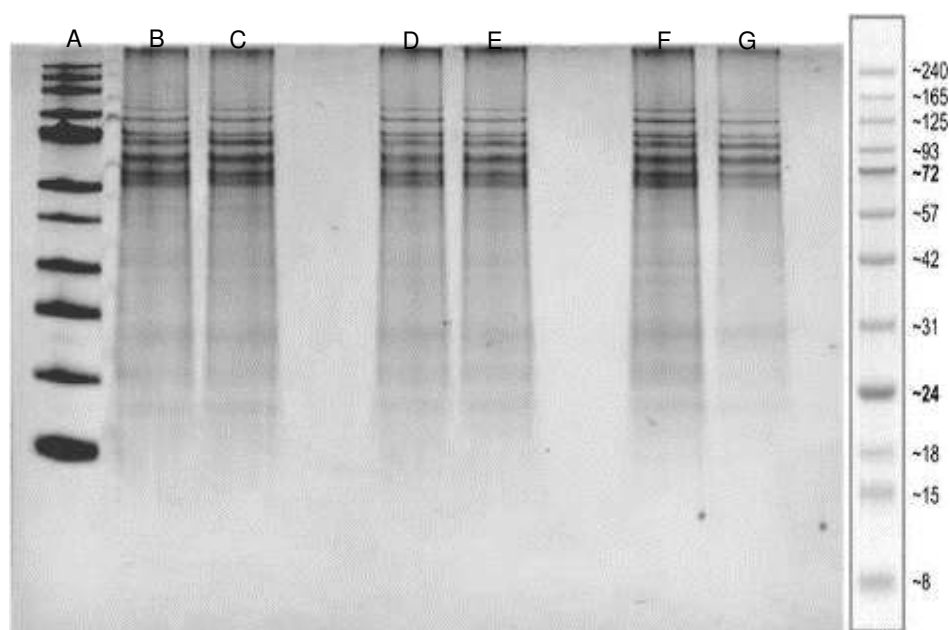
AST. Amastigotes sin tratar. R. Réplica. . Alcaloide **13**. . Alcaloide **19**. ABS. Absorbancia. DE. Desviación estandar

Estos resultados muestran que a partir de  $4 \times 10^6$  amastigotes aislados, es posible obtener la concentración adecuada para la realización de la electroforesis bi-dimensional ( $<500 \mu\text{g}$  de proteína). Adicionalmente, se observan concentraciones de proteínas similares entre tratamiento y entre las réplicas, mostrando baja variabilidad en los resultados a obtener (Tabla 14).

### 7.3.2 Determinación de la integridad de las proteínas extraídas por medio de SDS-PAGE



Al determinar la integridad de las proteínas totales de amastigotes tratados con los compuestos alcaloides, se pudo comprobar que las muestras tuvieron un corrido electroforético similar y se observaron bandas con alta resolución entre 165 kDa y 8 kDa de peso. Estos resultados demuestran que no hay degradación de proteínas y que estas muestras pueden ser usadas para la siguiente fase experimental (Figura 43).

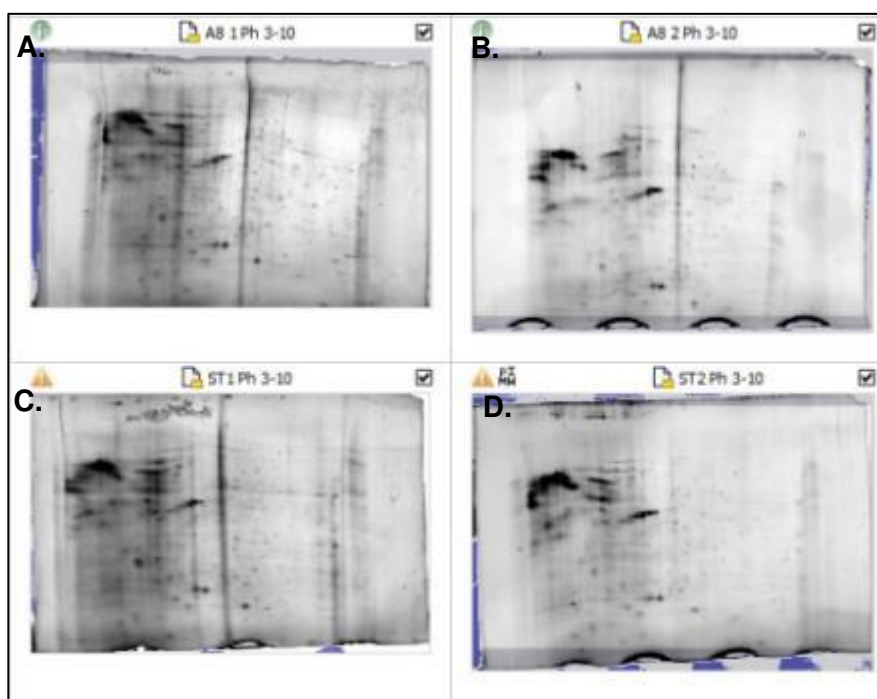


**Figura 43.** Integridad de proteínas de amastigotes aislados y expuestos a los alcaloides quinolínicos sintéticos. *SDS-PAGE*. A. Marcador de peso molecular 240 KDa. Proteínas amastigotes tratados con B-C. **19**. D-E. **13**. F-G. AST.

### 7.3.3 Comparación proteómica de amastigotes tratados con alcaloides sintéticos vs. Sin tratar Análisis de los geles obtenidos por 2D-PAGE

Debido a las propiedades antileishmaniales (efectividad sobre promastigote y amastigotes intracelular) y a su efecto terapéutico (40% cura y 50% de mejoría clínica) y a su efecto directo sobre el parásito, para la evaluación del proteoma mediante 2D-PAGE se seleccionó el tratamiento con el alcaloide **19** y su correspondiente control sin tratar (AST), los cuales se hará referencia en adelante como **ST** (sin tratamiento) y **19** (alcaloide **19**), respectivamente.

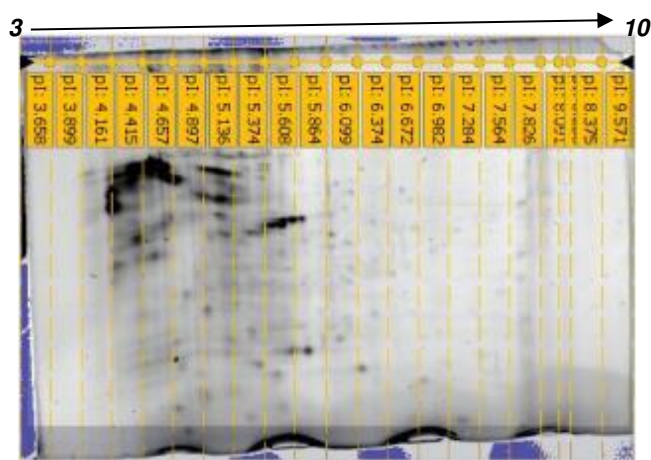
Con las proteínas de amastigotes intracelulares previamente reducidas y alquiladas se realizó la 2D-PAGE y se obtuvieron los geles para cada uno de los tratamientos, lo cual verificó la eficiencia en la extracción de proteínas, ya que no se observaron señales intensas que podrían generar distorsión del perfil electroforético (Figura 44). A continuación, se realizó el análisis comparativo de los geles 2D-PAGE para cada uno de los tratamientos (con y sin tratamiento). Teniendo en cuenta que el análisis comparativo se basa en la calidad de las imágenes de los geles evaluados, se llevó a cabo en primer lugar, la detección de la integridad, orientación e intensidad de los spots presentes en los geles (Figura 44) de cada uno de los tratamientos.



**Figura 44.** Alineamiento de geles 2D para cada uno de los tratamientos. *Electroforesis 2D. Alineamiento geles A. 19 réplica 1. B. 19 réplica 2. C. ST réplica 1. D. ST réplica 2*

En donde los geles 19-1 (Figura 45A) y A8-2 (Figura 45B) no mostraron presencia de background evidente, mientras que los geles ST-1 y ST-2 (Figura 45C y D) presentan entre 0.29 a 0.48% de background. Sin embargo, los geles de 2D-PAGE obtenidos a través de la extracción de proteínas de amastigotes intracelulares expuestas al alcaloide, muestran buena resolución en la separación de spots con un patrón de distribución regular y homogéneo en los geles entre tratamientos (ST vs.19) y con las mismas réplicas del experimento (Figura 41).

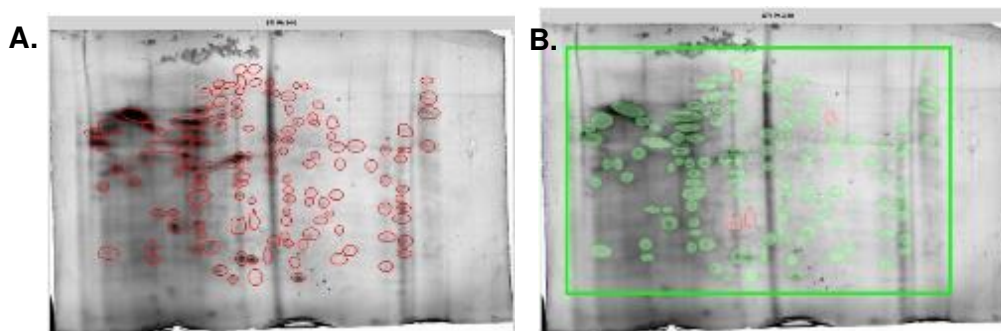
En los geles se observan spots bien definidos y patrones de separación de spots comparables, indicando que la metodología empleada fue la adecuada. Además, se observa mayor presencia de spots entre los pH 3.89 y 6.099, mientras que se observan spots de poca resolución entre pH 6.73 y 7.82; lo cual evidencia la separación adecuada entre los spots, teniendo en cuenta que las proteínas evaluadas se encuentran dentro del rango pH ácido (Figura 45).



**Figura 45.** Geles 2D con strips pH 3-10. Punto isoeléctrico de spots expresados en geles. *Punto isoelectrico según Strips (2D) usados (GE healthCare). Se realizó para cada una de las condiciones experimentales*

Después de la asignación de pH para cada píxel en el gel, de acuerdo con coordenadas y strips utilizados, se realizó a detección de los spots basados en varios parámetros: Smooth (valor =3), Profundidad (valor=10) y área mínima (valor=5), para cada uno de los geles evaluados (Figura 60). Para esto, el programa de forma automática, detecto 442 spots, de los cuales, el 22% de los spots no cumplían alguno de los tres parámetros, por lo cual fueron eliminados del análisis posterior.

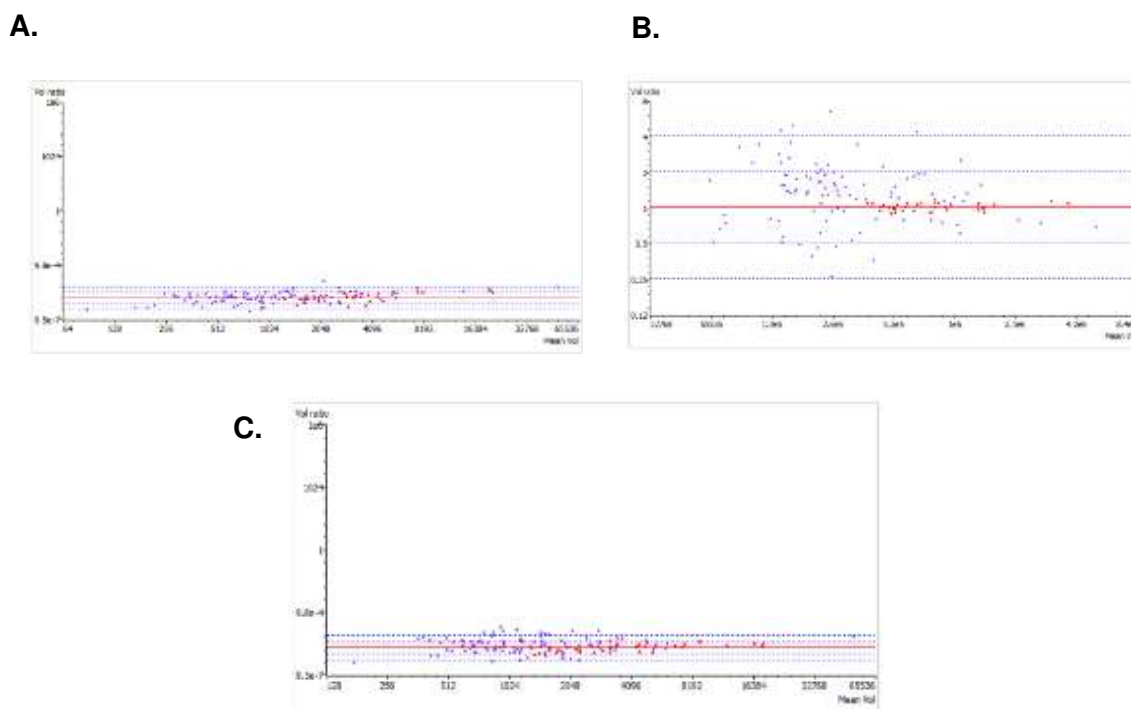
Después de esto, se observaron que algunos spots no se habían detectados y que el area de estos, se encontraba por fuera de los parámetros y del area de comparación de todos los geles evaluados. Por esta razón, se llevó a cabo la edición manual de los spots no detectados, resultando en un total de 132 spots validados (Figura 46).



**Figura 46.** Anotación automática y manual de spots presentes en los geles 2D. *A. Detección automática spots (software Melanie 9.0). B. alineamiento de geles y selección de zona mayor intensidad en geles 2D*

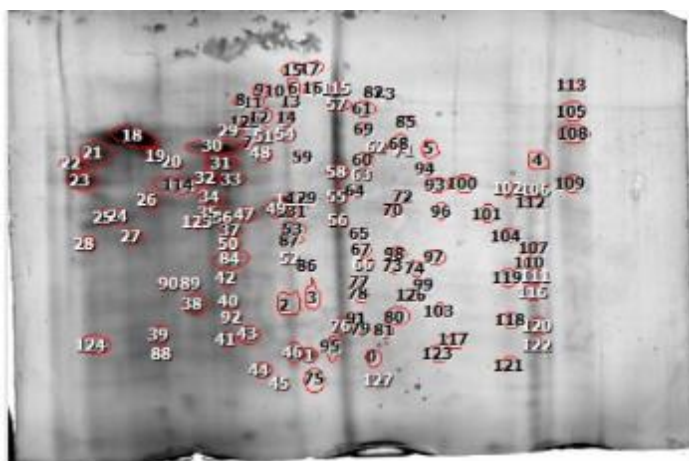
### **7.3.4 Selección de spots y análisis del %volumen normalizado en amastigotes intracelulares expuestos al alcaloide 19**

Después de esta validación de spots, fue posible la normalización de cada uno de los geles, para identificar posibles emparejamientos. Para esto, se realizaron comparaciones entre geles del mismo tratamientos ST-1 vs. ST-2 y 19-1 vs. 19-2 y entre factores de comparación ST vs. 19-2 (Figura 47A-C). En este sentido, se pudo normalizar el % volumen de cada uno de los spots para los geles entre tratamientos (ST-1 y ST-2), de los cuales 32 de estos se constituyen como spots de referencia (puntos rojos), necesarios para la alineación de los geles (Figura 47A), mostrando homogeneidad entre los spots a evaluar (puntos morados) de los dos geles y tomando como referencia de comparación la imagen del gel ST-1. Por otra parte, al comparar los geles ST-1 vs. 19-1 (Figura 47B), se observó la dispersión de puntos, mientras que ST-1 vs. 19-2, se conserva la homogeneidad de los spots detectados. Sugiriendo diferencias evidentes entre los geles que corresponden a los tratamientos con el alcaloide A8. (Figura 47C).



**Figura 47.** Alineamiento y normalización de spots detectados en geles comparados. *Normalización de spots presentes en los geles. Comparación entre A. ST1 vs. ST2 B. ST1 vs. 19-1. ST1 vs. 19-2.*

Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó la comparación entre los spots normalizados para cada gel, encontrando un total de 127 spots, los cuales cumplen con los requerimientos propuestos en la metodología: Volumen, profundidad e intensidad y presencia en al menos dos geles por tratamiento (Figura 48). Todos los spots detectados, fueron previamente curados, se encuentran dentro de la zona de análisis, no hacen parte de background de la técnica (artefactos). Adicionalmente, algunos de ellos son de carácter constitutivo (se encuentran en los geles ST y 19) y se correlacionan con los spots establecidos en el proceso de normalización.

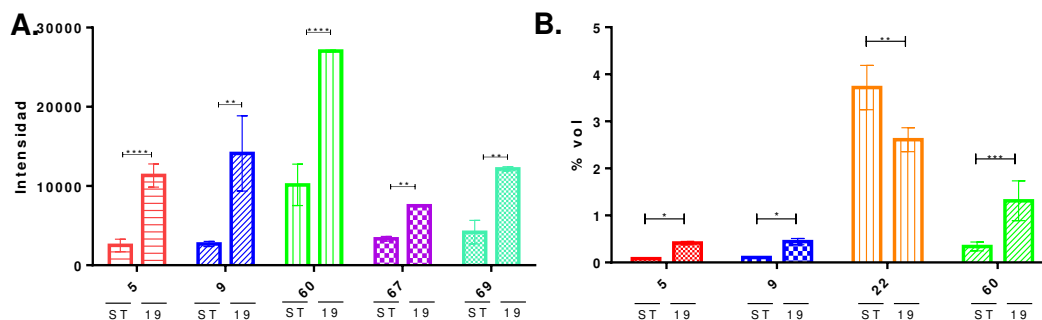


**Figura 48.** Detección de spots, validación y comparación entre spots expresados diferencialmente entre tratamientos.

*Comparación gels entre ST vs. 19. Números blancos (Anotación automática). Números negros (Anotación manual)*

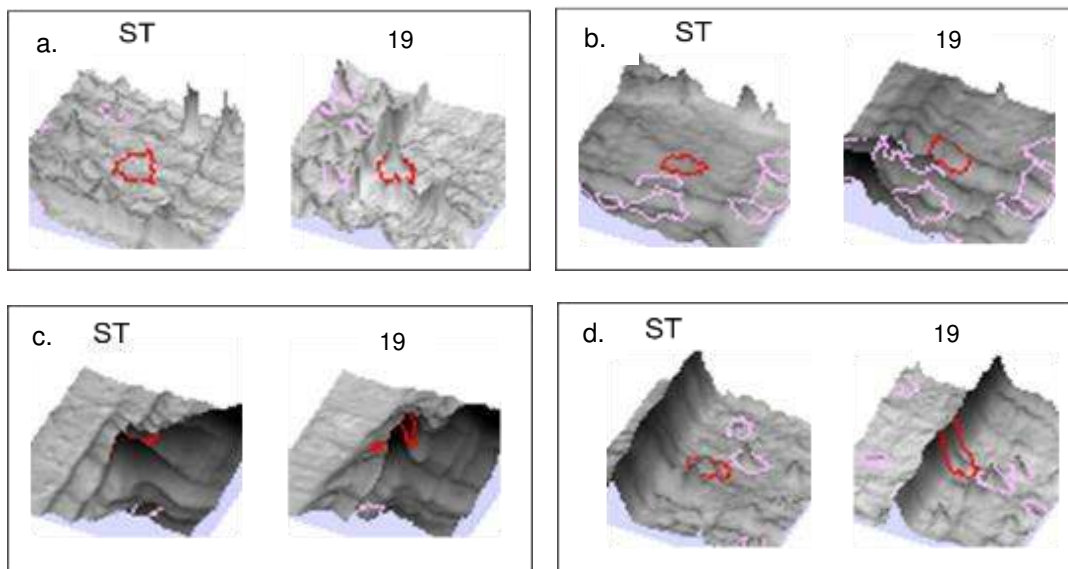
Después de identificar los spots normalizados, se llevo a cabo el análisis estadístico basado en dos parámetros importantes, Intensidad (dado por la cantidad de pixeles de cada spot) y % de volumen (porcentaje del volumen de los spots, respecto al tamaño de la zona de detección sugerida), el cual es utilizado para realizar la selección de posibles proteínas con expresión diferencial entre tratamientos.

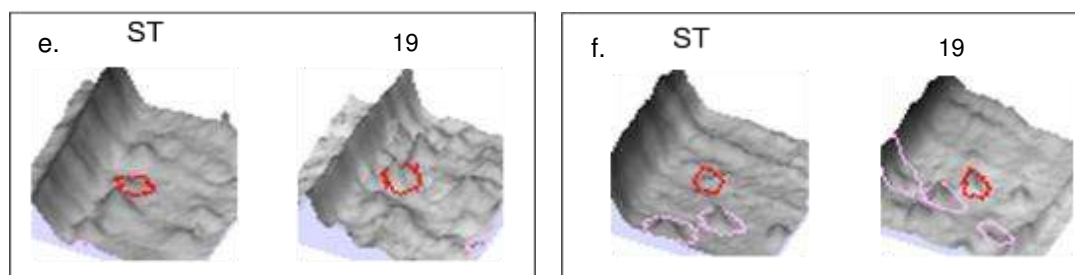
En nuestro estudio, realizamos el análisis comparativo en 2D de amastigotes intracelulares de *L. (V.) panamensis*, expuestos y no expuestos al alcaloide **19**, usando IPG strips de 18 cm en un amplio rango de pH (pH 3-10). Nosotros encontramos alrededor de 442 spots expresados concomitantemente, entre amastigotes sin tratar y tratados con el alcaloide **19**, en donde la cercanía entre los spots expresados en las dos condiciones experimentales fue evidente. Después de aplicar los criterios de selección, resultaron 132 spots validados, los cuales corresponden al 29,86% de las señales detectadas. De acuerdo con nuestro set de datos, amastigotes tratados y no tratados con **19**, comparten el 95.45% del perfil de expresión de proteínas (Figura 48-49).



**Figura 49.** Análisis comparativo de spots expresados diferencialmente entre los tratamientos ST vs. **19**. A. Intensidad de spots entre ST. VS. **19**. B. % volumen entre ST. Vs. **19**. Significancia estadística \* $p < 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$ , \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ .

Al realizar la comparación de la expresión respecto a la intensidad de los puntos, los spots 5 (pH 6.84), 9 (pH 5.53), 60 (pH 6.27), 67 (pH 6.26) y 69 (pH 6.28), muestran mayor intensidad en los geles de **19**, respecto a su control sin tratamiento (Figura 49A). Al evaluar el % de volumen, se observaron que los spots 5, 9, 22 y 60 tuvieron diferencias significativas entre tratamientos (ST vs. **19**), en donde la mayor expresión se dio en amastigotes tratados con el alcaloide (Figura 49B). Al observar los spots y el nivel de expresión en los geles en 3D se puede identificar el aumento del tamaño y área en los spots 5, 9, 22, 67 y 69 en geles correspondientes al tratamiento con alcaloide 19 (Figura 50 A-F).





**Figura 50.** Visualización spots 3D expresados diferencialmente entre ST vs. **19**. *Expresión 3D en geles de proteínas ST vs. 19 en 2DE. A. 5. B. 9. C. 60. D. 22. E.67 y F. 69*

## 7.4 Discusión

Uno de los objetivos mas importantes en el desarrollo de medicamentos es la determinación de blancos terapéuticos, que conlleven a la optimización de potenciales moléculas con actividad terapéutica. Decidimos usar como estrategia, la electroforesis en 2D, la cual de forma practica, busca la identificación de proteínas o spots diferenciales entre tratamientos. Este tipo de aproximaciones proteómicas en el nivel de expresión de proteínas, provee información adicional al análisis biológico y de actividad reportada para los compuestos(200,201).

La mayoría de los estudios proteómicos en *Leishmania* spp. llevados a cabo, se han realizado en promastigotes (estadio extracelular), debido a la dificultad de aislamiento y obtención de grandes cantidades de proteínas, los cuales son necesarios para la determinación de perfiles proteómicos (39,202). Si bien, el uso de proteínas del promastigote, facilita el estudio y comparación de perfiles protéicos, este modelo representa de manera limitada el comportamiento del parásito, debido a los cambios representativos que se llevan a cabo durante el paso desde el vector hacia el establecimiento en el hospedero final (203). Otra estrategia utilizada es el estudio de amastigotes axénicos los cuales se aproximan un poco más al comportamiento real del parásito en un ambiente hostil; sin embargo, se ha determinado, que el parásito intracelular toma nutrientes, proteínas y otras moléculas por parte del macrófago, para su sobrevivencia y replicación dentro de la célula, por lo cual algunas características relevantes del parásito intracelular se pierden o no se modulan en la diferenciación artificial(204,205).

Por estas razones, decidimos usar como modelo de estudio, los amastigotes intracelulares aislados de macrófagos murinos J774, debido a la facilidad de cultivo de estos macrófagos



---

y a la permisividad de infección por parte de *L. (V.) panamensis*(147); en donde se recuperaron de  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^8$  parásitos por tratamiento y los cuales fueron tratados por 24 h a 34°C y a pH 5.4 (condiciones en el macrófago), con los compuestos antileishmaniales. Los alcaloides quinolínicos fueron usados en este estudio, debido a la efectividad sobre los estadios del parásito, la selectividad sobre amastigotes intracelulares y las tasas de curación observadas en el modelo In vivo.

De acuerdo con las condiciones experimentales de la electroforesis en 2D, se observó una alta densidad de spots en la región de pH 3-6, la cual inevitablemente conllevó al solapamiento de algunos spots. Sin embargo, la representación y resolución de los spots de proteínas fue mejorado en las réplicas de los geles, así como por el uso de herramientas In silico (Software Melanie 8.0), los cuales pudieron discriminar los spots de manera individual.

Acorde a lo anterior, el 4.54 % de los spots fueron diferencialmente expresados entre las condiciones experimentales usadas; en donde los spots que mostraron diferencias significativas tanto en la intensidad, así como en % de volumen e intensidad fueron los spots 5, 9 y 60, los cuales muestran mayor expresión en amastigotes tratados con el compuesto **19** (12.37, 12 y 7,6 veces mayor % de volumen), en comparación con parásitos sin tratar y que se encuentran en rangos de pH de 5 a 7. Los spots 67 y 69 se descartaron del análisis, ya que en la comparación 3D de los geles, se pudo observar que estos puntos, correspondían a el solapamiento de los geles y la ubicación de estos, al momento de hacer la comparación.

Este análisis revela cambios en la expresión de proteínas presentes en los spots previamente revisados de los amastigotes expuestos al alcaloide **19**, y que de acuerdo con los resultados dados por el análisis ultraestructural como bioquímico de amastigotes intracelulares, indicarían que estas proteínas podrían estar involucradas en vías de sobrevivencia y protección del parásito, al daño ocasionado en el mitocondrion y kinetoplasto(104,198,206). Sin embargo, estas hipótesis deberán ser comprobadas, por medio de la identificación de las proteínas contenidas en los spots expresados diferencialmente, por medio de técnicas más robustas.

En nuestro estudio, nosotros demostramos que la técnica 2-DE, fue usada bajo condiciones que permiten su reproducibilidad y que esta, tiene la capacidad de resolver proteínas o spots diferenciales entre varias condiciones experimentales, corroborando los hallazgos en

previos estudios que usan este tipo de metodología (207). Esta herramienta provee una primera aproximación para la identificación de proteínas reguladas en los diferentes tratamientos y los cuales pueden ser posibles blancos terapéuticos relevantes para la optimización de las moléculas antileishmaniales acá evaluadas.

## 8 Conclusiones

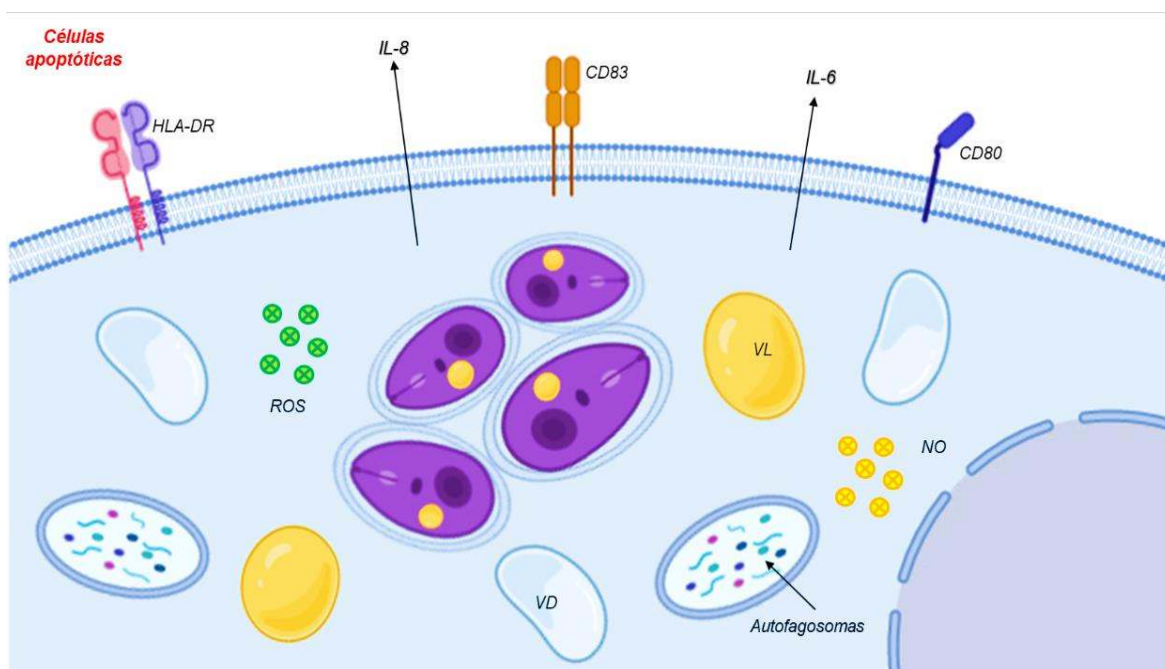
- La estrategia de búsqueda de compuestos análogos a partir de las moléculas de origen natural, conllevó a la identificación de 3 triterpenoides y 2 alcaloides con actividad antileishmanial.
- Las propiedades físico-químicas de cada uno de los compuestos antileishmaniales (sintéticos), sirvió para predecir el posible comportamiento de la molécula en sistemas biológicos y también para decidir el vehículo de formulación para la aplicación tópica en el modelo *In vivo*.
- Se pudo determinar que los triterpenoides 5 (ácido oleanólico), 7 (glicirrizato de amonio) y 8 (ácido 18 $\beta$ -glicirretínico) ejercen su actividad antileishmanial de manera exclusiva en macrófagos infectados, no presentando actividad evidente en la forma extracelular del parásito. Los compuestos 5 y 7 fueron capaces de inducir mejoría clínica evidente en los animales tratados, lo que sugiere que estos triterpenoides no solo son efectivos, sino también seguros.
- De manera diferencial, el pentacíclico 8 (ácido 18 $\beta$ -glicirretínico) demostró ser el más potente de los evaluados; esto sumado a sus propiedades inmunomoduladoras (inducción de producción de ON) y eficacia terapéutica en Hámsteres dorados (Cura clínica en el 20% y mejoría clínica en 60% animales evaluados).
- Los compuestos alcaloides 13 (1,2,3,4-tetrahidro-(benzo)-3-quinolin-ol) y 19 (2-amino-8 – hidroxiquinolina), su actividad antileishmanial fue evidente en promastigotes y en amastigotes intracelulares. En donde el compuesto 13, demostró aumentar la presencia de vacuolas lipídicas en macrófagos infectados, así como mega fagolisosomas (VP gigantes), con parásitos en su interior.
- El alcaloide quinolínico 19 (2-amino-8-hidroxiquinolina), fue el compuesto más potente dentro de las moléculas antileishmaniales sintéticas evaluadas, ya que se evidenciaron efectos diferenciales en macrófagos infectados y en amastigotes

intracelulares, así como la eficacia terapéutica en hámsteres dorados, por la evidencia de cura clínica en el 50% de los animales tratados.

- A partir de los resultados de este proyecto, se construyeron representaciones gráficas de los modos de acción de cada una de las moléculas antileishmaniales sintéticas identificadas y evaluadas (Figura 51-56):

#### **Infección de MdMhu infectados por *L. (V.) panamensis*:**

- MdMhu son permisivos frente a la infección por *L. (V.) panamensis*, mostrando entre 70-90% de células infectadas y 6-8 parásitos por células en promedio, a las 72 horas de infección. Este proceso es dependiente del tiempo de exposición de las células hospederas y el parásito, bajo condiciones controladas.
- El establecimiento de la infección, se puede asociar con la baja producción de moléculas microbicidas (ROS y ON) en el macrófago, durante las primeras horas de infección (4-48 horas).
- A las 72 horas, se evidencia la activación de MdMhu por medio de la expresión de moléculas co-estimuladoras (HLA-DR, CD80 y CD83), así como por la producción de ON, ROS; sin embargo, no es suficiente para el control de la infección por *L. panamensis*.
- La producción de citoquinas como IL-6 y IL-8 se asocian con la persistencia del patógeno en este tipo de células.
- La infección por *L. (V.) panamensis* es capaz de inducir apoptosis en MdMhu, así como el aumento de vacuolas de tipo lipídico, que pueden servir como fuente limitada de ácidos grasos para procesos de  $\beta$ -oxidación del parásito.

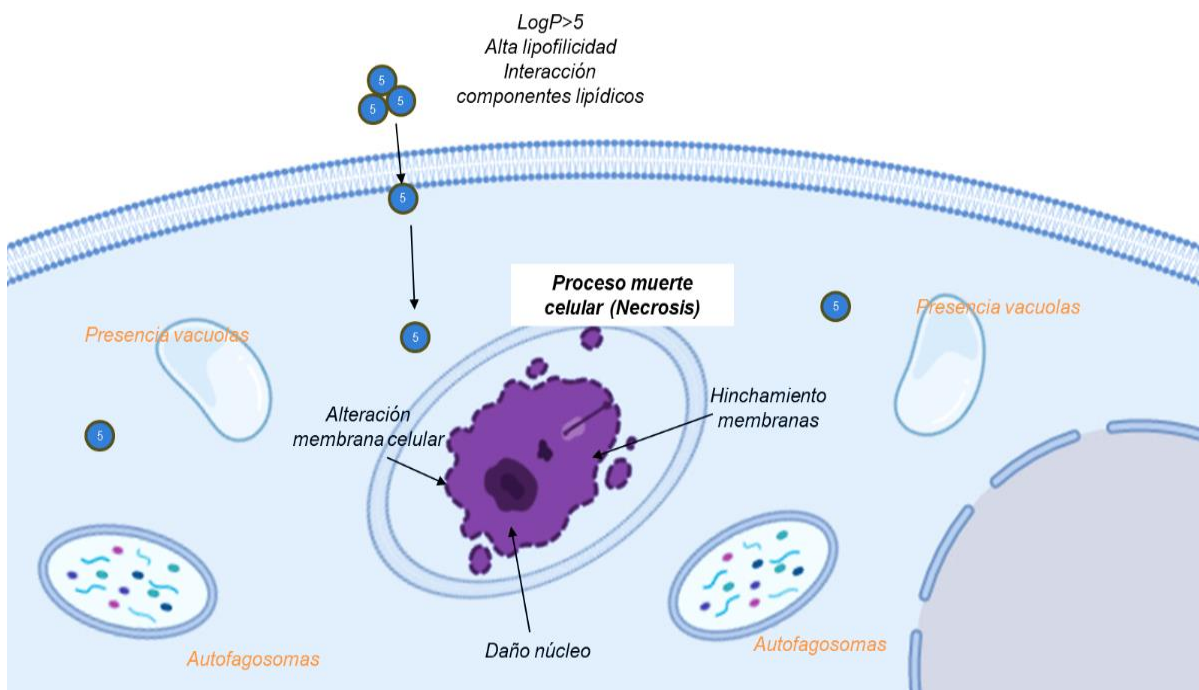


**Figura 51.** Infección de Mdmhu por *L. (V.) panamensis* después de establecida la infección (72 horas). ROS (especies reactivas de oxígeno); NO (óxido nítrico). VL (Vacuolas lipídicas). VD (Vacuolas digestivas). Amastigotes intracelulares, en vacuolas parasitóforas únicas y ajustadas (moradas).

#### **Células infectadas por *L. (V.) panamensis* y expuestas a triterpenoide pentacíclico 5 (ácido oleanólico):**

- Propiedades físico-químicas lo clasifican como un compuesto lipófilico con afinidad por componentes lipídicos de membranas celulares).
- Actividad antileishmanial es dependiente de antígeno, solo es efectivo en macrófagos infectados, categorizándolo como pro-fármaco. Esto fundamenta de manera significativa su espectro de seguridad (adecuada), conservando su eficacia.
- A las 72 horas de exposición al compuesto, se evidencia la disminución de ROS en macrófagos infectados y su efecto protector en el hospedero, puede estar relacionado a su eficacia terapéutica en donde se evidencia mejoría clínica del 100% de los animales tratados.

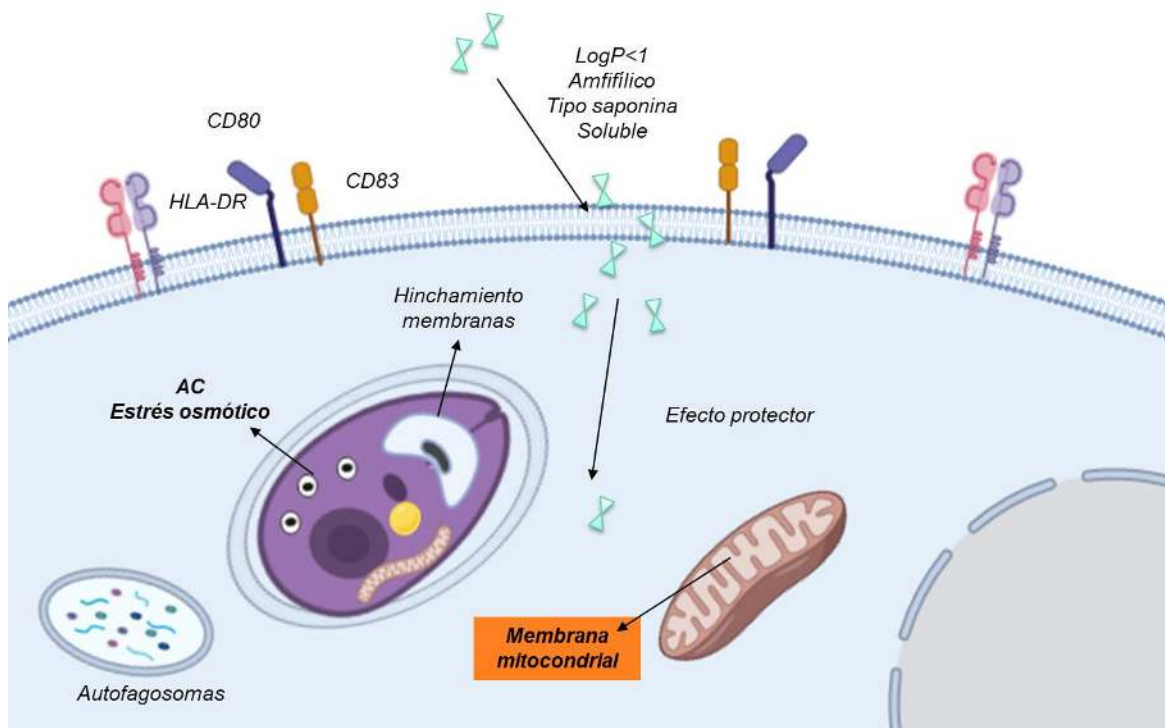
- En el amastigote intracelular causa alteraciones en la membrana celular, hinchamiento de membranas que recubren organelos como kinetoplasto, flagelo (bolsillo flagelar) y núcleo, induciendo muerte de tipo necrosis.



**Figura 52.** Células (Mdmhu) infectadas por *L. (V) panamensis* y expuestas al triterpenoide pentacíclico 5 (Ácido oleanóico).

### **Modo de acción del compuesto triterpenoide de tipo saponina 7 (Glicirrizato de amonio) en Mdmhu infectadas por *L. (V) panamensis***

- Sus características físico-químicas lo clasifican como una molécula anfifílica (componentes polares y apolares), los cuales se relacionan con efectos de alteración de fluidez de membrana.
- Su efecto se evidencia de manera notable en macrófagos infectados, en donde induce la expresión de moléculas co-estimuladoras.
- Posible organelo blanco es la mitocondria (Mdmhu y parásito intracelular), en donde se evidencia el hinchamiento de las membranas del organelo. En el parásito se puede asociar con procesos de generación de energía y fosforilación oxidativa, así como la inducción de estrés osmótico dado por la presencia de acidocalcisomas en el amastigote. Mientras que en el macrófago se observa un efecto protector, previniendo el daño mitocondrial.

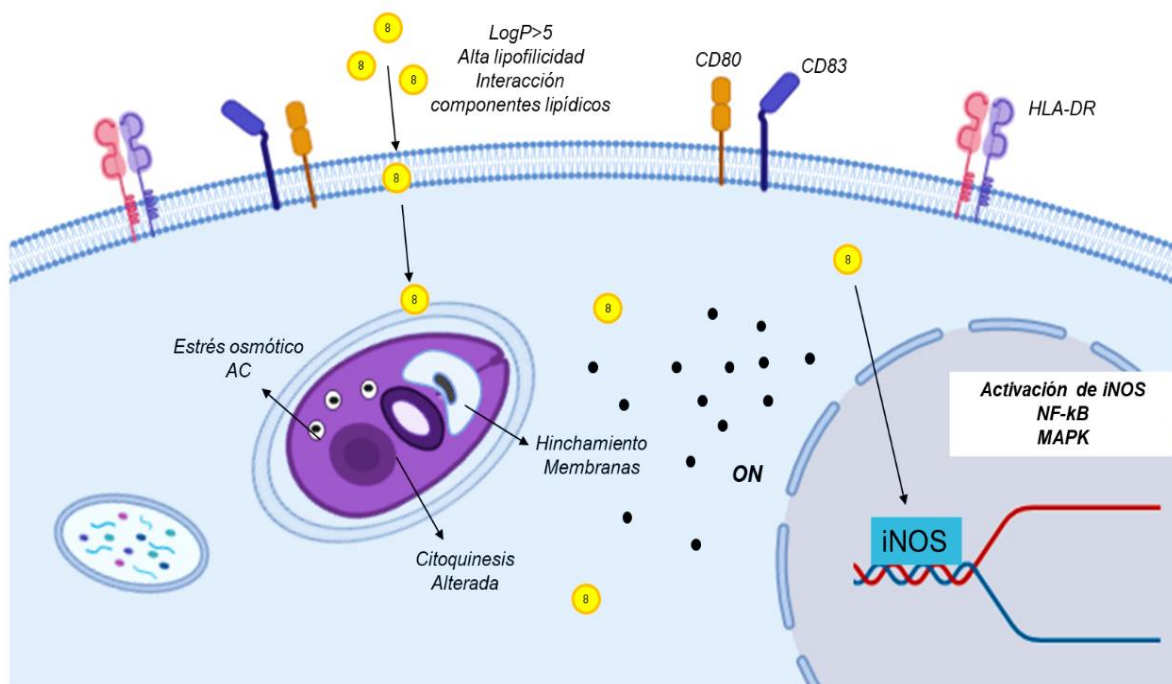


**Figura 53.** Modo de acción del compuesto saponina 7 (glicirrizato de amonio), en MdMhu infectados por *L. (V.) panamensis*.

### **Células infectadas por *L. (V.) panamensis* expuestas al triterpenoide pentacíclico 8 (Ácido 18 $\beta$ -glicirretínico)**

- Según sus propiedades físico-químicas, el compuesto 8 se clasifica como lipofílico, y liposoluble, con afinidad por componentes lipídicos de membrana.
- Dentro del grupo de los triterpenoides, esta molécula fue la más potente *In vitro* y con mejor eficacia terapéutica *In vivo*, evidenciado en los animales curados (20%) y con mejoría clínica (60%).
- Posee propiedades inmunomoduladoras, ya que induce la producción de ON en macrófagos infectados, a través de la activación de iNOS y estimula la expresión de moléculas co-estimuladoras (HLA-DR, CD80 y CD83), sugiriendo activación de macrófagos hacia el perfil M1. Esto apoya su uso como antileishmanial por su espectro de seguridad (adecuada conservando su eficacia).

- Posiblemente, la producción de ON por parte del macrófago, produce señales de estrés en el parásito, reflejado en presencia de acidocalcisomas, dobles organelos, vacuolas de tipo digestivo e hinchamiento de membranas de diferentes organelos en el amastigote intracelular.



**Figura 54.** Células (Mdmhu) infectadas por *L. (V) panamensis* y expuestas al triterpenoide pentacíclico 8 (Ácido 18β-glicirretínico).

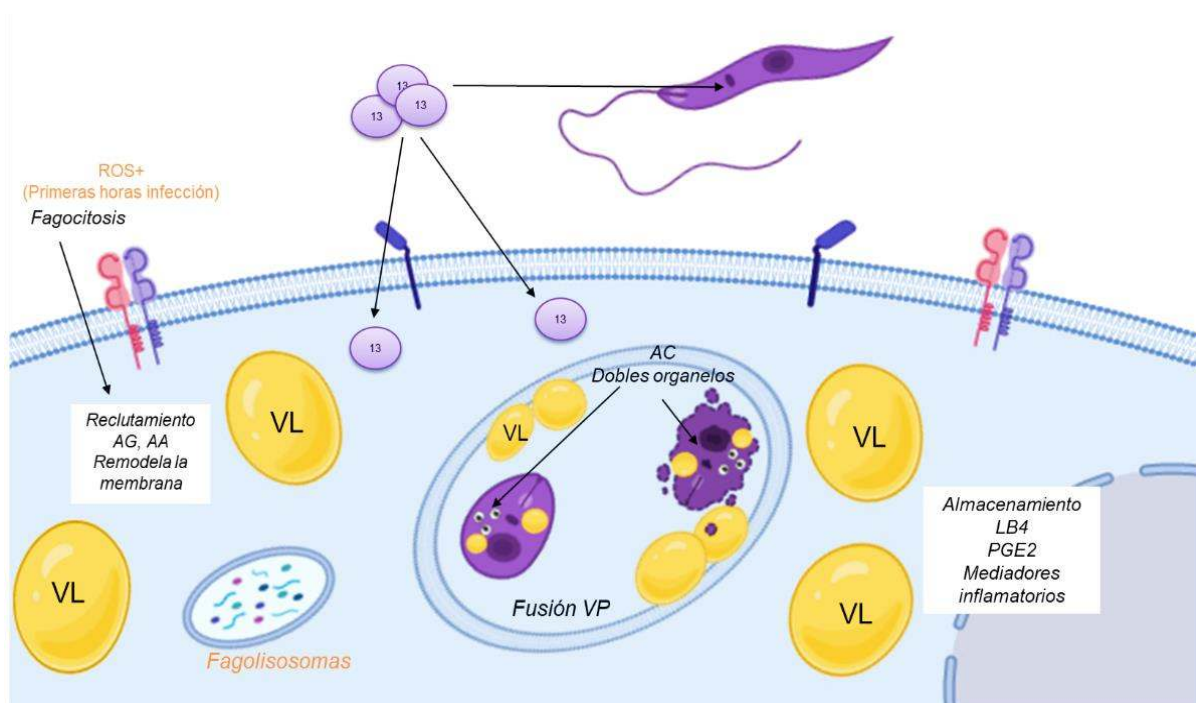
#### **Modo de acción de alcaloide quinolínico 13 (1,2,3,4-tetrahydro-(benzo)-3-quinolinol)**

- El compuesto alcaloide presenta características físico-químicas que cumplen los requisitos como molécula ideal para ser tratamiento antileishmanial (LogP>1 y peso molecular < 500 Da), debido a su posible capacidad de permear membranas celulares por medio de difusión pasiva.
- Modo de acción dual (Actividad en el parásito en sus dos estadios y en Mdmhu infectados), así como efecto terapéutico evidente por la cura clínica de 33.3% de animales y 66.7% en mejoría clínica.
- Ejerce un efecto temprano en Mdmhu infectados por medio de la modulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la cual puede inducir la peroxidación de



ácidos grasos que da lugar a procesos de fagocitosis y remodelamiento de la membrana celular, evidenciado por la presencia de VP gigantes.

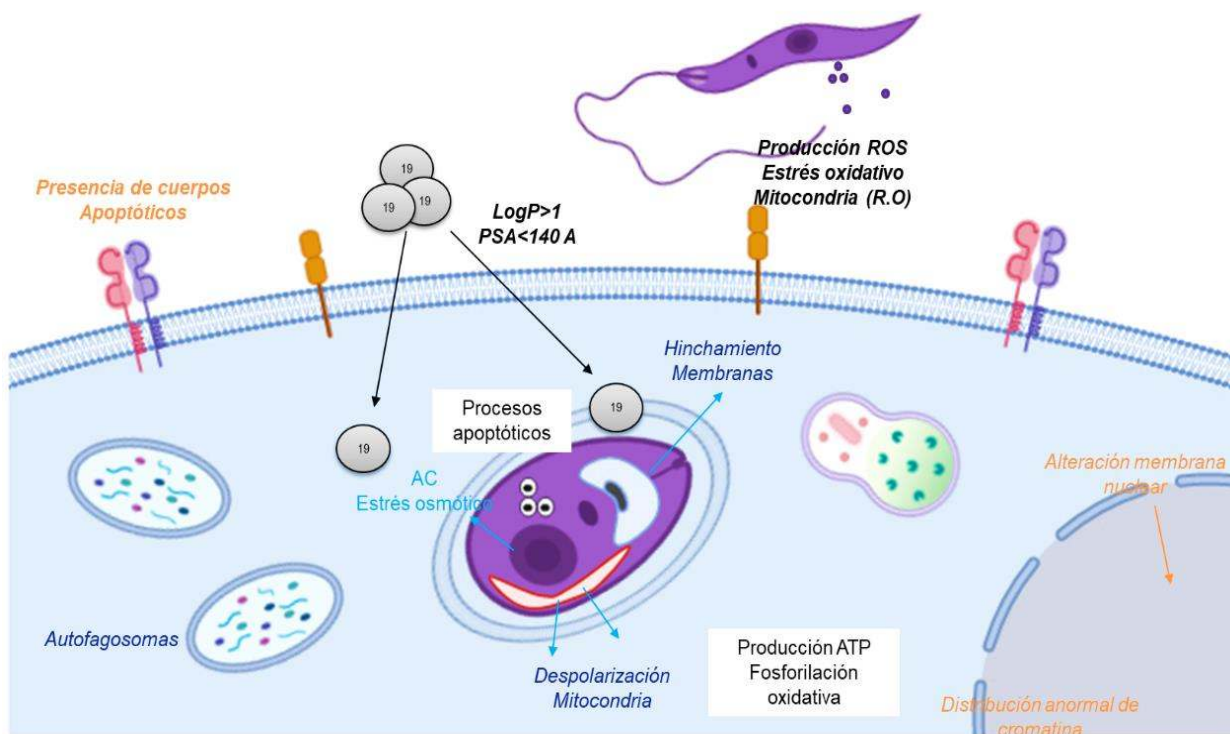
- La presencia evidente VL en macrófagos infectados, muestra que el compuesto puede regular mecanismos de activación de la célula (reservorios de mediadores inflamatorios), así como el aumento de la oferta de ácidos grasos y lípidos neutros, necesarios para el remodelamiento de fagolisosomas (fusión de vacuolas parasitóforas gigantes).
- El compuesto promueve la presencia de VL en el amastigote e induce estrés celular, reflejado en acidocalcisomas, dobles organelos y la ruptura de membranas celulares.



**Figura 55.** Células (Mdmhu) infectadas por *L. (V) panamensis* y expuestas al alcaloide quinolínico 13 (1,2,3,4-tetrahydro-(benzo)-3-quinolin-ol)

### Modo de acción del compuesto alcaloide quinolínicos 19 (2-amino-8-hidroxiquinolina) en Mdmhu infectadas por *L. (V.) panamensis*

- Es un compuesto con características físico-químicas que sugieren paso a través de membranas celulares por difusión pasiva ( $\text{LogP}>1$  y  $\text{PM}>500$  Da).
- Su actividad antileishmanial es la más potente de todos los compuestos antileishmaniales evaluados, demostrándose en su efectividad *In vitro*  $\text{CE}_{50}<10$   $\mu\text{g/mL}$  e *In vivo* con la evidencia del 50% de animales curados clínicamente y 33,3% de animales con mejoría clínica.
- El efecto directo sobre promastigotes se da por el aumento de ROS en el parásito, lo cual puede generar daño oxidativo y su exposición prolongada a estos factores oxidativos, puede generar daño en DNA y cambios morfológicos.
- El compuesto induce de manera diferencial la muerte de tipo apoptosis en macrófagos infectados.
- En amastigotes intracelulares muestra afinidad por la mitocondria, promoviendo la despolarización de su membrana, afectando procesos en la generación de energía del parásito, e induciendo apoptosis en este patógeno.



**Figura 56.** Células (Mdmhu) infectadas por *L. (V.) panamensis* y expuestas al alcaloide quinolínico 19 (2-amino-8-hidroxiquinolina).

## 9 . Recomendaciones y perspectivas

### **Evaluaciones *In silico***

- Búsqueda de posibles blancos moleculares de compuestos antileishmaniales, tanto en el parásito, como en células humanas; con el fin de establecer estrategias de mejoramiento y diseño racional de medicamentos.
- Optimización de moléculas a partir de la relación estructura-actividad (QSAR).


### **Evaluaciones *In vitro***

- Evaluar comparativamente la actividad antileishmanial de las moléculas evaluada en este estudio con distintas especies de *Leishmania* spp, para determinar si estos compuestos podrían ser usados para el tratamiento de LC en territorios donde se encuentran distribuidas diferentes especies del parásito.
- Evaluar las relaciones sinérgicas entre los distintos tratamientos, con el fin de aumentar su selectividad frente al parásito.
- Determinar el efecto de los compuestos antileishmaniales en la modulación de la respuesta inmune celular (poblaciones celulares involucradas en dicha respuesta).
- Realizar el seguimiento de la cinética de la expresión de moléculas co-estimuladoras y citoquinas pro-anti inflamatorias y de perfil Th1/Th2 para determinar hacia que perfil, se polarizan las células fagocíticas (macrófagos), antes, durante y después de establecerse la infección y del efecto del tratamiento
- Identificar la capacidad fagocítica, así como la acidificación de los fagolisosomas de Mdmhu infectados y expuestos a los compuestos antileishmaniales
- Evaluar en amastigotes intracelulares aislados, el efecto de estos compuestos en el ciclo celular, para dar respuesta a la aparición de dobles organelos en estos parásitos tratados
- Identificar las proteínas expresadas en los spots resultantes de la electroforesis en 2D de los amastigotes expuestos al compuesto **19** por medio de HPLC-MS/MS y validar dichos blancos en modelos *In vitro*.

### **Evaluación *In vivo***

- Determinar los cambios histopatológicos y la presencia de parásitos en la piel de hámster, tratados con los compuestos antileishmaniales
- Identificar el comportamiento farmacológico del tratamiento (compuestos antileishmaniales) en los animales infectados (PK y PD).
- Examinar las citoquinas producidas durante el tratamiento de los animales (pro-anti-inflamatorias)
- Comprobar las propiedades bio-farmacéuticas de los compuestos elegidos (coeficientes de permeabilidad)

## 10. Anexo A: Comité de Ética ensayos *In vitro* e *In vivo*

**UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE COLOMBIA**  
SEDE BOGOTÁ

**COMITÉ DE ÉTICA    FACULTAD DE  
CIENCIAS**

Bogotá, mayo 8 de 2017

Profesora  
**Lucy Gabriela Delgado Murcia**  
Departamento de Farmacia

Respetada Profesora:

Atentamente le comunico que el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias, en reunión realizada el día 8 de mayo de 2017 (Acta 04-2017), evaluó aspectos éticos del proyecto presentado por usted. Como resultado de esta revisión, el Comité considera que el proyecto **cumple** con los aspectos éticos básicos. Para los fines pertinentes, se transcriben las observaciones y el concepto final.

**Proyecto:** Compuestos tipo alcaloides quinolínicos o triterpenoides sintéticos con potencial antiparasitario: una aproximación al mecanismo de acción.


**Responsables:** **Lucy Gabriela Delgado Murcia** (Investigadora Principal, Grupo de Investigación en Immunotoxicología, COL0068495). Coinvestigadores: Manuel Alfonso Patarroyo (Facultad de Medicina) y Diana Susana Granados.

**Observaciones:**  
Esta investigación empleará líneas celulares tipificadas, obtenidas de proveedor comercial reconocido (colecciones ATCC) y muestras de sangre obtenidas de voluntarios anónimos y provistas por hemocentro certificado. La investigación aquí planteada no requiere el contrato de acceso a recursos genéticos y sus productos derivados, no habrá colecta de material vegetal ni aislamiento de microorganismos.

Los ensayos se realizarán en laboratorio de cultivos celulares, trabajo que se hará bajo parámetros de Buenas Prácticas de Laboratorio, POEs con condiciones estrictas de bioseguridad, incluyendo la gestión adecuada de muestras químicas y biológicas así como la disposición de los residuos acorde con el sistema institucional de gestión ambiental.

Los aspectos de Propiedad Intelectual se establecerán según los lineamientos del Acuerdo 008 del 8 de mayo de 2008 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional de Colombia.

**Concepto:** Avalado

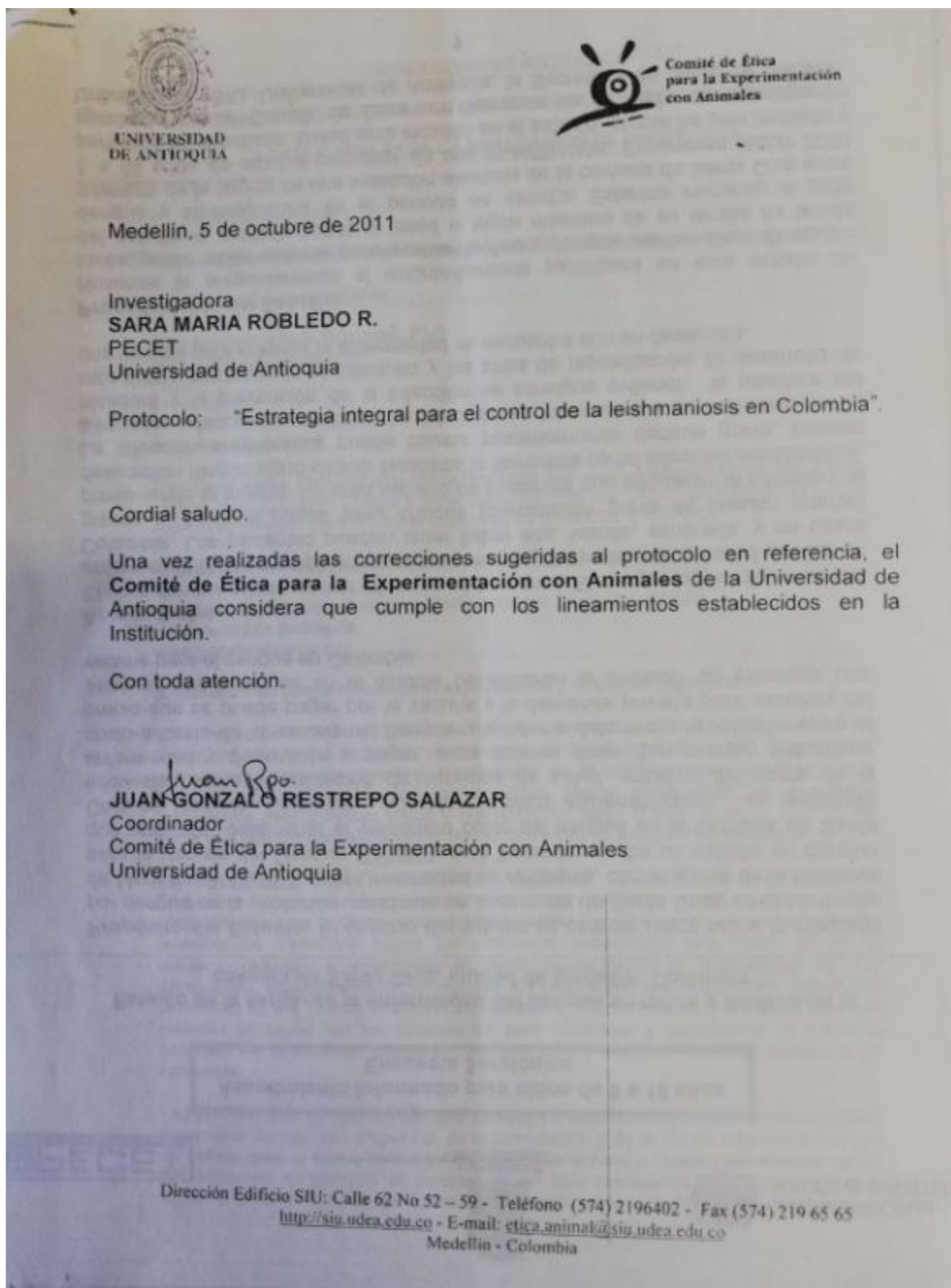


**LUIS FERNANDO OSPINA G.**  
Coordinador Comité de Ética

8

---

Carrera 30 No. 45-03, **FACULTAD DE CIENCIAS**, Edificio 450, 4º piso, Oficina 400  
Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext. 14666  
Correo electrónico: [l.ospinag@unal.edu.co](mailto:l.ospinag@unal.edu.co) / Bogotá, Colombia, Sur América



# 11. Anexo B: Carta solicitud Patente Ácido oleanóico y Amonio de glicirricina

Dirección de Investigación y Extensión  
Vicerrectoría de Sede  
Sede Bogotá



Bogotá D.C. 09 de Mayo de 2017

Señor  
OSCAR GUALDRÓN GONZALEZ  
Director Técnico  
DIRECCIÓN DE FOMENTO A LA INVESTIGACIÓN  
COLCIENCIAS

Asunto: Certificación recepción de documentos para presentación de solicitud de patente de Invención.

Apreciado señor Guadrón:

Cordial saludo. Manifestamos que al Equipo de Transferencia de Conocimiento de la División de Extensión de la Universidad Nacional, Sede Bogotá, fue remitido un documento descriptivo de la invención "Formulación en crema a base del triterpeno ácido oleanoico para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea" de la cual las siguientes personas manifiestan ser los inventores: Lucy Gabriela Delgado Murcia, Sara María Robledo Restrepo, Iván Darío Vélez, Luis Enrique Cuca Suárez, Diana Susana Granados Falla, Edwin Andrés Montoya Cuervo y Elaine Torres.

Por lo anterior, esta dependencia dio inicio al proceso interno de evaluación de la invención. Esta será presentada en el mes de mayo para evaluación ante el Comité de Propiedad Intelectual de Sede, quien deberá aprobarla para que se inicie el trámite de solicitud de protección, ya sea en el ámbito local ante la Superintendencia de Industria y Comercio, o vía PCT.

En caso de requerir información específica favor contactar a: Jaime Mayorga, Ext: 10862 o a Aida Fuqueno, Ext: 10984 o escribir al correo: [gestioneipi\\_bog@unal.edu.co](mailto:gestioneipi_bog@unal.edu.co).

Cordialmente,

SANTIAGO VARGAS DOMÍNGUEZ  
Jefe  
División de Extensión Sede Bogotá (DEB)



Registro de  
Labor: Alexis Galindo

División de Extensión  
Calle 44 No. 45 - 67  
Unidad Centro Torres, Módulo 6, Bloque C, Oficina A04  
Commutador: (57-1) 316 5000 Ext: 10984  
Bogotá, Colombia  
[debi\\_bog@unal.edu.co](mailto:debi_bog@unal.edu.co)

Patrimonio  
de todos  
los colombianos

División de Investigación y Extensión  
Vicerrectoría de Sede  
Sede Bogotá



Bogotá D.C. 09 de Mayo de 2017

Señor  
OSCAR GUALDRÓN GONZALEZ  
Director técnico  
DIRECCIÓN DE FOMENTO A LA INVESTIGACIÓN  
COINCIDENCIAS

Asunto: Certificación recepción de documentos para presentación de solicitud de patente de invención.

Apreciado señor Gualdrón:

Cordial saludo. Manifestamos que al Equipo de Transferencia de Conocimiento de la División de Extensión de la Universidad Nacional, Sede Bogotá, fue remitido un documento descriptivo de la invención "Formulación en crema a base del triterpeno glicirricina para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea", de la cual las siguientes personas manifiestan ser los inventores: Lucy Gabriela Delgado Murcia, Sara María Robledo Restrepo, Iván Darío Vélez, Luis Enrique Cuca Suárez, Diana Susana Granados Falla, Edwin Andrés Montoya Cuervo y Flaine Torres.

Por lo anterior, esta dependencia dio inicio al proceso interno de evaluación de la invención. Esta será presentada en el mes de mayo para evaluación ante el Comité de Propiedad Intelectual de Sede; quien deberá aprobarla para que se inicie el trámite de solicitud de protección, ya sea en el ámbito local ante la Superintendencia de Industria y Comercio, o vía PCT.

En caso de requerir información específica favor contactar al: Jaime Mayorga, Fxt: 10662 o a Aida Figueña, Fxt: 10984 o escribir al correo: [gestionipi\\_bng@unal.edu.co](mailto:gestionipi_bng@unal.edu.co).

Cordialmente,

SANTIAGO VARGAS DOMÍNGEZ  
Jefe  
División de Extensión Sede Bogotá (DEB)



Página 1 de 1  
Elaboró: Alexis Galindo

División de Extensión  
Edificio 44 No. 45 - 67  
Unidad Camillo Torres, Módulo 6, Bloque C, Oficina 604  
Commutador: (57-1) 316 3000 Ext. 10966  
Bogotá, Colombia  
[deb\\_bng@unal.edu.co](mailto:deb_bng@unal.edu.co)

Patrimonio  
de todos  
los colombianos



## 12. Anexo C : Artículo sometido Journal Plos one. Antileishmanial activity of synthetic analogues of the quinoline alkaloid N-methyl-8-methoxyflindersin

**PLOS ONE**  
**Antileishmanial activity of synthetic analogues of the quinoline alkaloid N-methyl-8-methoxyflindersin**  
 --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	PONE-D-20-17746R1
<b>Article Type:</b>	Research Article
<b>Full Title:</b>	Antileishmanial activity of synthetic analogues of the quinoline alkaloid N-methyl-8-methoxyflindersin
<b>Short Title:</b>	Quinoline alkaloid and its potential antileishmanial activity
<b>Corresponding Author:</b>	Gabriela Delgado Universidad Nacional de Colombia Bogotá, COLOMBIA
<b>Keywords:</b>	Leishmaniasis; quinoline alkaloid; Treatment; mechanism of action.
<b>Abstract:</b>	Quinoline alkaloids are secondary metabolites in plants from the Rutaceae family that have been shown to have antiparasitic activity against <i>Leishmania</i> species. One such quinoline alkaloid is 7-methoxy-2,2-dimethyl-2H,5H,6H-pyrano[3,2-c]quinolin-5-one, also known as N-methyl-8-methoxyflindersin having activity against <i>Leishmania</i> promastigotes and amastigotes. Eight N-methyl-6-methoxyflindersin-like alkaloids were identified by <i>in silico</i> tools due to the scarcity of <i>Raputia heptaphylla</i> -derived natural compounds. These quinoline alkaloids' antileishmanial activity and immunomodulatory and therapeutic effects were evaluated against <i>Leishmania</i> ( <i>V.</i> ) <i>panamensis</i> . Compounds 1 (natural), 2 and 8 (synthetic) were effective against promastigotes (9.9, 3.4 and 1.6 µg/mL EC <sub>50</sub> , respectively) and intracellular amastigotes (5.07, 7.94 and 1.81 µg/mL EC <sub>50</sub> , respectively). Compound 1 increased nitric oxide production in infected macrophages and triggered necrosis-related ultra-structural alterations in intracellular amastigotes. Alkaloid 2 stimulated oxidative breakdown in macrophages and caused ultrastructural alterations in the parasite after 4-h treatment. Compound 8 failed to induce macrophage modulation but selectively induced infected macrophages' apoptosis and alterations in intracellular parasite ultrastructure. It was seen that synthetic alkaloids 2 and 8 improved the health of hamsters suffering experimental cutaneous leishmaniasis without evidences of treatment-associated adverse toxic effects. It was concluded that synthetic alkaloids 2 and 8 were potential therapeutic candidates for topical treatment of cutaneous leishmaniasis.
<b>Order of Authors:</b>	Elaine Torres Suarez Diana Susana Granados-Falla Sara María Robledo Javier Murillo Yuleth Upegui Gabriela Delgado
<b>Opposed Reviewers:</b>	
<b>Response to Reviewers:</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- The references on this document have been management using the Mendeley software with the respective template of the journal.</li> <li>- English of this manuscript have been review by a native speaker.</li> <li>- The "Discussion" has been revised, discussed and re-focused in order to make it more concisely.</li> <li>- The changes proposed by the reviewer have made through all the document.</li> <li>- "Materials and methods" section has been ordered according to the comment proposed by the reviewer.</li> <li>- The "results" section has been ordered according to the sub-sections using for the presentation of the "Materials and methods".</li> <li>- Finally, due to one of the observations, the order of the presentation of the "materials and methods" and the "results" has change, reason by which the order of presentation</li> </ul>

Cover Letter



Joerg Heber  
Editor-in-Chief  
**Plos One Journal**

June 8, 2020

Dear Dr Herber

I would like to submit the manuscript entitled **"Antileishmanial activity of synthetic quinolinic alkaloids on the cutaneous experimental leishmaniasis"** by Elaine Torres Suarez, Diana Granados Falla, Sara M. Robledo, Javier Murillo, Yulieth A. Upegui and Gabriela Delgado Murcia to be considered for publication as an original article in the **Plos One Journal**. There are 9 files in all: 1 main manuscript file and 8 figure files.

This study was based on the search for quinoline alkaloid-like synthetic compounds as therapeutic alternatives for the treatment of cutaneous leishmaniasis, evaluating its antileishmanial activity corresponding to the effectiveness of the compound, immunomodulatory activity and ultrastructural modification in vitro and the therapeutic effect in vivo. Our results showed two compounds with antileishmanial activity in vitro and in vivo (parasitic and clinical cure in treated hamsters), which are correlated with ultrastructural modifications and induction of cell death processes of the evaluated pathogen.

We believe that these findings may be of interest to the readers of this Journal.

We confirm that this manuscript has not been published elsewhere and is not under consideration by another journal and all authors have approved the manuscript and agree with its submission to Plos One Journal.

This study was supported by a grant from the Ministry of Science and Technology of Colombia, Colciencias-Colfuturo Grant No.727-2015 for national

145 años  
renovando

Carrera 30 No. 45-03, FACULTAD DE CIENCIAS DEPARTAMENTO FARMACIA, Edificio 450, 2º piso, Oficina 206  
Teléfono: (57-1) 316 5120 Telefax: (57-1) 316 5080 Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext. 14643 Fax: 14642  
Correo electrónico: lgdelgadom@unal.edu.co  
Bogotá, Colombia, Sur América

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA SEDE BOGOTÁ, FACULTAD DE CIENCIAS, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN 2/2

doctoral students and Grant No.777-2017 for projects related to Health of the Ministry of Science and Technology of Colombia.

We believe that the following researchers would be well suited to reviewing our manuscript:


Pascale Kropf  
orcid.org/0000-0002-1670-8332  
Imperial College London  
UNITED KINGDOM

Humberto Lanz-Mendoza  
Instituto Nacional de Salud Pública  
MEXICO

Martin E Rottenberg  
orcid.org/0000-0003-0514-7434  
Karolinska Institutet  
SWEDEN

We look forward to hearing from you,

Yours sincerely



Gabriela Delgado Murcia, DrSc  
Corresponding author  
Head of the Immunotoxicology Research Group  
Faculty of Sciences  
Universidad Nacional de Colombia

145 años  
INNOVANDO

## PLOS ONE

## RESEARCH ARTICLE

Antileishmanial activity of synthetic analogs of the naturally occurring quinolone alkaloid *N*-methyl-8-methoxyflindersinElaine Torres Suarez<sup>1‡</sup>, Diana Susana Granados-Falla<sup>1,2‡</sup>, Sara María Robledo<sup>3‡</sup>, Javier Murillo<sup>3‡</sup>, Yulieth Upegui<sup>3‡</sup>, Gabriela Delgado<sup>1‡</sup>\***1** Grupo de Investigación en Inmunotoxicología, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, **2** Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia, **3** PÉCET, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

‡ These authors contributed equally to this work.

\* Current address: Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Sede Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

‡ Current address: Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia

† These authors also contributed equally to this work.

\* [gdelgado@unsl.edu.co](mailto:gdelgado@unsl.edu.co)

## OPEN ACCESS

**Citation:** Torres Suarez E, Granados-Falla DS, Robledo SM, Murillo J, Upegui Y, Delgado G (2020) Antileishmanial activity of synthetic analogs of the naturally occurring quinolone alkaloid *N*-methyl-8-methoxyflindersin. PLoS ONE 15(12): e0243392. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243392>

**Editor:** Henk D. F. H. Schallig, Academic Medical Centre, NETHERLANDS

**Received:** June 10, 2020

**Accepted:** November 19, 2020

**Published:** December 28, 2020

**Peer Review History:** PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243392>

**Copyright:** © 2020 Torres Suarez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript.

## Abstract

Leishmaniasis is a neglected, parasitic tropical disease caused by an intracellular protozoan from the genus *Leishmania*. Quinoline alkaloids, secondary metabolites found in plants from the Rutaceae family, have antiparasitic activity against *Leishmania* sp. *N*-methyl-8-methoxyflindersin (**1**), isolated from the leaves of *Raputia heptaphylla* and also known as 7-methoxy-2,2-dimethyl-2H,5H,6H-pyran[3,2-c]quinolin-5-one, shows antiparasitic activity against *Leishmania* promastigotes and amastigotes. This study used *in silico* tools to identify synthetic quinoline alkaloids having structure similar to that of compound **1** and then tested these quinoline alkaloids for their *in vitro* antiparasitic activity against *Leishmania (Viannia) panamensis*, *in vivo* therapeutic response in hamsters suffering from experimental cutaneous leishmaniasis (CL), and *ex vivo* immunomodulatory potential in healthy donors' human peripheral blood (monocyte)-derived macrophages (hMDMs). Compounds **1** (natural), **2** (synthetic), and **8** (synthetic) were effective against intracellular promastigotes (9.9, 3.4, and 1.6 µg/mL medial effective concentration [EC<sub>50</sub>], respectively) and amastigotes (5.07, 7.94, and 1.91 µg/mL EC<sub>50</sub>, respectively). Compound **1** increased nitric oxide production in infected hMDMs and triggered necrosis-related ultrastructural alterations in intracellular amastigotes, while compound **2** stimulated oxidative breakdown in hMDMs and caused ultrastructural alterations in the parasite 4 h posttreatment, and compound **8** failed to induce macrophage modulation but selectively induced apoptosis of infected hMDMs and alterations in the intracellular parasite ultrastructure. In addition, synthetic compounds **2** and **8** improved the health of hamsters suffering from experimental CL, without evidence of treatment-associated adverse toxic effects. Therefore, synthetic compounds **2** and **8** are potential therapeutic candidates for topical treatment of CL.

## 4 Bibliografía

1. WHO. Number of cases of cutaneous leishmaniasis reported Data by country. Global Health Observatory data repository. 2019.
2. PAHO. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas N° 7 - Março, 2019. Informe de Leishmanioses N° 7. 2019.
3. Valderrama L, McMahon-Pratt D, Navas C, Saravia NG, Segura I, Valencia AZ, et al. Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of serodemes of *Leishmania viannia* in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2017;
4. Herrera G, Barragán N, Luna N, Martínez D, De Martino F, Medina J, et al. An interactive database of *Leishmania* species distribution in the Americas. *Sci Data.* 2020 Dec 1;7(1).
5. Instituto Nacional de Salud. Lineamientos para la atención clínica de Leishmaniasis en Colombia. Bogotá; 2018.
6. Singh N, Mishra BB, Bajpai S, Singh RK, Tiwari VK. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. *Bioorg. Med. Chem.* 2014.
7. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Research.* 2017;
8. Croft SL, Olliaro P. Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. *Clinical Microbiology and Infection.* 2011.
9. Garnier T, Croft SL. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. *Current Opinion in Investigational Drugs.* 2002.
10. Ghorbani M, Farhodi R. Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy? *Drug Des. Devel. Ther.* 2018.

11. Le Pape P. Development of new antileishmanial drugs--current knowledge and future prospects. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2008;23(October):708–18.
12. Chrzanowska M, Grajewska A, Rozwadowska MD. Asymmetric Synthesis of Isoquinoline Alkaloids: 2004–2015. *Chem Rev* [Internet]. 2016 Oct 12 [cited 2017 Dec 10];116(19):12369–465. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27680197>
13. Granados-Falla D, Gomez-Galindo A, Daza A, Robledo S, Coy-Barrera C, Cuca L, et al. Seco-limonoid derived from *Raputia heptaphylla* promotes the control of cutaneous leishmaniasis in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Parasitology*. 2016;
14. Coy Barrera CA, Coy Barrera ED, Granados Falla DS, Delgado Murcia G, Cuca Suarez LE. seco-limonoids and quinoline alkaloids from *Raputia heptaphylla* and their antileishmanial activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* [Internet]. 2011 [cited 2017 Dec 8];59(7):855–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21720036>
15. Granados Falla DS. Determinación de la actividad leishmanicida e inmunomoduladora de compuestos naturales derivados de *Raputia heptaphylla* (Familia Rutaceae) como posible alternativa terapeutica frente a la leishmaniosis cutánea. Ph. D. Thesis [Internet]. Universidad Nacional de Colombia; 2013. Available from: <http://www.bdigital.unal.edu.co/11036/>
16. Silva GL, Lee I-S, Kinghorn AD. Special Problems with the Extraction of Plants. In 1998.
17. Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, Nakamura C V. Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases*. 2011.
18. Loedige M. Design and Synthesis of Novel Antileishmanial Compounds. *Int J Med Chem*. 2015;
19. Zulfiqar B, Shelper TB, Avery VM. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. Vol. 22, *Drug Discovery Today*. Elsevier Ltd; 2017. p. 1516–31.

20. Sereno D, Cordeiro da Silva A, Mathieu-Daude F, Ouaisi A. Advances and perspectives in Leishmania cell based drug-screening procedures. *Parasitology International*. 2007.
21. Monge-Maillo B, López-Vélez R. Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Drugs*. 2013.
22. Chatelain E, Ioset JR. Drug discovery and development for neglected diseases: The DNDi model. *Drug Design, Development and Therapy*. 2011.
23. Maggiora G, Vogt M, Stumpfe D, Bajorath J. Molecular Similarity in Medicinal Chemistry. *J Med Chem* [Internet]. 2014 Apr 24 [cited 2017 Dec 8];57(8):3186–204. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm401411z>
24. De Almeida MC, Vilhena V, Barral A, Barral-Netto M. Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps. A Review. Vol. 98, Mem . Inst. Oswaldo Cruz. 2003. p. 861–70.
25. Palatnik-De-Sousa CB, Day MJ. One Health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis. *Parasites and Vectors*. 2011.
26. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. Vol. 7, PLoS ONE. 2012.
27. Desjeux P. Focus: Leishmaniasis. *Nat Rev Microbiol*. 2004;
28. Nylén S, Eidsmo L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*. 2012.
29. Reveiz L, Maia-Elkhoury ANS, Nicholls RS, Sierra Romero GA, Yadon ZE. Interventions for American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review Update. *PLoS One*. 2013;
30. Scotti MT, Scotti L, Ishiki H, Ribeiro FF, Cruz RMD da, Oliveira MP de, et al. Natural Products as a Source for Antileishmanial and Antitrypanosomal Agents. *Comb Chem High Throughput Screen* [Internet]. 2016 [cited 2017 Dec 10];19(7):537–53.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27682867>

31. Vannier-Santos M, Martiny A, Souza W. Cell Biology of Leishmania spp.: Invading and Evading. *Curr Pharm Des.* 2005;
32. Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *The Lancet.* 2018.
33. Epidemiological situation W. WHO | Epidemiological situation. WHO. 2017.
34. Karimkhani C, Wanga V, Coffeng LE, Naghavi P, Dellavalle RP, Naghavi M. Global burden of cutaneous leishmaniasis: A cross-sectional analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infect Dis.* 2016;
35. Pan American Health Organization. Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas. Washington, DC PAHO. 2019;
36. WHO. WHO: Weekly epidemiological record: Global leishmaniasis update, 2006-2015, a turning point in leishmaniasis surveillance. *World Heal Organ.* 2017;
37. Salgado-Almarino J, Hernández CA, Ovalle-Bracho C. Geographical distribution of Leishmania species in Colombia, 1985-2017. *Biomedica.* 2019;
38. Ramírez JD, Hernández C, León CM, Ayala MS, Flórez C, González C. Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. *Sci Rep.* 2016;
39. Zarean M, Maraghi S, Hajjaran H, Mohebbali M, Feiz-Hadad MH, Assarehzadegan MA. Comparison of proteome profiling of two sensitive and resistant field Iranian isolates of Leishmania major to Glucantime® by 2-dimensional electrophoresis. *Iran J Parasitol.* 2015;
40. Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, Barrett MP, López-Vélez R, García-Hernández R, et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017.
41. Baiocco P, Colotti G, Franceschini S, Ilari A. Molecular basis of antimony treatment in Leishmaniasis. *J Med Chem.* 2009;



42. De Menezes JP, Saraiva EM, Da Rocha-Azevedo B. The site of the bite: Leishmania interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. Vol. 9, Parasites and Vectors. BioMed Central Ltd.; 2016.
43. Podinovskaia M, Descoteaux A. Leishmania and the macrophage: A multifaceted interaction. Future Microbiol. 2015.
44. Novais FO, Scott P. Immunology of Leishmaniasis. In: Encyclopedia of Immunobiology. 2016.
45. Liese J, Schleicher U, Bogdan C. The innate immune response against Leishmania parasites. Immunobiology. 2008;
46. Fidalgo LM, Gille L. Mitochondria and trypanosomatids: Targets and drugs. Pharmaceutical Research. 2011.
47. Wheeler RJ, Gluenz E, Gull K. The cell cycle of Leishmania: Morphogenetic events and their implications for parasite biology. Mol Microbiol. 2011;
48. Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, et al. The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. Science (80- ). 2005;
49. Mougneau E, Bihl F, Glaichenhaus N. Cell biology and immunology of Leishmania. Immunol. Rev. 2011.
50. Kima PE. The amastigote forms of Leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. International Journal for Parasitology. 2007.
51. Aulner N, Danckaert A, Rouault-Hardoin E, Desrivot J, Helynck O, Commere PH, et al. High Content Analysis of Primary Macrophages Hosting Proliferating Leishmania Amastigotes: Application to Anti-leishmanial Drug Discovery. PLoS Negl Trop Dis. 2013;
52. Torres, Henry Jay Forman M, Torres M. Signaling by the Respiratory Burst in Macrophages. IUBMB Life [Internet]. 2001 Jun 1 [cited 2018 May 10];51(6):365–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11758804>

53. Van Assche T, Deschacht M, Da Luz RAI, Maes L, Cos P. Leishmania-macrophage interactions: Insights into the redox biology. *Free Radic. Biol. Med.* 2011.
54. Christine Hsiao CH, Ueno N, Shao JQ, Schroeder KR, Moore KC, Donelson JE, et al. The effects of macrophage source on the mechanism of phagocytosis and intracellular survival of Leishmania. *Microbes Infect.* 2011;
55. Séguin O, Descoteaux A. Leishmania, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite. *Cell Immunol.* 2016;
56. Cecílio P, Pérez-Cabezas B, Santarém N, Maciel J, Rodrigues V, da Silva AC. Deception and manipulation: The arms of Leishmania, a successful parasite. *Front. Immunol.* 2014.
57. Naderer T, Vince JE, McConville MJ. Surface determinants of Leishmania parasites and their role in infectivity in the mammalian host. *Curr Mol Med.* 2004;
58. De Oliveira CI, Brodskyn CI. The immunobiology of Leishmania braziliensis infection. *Frontiers in Immunology.* 2012.
59. Ameen M. Cutaneous leishmaniasis: Advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clinical and Experimental Dermatology.* 2010.
60. Bosque F, Saravia NG, Valderrama L, Milon G. Distinct innate and acquired immune responses to Leishmania in putative susceptible and resistant human populations endemically exposed to L. (Viannia) panamensis infection. *Scand J Immunol.* 2000;
61. Oliveira WN, Ribeiro LE, Schrieffer A, Machado P, Carvalho EM, Bacellar O. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine.* 2014;
62. Andrews KT, Fisher G, Skinner-Adams TS. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *Int. J. Par: Drugs and Drug Resistance.* 2014.
63. Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira R V., Marzochi MC, et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in

the New World. *Acta Tropica*. 2011.

64. Balasegaram M, Ritmeijer K, Lima MA, Burza S, Ortiz Genovese G, Milani B, et al. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2012;
65. Sundar S, Chakravarty J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. *Expert Opin Pharmacother*. 2012;
66. Barrett MP, Croft SL. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. *British Medical Bulletin*. 2012.
67. Navas A, Vargas DA, Freudzon M, McMahon-Pratt D, Saravia NG, Gómez MA. Chronicity of dermal leishmaniasis caused by *Leishmania panamensis* is associated with parasite-mediated induction of chemokine gene expression. *Infect Immun*. 2014;
68. Nassif PW, De Mello TFP, Navasconi TR, Mota CA, Demarchi IG, Aristides SMA, et al. Safety and efficacy of current alternatives in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: A systematic review. *Parasitology*. 2017.
69. Aguiar MG, Pereira AMM, Fernandes AP, Ferreira LAM. Reductions in skin and systemic parasite burdens as a combined effect of topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;
70. Seeberger J, Daoud S, Pammer J. Transient effect of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with imiquimod. In: *International Journal of Dermatology*. 2003.
71. Mitra A, Wu Y. Topical delivery for the treatment of psoriasis. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2010.
72. Manderson L. Neglected Diseases of Poverty. *Medical Anthropology: Cross Cultural Studies in Health and Illness*. 2012;
73. Ogungbe IV, Setzer WN. The Potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases-Part III: In-Silico molecular

docking investigations. Vol. 21, *Molecules*. 2016.

74. Alqahtani A, Hamid K, Kam A, Wong KH, Abdelhak Z, Razmovski-Naumovski V, et al. The Pentacyclic Triterpenoids in Herbal Medicines and Their Pharmacological Activities in Diabetes and Diabetic Complications. *Curr Med Chem*. 2013;
75. Begum S, Ayub A, Qamar Zehra S, Shaheen Siddiqui B, Iqbal Choudhary M, Samreen. Leishmanicidal triterpenes from *Lantana camara*. *Chem Biodivers*. 2014;
76. Quinn RJ, Carroll AR, Pham NB, Baron P, Palframan ME, Suraweera L, et al. Developing a drug-like natural product library. *J Nat Prod*. 2008;
77. Mishra BB, Singh RK, Srivastava A, Tripathi VJ, Tiwari VK. Fighting against Leishmaniasis: search of alkaloids as future true potential anti-Leishmanial agents. *Mini Rev Med Chem* [Internet]. 2009 Jan [cited 2017 Dec 10];9(1):107–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19149664>
78. Rohloff J, Hymete A, Tariku Y. Plant-derived natural products for the treatment of leishmaniasis. In: *Studies in Natural Products Chemistry*. 2013.
79. T.J. Schmidt, S.A. Khalid, A.J. Romanha, T.M.A. Alves, M.W. Biavatti, R. Brun, et al. The Potential of Secondary Metabolites from Plants as Drugs or Leads Against Protozoan Neglected Diseases - Part I. *Curr Med Chem* [Internet]. 2012;19(14):2128–75. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=19&issue=14&spage=2128>
80. Xu R, Fazio GC, Matsuda SPT. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. *Phytochemistry*. 2004.
81. Kuttan G, Pratheeshkumar P, Manu KA, Kuttan R. Inhibition of tumor progression by naturally occurring terpenoids. *Pharm Biol* [Internet]. 2011 Oct 21 [cited 2017 Dec 8];49(10):995–1007. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880209.2011.559476>
82. Roy A, Saraf S. Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. *Biol Pharm Bull* [Internet]. 2006 Feb [cited 2017 Dec 8];29(2):191–

201. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16462017>

83. Steverding D, Sidjui LS, Ferreira ÉR, Ngameni B, Folefoc GN, Mahiou-Leddet V, et al. Trypanocidal and leishmanicidal activity of six limonoids. *Journal of Natural Medicines*. 2020.
84. Yamamoto ES, Campos BLS, Jesus JA, Laurenti MD, Ribeiro SP, Kallás EG, et al. The effect of ursolic acid on leishmania (*Leishmania*) amazonensis is related to programmed cell death and presents therapeutic potential in experimental cutaneous leishmaniasis. *PLoS One*. 2015;10(12).
85. Coy C, Coy E, Granados D, Delgado G, Cuca L. Seco-limonoids and quinoline alkaloids from *Raputia heptaphylla* and their antileishmanial activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2011;
86. Oliveira I dos S da S, Moragas Tellis CJ, Chagas M do S dos S, Behrens MD, Calabrese K da S, Abreu-Silva AL, et al. *Carapa guianensis* Aublet (Andiroba) Seed Oil: Chemical Composition and Antileishmanial Activity of Limonoid-Rich Fractions . *Biomed Res Int*. 2018;
87. Gupta P, Ukil A, Das PK. Bioactive Component of Licorice as an Antileishmanial Agent. In: *Biological Activities and Action Mechanisms of Licorice Ingredients*. 2017.
88. Dinesh N, Neelagiri S, Kumar V, Singh S. Glycyrrhizic acid attenuates growth of *Leishmania donovani* by depleting ergosterol levels. *Exp Parasitol*. 2017;176:21–9.
89. Melo TS, Gattass CR, Soares DC, Cunha MR, Ferreira C, Tavares MT, et al. Oleonic acid (OA) as an antileishmanial agent: Biological evaluation and in silico mechanistic insights. *Parasitol Int*. 2016;65(3):227–37.
90. Torres-Santos EC, Lopes D, Rodrigues Oliveira R, Carauta JPP, Bandeira Falcao CA, Kaplan MAC, et al. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. *Phytomedicine*. 2004;
91. Alakurtti S, Bergström P, Sacerdoti-Sierra N, Jaffe CL, Yli-Kauhaluoma J. Anti-leishmanial activity of betulin derivatives. *J Antibiot (Tokyo)*. 2010;

92. Das A, Jawed JJ, Das MC, Sandhu P, De UC, Dinda B, et al. Antileishmanial and immunomodulatory activities of lupeol, a triterpene compound isolated from *Sterculia villosa*. *Int J Antimicrob Agents*. 2017;
93. Sousa MC, Varandas R, Santos RC, Santos-Rosa M, Alves V, Salvador JAR. Antileishmanial activity of semisynthetic lupane triterpenoids betulin and betulinic acid derivatives: Synergistic effects with miltefosine. *PLoS One*. 2014;
94. Dinesh N, Neelagiri S, Kumar V, Singh S. Glycyrrhizic acid attenuates growth of *Leishmania donovani* by depleting ergosterol levels. *Exp Parasitol*. 2017;
95. Ukil A, Biswas A, Das T, Das PK. 18 $\beta$ -Glycyrrhetic Acid Triggers Curative Th1 Response and Nitric Oxide Up-Regulation in Experimental Visceral Leishmaniasis Associated with the Activation of NF- $\kappa$ B. *J Immunol*. 2014;
96. Gupta P, Das PK, Ukil A. Antileishmanial effect of 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid is mediated by toll-like receptor-dependent canonical and noncanonical p38 activation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;
97. Aniszewski T. Alkaloid chemistry. In: *Alkaloids*. 2015.
98. Calla-Magariños J, Quispe T, Giménez A, Freysdottir J, Troye-Blomberg M, Fernández C. Quinolinic Alkaloids from *G. alipea longiflora* Krause Suppress Production of Proinflammatory Cytokines *in vitro* and Control Inflammation *in vivo* upon *Leishmania* Infection in Mice. *Scand J Immunol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2017 Dec 10];77(1):30–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23126625>
99. Ferreira ME, Rojas de Arias A, Yaluff G, de Bilbao NV, Nakayama H, Torres S, et al. Antileishmanial activity of furoquinolines and coumarins from *Helietta apiculata*. *Phytomedicine*. 2010;17(5):375–8.
100. Nakayama H, Desrivot J, Bories C, Franck X, Figadère B, Hocquemiller R, et al. *In vitro* and *in vivo* antileishmanial efficacy of a new nitrilquinoline against *Leishmania donovani*. *Biomed Pharmacother*. 2007;
101. Paloque L, Verhaeghe P, Casanova M, Castera-Ducros C, Dumètre A, Mbatchi L, et

- al. Discovery of a new antileishmanial hit in 8-nitroquinoline series. *Eur J Med Chem.* 2012;
102. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Yoga Latha L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African J Tradit Complement Altern Med.* 2011;
103. Coimbra ES, Antinarelli LMR, Silva NP, Souza IO, Meinel RS, Rocha MN, et al. Quinoline derivatives: Synthesis, leishmanicidal activity and involvement of mitochondrial oxidative stress as mechanism of action. *Chem Biol Interact.* 2016;
104. Tempone AG, Melo Pompeu Da Silva AC, Brandt CA, Scalzaretto Martinez F, Borborema SET, Barata Da Silveira MA, et al. Synthesis and antileishmanial activities of novel 3-substituted quinolines. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;
105. Calixto SL, Glanzmann N, Xavier Silveira MM, da Trindade Granato J, Gorza Scopel KK, Torres de Aguiar T, et al. Novel organic salts based on quinoline derivatives: The in vitro activity trigger apoptosis inhibiting autophagy in *Leishmania* spp. *Chem Biol Interact.* 2018 Sep 25;293:141–51.
106. Fournet A, Barrios AA, Munoz V, Hocquemiller R, Cave A, Bruneton J. 2-Substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;
107. Fournet A, Gantier JC, Gautheret A, Leysalles L, Munos MH, Mayrargue J, et al. The activity of 2-substituted quinoline alkaloids in BALB/c mice infected with *leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother.* 1994;
108. Gopinath VS, Pinjari J, Dere RT, Verma A, Vishwakarma P, Shivahare R, et al. Design, synthesis and biological evaluation of 2-substituted quinolines as potential antileishmanial agents. *Eur J Med Chem.* 2013;
109. de Mello TFP, Bitencourt HR, Pedroso RB, Aristides SMA, Lonardon MVC, Silveira TGV. Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Exp Parasitol.* 2014;
110. Coimbra ES, Libong D, Cojean S, Saint-Pierre-Chazalet M, Solgadi A, Le Moyec L,

- et al. Mechanism of interaction of sitamaquine with *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother*. 2010;
111. Singh N, Kumar M, Singh RK. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med*. 2012;5(6):485–97.
  112. Bhattacharjee S, Bhattacharjee A, Majumder S, Majumdar SB, Majumdar S. Glycyrrhizic acid suppresses cox-2-mediated anti-inflammatory responses during *Leishmania donovani* infection. *J Antimicrob Chemother*. 2012;
  113. Biswas A, Bhattacharya A, Vij A, Das PK. Role of leishmanial acidocalcisomal pyrophosphatase in the cAMP homeostasis in phagolysosome conditions required for intra-macrophage survival. *Int J Biochem Cell Biol*. 2017;
  114. Zhang C, Liu Z, Zheng Y, Geng Y, Han C, Shi Y, et al. Glycyrrhetic Acid Functionalized Graphene Oxide for Mitochondria Targeting and Cancer Treatment In Vivo. *Small* [Internet]. 2017 Dec 4 [cited 2017 Dec 8];1703306. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29205852>
  115. Haghshenas V, Fakhari S, Mirzaie S, Rahmani M, Farhadifar F, Pirzadeh S, et al. Glycyrrhetic Acid inhibits cell growth and induces apoptosis in ovarian cancer a2780 cells. *Adv Pharm Bull* [Internet]. 2014 Oct [cited 2018 Sep 12];4(Suppl 1):437–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25364659>
  116. Dueñas-Romero AM, Loiseau PM, Saint-Pierre-Chazalet M. Interaction of sitamaquine with membrane lipids of *Leishmania donovani* promastigotes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2007;
  117. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012.
  118. Walters WP, Murcko A, Murcko MA. Recognizing molecules with drug-like properties. *Curr Opin Chem Biol*. 1999;
  119. World Health Organization (WHO). Control de la leishmaniasis. *Ser Inf técnicos*. 2010;



120. Matsson P, Kihlberg J. How Big Is Too Big for Cell Permeability? *Journal of Medicinal Chemistry*. 2017;
121. Vranka C, Mijailovic S, Fröhlich V, Zeilinger M, Klebermass EM, Wadsak W, et al. Expanding LogP: Present possibilities. *Nucl Med Biol*. 2018;
122. Nikaido H. Preventing drug access to targets: Cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria. *Semin Cell Dev Biol*. 2001;
123. Caridha D, Vesely B, van Bocxlaer K, Arana B, Mowbray CE, Rafati S, et al. Route map for the discovery and pre-clinical development of new drugs and treatments for cutaneous leishmaniasis. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2019.
124. Franc I, Lipinski A, Feeney PJ. Lipinski Rule, *AdvDrugDelivRev* 1997. *Adv Drug Deliv Rev*. 1997;
125. Bajusz D, Rácz A, Héberger K. Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations? *J Cheminform* [Internet]. 2015 Dec 20 [cited 2017 Dec 8];7(1):20. Available from: <http://www.jcheminf.com/content/7/1/20>
126. Kogej T, Engkvist O, Blomberg N, Muresan S. Multifingerprint based similarity searches for targeted class compound selection. *J Chem Inf Model*. 2006;
127. Coy Barrera CA, Coy Barrera ED, Granados Falla DS, Delgado Murcia G, Cuca Suarez LE. seco-Limonoids and Quinoline Alkaloids from *Raputia heptaphylla* and Their Antileishmanial Activity. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2011;
128. Holliday. Grouping of Coefficients for the Calculation of Inter-Molecular Similarity and Dissimilarity using 2D Fragment Bit-Strings. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2002;
129. Bajusz D, Rácz A, Héberger K. Why is Tanimoto index an appropriate choice for fingerprint-based similarity calculations? *J Cheminform*. 2015;
130. Bender A, Jenkins JL, Scheiber J, Sukuru SCK, Glick M, Davies JW. How similar are similarity searching methods? A principal component analysis of molecular

- descriptor space. *J Chem Inf Model.* 2009;
131. Martin YC, Kofron JL, Traphagen LM. Do structurally similar molecules have similar biological activity? *J Med Chem.* 2002;
  132. Eckert H, Bajorath J. Molecular similarity analysis in virtual screening: foundations, limitations and novel approaches. *Drug Discovery Today.* 2007.
  133. Kerns EH, Di L. *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods.* Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods. 2008.
  134. Liu X, Testa B, Fahr A. Lipophilicity and its relationship with passive drug permeation. *Pharmaceutical Research.* 2011.
  135. Raney SG, Franz TJ, Lehman PA, Lionberger R, Chen ML. Pharmacokinetics-Based Approaches for Bioequivalence Evaluation of Topical Dermatological Drug Products. *Clinical Pharmacokinetics.* 2015.
  136. Guo Y, Shen H. pKa, Solubility, and Lipophilicity. In: *Opt in Drug Dis.* 2009.
  137. Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2000;
  138. Carvajal MT, Yalkowsky S. Effect of pH and Ionic Strength on the Solubility of Quinoline: Back-to-Basics. *AAPS PharmSciTech* [Internet]. 2019 Apr 25;20(3):124. Available from: <http://link.springer.com/10.1208/s12249-019-1336-9>
  139. Ačimovič J, Rozman D. Steroidal triterpenes of cholesterol synthesis. *Molecules.* 2013.
  140. Böttger S, Melzig MF. The influence of saponins on cell membrane cholesterol. *Bioorganic Med Chem.* 2013;
  141. Sahu T, Patel T, Sahu S, Gidwani B. Skin Cream as Topical Drug Delivery System: A Review. *J Pharm Biol Sci.* 2016;
  142. Pulido SA, Muñoz DL, Restrepo AM, Mesa C V., Alzate JF, Vélez ID, et al. Improvement of the green fluorescent protein reporter system in *Leishmania* spp. for

- the in vitro and in vivo screening of antileishmanial drugs. *Acta Trop.* 2012;
143. Pérez-Flórez M, Ocampo CB, Valderrama-Ardila C, Alexander N. Spatial modeling of cutaneous leishmaniasis in the Andean region of Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2016;
  144. Robledo SM, Carrillo LM, Daza A, Restrepo AM, Muñoz DL, Tobón J, et al. Cutaneous Leishmaniasis in the dorsal skin of hamsters: A useful model for the screening of antileishmanial drugs. *J Vis Exp.* 2012;
  145. García E, Coa JC, Otero E, Carda M, Vélez ID, Robledo SM, et al. Synthesis and antiprotozoal activity of furanchalcone–quinoline, furanchalcone–chromone and furanchalcone–imidazole hybrids. *Med Chem Res.* 2018;
  146. Osorio EJ, Robledo SM, Bastida J. Chapter 2 Alkaloids with Antiprotozoal Activity. *Alkaloids: Chemistry and Biology.* 2008.
  147. Meza C, Muñoz DL, Echeverry MCM, Vélez ID, Robledo SM, Mesa C V, et al. Susceptibilidad in vitro a infección por *Leishmania* según tipo de macrófagos. *Salud UIS.* 2010;
  148. Mears ER, Modabber F, Don R, Johnson GE. A Review: The Current In Vivo Models for the Discovery and Utility of New Anti-leishmanial Drugs Targeting Cutaneous Leishmaniasis. Vol. 9, *PLoS Neglected Tropical Diseases.* Public Library of Science; 2015.
  149. Corpas-López V, Merino-Espinosa G, López-Viota M, Gijón-Robles P, Morillas-Mancilla MJ, López-Viota J, et al. Topical Treatment of *Leishmania tropica* Infection Using (-)- $\alpha$ -Bisabolol Ointment in a Hamster Model: Effectiveness and Safety Assessment. *J Nat Prod.* 2016;
  150. Gomes-Silva A, Valverde JG, Ribeiro-Romão RP, Plácido-Pereira RM, Da-Cruz AM. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Parasitology.* 2013;
  151. Zurada JM, Kriegel D, Davis IC. Topical treatments for hypertrophic scars. *J Am Acad Dermatol.* 2006;

152. Herrera G, Barragán N, Luna N, Martínez D, De Martino F, Medina J, et al. An interactive database of Leishmania species distribution in the Americas. *Sci Data*. 2020;
153. Ministerio de la protección Social. Guía para la atención clínica integral del paciente con leishmaniasis. Colombia; 2010 p. 58.
154. Ukil A, Kar S, Srivastav S, Ghosh K, Das PK. Curative effect of 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid in experimental visceral leishmaniasis depends on phosphatase-dependent modulation of cellular MAP kinases. *PLoS One*. 2011;
155. da Silva EC, Dias Rayol C, Lys Medeiros P, Figueiredo RCBQ, Piuvezan MR, Brabosa-Filho JM, et al. Antileishmanial Activity of Warifteine: A Bisbenzylisoquinoline Alkaloid Isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). *Sci World J [Internet]*. 2012;2012:1–5. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2012/516408/>
156. Chanquia SN, Larregui F, Puente V, Labriola C, Lombardo E, García Liñares G. Synthesis and biological evaluation of new quinoline derivatives as antileishmanial and antitrypanosomal agents. *Bioorg Chem*. 2019;
157. Di L, Kerns EH. *Drug-Like Properties: Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization*. Drug-Like Properties: Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization. 2016.
158. Olekhovitch R, Bousso P. Induction, Propagation, and Activity of Host Nitric Oxide: Lessons from Leishmania Infection. Vol. 31, *Trends in Parasitology*. 2015. p. 653–64.
159. Teixeira MJ, Teixeira CR, Andrade BB, Barral-Netto M, Barral A. Chemokines in host–parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol [Internet]*. 2006 Jan [cited 2019 Oct 14];22(1):32–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16310413>
160. Maspi N, Abdoli A, Ghaffarifar F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathogens and Global Health*. 2016.

161. Brodskyn CI, DeKrey GK, Titus RG. Influence of costimulatory molecules on immune response to *Leishmania major* by human cells in vitro. *Infect Immun*. 2001;
162. Park MC, Kim D, Lee Y, Kwon HJ. CD83 expression induced by CpG-DNA stimulation in a macrophage cell line RAW 264.7. *BMB Rep*. 2013;
163. Shio MT, Hassani K, Isnard A, Ralph B, Contreras I, Gomez MA, et al. Host Cell Signalling and *Leishmania* Mechanisms of Evasion. *J Trop Med* [Internet]. 2012 [cited 2017 Dec 8];2012:1–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22131998>
164. Kumar S, Bawa S, Gupta H. Biological Activities of Quinoline Derivatives. *Mini-Reviews Med Chem*. 2010;
165. Yamamoto ES, Campos BLS, Jesus JA, Laurenti MD, Ribeiro SP, Kallás EG, et al. The effect of ursolic acid on leishmania (*Leishmania*) amazonensis is related to programmed cell death and presents therapeutic potential in experimental cutaneous leishmaniasis. *PLoS One*. 2015;
166. Baltina LA. Chemical modification of glycyrrhizic acid as a route to new bioactive compounds for medicine. *Curr Med Chem* [Internet]. 2003 Jan [cited 2017 Dec 8];10(2):155–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12570715>
167. Ríos JL. Effects of triterpenes on the immune system. *Journal of Ethnopharmacology*. 2010.
168. Marquez-Martin A, Puerta RD La, Fernandez-Arche A, Ruiz-Gutierrez V, Yaqoob P. Modulation of cytokine secretion by pentacyclic triterpenes from olive pomace oil in human mononuclear cells. *Cytokine*. 2006;
169. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018.
170. Oh HM, Lee S, Park YN, Choi EJ, Choi JY, Kim JA, et al. Ammonium glycyrrhizinate protects gastric epithelial cells from hydrogen peroxide-induced cell death. *Exp Biol Med*. 2009;

171. Schröfelbauer B, Raffetseder J, Hauner M, Wolkerstorfer A, Ernst W, Szolar OHJ. Glycyrrhizin, the main active compound in liquorice, attenuates pro-inflammatory responses by interfering with membrane-dependent receptor signalling. *Biochem J*. 2015;
172. Jeong HG, Kim JY. Induction of inducible nitric oxide synthase expression by 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid in macrophages. *FEBS Lett*. 2002;
173. Herrera G, Teherán A, Pradilla I, Vera M, Ramírez JD. Geospatial-temporal distribution of Tegumentary Leishmaniasis in Colombia (2007–2016). *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;
174. Guillon J, Forfar I, Mamani-Matsuda M, Desplat V, Saliège M, Thiolat D, et al. Synthesis, analytical behaviour and biological evaluation of new 4-substituted pyrrolo[1,2-a]quinoxalines as antileishmanial agents. *Bioorganic Med Chem*. 2007;
175. Keshewani V, Sodhi A. Differential activation of macrophages in vitro by lectin Concanavalin A, Phytohemagglutinin and Wheat germ agglutinin: Production and regulation of nitric oxide. *Nitric Oxide* [Internet]. 2007 Mar 1 [cited 2019 Oct 13];16(2):294–305. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1089860306004526?via%3Dihub>
176. Tur J, Vico T, Lloberas J, Zorzano A, Celada A. Macrophages and Mitochondria: A Critical Interplay Between Metabolism, Signaling, and the Functional Activity. In: *Advances in Immunology*. 2017.
177. Titus RG, Dekrey GK, Morris R V., Soares MBP. Interleukin-6 deficiency influences cytokine expression in susceptible BALB mice infected with *Leishmania major* but does not alter the outcome of disease. *Infect Immun*. 2001;
178. Gomes CM, Ávila LR, Pinto SA, Duarte FB, Pereira LIA, Abrahamsohn IA, et al. *Leishmania braziliensis* amastigotes stimulate production of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TGF- $\beta$  by peripheral blood mononuclear cells from nonendemic area healthy residents. *Parasite Immunol*. 2014;
179. Suarez ET, Granados-Falla DS, Robledo SM, Murillo J, Upegui Y, Delgado G.

Antileishmanial activity of synthetic analogs of the naturally occurring quinolone alkaloid N-methyl-8-methoxyflindersin. PLoS One [Internet]. 2020 [cited 2020 Dec 28];15(12):e0243392. Available from:  
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0243392>

180. Macedo-Silva ST de, Oliveira Silva TLA de, Urbina JA, Souza W de, Rodrigues JCF. Antiproliferative, Ultrastructural, and Physiological Effects of Amiodarone on Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania amazonensis*. Mol Biol Int. 2011;
181. Saka HA, Valdivia R. Emerging Roles for Lipid Droplets in Immunity and Host-Pathogen Interactions. Annu Rev Cell Dev Biol. 2012;
182. Walpole GFW, Grinstein S, Westman J. The role of lipids in host-pathogen interactions. IUBMB Life. 2018;
183. Rabhi S, Rabhi I, Trentin B, Piquemal D, Regnault B, Goyard S, et al. Lipid droplet formation, their localization and dynamics during leishmania major macrophage infection. PLoS One. 2016;
184. Remmerie A, Scott CL. Macrophages and lipid metabolism. Cell Immunol. 2018;
185. DaMata JP, Mendes BP, Maciel-Lima K, Menezes CAS, Dutra WO, Sousa LP, et al. Distinct Macrophage Fates after in vitro Infection with Different Species of *Leishmania*: Induction of Apoptosis by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, but Not by *Leishmania (Viannia) guyanensis*. Afrin F, editor. PLoS One [Internet]. 2015 Oct 29 [cited 2019 Oct 14];10(10):e0141196. Available from:  
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0141196>
186. LeFurgey A, Gannon M, Blum J, Ingram P. *Leishmania donovani* amastigotes mobilize organic and inorganic osmolytes during regulatory volume decrease. J Eukaryot Microbiol. 2005;
187. Robertson GS, LaCasse EC, Holcik M. Programmed Cell Death. In: Pharmacology. 2009.
188. Perrotta I, Carito V, Russo E, Tripepi S, Aquila S, Donato G. Macrophage

- autophagy and oxidative stress: an ultrastructural and immunoelectron microscopical study. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2011 Sep 13 [cited 2019 Oct 14];2011:282739. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21922037>
189. Miranda K, Docampo R, Grillo O, Franzen A, Attias M, Vercesi A, et al. Dynamics of polymorphism of acidocalcisomes in *Leishmania* parasites. *Histochem Cell Biol*. 2004;
  190. Holzmüller P, Bras-Gonçalves R, Lemesre J-L. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. *Parasitology* [Internet]. 2006 Mar 3 [cited 2019 Oct 14];132(S1):S19–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17018162>
  191. Harris J, Deen N, Zamani S, Hasnat MA. Mitophagy and the release of inflammatory cytokines. *Mitochondrion* [Internet]. 2017 Oct 26 [cited 2017 Dec 8]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29107116>
  192. Cyrino LT, Araújo AP, Joazeiro PP, Vicente CP, Giorgio S. In vivo and in vitro *Leishmania amazonensis* infection induces autophagy in macrophages. *Tissue Cell*. 2012;
  193. Real F, Mortara RA. The diverse and dynamic nature of leishmania parasitophorous vacuoles studied by multidimensional imaging. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;
  194. Castro R, Scott K, Jordan T, Evans B, Craig J, Peters EL, et al. THE ULTRASTRUCTURE OF THE PARASITOPHOUS VACUOLE FORMED BY *LEISHMANIA MAJOR*. *J Parasitol*. 2007;
  195. Burchmore RJS, Barrett MP. Life in vacuoles - Nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *International Journal for Parasitology*. 2001.
  196. Real F, Mortara RA. The diverse and dynamic nature of leishmania parasitophorous vacuoles studied by multidimensional imaging. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012 Feb;6(2).
  197. Borges VM, Lopes UG, De Souza W, Vannier-Santos MA. Cell structure and cytokinesis alterations in multidrug-resistant *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*.



Parasitol Res. 2005;

198. Britta EA, Scariot DB, Falzirolli H, Ueda-Nakamura T, Silva CC, Filho BPD, et al. Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene. *BMC Microbiol.* 2014;
199. Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Res.* 2019;
200. Walker J, Vasquez JJ, Gomez MA, Drummelsmith J, Burchmore R, Girard I, et al. Identification of developmentally-regulated proteins in *Leishmania panamensis* by proteome profiling of promastigotes and axenic amastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 2006;
201. Akpunarlieva S, Weidt S, Lamasudin D, Naula C, Henderson D, Barrett M, et al. Integration of proteomics and metabolomics to elucidate metabolic adaptation in *Leishmania*. *J Proteomics [Internet].* 2017 Feb 23 [cited 2017 Dec 12];155:85–98. Available from:  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391916305267?via%3Dihub>
202. Hajjaran H, Mohammadi Bazargani M, Mohebbali M, Burchmore R, Salekdeh GH, Kazemi-Rad E, et al. Comparison of the proteome profiling of iranian isolates of *leishmania tropica*, *I. Major* and *I. infantum* by two-dimensional electrophoresis (2-DE) and mass-spectrometry. *Iran J Parasitol.* 2015;
203. Wheeler RJ, Gluenz E, Gull K. The cell cycle of *Leishmania*: Morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Mol Microbiol.* 2011;
204. Pescher P, Blisnick T, Bastin P, Späth GF. Quantitative proteome profiling informs on phenotypic traits that adapt *Leishmania donovani* for axenic and intracellular proliferation. *Cell Microbiol.* 2011;
205. Handman E, Bullen DVR. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology.* 2002.

206. Coimbra ES, Antinarelli LMR, Silva NP, Souza IO, Meinel RS, Rocha MN, et al. Quinoline derivatives: Synthesis, leishmanicidal activity and involvement of mitochondrial oxidative stress as mechanism of action. *Chem Biol Interact.* 2016;
207. Brobey RKB, Mei FC, Cheng X, Soong L. Comparative two-dimensional gel electrophoresis maps for promastigotes of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major*. *Brazilian J Infect Dis.* 2006;