



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PROGRESO Y DESARROLLO EN LOS COMPUESTOS
QUIMICOS UTILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO
DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS Y
LEISHMANIOSIS.

TRABAJO MONOGRAFICO DE
ACTUALIZACION
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
PRESENTA:
PABLO VELAZQUEZ ANGELICA MARIA



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

1999.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

271537



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente: Prof. ABEL GUTIÉRREZ RAMOS

Vocal: Prof. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS

Secretario: Prof. MARCO ANTONIO BECERRIL FLORES

1er. Suplente: Prof. MARÍA TERESA GUTIÉRREZ LUGO

2do. Suplente: Prof. CARLOS PÉREZ MUÑOZ

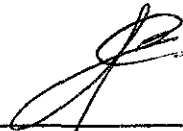
Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorio 122, Conjunto E,
Facultad de Química.

Asesor del tema:

Sustentante:



M. en C. Francisco Hernández
Luis



Pablo Velázquez Angélica
María

Dedicó ésta tesis a:

A mis padres

**Gregorio Pablo Delgado y María de la Luz Velázquez Ríos
Por los principios, fé y confianza que siempre me han brindado.**

A mis amigos

**Casimiro Frausto Campos y Ulises Morales Cacicue
Por su apoyo y amistad incondicional.**

A mis amigas:

**Esther Feregrino, Claudia Sánchez, Karina Morales, Nallely Hernández, Lizbeth Mohzo y Cristina
Pérez
Por los años vividos.**

A mis amigos:

**Patricia Bernal, Cecilia Chavéz, Leticia Lagos, Marisela Herrera, Mónica Ramírez, Isabel Váldez,
Araceli Pérez, Perla González, Argelia García, Alex González, Marcos González, Flor Ayala, José
Guadalupe Dañu, Alfredo Rivas, Julio Cesar Rivera y Félix Huerta
Carpe Diem: goza mientras vivas.**

En especial a Jorge y Juan Carlos por la hermandad que nos une.

AGRADECIMIENTOS

Al M. en C. Francisco Hernández Luis por el apoyo, tiempo y conocimientos brindados para la elaboración de ésta tesis.

Al Prof. Marco Antonio Becerril Flores por su asesoría y orientación en la investigación de este tema.

A Juvenal Rosales, Verónica Garduño y Marcos Peña por su asesoría en el manejo de los programas de cómputo.

HOY

Desde el primer día de nuestra vida hasta ayer, sólo representa lo que paso y no regresará.

De mañana en adelante sólo una promesa que no sabemos si llegará.

Pero ¡Hoy!... hoy es el más importante en la vida, hoy es un día especial, nunca habrá otro igual, vivelo, reliza lo que más deseas con una actitud positiva. Decidete y se entusiastamente feliz...

Recurda que: "La vida nos ofrece a todos por igual 24 horas diarias, pero no nos las entrega 'gratis', nos pide a cambio un día de nuestra existencia".

Y vuelan las golondrinas ¿ A dónde me llevarán?
Tan lejos como quisiera, tan alto, no hay estrellas que contar.
Volando en mi pensamiento regresan con el ayer
Volviendo a mover de sitio, los ramos de amor marchitos
Las sombras que te dejaste y el círculo que cerraste al marchar ..

ÍNDICE

Páginas

INTRODUCCIÓN 1

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

ENFERMEDAD DE CHAGAS

A.	Agentes etiológico: <i>Trypanosoma cruzi</i>	
1.	Taxonomía	4
2.	Fases del parásito	4
3.	Ciclo biológico	5
B.	Enfermedad de Chagas	
1.	Mecanismos de transmisión	10
2.	Fases de la enfermedad de Chagas.	11
C.	Diagnóstico.	13
D.	Epidemiología	
1.	Prevalencia de la infección.	14
2.	Distribución geográfica.	15
3.	Características de zonas endémicas.	16
4.	Transmisores	17

LEISHMANIOSIS

A.	Agentes etiológico: <i>Leishmania spp.</i>	
1.	Taxonomía	18
2.	Fases del parásito	18
3.	Ciclo biológico	19

B.	Leishmaniosis	
1.	Mecanismos de transmisión	21
2.	Tipos clínicos	21
C.	Diagnóstico.	24
D.	Epidemiología	
1.	Prevalencia de la infección.	26
2.	Distribución geográfica.	26
3.	Características de zonas endémicas.	26
4.	Transmisores	27

CAPÍTULO II. FÁRMACOS EMPLEADOS EN LA QUIMIOTERAPIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

A.	Nifurtimox	
	Historia	29
	Aspectos farmacocinéticos	30
	Efectos contra protozoos	30
	Toxicidad y Efectos adversos	32
B.	Benznidazol	
	Historia	33
	Aspectos farmacocinéticos	34
	Efectos contra protozoos	35
	Toxicidad y Efectos adversos	37
C.	Otros fármacos empleados en la quimioterapia de la enfermedad de Chagas.	
1.	Inhibidores de la biosíntesis del esteroI	39
2.	Mevinolin	44
3.	Ketoconazol	46

4.	ICI 195, 739.	52
D.	Compuestos con acción anti- <i>T. cruzi</i> con mecanismos no elucidados.	
1.	Camptotecina.	54
2.	Compuesto MK436	57
3.	D0870: Bis-triazol	59
4.	Violeta de Genciana	60
5.	Compuesto Q45	62
6.	8-Aminoquinolinas	66
7.	Disulfuro de tetraetiltiuram (TETD) y Dietilamina-N-Carboditioato	68
8.	Análogos de poliamina	71
9.	Ajoeno	74
10.	Primaquina	76

CAPÍTULO III. FÁRMACOS EMPLEADOS EN LA QUIMIOTERAPIA DE LEISHMANIOSIS

A.	Pentamidina	
	Historia	78
	Efecto contra protozoos	79
	Mecanismos de acción y de resistencia	80
	Absorción, destino y eliminación	81
	Aplicaciones terapéuticas	82
	Toxicidad y efectos adversos	84
B.	Estibogluconato de sodio	
	Historia	85
	Efecto contra protozoos	87
	Absorción, destino y eliminación	87

Aplicaciones terapéuticas	88
Toxicidad y efectos adversos	90
C. Anfotericina B	
1. Pentamidina y Anfotericina B	95
2. Anfotericina B asociada a lípidos	98
D. Existen otros fármacos que son empleados en la quimioterapia de Leishmaniosis.	
1. Alopurinol	109
2. Paromomicina	110
3. Artemisinina	112
4. Itraconazol	113
E. Compuestos con actividad antileishmanial, cuyo mecanismo no ha sido elucidado.	
1. Trifluralin	114
2. Licochalcona A	129
3. Derivados del ácido alénico	131
4. Efecto del extracto de hojas de <i>Kalanchoe pinnata</i>	136
5. Metabolitos secundarios aislados de líquenes chilenos	138
6. Diamidina	141
7. Neurolépticos tricíclicos	144
8. 3'-deoxi-3'-fluoroinosina	149
9. Análogos de inosina	153
10. Compuesto 86/450	156
CONCLUSIONES	159
BIBLIOGRAFÍA	162

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Chagas y Leishmaniosis continúan siendo causas de mortalidad y morbilidad en áreas extensas del mundo. En el continente americano, existen aproximadamente 35 millones personas infectadas por *Trypanosoma cruzi* y 100 millones de personas expuestas a la infección por vivir dentro de áreas endémicas del padecimiento. En el caso de leishmaniosis, se sugiere que aproximadamente existen 12 millones de infectados por *Leishmania spp.* alrededor del mundo y cerca de 400 000 nuevos casos cada año.

El propósito de este trabajo fue llevar a cabo una recopilación y revisión de artículos y textos publicados sobre los principios activos utilizados, o en fase de investigación, en la quimioterapia de ambas enfermedades. Los conocimientos aquí referidos servirán para dar sustento a otros proyectos a desarrollarse en este ámbito.

Los criterios rectores para el desarrollo de esta revisión se enlistan a continuación:

- 1) Estudiar los fármacos que actualmente se emplean en la quimioterapia de ambas enfermedades.
- 2) Revisar los posibles blancos de ataque para nuevos fármacos.

- 3) Mencionar cuales son las nuevas moléculas que se están estudiando para el tratamiento de ambas enfermedades; tomando en cuenta inclusive a aquellos cuyos mecanismos de acción no están del todo elucidados.
- 4) Considerar otras alternativas en el tratamiento de ambas enfermedades, tales como la inmunoterapia y la fitoterapia, de las que también se revisó la información publicada.

En el campo de la investigación farmacéutica la búsqueda y hallazgo de principios activos contra diversas enfermedades, ha sido generalmente de forma fortuita. Sin embargo, recientemente con el avance de la biología molecular y métodos computacionales se han llevado a cabo investigaciones para el descubrimiento de nuevos fármacos de una manera racional

Por supuesto, hoy en día, no solo se requiere que un determinado compuesto presente cierta actividad biológica de interés terapéutico, sino además, es necesario que su acción sea selectiva o localizada y presente la mínima cantidad de efectos adversos.

En el ámbito de la investigación de antiparasitarios, se trata de aprovechar las diferencias en el metabolismo de los parásitos en relación con el ser humano, para desarrollar compuestos eficaces y selectivos al inhibir alguna ruta metabólica del agente patógeno.

En México, los casos de ambas enfermedades han ido en aumento; esto debido a varios factores; tales como la falta de control en las transfusiones sanguíneas, el desplazamiento de personas de áreas endémicas, la ineficacia de los métodos para eliminar los vectores, etc.

De este modo, ambas enfermedades representan un problema de salud para nuestro país, por su localización y la falta de control en los diversos factores que participan tanto en su erradicación (medicamentos) como en su propagación (vectores, diagnóstico, etc.).

Por lo que el estudio de este tema es importante para iniciar nuevos proyectos de investigación que desemboquen en la obtención de nuevos compuestos más eficaces y seguros para el tratamiento de estas enfermedades.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

ENFERMEDAD DE CHAGAS.

A. Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*.

1. Taxonomía:

El *Trypanosoma cruzi* pertenece al subfilo Mastigophora del filo Sarcomastigophora, orden Kinetoplastida, que se compone de organismos flagelados con un kinetoplasto. El *T. cruzi* se incluye en la sección estercoreácea, junto con el grupo de tripanosomas cuyas etapas infectivas se desarrollan en el tracto digestivo y contaminan a los hospederos mamíferos a través de las heces. Se ha adoptado el subgénero *Schizotrypanum* para los tripanosomas que se multiplican en los vertebrados por medio de fases intracelulares. De ahí que el nombre taxonómico completo sea *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (OMS, 1991).

2. Fases del parásito.

Las fases que incluye el ciclo de vida de *T. cruzi* son (Figura 1):

a) **Amastigote:** es pequeño, redondo u ovalado sin flagelo pero contiene un núcleo y un kinetoplasto. Este último consta de un cuerpo parabasal y un blefaroblasto con forma de punto, del surge una delgada fibrilla o axonema. Se localiza en los tejidos (miocardio, esófago, colon y sistema reticuloendotelial) del hospedero vertebrado. Se divide por fisión binaria.

b) **Epimastigote:** parecido en forma al promastigote pero menos estrecho, se caracteriza por el desplazamiento del kinetoplasto hacia una posición anterior respecto al núcleo y por el desarrollo de una membrana ondulante que en el extremo anterior se convierte en un flagelo. Se observa en el aparato digestivo del vector, y en medios de cultivo específicos. Se divide por fisión binaria.

c) **Tripomastigote:** se caracteriza por un desplazamiento del kinetoplasto hacia una posición posterior respecto al núcleo, con una membrana ondulante que corre a todo lo largo del organismo. Es la forma infectante (metacíclica) y también la forma hemática (sanguínea).

d) **Promastigote:** es alargado y estrecho con un flagelo libre que se extiende a partir del axonema. El kinetoplasto se encuentra cerca del extremo anterior del organismo. Es una forma de transición frecuente entre las fases de amastigote y tripomastigote, particularmente en el intestino del vector (Beck, 1984; Velasco-Castrejón, 1994).

En la figura 2 se muestra un esquema de la ultraestructura de los tripomanosomas.

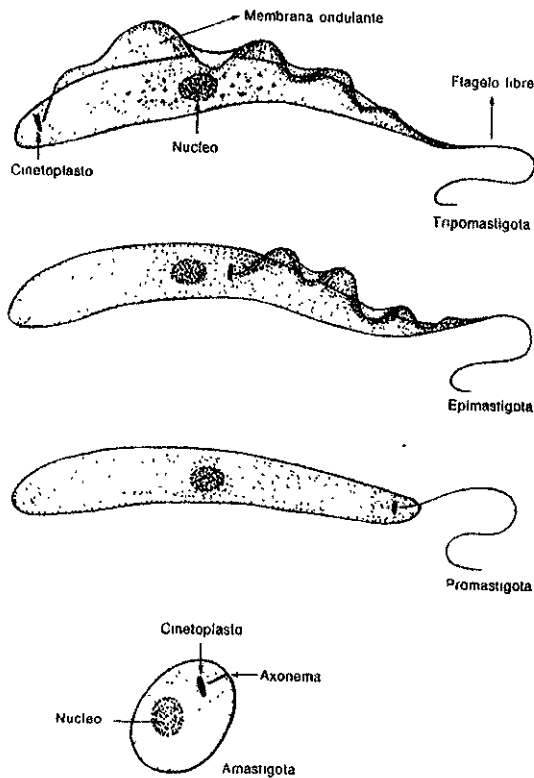
3. Ciclo biológico.

Después de la multiplicación en el intestino de la chinche reduvídea en forma de epimastigote, algunos parásitos se transforman en tripomastigotes infectantes o metacíclicos (metacíclico porque está al final del ciclo y porque morfológicamente es un poco más esbelto que el sanguíneo), que son transmitidos a los vertebrados por

contaminación fecal. En las noches, las chinches surgen furtivamente de las grietas de los muros e indoloramente extraen sangre de la gente mientras duerme.

Figura 1:

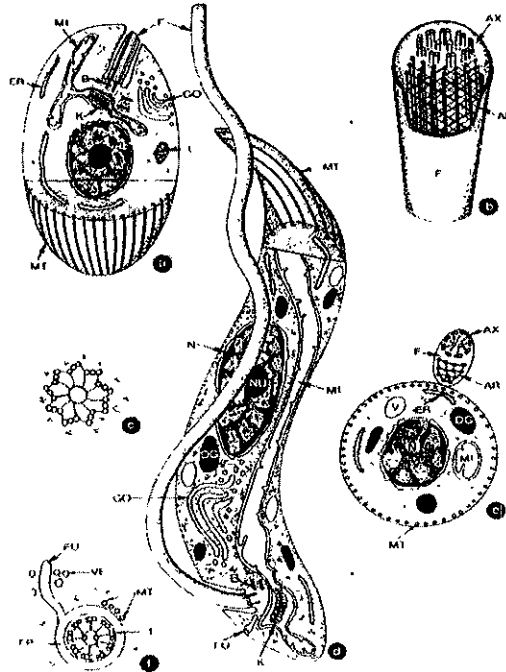
Fases polimorfas: tripomastigote, epimastigote, promastigote y amastigote.



Tomado y adaptado del Zaman, 1982.

Figura 2:

- Trypanosoma*: esquema de su ultraestructura. a) Vista longitudinal de amastigote. b) Flagelo (representación tridimensional). c) Aparato basal (corte transversal). d) Tripomastigote (corte longitudinal). e) Tripomastigote (corte transversal). f) Saco del flagelo (corte transversal).



AR: Varilla axial; AX: axonema; B: aparato basal; DG: inclusión densa, glicosoma; ER: retículo endoplásmico; F: flagelo; FP: bolsa del flagelo; FU: canal digitado; GO: aparato de Golgi; K: kinetoplasto; L: Lípido; MI: mitocondria; MT: microtúbulos; N: núcleo; NU: nucléolo; PM: membrana peritrófica; SCO: surface coat, glucocáliz; UM: membrana celular; V: vacuola; VE: vesícula.

Tomado y adaptado del Mehlhorn,1993.

Puesto que es frecuente que defecuen durante o poco después de haber picado, el sitio del piquete se contamina con facilidad. La víctima dormida también puede rascarse o frotar la zona lesionada sin darse cuenta, con lo que transporta los parásitos de la materia fecal a las mucosas de los ojos y otros sitios.

Estos parásitos penetran a través de la piel y las membranas mucosas intactas o se introducen a los folículos pilosos. Los tripomastigotes no se multiplican en el vertebrado. Después de invadir al hospedero los organismos penetran a las células tisulares y se convierten en amastigotes; dentro de las células ocurre una multiplicación localizada, similar a la de *Leishmania spp.* Otros tripomastigotes viajan en la sangre invaden leucocitos, monocitos y linfocitos, dentro de los cuales se transforman en amastigotes. Los tripomastigotes libres circulantes, así como los amastigotes intracelulares liberados de células lisadas, se diseminan por el cuerpo invadiendo cada órgano, pero en especial al sistema reticuloendotelial y al músculo cardíaco. En este momento, la chinche reduvídea puede alimentarse de sangre que contiene al tripanosoma. En los espacios intersticiales pueden verse algunos epimastigotes y promastigotes transitorios.

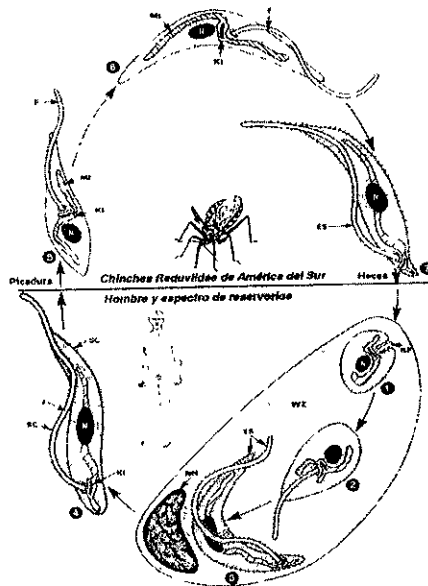
En el intestino del insecto los tripomastigotes ingeridos se convierten en epimastigotes y se multiplican por división longitudinal. Después de esto, los parásitos se desplazan hacia la porción posterior del intestino, donde se revierten a

tripomastigotes metacíclicos que pasan con las heces e inician la infección en humanos y otros vertebrados (Figura 3).

Figura 3:

Ciclo biológico de Trypanosoma cruzi.

1. Amastigote localizado directamente en el citoplasma de las diferentes células hospederas.
- 2.-3. Transformación en tripomastigote.
4. Tripomastigote en la sangre después de rasgar la célula hospedera.
5. Después de la picadura tiene lugar en el intestino medio de la chinche una transformación continua en epimastigote.
6. Epimastigote en el intestino posterior de la chinche.
7. Epimastigote metacíclico localizado en el recto de la chinche.



ES: "Surface coat" en formación; F: flagelo; K: Kinetoplasto; KF: flagelo corte; MI: mitocondrion; N: núcleo; NH: núcleo de la célula hospedera; SC: "surface coat"; WZ: célula hospedera.

Tomado y adaptado de Mehlhorn, 1993.

B. Enfermedad de Chagas.

1. Mecanismos de transmisión.

El hombre puede infectarse con *T. cruzi*, mediante diversos mecanismos:

1) Por las deyecciones de triatóminos: es la forma más importante. El insecto al picar en zonas descubiertas de la piel del hombre durante el sueño, elimina sus heces con los tripomastigotes metacíclicos que penetran en sitio de picadura o por las mucosas (Tay, 1998).

2) Por la placenta: determina la infección congénita. Una madre infectada puede transmitir los *T. cruzi* circulantes en su sangre durante la segunda mitad de la gestación.

3) Por la leche materna: podría ser una remota posibilidad de infección. En la literatura, existe un caso bien documentado de este mecanismo de transmisión.

4) Por las transfusiones sanguíneas: es un peligro real, puesto que el *T. cruzi* mantiene su vitalidad, a pesar de la temperatura del refrigerador, hasta por dos meses.

5) Por trasplante de órganos: se ha estudiado como una posible ruta de transmisión de *T. cruzi*. Esto se observó en dos reportes separados: en el primero los cuatro receptores de un donador muerto presentaron síntomas, de tal manera que se desarrolló la enfermedad de Chagas entre uno a tres meses después del trasplante. En el segundo, en donde nueve receptores que recibieron riñones de donadores

mueritos o donadores con algún parentesco, dos desarrollaron la fase aguda de la enfermedad de Chagas (Chance,1995).

6) Por la manipulación de sangre y de animales infectados: como ocurre en las infecciones accidentales que se producen en los laboratorios que trabajan en las enfermedades de Chagas experimental, o en los individuos que descueran animales salvajes o semidomésticos infectados.

7) Otros mecanismos: aun cuando en forma experimental se ha demostrado la transmisión por vía oral, inoculando en ratones de experimentación directamente los flagelados en la mucosa oral o con la intervención de moscas (*Musca domestica*), con seguridad son mecanismos de poca importancia en la transmisión de *T. cruzi* al hombre.

2. Fases de la enfermedad de Chagas.

Se conocen tres fases de la enfermedad de Chagas: una fase aguda corta y una fase crónica de larga duración; separadas por una fase clínicamente asintomática llamada fase indeterminada. En primera y tercera fases pueden verse afectados diversos órganos y la enfermedad puede ser mortal en cualquiera de ellas (OMS, 1991).

Fase aguda:

Se caracteriza por producir malestar general con diversas manifestaciones clínicas. Los síntomas pueden ser leves y atípicos; puede presentar a cualquier edad, pero en

las zonas altamente endémicas, los casos reconocidos generalmente se detectan en personas menores de 15 años. La inflamación localizada en la puerta de entrada del *T. cruzi* se llama chagoma. El chagoma del ojo (signo de Romaña) aparece en más del 90% de los pacientes diagnosticados como recién infectados. Los síntomas generales son fiebre, agrandamiento del hígado y del bazo, edema generalizado y adenomegalia. A veces se presenta un exantema generalizado, como también anorexia, diarrea y vómitos. Una complicación grave de esta fase es la meningoencefalitis.

Fase indeterminada:

Esta fase comienza unas 8-10 semanas después de la fase aguda, haya habido o no manifestaciones clínicas y puede durar varios años o indefinidamente. Se caracteriza por la ausencia de síntomas y el enfermo se siente sano.

Fase crónica:

Se estima que esta el 30% de las personas que sufren la forma indeterminada de la infección sufrirán daño cardíaco, digestivo o neurológico unos 10-20 años después de haber contraído la enfermedad, mientras que en los demás enfermos no se manifestará ninguna alteración orgánica.

Forma cardíaca: Las manifestaciones clínicas dependen del grado de daño miocárdico, presencia de arritmias y grado de insuficiencia cardíaca. Los síntomas más frecuentes son palpitaciones, mareos, síncope, disnea, edema y dolor pectoral.

Forma digestiva: Los segmentos más comúnmente afectados son el esófago y el colon. Puede presentarse una dilatación progresiva del esófago con diversos grados de regurgitación y disfagia. Se pierde el movimiento en el colon, lo cual causa estreñimiento severo y dilatación. El megaesófago y el megacolon pueden coexistir con diversos grados de lesión cardíaca.

C. Diagnóstico:

En el diagnóstico de la enfermedad de Chagas juega un papel importante la clínica, los antecedentes epidemiológicos, y los estudios de gabinete y de laboratorio. Existen dos métodos:

1. Métodos parasitológicos:

a) Métodos directos:

- ✧ Frotis delgado (García, 1983)
- ✧ Frotis sanguíneo grueso (OMS, 1991)
- ✧ Examen de sangre fresca (Zaman, 1982)
- ✧ Método de Strout (OMS, 1991).

b) Métodos indirectos:

- ✧ Inoculación en animales (García, 1983)
- ✧ Cultivo en medio NNN(medio Novy, MacNeal y Nicolle)
- ✧ Xenodiagnóstico (Zaman, 1982)

2. Métodos serológicos (Beck, 1984; García, 1983):

- ◇ Fijación de complemento (La prueba de Machado es una reacción de fijación de complemento).
- ◇ Anticuerpo fluorescente indirecto
- ◇ Hemaglutinación indirecta

C. Epidemiología:

1. Prevalencia de la infección.

Si bien los datos básicos sobre prevalencia y morbilidad de la enfermedad de Chagas mejoraron en calidad y cantidad durante la década de 1980, aún es difícil hoy día establecer con precisión la distribución geográfica y la prevalencia de la enfermedad (OMS, 1991).

Del total de 360 millones de personas que habitan los países endémicos (excluyendo México y Nicaragua, países para los cuales no se tienen datos adecuados), al menos 90 millones (el 25% de la población) se consideran expuestas al riesgo de la infección y 20 millones están infectadas.

La prevalencia de la enfermedad en México es más elevada en los estados de la costa del Pacífico, desde Chiapas hasta Nayarit, en la península de Yucatán y en algunas zonas circundantes al Altiplano. Si bien en México la mayoría de las

infecciones manifiestas en seres humanos son consideradas leves, recientemente se han notificado algunos casos de megavísceras.

Cabe mencionar que la prevalencia e incidencia de la enfermedad, como también la mortalidad debida a la misma, varían constantemente como consecuencia de la migración poblacional, la ejecución de programas de control y los cambios en las condiciones socioeconómicas, entre otros factores.

2. Distribución geográfica de la infección humana con *T. cruzi* en el continente americano.

La enfermedad de Chagas es una zoonosis capaz de perpetuarse en focos enzoóticos sin que exista infección en el ser humano. Tales ciclos enzoóticos se extienden aproximadamente desde los 42° de latitud N(norte de California) hasta los 46° de latitud S(Sur de Argentina y Chile). Sin embargo la distribución geográfica de la infección humana se extiende desde el Sur de los Estados Unidos de América hasta la provincia argentina de Chubut (Figura 4).

Se han encontrado vectores y mamíferos infectados en los estados de Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Sonora, Yucatán y Zacatecas.

Figura 4:

Distribución geográfica de la infección humana con *T. cruzi* en el continente americano.



Tomado y adaptado de OMS, 1991.

3. Características de zonas endémicas.

Las infecciones por *T. cruzi* están muy definidas en los animales de todas las regiones tropicales y subtropicales del continente americano, y la enfermedad de Chagas es endémica en el ser humano en la mayor parte de América Central y del Sur, donde debido a las condiciones socioculturales existe un estrecho contacto con las poblaciones humanas y los insectos vectores.

En las zonas rurales de América Latina, la construcción y terminación de la mayoría de las viviendas humanas son inadecuadas y se emplean materiales tales como palos y arcilla para las paredes sin revocar y techos de paja y palma, que son materiales que

ofrecen excelentes hábitats para los triatomíneos. Éstas características dan lugar a que sobrevengan cambios en los hábitats naturales de los vectores, los cuales invaden las viviendas humanas y transforman las zonas peridomiciliarias en lugares de multiplicación y focos de dispersión de sus colonias.

4. Transmisores.

Los únicos vectores epidemiológica y epizoológicamente importantes de *T. cruzi* son las chinches de la subfamilia *Triatominae*.

Los triatomíneos son insectos del orden *Hemiptera*, de la familia *Reduviidae* y de la subfamilia *Triatominae*. Las *Reduviidae* se distinguen de la mayoría de los demás hemípteros por poseer una proboscis de tres segmentos, que cuando no está en actividad se dobla bajo la cabeza, colocándose entre el primer par de patas.

Todas las especies de *Triatominae* son vectores potenciales de *T. cruzi*, pero los factores más importantes que determinan su capacidad de transmisión son: un intervalo corto entre la alimentación y la defecación, la adecuación para vivir en las habitaciones humanas, el alto grado de antropofilia y su amplia distribución geográfica.

Por ellos de las 27 especies conocidas en México, sólo unas cuantas tienen importancia epidemiológica y son 18 las que se han encontrado infectadas

naturalmente *Triatoma barberi*, *T. dimidiata*, *T. gerstaeckeri*, *T. Hegneri*, *T. lecticularia*, *Rhodnius prolixus*, etc.

Los reservorios naturales de *T. cruzi* son mamíferos silvestres.

LEISHMANIOSIS.

A. Agente etiológico: *Leishmania spp.*

1. Taxonomía.

Leishmania spp. pertenece al subfilo *Mastigophora* del filo *Sarcomastigophora*, orden Kinetoplastida (OMS, 1991).

2. Fases del parásito:

Leishmania pasa por dos estadios:

a) **Amastigote:** tiene forma redondeada u oval de 2-5 μm de diámetro con un gran núcleo excéntrico y un kinetoplasto que consta de blefaroplasto y un cuerpo basal de donde nace un rizoplasto que se convierte en flagelo en el promastigote. Esta etapa sólo se observa en los tejidos de los vertebrados parasitados y algunas veces (en forma esporádica) en los medios de cultivo.

b) **Promastigote:** de forma fusiforme, tiene aprox. 12-20 μm de diámetro mayor, consta de un núcleo situado aproximadamente en la parte central del parásito y un flagelo anteronuclear, que nace de un cuerpo basal situado por delante del

kinetoplasto y sale del cuerpo por el polo anterior, carece de membrana ondulante. Ambas fases se reproducen por fisión binaria (Velasco-Castrejón, 1994).

3. Ciclo biológico.

Los ciclo biológicos son idénticos para todas las especies. En este ciclo participa una existencia alterna de un hospedero vertebrado y un insecto.

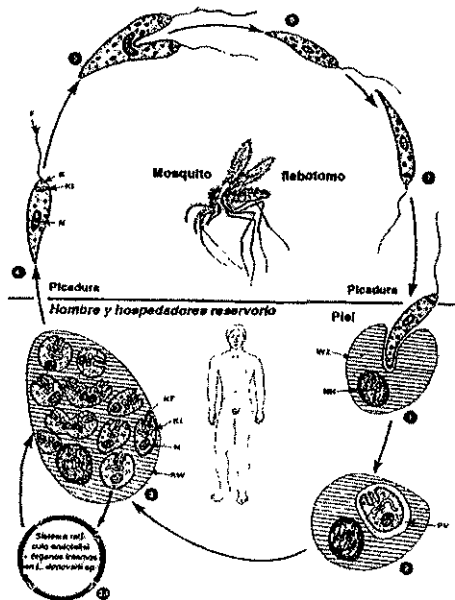
Pequeños amastigotes ovalados se observan intracelularmente en el sistema reticuloendotelial de la piel, médula ósea, hígado, bazo y nódulos linfáticos de los hospederos vertebrados; mientras que se advierten promastigotes en el aparato digestivo de moscas (hospederos invertebrados).

Mientras se alimentan esas moscas regurgitan promastigotes de la porción delantera del aparato digestivo, bloqueada, metiéndoles así por la herida; de esta manera, las moscas sirven de artrópodo vector. Las lesiones cutáneas iniciales son similares a todas las infecciones. Los promastigotes invaden con rapidez las células locales y se transforman en amastigotes, un parásito intracelular estricto. La multiplicación tiene lugar dentro de las células del hospedero mediante división longitudinal hasta que la célula termina por lisarse. Son invadidas nuevas células, con la producción inicial de una púpula, que luego presenta variaciones de evolución según la especie o cepa invasora (Figura 5).

Figura 5:

Ciclo biológico de las especies de *Leishmania*.

1. El promastigote es recogido en la región cutánea por un macrófago al picar.
2. Transformación en amastigote.
3. Reproducción por división binaria.
- 3.1. En las especies pertenecientes al grupo *L. donovani*, los amastigotes también atacan al sistema retículo endotelial de los órganos internos.
4. Los amastigotes tomados por el díptero flebotomo al picar, se transforman en el intestino de éstos en promastigotes.
5. Reproducción por división longitudinal.
- 6.-7. Diferenciación final en la fase infecciosa.



B: Aparato basal; F: Flagelo; KI: Kinetoplasto; KF: Flagelo corto; N: Núcleo; NH: Núcleo de la célula hospedera; PV: Vacuola parastófora; RW: Restos del citoplasma de la célula hospedera; WZ: Célula hospedera.

Tomado y adaptado de Mehlhorn, 1993.

B. Leishmaniosis.

1. Mecanismos de transmisión.

La transmisión de las leishmaniosis es realizada por las hembras de especies hematófagas de dípteros de la familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae*, géneros *Phlebotomus* (Europa) y *Lutzomyia* (América).

La transmisión también puede tener lugar por contaminación de la picadura y por contacto. Se han logrado infecciones en animales de laboratorio mediante inyecciones intraperitoneales, al ser introducidos en los tejidos, los promastigotes llegan a los fagocitos mononucleares, donde se multiplican. Al romperse las células infectadas, quedan en libertad y serán fagocitados por otras células, con lo que la infección se disemina a otros órganos o a sitios más distantes, según la especie infectante o el estado inmunitario del hospedero.

2. Tipos clínicos:

Existen dos tipos clínicos de leishmaniosis: las cutáneas y la visceral (kala-azar). Las leishmaniosis cutáneas afectan exclusivamente piel y mucosas y son causadas por diversas especies y subespecies de *Leishmania*. La leishmaniosis visceral (LV) se debe a diversas especies del complejo *L. donovani* (Velasco-Castrejón, 1994).

Leishmaniosis cutáneas (LC):

Las formas clínicas causadas por *L. mexicana mexicana* son la leishmaniosis cutánea localizada (LCL) o úlcera de los chicleros, la leishmaniosis cutánea difusa (LCD) o leishmaniosis leproide y la leishmaniosis mucocutánea (LMC) o espundia. En México el agente etiológico de las leishmaniosis cutáneas es *L. mexicana* y en algunas áreas puede asociarse a *L. braziliensis*. En el pasado se pensó que la LMC sólo era producida por *L. braziliensis*, sin embargo hasta ahora en nuestro país casi todos los casos causados por esta especie corresponden a LCL.

Leishmaniosis cutánea localizada (LCL):

Se caracteriza por la presencia de una ulceración pequeña única, aunque puede ser grande e incluso múltiple. La ulceración es generalmente redondeada, de bordes indurados, fondo limpio e indolora y aparece aprox. 15-20 días después de la picadura infectante. Al principio es un pequeño nódulo, pruriginoso, que evoluciona hacia la ulceración, aunque algunas veces la lesión continúa siempre nodular o se transforma en una placa infiltrada o atrófica e inclusive se vuelve vegetante. La LCL tiende a la curación espontánea entre 6 meses a 4 años, excepto cuando se localiza en las orejas, donde se hace crónica y mutilante y cuando es causada por *L. braziliensis*, origina úlceras más persistentes y resistentes al tratamiento con antimoniales.

Leishmaniosis cutánea difusa (LCD).

Se inicia por un nódulo que no se ulcera se disemina por vía linfática, dando múltiples nódulos que con frecuencia simulan una esporotricosis linfangítica. Esta diseminación

es muy lenta y se lleva a cabo por el líquido tisular, la linfa o la sangre llegando a colonizar prácticamente todo el tegumento, con excepción del cuero cabelludo, la región axilar, inguinal, genitales externos, palmas y plantas. Sin embargo en algunos enfermos mexicanos se han encontrado lesiones en los genitales externos, las plantas de los pies y con frecuencia en las mucosas orofaríngea y nasal.

Leishmaniosis mucocutánea (LMC) o espundia:

Es causada por *L. braziliensis* y presenta lesiones muy destructivas en la mucosa nasal y orofaríngea, que pueden entorpecer la fonación y la deglución e incluso causar inanición, debido al intenso dolor que provocan. No cura espontáneamente y también es más resistente a la quimioterapia específica como en el caso de LCL causada por *L. mexicana*.

Leishmaniosis visceral (LV) o kala-azar.

Afecta vísceras y puede ser mortal. Es causada por *L. donovani* y subespecies en Europa y por *L. chagasi* en América, aunque para algunos autores ésta es una subespecie de *L. donovani* (*L. d. chagasi*) o incluso de *L. infantum*.

Esta forma de leishmaniosis puede presentarse en tres modalidades: endémica, esporádica y epidémica. La LV endémica es común en América Latina, afecta primordialmente a niños entre 1 y 4 años y predomina en el sexo masculino (2:1). El periodo de incubación oscila de 10 días a más de un año y el cuadro clínico se inicia gradualmente. Los signos y síntomas más frecuentes son fiebre, a veces con picos

cotidianos dobles, malestar general, anorexia, pérdida de peso que puede progresar hasta la caquexia, así como hepatoesplenomegalia, linfadenopatía, pancitopenia y palidez de mucosas. El oscurecimiento de la piel, particularmente de cara, abdomen, pies y manos es común en la India. En México, la leishmaniosis visceral endémica afecta tanto a niños como adultos y es más común en el sexo femenino. La LV esporádica se observa en individuos no nativos que penetran en un área endémica. La LV epidémica se observa a veces en las áreas endémicas y puede involucrar a todos los grupos de edades particularmente del sexo masculino (4:3). Habitualmente cursa en forma crónica.

C. Diagnóstico:

El diagnóstico clínico de la LCL es relativamente fácil para un individuo entrenado, ya que habitualmente sólo se observa de una lesión ulcerada en la piel, indolora, redondeada con bordes indurados y fondo limpio, mientras que en la LV se presentan fiebre, malestar general, linfadenopatía, etc.

La observación y/o el aislamiento del agente etiológico son determinantes, pero esto no es sencillo ya que en las lesiones antiguas, con excepción de los casos de LCD, el parásito es tan escaso que prácticamente parece ausente, razón por la cual se requiere de la inoculación en animales, la inmunología y la biología molecular

(anticuerpos mononucleares, hibridación del DNA, entre otras) para confirmar el diagnóstico.

En los estadios tempranos de las leishmaniosis cutáneas la parasitoscopia es relativamente fácil mediante impronta, extendido o biopsia. Es factible el aislamiento en medios de cultivo (Velasco-Castrejón, 1994).

En el caso de la LCD los parásitos son muy abundantes, por lo que es fácil encontrar al parásito en el material teñido y lograr el aislamiento.

En el caso de LV, el diagnóstico se realiza por la observación de extendidos de médula ósea teñidos con Giemsa. El aislamiento del parásito se puede intentar a partir de una biopsia hepática o de médula ósea.

La búsqueda de anticuerpos específicos para *Leishmania* puede realizarse mediante métodos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA.

El uso de la intradermorreacción de Montenegro es invaluable para descubrir nuevas áreas de endemia, lo que se ha demostrado muchas veces en estudios de campo, e incluso puede convertirse en una prueba diagnóstica importante en presencia de un cuadro clínico y epidemiológico compatibles.

La metodología más reciente para la caracterización de *Leishmania* es la identificación del DNA en los organismos infecciosos con sondas e iniciadores con secuencias bien definidas de DNA procedentes de las cepas de referencia.

D. Epidemiología:

1. Prevalencia de la infección

Las leishmaniasis son zoonosis de distribución cosmopolita con excepción de Australia. Afectan a 12 millones de individuos de 80 países, de los cuales enferman cada año alrededor de 400 000 y ponen en riesgo a más de 350 millones.

2. Distribución geográfica

En América, las leishmaniasis se distribuyen desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina. Las leishmaniasis en México se encuentran al menos en 17 entidades, desde Coahuila, Nuevo León, Península de Yucatán, Chiapas, Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Campeche, Quintana-Roo, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Jalisco, Nayarit, San Luis Potosí, Morelos, Puebla, Hidalgo. La LCD se distribuye en: Coahuila, Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Campeche y Michoacán. La LMC hasta ahora se ha observado en Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas y Jalisco. El Kala-azar descubierto en 1952 en Guerrero, tiene dos áreas endémicas: la cuenca del Balsas (Puebla y Guerrero) y el área de Chiapas.

3. Características de zonas endémicas.

Las leishmaniasis han sido responsabilizadas del fracaso de proyectos de neocolonización de tierras tropicales y en el desarrollo agropecuario, del

entorpecimiento de la construcción de grandes obras viales en la selva: carreteras y vías férreas, de la prospección de minerales e inclusive de alejar a los visitantes de las áreas turísticas enclavadas en zonas endémicas de las regiones tropicales (Velasco-Castrejón, 1994).

4. Transmisores.

Los representantes de *Phlebotominae* tienen amplia distribución en el mundo. Actualmente se conocen once géneros de *Phlebotominae* que comprenden alrededor de 600 especies conocidas; en Europa: *Phlebotomus*, *Sergentomyia*, *Chinius*, etc.; en América: *Lutzomyia*, *Brumptomyia*, *Warileya*, *Hertigia* y *Psychodopygus*. Las especies que se conocen son transmisoras de *Leishmania spp.* quedan incluidas en los géneros *Phlebotomus* de Europa y en *Lutzomyia* y *Psychodopygus* (en América) (Velasco-Castrejón, 1994).

El género *Lutzomyia* es el que está mejor representado y distribuido en América, existen por lo menos 200 especies. Los transmisores de *L. mexicana* en la Península de Yucatán son las hembras de *Lutzomyia olmeca*, conocidas como papalotillas o huétl.

Se considera que los roedores silvestres son los reservorios de la leishmaniosis tegumentaria y los cánidos silvestres y domésticos los del Kala-azar.

CAPÍTULO II. FÁRMACOS EMPLEADOS EN LA QUIMIOTERAPIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La situación para el tratamiento de la enfermedad de Chagas no es muy prometedora. El tratamiento actual depende de dos fármacos: el *nifurtimox* y el *benznidazol* (Croft,1997). Por lo que llamaremos a éstos fármacos, fármacos de primera elección.

Ambos fármacos tienen la ventaja de que su vía de administración es oral, pero también ambos tienen serios efectos tóxicos, que incluyen neuropatía y dermatopatía, en alrededor del 40% de casos tratados. Inclusive los dos tienen una importante actividad contra la fase aguda de la enfermedad de Chagas, aunque se ha observado una marcada variación en la sensibilidad de diferentes cepas de *T. cruzi*. Además, ambos compuestos presentan eficacia limitada contra la fase crónica de la enfermedad (De Castro,1993).

En el presente capítulo se presentarán aquéllos compuestos que han mostrado actividad contra *Trypanosoma cruzi*. En primer lugar, se mencionarán al *nifurtimox* y al *benznidazol* por ser sustancias de mayor uso clínico. En segundo lugar, se mencionarán a los fármacos que se utilizan en combinación con los mencionados en primer lugar. En

tercer lugar, se presentarán otras sustancias que están en fase preclínica de investigación.

A.NIFURTIMOX:

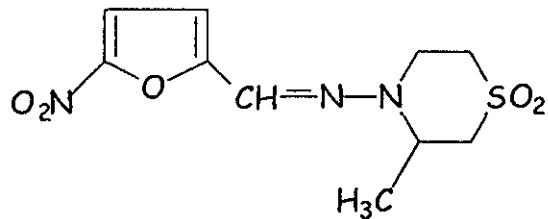
Historia:

En infecciones experimentales de la enfermedad de Chagas causada por *T. cruzi*, se advirtió la eficacia de los nitrofuranos y se emprendieron investigaciones de innumerables congéneres, en cuanto a su eficacia. De ellos sólo uno, el *nifurtimox* 3-Metil-N-[(5-nitro-2-furanil)-metilen-4- tiomorfolinamino 1,1-dióxido (Budavari,1996) es muy eficaz para tratar la enfermedad aguda de Chagas.

En la figura 6 se muestra la estructura del nifurtimox (Bayer 2502; Lampit):

Figura 6:

Estructura química del Nifurtimox.



Nifurtimox

Aspectos farmacocinéticos:

El nifurtimox se absorbe adecuadamente por vía oral, y en 3.5 h aproximadamente se advierten valores plasmáticos máximos. A pesar de ello, en el plasma aparecen sólo concentraciones bajas del fármaco (10 a 20 μM) y por la orina se excreta menos de 0.5% de la dosis. La vida media es solamente de unas tres horas. Sin embargo, se advierten cifras altas de varios metabolitos no identificados y es obvio que el nifurtimox pasa por una fase de biotransformación rápida quizá por medio de un efecto de "primer paso" presistémico. No se sabe si los metabolitos poseen o no actividad tripanocida (Tracy,1996).

Efectos contra protozoos:

El nifurtimox se utiliza en el tratamiento de la enfermedad de Chagas causada por *T. cruzi*. Este fármaco aminora la intensidad de la enfermedad aguda, pero es ineficaz en las fases crónicas de la infección.

El nifurtimox es tripanocida contra las formas de tripomastigote y amastigote de *T. cruzi*. Las concentraciones de 1 μM dañan a los amastigotes intracelulares *in vitro* e inhiben su desarrollo. La exposición continua, a la concentración mencionada del compuesto alarga considerablemente el ciclo intracelular del parásito. Los tripomastigotes son menos sensibles, concentraciones de 10 μM de nifurtimox, inhiben pero no eliminan la penetración de las células de vertebrados. La acción tripanocida

del nifurtimox al parecer depende de su capacidad de mostrar reducción parcial del anión radical nitro, seguida de autooxidación hasta regenerar el nitrofurano primario y formar un anión radical superóxido y otras especies de oxígeno reactivas como el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo.

No se ha mostrado siempre la presencia de la enzima de tripanosomas que se encarga de la reducción del nifurtimox proximal inicial, pero se ha dicho que interviene la tripanotiona reductasa. La reacción mencionada no sólo hace que se formen productos electrofílicos, sino que también bloquea la reducción de la forma disulfuro de tripanotiona hasta llegar a su forma ditiol biológicamente activa. Todavía más, al parecer *T. cruzi* muestra deficiencia en sus defensas enzimáticas contra especies de oxígeno reactivo. La reacción de los radicales libres con las macromoléculas celulares culmina en daño celular que incluye: peroxidación de lípidos y daño de membrana, inactivación de enzimas, lesión de DNA y mutagénesis (Tracy, 1996).

El nifurtimox también puede dañar tejidos de mamífero por la formación de radicales y ciclos redox.

Aún más, muchos enfermos que completan un ciclo terapéutico, no curan de la infestación parasitaria. En la fase aguda, la farmacoterapia hace que desaparezca la parasitemia, mejoren los síntomas y que haya curación clínica en más de 80% de los sujetos tratados. La respuesta clínica varía según sea la región geográfica y las cepas que se detectan en Argentina, sur de Brasil, Chile y Venezuela al parecer son más

sensibles que las detectadas en el centro de Brasil. En modelos de animales, se han descrito diferencias en la sensibilidad de diversas cepas de *T. cruzi* al nifurtimox, pero no se sabe si ellas explican los resultados clínicos variables (Tracy, 1996).

El nifurtimox es un producto oral y los adultos con infección aguda han de recibir 8 a 10 mg/kg de peso al día en cuatro fracciones, durante 120 días. En niños de uno a 10 años de edad con enfermedad aguda de Chagas, se administran de 15 a 20 mg/kg de peso del medicamento al día, en cuatro fracciones, durante 90 días; en sujetos de 11 a 16 años de edad, la dosis diaria es de 12.5 a 15 mg/kg de peso que se proporcionan con base en el mismo protocolo. Durante la terapéutica, a veces hay molestias gástricas y pérdida ponderal, y si ocurre este último problema habrá que disminuir la dosis (Tracy, 1996).

Toxicidad y efectos adversos:

Los efectos adversos ocasionados por el nifurtimox son frecuentes y varían desde reacciones de hipersensibilidad como dermatitis, fiebre, ictericia, infiltrados pulmonares y anafilaxia, hasta complicaciones que dependen de la dosis y de la edad, localizables más bien en vías gastrointestinales y sistemas nerviosos periférico y central. Son frecuentes náuseas y vómito, y también mialgias y debilidad. Neuropatía periférica y síntomas gastrointestinales son particularmente comunes después de tratamiento duradero; esta última complicación puede ocasionar pérdida ponderal e impedir el uso ulterior del compuesto. Son menos frecuentes cefalea, perturbaciones

psíquicas, parestesias, polineuritis y excitabilidad del sistema nervioso central. Se han señalado casos de leucopenia y de disminución en el número de espermatozoides. El compuesto puede suprimir las reacciones inmunitarias mediadas por células, *in vitro* e *in vivo*. Los niños al parecer toleran el *nifurtimox* mejor que los adultos. Ante la gravedad de la enfermedad de Chagas y el hecho de no contar con fármacos mejores, son pocas las contraindicaciones absolutas para utilizar el *nifurtimox* (Tracy, 1996).

El tratamiento con *nifurtimox* no genera efecto alguno en lesiones orgánicas irreversibles. La cardiomiopatía que surge con la enfermedad crónica en realidad puede traducir un padecimiento autoinmunitario que es independiente de la presencia de tripanosomas. En el tratamiento es importante no consumir bebidas alcohólicas ya que puede aumentar la incidencia de efectos adversos (Tracy, 1996).

B.BENZNIDAZOL:

Historia:

Tanto el *nifurtimox* como el *benznidazol* son capaces de suprimir la parasitemia y curar o mejorar el estadio agudo de la infección chagásica, estos compuestos ejercen un escaso efecto en la fase crónica de la enfermedad (Brener,1979). El *T. cruzi* es especialmente vulnerable a las drogas que forman radicales libres intracelulares. Tanto el *nifurtimox* como el *benznidazol* poseen esta capacidad, y otros agentes con

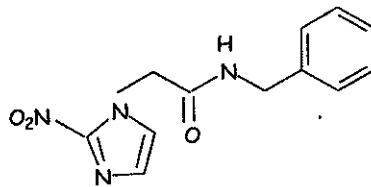
un potencial similar son evaluados actualmente como posibles agentes antitripanosómicos (Tracy, 1996).

El *benznidazol* (Radanil) se introdujo en la quimioterapia de la enfermedad de Chagas, pertenece a la familia de los nitroimidazoles -derivados del 2-nitroimidazol, el *benznidazol* posee una cadena lateral sencilla sobre el anillo imidazólico (Litter,1988).

En la figura 7 se muestra la estructura química del *benznidazol*, 2-Nitro-N-(fenilmetil)-1H-imidazol-1-acetamida.

Figura 7:

Estructura química del Benznidazol



Benznidazol

Aspectos farmacocinéticos:

El *benznidazol* posee una potente acción tripanocida sobre el *Trypanosoma cruzi* - *in vitro* e *in vivo*-. En cuanto a su mecanismo de acción, estudios efectuados *in vitro* con el *benznidazol* han demostrado que el fármaco inhibe la síntesis del RNA de los parásitos, que rige la síntesis proteica de éstos, que asimismo es inhibida. El

benznidazol se absorbe bien por todas las vías y pasa a la sangre, en la que alcanza la máxima concentración plasmática de 2 a 3 $\mu\text{g/ml}$ entre 1 y 3 horas después de la administración para descender luego. Se distribuye por todos los órganos y se metaboliza en el organismo; no se conocen los metabolitos formados, los cuales y el fármaco libre, 20% para el *benznidazol*, se excretan en la orina y algo en las heces. La vida media del *benznidazol* es de 12 horas (Litter,1988)

Aplicaciones terapéuticas:

El *benznidazol* se emplea en el tratamiento de la enfermedad de Chagas en ambas fases de la enfermedad, tanto aguda como crónica; aunque en la fase crónica no es muy efectivo. A una dosis de 5 mg por kg de peso diariamente por 30 a 60 días son necesarios (Reinolds, 1982). El *benznidazol* se administro a 76 pacientes con la enfermedad de Chagas en la fase aguda.

La dosis inicial media diaria fue de 3.01 mg por kg de peso corporal fue incrementada a una media de 7.37 mg por kg de peso corporal al final del tratamiento de 30 días. De los 73 pacientes disponibles que siguieron el tratamiento, 65 fueron considerados, por medio de xenodiagnóstico, estar libres de infección. Reacciones en la piel ocurrieron en 11 pacientes (Barclay,1978).

214 pacientes con la enfermedad en la fase aguda ó crónica fueron tratados con *benznidazol*: 92 recibieron 8 mg o más por kg de peso corporal diariamente y 122 recibieron 7 mg o menos por kg. La eliminación, asignada por xenodiagnóstico, ocurrió

en 74 y 78% de los pacientes respectivamente; pacientes ya sea en fase aguda o crónica de la enfermedad respondieron similarmente. Efectos secundarios (náusea, vómito, dolor abdominal y erupción) fueron comunes. Un esquema de dosis de 5 mg por kg diario por 30 a 60 días fue sugerido (Coura,1978).

Este fármaco se encuentra dentro del grupo de fármacos que se unen de forma no intercalante a través del surco del ADN. Este grupo produce la ruptura de las hebras de ADN como consecuencia de su interacción, y se clasifican en dos grupos: los que han encontrado aplicación como antibacterianos o antiprotozoarios y aquellos que actúan como agentes antitumorales. Los 2-nitroimidazoles son antitumorales por su capacidad para dañar al ADN y por actividad como radiosensibilizadores (los tejidos tumorales de rápido crecimiento están poco vascularizados y suelen ser hipóxicos. Los radiosensibilizadores son compuestos que sensibilizan específicamente a estos tejidos frente a las radiaciones, y se utilizan como coadyuvantes en la radioterapia antitumoral) (Espada, 1993).

Su mecanismo de acción está ligado a la reducción del grupo nitro. La diferencia estriba entre los antibacterianos y antiprotozoarios de los agentes antitumorales, en que los primeros dañan fundamentalmente el ADN de las células del parásito, mientras que los antitumorales no son selectivos. Algunos se utilizan en ambos sentidos. Así el *benznidazol* es por una parte el fármaco de elección en la quimioterapia de la

enfermedad de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, y por otra parte, se ha mostrado efectivo como antineoplásico en combinación con lomustina (Espada, 1993).

La mayor o menor facilidad con que se reduce un nitroderivado depende de su potencial redox o afinidad electrónica. Cuanto menos selectivo sea aquél, más fácilmente se reduce. Si es muy negativo, sólo se produce la reducción en condiciones anaerobias. Aunque los nitroderivados propiamente dichos son las estructuras que se unen al ADN, es muy importante conocer cuál es la especie reducida que lo lesiona definitivamente. Esta especie nunca es el producto de reducción final, el hidroxilaminoderivado, sino alguno de sus precursores. En cualquier caso, el resultado observado es que el ADN se oxida, produciéndose la pérdida de fosfato de timidina (Espada, 1993).

Toxicidad y efectos adversos:

Entre los efectos adversos se encuentran: anorexia, náusea, cefalea, vómito, dolor abdominal y en algunos casos polineuritis, erupciones cutáneas y eritematosas, a veces fiebre. (Reinolds, 1982).

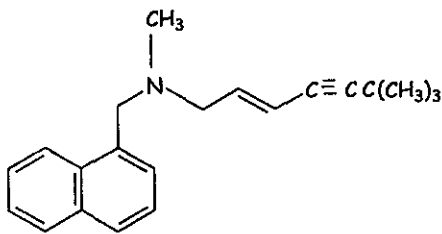
C. OTROS FÁRMACOS EMPLEADOS EN LA QUIMIOTERAPIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.

Existen otros fármacos que también se usan en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, se muestran en la tabla 1.

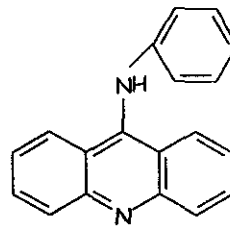
Se muestra en la figura 8 algunas de las estructuras de los compuestos antes mencionados.

Figura 8:

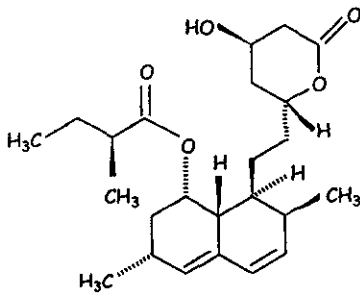
Estructuras de algunos compuestos empleados en el tratamiento de la Enfermedad de Chagas.



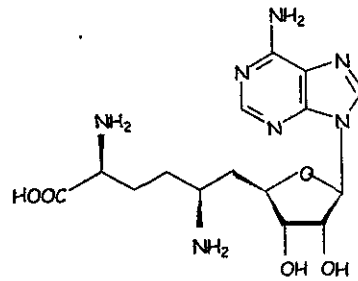
Terbinafina



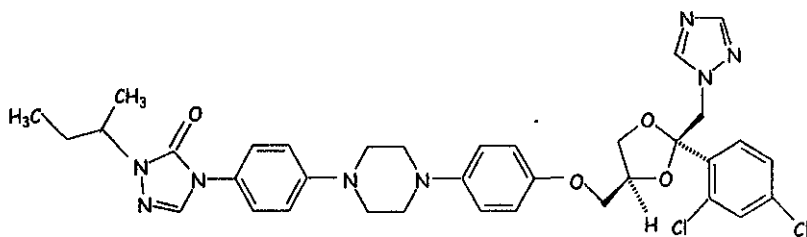
9-Anilinoacridina



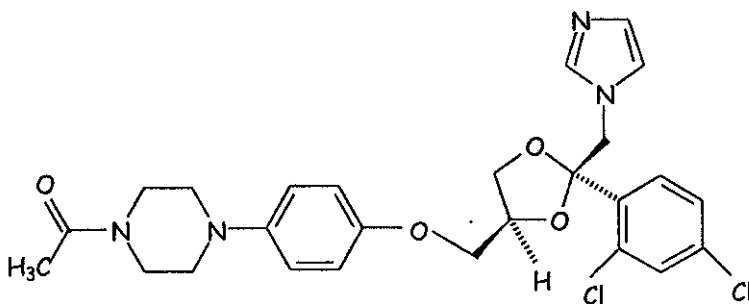
Lovastatin



Sinefungin



Itraconazol



Ketoconazol

Se ha propuesto el uso de inhibidores de la biosíntesis del esteroles (SBI), por sus efectos antiproliferativos. En *Trypanosoma cruzi*, el mecanismo que se acepta es el siguiente: SBI reduce esteroides específicos del parásito que son factores esenciales para su crecimiento y que no pueden ser reemplazados por el colesterol, el principal esteroles presente en el hospedero vertebrado (Contreras, 1997).

Tabla 1:

Otros fármacos usados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas y sus posibles mecanismos de acción.

FÁRMACO	MECANISMO DE ACCIÓN
Terbinafina	Inhibidor de la biosíntesis del ergosterol
9-Anilinoacridinas	Topoisomerasa II Se une al DNA
Difluorometilarginina	Inhíbe la arginina decarboxilasa
Hidroquinonas	Bloquea el sistema mitocondrial de transporte de electrones
Imidazoles Ketoconazol Itraconazol	Bloquea el sistema mitocondrial de transporte de electrones
Lovastatin	Bloquea el sistema mitocondrial de transporte de electrones
Nucleósidos Sinefungin	Inhíbe la síntesis nuclear y kinetoplástica de DNA
Péptido-fluorometil cetonas	Inhíbe la cisteín proteasa

Agentes antifúngicos:

La biosíntesis del ergosterol a partir de acetato vía escualeno y lanosterol es un blanco para la quimioterapia de leishmaniosis y ha sido explotada por agentes

antifúngicos. La síntesis puede ser inhibida en diferentes estadios por varios agentes antifúngicos, como los azoles, alilaminas y morfolinas (figura 9). Estos compuestos causan acumulación de intermediarios en la membrana de la célula fungal. Comparados con anfotericina B, ellos causan un menor daño directo a la membrana y actúa más lentamente (Olliaro,1993)

Sin embargo, en contraste con *T. cruzi*, *Leishmania* (y particularmente el estado amastigote) puede utilizar el colesterol del hospedero. Esta es una explicación de la pobre sensibilidad de los amastigotes de algunas especies de *Leishmania* a los azoles, en comparación de los promastigotes y con *T. cruzi*, y es posible un retroceso de estos fármacos para su uso en leishmaniosis.

Pero tienen dos atracciones adicionales:

- 1) Ellos son (la mayoría) administrados oralmente.
- 2) Ellos son autorizados o son enfocados para uso humano en enfermedades producidas por organismos fúngicos.

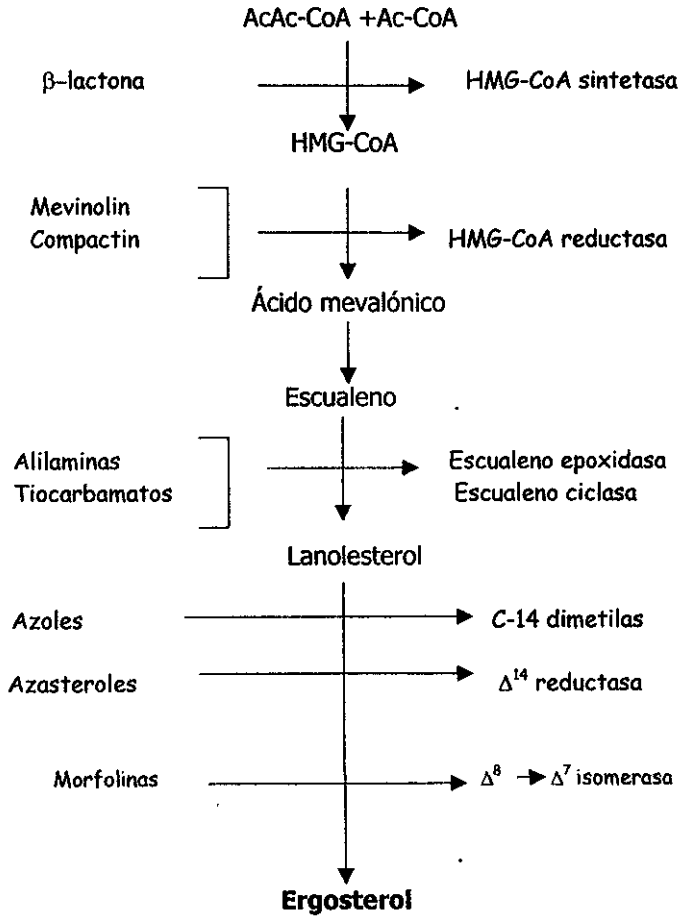
La mayoría de los azoles, que inhiben la dimetilización de C-14 de lanolesterol son interesantes porque ellos ofrecen perfiles farmacológicos diferentes.

Los esteroides específicos que requiere el parásito son el ergosterol y el 24-etilcolesta-5,7,22-trien-3 β -ol. En *T. cruzi*, se observó que los SBI inducidos inhiben el crecimiento y pérdida de la viabilidad de la célula que se ha correlacionado con la

Figura 9:

BIOSÍNTESIS DEL ERGOSTEROL

Se muestran los posibles sitios de su inhibición por los agentes antifúngicos.



completa reducción de los esteroides endógenos y no con la acumulación de los precursores o esteroides no naturales. En este artículo lo que se estudio fue la

alteración en cuanto a la composición lipídica y la actividad enzimática de las preparaciones purificadas de la membrana obtenida de los epimastigotes de *T. cruzi*, que crecieron en ausencia o presencia de dos tipos de SBI: el citocromo P450-dependiente de C-14 α dimetilasa inhibidor ketoconazol y dos esteroides 24-metiltransferasa (24(25)-SMT) inhibidores (Olliaro,1993).

Los dos tipos de SBI que son inhibidores de los siguientes esteroides: C-14 α dimetilasa y $\Delta^{24(25)}$ metil transferasa y se investigó la modificación de la composición lipídica y la actividad de las enzimas en el plasma de las membranas del parásito.

Los resultados sugieren que un efecto primario de la reducción de los esteroides endógenos inducido por SBI en *T. cruzi* es una modificación en la composición celular, en especial de los fosfolípidos, como consecuencia de una reducción en la actividad de PE-PE-N-metil transferasa y probablemente del acil Δ^9 y Δ^6 desaturasas. Los SBI empleados fueron 22,26-Azasterol (20-piperidin-2-il-5 α -pregnan-3 β -208R,S)-diol, 24,25-(R,S)-Epiminolanosterol y Ketoconazol (*cis*-1-acetil-4-[4-[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-il-metil)-1,3-dioxolan-4-il]metoxi]fenil]piperazina).

Hay una alteración en la composición de la membrana ya que se disminuye la actividad de la enzima PE-PC-N-metil transferasa.

Mevinolin (Lovastatin) potencia el efecto antiproliferativo del ketoconazol y terbinafina en contra de *T. cruzi*; estudios *in vivo* e *in vitro*.

En este estudio (Urbina,1993) se probó el efecto antiproliferativo del mevinolin (lovastatin) , que es un inhibidor de la enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A reductasa, en el parásito *T. cruzi* y además posee la habilidad de potenciar la acción de los inhibidores de la biosíntesis del ergosterol, tal como el ketoconazol y la terbinafina, ambos *in vitro* e *in vivo*.

Mevinolin por sí mismo no es un agente antiproliferativo efectivo contra la forma amastigote de *T. cruzi* *in vitro*, pero potencia fuertemente el efecto antiproliferativo del ketoconazol *in vitro*, resultando en un efecto sinérgico muy similar al observado en estudio previos con la combinación de ketoconazol y terbinafina en el mismo sistema.

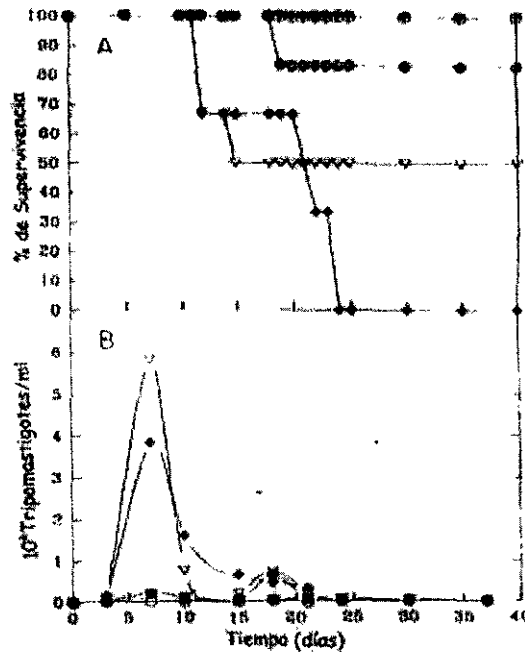
Mevinolin demostró en los experimentos *in vivo* per se tiene un efecto antiparasitario, a pesar de su limitada acción *in vitro*. La figura siguiente(Figura 10) indica la completa supresión de la infección por *T. cruzi* a niveles altos de ketoconazol o la combinación de niveles bajos de ketoconazol más mevinolin.

Lovastatin exhibió una actividad modesta contra la forma de epimastigote *in vitro*, pero cuando fue usado en combinación con ketoconazol o terbinafina, los cuales actúan en diferentes puntos de la biosíntesis de ergosteroles, se observó sinérgismo. La

actividad sinérgica de esta combinación, fue observada también en el modelo murino (Urbina,1993).

Figura 10:

Efectos de mevinolin y ketoconazol solo y en combinación en la supervivencia (A) o parasitemia (B) en ratones infectados con *T. cruzi* y tratados por 7 días. Los ratones fueron infectados con 10^5 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Y de *T. cruzi*; 24 h después, el tratamiento oral fue iniciado con los siguientes regímenes: ◆ controles (recibieron placebo); ○, ketoconazol a 30 mg/kg/día; ●, ketoconazol a 15 mg/kg/día; σ, mevinolin a 20 mg/kg/día; θ, mevinolin a 20mg/kg/día más ketoconazol a 15 mg/kg/día.



Tomado y adaptado de Urbina,1993.

Actividad del ketoconazol y otros azoles contra *Trypanosoma cruzi*: su acción bioquímica y quimioterapia *in vitro*

En este estudio (Goad,1989) se observó la biosíntesis del esterol y el crecimiento de las siguientes formas de *T. cruzi*: epimastigotes en un medio de cultivo y amastigotes y tripomastigotes en células de pulmón humanas cultivadas y que fueron expuestas al agente antimicótico ketoconazol. La propagación de epimastigotes y amastigotes fue debilitada a concentraciones de ketoconazol alcanzables en suero humano, y los amastigotes fueron tan sensitivos como los epimastigotes.

En epimastigotes y tripomastigotes (en un estado de no división) se observaron cambios en el contenido de esteroides de su membrana, ya que se observó una notable disminución de productos finales de esteroides (ergosterol, ergosta-5,7-dien-3 β -ol, 24-etilcolesta-5,7,22-trien-3 β -ol, 24-etilcolesta-5,7-dien-3 β -ol) y cantidades de precursores de 14 α -metil esterol de estos esteroides (24-metilendihidrolanosterol, obtusifoliol, lanosterol) fueron incrementadas.

Otros azoles como el itraconazol y fluconazol, cuando fueron probados en epimastigotes, evocaron el mismo patrón cualitativo de cambios en los esteroides libres. Itraconazol fue casi tan potente como el ketoconazol, pero fluconazol fue significativamente menos potente. La naturaleza de los esteroides encontrada en *T.*

cruzi y las acciones de los azoles en su biosíntesis fue similar en muchos aspectos que los observados en especies fungi y de *Leishmania*.

Por analogía, parece ser que el mecanismo primario de la acción de los azoles en *T. cruzi* en los estadios de su ciclo de vida es el deterioro de su esteroles citocromo P-450 14 α -dimetilasa. La consecuencia de la pérdida de esteroides normales y la acumulación de 14 α -metil esteroides podrían ser los responsables del retardo o cese del crecimiento.

El ketoconazol es un imidazol e itraconazol es un triazol, ambos son activos contra *Trypanosoma cruzi*.

En este estudio, el cultivo de epimastigotes y el cultivo de tejidos de tripomastigotes de *T. cruzi* exhibió cambios en la composición de esteroides libres relacionados con la presencia de azoles como se observa en la tabla 2.

En todos los casos temporales y asociaciones a la dosis han sido observados entre exposiciones de un fármaco azólico y cambios en el modelo de incorporación del mevalonato dentro de los esteroides y/o incremento en el tiempo de generación celular. Esto nos lleva a concluir que el primer mecanismo de acción de los azoles es la inhibición de la biosíntesis de los 24-alquil esteroides causados por el deterioro del citocromo P-450 dependiente, 14 α -dimetilación esteroles. Esta inhibición resulta en la

pérdida de esteroides normales 24-alquil y en la acumulación en masa de sus precursores 14 α -metilados.

El colesterol se encuentra en las siguientes formas de *T. cruzi*: en el cultivo de epimastigotes, en el cultivo de tejidos de tripomastigotes y tripomastigotes del torrente sanguíneo. Pero no se encuentra en epimastigotes cultivados en un medio definido. De estas observaciones se podría inferir que el *T. cruzi* probablemente no biosintetiza colesterol, pero lo obtiene del medio que lo rodea. El cultivo de *T. cruzi* y tripomastigotes encontrados en el torrente sanguíneo contienen más colesterol que el cultivo de epimastigotes.

La vía de biosíntesis de esteroides a partir de lanosterol en el cultivo de *T. cruzi* en la forma de epimastigotes y en el cultivo de tripomastigotes podría llevarnos al conocimiento de:

- 1) Estructuras de esteroides por sí mismas (Figura 11)
- 2) Las vías biosintéticas fúngicas de algunos de los mismos esteroides y de los mecanismos por los cuales las algas y plantas.
- 3) Cambios en la composición de esteroides en *T. cruzi* expuesto a fármacos pertenecientes a los azoles.
- 4) Las vías sugeridas para las especies de *Leishmania*.

En el caso de *T. cruzi* cepa Peru, el paso inicial en el metabolismo del lanosterol (Figura 11, A), podría ser la alquilación C-24 a la forma 24-metilenodihidrolanosterol

(B). 24-metilenodihidrolanosterol y lanosterol fueron encontrados en pequeñas cantidades en los epimastigotes normales y tripomastigotes, mientras que grandes cantidades de estos esteroides y pequeñas cantidades de obtusifoliol (C) fueron encontradas etapas tratadas con azoles. 4α y 14α -metil esteroides con una cadena lateral insaturada no fueron detectados. 4α -metilfecosterol(D) y fecosterol (E), no fueron identificados en *T. cruzi* pero son reconocidos como productos de la 14α y 4α -dimetilación del obtusifoliol en los organismos fúngicos. La isomerización de la doble ligadura en la posición 8 del fecosterol podría dar paso a la estructura episterol (F) y la desaturación en la posición 5 del episterol podría producir el 5- dihidroepisterol(G). La saturación secuencial de la doble ligadura C-24(28) del 5- dihidroepisterol y la desaturación en la posición C-22(23) del producto, nos lleva a ergosta-5,7-dien-3 β -ol (H) y el ergosterol (I).

Por lo que esta claro que el ketoconazol es capaz de eliminar los amastigotes de *T. cruzi* en un sistema de cultivo de tejidos. A concentraciones extremadamente bajas (5ng/ml), es efectivo causando cambios en la composición de esteroides de los tripomastigotes.

Tabla 2:
Efecto de los azoles en el crecimiento y biosíntesis de los
esteroles en el cultivo de epimastigotes.

ESTEROL IDENTIFICADO ^c	C	K ^a	I ^a	F ^b
Exógeno				
Colesterol	27	14	21	19
Endógenos, 14 α -dismetil				
Ergosterol	15	1	1	10
Ergosta-5,7-dien-3 β -ol	20	2	2	15
24-Etilcolesta-5,7,22-trien-3 β -ol	20	<1	3	20
24-Etilcolesta-5,7-dien-3 β -ol	12	1	1	10
24-Etilcolesta-5,7,24(28)-trien-3 β -ol	2	<1	1	1
Endógeno, 14 α -metil:				
24-Metilendihidrolanosterol	2	70	65	9
Obtusifoliol	<1	4	1	<1
Lanosterol	1	6	3	13
Trazas de otros esteroides	1	6	2	3
Crecimiento(%control)	100	25	26	86

C: Control

K^a: Ketoconazol 1 μ g/ml

I^a: Itraconazol 1 μ g/ml

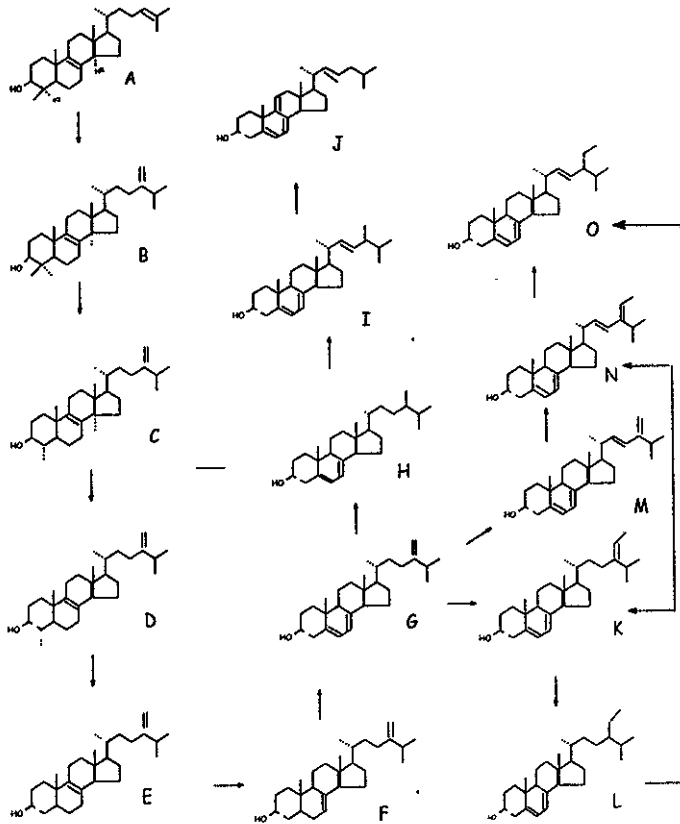
F^b: Fluconazol 10 μ g/ml

^d: Vea la figura 11.

Figura 11:

Vía de biosíntesis del esteroil de novo postulada para

T. cruzi: (A) lanosterol; (B) 24-metilendihidrolanosterol; (C) obtusifoliol; (D) 4 α -metilfecosterol; (E) fecosterol; (F) episterol; (G) 5-dehidroepisterol; (H) dihidroergosterol; (I) ergosterol, (j) 9(11)-dihidroergosterol; (K) 24-etilcolesta-5,7,24(28)-trien-3 β -ol; (L) 24-etilcolesta-5,7-dien-3 β -ol; (M) 24(28)-dihidroergosterol; (N) 24-etilcolesta-5,7,22,24(28)-tetraen-3 β -ol; (O) 24-etilcolesta-5,7,22-trien-3 β -ol



Quimioterapia experimental con una combinación de inhibidores de la biosíntesis del ergosterol en modelos murinos de la enfermedad de Chagas

ICI 195,739

En este estudio (Maldonado,1993) se reportó los efectos del ketoconazol y el bistriazol ICI 195,739 actuando sólo o en combinación con la alilamina terbinafina (Lamisil) en modelos murinos con la enfermedad de Chagas.

Se ha encontrado que los compuestos pertenecientes al grupo de los azoles, que comprenden derivados del imidazol y el triazol, siendo el ketoconazol el compuesto de referencia, que actúa a niveles de la dimetilación C-14 del lanosterol y de alilaminas fundamentalmente, naftinina y terbinafina (Lamisil), que bloquea la escualeno epoxidasa en los fungi. Los triponosomátidos, como en el *T.cruzi*, y diferentes especies de *Leishmania*, tienen requerimientos estrictos de ergosterol y 4-dimetol esteroides.

Estos autores encontraron que la actividad antiproliferativa *in vitro* del ketoconazol contra la forma de epimastigote y la forma intracelular de amastigote del parásito puede ser sustancialmente potenciada por la terbinafina, al punto que el uso de éste fármaco a una concentración de 1 nM dado en combinación puede prevenir completamente la infección de células de vertebrados cultivadas por el parásito o puede erradicar al parásito de células infectadas previamente.

Se ha encontrado que el compuesto ICI 195,739 (derivado del bistriazol), que es un potente agente antifungico que actúa en estas células a nivel de la dimetilación C-14 del lanosterol.

Los fármacos empleados fueron los siguientes:

- 1)Terbinafina (SF-86-327; Lamisil; (E)-N-(6,6-dimetil -2-hepten -4-in-il)-N-metil-1-naftalenemetanamina)
- 2)Ketoconazol (*cis*-1-Acetil-4-[4[[2-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-ilmetil)-1,3-dioxolan-4-il]metoxi]fenil]piperazina)
- 3)ICI 195,739 [(R,S)-2-(2,4-difluorofenil)-1,2,4-triazol-1-il]-propan-2-ol].

De los resultados que se obtuvieron, se observó que llevando el tratamiento de ketoconazol a una dosis de 15 mg/kg/día o terbinafina a 100 mg/kg/día no prolonga la supervivencia más allá que la observada en los controles.

En cambio, si a los animales infectados se les trata con una combinación de ketoconazol a 15 mg/kg/día más terbinafina a 100 mg/kg/día nuevamente, el 100% de los animales sobrevive después de 35 días de postinoculación y no se detecta una diferencia estadística importante entre este grupo y el tratado con una alta dosis de ketoconazol (30mg/kg/día).

Se demostró que el ketoconazol usado en combinación con terbinafina puede ser útil en el tratamiento en humanos que tienen la enfermedad de Chagas, porque puede

promover la cura parasitológica sin necesidad de usar niveles altos de azoles, que se sabe que interfieren con la función hepática y la síntesis de esteroides en el hospedero. Además, este trabajo confirma las conclusiones de estudios *in vitro* previos que sugieren que el triazol ICI 195,739 bloquea la proliferación de *T. cruzi* por un mecanismo que difiere del clásico que llevan a cabo los inhibidores de la biosíntesis del ergosterol. ICI 195,739 le confiere a los ratones infectados una protección contra la muerte a una concentración de 1 mg/kg/día en tratamientos cortos (de 5 a 15 días).

Este tratamiento se llevó a cabo en períodos cortos de tratamiento, por lo que se sugiere que se lleven a cabo tratamientos a largo plazo, ya que el empleo de potenciadores de azoles, tales como el mevinolin y la terbinafina, ayudarían a disminuir los riesgos de desórdenes en la función hepática que conlleva el tratamiento de los azoles.

D. COMPUESTOS CON ACCION ANTI-*T. cruzi* CON MECANISMOS NO ELUCIDADOS (Tabla 3).

1. Camptotecina:

La camptotecina es un agente quimioterapéutico que inhibe la topoisomerasa I de eucariotes pero no de procariotes.

Tabla 3:
Compuestos candidatos para ser usados en el tratamiento de la
Enfermedad de Chagas.

NOMBRE	FAMILIA
Camptotecina	
MK436	Nitroareno
D0870	Bis-triazol
Violeta de genciana	Colorante
Compuesto Q45, WR6026	Lepidina
	8-Aminoquinolinas
Tetraetiltiuram (TETD)	Disulfuro de tiuram
Dietilamina-N-carboditioato (DECD)	Carboditioato
MDL28302	Análogo de poliamina
MDL29431	Análogo de poliamina
Ajoeno	
Primaquina	

Camptotecina, obtenido de extractos alcohólicos del árbol *Camptotheca acuminata* es un agente antitumoral con una inusual estructura heterocíclica. Su estructura fue elucidada a mitad de la década del sesenta, y la primera síntesis total de 20(S)-camptotecina ópticamente activo fue reportada en 1975 (Corey,1975).

Camptotecina, cuyo nombre químico es (S)-4-Etil-4-hidroxi-1*H*-pirano-[3',4':6,7]indolizino[1,2-*b*]quinolina-3,14(4*H*,12*H*)-diona, su estructura se presenta en la figura 12.

Camptotecina es selectivamente tóxico para células malignas en cultivo, inhibe completamente el crecimiento de cáncer humano en ratones desnudos y supera la resistencia mediada por MDR1, propiedades que pesan mucho en su índice terapéutico.

En el estudio llevado a cabo por Bodley (1995) se empleó 20(S)-camptotecina lactona, epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *L. donovani*.

Se encontró que camptotecina es letal para *T. cruzi* y *L. donovani* con valores de EC₅₀ DE 1.5 Y 3.2 μ M, respectivamente. Estos parásitos fueron completamente eliminados a altas concentraciones de camptotecina. Camptotecina es citotóxico para *T. cruzi* a un valor de EC₅₀ DE 1.6 μ M (Bodley,1995)

Se encontró que camptotecina promueve la formación de aductos nucleares de DNA-proteínas en tripanosomas y leishmania, esto nos proporciona evidencia de que estos parásitos hemoflagelados son sensibles a camptotecina en la actividad de la topoisomerasa I.

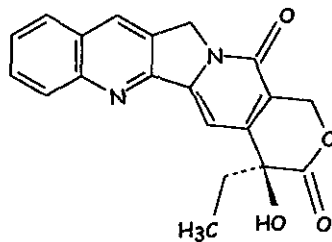
Pero se especifica que no están completamente seguros de que en los tripanosomas el blanco de camptotecina sea la topoisomerasa I. Pero lo que es un hecho, es que la

topoisomerasa I es un blanco perfecto para la quimioterapia antiprotozoaria (Bodley,1995).

En ensayos clínicos, su principal toxicidad es cuando se administra oralmente a dosis arriba de 8.7 mg/m², dado diariamente por muchos meses ocasiona diarrea.

Figura 12:

Estructura química del Camptotecina.



Camptotecina

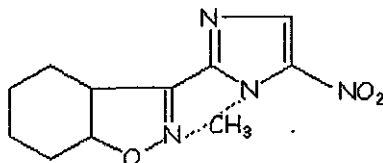
2. Compuesto MK436: Nitroareno

La actividad carcinogénica de varios derivados de agentes tripanocidas, tales como 2-nitroimidazoles, 5- nitroimidazoles y 5-nitrofuranos fue comprobada en ratones de la misma edad en un grupo. El uso indiscriminado de nitroarenos en el tratamiento de infecciones por *T. cruzi* en humanos puede inducir un número significativo de linfomas.

En el artículo escrito por Teixeira, 1994; afirma que el nitroareno MK-436 (3-[1-metil-5-nitroimidazol-2-il]-3d,4,5,6,7d-hexahidro-1,1- benzisoxalina) ha sido usado en el

tratamiento de la enfermedad de Chagas. La estructura química del MK-436 se muestra en la figura 13.

Figura 13:
Estructura química del MK-436



MK-436

En este estudio los tres fármacos (benznidazol, nifurtimox y MK-436) fueron inyectados por vía intraperitoneal a dosis recomendadas en humanos en el tratamiento de la enfermedad de Chagas y a dosis experimentales en animales. Benznidazol y nifurtimox fueron empleados a dosis de 8 $\mu\text{g/g}$ y MK-436 a una dosis de 80 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal. Estos nitroarenos fueron administrados diariamente por 60 días en el grupo A, por 30 días en el grupo B y 15 días en el grupo C. Los controles para cada grupo experimental consistió en 30 ratones, que recibieron diariamente inyección intraperitoneal de 0.1 ml de 0.15 M de solución salina.

Del grupo A, ocho ratones mostraron linfoma linfoblástico en los nódulos linfáticos cuando se les administró MK-436, 12 inyectados con nifurtimox desarrollaron linfomas y en el caso de benznidazol hubo 14 casos de linfomas.

Del grupo B, 7 casos de linfomas cuando se les administró nifurtimox, 9 casos con benznidazol y 6 para MK-436.

Del grupo C, no hubo una diferencia estadística entre los animales control y los de prueba.

El empleo de nitroarenos conlleva a diversos efectos colaterales, además de que son agentes inmunosupresores.

Se observa que el benznidazol se asocia a una mayor incidencia de linfomas.

3. D0870 : Bis-triazol

Se han llevado a cabo ensayos clínicos (Croft,1997) con el fármaco *alopurinol* (pirazolopirimidina), un fármaco que interfiere en la síntesis de ácidos nucleicos , y con antifúngicos, como el *ketoconazol* y el *itraconazol*, inhibidores de la biosíntesis del esterol. Estos fármacos son capaces de suprimir pero no eliminar la infección (Brener,1993).

Científicos de Venezuela, que trabajan en cooperación con investigadores ingleses y franceses, (McCarthy,1996) han reportado que lograron la cura de ratones infectados con *T. cruzi* usando un compuesto antifúngico D0870 (bis-triazol) . Este compuesto se emplea en pruebas clínicas para el tratamiento de infecciones micóticas en pacientes con SIDA. Los tratamientos en curso pueden reducir la duración de los síntomas de la fase aguda y prolongar la vida pero no pueden erradicar al parásito una vez establecido.

D0870 fue capaz de prevenir la muerte e inducir cura en un 70-90% de los animales que se utilizaron en la prueba. Este compuesto tiene dos mecanismos de acción. Tiene una alta actividad y es inhibidor específico para el esteroil C14 α -demetilasa, una enzima crucial en la habilidad del parásito para la síntesis de esteroides esenciales. Además, el compuesto bloquea el ciclo de la célula, de tal manera que se inhibe la división celular.

4. Violeta de Genciana (colorante):

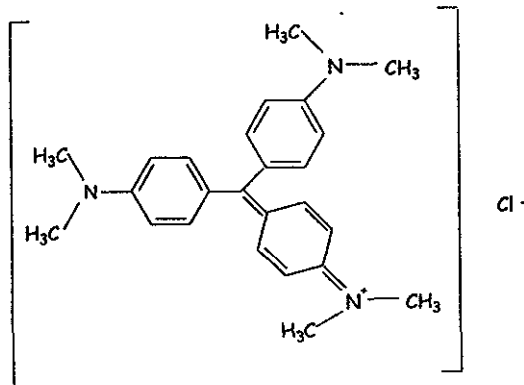
La transmisión de *T. cruzi* por medio de la transfusión sanguínea es un grave problema en las áreas urbanas, es potencialmente un método efectivo de transmisión, ya que los tripomastigotes pueden sobrevivir hasta dos semanas, algunos autores

sugieren tres meses, en sangre citrada en el refrigerador. La eficacia de este modo de transmisión ha sido comprobada en un estudio boliviano, en donde el 47% de los receptores de la sangre seropositivo llega a ser parasitémico después de la transfusión (Zuna,1985).

La transmisión de *T. cruzi* por medio de transfusión sanguínea ha adquirido una gran relevancia en países cuya población esta libre de la infección, pero están recibiendo inmigrantes de áreas en donde la enfermedad es endémica.

En la figura 14 se muestra la estructura química del violeta de genciana (N-[4-[Bis[4-(dimetilamino)-fenil]metileno]-2,5-ciclohexadien-1-iliden]-N-metil-metanaminium cloruro).

Figura 14:
Estructura química de violeta de genciana.



Violeta de Genciana

El violeta genciana (gentian violet), una tintura de fenilmetano, fue introducido en 1952, ya que se demostró que es activo contra tripomastigotes presentes en la sangre destinada para transfusión. A una concentración de 0.6mmol/litro elimina todos los parásitos después de 24h de incubación a 4°C (Souza,1989), permanece en uso en los bancos de sangre de América del Sur. A pesar de su efectividad, hay algunas restricciones en su uso. Este compuesto le da a la sangre un color púrpura, además de que podría manchar la piel y mucosas del paciente. Se ha comprobado que este compuesto tiene un efecto carcinogénico que ha sido descrito en roedores, pero no ha sido probado en humanos. La formación de microaglutinación y rouleaux de eritrocitos se ha observado.

5. Compuesto Q45: WR6026

Compuesto sintetizado por el Walter Reed Army Institute of Research

En un estudio (Chiari,1996), se reportaron los resultados obtenidos con grupos de quinonas, quinolina (compuestos sintéticos) y derivados de artemisinina (semisintético).

Los compuestos usados en este estudio se enlistan en la tabla 4 y algunas estructuras químicas se muestran en la figura 15:

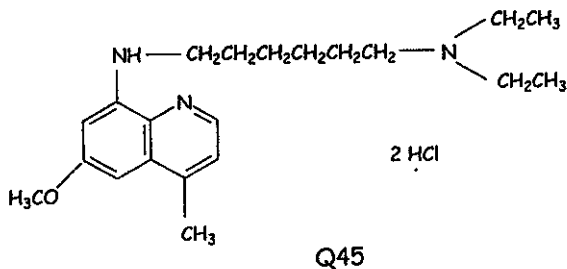
Tabla 4:

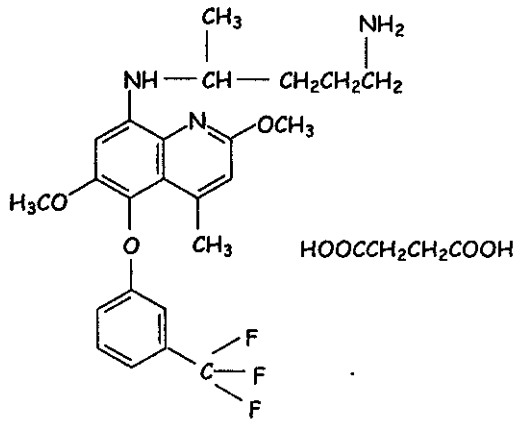
Compuestos sintetizados por el Walter Reed Army Institute of Research

COMPUESTO	NOMBRE QUÍMICO	PM
Q80	2-[trans-4-(4-Clorofenil)ciclohexil]-3-hidroxi-1,4-naftoquinona	366.8
Q52	8-[(4-Amino-1-metilbutil)amino]-2,6-dimetoxi-4-metil-5-(3-trifluorometilfenoxi) succinato de quinolina	581.5
Q45	6-Metoxi-8-(dietilaminohexilamino) diclorhidrato de lepidina (WR6026)	416.4
Q86	8-[(4-Amino-1-metilbutil)amino]1-5-(1-hexiloxi)-6-metoxi 4-lepidina DL-tartarato de metilquinolina	523.6
Q16	β -Arteether	312.4
Q66	Artelinato de sodio	452.4
Q67	β -Artemether	298.3

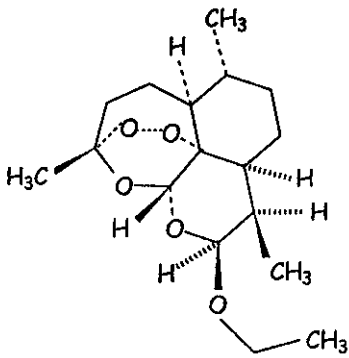
Figura 15:

Estructuras químicas de los compuestos sintetizados por el Walter Reed Army Institute of Research

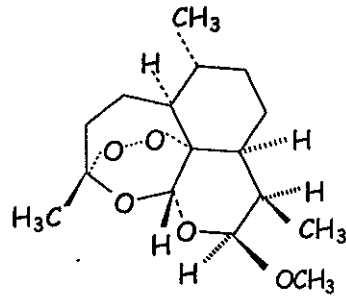




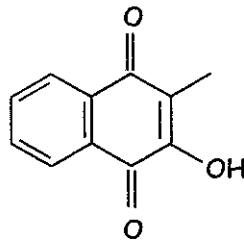
Q52



Arteether



Artemether



Q80

Para medir su actividad contra tripomastigotes sanguíneos se emplearon las cepas Y, CL, y B229 de *T. cruzi*, usando dos o más diluciones de cada compuesto.

Se observó que el compuesto Q45 a una concentración de 65 µg/ml eliminó tripomastigotes de cada cepa de sangre contaminada. Esto fue demostrado, ya que hubo ausencia de parásitos después de incubar la sangre con el compuesto Q45 durante 24 h a 4°C y por la ausencia de tripomastigotes circulantes en ratones inyectados con sangre contaminada y tratada. Esta ausencia de parásitos fue confirmada por microscopía y hemocultivos.

WR6026 (Q45) fue efectivo en el tratamiento de leishmaniosis visceral en 16 pacientes a una dosis de 0.75 a 1.00 mg/kg/día. La terapia fue asociada con toxicidad mínima; se observaron efectos adversos.

Anteriormente WR6026 había mostrado ser inactivo contra la infección provocada por *T. cruzi* en ratones. Pero este artículo confirmó, que la inactividad se presenta cuando los ratones son inoculados con la cepa Y de *T. cruzi* y tratados con el compuesto WR6026 durante 20 días desarrollándose niveles de parasitemia y mortalidad similares a los ratones sin tratamiento.

WR6026 mostró actividad contra los tripomastigotes de *T. cruzi* en sangre después de 2 h de incubación a 37°C, pero no fue activo a 25°C.

Concluyen este artículo mencionando que el uso de la lepidina (compuesto Q45) muestra algunas ventajas sobre el compuesto violeta genciana. Q45 no cambia el color

de la sangre que se va a emplear para la transfusión y no mancha las mucosas. Es tolerado por los humanos, efectos adversos no se han detectado en los voluntarios humanos. Q45 es efectivo a concentraciones similares a las que el violeta genciana es efectivo y no se observan efectos adversos sobre los eritrocitos. Por lo que ellos proponen más estudios para evaluar su uso potencial como agente quimioproláctico para la prevención de la transmisión de *T. cruzi* por medio de la transfusión sanguínea.

6. 8-Aminoquinolinas

Otros investigadores sugieren que las 8-aminoquinolinas son potencialmente fármacos efectivos contra la enfermedad de Chagas (Kinnamon,1997).

Miembros de la clase química de las 8- aminoquinolinas, siendo estos análogos de la primaquina, tienen actividad antichagásica.

En este estudio, las non-primaquinas 8-aminoquinolinas (por ejemplo aquellas que no tienen el 4-amino-1-metilbutilamino agrupados en la posición 8).

Se investigó la actividad de cuarenta compuestos, siendo once de ellos (27.5%) efectivos en la reducción de la parasitemia (Tabla 5 y Figura 16).

Miembros del grupo de las 8-aminoquinolinas son compuestos que están bien equipados para combatir las infecciones de *T. cruzi*.

Figura 16:

8-aminoquinolinas que tienen actividad contra *T. cruzi* (infecciones en ratones).

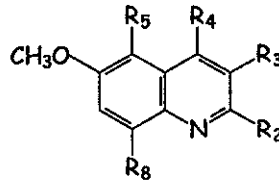


Tabla 5:

8-aminoquinolinas que tienen actividad contra *T. cruzi* (infecciones en ratones)

COMPUESTO	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₈	MR
1	H	H	H	H	NH(CH ₂) ₂ NH ₂	NH(CH ₂) ₂ NH ₂	2975
2	H	H	CH ₃	H	NH(CH ₂) ₂ NHCH ₂ CH ₃	NH(CH ₂) ₂ NHCH ₂ CH ₃	6027
3	H	H	CH ₃	H	NH(CH ₂) ₂ NHCH ₂ CH ₃	NH(CH ₂) ₂ NHCH ₂ CH ₃	211 815
4	H	H	H	OCH ₃	NH(CH ₂) ₂ NH ₂	NH(CH ₂) ₂ NH ₂	212 232
5	H	H	CH ₃	H	NH(CH ₂) ₂ NHCH ₂ CH ₃	NH(CH ₂) ₂ NHCH ₂ CH ₃	215 296
6	OH	H	H	H	NH(CH ₂) ₂ NHCH ₂ CH ₃	NH(CH ₂) ₂ NHCH ₂ CH ₃	217 038
7	H	H	H	OCH ₃	NH(CH ₂) ₂ NHCH ₂ CH ₃	NH(CH ₂) ₂ NHCH ₂ CH ₃	226 937
8	CH ₃	CH ₃	H		NH(CH ₂) ₂ NHCH ₂ CH ₃	NH(CH ₂) ₂ NHCH ₂ CH ₃	229 238
9	H	CH ₃	H	H	NH(CH ₂) ₂ NHCH ₂ CH ₃	NH(CH ₂) ₂ NHCH ₂ CH ₃	233 821
10	OCH ₃	H	CH ₃	OCH ₃	NH(CH ₂) ₂ NHCH ₂ CH ₃	NH(CH ₂) ₂ NHCH ₂ CH ₃	252 123
11	H	H	CH ₃	OCH ₃	NH(CH ₂) ₂ NHCH ₂ CH ₃	NH(CH ₂) ₂ NHCH ₂ CH ₃	254 238

Además, previamente, las 8-aminoquinolinas fueron consideradas como eficientes sólo contra los estados extracelulares de los parásitos (Kierszenbaum, 1984), pero estudios más recientes indican que las 8-aminoquinolinas (primaquina), es también muy efectivo contra las formas intracelulares (McCabe, 1988). Este efecto es a niveles fácilmente alcanzables cuando el fármaco experimenta una distribución en varios tejidos (Clark, 1984). Incluso, las 8-aminoquinolinas a dosis terapéuticas aparentemente no tiene problemas de toxicidad como otros fármacos antichagásicos. El compuesto 8 fue trece veces más activo que el estándar (nifurtimox) y tres veces más efectivo que la primaquina, un fármaco conocido por su actividad.

Respecto a su modo de acción, quizá se debe a su unión al DNA, como se observa en los parásitos que ocasionan la malaria. Por lo que los autores recomiendan la evaluación de los compuestos más activos de esta serie de compuestos, con especial énfasis en los índices terapéuticos.

7. Actividad tripanocida *in vitro* de TETD Y DECD en *Trypanosoma cruzi*.

En estudios preliminares se encontró que el Disulfuro de tetraetiltiuram (TETD) y Dietilamina-N-carboditioato de sodio (DECD) son efectivos contra los epimastigotes

de *T. cruzi in vitro*. En la figura 17 se muestran las estructuras químicas de BNZ, TETD y DECD.

El compuesto TETD se encuentra disponible (Lane), ya que se ha usado en el tratamiento del alcoholismo, la farmacología de este compuesto es bien conocida. La reducción metabólica de TEDC a DECD resulta en múltiples mecanismos para la inhibición del parásito. TETD se sabe que interfiere con dos enzimas: aldehído deshidrogenasa y treonina deshidrogenasa. Incluso puede interaccionar con la enzima superóxido dismutasa y/o con el sistema citocromo P-450 de *T. cruzi*.

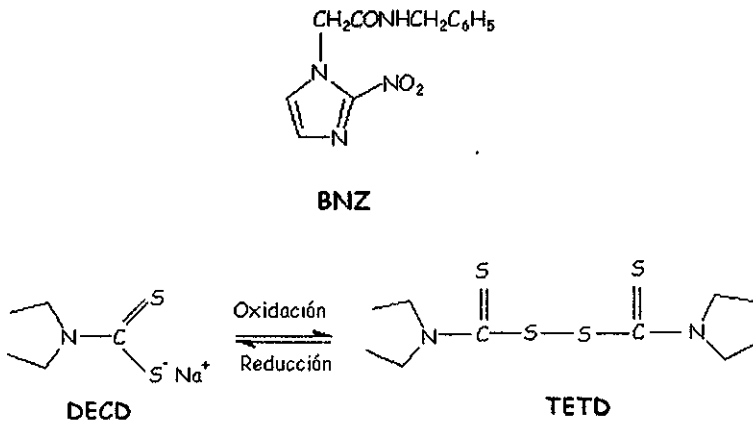
En este estudio se usaron los dos compuestos mencionados y como control positivo se empleó en benznidazol (BNZ). Las pruebas de inhibición incluyeron la evaluación contra las formas siguientes de *T. cruzi*: epimastigote, tripomastigote y amastigote.

Los epimastigotes se emplearon de la cepa Y de *T. cruzi*, los tripomastigotes se obtuvieron de cultivos de tejidos de los fibroblastos de la cepa 3T3 de los murinos infectados con tripomastigotes metacíclicos y células viables fueron infectadas con células del cultivo de tripomastigotes para obtener amastigotes intracelulares.

Las concentraciones empleados fueron 5,10,50 y 100 µg/ml.

TETD y DECD demostraron su actividad contra las tres formas de *T. cruzi in vitro*. Ambos compuestos inhibieron consistentemente a los epimastigotes. En cuanto a la forma de tripomastigote, BNZ fue más efectivo y a la forma amastigote DECD demostró la mayor actividad.

Figura 17:
BNZ, TETD Y DECD



De los carboditioatos estudiados el más activo fue DECD, sólo que no es muy efectivo contra la forma de amastigote. Los carboditioatos y los disulfuro de tiuram son metabólicamente intercambiables por una reacción redox *in vivo*. Ambos TETD y DECD están clínicamente disponibles, además de que se cuenta con información farmacológica. TETD se emplea en el caso de alcoholismo severo y DECD es un

inmunomodulador efectivo en humanos y además inhibe la superóxido dismutasa en ratones.

Un posible mecanismo de acción de TETD y DECD es via interferencia del metal esencial en el metabolismo de *T. cruzi*. En cuanto a la toxicidad, sólo en pocos casos se han reportado reacciones adversas, tales como dermatitis, hepatitis y polineuritis. En cambio, BNZ ha sido asociada con efectos severos, tales como dermatitis generalizada, fiebre y linfadenopatía, desórdenes en el sistema nervioso central e intolerancia al fármaco.

Por lo que ambos compuestos son fuertes candidatos para posteriores estudios para determinar si pueden ser utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

8. Análogos de la poliamina

La falta de fármacos consistentemente efectivos y no tóxicos en el tratamiento de la tripanosomosis ha llevado a una intensa búsqueda, la cual ha llevado a diversos investigadores el estudio de la bioquímica de la penetración de las células del hospedero por parte de *T. cruzi* y la replicación intracelular de éste, ya que ambos acontecimientos son muy importantes para el establecimiento y diseminación del parásito en los hospederos vertebrados.

En el siguiente estudio (Majumder,1993) los investigadores se interesaron en el papel que las poliaminas y la biosíntesis de éstas juegan en éstas dos funciones del parásito por dos principales razones: por una parte, estudios previos han mostrado que tanto la infectividad y la replicación de *T. cruzi* se debilitan cuando la producción de agmatina y putrescina se reduce por la presencia de un inhibidor específico de arginina descarboxilasa, el DL- α -difluorometilarginina. Por el otro lado, en la regulación del crecimiento celular en células de mamíferos así como en varias especies de parásitos.

Tetraaminas N,N'-di-sustituidas cuya fórmula general es $RNH(CH_2)_xNH(CH_2)_yNH(CH_2)_xNHR$ han demostrado que inhiben el crecimiento de muchos protozoarios parásitos, como por ejemplo *Leishmania donovani*. En el estudio se utilizaron dos análogos de poliaminas N,N'-tiofeno-sustituidas, para explorar sus efectos en la infectividad y replicación de *T. cruzi*. Se demostró que dos análogos de poliamina N,N'-tiofeno-sustituidas inhiben la penetración de *T. cruzi*, así como su replicación, dentro de las células del hospedero mamífero.

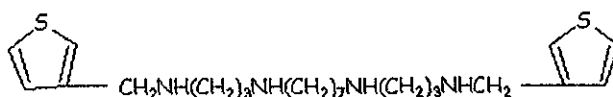
Los compuestos empleados fueron los análogos de la poliamina, N,N'-di-sustituidas, MDL 28302 y MDL 29431, cuya estructura se muestra en la figura 18. Ambos compuestos inhibieron la infectividad a un tiempo y concentración de manera dependiente, esta inhibición fue selectiva en el parásito, ya que la infectividad del parásito se recuperó gradualmente cuando el análogo de la poliamina se retiró del

medio, por lo que se comprobó que el efecto inhibitorio es reversible. En parásitos tratados con el fármaco MDL 72527, que es un inhibidor específico de la poliamino oxidasa (PAO), se observó que el parásito conservó su capacidad de infectividad. Esta observación sugiere que la conversión de los análogos de la poliamina N,N'-tiofenosustituidas a análogos libres de la poliamina es un requerimiento importante para su actividad inhibitoria.

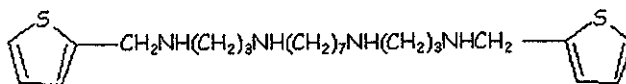
Dado que la localización citoplasmática de *T. cruzi* para su replicación en las células del hospedero es indispensable, la habilidad de MDL 28302 y MDL 29431 para inhibir el crecimiento intracelular del parásito es una esperanza en la búsqueda de nuevos fármacos para combatir esta enfermedad.

Figura 18:

MDL28302 y MDL29431



MDL 28302



MDL 29431

9. Ajoeno (antiplaquetario)

Ajoeno, cuyo nombre químico es 2-Propenil 3-(2-propenilsulfenil)-1-propenil disulfuro, es un potente antiplaquetario; es un compuesto aislado del ajo (*Allium sativum L.*, *Liliaceae*), es enzimáticamente derivado del alliin, una cisteína derivada de los bulbos del ajo, su estructura se muestra en la siguiente figura 19.

Compuestos derivados del ajo, entre ellos el ajoeno, han demostrado su actividad antifúngica y antibacteriana tanto *in vitro* como *in vivo*.

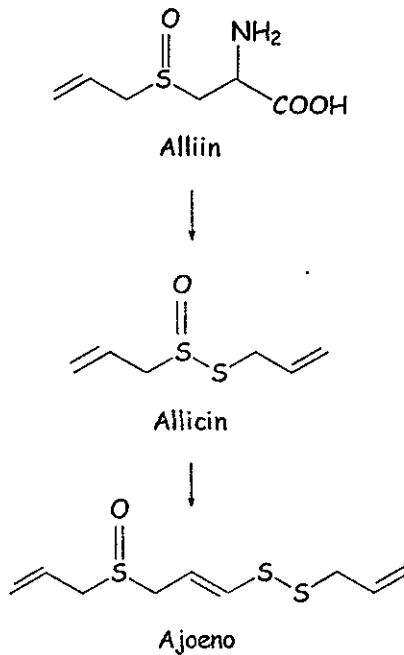
En el siguiente estudio (Urbina,1993) se muestra que el ajoeno sintético es un potente agente antiproliferativo contra dos formas de *T. cruzi*: epimastigotes y amastigotes. El efecto antiproliferativo del compuesto se explica claramente por su efecto específico en la biosíntesis de la principal fracción de fosfolípidos de la célula, fosfatidilcolina.

El crecimiento de la forma de epimastigote fue inmediatamente interrumpida a una concentración del ajoeno de 80 μM , mientras que a una concentración de 100 μM se inducía la lisis de las células en 24 h. En la forma de amastigotes, que proliferaban dentro de las células VERO, la concentración de ajoeno de 40 μM fue suficiente para erradicar al parásito de las células del hospedero en 96 h. La inhibición en el crecimiento de los epimastigotes fue acompañada por una alteración de la composición fosfolípida de células tratadas, en donde la fosfatidilcolina(PC), disminuyó en relación

con células tratadas con una concentración de ajoeno de 60 μ M por 96 h. Mientras que su inmediato precursor, fosfatidiletanolamina (PE) , llegó a ser la especie predominante. Estos resultados sugieren que existe un factor importante asociado con el efecto antiproliferativo del ajoeno en contra de *T. cruzi* es la alteración específica en la composición de éstas células.

Figura 19:

Estructura química del ajoeno

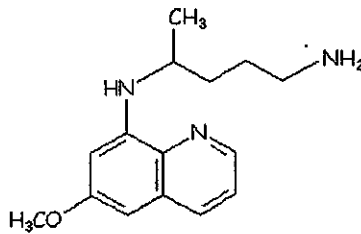


10. Primaquina

La primaquina ha sido usada en el tratamiento de la enfermedad de Chagas y se ha reportado que es activa contra la forma extracelular de *T. cruzi*.

La estructura química de la primaquina se muestra en la figura 20.

Figura 20:
Estructura química de la primaquina.



Primaquina

La primaquina ha sido usado extensamente en el tratamiento de la malaria; administrada oralmente a ratones a una dosis de 0.25 mg/día suprime la infección aguda con la cepa Tulahuen de *T. cruzi*. La primaquina ha sido usada en el tratamiento de humanos que han adquirido la enfermedad en el laboratorio o por vía congénita.

La primaquina a una dosis de 0.5µg/ml inhibe significativamente la replicación de *T. cruzi* en ratones infectados de macrófagos peritoneales. Para evaluar la actividad de la

primaquina en organismos extracelulares, el cultivo de tejidos de *T. cruzi* fue incubado con primaquina a diferentes períodos de tiempo y después fueron usados para infectar macrófagos. La incubación con 10 µg/ml a 14 h inhibió pero no erradicó la replicación.

La combinación de primaquina con ketoconazol administrada a ratones infectados en la fase aguda disminuye significativamente las parasitemias en comparación con el tratamiento con primaquina o ketoconazol solos. La primaquina actúa en la forma intracelular de *T. cruzi* más que en la extracelular (la primaquina disminuye la infectividad extracelular de *T. cruzi* a macrófagos sólo a concentraciones relativamente altas y después de períodos relativamente largos) en cambio el ketoconazol es activo primeramente contra la forma intracelular de *T. cruzi*.

CAPÍTULO III. FÁRMACOS EMPLEADOS EN LA QUIMIOTERAPIA DE LEISHMANIOSIS

A. PENTAMIDINA

Historia:

La identificación de la actividad antiprotozoica de la familia diamidina de medicamentos fue una consecuencia fortuita de la búsqueda de compuestos que produjeran hipoglucemia. De los fármacos estudiados, se advirtió que tres poseían notablemente actividad: estilbamidina, pentamidina y promamidina. La pentamidina posee la mayor eficacia clínica por su estabilidad relativa, menor toxicidad y facilidad de administración. Es eficaz en clínica contra diversos protozoos patógenos, pero la pentamidina en la actualidad se utiliza más bien para la profilaxia y terapéutica de neumocistosis. Se le sigue combinando con suramina, para combatir la tripanosomosis africana occidental en sus etapas tempranas. El diminaceno (Berenil) es una diamina similar que se emplea como alternativa barata de la pentamidina para tratar la tripanosomosis africana en algunas áreas endémicas, a pesar de que se ha comprobado solamente para uso en veterinaria. En un modelo de rata infectada por *P. carinii*, se han probado diversos análogos prometedores de la pentamidina pero ninguno de ellos ha sido sometido a prueba en seres humanos (Tracy,1996).

infecciones por *Leishmania donovani* en cricetos. Los datos anteriores constituyen la base para utilizar las diamidinas en la tripanosomosis africana y en la leishmaniosis en seres humanos (Tracy, 1996).

Las diamidinas también son fungicidas y ello se demuestra fácilmente *in vitro* contra *Blastomyces dermatitidis*, lo cual ha sido el punto de partida de estudios terapéuticos adecuados del fármaco en la blastomicosis sistémica. Sin embargo, el empleo de la anfotericina B ha aminorado la eficacia de las diamidinas para tratar la enfermedad mencionada. La pentamidina a concentraciones terapéuticas aproximadas posee un efecto letal directo en las formas de *P. carinii* no replicantes en cultivo. Sin embargo, datos de otros experimentos sugieren que ésta sustancia ejerce un efecto biostático y no biocida (Tracy, 1996).

Mecanismo de acción y resistencia:

Se desconoce el mecanismo de acción de las diamidinas; estos compuestos dicatiónicos pueden tener múltiples efectos en un parásito particular y actuar por mecanismos diferentes en otros parásitos. Por ejemplo: en *T. brucei* las diamidinas son centradas por medio de un sistema de captación de gran afinidad, que depende de energía, y que interviene con mayor eficacia en cepas farmacosenesibles que en las farmacoresistentes. Las diamidinas probablemente utilizan un transportador que es selectivo para adenina y adenosina, purinas que deben ser importadas para asegurar la supervivencia del parásito. Los productos arsenicales basados en melamina utilizan el

mismo transportador de purina, lo cual explica la resistencia cruzada a las diamidinas que muestran algunas cepas de *T. brucei* resistentes a diversos arsenicales. Otra opción posible de las diamidinas es interferir en la biosíntesis de poliamina en tripanosomas por bloqueo reversible de la S-adenosil-L-metionina descarboxilasa. El DNA puede servir como el objetivo mayor de estos compuestos con carga positiva. Las diaminas se unen a DNA en secuencias compuestas de cuatro pares de bases A-T consecutivas (como mínimo). La pentamidina estimula la linealización del DNA del kinetoplasto del tripanosoma. Lo cual es congruente con su acción como inhibidor de la topoisomerasa del tipo II. El compuesto también bloquea a las topoisomerasas que dependen de ATP en extractos de *P. carinii*, pero no se sabe el mecanismo por el cual disminuye el metabolismo de glucosa en *P. carinii* en reposo (Tracy, 1996).

Absorción, destino y eliminación:

El isetionato de pentamidina se absorbe bastante bien en los sitios parenterales de administración. Después de una dosis intravenosa en enfermos de SIDA, el producto desaparece plasma con una vida media aparente de unas 6 h. No obstante, la pentamidina es eliminada con lentitud mucho mayor en la orina en la forma del fármaco original; su excreción por riñones explica solamente 2% en promedio, de su eliminación desde el plasma. En personas que reciben inyecciones múltiples del medicamento, en un período de trece días para combatir la neumocistosis, se acumuló el compuesto y no se alcanzaron concentraciones plasmáticas en estado estable. La vida media terminal fue

de unos doce días, y en casi todos los pacientes se detectó todavía pentamidina después de seis semanas. La acumulación extensa del medicamento en tejidos y su excreción lenta durante la administración repetida tal vez explique sus propiedades terapéuticas y su eficacia profiláctica en la tripanosomosis africana y en la neumocistosis. Después de dosis parenterales múltiples, se advierten las máximas concentraciones del fármaco en hígado, riñones, glándulas suprarrenales y bazo de sujetos con SIDA, en tanto que en encéfalo solo se advierten cantidades pequeñas. Los pulmones de los pacientes mencionados contienen concentraciones intermedias, pero terapéuticas, después de cinco dosis diarias de base de cuatro miligramos por kilogramo de peso. Las cifras pulmonares mayores han de lograrse por medio de inhalación de aerosoles de pentamidina para profilaxia o como tratamiento coadyuvante de la neumonía leve o moderada de *P. carinii*; la aplicación del compuesto por dicha vía ocasiona poca absorción a nivel general y menor toxicidad en comparación con la administración intravenosa en adultos y niños. La dosis real que llega a los pulmones depende del diámetro de las partículas generadas por el nebulizador y de los patrones de ventilación del enfermo (Tracy, 1996).

Aplicaciones terapéuticas:

El isetonato de pentamidina suele ser aplicado en inyección intramuscular o en goteo intravenoso lento, en un lapso de 60 minutos, a dosis diarias únicas de la base de

4 mg/kg de peso. Sin embargo, los regímenes posológicos varían con la enfermedad y en algunos casos no se les ha definido con exactitud.

En la terapéutica de la fase linfática temprana de tripanosomosis africana por *T. brucei gambiense*, la pentamidina puede aplicarse por vía intramuscular en los días 1, 3, 5, 7, 13 y 17, en tanto se administra por vía intravenosa suramina (20 mg/kg de peso hasta llegar a un máximo de 1g) los días 1 y 13. Otro régimen sería aplicar siete dosis intramusculares de pentamidina sola, en días alternos. Dado que la pentamidina no penetra en el sistema nervioso central, esta no es utilizada para combatir *T. b. rhodesiense* que afecta al encéfalo desde los comienzos de la infección. Una vez trastornado el sistema nervioso central, el fármaco también es ineficaz contra infecciones por *T. b. gambiense* (Tracy, 1996).

En el tratamiento de la leishmaniosis visceral (causada por *L. donovani*), la pentamidina se ha usado con buenos resultados en un ciclo de 12 a 15 inyecciones intramusculares (2 a 4 mg/kg de peso). A veces se necesita un segundo ciclo que se inicie después de transcurrido un intervalo de una a dos semanas en áreas donde la infección no reacciona tan satisfactoriamente al tratamiento. La pentamidina es particularmente útil donde no ha habido mejoría con los antimoniales. Se han obtenido algunos buenos resultados con el empleo de pentamidina en el tratamiento de

leishmaniosis cutánea (causada por *L. tropica*), pero no se le emplea sistemáticamente contra dicho trastorno.

La pentamidina es parte de un grupo de fármacos y combinaciones medicamentosas utilizadas ampliamente en la profilaxia y tratamiento de neumonía leve o moderada por *P. carinii*, que es la infección más común por microorganismos oportunistas en personas infectadas por virus de inmunodeficiencia humana (Tracy, 1996).

Toxicidad y efectos adversos:

A dosis terapéuticas (4 mg/kg de peso al día), la pentamidina causa toxicidad en 50% de los pacientes tratados, tengan SIDA o no. Después de la inyección intravenosa del fármaco y de otras diamidinas, pueden surgir reacciones peligrosas y a veces alarmantes; estas incluyen falta de aire, taquicardia, mareos o síncope, cefaleas y vómito. El cuadro anterior quizá depende de la disminución repentina de la presión arterial que ocurre después de la administración intravenosa demasiado rápido del producto y tal vez sea causada en parte por la liberación de histamina. Si no se puede administrar lentamente por vía intravenosa las soluciones, el medicamento es tolerado adecuadamente por inyección intramuscular. Esta última vía se acompaña de la formación de abscesos estériles en el sitio de aplicación. Al parecer no causa neuropatías tardías. Después de aplicar este fármaco se ha corroborado la aparición de pancreatitis e hipoglucemia y, como aspecto paradójico, hiperglucemia y diabetes

insulinodependiente; la hipoglucemia puede amenazar la vida o incluso ser mortal si no se le identifica. Otros efectos adversos incluyen erupciones cutáneas, tromboflebitis, trombocitopenia, anemia, neutropenia, aumento de las enzimas hepáticas y nefrotoxicidad. En 24 % de sujetos que reciben el compuesto, se advierte disminución de la función renal pero suele ser reversible. Este fenómeno tóxico tal vez dependa del bloqueo potente de la dihidrofolato reductasa de los riñones por acción del medicamento y constituye un problema notable en personas infectadas por VIH y que además tienen neumocistosis (Tracy, 1996).

B. ESTIBOGLUCONATO DE SODIO

Historia:

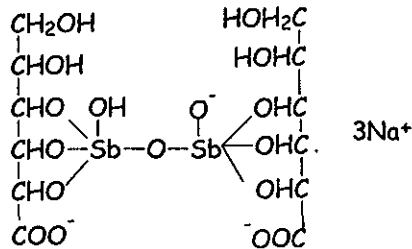
Desde mucho se han usado los antimoniales para combatir la leishmaniosis y otras infecciones por protozoos. El tartrato antimónico-potásico (tártato emético) fue el primer antimonial trivalente utilizado para tratar la leishmaniosis cutánea y el kala-azar, pero era tóxico y difícil de administrar. Al final, el tártaro y otros arsenicales prevalentes fueron sustituidos por antimoniales pentavalentes derivados del ácido fenilestibónico. Dichos productos tenían la misma eficacia, pero eran menos tóxicos que el tártaro emético y ello permitió emplear dosis más grandes y períodos más breves de tratamiento. La síntesis ulterior hizo que se volviera a un tipo de compuesto

tártaro emético en el que el antimonio trivalente fue sustituido por el pentavalente. Un miembro inicial de esta categoría fue el estibogluconato sódico (gluconato de sodio y antimonio; nombre comercial Pentostam); se usa ampliamente y junto con el antimoniato de meglumina, un antimonial pentavalente preferido en países de habla francesa, constituye el producto fundamental para tratar la leishmaniosis, por medio de antimoniales.

El estibogluconato de sodio posee la estructura mostrada en la figura 22.

Figura 22:

Estructura química del estibogluconato de sodio.



Estibogluconato de sodio

Sin embargo, las presentaciones clínicas del estibogluconato de sodio consiste en múltiples formas moleculares no caracterizadas, de las cuales algunas tienen masas moleculares mayores que el compuesto que se señala.

Los preparados típicos contienen de 30-34% de antimonio pentavalente en peso (Tracy, 1996).

Efectos contra protozoos:

El estibogluconato sódico al parecer interfiere en la bioenergética de los amastigotes de leishmania. Inhibe la glucólisis y oxidación β de ácidos grasos, procesos localizados más bien en organelos no comunes llamados glucosomas, y ello se acompaña de una disminución neta en la generación de ATP y GTP. Pueden intervenir otros mecanismos como la unión inespecífica del antimonio a los grupos sulfhidrilo de las proteínas del amastigote. No se sabe si se necesita para la acción contra la leishmania, reducir el antimonio pentavalente a su forma trivalente (Tracy, 1996).

Los antimoniales encapsulados en liposomas se han utilizado con buenos resultados para tratar infecciones por *L. donovani* en cricetos. En dicha forma, el fármaco es captado de manera selectiva por endocitosis y llega a fagolisosomas de los macrófagos en donde se encuentran los parásitos (Tracy, 1996).

Absorción, destino y eliminación:

Los antimoniales pentavalentes alcanzan concentraciones mucho mayores en plasma, que los trivalentes. Como consecuencia, gran parte de una sola dosis del estibogluconato sódico se excreta por la orina en término de 24 h. Su comportamiento

farmacocinético es semejante, independientemente de que el compuesto se aplique por vía intravenosa o intramuscular. El medicamento se absorbe con rapidez, se distribuye en un volumen aparente de 0.22 L/kg de peso y se elimina en dos fases; la primera posee una vida media breve de 2 h aproximadamente, y la segunda es mucho más duradera (vida media de 33 - 76h). La fase de eliminación terminal puede reflejar conversión del antimonial pentavalente en la forma trivalente y también puede explicar la acumulación y liberación lenta del fármaco durante la administración de múltiples dosis (Tracy, 1996).

Aplicaciones terapéuticas:

El estibogluconato sódico puede aplicarse por vía intravenosa o intramuscular, pero no se han establecido pautas uniformes de la quimioterapia en las diversas formas de leishmaniosis.

Con base en el análisis de Berman (1988), tal vez haya que modificar algunos regímenes tempranos. En el caso de la leishmaniosis cutánea habrá que administrar durante 20 días una dosis diaria de estibogluconato sódico (20 mg/kg de peso, de antimonio pentavalente). Las especies de *Leishmania* pueden reaccionar de modo diferente; por ejemplo, en un estudio en que los testigos recibieron placebo se advirtió que el régimen comentado era más eficaz contra *L. braziliensis* y contra *L. mexicana*. En el caso de la leishmaniosis mucocutánea, al parecer son adecuadas las recomendaciones de la OMS de usar 20 mg/kg de peso, de antimonio pentavalente

durante 30 días; el mismo régimen que también se recomienda en la leishmaniosis sistémica (*kala-azar*). Los niños casi siempre toleran de manera adecuada el compuesto y la dosis por kg es igual a la que se usa en adultos. Si surgen reacciones desfavorables en sujetos debilitados (particularmente) poco después de iniciar la terapéutica, habrá que perseverar en el uso del fármaco y administrarlo en días alternos o por intervalos más largos. Las tasas de curación por lo común son altas si se cumplen las recomendaciones anteriores. Incrementar las dosis diaria de antimonio pentavalente de 10 a 20 mg/kg de peso por lo regular causa mínimo riesgo adicional al enfermo (Tracy, 1996).

En áreas endémicas se ha observado un aumento impresionante en la incidencia de ineficacia terapéutica del estibogluconato sódico en las formas visceral, mucocutánea y otras de leishmaniosis cutánea. Si bien muchos fracasos del tratamiento pueden atribuirse a reinfección o variabilidad farmacocinética o inmunológica en los pacientes, se ha corroborado sin duda alguna resistencia al estibogluconato sódico por parte de cepas obtenidas en laboratorio y otras aisladas de enfermos. No se ha dilucidado el mecanismo de la resistencia al medicamento. A pesar de la mayor incidencia de resistencia a los antimoniales el estibogluconato sódico sigue siendo el fármaco más conveniente para usar en leishmaniosis. Sus desventajas principales son los largos ciclos que se requieren con él, la necesidad de administración parenteral y su costo relativamente alto. De manera similar, la anfotericina B es una alternativa excelente

(aunque es un producto tóxico) en el tratamiento de la leishmaniosis mucocutánea (Tracy, 1996).

Toxicidad y efectos adversos:

En términos generales, el estibogluconato sódico se tolera de manera adecuada. Las reacciones específicas que surgen, a menudo incluyen dolor en el sitio de inyección de aplicación intramuscular, síntomas gastrointestinales, mialgias tardías y rigidez articular. Se han detectado incrementos de las transaminasas hepáticas pero estos son reversibles una vez que se interrumpe la terapéutica. En infrecuentes ocasiones, ha habido casos de choque y muerte repentina.

Los géneros de *Leishmania spp.* son endémicos en esparcidas áreas a lo largo del mundo. Residen en los macrófagos de los hospederos humanos y producen un espectro de enfermedad el cual clínicamente se divide en síndromes visceral, cutánea y mucosal.

En la leishmaniosis visceral, los amastigotes son encontrados en macrófagos a lo largo del sistema reticuloentoleal. Simple o múltiple crónico, lesiones ulcerativas de la piel son típicamente presentes en la leishmaniosis cutánea. En la leishmaniosis mucosal, se observan complicaciones en la nariz, la boca y la faringe, que siguen después de meses o hasta años después del desarrollo de la leishmaniosis cutánea.

La principal epidemia de leishmaniosis visceral fue causada por *Leishmania donovani* durante la década pasada en India y Bangladesh. La leishmaniosis visceral también ha sido reconocida como una infección oportunista en personas con VIH. La leishmaniosis cutánea es un problema presente en residentes de áreas endémicas como en expatriotas visitantes o que trabajan en esos lugares. El síndrome viscerotrópico, causado por *Leishmania tropica*, una especie típicamente asociada a leishmaniosis cutánea, se observó en un grupo de soldados que sirvió en la Operación del Desierto (Tracy, 1996).

Por décadas, los compuestos antimoniales pentavalentes, como el estibogluconato sódico (Pentostam) y antimoniato de meglumina (Glucantime) han sido recomendados para el tratamiento de leishmaniosis. Sin embargo, tienen importantes efectos colaterales y hay incidencia en fracasos clínicos y resistencia a los compuestos antimonioniales. Además no son efectivos en el tratamiento de algunos pacientes con VIH y en otras condiciones inmunocomprometidas. Las alternativas tradicionales son la anfotericina B y el isetionato de pentamidina, que son usualmente eficaces pero son tóxicos y requieren de prolongados tratamientos. Alternativas en la quimioterapia están bajo estudio, que incluyen blancos de agentes quimioterapéuticos a macrófagos y el desarrollo de nuevos fármacos.

Desgraciadamente hasta ahora no ha surgido ninguna droga que reemplace a los antimoniales pentavalentes.

Actividad antileishmanial de las fracciones de Estibogluconato sódico:

El estibogluconato sódico, un derivado del antimonio pentavalente producido por la reacción de los ácidos estibónico y glucónico, es un fármaco de elección en el tratamiento de leishmaniosis. En el presente estudio (Roberts,1993), se separó al estibogluconato sódico en doce fracciones por cromatografía de intercambio aniónico. Se encontró que una fracción era de suma importancia, en su actividad leishmaniocida contra los promastigotes de *Leishmania panamensis* con una concentración del 50 % inhibitoria (IC_{50}) de 12 μg de Sb por ml; y el estibogluconato sódico no fraccionado fue de 154 μg de Sb por ml. Análisis más detenidos de esta fracción, demostraron que el componente principal era *m*-clorocresol, que había sido incluido en la formulación de estibogluconato sódico como preservativo. El IC_{50} de la fracción pura de *m*-clorocresol fue de 1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, una concentración equivalente a la presente en el estibogluconato sódico sin fraccionar, a una concentración de 160 μg de Sb por ml. Después de la extracción con éter para remover el *m*-clorocresol, el IC_{50} del estibogluconato sódico fue de > 4000 μg de Sb por ml. En contraste, cuando los amastigotes de *L. panamensis* crecieron en macrófagos, el IC_{50} del estibogluconato sódico extraído con éter fue de 10.3 μg . Las doce fracciones del extracto de estibogluconato sódico obtenido por la cromatografía de intercambio aniónico tuvieron IC_{50} de 10.1 a 15.4 μg de Sb por ml. Por lo que concluyen en el estudio, que el preservativo del estibogluconato sódico libre tiene una pequeña actividad contra los promastigotes de *L. panamensis* pero es

altamente activo contra los amastigotes de *L. panamensis* en macrófagos. Esta actividad se asocia con múltiples especies químicas.

Se afirma que la mayoría de los fármacos trabajan con interacciones específicas con proteínas, usualmente una enzima o un receptor. En este aspecto, la actividad es altamente dependiente de la estructura molecular.

Si el estibogluconato sódico sigue este paradigma, se podría plantear la hipótesis que la principal actividad antileishmanial reside en un solo componente de la mezcla que tiene la estructura apropiada para interactuar con el blanco del fármaco. Tal vez esta hipótesis sea correcta, una preparación del componente purificado debería exhibir una actividad realzada e incluso disminuir la toxicidad. Para probar esta hipótesis, el estibogluconato sódico se fraccionó por cromatografía de intercambio aniónico, y la concentración que inhibió el 50% (IC₅₀) de cada fracción fue determinada con promastigotes axénicos de *Leishmania panamensis* y con amastigotes intracelulares que crecían en los macrófagos de ratones (Líneas celulares J774G8).

El objetivo de este estudio era aislar a la fracción que aumentaba la actividad antileishmanial. La cromatografía de intercambio aniónico ayudó en esto, y las doce fracciones fueron evaluadas en su actividad en dos sistemas *in vitro*. El primer sistema que se usó fue promastigotes axénicos de *L. panamensis* y tuvieron la ventaja de la simplicidad. El crecimiento axénico de promastigotes es el más usado en los modelos para el estudio de fármacos con actividad antileishmanial. El segundo sistema

usado, fue el de amastigotes de la misma cepa que crecía en macrófagos de la línea celular J774G8, un modelo que se acerca a la situación en el hospedero.

El tratamiento de las formas sin curar de la leishmaniosis cutánea con fármacos antimoniales en combinación con interferón gamma (IFN- γ) promueve la curación más efectiva que la terapia con los fármacos convencionales. Incluso, la respuesta inmune de los pacientes antes del tratamiento no es ciertamente claro, en general se asume que la terapia promueve un switch de la forma de respuesta tipo Th-2 a la respuesta dominante de Th-1. En este trabajo (Li, 1997) se examinó la eficacia de la terapia con el IFN- γ en combinación con la terapia con el fármaco, para promover la curación y el switch de Th2 a Th1 en ratones altamente susceptibles BALB/c infectados con *Leishmania major*. Tratamiento en corto tiempo con el estibogluconato sódico fracasó ya que altera el curso de la enfermedad o la respuesta inmune cuando se administra durante la tercera y cuarta semana de la infección. La terapia con IFN- γ administrada en el mismo periodo, también fracasa en la inducción de la cura o la respuesta Th1 dominante. En contraste, ratones tratados con una combinación del fármaco y la terapia de IFN- γ resolvió las infecciones y desarrollo respuesta tipo Th1. Sin embargo, la administración del anticuerpo la interleucina 12 (IL-12), invirtió los efectos terapéuticos de la terapia con fármacos más IFN- γ , sugiriendo que el IFN- γ promueve la cura a través de un mecanismo dependiente de IL-12.

La inmunoterapia puede promover el desarrollo de una respuesta protectora tipo Th1 en ratones susceptibles por un mecanismo que involucra tanto la supresión de citocinas regulatorias y el aumento de IL-12 y la producción de óxido nítrico.

Ya que el interferón gamma (interferón γ) juega un papel importante en la muerte mediada por células de los amastigotes de leishmania *in vitro* e *in vivo*, su uso terapéutico en combinación con antimoniales en el tratamiento de varias formas de leishmaniosis ha sido estudiado (Badaro,1993 ; Harms,1993 ; Bottasso,1992).

Se ha comprobado que la terapia combinada de IFN- γ más estibogluconato sódico es más efectiva que la terapia con el fármaco sólo en la promoción de la cura de la enfermedad visceral (Harms,1993). El tratamiento con IFN- γ solamente no es suficiente para promover la respuesta y/o suprimir la activación *in vivo* de células

C. ANFOTERICINA B

1. Pentamidina y Anfotericina B.

La anfotericina B y la pentamidina son consideradas como agentes alternativos para el tratamiento de la leishmaniosis. Pacientes tratados con anfotericina B han tenido un

índice mayor de cura (98%) en un lapso de 6 meses seguidos de la conclusión de la terapia comparada con aquellos tratados con pentamidina (80%) (Soto-Mancipe, 1993).

Anfotericina B desoxicolato es un antibiótico polieno. Es muy activo, *in vitro*, mata formas extracelulares e intracelulares de *Leishmania* a concentraciones de 1 mg/ml en un medio. En hámsters y monos infectados con *L. donovani*, la anfotericina B fue 400 veces más potente que el estibogluconato sódico. La anfotericina B es formulada como una suspensión coloidal la cual se administra por medio de infusiones intravenosas lentas de 2 mg/kg en días alternantes. Su utilidad es limitada por sus efectos adversos que incluyen anafilaxia, trombocitopenia, convulsiones, fiebre, flebitis, anemia, anorexia en aproximadamente un tercio de los pacientes tratados. Nunca se ha considerado como un fármaco de primera línea para el tratamiento de leishmaniosis y se tiene poca experiencia de su uso en leishmaniosis visceral (Olliario, 1993).

El modo de acción de la anfotericina B se considera que es interesante. Une los esteroides de la membrana, formando poros donde ocurre fuga de iones. Une preferentemente esteroides 24-sustituidos como el ergosterol, que es el principal esteroide de la membrana de leishmania y de otros organismos fúngicos, pero no a la membranas de las células del hospedero. Anfotericina B actúa uniéndose al ergosterol, el principal esteroide en la membrana de organismos fúngicos y de las células de los parásitos. Esto provoca una disfunción en la membrana causando un disturbio

metabólico, que lleva a una pérdida de los constituyentes celulares y eventualmente la muerte celular. Tiene un menor alcance, une el colesterol humano en membranas. Se puede reducir la toxicidad ya sea con pre-tratamiento de infusión salina y mezclando el fármaco a soluciones de lípidos diseñados para ser administrados de forma parenteral, pero el principal avance han sido las nuevas formulaciones de anfotericina con lípidos (Olliaro, 1993).

El desarrollo de la anfotericina B se explica por las nuevas formulaciones en las que el fármaco se compleja con lípidos. En este diseño, una pequeña cantidad del fármaco libre es liberada a la circulación antes la anfotericina B-asociada a lípidos es fagocitada por los macrófagos, de ese modo se maximiza la liberación del fármaco al sitio de infección y minimiza el daño a órganos, tales como el riñón, que es susceptible a toxicidad. En un modelo con hámsters de leishmaniosis visceral, la anfotericina B complejada con sulfato de colesteril en discos microscópicos fue quince veces más activo que la formulación convencional de anfotericina B en animales levemente infectados y cuatro veces más activo en animales fuertemente infectados (Berman,1992).

La pentamidina se excreta lentamente por el hígado y por el riñón: 50% de la dosis por 5 días. Su uso es limitado por la rápida hipotensión y las reacciones adversas (diabetes, nefrotoxicidad y muerte). Se debe restringir en pacientes con enfermedad

severa que no responden a la terapia con antimoniales. Su modo de acción se entiende muy poco, pero se sabe que daña el kinetoplasto (el complejo DNA-mitocondrial).

2. Anfotericina B asociada a lípidos:

El concepto subyacente de asociar a la anfotericina B a lípidos (LAAMB), es que el componente lipídico puede encontrar receptores sólo en células deseadas, específicamente los macrófagos, y el fármaco puede ser aislada en el sitio de infección intracelular, saliendo más fármaco que interactúe con el ergosterol del parásito y menos reactivo con el colesterol del hospedero, de ese modo incrementa el índice terapéutico. Tres preparaciones comerciales de LAAMB han sido introducidas para el tratamiento de enfermedades fúngicas y han sido consideradas en el tratamiento de leishmaniosis (Olliaro, 1993).

1) Anfotericina B liposomal (AmBisome, Vestar, San Dimas) que es anfotericina B incorporada a liposomas hechos de fosfatidilcolina, colesterol y disteroil fosfatidilglicerol. Se ha usado en pacientes con leishmaniosis visceral que no han respondido al tratamiento estándar, pero AmBisome es muy caro.

2) Anfotericina B sulfato de colesterol (anfotericina B dispersión coloidal, Amphocil).

3) Anfotericina B formando complejos con lípidos: Los lípidos son dimiristoil fosfatidilcolina y dimiristoil fosfatidilglicerol.

La relativa eficacia y la toxicidad de éstos tres fármacos no ha sido todavía bien determinada.

Uso terapéutico en el control de enfermedades fúngicas y leishmaniosis visceral (Coulkell,1998).

La incorporación de anfotericina B a pequeños liposomas (AmBisome), altera las propiedades farmacocinéticas del fármaco, pero permite que se retenga su actividad *in vitro* e *in vivo* contra especies fúngicas, que incluye *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus* y además parásitos del género *Leishmania*. La alteración lleva a cambios en la distribución de los tejidos, actividad antifúngica y muy importante, en su tolerabilidad.

Se usa en la profilaxis contra infecciones fúngicas en pacientes inmunocomprometidos, la anfotericina B liposomal parece reducir la incidencia de ambas tanto de la colonización fúngica como las infecciones fúngicas, pero no afecta la supervivencia.

La anfotericina B liposomal es efectiva en el tratamiento de leishmaniosis visceral de adultos inmunocomprometidos y niños; incluyendo a aquellos que tienen una resistencia al fármaco. El fármaco además produce una buena respuesta en el índice

de pacientes inmunocomprometidos, sin embargo, el índice de recaídas en éstos pacientes es alto.

La anfotericina B liposomal es en general bien tolerada, ya que la formulación convencional se ve limitada por su pobre índice de tolerabilidad. Pocos pacientes requieren de dejar su administración o de una reducción en la dosis fármaco por presentarse efectos adversos. Los más frecuentes efectos adversos observados en pacientes son: hipocalcemia, nefrotoxicidad y reacciones relacionadas a la infusión, sin embargo, esto ocurre en menor grado después del tratamiento con anfotericina B liposomal que después del tratamiento con la fórmula convencional del fármaco.

La anfotericina B liposomal parece ser una alternativa eficaz de la anfotericina B convencional en el control de pacientes inmunocomprometidos con o con sospecha de infección fúngica. El uso del fármaco se facilita por su gran perfil de tolerabilidad comparado con la anfotericina B convencional. Por esto, la anfotericina B liposomal podría preferirse en vez de la formulación convencional anfotericina B en el control de infecciones fúngica en pacientes inmunocomprometidos con una disfunción renal preexistente o que se haya presentado un fracaso en el tratamiento usando anfotericina B convencional. Incluso la anfotericina B liposomal podría ser considerada como primera o segunda opción en el tratamiento de pacientes inmunocomprometidos con leishmaniosis visceral.

En la tabla 6 se muestra una comparación de las propiedades de las formulaciones de anfotericina B:

Tabla 6:
Comparación de las propiedades de las formulaciones de la anfotericina B.

PROPIEDADES DE LA PARTÍCULA	ANFOTERICINA B CONVENCIONAL	ANFOTERICINA B LIPOSOMAL (AmBisome)	ANFOTERICINA B DISPERSIÓN COLOIDAL	ANFOTERICINA B ACOMPLEJADA CON LÍPIDOS.
Forma	Micela	Liposoma	Disco de lípidos	Capa de lípidos
Tamaño (nm)	<25	90	100	500-5000
Composición lípido/acarreador	Deoxicolato	Lecitina colesterol soya más distearoilfosfatidilcolina	Colesterol-sulfato	Dimiristoilfosfatidilcolina más dimiristoilfosfatidilglicerol
Concentración de anfotericina (mol/L)	340	100	50	330

Farmacodinámica:

La anfotericina B es un derivado proveniente de *Streptomyces nodosus*.

La anfotericina B es un antibiótico macrocíclico polieno que actúa vía inhibición de la función membranal en células fúngicas y en *Leishmania*.

La anfotericina B liposomal (AmBisome) producida por la incorporación de anfotericina B a pequeños liposomas unilaminares se acumulan en el sitio de infecciones fúngicas, uniéndose directamente a la célula fungal y causando la muerte de la célula. El fármaco y el liposoma continúan cercanamente asociados en circulación, permitiendo la administración de altas dosis con una reducción en la toxicidad relativa a la anfotericina B convencional.

La anfotericina B liposomal es activa *in vitro* e *in vivo* contra una variedad de hongos patogénicos y especies de *Leishmania*. Los índices de supervivencia son generalmente similares entre las dos formulaciones (la convencional y la liposomal), las dos tienen efectos similares en la supervivencia de animales infectados, y la anfotericina B convencional tiende a producir una mayor reducción en la carga fungal. Contra la leishmaniosis visceral en murinos, la anfotericina B liposomal fue considerada más efectiva que la convencional o que el antimonio de meglumina, y produce una mejoría clínica a menores dosis que el agente anterior.

Actividad contra Leishmania:

Contra los promastigotes de *Leishmania major* (la forma del parásito que ocurre en el vector) en cultivos y amastigotes (encontrados en una lesión infectada) en macrófagos de murinos, la anfotericina B liposomal es 3 a 6 veces menos activa que la formulación convencional (Yardley,1997). Sin embargo, en ratones (BALB/c) infectados con *L. major*, la anfotericina B liposomal (6.25 a 50 mg/kg) redujeron el

tamaño de la lesión, y la formulación convencional fue inefectiva a dosis subtóxicas (Yardley,1997).

Se observó que en los humanos, como en los roedores, la anfotericina B liposomal fue menos tóxica que la anfotericina B convencional (Proffitt,1991).

Farmacocinética:

Después de la administración intravenosa, la anfotericina B liposomal alcanza una alto pico de concentración en el suero y larga área debajo de la curva concentración-tiempo en comparación con la anfotericina B convencional. El fármaco parece ser bien aceptado extensamente por el sistema reticuloendotelial. Altas concentraciones del fármaco son detectadas en hígado y bazo, reflejando su preferencia por el sistema reticuloendotelial; y bajas concentraciones en cerebro, corazón y pulmón (Ringdén, 1991).

El perfil farmacocinético de la anfotericina B liposomal es substancialmente diferente al observado en la formulación convencional. La anfotericina B liposomal se distribuye en un volumen de distribución más pequeño que las otras formulaciones. Aparentemente el tiempo de vida media de la anfotericina B liposomal es de aproximadamente de 6 a 7 horas. La eliminación de anfotericina B liposomal es como la convencional, se sabe muy poco. No se conocen metabolitos.

Uso terapéutico en infecciones fúngicas:

La anfotericina B liposomal en la profilaxis de infecciones fúngicas resultó más efectiva que el placebo en pacientes inmunocomprometidos. El fármaco redujo ampliamente el índice de infecciones fúngicas invasivas en los receptores de transplantes de hígado. La supervivencia no fue afectada.

Uso terapéutico en leishmaniosis visceral:

Infecciones causadas por *Leishmania spp.* son prevalentes en regiones en donde los vectores y los reservorios mamarios están presentes en un número adecuado para facilitar la transmisión del parásito. *L. infantum* ocasiona infecciones esporádicamente en la región del Mediterráneo, particularmente a niños y pacientes inmunocomprometidos. La leishmaniosis visceral causada por *L. donovani* es epidémica en Sudán e India y endémica en partes de China. Incluso otras especies están implicadas como *L. major* y *L. chagasi*. Se han reportado en el mundo alrededor de 100000 casos de leishmaniosis visceral y la incidencia global está aumentando.

Leishmaniosis visceral sintomática (*kala-azar*) es comúnmente fatal en casos no tratados, incluso con tratamientos, el 1 al 11% de pacientes muere. Antimoniales pentavalentes han sido usados en el tratamiento de la leishmaniosis visceral. La anfotericina B convencional ha sido estudiada en pacientes con leishmaniosis visceral, pero su uso está limitado por la alta incidencia de toxicidad (Berman,1997).

La anfotericina B liposomal es un efectivo tratamiento, se administra en una variedad de regímenes que van de 7 a 21 días, en la leishmaniosis visceral (*kala-azar*) en adultos inmunocomprometidos y niños, eliminando el 100% de los parásitos en pacientes de numerosos estudios.

Este fármaco también es efectivo en pacientes con una resistencia severa a antimoniales pentavalentes; sin embargo, los índices de respuesta son bajos. En muchos pacientes inmunocomprometidos, el mejoramiento de los síntomas y la respuesta objetiva (estos es, la esplenomegalia decrece) son detectables en un lapso de una semana de haber empezado la terapia en pacientes con leishmaniosis visceral (Davidson,1994).

Tolerabilidad:

La anfotericina B liposomal es en general bien tolerada. El fármaco se deja de administrar cuando se presentan efectos adversos sólo en <5% de los pacientes. El perfil de tolerabilidad de la anfotericina B liposomal es superior al que se presenta en la anfotericina B convencional.

Efectos adversos se asocian comúnmente a la anfotericina B convencional y éstos incluyen daño tubular renal, reacciones relacionadas a la infusión como fiebre, náusea y vómito, que son reducidas en los recipientes de anfotericina B liposomal.

Dosis y administración:

La anfotericina B se administra en una sola dosis diaria lenta por infusión intravenosa, la dosis se basa en el peso corporal (tabla 7). En pacientes inmunocompetentes con leishmaniosis visceral, la anfotericina B liposomal se administran 3mg/kg en los días del 1 al 5, 14 y 21. En pacientes inmunocomprometidos, la dosis recomendada es de 3 mg/kg/día en los días 1 al 5 y 4 mg/kg en los días 10, 17, 24, 31, y 38. Otros regímenes de 21 a 30 mg/kg son administrados en un lapso de 10 a 21 días podrían ser apropiados.

Administración:

Administrar intravenosamente durante 60-120 minutos a una concentración de 1-2 mg/ml (USA(1)) o durante 30-60 minutos a una concentración de 0.2-2.0 mg/ml (UK(2)).

Premedicación no es requerida

La formulación liposomal es físicamente incompatible con solución salina y otros electrolitos.

En el tratamiento de la leishmaniosis visceral, se recomienda dar una dosis intravenosa total de anfotericina B liposomal de 21 a 30 mg/kg en un espacio de 10 a 21 días (tabla II). Una variedad de regímenes han sido usados en estudios clínicos.

Tabla 7:

Dosis recomendadas y administración de anfotericina B liposomal en pacientes adultos y pediátricos.

	USA(1)	UK(2)
Dosis (mg/kg/día)		
Tratamiento empírico antifúngico	3 ^a	
Infecciones sistémicas fúngicas (<i>Aspergillus, Candida, Cryptococcus</i>)	3-5 ^a	1-3 ^{ab}
Leishmaniosis visceral: pacientes inmunocompetentes	3 en los 1-5, 14, 21 ^c	21-30 mg/kg durante 10-21 días
Leishmaniosis visceral: pacientes inmunocomprometidos	3 en los días 1-5, 4 en los días 10, 17, 24, 31, 38	

^a: La duración óptima de la terapia antifúngica no está bien definida.

^b: A 1 mg/kg/día de dosis inicial es recomendada, incrementando a 3 mg/kg/día si es necesario.

^c: Si el parásito no está claro, repetir el curso de la terapia podría ser útil.

USA (1): NeXstar Pharmaceuticals Inc.

UK(2): NeXstar Pharmaceuticals Limited.

Implicaciones de la farmacoeconomía de la anfotericina B liposomal:

El costo de adquisición de la anfotericina B liposomal es consideradamente más alta que la formulación convencional.

Por lo que la anfotericina B liposomal parece ser una alternativa eficaz de la anfotericina B convencional en el control de infecciones fúngicas.

La gran ventaja de la anfotericina B liposomal es su gran mejoría en el perfil de tolerabilidad comparada con la anfotericina B convencional.

La anfotericina B liposomal es más costoso que la formulación convencional; sin embargo, el uso de la anfotericina B liposomal podría preferirse en vez de la convencional en el control de infecciones fúngicas en pacientes inmunocomprometidos con disfunción renal preexistente, toxicidad inducida por anfotericina B convencional o fracasa en el tratamiento con anfotericina B convencional.

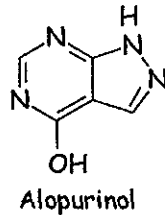
Anfotericina B liposomal podría ser considerablemente usada como fármaco de primera o segunda elección en el control de leishmaniosis visceral en pacientes inmunocompetentes.

D. EXISTEN OTROS FÁRMACOS QUE SON EMPLEADOS EN LA QUIMIOTERAPIA DE LA LEISHMANIOSIS.

1. Alopurinol:

El alopurinol es un análogo de la hipoxantina. Se muestra su estructura en la figura 23 (Olliaro, 1993).

Figura 23:
Estructura química del alopurinol



Alopurinol y el ribósido de alopurinol han sido estudiados en el tratamiento de leishmaniosis. En estudios recientes, realizados en Colombia, el alopurinol administrado por vía oral fue encontrado ser efectivo y menos tóxico que el antimonio de meglumina en el tratamiento de la leishmaniosis cutánea causada por *Leishmania braziliensis panamensis*.

Leishmania, como cualquier hemoflagelado, es incapaz de sintetizar purinas *de novo*.

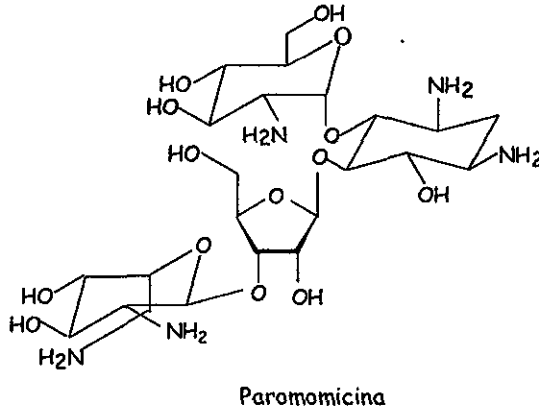
Una nueva estrategia en la terapia de leishmaniosis ha sido el uso de fármacos que sean específicos para macrófagos y que los complejen con moléculas que se unan a los receptores del macrófago. En un estudio, el ribósido de alopurinol fue específico a receptores de manosa en el macrófago por unión del fármaco a una manosa sustituida portadora de la molécula poly-L-lisina. El polímero ligado al fármaco fue 50 veces más activo que el fármaco libre *in vitro* (Negre, 1992).

2. Paromomicina

Aminosidina (paromomicina) es un antibiótico de la familia de los aminoglicósidos. No se absorbe cuando es administrado oralmente. Esta disponible en la formulación inyectable o infusión intravenosa. Las propiedades anti-leishmania de la aminosidina fueron primero reportadas en los 60's. Su estructura se muestra en la figura 24.

Las combinaciones de antimoniales y aminosidinas mostraron potenciación, *in vitro*, contra *L. mexicana*. Este efecto fue menos marcado *in vivo*. Este hallazgo permite que se piense en el uso de aminosidina sola o en combinación con antimoniales para el tratamiento de leishmaniosis.

Figura 24:
Estructura química de paromomicina



Comparación del aminosidina (paromomicina) y estibogluconato sódico en el tratamiento de la leishmaniosis canina (Poli,1997)

Doce perros infectados con *Leishmania infatum* fueron tratados vía subcutánea con aminosidina a una dosis de 10 mg/kg por día durante cuatro semanas. Once de los doce perros presentaron respuesta a la terapia con aminosidina en 30 días. El tratamiento con el antibiótico aminoglucósido presentó una notable disminución de los títulos de anticuerpos anti-*Leishmania* en comparación con los controles. Aminosidina reduce proteínas urinarias y concentraciones de complejos circulantes inmunes. Efectos adversos secundarios se observaron solamente en perros con lesiones renales

preexistentes. Este estudio provee que el aminosidina es un fármaco efectivo, tolerable y seguro para el tratamiento de la leishmaniosis canina y podría ser utilizado como un sustituyente de la terapia con antimoniales.

El autor recomienda estudios posteriores para establecer regímenes apropiados en el tratamiento con aminosidina contra la leishmaniosis canina para evitar los efectos adversos y evaluar la eficacia del fármaco en términos largos.

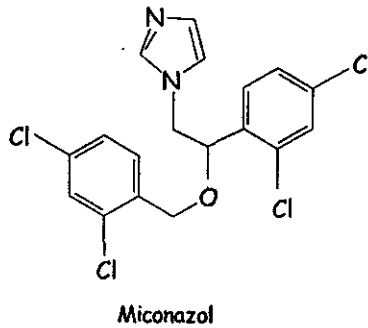
3. Artemisinina

El sesquiterpeno *artemisinina* fue probado por su actividad en contra de *L. major*. Se encontró que es efectivo a concentraciones micromolares contra promastigotes y amastigotes *in vitro*.

Se ha demostrado que el hexadecilfosfocolina, un nuevo derivado de fosfolípidos, tiene actividad contra *L. donovani* y *L. infatum* en forma de promastigotes *in vitro*.

Dos inhibidores de la biosíntesis del esteroles, el miconazol y lovastatin, trabajan sinérgicamente para inhibir la proliferación de promastigotes *in vitro* y amastigotes de *Leishmania amazonensis* y *L. donovani*. En la figura 25 se muestra la estructura química del miconazol.

Figura 25:
Estructura química del miconazol



4 Itraconazol

Itraconazol es un nuevo triazol sintético derivado de dioxolano con actividad antimicótica. El fármaco es altamente lipofílico.

Estudios previos controlados en el que se les administraba itraconazol oral, sugieren que es más efectivo en la CL de la India. Dogra en 1996, realizó un estudio, en el que 20 pacientes con CL fueron seleccionados al azar para recibir cápsulas de itraconazol y de placebo por un espacio de seis semanas; se realizaron frotis, ya que se debían de identificar los parásitos provenientes de las lesiones de la piel. Además, periódicamente y tres meses después de completar la terapia se realizaban los siguientes ensayos clínicos: pruebas de la función del hígado y urianálisis. De los 10

casos que recibían itraconazol, siete fueron declarados curados tanto clínica como parasitológicamente; no se observaron efectos adversos. El principal criterio para afirmar que un paciente estaba curado, era observar la desaparición completa de las lesiones nodulares o la reepitelación de lesiones ulcerativas, acompañados de tres frotis mensuales consecutivos sin la presencia de parásitos después de completar la terapia. Se observó un caso de curación espontánea, en el grupo al cual se le administraba placebo, tres meses después.

La tabla 8 provee el nombre de los fármacos empleados en el tratamiento de la leishmaniosis y sus posibles mecanismos de acción.

E. COMPUESTOS CON ACCIÓN LEISHMANICIDA CON MECANISMOS NO ELUCIDADOS.

1. Trifluralin

Inhibidor de los microtúbulos de las plantas contra los tripanosomátidos

El sistema microtubular es un blanco para la quimioterapia. Los inhibidores de los microtúbulos de las plantas, como el trifluralin y sus análogos, inhiben a *Leishmania* y *Trypanosoma brucei* (Chan, 1994).

Tabla 8:
Agentes utilizados en el tratamiento de la leishmaniosis y su posible mecanismo de acción

FÁRMACO	MECANISMO DE ACCIÓN	ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> Y EN ANIMALES	ESTUDIOS CLÍNICOS
Alopurinol y ribósido de alopurinol	Análogos de purina	Negre,1992	Halim,1993; Herwaldt, 1992
Anfotericina B y complejos de anfotericina con lípidos	Función de membrana	Berman,1992	Mishra,1992
Antimoniales: Glucantima (Specia) Pentostam (Burroughs Wellcome)	Desconocido	Cantos,1993	Zijlstra,1992; Medrano,1992 Grogl,1992
Artemisinina	¿Radicales libres dañan a la membrana?	Yang,1993	
Hexadecilfosfolina	¿Efecto en la membrana?	Kuhlencord,1992	
Imidazoles Ketoconazol Itraconazol Miconazol	Inhibidores de la Biosíntesis del Ergosterol	Haughan,1992	Halim,1993 Soto,1993
Interferón-	Efecto inmunomodulatorio		Badaro,1993 Bottasso,1992
Lovastatin	Inhibidor de la biosíntesis del ergosterol	Haughan,1992	
Paromomicina	Inhibe la síntesis de proteínas y se une a los ribosomas		El-On,1992; Thakur,1992
Pentamidina	Inhibe la síntesis de DNA, RNA, fosfolípidos y proteínas.		Mishra,1992 Soto,1993
Complejos raros de metales Rh(III)-mepacrina Ir(III)pirolidina ditiocarbamato		Croft,1992 Croft,1992	

Las tubulinas son proteínas conservadas evolutivamente. El sistema microtubular es comúnmente un blanco para los tripanosomátidos, porque la β -tubulina de la *Leishmania* tiene un 93% de similitud con *Trypanosoma*.

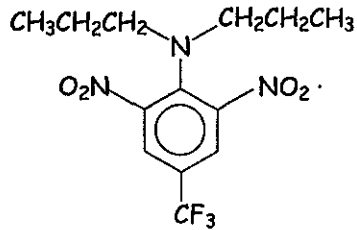
Además, las tubulinas son las proteínas más abundantes, constituyen cerca del 10% de las proteínas totales (Fong,1981).

La secuencia de aminoácidos de la tubulina α y β de *Trypanosoma* y β -tubulina de *Leishmania* revela diferencias que nos proveen blancos selectivos para la quimioterapia (Fong,1988; Kimmel,1985). Cerca de 440-450 aminoácidos que están en nueve posiciones en la β -tubulina de *Leishmania* y 27 en la α -tubulina de *Trypanosoma* son similares a las de las plantas pero diferentes a las de los humanos.

Trifluralin (α,α,α -trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropil-p-toluidina , cuyo nombre comercial es Treflan, figura 26) y su análogo han llegado a usarse como herbicidas. La interacción del trifluralin y los microtúbulos de la planta ha sido bien establecida. Ellos se unen a las tubulinas de las plantas, detienen mitosis y causan la pérdida de orientación de las microfibrillas de la pared celular de la planta provocando que las células rectangulares se convierten en redondas.

Como en las plantas, las estructuras microtubulares de los tripanosomátidos parásitos son susceptibles de la disrupción por trifluralin (Chan,1990 y Chan,1993).

Figura 26:
Estructura química del trifluralin.



Trifluralin
 α,α,α -trifluoro-2,6-dinitro-N,N-
 dipropil-*p*-toluidina; Treflan;
 (PM = 335.28)

Trifluralin inhibe la proliferación de promastigotes de muchas especies de *Leishmania* (*L. mexicana amazonensis*, *L. panamensis*, *L. major*, *L. tropica* y *L. donovani*) y tripomastigotes procíclicos de *T. brucei* con una eficacia similar ($ED_{50}=2-7\mu\text{M}$). Una alta concentración ($15\mu\text{M}$) se necesita para reducir la parasitación de los macrófagos infectados con amastigotes de *Leishmania* (*L. major*, *L. tropica*, *L. donovani* y *L. m. amazonensis*) en el 25%.

La eficacia del compuesto parece depender de su solubilidad y accesibilidad al blanco. Por ejemplo, $5\mu\text{M}$ de trifluralin reduce la parasitación en un 50% cuando la concentración de la acetona se incrementa de 0.5 a 1.0%. No nos sorprende que el trifluralin inhiba la transformación de amastigote-promastigote (en un 30-80% a $0.5\mu\text{M}$) cuando la diferenciación de la célula involucra una remodelación del sistema

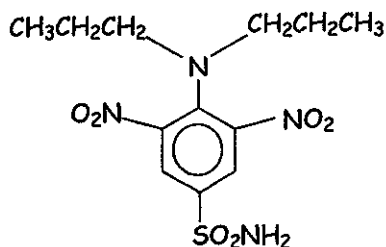
microtubular. La eficacia de trifluralin contra *T. cruzi* precisa determinarse; los autores predicen que el trifluralin tiene el mismo efecto y quizá sea activo contra protozoarios más distantes, como *Plasmodium falciparum*.

El mecanismo de inhibición de los parásitos es similar que el efectuado en las plantas. Morfológicamente, cuando el tripanosoma procíclico de *T. b. brucei* crecía en un cultivo con trifluralin o promastigotes de *L. m. amazonensis* fueron cultivados con orizalin (un análogo de trifluralin menos citotóxico), se observaron células redondas, flagelo con anomalías y ocurrían divisiones mitóticas incompletas.

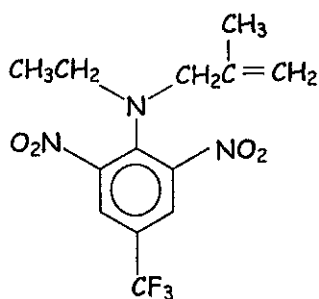
Desde la introducción del trifluralin en 1965, los herbicidas derivados de la dinitroanilina han sido ampliamente usados en granjas, constituyendo un mercado de US\$660 millones. Trifluralin no es genotóxico; se han descrito nueve análogos (benfluralin, dinitramina, etalfluralin, flucloralin, nitratin, orizalin, pendimetalin, prodiamina y profluralin; algunos se muestran en la figura 27). Se ha comprobado que sólo uno de los dos grupos nitro es necesario para efectuar la actividad anti-*Leishmania*.

El género *Leishmania* posee resistencia a fármacos, especialmente a antimoniales pentavalentes, que son recomendados en el tratamiento desde la Segunda Guerra Mundial.

Figura 27:
Análogos del trifluralin.



Orizalin
3,5-dinitro-N⁴,N⁴-dipropilsulfanilimida
Surflan; (PM = 346.36)



Etalfluralin
N-etil-N-(2-metil-2-propenil)-2,6-
dinitro-4-(trifluorometil)benzenamina;
Sonalan; (PM = 333.26)

El mecanismo más frecuente de resistencia a fármacos reportado de *Leishmania* es la amplificación del gen, lo que significa, que hay un incremento en la toma del fármaco y una sobreproducción como consecuencia del rearrreglo de los genes. Incluso el

parásito sobreproduce enzimas que los fármacos normalmente inhiben o activan proteínas membranales que previenen la acumulación del fármaco. Un grupo de cepas que poseen resistencia a multi-fármacos tienen una región H ampliada (Ellenberger, 1989). Esta región genómica contiene por lo menos dos genes que son altamente homólogos a los genes de las P-glicoproteínas en mamíferos. En las células mamíferas, las P-glicoproteínas confieren resistencia al fármaco por medio de que impiden la acumulación intracelular de fármacos hidrofóbicos. En las especies de *Leishmania* su amplificación ha sido asociada con la simultánea resistencia a muchos compuestos.

Ya que el trifluralin es un compuesto hidrofóbico, en este estudio se investigó como la P-glicoproteína de *Leishmania* puede contrarrestar los efectos del trifluralin (Chan, 1995). Aquí se comparó la eficacia del fármaco contra cuatro cepas que expresan genes de resistencia a multi-fármacos o moléculas de P-glicoproteínas que son sensibles al fármaco de la cepa relacionada. Estas cepas fueron *L. major* transinfectada con *ImpgpA* y *L. donovani* con el gen amplificado *ldmdr1* y *L. mexicana panamensis* que había sido inducida para sobreexpresar las moléculas de P-glicoproteína reactivas.

Los resultados de este estudio sugieren que las cuatro cepas de *Leishmania* con producción ampliada de P-glicoproteínas indican que el trifluralin no está sujeto de

la acción de estas proteínas, aunque existen otras cepas, el desarrollo en laboratorios y aisladas en el campo, no han sido probadas. Simultáneamente, estos resultados sugieren que el trifluralin es improbablemente para activar la amplificación de los homólogos de P-glucoproteínas en *Leishmania*.

En el presente estudio (Chan,1995) se probó la eficacia *in vitro* del trifluralin contra diferentes especies de tripanosomátidos y su eficacia *in vivo* de este herbicida contra *Leishmania* en modelos murinos infectados.

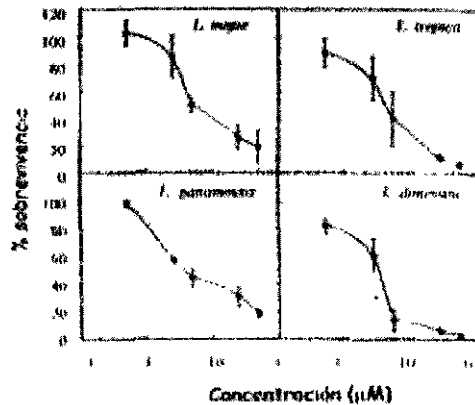
En la figura 28 se muestra la gráfica que resume la efectividad del trifluralin, inhibiendo la proliferación de diferentes especies de *Leishmania*.

En la figura 29, se muestra como el trifluralin reduce la infectividad de especies diferentes de *Leishmania*.

En este estudio se comprobó que el trifluralin es efectivo contra leishmanias pertenecientes a cuatro diferentes complejos: *L. mexicana*, *L. tropica*, *L. donovani* y *L. panamensis*, que causan infecciones viscerales y cutáneas. Desde que las tubulinas se conservaron como proteínas, no es una sorpresa encontrar que el trifluralin es efectivo uniformemente dentro de la familia Trypanosomatidae.

Figura 28:

Trifluralin inhibe la proliferación de promastigotes de diferentes especies de *Leishmania*. Trifluralin se adicionó a los cultivos de promastigotes. Después de una incubación de 5-6 días, los parásitos fueron contados por medio de un hematocímetro y el % de supervivencia fue calculado por comparación con el control no tratado.



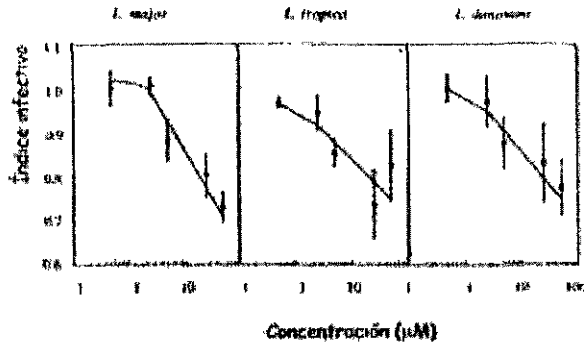
Tomado y adaptado de Chan,1993.

Su actividad *in vivo* fue probada en ratones infectados con *L. major* y *L. mexicana* que provocaron lesiones cutáneas en los ratones. Después del tratamiento de los ratones con trifluralin vía tópica, se observó que las lesiones disminuían su tamaño. En el caso de *Leishmania mexicana* después de 45 días, las lesiones tratadas (15/15) se cerraron, mientras que las lesiones no tratadas reportaron un tamaño promedio de 180 mm². Cuando los ratones infectados con *L. mexicana* fueron sacrificados en el día 80, 12 de las 15 lesiones permanecieron cerradas y 3 llegaron a ser metastásicas (1

apareció en el día 60 y 2 en el día 80). En el caso de las infecciones causadas por *L. major* éstas fueron progresivas y no sanaron.

Figura 29:

Trifluralin reduce la infectividad de diferentes especies de *Leishmania*. Trifluralin fue adicionado a cultivos de J774A.1 en macrófago murinos con amastigotes intracelulares. Después de 3 días, los macrófagos fueron lavados y teñidos con el colorante Giemsa, y el número de macrófagos infectados fue determinado. Para calcular el índice efectivo, el % de macrófagos infectados en cultivos tratados fue dividido entre aquellos del control no tratado.



Tomado y adaptado de Chan,1993.

El trifluralin no es teratogénico o genotóxico y no causa daños al hombre.

Trifluralin es la única terapia contra leishmaniosis, excepto paromomicina, que ha mostrado ser activo como ungüento tópico. Farmacológicamente, tiene la ventaja de que ha sido bien caracterizado, no requiere de pruebas de toxicidad prolongadas y

caras, y el costo efectivo de manufactura no es muy alto. Al ser las tubulinas vitales para el crecimiento y diferenciación de los kinetoplástidos, el uso del trifluralin es efectivo contra éstos parásitos. Además, una terapia combinada del trifluralin con otros compuestos como el paromomicina ocasiona efectos sinérgicos y permite el desarrollo de una resistencia a multi-fármacos.

Similares características se observaron en el tratamiento de *Plasmodium falciparum* con trifluralin (Kaidoh,1995) y en el tratamiento de *Leishmania mexicana* tratada con orizalin (Chan,1991). A dosis subletales de estos compuestos, la forma de los promastigotes de *Leishmania* cambiaban, llegando a la redondez, presuntamente por la misma razón que en las plantas, una falta de microtúbulos estructurales. Los autores especulaban que estas células fueron detenidas durante la división celular.

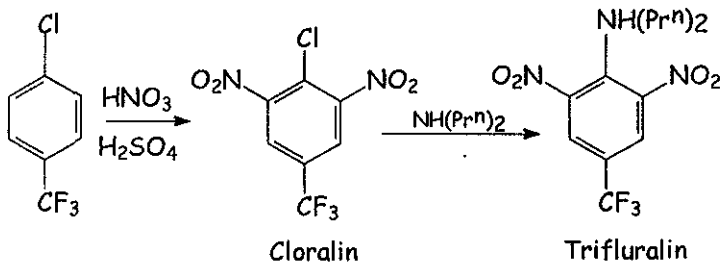
En las especies de *Leishmania*, parece que se exhibe el mismo mecanismo de inhibición que en las plantas, eso desde que el orizalin se encontró que inhibía específicamente la polimerización de la tubulina de *Leishmania*, *in vitro*. Así, la tubulina leishmanial parece ser más similar a la tubulina de las plantas que las tubulinas de los mamíferos, lo cual distingue estructuras que pueden ser usadas como blancos para fármacos (Callahan, 1996).

Sin embargo, estudios recientes de Chan han revelado que la actividad antiparasitaria del trifluralin no se debe así mismo, sino más bien a una impureza o

contaminante del trifluralin (Chan,1993),y que es responsable de su actividad in vitro contra las de especies de *Leishmania*.

Por medio de cromatografía de gas-líquido y espectroscopia de masas se analizaron muestras de trifluralin, y se observó que el mayor pico pertenecía a trifluralin y los picos más pequeños a cloralin. Previamente se había demostrado que las impurezas del trifluralin eran las responsables de su actividad, por lo que la presencia del cloralin era debido a que es un producto intermediario en la síntesis del trifluralin. La síntesis comercial se muestra en la figura 30:

Figura 30:
Síntesis comercial del trifluralin.

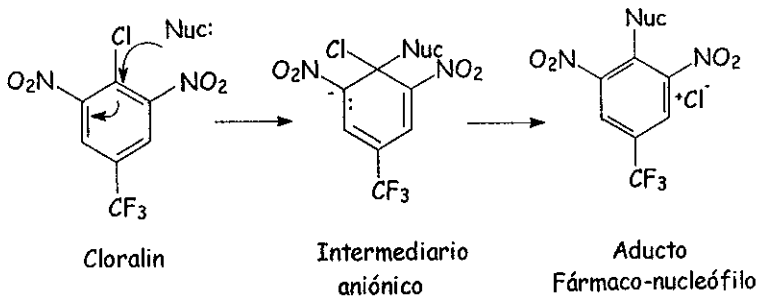


El cloralin es 100 veces más activo que el trifluralin contra promastigotes de *Leishmania in vitro* (IC_{50} s, $0.89 \pm 0.3 \mu\text{M}$ versus $72 \pm 21 \mu\text{M}$, respectivamente) por lo que es el compuesto que ellos buscaban.

Como se muestra en la figura 31, se muestra como reacciona el cloralin con un nucleófilo. Esta información sugiere un modelo de selección para análogos del cloralin. La hipótesis que ellos sugieren es que la habilidad del compuesto para experimentar la reacción se podría correlacionar con su actividad contra las especies de *Leishmania*. La prueba de nuestra hipótesis, los análogos son grupos adecuados de electrones de retiro y llevando grupos que ellos eligen.

Figura 31:

Reacción del cloralin con un nucleófilo (Nuc) para formar un aducto fármaco-nucleófilo.



De los análogos estudiados (en la figura 32 se muestra la estructura química en general de los compuestos aromáticos y en la tabla 9), la adición del sustituyente trifluorometil al compuesto 5 resultó incrementar tres veces más la actividad antileishmanial.

Compuestos 4, 7 y 8 difieren el grupo de salida. De éstas pruebas se concluye que el cloralin sigue siendo el más activo, seis de los siete compuestos probados son activos tanto o más que el trifluralin (compuestos 2 y del 4 al 8). El compuesto 3 no mostró actividad.

Aunque no se sabe se conoce el sitio de acción celular del cloralin, el sitio de acción de los compuestos familiares, como el trifluralin y otra dinitroanilina, orizalin, han sido previamente determinadas en las tubulinas de las leishmanias (Chan). Por lo que los autores esperan que el cloralin, su blanco sean las tubulinas. Si esto es cierto, ellos plantean la hipótesis que la interacción avanza por una sustitución nucleofílica, con el sustituyente sulfhidrilo de un residuo de la cisteína actuando como un nucleófilo.

Figura 32:

Estructura química general de un compuesto aromático simple.

Los sustituyentes R_3 , R_4 y R_5 se muestran en la tabla V.

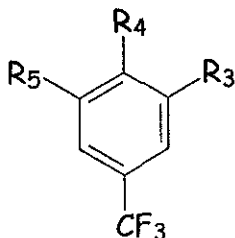


Tabla 9:

Efecto de los grupos de electrones de retiro y de salida en la actividad antileishmanial del cloralin

C*	NOMBRE QUIMICO	R ₃	R ₅	R ₄	IC ₅₀ (μ M)
Cloralin	4-cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoruro	NO ₂	NO ₂	Cl	0.89 \pm 0.3
2	4-cloro-3-nitro-5-sulfonilbenzotrifluoruro	NO ₂	SO ₂ H	Cl	6.1 \pm 1.4
3	4-cloro-3-nitro-5-carboxilbenzotrifluoruro	NO ₂	COOH	Cl	120 \pm 30
4	4-cloro-3-nitrobenzotrifluoruro	NO ₂	H	Cl	35 \pm 9
5	3-amino-4-clorobenzotrifluoruro	NH ₂	H	Cl	77 \pm 5
6	2-bromo-3,5-bis(trifluorometil)anilina	NH ₂	CF ₃	Br	26 \pm 3
7	4-metoxi-3-nitrobenzotrifluoruro	NO ₂	H	OCH ₃	68 \pm 10
8	2-nitro-4-(trifluorometil)tiófenol	H	NO ₂	SH	15 \pm 3

C*: Compuesto.

2. Licochalcona A

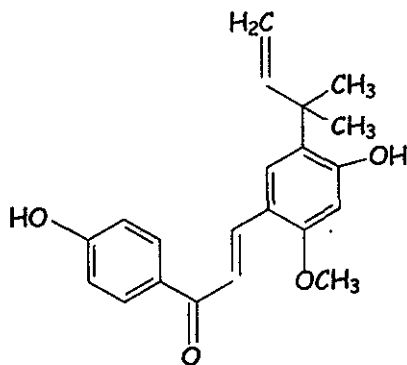
Chen y colaboradores (1997) afirmaron que la licochalcona, una chalcona oxigenada y que se aísla de raíces de regaliz chinas, exhibe una actividad antileishmanial y antimalaria. La licochalcona A, cuya estructura química se muestra en la figura 33, inhibe el crecimiento *in vitro* de promastigotes y amastigotes de *Leishmania major* y *Leishmania donovani* (Chen,1993); impide el desarrollo de lesiones en ratones infectados con *L. major*, y reduce la carga de parásitos en el hígado y bazo de hámsters infectados con *L. donovani* (Chen,1994).

Licochalcona A altera la ultraestructura y el funcionamiento de la mitocondria de los parásitos (*Leishmania*) (Zhai, 1995).

Recientemente, este grupo de investigadores observaron que el compuesto 2,4 mbc (2,4-dimetoxi-4'-butoxichalcona), cuya estructura se muestra en la figura 34, interfiere con la actividad de algunas enzimas mitocondriales de los organismos de *Leishmania* (pero estos datos no han sido publicados).

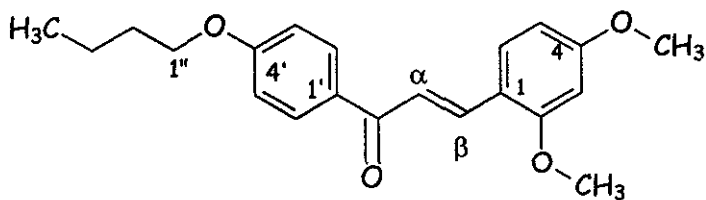
Estudios posteriores deben realizarse para corroborar este último punto.

Figura 33:
Estructura química de la Licochalcona A.



Licochalcona A

Figura 34:
Estructura química del 2,4mbc.



Compuesto 2,4mbc
(2,4-dimetoxi-4'-butoxichalcona)

3. Derivados del ácido alénico.

Se sabe que muchos parásitos tienen esteroides distintivos de los que el hospedero mamífero posee. Considerados como blanco para el desarrollo de nuevos fármacos, la biosíntesis de esteroides es importante para los parásitos así como para los kinetoplástidos flagelados y para el protista oportunista asociado a SIDA el *Pneumocystis carinii*. Estos patógenos sintetizan esteroides con un grupo alquil a C-24, y algunos tienen doble ligadura en C-22 de la cadena lateral. Los humanos y los hospederos mamíferos son incapaces de alquilar a C-24 y desaturar a C-22. En el presente estudio (Beach, 1997), tres componentes esteroideos con cadenas laterales sustituidas por grupos fosfonil-unidos fueron sintetizados y probados para sus efectos en el crecimiento de cultivos de *L. donovani* y *L. m. mexicana*.

Los compuestos inhibieron la proliferación del organismo a concentraciones de microgramos por mililitro. El más potente inhibidor de este grupo de compuestos fue caracterizado por dos grupos etil en la función fosfato. Los organismos de *Leishmania* tratados con 17-[2-(dietilfosfonato)etilidienil]3-metoxi-19-norpregna-1,3,5-trieno mostró una reducción en el crecimiento después de transferirse a un medio libre de inhibidores. Porque actualmente no existen métodos axénicos disponibles para la subcultivación continua de *P. carinii*, los efectos de éstos fármacos en el organismo fue evaluado por dos sistemas de estimación alternativos.

Los mismos dos compuestos dietil fosfonoesteroides que inhibieron la proliferación de *Leishmania*, también mostraron actividad contra *P. carinii* y se determinó como un potente efecto que tienen en reducir el contenido celular de ATP.

Los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma* biosintetizan esteroides C_{28} y C_{29} (Haughan,1991). Estos esteroides son caracterizados por un grupo etil o metil en el C-24 de la cadena lateral del esteroide. Algunos tripanosomátidos además sintetizan esteroides con doble ligadura en el C-22. Porque los mamíferos, incluyendo los humanos, no son capaces de la alquilación del esteroide C-24 o desaturación en C-22, las reacciones biosintéticas presentes en el patógeno llevan a modificaciones en la cadena lateral que son atractivos blancos para la intervención de la quimioterapia.

Los fosfonatos son compuestos orgánicos que establecen uniones o ligaduras fosfóro-carbono resistentes a la oxidación e hidrólisis enzimática (Engel,1983; Hilderbrand,1983). Una variedad de fosfonatos han sido sintetizadas y desarrolladas como agentes antibacterianos y antivirales.

A altas concentraciones, de los cinco compuestos esteroidales (Figura 35), la disminución final de la densidad celular en los cultivos de *L. donovani* y *L. m. mexicana*. Los más potentes inhibidores del crecimiento fueron los compuestos C y E. A la concentración más alta probada (10 μ g/ml), estos dos compuestos mataron a todos los organismos en el día 5.

Figura 35:

Estructura de los compuestos analizados.

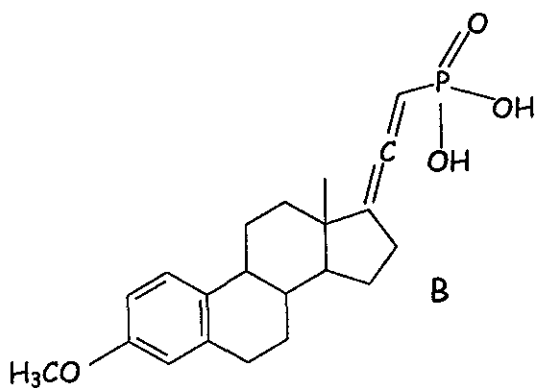
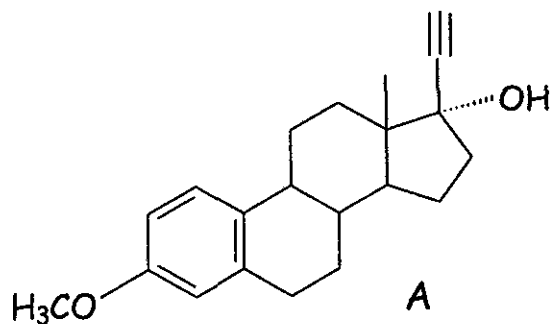
A) Mestranol, (17 α)-3-metoxi-19-norpregna-1,3,5(10)-trieno-20-in-17-ol (compuesto A)

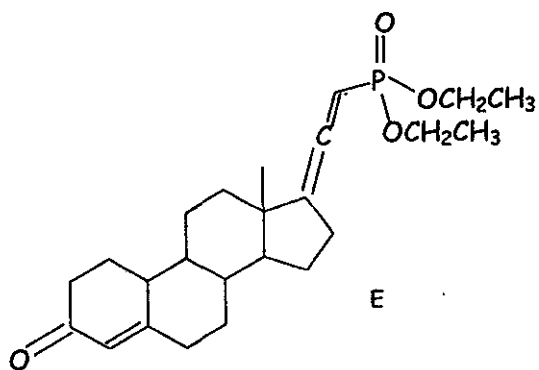
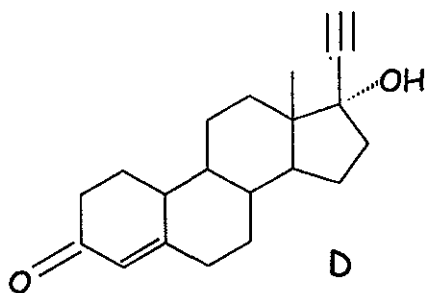
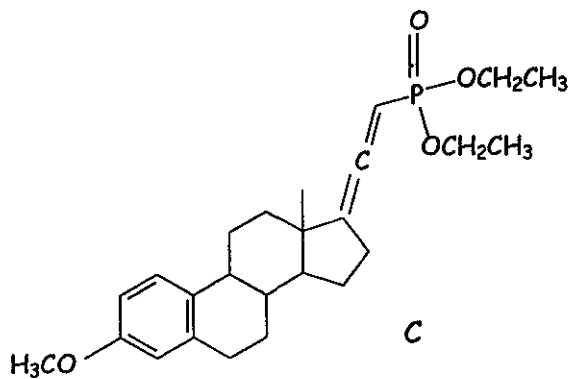
B) 17-(2-fosfonatoetilidienil)-3-metoxi-1,3,5(10)-estratrieno (compuesto B).

C) 17-[2-(dietilfosfonato)etilidienil]-3-metoxi-19-norpregna-1,3,5-trieno (compuesto C).

D) Noretindrona, 17-hidroxi-19-norpregn-5(10)-en-20-in-3-ona (compuesto D)

E) 17-[2-(dietilfosfonato)etilidienil]-19-norpreg-4-en-3-ona (compuesto E), un análogo dietilfosfónico de noretindrona.





Los fosfonatos esteroidales sintetizados en este estudio mostraron actividad inhibitoria en dos especies de *Leishmania* y en *P. carinii carinii*.

Los compuestos más potentes fueron el C y E. El compuesto C, pero no el compuesto E, mostró tener un efecto letal sobre *Leishmania*, prolongando la interrupción de las funciones celulares de las especies de *Leishmania* fueron demostradas por la inhibición del crecimiento después de la exposición de los organismos al compuesto cuando fueron inoculados a un medio libre del compuesto.

La toxicidad de los compuestos C y E parecen deberse a la asociación con la presencia de los grupos etil. La inhibición prolongada y los efectos letales observados por el compuesto C comparados con los producidos por el compuesto E en los cultivos de crecimiento de *Leishmania donovani* y *Leishmania mexicana mexicana* sugieren que el grupo metoxi del C-3 del compuesto C también tiene actividad. Esta función puede interferir en la composición lipídica de la membrana y por lo tanto interrumpir la función normal membranal.

En el estudio presente el ensayo del contenido de ATP indican que los compuesto esteroidales (compuesto C y E) son efectivos contra *P. carinii carinii*, *L. donovani* y *L. m. mexicana*. El ensayo de ATP es sensible para detectar respuesta fisiológica y metabólica al compuesto.

4. Efecto del extracto de hojas de *Kalanchoe pinnata*.

El efecto del extracto de hoja de la especie *Kalanchoe pinnata* (Kp) fue investigado en ratones BALB/c infectados con *Leishmania amazonensis* por Da Silva (1995). El tratamiento oral con Kp retardo significativamente el ataque de la enfermedad en comparación con los ratones no tratados o ratones que recibían Kp por vía intravenosa o vía tópica. Al inicio de la infección, se administraban dosis diarias orales de 8 mg que impedían el crecimiento de la lesión y existía un efecto duradero, comparable con la observada en el fármaco antileishmanial de referencia (*Glucantime*). La disminución del crecimiento de la lesión usando una ruta oral fue acompañada por una disminución del número de parásitos viables. La protección fue acompañada por una disminución de la capacidad de los animales a desarrollar hipersensibilidad del tipo retardada y producción anticuerpos específicos.

La leishmaniosis cutánea es una enfermedad endémica en muchas partes del mundo, caracterizada por lesiones crónicas en la piel en el sitio en donde se efectuó la mordedura del vector. En la siguiente revisión se investigó el efecto de un extracto acuoso de *Kalanchoe pinnata* (Kp, sinónimo de *Briophyllum pinnatum*) en un modelo murino de leishmaniosis. *Kalanchoe* es una planta popular conocida en Brasil, India, China y Africa por su efectividad en curar heridas tópicas, artritis y úlceras

gástricas. Se había reportado que el extracto de sus hojas poseían actividad antifúngica (Misra,1979) y antiinflamatoria (Pal,1992).

Kalanchoe es una planta rica en flavonoides (Gaiind,1981). Los flavonoides tienen un amplio rango de efectos biológicos incluyendo las siguientes actividades: antialérgico, antitumoral y antiinflamatorio (Pathak,1991).

El presente estudio se enfocó en la suposición que las manipulaciones inmunosupresoras tales como el tratamiento con ciclosporina A (Behforouz,1988) y la γ -irradiación (Howard,1981) protegían al ratón susceptible de infecciones provocadas por *L. major*. En el presente trabajo se reporta que el tratamiento con Kp reprime respuesta inmune específica al parásito y protege fuertemente a los ratones contra leishmaniosis cutánea, particularmente cuando se le administra por la ruta oral.

En este estudio se probaron tres tipos de rutas: intraperitoneal, tópica y oral; siendo la última la más efectiva en controlar la enfermedad después de su establecimiento, que fue alrededor de un mes después del inicio de la infección. La efectividad del tratamiento fue confirmada por la reducción del tamaño de la lesión y la carga parasitaria cuando se realizaron los estudios de histopatología. Esta efectividad superior podría ser debida a la descomposición diferencial del extracto crudo en el tracto digestivo y/o a la baja absorción y la persistente liberación por la mucosa intestinal.

La fracción de Kp rica en flavonoides es muy activa en la inhibición de la proliferación de linfocitos humanos *in vitro* (Moraes,1994). Por lo que actualmente se encuentran evaluando si existe o no una relación de los flavonoides en sus efectos inmunosupresores y antileishmaniales *in vivo*.

Dado que se demostró que el Kp administrado oralmente en dosis bajas del extracto crudo, la purificación química llevaría a un potente compuesto que podría ser útil en el tratamiento clínico de la leishmaniosis solo o en combinación con otros fármacos.

5. Metabolitos secundarios aislados de líquenes chilenos.

Tres metabolitos secundarios aislados de líquenes chilenos: (+)ácido úsnico, panarina y 1'-cloropanmarina, fueron probados contra promastigotes de tres cepas de *Leishmania spp.* Panarina y 1'-cloropanmarina exhibieron actividad *in vitro* a 50 µg/ml y (+) ácido úsnico por las rutas subcutánea y oral por 15 días a 25 mg/kg o por cinco inyecciones intralesionales en intervalos de cuatro días a 25 mg/kg de peso corporal. El fármaco de referencia fue Glucantime y fue administrado por inyecciones subcutáneas (regímenes de 28 mg de antimonio pentavalente) por 15 días. Los tratamientos subcutáneo y oral con (+) ácido úsnico no produjeron ningún efecto, pero por administración intralesional observaron un efecto importante que redujo al 43.34% del peso de la lesión y por 72.28% de la carga parasitaria en los cojinetes plantares

infectados (Fournet, 1997). Los metabolitos aislados de líquenes chilenos, llamados compuestos trifenólicos: (+) ácido úsnico, panarina y 1'-cloropanmarina, los cuales poseen una actividad *in vitro* contra los promastigotes de tres cepas de *Leishmania spp.*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. donovani*. Se reportó la actividad *in vitro* de estos tres metabolitos secundarios e *in vivo* la actividad antileishmanial del (+) ácido úsnico cuando se administró por vía oral, subcutánea e intralesional.

En la siguiente figura 36 se muestra la estructura química de los compuesto fenólicos.

El tratamiento fue iniciado cuatro semanas después de la inoculación, cuando la infección estaba bien establecida y las lesiones eran obvias. Los resultados se muestran en la tabla 10.

En la tabla se muestra la actividad *in vitro* de los compuestos fenólicos hacia tres cepas de promastigotes de *Leishmania spp.* y los símbolos significan: 0, parásitos idénticos al control; ++, cerca del 80-90% de lisis de parásitos; +++ lisis total de parásitos.

El (+) ácido úsnico y el 1'-cloropanmarina fueron descritos como agentes antimicrobianos y con actividad antitumoral, podría explicar la actividad antiprotozoaria del (+) ácido úsnico cuando se aplica por la ruta intralesional. En 1995, Lauterwein, indicó que el (+) ácido úsnico tiene propiedades lipofílicas por lo que altas concentraciones pueden ser usadas en la formulación de pomadas.

Figura 36:
Estructura química de ácido úsnico

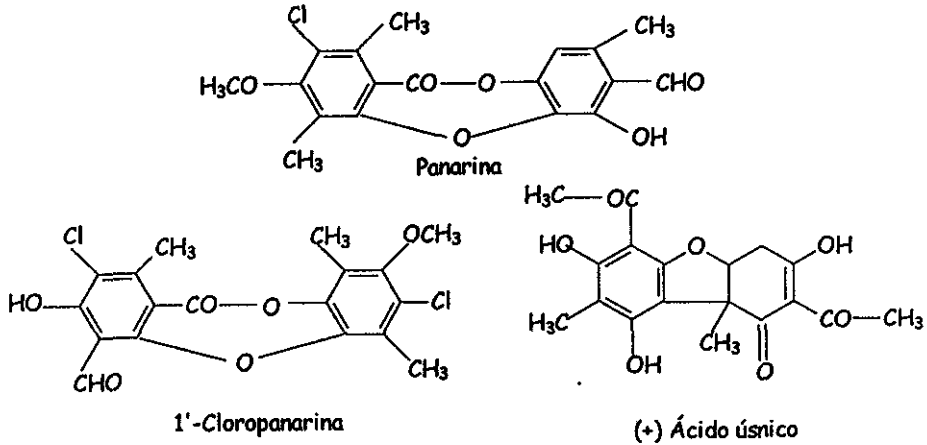


Tabla 10:

COMPUESTOS ($\mu\text{g/ml}$)	<i>L. amazonensis</i> (PH8)			<i>L. braziliensis</i> (2903)			<i>L. donovani</i> (HS-70)		
	50	25	10	50	25	10	50	25	10
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pentamidina	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Ketoconazol	++	0		++	0		0		
(+) Ácido usnico	+++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++
1'-cloropanarina	+++	0		+++	0		+++	0	
Panarina	+++	0		+++	0		+++	0	

6. Diamidinas.

Las diamidinas son conocidas por poseer una potente actividad antiprotozoaria debido a su propiedad de unirse al surco menor del DNA. La pentamidina o 1,5-bis-(4'-amidinofoxy) pentano, es la diamidina aromática más conocida y se usa en los casos de leishmaniosis en los que existe resistencia antimonial. Pero, sufre un limitado uso terapéutico debido a sus efectos adversos y tóxicos. Por lo que, cuatro análogos de análogos de la pentamidina, con las conocidas diamidinas viz. antileishmaniales, pentamidina, berenil, y dibromopropamidina, fueron probadas para observar su efecto en el crecimiento de los promastigotes *in vitro* de *Leishmania donovani*, usando la incorporación de ^3H -timidina como un parámetro del crecimiento.

Realizando una revisión de las similitudes entre el grupo amidina de las diamidinas y el grupo guanidino del grupo de L- arginina y también reportes previos de este grupo de investigadores (Kandpal, 1996); observaron la presencia de un nuevo transportador de arginina en los promastigotes de *L. donovani*, un estudio paralelo condujo con los análogos y estándares de la diamidina por su efecto inhibitorio en la función del transporte de arginina leishmanial.

Bisbenzil pentamidina y el bisciclopropil pentamidina fueron identificados como potentes inhibidores del crecimiento y la función del transporte de arginina de los promastigotes de *Leishmania in vitro*, y esta actividad fue más potente que la exhibida por la pentamidina. Una correlación lineal fue establecida entre la inhibición del

crecimiento parasitario y el transporte de arginina con un consideración para estandarizar las diamidinas como nuevos análogos. La inhibición del transporte de arginina por la dibromopropamidina y Pentamidina fue competitiva. Las diamidinas posiblemente aumenten su entrada a las células infectadas con *Leishmania* a través del transportador de arginina.

En la figura 37 se muestra la estructura básica de los análogos de pentamidina reportados.

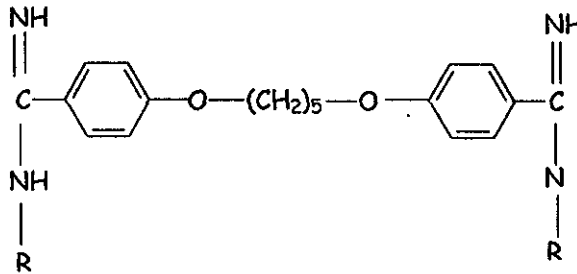
En el presente estudio se fue variando las concentraciones de las diamidinas para observar su efecto en el crecimiento y en flujo de arginina por los promastigotes de *Leishmania donovani in vitro*. Los valores de IC_{50} fueron computarizados de la curva dosis-respuesta realizada en gráficas semilogarítmicas. Entre el estándar de diamidinas, dibromopropamidina (DBP) se encontró que fue el más potente agente antileishmanial así como el inhibidor del transporte de arginina seguido por la pentamidina y el berenil. Entre los nuevos análogos de la pentamidina probados el bisbenzil pentamidina y el bisciclopropil pentamidina fueron identificados como los más potentes inhibidores del crecimiento leishmanial así como del transporte de arginina.

L-arginia es un aminoácido de importancia metabólica para las células que estén infectadas de *Leishmania*. Los promastigotes de *L. donovani* utilizan arginina como un índice comparable al de D-glucosa (Bera, 1987). Las diamidinas tienen una semejanza

estructuras a L-arginina en términos de grupos amidino terminal de los fármacos y el grupo guanidino de los aminoácidos. Los promastigotes de *L. donovani* son equipados con un único sistema de transporte de arginina (Fouce, 1989).

Figura 37:

Estructura básica de los análogos de la pentamidina reportados.



La correlación entre el efecto de las diamidinas en el crecimiento y la función de transporte de arginina por los promastigotes de *L. donovani* y el cambio de la inhibición en presencia de altas concentraciones de arginina indican que las diamidinas probablemente aumenten su entrada a las células infectas por *Leishmania* a través del transportador de arginina y la diferencia de la actividad antileishmanial entre las diferentes diamidinas probadas podría atribuirse a las variaciones de afinidad y eficacia de las interacciones con el transportador.

Por lo que estos investigadores concluyen que existe una correlación entre la inhibición del transporte de arginina por las diamidinas y su actividad antileishmanial.

7. Neurolépticos tricíclicos.

Ha continuado el interés por los efectos antimicrobianos de los neurolépticos tricíclicos y antidepresivos, particularmente contra los tripanosomátidos, pero pocos estudios se han abocado a investigar la relación entre la acción antiparasitaria y los efectos que ocurren en el sistema nervioso central. En este artículo, se midió la potencia antileishmanial de un rango de análogos estructurales en este grupo de fármacos, y se concluyó que ninguna estructura es determinante ó crítica para esta actividad. Además, la potencia puede ser predecida por una determinación en los componentes lipofílicos y estéricos de la estructura de una simple combinación de dos parámetros descriptivos, conectividad balanceada y un término interactivo (Evans, 1994).

La actividad de los compuestos neurolépticos tricíclicos contra *Leishmania* y *Trypanosoma* han sido reportado previamente (Pearson, 1982; Zilberstein,1984; Benson,1992). Esto no separó el efecto potencial central de estos compuestos de sus actividades antiparasitarias, aunque varias interacciones específicas fueron

propuestas. Pearson en 1982 reportó que la actividad de 10 fenotiazinas contra *L. donovani* tanto *in vitro* como *in vivo*. Zilberstein, en 1984, demostró que los antidepresivos triciclos basados en un núcleo de dibenzazepina fueron efectivos contra cultivos de promastigotes de *L. donovani*.

Estos autores proponen que los compuestos tricíclicos interfieren con el sistema de transporte membranal único en los tripanosomátidos, una bomba de protón-ATPasa.

Benson, en 1992, diseñó una técnica por computadora basada en una estructura tridimensional de tripanotiona reductasa recombinante, un componente único en el mecanismo redox de los tripanosomátidos. Con lo cual demostró la habilidad de una fenotiazina, una dibenzazepina y un dibenzocicloheptadieno para actuar como inhibidores competitivos de esta enzima, y describió la conformación molecular que permite que la región tricíclica que yace sobre las regiones hidrofóbicas del sitio activo mientras que la cadena lateral activa interactúa con los puentes de hidrógeno.

La habilidad de los neurolépticos de proteger a los eritrocitos de la hemólisis y su comportamiento lisosomotrópico son ejemplos de efectos no específicos mediados por un carácter catiónico o anfifílico. Existe un amplio rango de análogos estructurales (Tabla 11, y este autor examinó más detalladamente los requerimientos estructurales para a la actividad antileishmanial *in vitro*).

Tabla 11:
Actividad antileishmanial de compuestos tricíclicos *in vitro*

COMPUESTO	<i>L. amazonensis</i>		<i>L. donovani</i>	
	MAX.CEL. CLEAR	ED ₅₀ (μ M)	(RANGO)	ED ₅₀
Amitriptilina	100	12.1	(8.9-15.3)	14.0
Clomipramina	97	4.3	(2.3-6.3)	8.0
Cloropromacina	93	6.9	(6.3-7.5)	9.1
Desipramina	99	8.5	(7.8-9.1)	16.0
Dibenzepina	18	69*	(48-90)*	Inactivo
Doxepina	97	40.0	(29.6-50.2)	35.0
Flufenazina	77	5.4	(3.9-7.1)	9.3
Imipramina	99	14.3	(8.6-20.3)	16.2
Nortriptilina	93	5.5	(3.1-8.2)	10.0
Opipramol	64	20.0	(16.7-23.5)	28.7
Protriptilina	92	6.3	(4.0-8.6)	9.6
Tioridazina	97	4.4	(3.9-4.9)	ND
Trifluoperazina	97	3.7	(3.7-3.9)	5.3
Triflupromazina	83	6.7	(5.4-8.0)	7.6
Trimipramina	82	9.4	(6.2-12.9)	14.1

Todos los compuestos fueron >90% efectivos a su dosis máxima tolerada excepto el opipramol (64±3%) y dibenzepina (18±18%), * valores extrapolados fueron usados.

Todos los compuestos fueron >90% efectivos a su máxima dosis tolerada, excepto el pipramol ($64\pm 3\%$) y dibenzepina ($18\pm 18\%$),* valores extrapolados fueron usados.

Los compuestos tricíclicos antidepresivos y neurolépticos forman un interesante grupo que está cercanamente relacionado con los agentes que poseen una actividad antileishmanial *in vitro* (Tabla 11), y el presente estudio confirma que el grupo dibenzocicloheptadieno desarrolla un rango de potencia equivalente a las fenotiazinas y dibenzazepinas.

En la tabla 12 se muestran las estructuras de los antidepresivos tricíclicos y neurolépticos.

Una comparación de las actividades de la cloropromazina, amitriptilina e imiprimina sugieren que el núcleo fenotiazina confiere una mayor actividad que el anillo de dibenzocicloheptadieno.

Por lo que el autor concluye que esta potencia en este sistema refleja una toxicidad física no específica que involucra que los efectos de la estabilización membranal o la interacción con más de un receptor con un sitio activo anafípático.

Tabla 12:
Estructura de los antidepresivos tricíclicos
Y neurolépticos.

R ₁	R ₂	R ₃	Fenotiazina	Dibenzazepina	Dibenzocicloheptadieno
<chem>CH3(CH2)2N(CH3)2</chem>	<chem>C6H5</chem>	H		Desipramina	Nortriptilina
<chem>C6H5(CH2)2N(CH3)2</chem>	<chem>C6H5</chem> <chem>C6H4</chem>	H		Imipramina	Protriptilina
<chem>CH3</chem> <chem>C6H5(CH2)2N(CH3)2</chem>	<chem>CH3O</chem> <chem>C6H4(OCH2N(CH3)2)</chem> <chem>C6H4</chem>	Cl	Cloropromazina Trifluoperazina	Comipramina	Amitriptilina
<chem>(CH3)2N</chem> <chem>(CH2)6N(CH2)2OH</chem>	<chem>C6H5</chem>	H		Dibenzetipina Trazolopramina	Desipina
<chem>(CH2)6N</chem> <chem>(CH2)6N(CH2)2OH</chem>	<chem>C6H5</chem>	H	Flufenazina	Oponef	
<chem>(CH2)6N(CH2)2OH</chem>		<chem>CF3</chem>	Trifluoperazina		
		<chem>SO2</chem>			

Tomado y adaptado de Evans, 1994.

El estudio sugiere que los datos presentados, son útiles para generar un amplio rango de estructuras tricíclicas basados en la inclusión de un núcleo dibenzocicloheptadieno dentro de las estructuras analizadas.

8. 3'-deoxi-3'-fluorinosina.

Shin y un grupo de investigadores (1995), ha estudiado el efecto del 3'-deoxi-3'-fluorinosina (3'-FI) contra *L. donovani* y *L. tropica*.

De los cultivos *in vitro*, los valores de EC_{50} (concentración del fármaco necesaria para inhibir el índice de crecimiento de las células al 50% del valor control), obtenidas de 3'-FI contra los promastigotes de *L. tropica* y *L. donovani* fueron: 2.3×10^{-7} y 1.0×10^{-6} M, respectivamente. Esto resultó ser menos tóxico que en el ensayo realizado con células FM3A (células de tumores mamarios en ratones) que es un modelo del hospedero; la EC_{50} fue de 1.9×10^{-4} . Los promastigotes de *Leishmania* metabolizan al 3'-FI a 3'-deoxi-3'-fluoroadenosina-5'-trifosfato (3'-FATP) pero las células FM3A no. 3'-FI fue efectivo contra los amastigotes de *L. donovani* en la línea celular J774.1 en cultivos *in vitro* cuyas condiciones fueron similares a las utilizadas en el ensayo *in vivo*. 3'-FI (vía IV a una dosis de 50 mg/kg) mostró un efecto citotóxico contra los amastigotes de *L. donovani* en ratones.

Los análogos de purina pueden ser útiles en el tratamiento de leishmaniosis porque los parásitos son incapaces de sintetizar purinas de novo y entonces se vuelven dependientes del hospedero para el abastecimiento de purinas. (Nygaard,1983; Marr,1984; Marr,1985; Berman,1988). Esta diferencia entre el parásito y el hospedero sugieren un acercamiento racional hacia el diseño de agentes tóxicos selectivos hacia el parásito.

Se ha reportado que los análogos de azúcares de nucleósido de purina, inosina carboxílica y 3'-deoxiinosina, son efectivos contra promastigotes de *L. tropica in vitro*. Este efecto aumenta cuando estos análogos son convertidos, en su parte purínica, a adenosina y residuos tipo guanosina, de esta manera se vuelven citotóxicos y selectivos al parásito. Los análogos del anillo de purina, alopurinol ribósido, formicina B y 9-deazainosina, también han demostrado efectos antileishmaniales *in vitro e in vivo*.

En este estudio en particular, se reportó que el 3'-FI inhibe fuertemente *in vitro* el crecimiento de los promastigotes de *Leishmania* y el crecimiento *in vivo* de los amastigotes de *L. donovani* en ratón; pero es moderadamente tóxico en un modelo del hospedero (en células FM3A). Un nuevo sistema de cultivo *in vitro* que asemeja a condiciones *in vivo* ha sido reportado para *L. mexicana amazonensis* en células J774G8 (línea de macrófagos de ratón). Este grupo también estableció un cultivo *in*

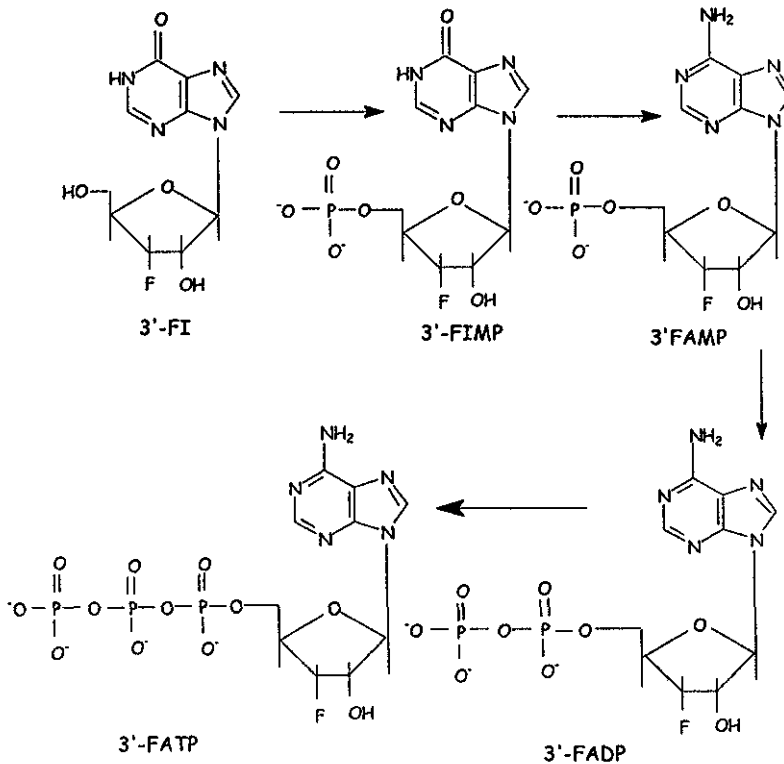
vitro para *L. donovani* en células J774.1 y se reporto en el presente que la 3'-FI tiene efectos antiparasitarios en los amastigotes de este sistema. Se investigó el metabolismo de la 3'-FI en la especie de *Leishmania* y muestran que el parásito convierte el inocuo 3'-FI al altamente citotóxico 3'-FATP, se propone el siguiente mecanismo:

- 1) La fosforilación del 3'-FI a 3'-FIMP, que podría ser catalizado por la nucleósido fosfotransferasa, la cual ha mostrado catalizar la fosforilación de 3'-Di.
- 2) Pasa de 3'-FIMP a 3'-FAMP, puede ser catalizada por enzimas que participan en la aminación de la inosina 5'-monofosfato a adenosina 5'-monofosfato.
- 3) La ruta desde 3'-FAMP a 3'-FATP podría ser catalizada por las enzimas responsables de la formación de ATP de la AMP (Figura 38).

Los agentes antileishmaniales han sido requeridos para tener un efecto contra las formas de amastigotes de *Leishmania*. Estos investigadores han desarrollado un sistema de cultivo en donde las condiciones de cultivo se asemejan a las situaciones *in vivo*. Con este método se reduce el costo y el tiempo consideradamente en comparación con la estimación *in vivo*.

Figura 38:

Metabolismo propuesto para el 3'-FI en promastigotes de *L. donovani*.



Para investigar la actividad antileishmanial de 3'-FI *in vivo*, estos investigadores infectaron ratones con *L. donovani*. Esta investigación demostró el rango de inhibición de los amastigotes de *L. donovani* en ratones tratados con 3'-FI via IV es comparable con el presentado por el Pentostam. El índice de inhibición del 3'-FI fue cerca del 74% en su administración a 50 mg/kg en ratones. Incrementos en el peso corporal, de

hígado y de bazo sugieren que no hay efectos colaterales del 3'-FI en ratones. El 3'-FI puede ser un candidato prometedor como un fármaco empleado en la quimioterapia contra las enfermedades causadas por las especies de *Leishmania*.

9. Análogos de la inosina.

La inhibición de la inosina carbocíclica (C-Ino), 3'-deosxiinosina (3'-dI) y 3'-deoxi-3'-fluoroinosina (3'-FI) a los amastigotes de *Leishmania donovani* ha sido investigado. Las células J774.1 (una línea celular de macrófagos de ratones) fueron cultivada en el medio GIT con lipopolisacáridos y hemina e infectados con el parásito (Morishige, 1995).

C-Ino (3 μ M) inhibió completamente y 3'-dI(30 μ M) redujo el 40% del índice de infección en el día 6 después de la infección. Pentostam resultó en un 38% del índice de la infección. La eficacia terapéutica de los análogos de los liposomas libres y en la formulación liposomal fue probada en ratones infectados con *L. donovani*. Los ratones fueron inyectados intravenosamente cinco tiempos en días alternativos, comenzando 2 días después de la infección. El tratamiento con los análogos de la inosina libres de C-Ino (100 mg/kg), 3'-dI (100 mg/kg) o 3'-FI (50 mg/kg) resultó en unas LDU (LDU: unidades de Leishman-Donovan) que fueron 94, 68 y 73% menor, respectivamente,

que los valores del control. El tratamiento con su correspondiente análogo en liposomas (10 mg/kg) causaron un decremento de 90,69 o 68 % de LDU respectivamente.

Los análogos de la inosina en liposomas fue inhibitorio a dosis un quinto a una décima parte de los análogos de la inosina libres. C-Ino tuvo el efecto inhibitorio más fuerte de los tres análogos probados *in vitro e in vivo*. El C-Ino en liposomas no tiene graves efectos colaterales, aunque el peso del bazo se incremento. Por lo que se podría usar en la quimioterapia de leishmaniosis.

Los análogos de la inosina (Figura 39): inosina carbocíclica (C-Ino), 3'-deoxiinosina (3'-dI) y 3'-deoxi-3'-fluoroinosina (3'-FI) son efectivos contra los promastigotes de *L. donovani in vitro* (Hiraoka,1986).

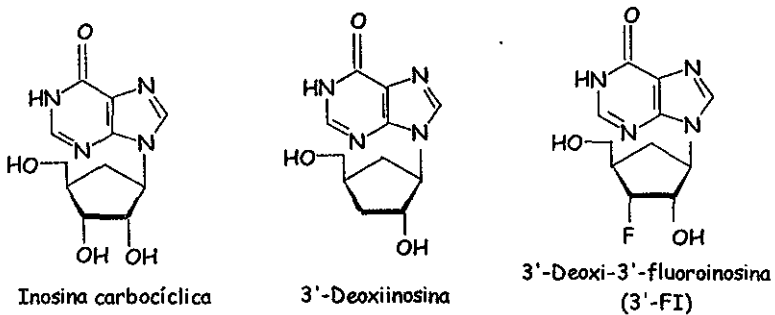
El cultivo *in vitro* se parece a las condiciones *in vivo* que han sido reportadas para *Leishmania mexicana amazonensis* en las células J774.1. También se ha establecido un nuevo sistema de cultivo para *L. donovani* en las células J774.1 y se reportaron los efectos parasitarios de C-Ino y 3'-dI en los amastigotes de este sistema.

El efecto terapéutico fue mayor cuando los agentes fueron atrapados en liposomas (Black,1977). Los fármacos así atrapados fueron sacados rápidamente de circulación

por las células reticuloendoteliales del hígado y bazo y se observó una disminución de la toxicidad porque fueron protegidos de la circulación.

Figura 39:

Estructura química de los análogos de la inosina.



De los resultados que obtuvieron estos investigadores; el que más sobresalió fue que el pretratamiento por C-Ino o 3'-dI no produjeron diferencias en la infectividad de promastigotes en el día 1 o en el índice de infección de los amastigotes en el día 6. El C-Ino y 3'-dI mostraron el mismo efecto del análogo carbocíclico de 2'-deoxyguanosina contra promastigotes: 0% en el índice de la infección de amastigotes en el día 6 a 3 μ M C-Ino, pero el 40% del índice de infección a 30 μ M 3'-dI.

La gran potencia de los análogos que se encuentran en los liposomas incrementa de la concentración en las células de Kupffer en el hígado, cuando ellos tienen un efecto

directo terapéutico en los parásitos. En contraste, los análogos de la inosina libres son dispersados por todo el cuerpo con sólo una fracción de la dosis inicial encontrada en hígado. El atrapamiento de C-Ino en liposomas a 10 mg/kg tienen efectos terapéuticos sin disminuir el peso corporal. C-Ino atrapado en liposomas promete como un agente antileishmanial.

10. Compuesto 86/450

Muchos nuevos tipos de lipopéptidos fueron sintetizados y evaluados por su habilidad para estimular una resistencia no específica contra las infecciones producidas por *L. donovani*. Los macrófagos aislados de la región peritoneal de jóvenes hámsters machos tratados con muramil dipéptidos (MDP) y varios lipopéptidos sintéticos (6mg/kgi.p.) por 7 días, fueron cultivados *in vitro* y después se llevo a cabo un reto 24 después con promastigotes de *L. donovani*. Un lipopéptido, sintetizado en el Instituto Central de Investigación de Fármacos (CDRI), compuesto 86/450, exhibió una más alta actividad inmunoestimuladora que el MDP. Esta actividad profiláctica fue confirmada en hámsters dándoles dos dosis de 3 mg/kg del compuesto espaciado a 2 semanas, por ejemplo, un día -7 y +7 del desafío o reto con *L. donovani* amastigotes. El efecto profiláctico tardó 7 días seguidos del último tratamiento con el compuesto

86/450. La acción antileishmanial del estibogluconato sódico (SAG) se encontró que se realiza en un 16% en hámsters primero con el compuesto 86/450 (Zehra, 1995).

Existen fármacos para la leishmaniosis visceral que son particularmente efectivos y potencialmente tóxicos. Desde que los pacientes infectados con *Leishmania* son inmunosuprimidos, la combinación de una terapia que incluya inmunoestimulantes ha sido planteada por ser más efectiva que la inmunoterapia o el tratamiento con el fármaco solos.

Por lo que éstos autores han estudiado la síntesis y la bioevaluación de péptidos inmunoestimulantes nuevos con el objetivo de identificar a un potente compuesto que pueda ser accesible para su incorporación en un régimen de inmunoestimulación combinado con quimioterapia para el tratamiento de la leishmaniosis visceral. Por lo que en primera instancia, una serie de análogos de muramil dipéptido (MDP) fue probada para observar su habilidad de estimular resistencia no específica en hámsters contra infecciones provocadas por *L. donovani*. En este estudio, un lipopéptido (86/450), el cual mostró una considerable inmunoprotección, fue investigado detalladamente y el MDP fue usado como fármaco de referencia.

Desde que la leishmaniosis se caracterizó por una marcada inmunosupresión y la inmunidad del hospedero es sinérgica a la eficacia del fármaco, un racional

acercamiento para combatir al parásito se ha llevado a cabo. Por lo que se ha puesto mucho interés en el estatus inmunológico del hospedero para mejorar el resultado terapéutico. Bajo estas circunstancias, el uso de inmunomoduladores en combinación con fármacos antileishmaniales es una buena proposición en el tratamiento de la leishmaniosis.

En investigaciones recientes llevadas a cabo por ellos, la combinación de inmunomoduladores glicopeptídicos análogos del MDP y SAG han sido esperanzadoras.

El compuesto 86/450 exhibió suficiente actividad *in vitro* para garantizar su ensayo en animales. De los dos modelos disponibles, se escogió el modelo con hámsters para este estudio, porque, a diferencia de la leishmaniosis visceral en ratones, la leishmaniosis visceral en hámsters es progresiva y uniformemente fatal y las respuestas a la quimioterapia se correlacionan muy bien con los humanos.

La administración del compuesto 86/450 a una simple dosis (día-7) o en la misma dosis entre dos (días -7, +7) causaron inmunopotenciación en hámsters, resultado en una pequeña carga parasitaria. Una dosis baja, (1.5 mg/kg x 2) fue inefectiva, así es que un total de 6 mg/kg en una simple o dos administraciones parecen ser óptimas para inducir la inmunopotenciación.

CONCLUSIONES

Basándose en las revisiones bibliográficas que se llevaron a cabo, se denota que la quimioterapia de ambas enfermedades se ve obstaculizado por diversos factores, entre ellos:

1. La toxicidad y los efectos colaterales que conlleva el uso de los fármacos.
2. La resistencia, en especial a los antimoniales pentavalentes.
3. Así, como a la falta de interés de las compañías farmacéuticas en llevar a cabo investigaciones para el desarrollo de nuevos fármacos; ya que la mayoría de los casos que se presentan es en áreas de pobreza extrema.

Sin embargo, se han encontrado alternativas para seguir usando los fármacos de primera línea; como :

1. Cambiando la duración del tratamiento, aunque se corre el riesgo de los efectos colaterales.
2. Se han desarrollado nuevas formulaciones de los fármacos, lo que ha guiado a un nuevo enfoque; tal es el caso de la anfotericina B.
3. Se emplea el uso de una terapia combinada.

Como se planteo en la introducción, el entendimiento de la bioquímica del parásito es un punto clave, porque revela los blancos de ataque.

En el caso del *Trypanosoma cruzi*, las investigaciones efectuadas en su metabolismo han dado importantes frutos. Han revelado, que la cruzaina esta involucrada en la relación existente entre el parásito y el hospedero, además de ser crucial en la nutrición del parásito.

Incluso, se han revelado otros blancos tales como: el glicosoma, el complejo Golgi; diversas enzimas como la tripanotiona reductasa, topoisomerasas, cisteína proteasa; además de la biosíntesis de esteroides.

En el caso de la *Leishmania spp.*, las investigaciones han revelado que la alanina es importante para la sobrevivencia del parásito en las células del hospedero.

Se han encontrado otros blancos de ataque como: los microtúbulos, síntesis de poliaminas, S-adenosil-homocisteína hidrolasa y biosíntesis de esteroides.

Me pareció que el mejor camino por el que se puede seguir desarrollando la investigación, es por la biosíntesis de esteroides; ya que se ha llevado a cabo un mayor

número de ensayos y sobre todo se ha establecido una ruta por la cual actúan los diversos fármacos sobre la biosíntesis.

Los compuestos cuyo mecanismo de acción no ha sido elucidado, en el caso de ambas enfermedades, son prometedores; por los siguientes motivos:

1. En la mayoría de los casos, son eficaces a bajas dosis.
2. El tratamiento dura poco tiempo.
3. Presentan una mayor actividad con relación a los fármacos de referencia.
4. Presentan una menor toxicidad y efectos colaterales.

La revisión guió hacia otro punto muy importante en el desarrollo de los fármacos, que es la evaluación de los mismos. En el caso de *Leishmania spp.* el empleo de cultivos axénicos agiliza la evaluación, además de disminuir el costo y el tiempo de la misma. En el caso de *Trypanosoma cruzi*, poco se ha avanzado en este punto (basándose en la revisión efectuada), prefiriéndose, en algunos casos, los métodos antiguos (que son caros y que requieren de un personal con una capacitación previa).

Se requiere de un mayor número de estudios para que los compuestos encontrados en la bibliografía salgan al mercado, pero el camino está trazado.

BIBLIOGRAFÍA.

- 1) OMS, Serie de Informes Técnicos. Control de la Enfermedad de Chagas. España, 1991.
- 2) Zaman, V. Hemoflagelados. En: Zaman, V. Atlas de Parasitología Clínica. 2da. Edición. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 1988. pp. 59 – 86.
- 3) Beck, W. J., Davies, E. J. Los flagelados (Mastigophora). En: Beck, W. J., Davies, E. J. Parasitología Médica. 3era. Edición. México: Nueva Editorial Interamericana; 1984, pp. 40 – 75.
- 4) Velasco-Castrejón, O.; Gúzman, B. C., et. Al. Enfermedad de Chagas. En: Valdespino, G. J., Velasco-Castrejón, O. *Enfermedades Tropicales en México, diagnóstico, tratamiento y distribución geográfica*. INDRE. SSA. 1994, pp. 279 – 292.
- 5) Mehlhorn, H., Piekarski, G. Flagelados-zooflagelados. En: Mehlhorn, H. Piekarski, G. Fundamentos de Parasitología. Parásitos del hombre y de los animales domésticos. 1era. edición. España: Editorial Acribia, S. A.; 1993. PP. 19 – 48.
- 6) Tay, Z.J., Lara, A. R., Velasco-Castrejón, O., et.al. Protozoosis transmitidas por artrópodos. En: Tay, Z.J., Lara, A. R., Velasco-Castrejón, O., et.al. Parasitología Médica. 6ta. Edición. México. Méndez Editores; 1998. pp. 107 – 130.
- 7) Tay, Z.J., Lara, A. R., Velasco-Castrejón, O., et.al. Leishmaniosis. En: Tay, Z.J., Lara, A. R., Velasco-Castrejón, O., et.al. Parasitología Médica. 6ta. Edición. México. Méndez Editores; 1998. pp.131-150.
- 8) Chance, L. M., Molyneux, H. D. The human trypanosomiasis (sleeping sickness and Chagas disease. *Current Opinion in Infectious Disease*. 1995; 8: 328 – 335.
- 9) García, S. L., Ash, R. L. Procedimientos para detectar parásitos en la sangre. Recuperación del parásito: métodos de cultivo, inoculación animal y xenodiagnóstico. En: García S. L., Ash, R. L. *Diagnóstico parasitológico. Manual de Laboratorio clínico*. 2ad, edición. Argentina: Editorial Médica Panamericana, S. A. 1983. pp. 56 – 74.

- 10) Velasco-Castrejón, O.; Gúzman, B. C., et. Al. Leishmaniasis. En: Valdespino, G. J.,; Velasco-Castrejón, O. Enfermedades Tropicales en México, diagnóstico, tratamiento y distribución geográfica. INDRE. SSA. 1994, pp. 293 – 308.
- 11) Croft, S. L., The current status of antiparasite chemotherapy. Parasitology. 1997; 114 (Suppl S): S3 – S15.
- 12) De Castro, S. L. The challenge of Chagas' disease chemotherapy and update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. Acta Tropica. 1993; 53: 83 – 98.
- 13) Budavary, S., O' Neil, J. M. The Merck Index, and encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 12ava. Edición. Estados Unidos: Merck & Co., Inc.; 1996.
- 14) Tracy, W. J. Webster, T.L. Infecciones causadas por protozoos: tripanosomiasis, leishmaniasis, amibiiasis. En: Hardman, J.G., Limbird, L.E. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9na edición, México: Mc Graw- Hill. Interamericana; 1996. pp 1049 – 1071.
- 15) Brener Z., Present status of chemotherapy and chemoprophylaxis of human trypanosomiasis in the Western Hemisphere. Pharmacol. Ther. 1979; 7: 71 – 90.
- 16) Litter, M. Quimioterapia de la tripanosomiasis. Americana y africana. Antagonistas de los metales pesados En: Litter, M. Compendio de Farmacología. 4ta. Edición, Argentina: Librería El Ateneo Editorial; 1988. pp. 818 – 820.
- 17) Reynolds, J. E. F. Metronidazole and some other antiprotozoal. En: Reynolds, J. E. F. Martindale. The Extra Pharmacopeia. 28ava. Edición. Inglaterra: The Pharmaceutical Press; 1982. pp. 968 – 985.
- 18) Barclay, C. C., et. al. Current Chemotherapy. Vol. I, W. Siegenthaler and R. Luthy (Ed.), Washington, American Society of Microbiology. 1978, 158.
- 19) Coura, R., et. Al. Current Chemotherapy. Vol. 1, W. Siegenthaler and R. Luthy (Ed.), Washington, American Society of Microbiology. 1978, 161.
- 20) Espada, M., Avendaño, C. Fármacos que actúan sobre receptores intracelulares (II). Fármacos que interaccionan con los ácidos nucleicos. En: Avendaño, C. Introducción a la

Química Farmacéutica. 3era. Reimpresión, España: Interamericana-McGraw-Hill; 1996. pp. 525 – 548.

21) Contreras, M. L., Vivas, J., et. al. Altered lipid composition and enzyme activities of plasma membrane from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes grown in the presence of sterol biosynthesis inhibitors. *Biochemical Pharmacology*. 1997; 53: 697 – 704.

22) Olliaro, P. L., Bryceson, A. D. M. Practical progress and new drugs for changing patterns of *Leishmaniasis*. *Parasitology Today*. 1993; 9: 323 – 328.

23) Urbina, J. A., Marchan, E., et. al. Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis and cell proliferation in *Trypanosoma cruzi* by ajoene, an antiplatelet compound isolated from garlic. *Biochemical Pharmacology*. 1993; 45: 2381 – 2387.

24) Goad, J. L., Berens, R. L., et. al. The activity of ketoconazole and other azoles against *Trypanosoma cruzi*: biochemistry and chemotherapeutic actions *in vitro*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 1989; 32: 179 – 190.

25) Maldonado R. A., Molina, J., et. al. Experimental chemotherapy with combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors in murine of Chagas disease. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. 1993; 37: 1353 – 1359.

26) Bodley, L. A., Shapiro, A. T. Molecular and cytotoxic effects of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, on trypanosomes and *Leishmania*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995; 92: 3726 – 3730.

27) Corey, E. J., Crouse, D. N., et. Al. A total synthesis of natural 20(S)-camptothecin. *J. Org. Chem*. 1975; 40: 2140 – 2141.

28) Teixeira, R. L., Calixto, M. A. Chagas' disease: carcinogenic activity of the antitrypanosomal nitroarenes in mice. *Mutation Research*. 1994;305 : 189–196.

29) Brener, Z., Cancado, J. R., et. al. An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1993; 88: 149 – 153.

30) McCarthy, M. Drug eradicates Chagas parasite in mice. *Lancet*. 1996; 348: 534.

- 31) Zuna, H. La Fuente; C., et. al. Prospective studies on the transmission of *Trypanosoma cruzi* by blood transfusion in Bolivia. *Ann. Soc. Belge. Med. Trop.* 1985; 65 (suppl 1): 107 – 113.
- 32) Souza, H. M. The present state of chemoprophylaxis in transfusional Chagas' disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1989; 22: 1 – 3.
- 33) Chiari, E., Oliveira, A. B., et. al. Potencial use of WR6026 as prophylaxis against transfusion-transmitted american tripanosomiasis. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy.* 1996; 40: 613 – 615.
- 34) Kinnamon, E. K., Poon, B. T., et. al. Evidence that certain 8-aminoquinolines are potentially effective drugs against Chagas disease. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology.* 1997; 91: 147 – 152.
- 35) Kierzenbaum, F. The chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infections (Chagas' Disease). En: Mansfield, J. M. *Parasitic Diseases, Vol. 2, The Chemotherapy.* Estados Unidos: Marcel Dekker; 1984. pp. 136 – 163.
- 36) McCabe, R. E. Primaquine is lethal for intracellular but not extracellular *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Parasitology.* 1988; 74: 748 – 753.
- 37) Clark, A. M. Baker, J. K., et. al. Excretion, distribution, and metabolism of primaquine in rats. *Journal of Pharmaceutical Sciences.* 1984; 73: 502-506.
- 38) Lane, E. J., Ribeiro-Rodrigues, R., et. al. *In vitro* trypanocidal activity of Tetraethylthiuram disulfide and sodium diethylamine-carbodithioate on *Trypanosoma cruzi*. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene.* 1996; 55:263 – 266.
- 39) Majumder, S., Kierszenbaum, F. N,N' – thiophene-substituted polyamine analogs inhibit mammalian host cell invasion and intracellular multiplication of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular & Biochemical Parasitology.* 1993; 60: 231 – 239.
- 40) Roberts, W. L., Rainey, P. M. Anti-leishmanial activity of sodium stibogluconate fractions. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy.* 1993; 37: 1842 – 1846.

- 41) Li, J., Sutterwala, S., et. al. Successful therapy of chronic, nonhealing murine cutaneous leishmaniasis with sodium stibogluconate and gamma interferon depends on continued interleukin-12 production. *Infection & Immunity*. 1997; 65: 3225 – 3230.
- 42) Badaro, R., Johnson, W. D. The role of interferon gamma in the treatment of visceral and diffuse cutaneous leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 1993; 167 (suppl 1): S13 – S17.
- 43) Badaro, R., Falcoff, E., et. al. Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. *New England Journal of Medicine*. 1990; 322: 16 – 17.
- 44) Harms, G., Zwingenberger, K., et. al. Immunochemotherapy of visceral leishmaniasis: a pilot trial of sequential treatment with recombinant interferon-gamma and pentavalent antimony. *J. Interferon Res.* 1993; 13: 39 – 41.
- 45) Bottasso, O., Cabrini, J., et. al. Successful treatment of an antimony-resistant american mucocutaneous leishmaniasis: a case report. *Arch. Dermatol.* 1992; 128: 996 – 997.
- 46) Soto-Mancipe, J., Grogil, M., et. al. Evaluation of pentamidine for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Columbia. *Clin. Infect. Dis.* 1993; 16: 417 – 425.
- 47) Berman, J. D., Ksionski, G., et. al. Activity of amphotericin B cholesterol dispersion (Amphocil) in experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1992; 36: 1978 – 1980.
- 48) Coukell, A. S., Brogden, R. N. Liposomal amphotericin B-therapeutic use in the management of fungal infections and visceral leishmaniasis. *Source Drugs*. 1998; 55: 585– 612.
- 49) Yardley, V., Croft, S. L. Activity of liposomal amphotericin B against experimental cutaneous leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997; 41: 752 – 756.
- 50) Proffitt, R. T., Satorius, A., et. al. Pharmacology and toxicology of a liposomal formulation of amphotericin B (Ambisome) in rodents. *J. Antimicrob. Chemother.* 1991; 28 (Sup B): 49–61.
- 51) Ringdén, O., Meunier, F., et. al. Efficacy of amphotericin B encapsulates in liposomes (Ambisome) in the treatment of invasive fungal infections in immunocompromised patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 1991; 28 (Suppl. B): 73 – 82.

- 52) Berman, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis.* 1997; 24: 684 – 703.
- 53) Davidson, R. N., di Martino, L., et. al. Liposomal amphotericin B (Ambisome) in Mediterranean visceral leishmaniasis: a multi-centre trial. *Q. J. Med.* 1994; 87: 75 – 81.
- 54) NeXstar Pharmaceuticals Inc. Ambisome® (liposomal amphotericin B. P.): product monograph. Boulder, Colorado, USA, 1995.
- 55) NeXstar Pharmaceuticals Limited. Ambisome: summary of product characteristics. Cambridge, England. 1996 Feb 07.
- 56) Poli, A., Sozzi, S. Comparison of aminosidine (paromomycin) and sodium atibogluconate for treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology.* 1997; 71: 263 – 271.
- 57) Negre, E., Chance, M. L., et. al. Antileishmanial drug targeting through glycosylated polymers specifically internalized by macrophage membrane lectins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1992; 36: 22228 – 2232.
- 58) Cantos, G., Barbieri, C. L., et. al. Synthesis of antimony complexes of yeast mannan and mannan derivatives and their effect on *Leishmania*-infected macrophages. *Biochem. J.* 1993; 289: 155 – 160.
- 59) Yang, D. M., Liew, F. Y. Effects of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives on experimental leishmaniasis. *Parasitology.* 1993; 106: 7 – 11.
- 60) Kuhlencord, A., Maniera, T., et. al. Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1992; 36: 1630 – 1634.
- 61) Haughan, P. A., Chance, M. L., et. al. Synergism *in vitro* of Lovastatin and Miconazole as anti-leishmanial agents. *Biochem. Pharmacol.* 1992; 44: 2199 – 2206.
- 62) Croft, S. L., Neal, R. A., et. al. The activity of platinum, iridium and rhodium drug complexes against *Leishmania donovani*. *Trop. Med. Parasitol.* 1992; 43: 24 – 28.

- 63) Halim, M. A., Alfurayh, O., et. al. Successful treatment of visceral leishmaniasis with allopurinil plus ketoconazole in a renal transplant recipient after the occurrence of pancreatitis due to stibogluconate. *Clin. Infect. Dis.* 1993; 16: 397 – 399.
- 64) Hergwaldt, B. L., Berman, J. D. Recommendations for treating Leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *Am J. Trop. Med.* 1992; 46: 296 – 306.
- 65) Hergwaldt, B. L., Neva, F. A., et. al. Allopurinol in the treatment of american cutaneous leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.* 1992; 327: 498 – 499.
- 66) Mishra, M., Biswas, U. K., ET. AL. Amphotericin versus pentamidine in antimony-unresponsive Kala-azar. *Lancet.* 1992; 340: 1256 – 1257.
- 67) Zijlstra, E. E., Siddig A. M., et. al. Clinical aspects of Kala-azar in children from the Sudan: A comparison with the Disease in adults. *J. Trop. Pediatr.* 1992; 38: 17 – 21.
- 68) Medrano, F. J., Hernández-Quero, J., et. al. Visceral leishmaniasis in HIV-1 infected individuals: a common opportunistic infection in Spain AIDS. 1992; 6: 1499 – 1503.
- 69) Grogl, M., Thomason, T. N., et. al. Drug resistance in Leishmaniasis: its implications in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1992; 47: 117 – 126.
- 70) El-On, J., Halevy, S, et. al. Tropical treatment of old world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*: A double-blind control study. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1992; 27: 227 – 231.
- 71) Thakur, C. P., Olliaro, P., et. al. Treatment of visceral leishmaniasis (Kala-azar) with aminosidine (Paromomycin)-antimonial combinations, a pilot study in Bihar, India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1992; 86: 615 – 616.
- 72) Chan, M. M., Fong, D. Plant microtubule inhibitors against Trypanosomatids. *Parasitology Today.* 1994; 10: 448 – 451.

- 73) Fong, D., Chang, K. P. Tubulin biosynthesis in the development cycle of a parasite protozoan, *Leishmania mexicana*: changes during differentiation of motile and nonmotiles stages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981; 78: 7624 – 7628.
- 74) Fong, D., Lee, B. Beta tubulin gene of the parasite protozoan *Leishmania mexicana*. Mol. Biochem. Parasitol. 1988; 31: 97 – 106.
- 75) Kimmel, B. E., Samson, S. Tubulin genes of the African trypanosome *Trypanosoma brucei rhodesiense*: nucleotide sequence of a 3.7-kb fragment containing genes for alpha and beta tubulins. Gene. 1985; 35: 237– 248.
- 76) Chan, M. M. Fong D. Inhibition of leishmanias but not host macrophages by the antitubulin herbicide trifluralin. Science. 1990; 249: 924 – 926.
- 77) Chan M. M., Tzeng, J., et. al. Structure-function analysis of antimicrotubule dinitroanilines against promastigotes of the parasitic protozoan *Leishmania mexicana*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1993; 37: 1909 – 1913.
- 78) Ellenberger, T. E., Beverly, S. M. Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania major*. J. Biol. Chem. 1989; 264: 15094 – 15103.
- 79) Chan, M. M. Y., Grogl, M. Efficacy of the herbicide Trifluralin against four P-glycoprotein-expressing strains of *Leishmania*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1995; 39: 1609 – 1611.
- 80) Chan M. M., Grogl, M., et. al. Herbicides to curb human parasitic infections- *in vitro* and *in vivo* effects of trifluralin on the Trypanosomatid protozoans. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993; 90: 5657 – 5661.
- 81)) Chan, M. M., et. al. Herbicides to curb human parasitic infections: *in vitro* and *in vivo* effects of trifluralin on the trypanosomatid protozoans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993; 90: 5657 – 5661.
- 82) Chan, M. M., Triemer, R. E., et. al. Effect of the antimicrotubule drug oryzalin on growth and differentiation of the parasitic protozoan *Leishmania mexicana*. Differentiation. 1991; 46: 15 – 21.

- 83) Chen, M., Christensen, S. B., et. al. The novel oxygenated chalcone, 2,4-dimethoxy-4'-butoxychalcone, exhibits potent activity against human malaria parasite *Plasmodium falciparum* *in vitro* and rodent parasites *Plasmodium yoelli* *in vivo*. *JID*. 1997; 176: 1327 – 1333.
- 84) Chen, M., Christensen, S. B., et. al. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1993; 37: 2550 – 2556.
- 85) Chen, M., Christensen, S. B., et. al. Antileishmanial activity of licochalcone A in mice infected with *Leishmania major* and in hamsters infected with *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994; 38: 1339 – 1344.
- 86) Zhai, L., Blom, J., et. al. The antileishmanial agent licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1995; 39: 2724 – 2748.
- 87) Beach, H. D., Chen, F., et. al. Effects of steroidal allenic phosphonic acid derivatives on the parasitic protists *Leishmania donovani*, *Leishmania mexicana mexicana* and *Pneumocystis carinii carinii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997; 41: 162 – 168.
- 88) Engel, R. Phosponic acids and phosphonates as antimetabolites. En: Hielderbrand, R.L. The role of phosphonates in living systems. Boca Raton: CRC Pres, INC, 1983. Pp. 97 – 138.
- 89) Da Silva, S. A. G., Costa, S. S., et. al. Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. *Acta Tropica*. 1995; 60: 201 – 210.
- 90) Misra, S. B., Dixit, S. N. Antifungal activity of leaf extracts of some higher plants. *Acta Botanica Indica*. 1979; 7: 147 – 150.
- 91) Pal, S., Chaudhuri, A. K. Further studies on the anti-inflammatory profile of the methalic fraction of the fresh leaf extract of *Bryophyllum pinnatum*. *Fitoterapia*. 1992; 63: 451 – 459.
- 92) Gaiind, K. N., Singla, A. K., et. al. Flavonoid glycosides of *Kalanchoe spathulata*. *Phytochem*. 1981; 20: 530 – 531.
- 93) Pathak, D., Pathak, K., et. al. Flavonoids as medicinal agents- Recent advances. *Fitoterapia*. 1991; 62: 371 – 389.

- 94) Behforouz, N. C., Wnger, C. D. Immunomodulation of murine leishmaniasis with cyclosporin A. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1988; 239: 379 – 384.
- 95) Howard, J. G., Hale, C., et. al. Immunological regulation of experimental cutaneous leishmaniasis. IV. Prophylactic effect of sublethal irradiation as a result of abrogation of suppressor T cell generation in mice genetically susceptible to *Leishmania tropica*. *J. Exp. Med.* 1981; 153: 557– 568.
- 96) Moraes, V. L., Santos, L. F. M., et. al. Inhibition of lymphocyte activation by extracts and fractions of *Kalanchoe*, *Althernanthera*, *Paullinia* and *Mikania* species. *Phytomedicine*. 1994; 1: 199 – 204.
- 97) Fournet, A., Ferrelra, M. A., et. al. Activity of compounds isolated from chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis. *Comp. Biochem. Physiol.* 1997; 116C: 51 – 54.
- 98) Kandpal, M., Babu, L. T., et. al. Correlation between inhibition of growth and arginine transport of *Leishmania donovani* promastigotes *in vitro* by diamidines. *Life Sciences*. 1996; 59: PL 75 – 80.
- 99) Bera, T. The guanidinobutyramide pathway of L-arginine catabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1987; 23: 183– 192.
- 100) Fouce, R. B., Ordóñez, D., et. al. Putrescine transport system in *Leishmania infatum* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1989; 35: 43-50.
- 101) Evans, T. A., Croft, L. S. Antileishmanial actions of tricyclic neuroleptics appear to lack structural specificity. *Biochemical Pharmacology*. 1994; 48: 613-616.
- 102) Pearson, R. D., Marian, A. A., et. al. Antileishmanial activity of chlorpromazine. *Science*. 1982; 217: 369 – 371.
- 103) Zilberstein, D., Dwyer, D. N. Antidepressants cause lethal disruption of membrane function in the human protozoal parasite *Leishmania*. *Science*. 1984; 226: 997 – 999.
- 104) Benson, T. J., Mchie, L. E., et. al. Rationally designs selective inhibitors of trypanothione reductase. *Biochem. J.* 1992; 286: 9 – 11.

- 105) Shin, S. I., Tanifuji, H., et. al. 3'- Deoxy-3' -fluorinosine as a potent antileishmanial agent. The metabolism and selective cytotoxic effect of 3'- deoxy- 3' -fluorinosine against *Leishmania tropica* and *L. donovani* *in vitro* and *in vivo*. Parasitol. Res. 1995; 81: 622 – 626.
- 106) Nygaard, P. Utilization of preformed purine base and nucleosides. En: Munch-Peterson, A. Metabolism of nucleotides, nucleosides and nucleobases in microorganisms. USA: Academic Press, 1983. Pp. 27 – 93.
- 107) Marr, J. J., Berens, R. L. Biological action of inosine analogs in *Leishmania* and *Trypanosoma spp.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1984; 25: 292 – 295.
- 108) Marr, J. J., Berens, R. L. Purine and pyrimidine metabolism in *Leishmania*. En: Chang, K. P., Bray, R. S. Leishmaniasis. Amsterdam: Elsevier Science, 1985. Pp. 65 – 78.
- 109) Berman, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. Rev. Infect. Dis. 1988; 10: 560 – 586.
- 110) Morishige, K., Aji, T., et.al. *Leishmania donovani*: pilot study for evaluation of therapeutic effects of inosine analogs against amastigotes *in vitro* and *in vivo*. Experimental Parasitology. 1995; 80: 665 – 671.
- 111) Hiraoka, O., Satake, H., et. al. Carbocyclic inosine as a potent anti-leishmanial agent: the metabolism and selective cytotoxic effects of carbocyclic inosine in promastigotes of *Leishmania tropica* and *Leishmania donovani*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1986; 134: 1114 – 1121.
- 112) Black, C. D., Warson, G. J., et. al. The use of Pentostam liposomes in the chemotherapy of experimental leishmaniasis. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1977; 71: 550 – 552.
- 113) Zehra, K., Pal, R., et. al. *Leishmania donovani* in hamsters-stimulation of non-specific resistance by novel lipopeptides and their effect in antileishmanial therapy. Experimentia. 1995; 51: 725 – 730.