



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Análisis del efecto de los compuestos H₂Salbu, H₄Salbu,
CuClH₄ y ClH₄bu sobre la viabilidad de *Leishmania
mexicana*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ROSA ISELA LÓPEZ PALMA



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. INGEBORG DOROTHEA BECKER
FAUSER
CIUDAD DE MÉXICO 2019**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

1. Datos del alumno
López
Palma
Rosa Isela
55 13 11 83 03
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
310119652

2. Datos del Asesor
Dra
Becker
Fauser
Ingeborg Dorothea

3. Datos del sinodal 1
Dra
Lena
Ruiz
Azuara

4. Datos del sinodal 2
Dr
José Sotero
Delgado
Domínguez

5. Datos del sinodal 3
Dra
Ingeborg Dorothea
Becker
Fauser

6. Datos del sinodal 4
Dra
Ana María
Fernández
Presas

7. Datos del sinodal 5

M en C

Ronna

Delgado

Altamirano

8. Datos del trabajo escrito

Análisis del efecto de los compuestos H_2Salbu , H_4Salbu , $CuClH_4$ y ClH_4bu sobre la viabilidad de *Leishmania mexicana*

43 p

2019

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunoparasitología
de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina
(UNAM)

AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto fue apoyado por los donativos PAPIIT IN211418 y PAPIIT IG200616.

A la Dra. Ingeborg Becker Fauser por su asesoría y apoyo en la realización de este trabajo de investigación.

Al Dr. José Sotero Delgado Domínguez de la Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina UNAM por su apoyo técnico y académico en la realización del proyecto.

A los miembros del jurado del examen profesional: Dra. Lena Ruiz Azuara, Dr. José Sotero Delgado Domínguez, Dra. Ingeborg Becker Fauser, Dra. Ana María Fernández Presas y M. en C. Q. Ronna Delgado Altamirano por la revisión del presente trabajo y sus valiosas aportaciones.

A la M. en C. Rocely Buenaventura Cervantes Sarabia de la Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina UNAM, por las facilidades otorgadas para la disposición de los cultivos de *Leishmania mexicana*.

Al Dr. Jaime Zamora Chimal de la Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina UNAM por el apoyo académico y el asesoramiento en la redacción del escrito.

Al Biól. Juan Carlos Muñoz Herrera por su apoyo en la parte experimental del proyecto.

Al Sr. Marco Elías Gudiño Zayas por su apoyo en la toma de fotografías para el proyecto.

Al HT. Alfredo Amadeo Díaz Estrada por su ayuda en el procesamiento de las muestras de tejido.

A la Biól. Nadia Joselyne Soto Olgúin por su asesoramiento en la redacción del escrito.

A la Sra. Zaide Jazmín Rivera Saldaña por mantener siempre el material de laboratorio en perfectas condiciones.

A los técnicos del Bioterio de la Unidad de Medicina Experimental: Ricardo Vargas Orozco, Alejandro Reza García y Guillermo Blancas por las facilidades otorgadas para la disposición de los animales de laboratorio.

DEDICADA A:

A mis padres y hermanos por su amor, confianza y apoyo incondicional

A Santiago por ser fuerza e inspiración cada día de mi vida

Índice General

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 1 |
| CAPÍTULO 1 GENERALIDADES | 2 |
| INTRODUCCIÓN | 2 |
| 1.1 Ciclo de vida | 3 |
| 1.2 Distribución del género <i>Leishmania</i> | 5 |
| 1.3 Formas clínicas | 6 |
| A) Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL) | 6 |
| B) Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD)..... | 7 |
| C) Leishmaniasis Mucocutánea (LMC)..... | 8 |
| D) Leishmaniasis Visceral (LV)..... | 9 |
| 1.4 Respuesta inmune en la leishmaniasis y el papel de los macrófagos en la enfermedad | 10 |
| 1.5 Macrófagos de línea celular RAW 264.7 | 11 |
| 1.6 Tratamiento | 11 |
| 1.7 Bases de Schiff..... | 14 |
| 1.8 Descripción de los compuestos H ₂ Salbu, H ₄ Salbu, CuClH ₄ y ClH ₄ bu | 16 |
| 1.9 “La regla de 5” de Lipinski..... | 17 |
| CAPÍTULO 2 JUSTIFICACIÓN | 18 |
| CAPÍTULO 3 HIPOTÉISIS | 19 |
| CAPÍTULO 4 OBJETIVOS | 19 |
| 3.2 Objetivo General..... | 19 |
| 3.2.1 Objetivos Particulares | 19 |
| CAPÍTULO 5 MATERIALES Y MÉTODOS..... | 20 |
| 5.1 Cultivo de parásitos..... | 20 |
| 5.2 Tratamiento con H ₂ Salbu, H ₄ Salbu, CuClH ₄ y ClH ₄ bu sobre promastigotes de <i>L. mexicana</i> | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 5.3 Tratamiento con los compuestos H ₂ Salbu, H ₄ Salbu, CuClH ₄ y ClH ₄ bu sobre macrófagos de la línea celular RAW 264.7 | 22 |
| 5.4 Sobrevida de promastigotes de <i>L. mexicana</i> | 23 |
| 5.5 Análisis del efecto <i>in vivo</i> que ejercen los compuestos H ₂ Salbu, H ₄ Salbu y CuClH ₄ en la infección del cojinete plantar de ratones BALB/c causada por <i>L. mexicana</i> | 24 |
| 5.6 Análisis de los compuestos H ₂ Salbu, H ₄ Salbu, CuClH ₄ y ClH ₄ bu con el programa MarvinSketch | 25 |
| 5.7 Prueba estadística | 25 |
| CAPÍTULO 6 RESULTADOS..... | 26 |
| 6.1 Análisis del efecto de los compuestos H ₂ Salbu, H ₄ Salbu, CuClH ₄ y ClH ₄ bu en el número de promastigotes de <i>L. mexicana</i> a las 48 horas de tratamiento | 26 |
| 6.3 Análisis de sobrevida intracelular de <i>L. mexicana</i> | 30 |
| 6.4 Análisis del efecto <i>in vivo</i> de los compuestos H ₂ Salbu, H ₄ Salbu y CuClH ₄ | 32 |
| 6.5 Análisis de los compuestos H ₂ Salbu, H ₄ Salbu, CuClH ₄ y ClH ₄ bu con el programa MarvinSketch | 34 |
| CAPÍTULO 7 DISCUSIÓN..... | 35 |
| CAPÍTULO 8 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS | 38 |
| BIBLIOGRAFÍA | 39 |

ACRÓNIMOS Y ABREVIACIONES

| | |
|----------------------|--|
| ADP | Adenosín difosfato |
| AnB | Anfotericina B |
| CI ₅₀ | Concentración inhibitoria 50 |
| ClH ₄ bu | C ₁₈ H ₂₂ N ₂ O ₂ Cl ₂ |
| CR1 | Receptor de Complemento 1 |
| CR3 | Receptor de Complemento 3 |
| Cu | Cobre |
| CuClH ₄ | Cu(C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₂ Cl ₂) 2H ₂ O |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| H ₂ Salbu | C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₂ |
| H ₄ Salbu | C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₂ |
| IL-4 | Interleucina 4 |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IFN-γ | Interferón gamma |
| LAC | Cepa Lacandona |
| LC | Leishmaniasis Cutánea |
| LCD | Leishmaniasis Cutánea Difusa |
| LCL | Leishmaniasis Cutánea Localizada |
| <i>L. mexicana</i> | <i>Leishmania mexicana</i> |
| LMC | Leishmaniasis Mucocutánea |
| LogP | Coefficiente de partición |
| LPG | Lipofosfoglicano |
| LV | Leishmaniasis Visceral |
| mm | Milímetros |
| nM | Nanomolar |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| PBS | Solución salina amortiguada por fosfatos |
| PM | Peso Molecular |
| PRRs | Receptores para el Reconocimiento de Patrones Moleculares |
| SBF | Suero Fetal Bovino |
| Sb ^v | Antimoniales pentavalentes |
| T CD4 | Linfocitos T (CD4) |
| T CD8 | Linfocitos T (CD8) |
| TNF-α | Factor de Necrosis Tumoral alfa |
| TLR2 | Receptores Tipo Toll 2 |
| μm | Micrómetro |
| μM | Micromolar |

RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad desatendida a nivel mundial que afecta principalmente a sectores pobres de la población. Los fármacos comúnmente empleados como tratamiento para la enfermedad suelen ser tóxicos y costosos, además, en la actualidad está aumentando la resistencia del parásito a los fármacos disponibles en el mercado. En este trabajo se analizó el efecto que ejercen 3 ligantes (moléculas con capacidad de unirse a un átomo de metal por poseer pares de electrones no compartidos) sobre la viabilidad de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana*. Uno de los ligantes es una base de Schiff (H_2Salbu), dos son ligandos hidrogenados (H_4Salbu y ClH_4bu). Además se analizó un compuesto coordinado con un centro metálico de cobre ($CuClH_4$). Los resultados demostraron que todos los compuestos tienen actividad leishmanicida *in vitro*, el efecto se observó directamente contra promastigotes. Adicionalmente se observó una reducción en la sobrevivencia de amastigotes intracelulares dentro de macrófagos, mostrando selectividad contra el parásito sin afectar la viabilidad de macrófagos de la línea celular RAW 264.7. Se demostró que todos los compuestos cumplen con la regla de 5 de Lipinski, la cual determina si un compuesto puede pasar la membrana de las células. Por último, se analizaron los efectos de los compuestos *in vivo* en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*. Los resultados mostraron que bajo el esquema utilizado, los compuestos no tuvieron efecto sobre la evolución de la enfermedad.

Nuestros resultados *in vitro* sugieren que los ligandos y el compuesto con centro metálico que fueron evaluados, pueden ser agentes leishmanicidas y representan una opción terapéutica contra la leishmaniasis, sin embargo, hace falta estudiar detalladamente su efecto *in vivo*.

Capítulo 1

GENERALIDADES

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad tropical desatendida a nivel mundial, afecta principalmente a las poblaciones más pobres del planeta (OMS, 2010). Se considera como la segunda causa principal de muerte relacionada con parásitos, después de la malaria (Kevric *et al.*, 2015). La leishmaniasis es causada por parásitos protozoos intracelulares del género *Leishmania*, que son transmitidos por flebótomos del género *Phlebotomus* en el viejo mundo (África, Asia, Medio Oriente y el Mediterráneo) y del género *Lutzomyia*, en el nuevo mundo (América) (Mitropoulos *et al.*, 2010).

Las diferentes especies del género *Leishmania* producen un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que van desde úlceras cutáneas hasta graves afectaciones viscerales y desfiguración facial (Pigott *et al.*, 2014). La Organización Mundial de la Salud estima que alrededor de 12 millones de personas a nivel mundial están infectadas (Mitropoulos *et al.*, 2010; Teixeira., 2013) y que existen 350 millones de personas en riesgo de contraerla, generándose 2 millones de casos nuevos cada año (OMS., 2010). En México, los estados más afectados son los del sureste, donde la manifestación clínica más común es la leishmaniasis cutánea localizada causada por *Leishmania mexicana* y representa el 99% de los casos nuevos (Zetina., 2008).

1.1 Ciclo de vida

Los parásitos del género *Leishmania* son protozoarios unicelulares dimorfos de la familia *Trypanosomatidae*, que poseen un complejo ciclo de vida. Requieren de dos hospederos, un flebótomo hembra y un vertebrado para completar su ciclo de vida. En el flebótomo se encuentra el estadio flagelado conocido como promastigote (la forma extracelular, fusiforme y flagelada, que mide entre 15 y 20 μm de largo por 1.5 a 4 μm de ancho, con un núcleo central) y en el hospedero vertebrado se encuentra el estadio sin flagelo conocido como amastigote (forma intracelular obligada, oval y aflagelada, que mide 5 μm de diámetro, con núcleo excéntrico y un cinetoplasto).

El ciclo de vida del parásito inicia cuando un flebótomo infectado se alimenta de la sangre de un vertebrado inoculando a los promastigotes. La mordedura del flebótomo induce una rápida infiltración de neutrófilos seguido por el reclutamiento de macrófagos al sitio de infección. Los macrófagos internalizan al parásito por fagocitosis y lo incorporan en un fagosoma conocido como vacuola parasitófora. Dentro de la vacuola, el promastigote se diferencia a amastigote, quien prolifera con rapidez hasta provocar la lisis del macrófago, liberando amastigotes que pueden infectar a otras células o ser ingeridos por el vector al momento de alimentarse, cerrando de esta manera el ciclo de vida (Kaye & Scott, 2011; Teixeira, 2013).

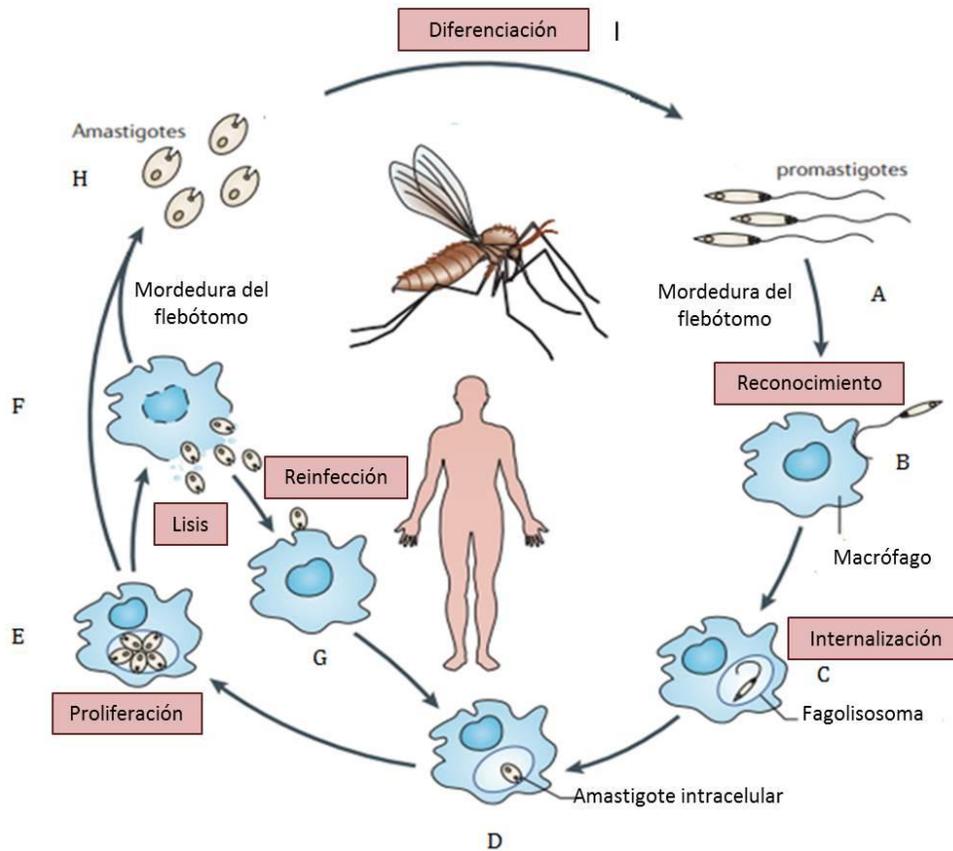


Figura 1. **Ciclo de vida de *Leishmania*.** A) El flebotomo inocula promastigotes en el vertebrado al momento de alimentarse. B) Reconocimiento del parásito por un macrófago. C) Internalización del parásito en una vacuola parasitófora. D) Diferenciación de promastigote a amastigote. E) Proliferación del amastigote dentro de la vacuola parasitófora. F) Ruptura del macrófago y liberación de parásitos (G). Fagocitosis de amastigotes libres por un macrófago sano. H) Amastigotes libres que pueden ser ingeridos por un flebotomo sano al ingerir sangre. I) Diferenciación a promastigotes dentro del vector. Tomado y modificado de Kaye & Scott., 2011.

1.2 Distribución del género *Leishmania*

Las diferentes especies del género *Leishmania* se distribuyen en 88 países en todo el mundo, principalmente en el Centro y Sur de América, África, Asia y el Sur de Europa. Más del 90% de todas las infecciones potencialmente fatales ocurren en seis países: Brasil, Etiopía, Sudán, Sudán del Sur, India y Bangladesh (Pigott *et al.*, 2014).

En México, la leishmaniasis es una enfermedad que afecta a 13 estados del país, los cuales se agrupan en tres regiones: Región del Golfo que incluye a Veracruz, Tabasco, Campeche, Quintana Roo y Yucatán; Región del Pacífico que incluye a Chiapas, Guerrero, Jalisco, Nayarit, Oaxaca y Sinaloa; Región Centro que incluye a Morelos y Puebla (Secretaría de Salud., 2013). Es importante señalar que factores como el cambio climático, la urbanización, la deforestación, el incremento de turistas, la inmigración y los desastres naturales están favoreciendo a que la enfermedad se disperse a zonas donde anteriormente no se reportaban casos (Kevric *et al.*, 2015; Montalvo *et al.*, 2012).

1.3 Formas clínicas

A) Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL)

La LCL es el cuadro clínico más común en el mundo, se caracteriza por presentar una lesión que aparece unas semanas después de la mordedura del flebótomo. Dicha lesión generalmente es redonda con bordes endurecidos y puede presentar dolor si se infecta o se superpone a una articulación. La ulceración en esta enfermedad es de buen pronóstico para la curación, la cual puede darse espontáneamente en un periodo de seis meses a dos años. Debido a las úlceras y a la asociación con recolectores de los frutos del árbol del chicle, en México se le conoce a esta enfermedad como “úlceras de los chicleros” (Kevric *et al.*, 2015; Torres-Guerrero., 2017; Zetina., 2008; Unger *et al.*, 2009).



Figura 2. **Paciente con Leishmaniasis cutánea localizada.** Úlcera única localizada en la región preauricular derecha. Foto tomada de Kevric *et al.*, 2015.

B) Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD)

Se caracteriza por una diseminación de lesiones en la mayor parte de la piel. Generalmente, inicia con nódulos eritematosos duros y placas verrugosas o lisas que pueden o no ulcerarse, primero inicia en la cara y progresivamente invade las extremidades. Se puede presentar inflamación por acumulación de linfa, inflamación de los ganglios y fiebre. Para esta forma clínica no hay resolución espontánea y la evolución puede ser de hasta 20 años (Lupi *et al.*, 2009; Torres-Guerrero., 2017).



Figura 3. **Paciente con Leishmaniasis cutánea difusa.** Foto tomada de Torres-Guerrero., 2017.

C) Leishmaniasis Mucocutánea (LMC)

También conocida como espundia, es un cuadro clínico que comienza con una lesión en la mucosa nasal y, posteriormente, se disemina a la mucosa oral, faringe, laringe, piel de la nariz y labios, puede ocurrir la destrucción del tabique cartilaginoso e incluso causar la muerte en casos extremos. Los síntomas abarcan desde molestias simples con ligero dolor hasta caquexia en casos severos donde la lesión compromete completamente a la faringe, laringe y esófago. Al inicio de la enfermedad se puede observar infiltración de la mucosa con úlceras superficiales, cuando las úlceras están bien desarrolladas los bordes tienen una apariencia necrótica y se encuentran desgarradas y desprendidas. Los ganglios linfáticos regionales pueden volverse dolorosos por infecciones alternas. (Podinovskaia & Descoteaux., 2015; Torres-Guerrero., 2017).



Figura 4. **Paciente con leishmaniasis mucocutánea.** Foto tomada de World Health Organization.

D) Leishmaniasis Visceral (LV)

La LV o kala-azar se caracteriza por afectar el hígado, el bazo y la médula ósea. Las manifestaciones clínicas son: inflamación de los ganglios linfáticos, aumento patológico en el tamaño del hígado y del bazo, anemia, disminución del número de leucocitos y plaquetas en sangre, fiebre y anorexia. Los niños presentan diarrea crónica y retraso en el crecimiento. El periodo de incubación es de 3 a 8 meses y el sector de la población en mayor riesgo se conforma principalmente de niños, personas inmunocomprometidas y desnutridas (Podinovskaia & Descoteaux., 2015; Torres-Guerrero., 2017).



Figura 5. **Paciente con leishmaniasis visceral.** Foto tomada de World Health Organization.

1.4 Respuesta inmune en la leishmaniasis y el papel de los macrófagos en la enfermedad

La picadura del vector y la inoculación de los parásitos atraen a células fagocíticas del sistema inmunológico, principalmente neutrófilos y macrófagos (Ruíz & Becker., 2007; Scott & Novais., 2016), los cuales son los principales hospederos en las lesiones generadas en la piel. La interacción inicial entre el macrófago y el parásito se da a través del flagelo donde moléculas de superficie como el lipofosfoglicano son reconocidas a través de PRRs (Receptores para el reconocimiento de patrones moleculares) como el TLR2 (Receptor tipo toll, por sus siglas en inglés). Adicionalmente, *Leishmania* al entrar en contacto con la piel, es opsonizada por el complemento, induciendo de esta manera su reconocimiento por receptores de complemento como son CR1 y CR3 que a la vez inhiben la activación del macrófago, lo que puede ser benéfico para el parásito al favorecer su supervivencia (Argueta-Donohué *et al.*, 2016; Podinovskaia & Descoteaux., 2015; Rojas-Espinosa & Arce-Paredes., 2004).

Cuando el macrófago internaliza al promastigote, fusiona la vacuola parasitófora con lisosomas formando así al fagolisosoma con condiciones características como aumento de temperatura y disminución de pH. Se cree que la diferenciación de promastigotes a amastigotes se favorece con dichas condiciones. Una vez dentro del fagolisosoma, el macrófago lleva a cabo acciones de defensa como la generación de especies reactivas de oxígeno e intermediarios reactivos de nitrógeno para incapacitar a los parásitos, sin embargo, se ha observado que *Leishmania* es capaz de inhibir dichos mecanismos microbicidas. Por ejemplo, se ha observado que dentro de la vacuola parasitófora *Leishmania* secreta LPG en la membrana de la vacuola que inhibe a V-ATPasas impidiendo una acidificación excesiva. (Podinovskaia & Descoteaux., 2015; Rojas-Espinosa & Arce-Paredes., 2004).

El macrófago también tiene un papel fundamental en el establecimiento y persistencia de la enfermedad, puede participar como célula hospedera presentadora de antígenos para activar a las células T específicas y como célula efectora cuya eficacia depende de la activación de citocinas como IFN- γ y TNF- α (Ruíz & Becker., 2007), ya que al estar

en contacto con estas moléculas, el macrófago se activa por la vía clásica que desencadena la producción de óxido nítrico que elimina al parásito. La activación alternativa se da por IL-4 donde se inhibe la inflamación a través de la producción de IL-10 y favorece al crecimiento del parásito (Podinovskaia & Descoteaux., 2015).

1.5 Macrófagos de línea celular RAW 264.7

Los macrófagos de la línea celular RAW 264.7 han sido utilizados en laboratorios biológicos por más de 40 años. Se aislaron de un tumor inducido por el virus de la leucemia murina de Abelson en un ratón BALB/c. Estas células tienen la capacidad de fagocitar y realizar pinocitosis. Cuando las células RAW 264.7 son estimuladas con lipopolisacáridos aumentan la producción de óxido nítrico y mejoran la fagocitosis. (Taciak *et al.*, 2018).

1.6 Tratamiento

En la actualidad no se cuenta con una vacuna disponible para leishmaniasis, lo único efectivo para todas las formas clínicas es la quimioterapia que resulta ser muy tóxica, costosa, ineficaz y además se ha presentado un nuevo problema, la resistencia del parásito a los fármacos empleados (Mitropoulos *et al.*, 2010; Monzote., 2009; Palumbo., 2009; Santos., *et al.*, 2008).

Entre los fármacos existentes para combatir la leishmaniasis se encuentran los siguientes:

Antimoniales pentavalentes (Sb^v): son el fármaco de elección para todos los tipos de leishmaniasis, disponibles desde 1920. Existen dos presentaciones en el mercado, Pentostam® (estibogluconato de sodio) y Glucantime® (N-metilglucamina). La droga se puede administrar por vía intramuscular o intravenosa, se distribuye en alta concentración en el plasma, hígado y bazo. El mecanismo de acción de los antimoniales se basa en inhibir la glucólisis del parásito, la β -oxidación de los ácidos grasos y la inhibición de la fosforilación de adenosín difosfato (ADP). Los efectos secundarios son náuseas, dolor abdominal, mialgia, inflamación pancreática, arritmia cardíaca y hepatitis, lo que lleva a la reducción o el abandono del medicamento (Monzote., 2009; Palumbo., 2009). Los antimoniales pentavalentes están lejos de ser

el medicamento ideal debido a su difícil administración, alta toxicidad y a la resistencia que se ha generado en los últimos años (Goto & Lindoso., 2010; Mitropoulos *et al.*, 2010; Palumbo., 2009).

Anfotericina B (AnB): es un fármaco utilizado como segunda opción contra la leishmaniasis, especialmente con las formas mucocutánea y visceral en los casos en que los antimoniales pentavalentes no resulten efectivos en el paciente (Mitropoulos *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2008). Es un antibiótico y antifúngico extraído de la bacteria *Streptomyces nodosus*, su actividad antileishmania se descubrió desde 1960. Su administración es intravenosa y el paciente debe de estar en monitoreo clínico estricto. El mecanismo de acción de AnB se basa en su capacidad de unirse al ergosterol formando poros en la membrana celular de *Leishmania* lo que resulta en pérdida de iones y muerte celular (Monzote., 2009; Ramírez., 2012). Las reacciones adversas con el uso de este medicamento incluyen fiebre, escalofríos, inflamación de venas a causa de la obstrucción por coágulos sanguíneos, presión arterial baja y toxicidades como inflamación del miocardio, trastornos metabólicos a causa del deceso de potasio en sangre, así como disfunción renal e incluso la muerte. El principal factor limitante del uso de este medicamento es su toxicidad (Monzote., 2009; Palumbo., 2009).

Pentamidina: es un medicamento alterativo para todos los tipos de leishmaniasis cuando fracasa el tratamiento antimonial, desde su descubrimiento en 1939. Se trata de isetionato de pentamidina, una diamidina aromática, comercializada con el nombre de Pentacarinat® (Ramírez., 2012). Se puede administrar por vía intramuscular o intravenosa, se concentra mayormente en hígado, riñones, glándulas suprarrenales y bazo. El mecanismo de acción afecta el genoma del parásito obstaculizando la replicación y la transcripción a nivel mitocondrial. Entre los efectos secundarios se encuentra el dolor muscular, dolor en el sitio de la inyección, náuseas, vómitos, diarreas, disminución del número de leucocitos en la sangre, anemia, disminución en el número de plaquetas del torrente sanguíneo, dolor de cabeza, alucinaciones, ardor, entumecimiento y presión arterial baja. También puede causar diabetes insulino-

dependiente irreversible y la muerte. El uso de este fármaco ha disminuido debido a su baja eficacia y toxicidad (Monzote., 2009; Palumbo., 2009).

Miltefosina: es el primer fármaco administrado vía oral contra leishmaniasis visceral (Piccolo *et al.*, 2018). Ayuda a inducir radicales de oxígeno en los macrófagos que ayudan a la eliminación del parásito (Ramírez., 2012). Inicialmente fue utilizado como tratamiento antineoplásico que causa muerte por apoptosis al inhibir la proteína quinasa B, la cual está involucrada en la supervivencia celular (Piccolo *et al.*, 2018). En 2002, la hexadecilfosfocolina o miltefosina fue probada en la India en pacientes inmunocompetentes con leishmaniasis visceral. En 2004, fue aprobada en Alemania incluso en pacientes inmunocomprometidos (Monzote., 2009). Efectos adversos de este medicamento son las alteraciones gastrointestinales y la toxicidad renal que, por fortuna, son reversibles. Aunque parece ser un medicamento eficaz, se ha reportado que algunas especies de *Leishmania* en el nuevo mundo (*L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. mexicana*) son insensibles a la miltefosina (Monzote., 2009; Yardley *et al.*, 2005). Está contraindicado en el embarazo y se usa con precaución en mujeres con edad reproductiva (Ramírez., 2012).

Paromomicina o Aminosidina: se demostró su actividad antileishmania en la década de 1960. Es un antibiótico aminoglucósido producido por *Streptomyces rimosus*. El compuesto se absorbe rápidamente si es administrado de manera intramuscular. El mecanismo de acción consiste en la unión de la paromomicina a la subunidad ribosómica 30S del parásito con lo que interfiere con el inicio de la síntesis proteica. El efecto secundario más común es la ototoxicidad y problemas con la función del hígado (Monzote., 2009; Ramírez., 2012).

Otros medicamentos utilizados clínicamente son:

Azoles: se trata de antifúngicos orales que han demostrado tener efecto sobre *Leishmania*, consiguen lisar al parásito, ya que alteran la ruta de síntesis del esteroles por lo que interfiere con la biosíntesis de la membrana celular (Goto & Lindoso., 2010; Monzote., 2009). La principal desventaja es que solo son efectivos contra algunas especies de *Leishmania* (Del Rosal *et al.*, 2010).

Sitamaquina: es un análogo de 8-aminoquinolina que fue desarrollada originalmente para su uso contra la malaria. Las pruebas *in vivo* contra la leishmaniasis visceral fueron muy alentadoras, aunque no mostraron eficacia en el tratamiento clínico durante 28 días (Monzote., 2009).

Alopurinol: es un análogo de purina (hipoxantina) que se probó contra la leishmaniasis cutánea y visceral con resultados desalentadores. Actualmente se sabe que el medicamento no es efectivo cuando se administra solo, pero sí cuando está en asociación con dosis bajas de antimoniales (Goto & Lindoso., 2010; Monzote., 2009; Palumbo., 2009).

1.7 Bases de Schiff

Llamadas así en honor al químico alemán Hugo Schiff, son un grupo funcional de la química orgánica. Estructuralmente, en una base de Schiff, el grupo carbonilo (C=O) ha sido sustituido por un grupo imina, también llamado azometina, y se forma cuando una amina primaria reacciona con un aldehído o cetona (Kajal *et al.*, 2013), como se observa en la siguiente figura:

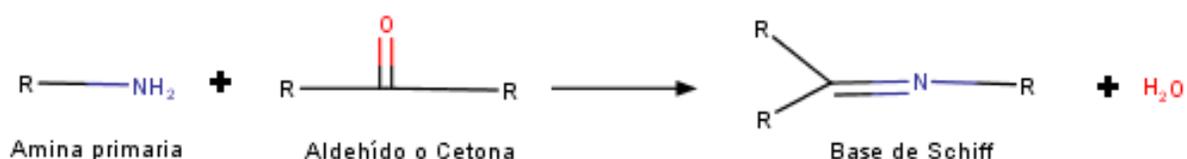


Figura 6. **Reacción química para formar una base de Schiff.** R puede ser un grupo alquilo o arilo.

Las bases de Schiff generalmente son bi o tri dentadas capaces de formar compuestos muy estables con muchos iones metálicos en varios estados de oxidación, a los que se les denomina compuestos coordinados (Arulmurugan *et al.*, 2010). Las moléculas que rodean al ion metálico (en este caso una base de Schiff) es conocido como ligando (de la palabra latina *ligare*, que significa “unir”), generalmente son polares y tienen al menos un par no compartido de electrones de valencia. Se ha reportado que la presencia del par de electrones libres en el átomo del nitrógeno del grupo imina le

confiere un efecto quelatante a la molécula (Da Silva *et al.*, 2011; Abu-Dief & Mohamed., 2015).

Las bases de Schiff derivadas de aldehídos alifáticos son inestables y se polimerizan rápidamente, por otro lado, las bases de Schiff derivadas de aldehídos aromáticos son más estables. Generalmente son ligandos bi o tri dentados (Arulmurugan *et al.*, 2010).

En los últimos años se ha descrito que las bases de Schiff así como los compuestos coordinados tienen una amplia actividad biológica, como antifúngicos, antibacterianos, antivirales, antipiréticos, antiinflamatorios y antiproliferativos (Abu-Dief & Mohamed., 2015; Kajal *et al.*, 2013), por ejemplo, se ha reportado que ligantes Salphen con centro metálico de Cu tienen actividad antibacteriana contra *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi* (Fasina *et al.*, 2012).

1.8 Descripción de los compuestos H₂Salbu, H₄Salbu, CuClH₄ y ClH₄bu

Los ligantes tipo H₂Salbu son derivados de ligantes H₂Salen. La diferencia entre ellos radica en que H₂Salbu cuenta con una cadena de cuatro metilenos en el puente diimínico mientras que H₂Salen sólo tiene dos. Lo anterior contribuye a que H₂Salbu sea más flexible y forme compuestos de coordinación con diferentes propiedades y geometrías. Los siguientes compuestos fueron sintetizados en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por la M. en C. Q. Cynthia Sinaí Novoa Ramírez y la Dra. Lena Ruíz Azuara, partiendo del supuesto donde la hidrogenación del grupo azometino de los ligantes H₂Salbu le confiere mayor flexibilidad a la molécula por lo que genera una ligera modificación en la geometría del centro metálico en el compuesto de coordinación con Cobre II (Novoa., 2017).

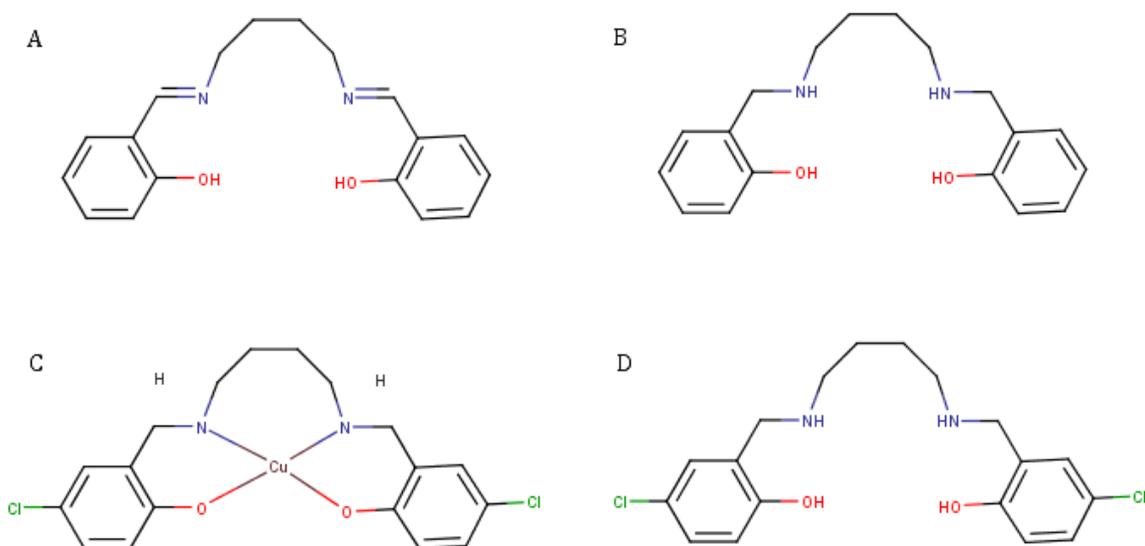


Figura 7. **Descripción de los compuestos H₂Salbu, H₄Salbu, CuClH₄ y ClH₄bu.** A) Ligante H₂Salbu, es una base de Schiff derivada del Ligante H₂Salen, la molécula es bidentada. B) Ligante H₄Salbu, es una molécula hidrogenada y bidentada. C) Compuesto coordinado CuClH₄ es una molécula hidrogenada, bidentada, con dos átomos de cloro en la posición *meta* de sus anillos aromáticos y un centro metálico de Cobre II. D) Ligante ClH₄bu es una molécula hidrogenada, bidentada, con dos átomos de cloro en la posición *meta* de sus anillos aromáticos.

1.9 “La regla de 5” de Lipinski

Actualmente “la regla de 5”, desarrollada por Chris Lipinski y colaboradores en los años 90’s, es una herramienta importante para el diseño y desarrollo de nuevos fármacos. Dicha regla se basa en un análisis computacional que da a conocer las propiedades que requiere una molécula para una mejor absorción oral. Estas reglas indican que la absorción o permeabilidad de un fármaco es mayor si el compuesto presenta menos de 5 enlaces donadores de hidrógeno, menos de 10 enlaces aceptores de hidrógeno, cuando el peso molecular es menor de 500 y el coeficiente de partición octanol-agua (Log P) es menor que 5 (Lipinski *et al.*, 1997).

Capítulo 2

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, factores como el cambio climático, la urbanización, la deforestación, el incremento de turistas e inmigración a países endémicos están contribuyendo a la diseminación de la leishmaniasis, enfermedad que anteriormente sólo se limitaba a los trópicos y subtrópicos.

El tratamiento para esta enfermedad se basa en antimoniales pentavalentes y no se cuenta con una vacuna disponible. Dichos antimoniales tienen efectos secundarios como anorexia, náuseas, dolor de cabeza, dolor abdominal, dolor muscular, inflamación pancreática y arritmia cardíaca, siendo un tratamiento tóxico, costoso e ineficaz; además, se ha presentado un nuevo problema, la resistencia del parásito a los fármacos empleados. Todo lo anterior ha obligado a investigar nuevos agentes leishmanicidas que sean más baratos, más efectivos, menos tóxicos y que la forma de administración no sea tan invasiva.

En los últimos años se ha descrito que las bases de Schiff así como los compuestos coordinados tienen una amplia actividad biológica, como antifúngicos, antibacterianos, antivirales, antipiréticos, antiinflamatorios y antiproliferativos. Por lo anterior se consideró interesante utilizarlos como posible tratamiento contra *Leishmania mexicana* durante este proyecto.

Capítulo 3

HIPOTÉISIS

Los compuestos H₂Salbu, H₄Salbu, CuClH₄ y ClH₄bu reducen la sobrevida de *Leishmania mexicana*.

Capítulo 4

OBJETIVOS

3.2 Objetivo General

Determinar el efecto de los compuestos H₂Salbu, H₄Salbu, CuClH₄ y ClH₄bu sobre el crecimiento de los promastigotes de *L. mexicana*.

3.2.1 Objetivos Particulares

1. Analizar el efecto *in vitro* que ejercen los compuestos H₂Salbu, H₄Salbu, CuClH₄ y ClH₄bu sobre la viabilidad de parásitos y calcular la concentración CI₅₀.
2. Determinar el efecto *in vitro* que ejercen los compuestos H₂Salbu, H₄Salbu, CuClH₄ y ClH₄bu sobre la viabilidad de macrófagos de la línea celular RAW 264.7, calculando su concentración CI₅₀.
3. Analizar la sobrevida de amastigotes intracelulares de *L. mexicana* en macrófagos incubados con los compuestos H₂Salbu, H₄Salbu, CuClH₄ y ClH₄bu.
4. Identificar el efecto *in vivo* que ejercen los compuestos H₂Salbu, H₄Salbu, CuClH₄ y ClH₄bu sobre la infección del cojinete plantar de ratones BALB/c causada por *L. mexicana*.

Capítulo 5

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de laboratorio: para el presente proyecto se emplearon ratones singénicos de 12 a 14 semanas de edad de la cepa BALB/c proporcionados por el bioterio de la Unidad de Investigación de Medicina Experimental (UIME) de la Facultad de Medicina, UNAM, del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”. El método de eutanasia se llevó a cabo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Compuestos químicos: los compuestos H_2Salbu , H_4Salbu , $CuClH_4$ y ClH_4bu utilizados en este estudio fueron donados por la Dra. Lena Ruiz Azuara del Departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química UNAM.

5.1 Cultivo de parásitos

En este estudio, se utilizaron promastigotes de *Leishmania mexicana* de la cepa Lacandona (LAC), la cual fue aislada de un paciente con leishmaniasis cutánea localizada. Los parásitos se mantuvieron mediante infecciones en ratones BALB/c, para lo cual se inocularon 10×10^6 promastigotes en el cojinete plantar. Una vez visible la lesión, los ratones fueron sacrificados y se aislaron los parásitos mediante aspirados con jeringas de insulina. El aspirado de las lesiones se cultivó en medio líquido 199 (Gibco® 12350-039) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Biowest® 51650-500) a 26°C para su diferenciación a promastigotes. Posteriormente se realizaron dos pases de los parásitos con el fin de homogenizar el cultivo. Para cada pase se tomaron 5×10^6 de parásitos entre los días 3-4 (fase logarítmica de cultivo), los cuales se sembraban en 10 ml de medio líquido 199 suplementado con 10% de SFB. Las cuentas de los parásitos se realizaron en una cámara de Neubauer.

5.2 Tratamiento con H₂Salbu, H₄Salbu, CuClH₄ y ClH₄bu sobre promastigotes de *L. mexicana*

Para el tratamiento con los diferentes compuestos se utilizaron promastigotes del día cuatro de cultivo, los cuales fueron cosechados en tubos de 15 ml y centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos. El botón celular fue lavado y centrifugado dos veces con PBS a pH 7.2. El lavado se realizó resuspendiendo el botón celular con 5 ml de PBS. Posteriormente, se colocó 1 x 10⁶ parásitos en tubos de 5 mL para cultivo celular (Falcon® 352054) con medio 199 suplementado con 10% de SFB. Los parásitos fueron tratados bajo las siguientes condiciones:

| Control | Vehículo | H ₂ Salbu | H ₄ Salbu | CuClH ₄ | ClH ₄ bu |
|-----------------|--------------|----------------------|----------------------|--------------------|---------------------|
| Sin tratamiento | 0.1% de DMSO | 1 nM | 1 nM | 0.21 μM | 0.28 μM |
| | | 2 nM | 2 nM | 0.43 μM | 0.54 μM |
| | | 4 nM | 4 nM | 0.86 μM | 1.09 μM |
| | | 8 nM | 8 nM | 1.7 μM | 2.2 μM |
| | | 12 nM | 12 nM | 2.6 μM | 3.3 μM |
| | | 16 nM | 16 nM | 3.4 μM | 4.3 μM |
| | | 20 nM | 20 nM | | |

Para los tratamientos, los compuestos fueron disueltos en DMSO y medio 199 suplementado con 10% de SFB. La molaridad del stock inicial de los compuestos H₂Salbu y H₄Salbu fue de 2 μM, mientras que para los compuestos CuClH₄ y ClH₄bu fue de 430 μM y 543 μM, respectivamente. La concentración de DMSO para la condición del vehículo fue al 0.1% en el medio de cultivo. Todas las condiciones se incubaron por 48 horas a 26°C y se contó el número de parásitos en cámaras de Neubauer. Los datos fueron normalizados a 100. Adicionalmente se calculó la CI₅₀ de cada compuesto utilizando el programa Compusyn®.

5.3 Tratamiento con los compuestos H₂Salbu, H₄Salbu, CuClH₄ y ClH₄bu sobre macrófagos de la línea celular RAW 264.7

Con la finalidad de analizar el efecto de los compuestos sobre macrófagos, se utilizó la línea celular RAW 264.7. Las células fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Gibco® 21870-084) suplementado al 10% con SFB hasta su confluencia. Los macrófagos se centrifugaron a 1200 rpm por 10 minutos a 5°C, la pastilla se resuspendió en medio RPMI-1640. Para la cuenta se diluyeron los parásitos en azul tripan y se realizó la cuenta en una cámara de Neubauer.

Para preparar la solución stock se diluyeron los compuestos en DMSO y medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de SFB. La molaridad del stock inicial de los compuestos H₂Salbu y H₄Salbu fue de 2 µM, mientras que para los compuestos CuClH₄ y ClH₄bu fue de 430 µM y 543 µM respectivamente. La concentración de DMSO para la condición del vehículo fue al 0.1% en el medio de cultivo. Se ajustó 1 x 10⁶ de macrófagos por condición y se estimularon con los compuestos de acuerdo a las siguientes concentraciones:

| Control | Vehículo | H ₂ Salbu | H ₄ Salbu | CuClH ₄ | ClH ₄ bu |
|-----------------|--------------|----------------------|----------------------|--------------------|---------------------|
| Sin tratamiento | 0.1% de DMSO | 1 nM | 1 nM | 0.21 µM | 0.28 µM |
| | | 2 nM | 2 nM | 0.43 µM | 0.54 µM |
| | | 4 nM | 4 nM | 0.86 µM | 1.09 µM |
| | | 8 nM | 8 nM | 1.7 µM | 2.2 µM |
| | | 12 nM | 12 nM | 2.6 µM | 3.3 µM |
| | | 16 nM | 16 nM | 3.4 µM | 4.3 µM |
| | | 20 nM | 20 nM | | |
| | | | 40 nM | | |

Todas las condiciones se incubaron por 24 horas en medio RPMI-1640 a 37°C. Al finalizar el tiempo, se contaron los macrófagos vivos utilizando azul tripan en la dilución para discriminar entre células vivas y muertas. El total de macrófagos sin

tratamiento se utilizó como control. Los datos fueron normalizados a 100. Adicionalmente, se calculó la CI_{50} de cada compuesto utilizando el programa Compusyn.

5.4 Sobrevida de promastigotes de *L. mexicana*

Para el análisis de sobrevida se utilizó la línea celular de macrófagos RAW 264.7. Los macrófagos fueron lavados con PBS frío y se centrifugaron a 1200 rpm por 10 minutos a 5°C. Posteriormente, se incubaron en medio RPMI-1640 a 37°C por 24 horas para una mayor adherencia. Transcurrido el tiempo se infectaron con promastigotes en fase estacionaria de *Leishmania mexicana* en una relación 1:10 y se incubaron a 37°C en medio RPMI-1640 por 24 horas para lograr mayor fagocitosis. Para asegurar la eliminación de parásitos no fagocitados, se hicieron lavados con PBS a temperatura ambiente y se incubaron por 24 horas adicionales. Pasado el tiempo, los macrófagos fueron coincubados por 24 horas a 37°C con las concentraciones medias inhibitorias (CI_{50}), de los metales H_2Salbu , H_4Salbu , $CuClH_4$ y ClH_4bu , calculada previamente (en el apartado 5.2), como se describen a continuación:

| Control | H_2Salbu | H_4Salbu | $CuClH_4$ | ClH_4bu |
|-----------------|------------|------------|--------------|--------------|
| Sin tratamiento | 18 nM | 40 nM | 0.77 μ M | 0.67 μ M |

Al finalizar el tiempo se retiró el metal lavando con PBS a temperatura ambiente, se incubaron las células en medio 199 a 25°C por 48 horas y el total de promastigotes extracelulares liberados fueron contados en una cámara de Neubauer. La sobrevida de los parásitos en la condición con macrófagos sin tratamiento se utilizó como control positivo. Los datos fueron normalizados a 100 (Tomado y modificado de Delgado – Domínguez *et al.*, 2010).

5.5 Análisis del efecto *in vivo* que ejercen los compuestos H₂Salbu, H₄Salbu y CuClH₄ en la infección del cojinete plantar de ratones BALB/c causada por *L. mexicana*

Cinco grupos de ratones con tres individuos cada uno fueron infectados con 250,000 parásitos de la cepa LAC de *Leishmania mexicana* en el cojinete plantar. El grupo 1 o grupo control que constó de ratones que no recibieron tratamiento, el grupo 2 o vehículo ratones tratados únicamente con la crema utilizada como vehículo, el grupo 3 ratones infectados que recibieron tratamiento con el compuesto H₂Salbu disuelto en el vehículo, el grupo 4 fueron ratones infectados que recibieron tratamiento con el compuesto H₄Salbu disuelto en el vehículo y el grupo 5 que fueron ratones infectados que recibieron tratamiento con el compuesto CuClH₄ disuelto en el vehículo. El tratamiento fue aplicado sobre la lesión e inició en la semana 4 post-infección. El tratamiento consistió de 3 miligramos del compuesto mezclado en 20 µL de la crema usada como vehículo. Fue aplicado tópicamente sobre la lesión durante 5 días cada semana, durante un mes. La evolución de la enfermedad se evaluó midiendo el cojinete plantar semanalmente con un vernier digital (Truper®). La crema utilizada como vehículo para el experimento *in vivo* se preparó con 35 g de aceite mineral ligero, 12 g de cera de abeja, 10 g de miristato de isopropilo, 5 g de parafina, 1 g de lanolina 0.2 g de propilparabeno, 35.7 g de agua destilada, 1 g de bórax, 0.2 g de metilparabeno y 0.2 g de vitamina E.

Al finalizar el tiempo del tratamiento, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Se cortaron y se fijaron los cojinetes en formol al 10% v/v. Posteriormente fueron embebidos en parafina y se realizaron cortes de 4 micras en el micrótopo, los cuales fueron montados en un portaobjetos y teñidos con hematoxilina-eosina. Se tomaron fotos de cada laminilla en un microscopio Microphot-FXA (Nikon®) con una iluminación de campo claro utilizando el software ACT-1 (Nikon®) y un objetivo de inmersión de 60x hasta conseguir 1 milímetro cuadrado de tejido. Por último, se cuantificó la carga parasitaria del milímetro cuadrado de tejido utilizando el programa ImageJ 1.50i para 64 bits.

5.6 Análisis de los compuestos H₂Salbu, H₄Salbu, CuClH₄ y ClH₄bu con el programa MarvinSketch

Con la finalidad de comprobar que los compuestos cumplieran con los parámetros requeridos por la regla 5 de Lipinski y por tanto tuvieran la capacidad de entrar a las células, se graficaron las moléculas de H₂Salbu, H₄Salbu, CuClH₄ y ClH₄bu en el programa MarvinSketch®. También se calcularon las fórmulas químicas así como el peso molecular, enlaces donadores de hidrógeno, enlaces aceptores de hidrógeno y el LogP.

5.7 Prueba estadística

Los resultados fueron normalizados a 100 y expuestos con su desviación estándar. Se realizó la prueba estadística U de Mann-Whitney de dos vías para su análisis y se consideró estadísticamente significativo cuando $P < 0.05$ respecto al control y al vehículo.

Capítulo 6

RESULTADOS

6.1 Análisis del efecto de los compuestos H₂Salbu, H₄Salbu, CuClH₄ y ClH₄bu en el número de promastigotes de *L. mexicana* a las 48 horas de tratamiento

Para analizar si las bases de Schiff afectan el crecimiento de *L. mexicana* se incubaron promastigotes con diferentes concentraciones de H₂Salbu, H₄Salbu, CuClH₄ y ClH₄bu por 48 horas. Nuestros resultados revelaron que a mayor concentración de los compuestos, la cantidad de parásitos disminuye a las 48 horas de interacción. El compuesto H₂Salbu redujo aproximadamente 0.4 veces el número de parásitos ($p < 0.05$) con respecto al control sin tratamiento, viéndose un efecto dosis dependiente desde la concentración de 4 nM hasta 20 nM, con respecto al control (Figura 6.1A). En el caso del compuesto H₄Salbu se apreció una reducción de aproximadamente 0.5 veces en el número de parásitos con respecto al control, sin embargo, únicamente las concentraciones de 16 nM y 20 nM fueron significativas ($p < 0.05$), con respecto al control (Figura 6.1B). El compuesto CuClH₄ utilizado a una concentración de 0.86 μ M hasta 3.4 μ M disminuyó significativamente el número de parásitos (con un aproximado de 0.8 veces) con respecto al control sin tratamiento ($p < 0.05$), lo cual también demostró un efecto dosis dependiente en la reducción del número de parásitos (Figura 6.1C). El mismo fenómeno dosis-respuesta se observó con el compuesto ClH₄bu, en donde se encontró una disminución significativa ($p < 0.05$) en el número de parásitos de aproximadamente 0.9 veces con respecto al control sin tratamiento, desde la dosis 2.2 μ M hasta la dosis 4.3 μ M (Figura 6.1D). Adicionalmente, se calculó la CI₅₀ con el programa Compusyn, en donde se reveló que los compuestos más letales para el parásito son H₂Salbu y H₄Salbu, ya que necesitan concentraciones más bajas que los compuestos CuClH₄ y ClH₄bu para dañar al parásito (Figura 6.1E).

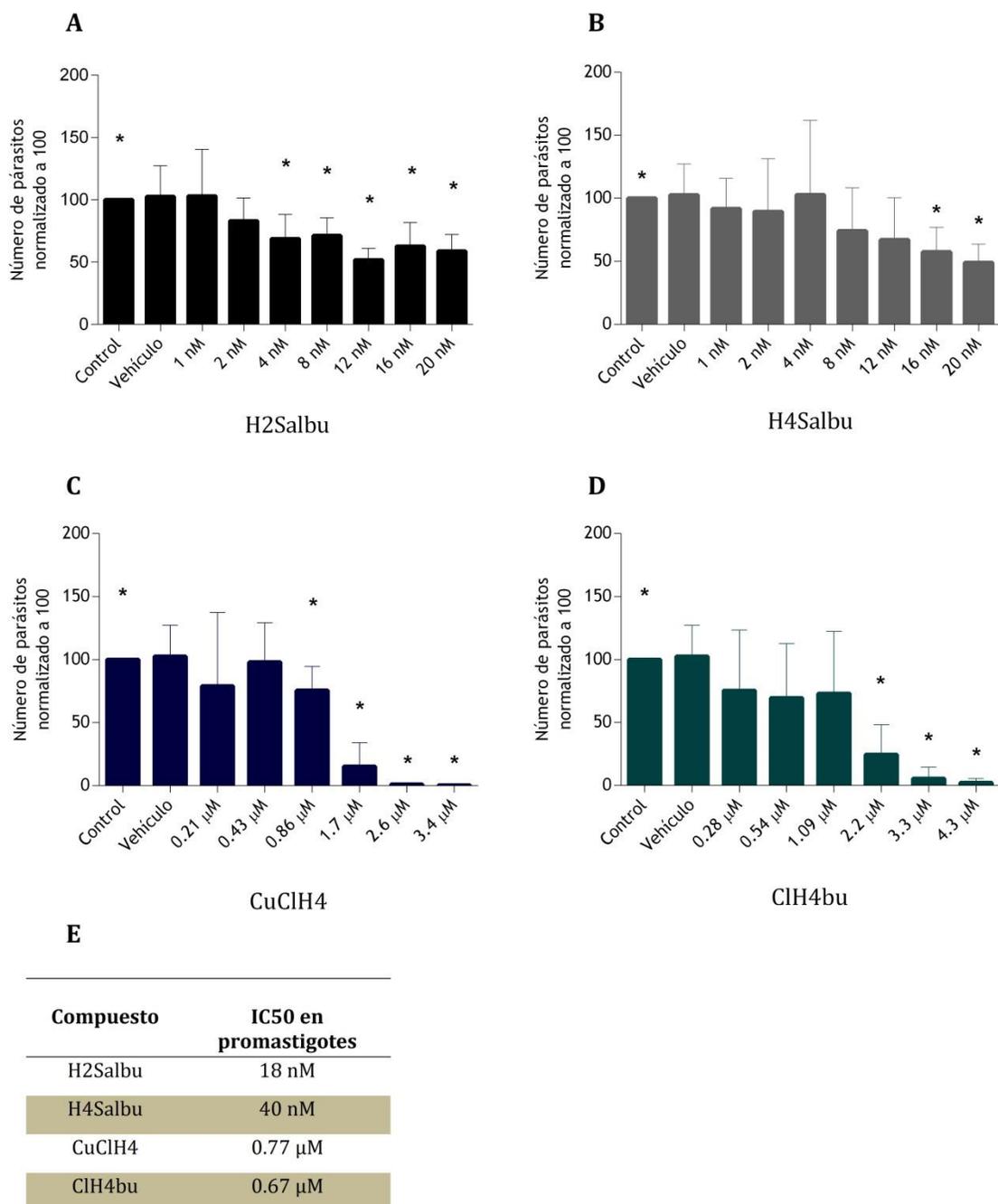


Figura 6.1 Viabilidad de promastigotes coincubados con bases de Schiff y compuestos de coordinación a las 48 horas. Las gráficas representan el efecto de los compuestos H₂Salbu (A), H₄Salbu (B), CuClH₄ (C) y ClH₄bu (D) sobre el número de parásitos. Los datos fueron normalizados a 100 con respecto al control sin tratamiento y representan el promedio \pm la desviación estándar (SD) de 3 experimentos independientes. (E) Señala las concentraciones medias inhibitorias (CI₅₀) de todos los

compuestos en promastigotes. El símbolo * representa que los datos son estadísticamente significativos $p < 0.05$ con respecto al control sin tratamiento.

6.2 Análisis del efecto de los compuestos H₂Salbu, H₄Salbu, CuClH₄ y ClH₄bu sobre la viabilidad de macrófagos RAW 264.7 a las 24 horas de interacción

Con el objetivo de analizar si las bases de Schiff afectan el crecimiento de los macrófagos, se utilizó la línea celular RAW 264.7. Las células se incubaron con distintas concentraciones de H₂Salbu, H₄Salbu, CuClH₄ y ClH₄bu por 24 horas. Los resultados demostraron que los compuestos no tuvieron efecto sobre la viabilidad de los macrófagos al finalizar el tiempo de coincubación ya que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) contra el control sin tratamiento y vehículo (Figura 6.2).

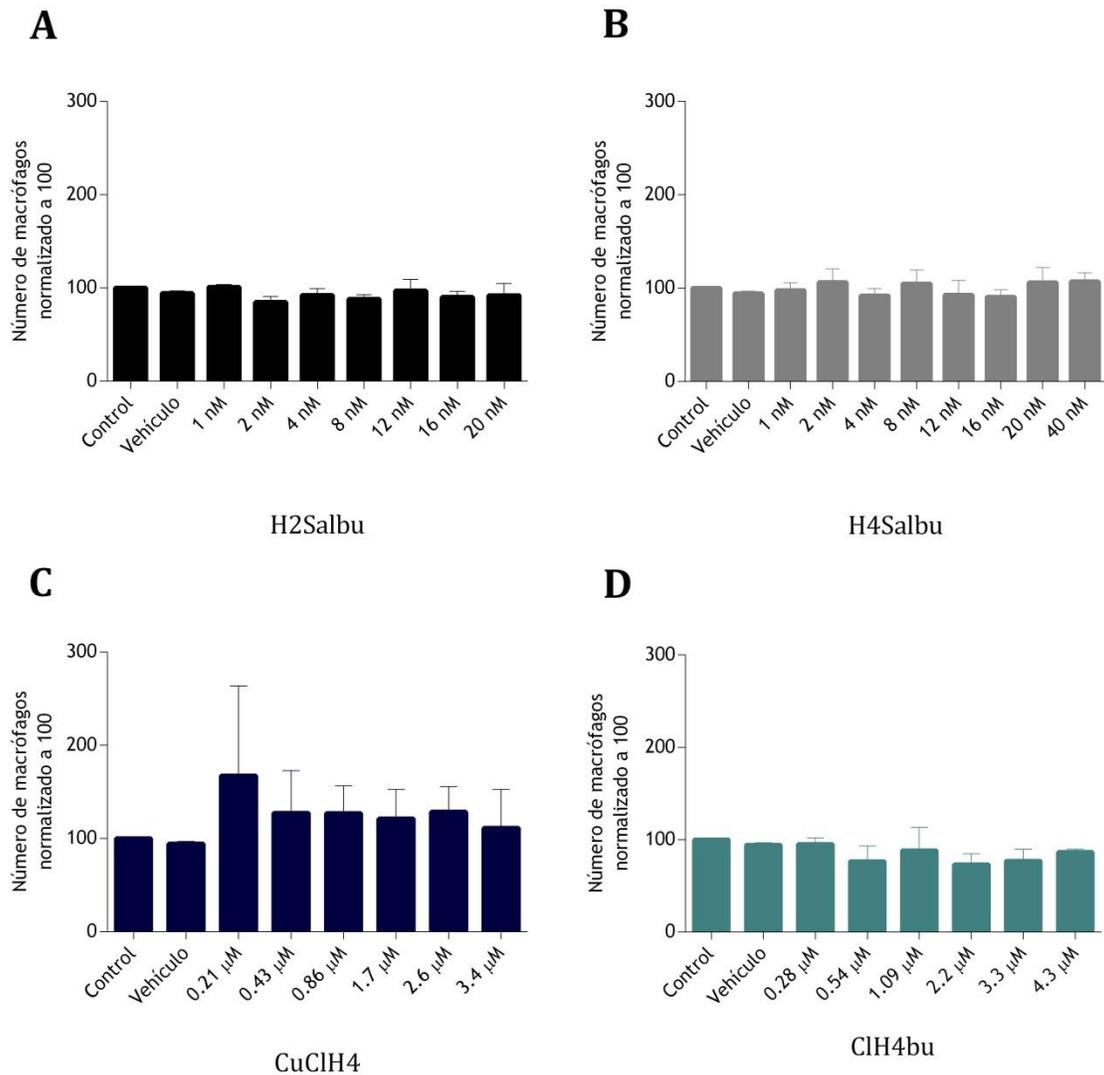


Figura 6.2 Viabilidad de los macrófagos de la línea celular RAW 264.7 coincubados con bases de Schiff y compuestos de coordinación a las 24 horas. Las gráficas representan el efecto de los compuestos H₂Salbu (A), H₄Salbu (B), CuClH₄ (C) y ClH₄bu (D) en el número de macrófagos vivos. Los datos fueron normalizados a 100 con respecto al control sin tratamiento y representan el promedio ± la desviación estándar (SD) de 3 experimentos independientes.

6.3 Análisis de sobrevida intracelular de *L. mexicana*

Para evaluar la sobrevida del parásito se infectaron macrófagos de la línea celular RAW 264.7 con promastigotes de *L. mexicana* (LAC) por 24 horas. Transcurrido el tiempo, se coincubaron por 24 horas a 37 °C con las concentraciones medias inhibitorias (CI₅₀) de H₂Salbu, H₄Salbu, CuClH₄ y ClH₄bu (calculadas previamente). Posteriormente se retiraron los compuestos y se incubaron las células por otras 48 horas a 25 °C (tiempo al que comenzó a percibirse la liberación de los parásitos). Nuestros resultados revelaron que todas las CI₅₀ de los compuestos disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) el número de parásitos intracelulares liberados, con respecto al control sin tratamiento. Interesantemente se obtuvieron sobrevidas muy bajas con los compuestos H₂Salbu (CI₅₀ 18 nM) y H₄Salbu (CI₅₀ 40 nM) que fueron de 21.25 % y 31.97 % respectivamente (Figura 6.3A y 6.3B). Se registró mayor sobrevida con el compuesto CuClH₄ en donde se encontró una sobrevida de 71.20 % y con ClH₄bu de 62.17 % con las CI₅₀ de 0.77 μM y 0.67 μM, respectivamente (Figura 6.3C y 6.3D).

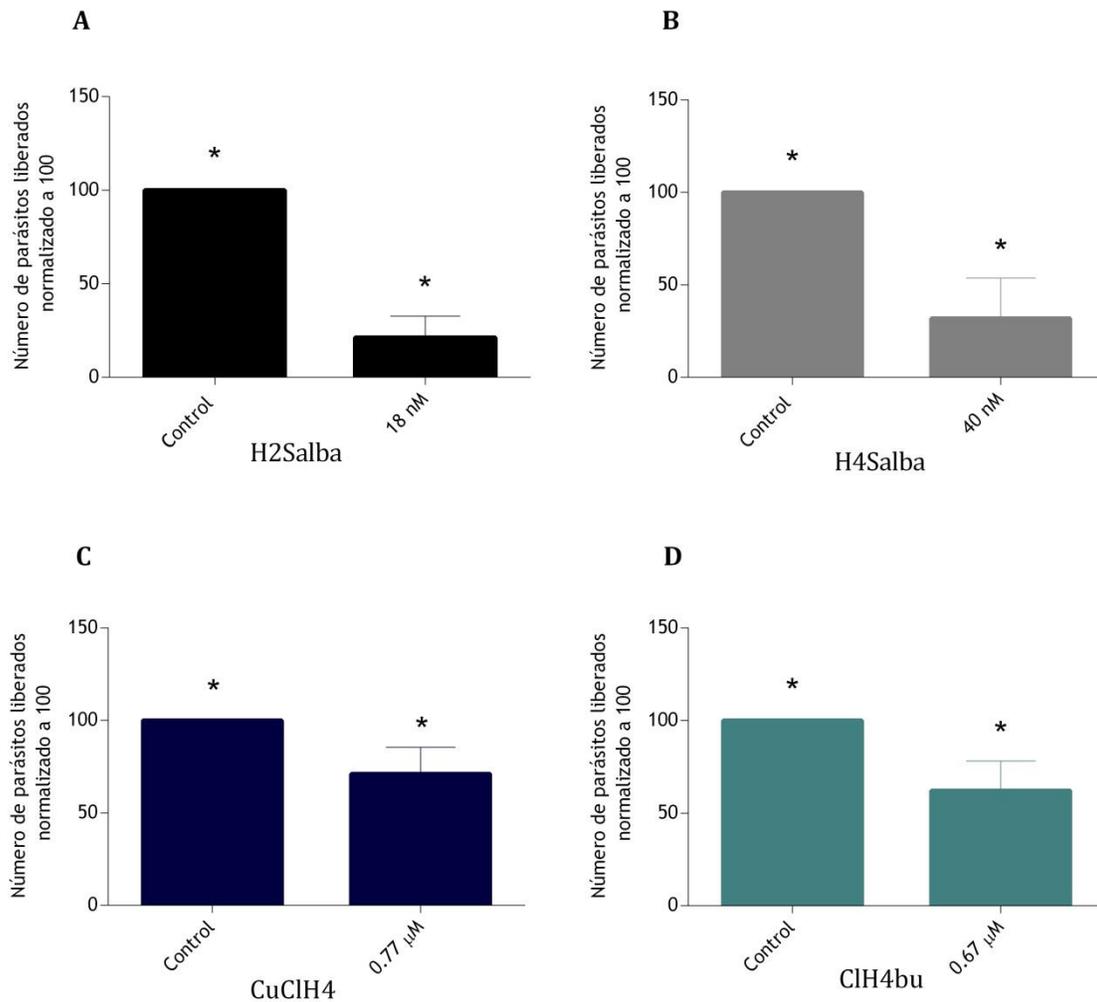


Figura 6.3 **Porcentaje de sobrevida intracelular de *L. mexicana* en macrófagos de la línea celular RAW 264.7 con y sin presencia de bases de Schiff y compuestos de coordinación.** Las gráficas muestran la sobrevida del parásito después de interactuar con H₂Salbu (A), H₄Salbu (B), CuClH₄ (C) y ClH₄bu (D). Los datos fueron normalizados a 100 con respecto al control sin tratamiento y representan el promedio ± la desviación estándar (SD) de 3 experimentos independientes. El símbolo * representa que los datos son estadísticamente significativos $p < 0.05$ con respecto al control sin tratamiento.

6.4 Análisis del efecto *in vivo* de los compuestos H₂Salbu, H₄Salbu y CuClH₄

Se midió semanalmente el cojinete plantar de ratones BALB/c con y sin tratamiento durante un mes para observar la evolución de la enfermedad ocasionada por *L. mexicana*. Los resultados obtenidos de los ratones de los diferentes grupos no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos que recibieron tratamiento al compararlos con los que recibieron el vehículo o con los controles sin tratamiento (Figura 6.4A). Tampoco se observaron cambios significativos al comparar la carga parasitaria de los grupos que recibieron tratamiento con los ratones control que no recibieron tratamiento o con los que fueron tratados únicamente con el vehículo (Figura 6.4B y 6.5).

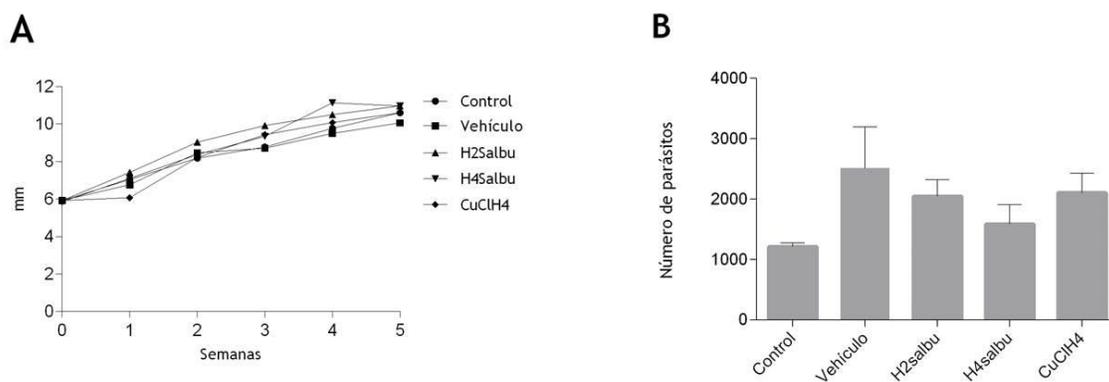


Figura 6.4 Evolución de la enfermedad causada por *L. mexicana* en cojinete plantar de ratón BALB/c con y sin tratamiento. A) expresa el promedio de las medidas de los cojinetes en mm durante 5 semanas por grupo de ratones. B) Muestra el promedio del número de parásitos por milímetro cuadrado de tejido en el cojinete plantar.

A continuación se observa una muestra representativa del tejido infectado de cada uno de los 5 grupos de ratones y una imagen con mayor aumento, con el objetivo de ilustrar la morfología que se tomó en consideración para el conteo de parásitos con el programa ImageJ 1.50i.

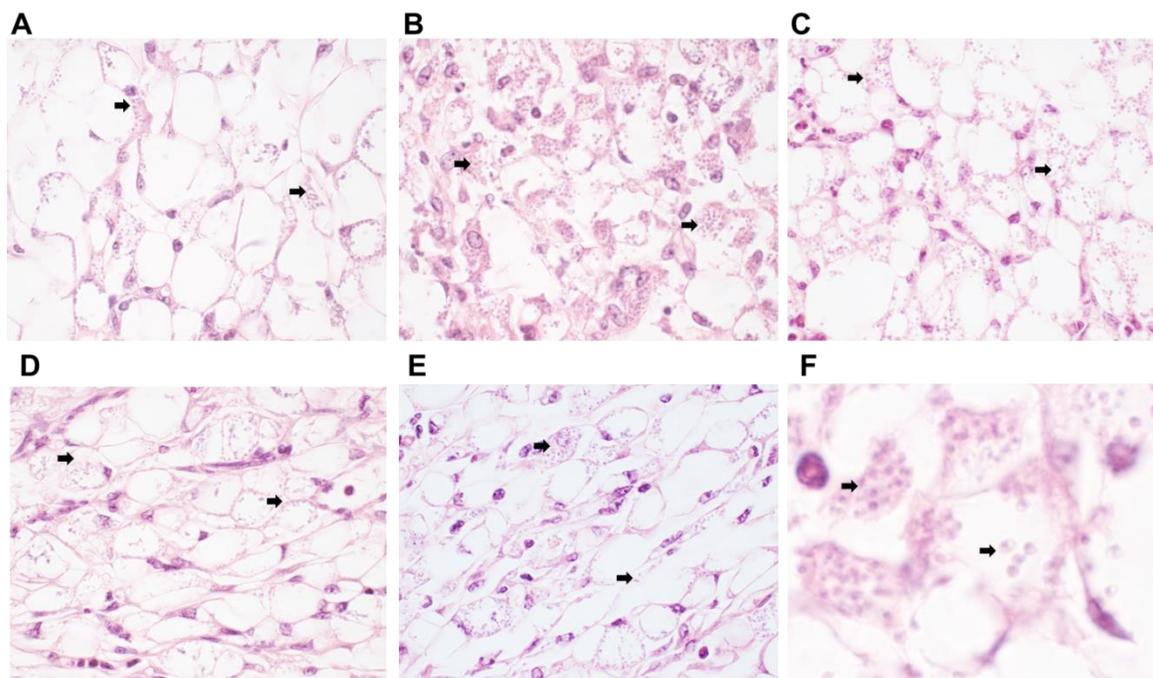


Figura 6.5 **Evolución de la enfermedad causada por *L. mexicana* en cojinete plantar de ratón BALB/c con y sin tratamiento.** Fotos a 60x de cortes teñidos con hematoxilina-eosina a 4 micras de cojinetes plantares de ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*. A) Grupo control que no recibió tratamiento B) Grupo al que únicamente se le trató con el vehículo C) Grupo que recibió tratamiento con el compuesto H₂Salbu D) Grupo de ratones que recibió tratamiento con H₄Salbu E) Grupo de ratones que recibió tratamiento con el compuesto CuClH₄ y F) Foto representativa con aumento de la morfología que se tomó en consideración para el conteo de los parásitos utilizando el programa ImageJ 1.50i. Las flechas señalan a algunos amastigotes.

6.5 Análisis de los compuestos H₂Salbu, H₄Salbu, CuClH₄ y ClH₄bu con el programa MarvinSketch

Con la finalidad de determinar que los compuestos utilizados en este experimento tienen la capacidad de atravesar la célula, se graficaron y se analizaron con el programa MarvinSketch. Dicho programa calcula la fórmula química del compuesto, el peso molecular, la cantidad de enlaces donadores de hidrógeno, los enlaces aceptores de hidrógeno y el LogP (Figura 6.6). Los resultados indican que todos los compuestos cumplieron con la regla de 5 de Lipinski y por tanto cuentan con gran potencial para atravesar la membrana de la célula.

| Compuesto | Fórmula | PM [g/mol] | Enlaces | Enlaces | LogP |
|----------------------|--|------------|----------------|----------------|------|
| | | | donadores de H | aceptores de H | |
| H ₂ Salbu | C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₂ | 296 | 2 | 6 | 3.64 |
| H ₄ Salbu | C ₁₈ H ₂₄ N ₂ O ₂ | 300 | 4 | 6 | 2.86 |
| CuClH ₄ | Cu(C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₂ Cl ₂) | 430.82 | 0 | 6 | 4.30 |
| ClH ₄ bu | C ₁₈ H ₂₂ Cl ₂ N ₂ O ₂ | 369 | 4 | 6 | 4.07 |

Figura 6.6 Análisis de los compuestos en el programa MarvinSketch. H₂Salbu, H₄Salbu, CuClH₄ y ClH₄bu cumplen con los parámetros requeridos en la regla 5 de Lipinski.

Capítulo 7

DISCUSIÓN

Actualmente, existen reportes sobre la resistencia del parásito a los fármacos disponibles para esta enfermedad, por ello es sumamente importante el desarrollo de nuevos fármacos anti-*Leishmania*. En la búsqueda de nuevos fármacos antiparasitarios, se ha considerado a las enzimas de rutas metabólicas y bioquímicas como blancos importantes para la inhibición selectiva empleando compuestos químicos (Caballero *et al.*, 2014). En este trabajo se analizó el efecto de la base de Schiff H₂Salbu, y de sus derivados hidrogenados, H₄Salbu y ClH₄Salbu, así como de un compuesto coordinado CuClH₄, como agentes leishmanicidas, ya que algunos autores han descrito que las bases de Schiff y los compuestos coordinados tienen una amplia actividad biológica, ya que pueden actuar como antifúngicos, antibacterianos, antivirales, antipiréticos, antiinflamatorios y antiproliferativos (Da Silva, *et al.*, 2011; Abu-Dief, & Mohamed., 2015). Por otra parte, algunos autores han sugerido que a través de los electrones libres del grupo imina de las bases de Schiff es factible la unión a los iones metálicos como cobre o zinc, secuestrando de esta manera a cofactores necesarios para el metabolismo celular. El secuestro de cofactores puede interferir con el funcionamiento de algunas enzimas metalo-dependientes, disminuyendo su función. Igualmente, los procesos metabólicos del parásito, como su crecimiento, pudieran estar inhibidos y en algunos casos provocando su muerte (Caballero *et al.*, 2014). Nuestros resultados demostraron que todos los compuestos inhibieron el crecimiento de *L. mexicana*. Lo anterior es de importancia, ya que en estudios previos se ha demostrado que ligantes tetradentados tienen la capacidad de inhibir selectivamente a la anhidrasa carbónica (enzima que pertenece a la familia de las metaloenzimas) al quelar al zinc que poseen en su centro activo (Carradori *et al.*, 2013). Los ligantes H₂salbu, H₄Salbu y ClH₄Salbu tienen la característica de ser moléculas bidentadas que poseen 2 oxígenos y 2 nitrógenos con un par de electrones cada uno capaces de interactuar con iones metálicos. Esta característica podría conferirles la capacidad de ser agentes quelatantes y secuestrar iones metálicos dentro de la célula (Revenga., 2009).

Los compuestos H₄Salbu y ClH₄bu presentan una estructura tetraédrica. Se ha reportado que dicha estructura tiene mayor afinidad por algunos iones, por ejemplo, el Zn²⁺. En este caso, los ligandos (H₄Salbu y ClH₄bu) posiblemente puedan competir con el parásito por el zinc, el cual es importante para su fisiología (Kumari *et al.*, 2017).

Notablemente se observó que en macrófagos infectados con *Leishmania*, la incubación con los compuestos (H₂Salbu y H₄Salbu) durante 24 horas redujo a más del 50% la sobrevivencia de los amastigotes intracelulares, mientras que los compuestos (ClH₄bu y CuClH₄) afectaron aproximadamente un 30% de sobrevivencia del parásito. Esto sugiere que los compuestos tienen la capacidad de ingresar a los macrófagos infectados y dañar a los amastigotes. En la literatura se ha reportado que los complejos de bases de Schiff de N-2-hidroxinaftaldehído con D-glucosamina y complejos con iones de metales de transición, como cobre y zinc con D-glucosamina, tuvieron la propiedad de poder entrar a la célula y de unirse al DNA, lo cual fue demostrado por la alteración en la absorbancia de la luz UV-vis de muestras de DNA de células incubadas con las bases de Schiff y con los complejos con respecto a las células sin estimular, demostrando así la interacción de ambas moléculas (Tang *et al.*, 2003).

En este estudio no se evaluó experimentalmente la capacidad de entrar a la célula de nuestros compuestos, sin embargo, se calcularon algunas de las propiedades necesarias para poder entrar a la célula siguiendo las reglas de 5 de Lipinski (Lipinski *et al.*, 1997). Todos los compuestos evaluados durante este trabajo cumplieron los criterios de las reglas de Lipinski, mostrando gran potencial para poder entrar a la célula. Interesantemente, aunque los compuestos presentaron capacidad de ingresar a células y unirse al DNA, no afectaron la sobrevivencia de macrófagos. Esto sugiere que posiblemente exista un mecanismo selectivo de entrada a la vacuola parasitófora, ya que se mostró solamente efecto contra el parásito. Es necesario realizar más estudios para demostrar esta selectividad. Nuestros resultados concuerdan con datos de la literatura en la cual se reporta que la base de Schiff N-(saliciliden)-2-hidroxianilina es efectiva contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv con una MIC de 8 µg/ml, sin presentar toxicidad contra macrófagos J774, aún con concentraciones muy elevadas

como 1000 $\mu\text{g/ml}$ que cursó con una sobrevida del 80% de los macrófagos, lo cual sugiere una selectividad sobre la bacteria (Da Silva *et al.*, 2011). Por otro lado, el mecanismo de acción del compuesto CuClH_4 podría asociarse con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan de manera inespecífica al DNA. Los compuestos de coordinación con iones metálicos han mostrado ser capaces de interaccionar con DNA y que, en presencia de un reductor, generan radicales libres de oxígeno que dañan inespecíficamente al DNA (Navarro *et al.*, 2010). Además, el compuesto CuClH_4 se caracteriza por poseer una geometría plana, en la literatura se ha descrito que las moléculas con geometría plana tienen cierta rigidez y que esta propiedad les confiere la capacidad de intercalarse en el surco menor del DNA, desestabilizando de esta manera al genoma del parásito (Lamour *et al.*, 1999).

Capítulo 8

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este estudio se demostró que las bases de Schiff, los ligantes hidrogenados y los compuestos coordinados con cobre poseen actividad leishmanicida, tanto sobre parásitos extracelulares, como sobre parásitos en el interior del macrófago. Los compuestos mostraron ser capaces de ingresar a la vacuola parasitófora y dañar selectivamente al parásito, sin dañar al macrófago. Es importante analizar si el efecto leishmanicida es por acción directa de los compuestos sobre el parásito o si posiblemente también activen mecanismos microbicidas del macrófago. Aunque en este estudio se demostró que los compuestos cumplen con las características para poder entrar a la célula, son necesarios más estudios para demostrar su entrada y selectividad. Adicionalmente es importante encontrar un vehículo adecuado para su aplicación tópica. El poder desarrollar un tratamiento que combine las propiedades farmacocinéticas de estos compuestos con un vehículo que permita su buena absorción en la lesión, permitiría generar una terapia novedosa con gran potencial. También será interesante estudiar si además de ser leishmanicidas, estos compuestos puedan inmunomodular al macrófago, reforzando sus mecanismos efectores como son la generación de especies reactivas de oxígeno y óxido nítrico.

Bibliografía

1. Abu-Dief, A., & Mohamed, I. (2015). A review on versatile applications of transition metal complexes incorporating Schiff bases. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(2), 119–133.
2. Argueta-Donohué, J., Wilkins-Rodríguez, A., Aguirre-García, M. & Gutiérrez-Kobeh, L. (2016). Differential phagocytosis of *Leishmania mexicana* promastigotes and amastigotes by monocyte-derived dendritic cells. *Immunology*, 60, 369-381.
3. Arulmurugan, S., Kavitha, H., & Venkatraman., B. (2010). Biological Activities of Schiff Base and Its Complexes : a Review. *Rasayan J.Chem.*, 3(3), 385–410.
4. Caballero, A., Salas, J & Sánchez-Moreno, M. (2014). Metal-Based Therapeutics for Leishmaniasis. *Leishmaniasis – Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment, IntechOpen*, 465 – 493.
5. Carradori, S., De Monte, C., D’Ascenzio, M., Secci, D., Celik, G., Ceruso, M., Vullo, D., Scozzafava, A & Supuran, C. (2013). Salen and tetrahydrosalen derivatives act as effective inhibitors of the tumor-associated carbonic anhydrase XII - A new scaffold for designing isoform-selective inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23(24), 6759–6763.
6. Da Silva, C., Da Silva, D., Modolo, L., Alves, R., De Resende, M., Martins, C., & De Fátima, Â. (2011). Schiff bases: A short review of their antimicrobial activities. *Journal of Advanced Research*, 2(1), 1–8.
7. Del Rosal, R., Baquero-Artigao, F., & García, M. (2010). Leishmaniasis cutánea. *Pediatría de Atención Primaria*, 12(46), 263–271.
8. Delgado-Domínguez, J. González-Aguilar, H. Aguirre-García, M. Gutiérrez-Kobeh, L. Berzunza-Cruz, M. Ruiz-Remigio, A. Robles-Flores, M & Becker, I. (2010). *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan differentially regulates PKC α -induced oxidative burst in macrophages of BALB / c and C57BL / 6 mice. *Parasite Immunology*, (32), 440–449.
9. Fasina, T., Ogundele, O., Ejiah, F & Dueke-Eze, C. (2012). Biological Activity of Copper (II), Cobalt (II) and Nickel (II) Complexes of Schiff Base Derived from o-phenylenediamine and 5-bromosalicylaldehyde. *International Journal of Biological Chemistry*, 6 (1), 24-30.

10. Goto, H., & Lindoso, J. (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8(4), 419–433.
11. Kajal, A., Bala, S., Kamboj, S., Sharma, N. & Saini, V. (2013). Schiff Bases : A Versatile Pharmacophore. *Journal of Catalysts*. 2013.
12. Kaye, P., & Scott, P. (2011). Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, 9(8), 604–615.
13. Kevric, I., Cappel, M., & Keeling, J. (2015). New World and Old World Leishmania Infections A Practical Review. *Dermatologic Clinics*, 33(3), 579–593.
14. Kumari, A., Singh, K., Mandal, A., Paswan, R., Sinha, P., Das, P., Ali, V., Bimal, S & Lal, C. (2017). Intracellular zinc flux causes reactive oxygen species mediated mitochondrial dysfunction leading to cell death in *Leishmania donovani*. *PLoS ONE*, 12(6), 1–25.
15. Lamour, E., Routier, S., Bernier, J., Catteau, J., Bailly, C., & Vezin, H. (1999). Oxidation of Cu(II) to Cu(III), free radical production, and DNA cleavage by hydroxy-salen-copper complexes. Isomeric effects studied by ESR and electrochemistry. *Journal of the American Chemical Society*, 121(9), 1862–1869.
16. Lipinski, C., Lombardo, F., Dominy, B., & Feeney, P. (1997). Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, 3–25.
17. Lupi, O., Bartlett, B., Haugen, R., Dy, L., Sethi, A., Klaus, S. N., Tying, S. (2009). Tropical dermatology: Tropical diseases caused by protozoa. *Journal of American Dermatology*, 60(6), 897–925.
18. Mitropoulos, P., Konidas, P., & Durkin-Konidas, M. (2010). New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 63(2), 309–322.
19. Montalvo, A., Fraga, J., Monzonte, L., García, M., & Fonseca, L. (2012) Diagnóstico de la leishmaniasis : de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN Leishmaniasis diagnosis : going from microscopic observation of parasite to DNA detection. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 64, 108–131.

20. Monzote, L. (2009). Current treatment of leishmaniasis: a review. *Open Antimicrob Agents J*, 9–19.
21. Navarro, M., Gabbiani, C., Messori, L., & Gambino, D. (2010). Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: Recent achievements and perspectives. *Drug Discovery Today*, 15(23–24), 1070–1078.
22. Novoa, C. (2017). Estudio de la variación del sustituyente y la hidrogenación del Ligante 5-X-H₂Salbu en compuestos de coordinación de Cu(II) y su efecto en la actividad biológica (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México.
23. Organización Mundial de la Salud. (2010). Control de las leishmaniasis. Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS, 1–200.
24. Palumbo, E. (2009). Current Treatment for Cutaneous Leishmaniasis : A Review, 182, 178–182.
25. Piccolo, L., Pérez, E., Álvarez, L., Wang, C., & Sancho, M. (2018). Leishmaniasis: Opciones terapéuticas en la población pediátrica Leishmaniasis. *Medicina Legal de Costa Rica Edición Virtual* 35(1), 1–13.
26. Pigott, D., Bhatt, S., Golding, N., Duda, K., Battle, K., Brady, O., Messina, J., Balard, Y., Bastien, P., Pratlong, F., Brownstein, J., Freifeld, C., Mekary, S., Gething, P., George, D., Myers, M., Reithinger, R., & Hay, S. (2014). Global distribution maps of the Leishmaniases. *ELife*, (3), 1–21.
27. Podinovskaia, M., & Descoteaux, A. (2015). Leishmania and the macrophage : a multifaceted interaction, 10, 111–129.
28. Ramírez, M. (2012). *Búsqueda de nuevos fármacos de actividad antiparasitaria frente a Leishmania spp y Trypanosoma cruzi* (Tesis Doctoral). Universidad de Granada, España.
29. Revenga, M. (2009). Síntesis y caracterización de ligandos hidroxilados de base de Schiff. Aplicación al desarrollo de sensores y biosensores (Tesis de Doctorado). Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, España.
30. Rojas-espinosa, O. & Arce-paredes, P. (2004) Fagocitosis : mecanismos y consecuencias Segunda parte. *Bioquímica*. 29(1), 18-31.

31. Ruiz, J., & Becker, I. (2007). CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, *29*(12), 671–678.
32. Santos, D., Coutinho, C., Madeira, M., Bottino, C., Vieira, R., Nascimento, S., Castro, H. (2008). Leishmaniasis treatment - A challenge that remains: A review. *Parasitology Research*, *103*(1), 1–10.
33. Secretaría de Salud. Programa de Acción Específico Prevención y Control de las Leishmaniasis (2013).
34. Scott, P., & Novais, F. O. (2016). Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Reviews Immunology*, *16*(9), 581–592.
35. Taciak, B., Białasek, M., Braniewska, A., Sas, Z., Sawicka, P., Kiraga, Ł., Kro, M. (2018). Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages, *PLOS ONE*, *13*(6), 1–13.
36. Tang, H., Ye, Y., Li, T., Zhou, J., & Chen, G. (2003). Study on Schiff base complexes-cellular DNA interactions by a novel system of Hadamard transform fluorescence image microscopy. *Analyst*, *128*(7), 974–979.
37. Teixeira, D., Benchimol, M., Rodrigues, J., Crepaldi, P., Pimenta, P., & de Souza, W. (2013). The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. *PLoS Pathogens*, *9*(10), 7–11.
38. Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M., Ruiz-Esmenjaud, J., & Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, *6*(May), 750.
39. Unger, A., O’Neal, S., Machado, O., Guimarães, L., Morgan, D., Schriefer, A., Bacellar, O., Glesby, M., & Carvalho, E. (2009). Association of Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis Prior to with High Rate of Failure in Northeastern Brazil. *NIH Public Access*. *80*(4), 574-579.
40. World Health Organization. Clinical forms of the leishmaniasis. Recuperado de: http://www.who.int/leishmaniasis/disease/clinical_forms_leishmaniasis
41. Yardley, V., Croft, S., De Doncker, S., Dujardin, J., Koirala, S., Rijal, S. & Chappuis, F. (2005). The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *73*(2), 272–275.

42. Zetina, J. (2008). Artículo original Leishmaniasis cutánea en el estado de Quintana Roo, México, *Dermatología Revista Mexicana*, 52(1), 3–9.