



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Análisis del efecto *in-vitro* que ejerce el compuesto
Casiopeína® III-ia sobre *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:

ANDREA ARIZBETH JUÁREZ GALICIA



DIRECTOR 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

Juárez
Galicia
Andrea
Arizbeth
55 86 18 60 96
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de ciencias
Biología
310123251

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

M en C
Isabel Cristina
Cañeda
Guzmán

7. Datos del sinodal 5

M en C

Ronna

Delgado

Altamirano

8. Datos del trabajo escrito

Análisis del efecto *in vitro* que ejerce el compuesto Casiopeína® III-ia sobre
Leishmania mexicana

42 p

2019

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de
Inmunoparasitología de la Unidad de Medicina Experimental
de la Facultad de Medicina (UNAM)

Agradecimientos

A los programas de apoyos PAPIIT IN211418 y PAPIIT IG200616 por la aportación económica para la realización de este proyecto.

A la Dra. Ingeborg Becker Fauser por el apoyo y asesoría académica en este proyecto de investigación.

Al Dr. José Sotero Delgado Domínguez por brindarme su experiencia, asesoría técnica y académica, así como su paciencia y consejos durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Lena Ruiz Azuara por el asesoramiento y aportación de las Casiopeínas® para la realización de este estudio.

A las M. en C. Cristina Cañeda Guzmán y Ronna Delgado Altamirano por sus correcciones y aportaciones en el trabajo escrito.

A la M. en C. Rocely Buenaventura Cervantes por la aportación de cultivos de *Leishmania mexicana* y apoyo técnico en los experimentos realizados para el presente estudio.

A los técnicos del Laboratorio de Inmunoparasitología de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina (UNAM) por las enseñanzas y facilidades durante mi estancia en el laboratorio.

Al Sr. Marco Elías Gudiño Zayas por su ayuda en la toma de fotografías para este estudio.

Al HT. Alfredo Amadeo Díaz Estrada por el apoyo en el procesamiento de muestras de tejido.

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

Dedicada a:

Mis padres Sandra Luz Galicia Ceja y Oscar Joaquín Juárez Aguilar, a mi hermana Adriana y a mi segunda mamá, mi abuelita Estela, por su amor, apoyo incondicional y por brindar su mayor esfuerzo para que yo pudiera estudiar en la mejor universidad del país.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES	2
1.1 Generalidades sobre leishmaniasis	2
1.2 Epidemiología	2
1.3 Epidemiología en México	3
1.4 Taxonomía del género <i>Leishmania</i>	5
1.5 Ciclo biológico de <i>Leishmania</i>	5
1.6 Formas clínicas de la enfermedad leishmaniasis	7
1.6.1 Leishmaniasis cutánea (LC)	7
1.6.2 Leishmaniasis visceral (LV)	8
1.6.3 Leishmaniasis mucocutánea (LMC)	9
1.7 Diagnóstico y tratamientos contra Leishmaniasis	10
1.7.1 Antimoniales pentavalentes	10
1.7.2 Pentamidina	11
1.7.3 Anfotericina B	11
1.7.4 Otros tratamientos	12
1.8 Casiopeínas®: Generalidades	13
1.8.1 Antecedentes de Casiopeínas®	14
1.8.2 Posibles mecanismos de acción de las Casiopeínas®	16
1.8.3 Casiopeína III-ia	17
CAPÍTULO 2: JUSTIFICACIÓN	18

CAPÍTULO 3: HIPÓTESIS	19
CAPÍTULO 4: OBJETIVO GENERAL	19
4.1 Objetivos particulares	19
CAPÍTULO 5: MÉTODO Y MATERIALES	20
5.1 Obtención del compuesto Ca III-ia	20
5.2 Animales de laboratorio	20
5.3 Obtención y aislado de <i>Leishmania mexicana</i>	20
5.4 Análisis de Ca III-ia sobre promastigotes	21
5.5 Obtención de macrófagos murinos	21
5.6 Análisis de viabilidad en macrófagos murinos en contacto con el compuesto Ca III-ia	21
5.7 Evaluación del efecto de Ca III-ia en la sobrevivencia de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	22
5.8 Infección de cojinete plantar en modelo murino con <i>L. mexicana</i>	23
5.9 Evaluación de la evolución de la enfermedad en ratones BALB/c infectados con <i>L. mexicana</i> y que fueron tratados vía tópica con Ca III-ia	23
5.10 Herramientas computacionales y estadísticas	24
CAPÍTULO 6: RESULTADOS	25
6.1 Análisis del efecto in-vitro que ejerce Ca III-ia sobre la viabilidad en promastigotes de <i>L. mexicana</i>	25
6.2 Análisis del efecto <i>in vitro</i> que ejerce el compuesto Casiopeina® III-ia sobre macrófagos murinos	26
6.3 Análisis del efecto <i>in vitro</i> que ejerce Cas III-ia sobre la viabilidad de promastigotes en macrófagos infectados con <i>L. mexicana</i>	27
6.4 Evaluación de la evolución de la enfermedad en ratones BALB/c infectados con <i>L. mexicana</i> y que fueron tratados vía tópica con Ca III-ia	28
CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN	31

CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	35
CAPÍTULO 9: BIBLIOGRAFÍA	36

RESUMEN

En México una parasitosis de gran interés es la leishmaniasis, un conjunto de enfermedades que representan un serio problema de salud pública. Actualmente existen diferentes tratamientos contra esta enfermedad. El tratamiento más usado en México son los antimoniales pentavalentes, sin embargo, suelen ser caros y su obtención es limitada, cabe recalcar que también se han presentado efectos adversos en pacientes, y como consecuencia ha aumentado la resistencia del parásito a estos fármacos. En el presente proyecto se analizó el efecto de Casiopeína III-ia, (un compuesto coordinado con centro metálico de Cobre) sobre la viabilidad en los estadios promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana*, así como también en macrófagos sanos. En este estudio se aplicaron diferentes concentraciones del compuesto, más un control sin estímulo. Se realizaron pruebas de viabilidad por conteo en cámara de Neubauer y se obtuvieron las concentraciones inhibitorias medias (CI₅₀). Así mismo, se realizaron pruebas *in vivo* donde se trataron vía tópica ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* y se evaluó la evolución de la enfermedad durante un mes.

Los resultados demostraron que este compuesto inhibe la viabilidad de los parásitos comportándose de manera dosis-dependiente sobre ambos estadios del parásito, obteniendo una CI₅₀ de 10.03 μM en promastigotes de *Leishmania mexicana* y una CI₅₀ de 0.98 μM en macrófagos murinos. Además, al analizar el efecto sobre la evolución de la enfermedad en ratones, se observó una disminución en la carga parasitaria del área infectada.

Estos resultados permiten considerar a Cas III-ia como un compuesto prometedor para el tratamiento de la enfermedad leishmaniasis. Sin embargo, se requiere realizar experimentos que permitan entender el mecanismo de acción de dicho compuesto.

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES

1.1 Generalidades sobre leishmaniasis

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades producidas por parásitos protozoarios flagelados, que pertenecen al género *Leishmania*. Se transmiten a través de la picadura de un vector díptero hematófago del género *Phlebotomus spp.* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia spp.* en el Nuevo Mundo [Herdwaldt, 1999; Buffet, 2015].

Las leishmaniasis son enfermedades zoonóticas con amplia distribución en zonas tropicales y subtropicales [CDC, 2019] y pueden afectar tanto a seres humanos como a otras especies de mamíferos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) la como el cuarto grupo de enfermedades más importante en el trópico. Casi 350 millones de personas viven en áreas endémicas y se calcula que 12 millones de individuos están infectados con el parásito, de los cuales 1.5 millones son casos notificados [Velazco *et al.*, 1994].

1.2 Epidemiología

Las leishmaniasis son endémicas en 98 países del mundo [CENAPRECE, 2015] incluyendo América Central, América del Sur, India, el Oriente Medio, el Norte de África y el Sur de Europa (Figura 1). Sin embargo, el 90 % de los casos de leishmaniasis cutánea se presenta en 8 países: Afganistán, Pakistán, Siria, Arabia Saudita, Argelia, Irán, Brasil y Perú. Por otra parte, el mayor número de casos de leishmaniasis visceral se encuentra en India, Bangladesh, Nepal, Sudán y Brasil [Alvar *et al.*, 2012]. La enfermedad está asociada principalmente a la pobreza, desnutrición, el desplazamiento de la población, la vivienda deficiente, el sistema inmunológico débil y la falta de recursos. Predomina en hombres, aunque no es determinante [Pisopo & Mallia, 2006].

Específicamente en América Latina, la leishmaniasis cutánea y mucosa son endémicas en 18 países distribuidos desde México hasta Argentina, son enfermedades propias de ambientes con altitudes de 0 a 1,500 msnm y temperaturas mayores a 20°C. En el periodo del 2001 al 2013 fueron registrados 743.970 casos con un promedio anual de 57.228 casos, del 2013 al 2017 se

registraron menos casos, esto puede deberse a factores relacionados con el sistema de vigilancia, aspectos ambientales, biológicos, sociales, etc. [POS/OMS].

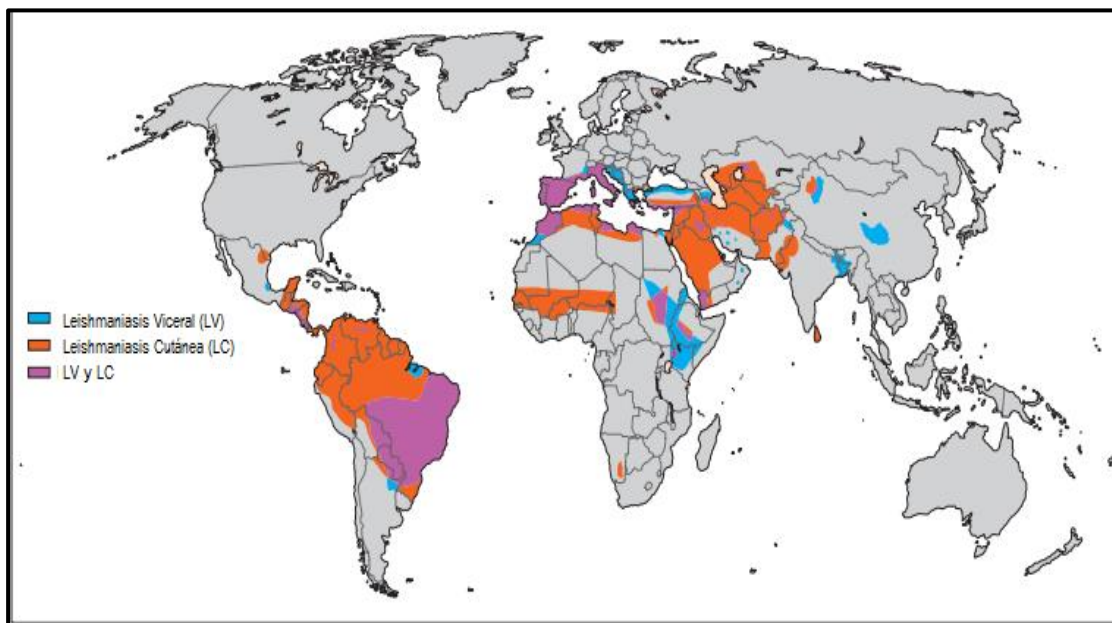


Figura1. Distribución de leishmaniasis en el mundo. En azul se representa la presencia de leishmaniasis visceral (LV), en color naranja indica la presencia de leishmaniasis cutánea (LC), en color morado indica la presencia de ambas (LC y LV), el color gris representa la ausencia de datos. Foto tomada de Davidson (2017).

1.3 Epidemiología en México

Con respecto a México, se han reportado todas las formas clínicas de leishmaniasis que se han descrito a nivel mundial. No obstante, la forma clínica predominante es la leishmaniasis cutánea (LC), que al afectar la oreja del humano origina la clásica “ulcera de los chicleros” [Cordoba *et al.*, 1993].

Si bien 17 estados reportaron casos alguna vez, actualmente la población en riesgo se distribuye en 13 entidades federativas con aproximadamente nueve millones de habitantes, agrupadas en tres áreas geográficas (Figura 2):

- a) Región del Golfo: Veracruz, Tabasco, Campeche, Quintana Roo y Yucatán.
- b) Región del Pacífico: Chiapas, Guerrero, Jalisco, Nayarit, Oaxaca y Sinaloa.

c) Región Centro: Morelos y Puebla.

Todos correspondientes a la zona neotropical [CENAPRECE, 2015].

A partir de datos obtenidos del Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS) durante el periodo del 2006-2011 se registraron 3,657 casos de leishmaniasis (en su mayoría correspondientes a la forma cutánea) de los cuales el 72% son masculinos, 28% femeninos [DGE, 2019], durante el 2012 se registraron 579 casos de los cuales el mayor porcentaje lo obtuvo Quintana Roo con el 39% de casos, seguido de Campeche con 21% y Chiapas con 17% [CENAPRECE, 2015], entre el 2010 y el año 2013 se registraron 970 [OPS/OMS]. El grupo de edad más afectado es el de adultos-jóvenes con un rango de edad entre los 20 y 50 años quienes acumulan el 47% de los casos [OPS/OMS; CENAPRECE].

La ocupación en México es un factor de riesgo importante: agricultores, cazadores, taladores, militares, biólogos, quienes practican el turismo ecológico, así como mujeres, ancianos y niños se encuentran en mayor riesgo de contraer leishmaniasis, debido a su alta exposición en zonas endémicas [David & Craft. 2009].

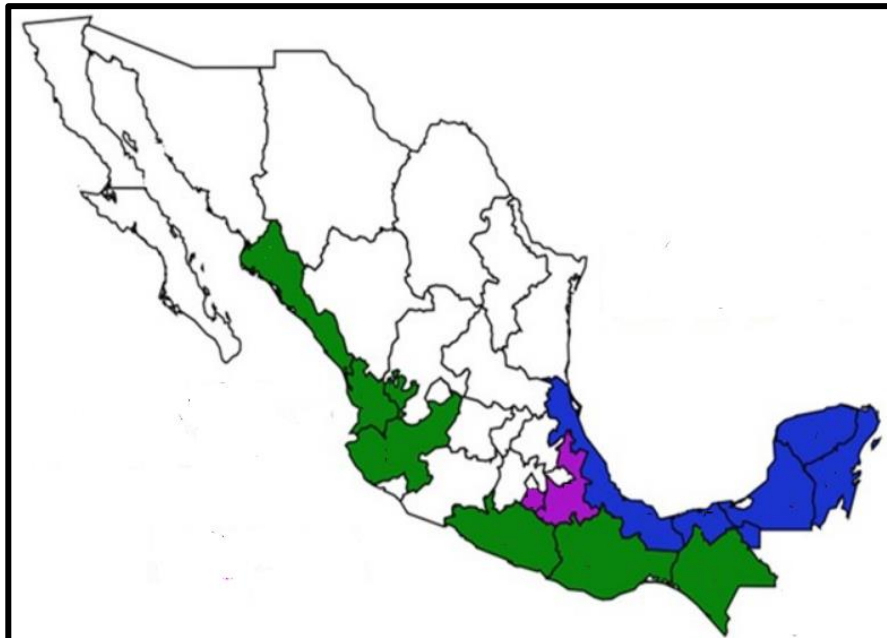


Figura 2. Regiones endémicas de leishmaniasis de la República Mexicana. La región del Golfo (azul), la región centro (morado), la región del pacífico (verde). Tomado y modificado de Monroy & Sánchez (2017).

1.4 Taxonomía del género *Leishmania*

Las especies de parásitos pertenecientes al género *Leishmania* se agrupan en dos subgéneros de acuerdo con el sitio donde se desarrollan en el tracto gastrointestinal del insecto vector (Figura 3). En el subgénero *Leishmania* se incluyen las especies que se desarrollan en el intestino medio de los flebotomíneos, como las especies del Viejo Mundo y el complejo mexicana del Nuevo Mundo. Por otro lado, *Viannia* se agrupan las especies que se desarrollan en el intestino posterior a la altura del triángulo pilórico, dentro del cual se incluyen el resto de las especies del Nuevo Mundo, como *Leishmania panamensis*, *Leishmania braziliensis* y *Leishmania guyanensis* [Hepburn, 2003]. Hay al menos 21 especies de *Leishmania* que pueden causar enfermedades en humanos [Escalona, 2018].

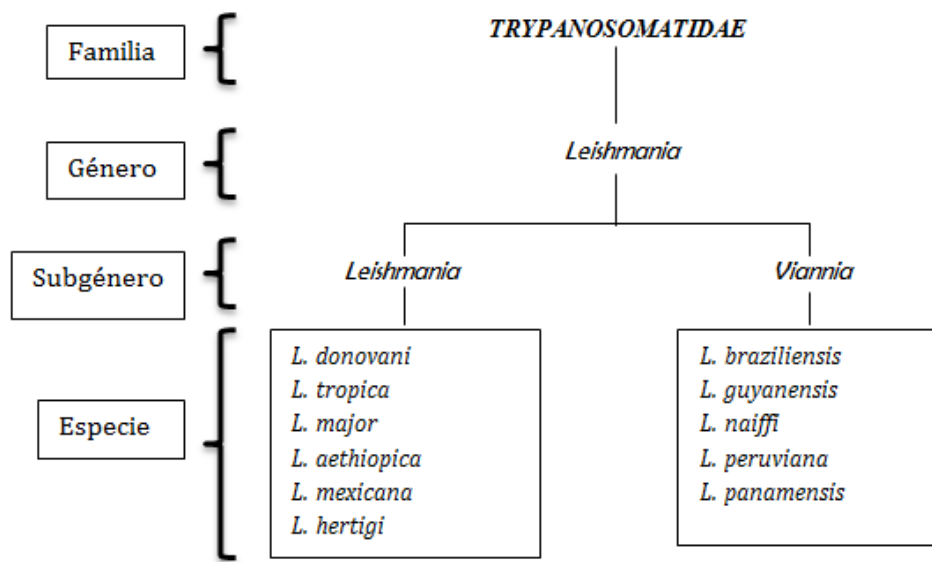


Figura 3. Clasificación taxonómica del género *Leishmania*.

1.5 Ciclo biológico de *Leishmania*

Los parásitos de *Leishmania* presentan dos estadios en su ciclo de vida: el promastigote, que es la forma flagelada, móvil, alargada, extracelular que mide de 20-30 μm . Esta forma se desarrolla y se multiplica en el tracto digestivo de los insectos transmisores. La otra forma es el amastigote, es

redondo u oval, no presenta flagelo, mide 2-5 μm es inmóvil y se encuentra dentro de los macrófagos de los vertebrados. En ambas formas se reproducen por fisión binaria [CDC, 2019].

La infección por *Leishmania* en el hospedero vertebrado comienza cuando un flebotomíneo hembra infectado inoculara, a través de una picadura, al promastigote en fase metacíclica. Los promastigotes son fagocitados, permanecen dentro de la vacuola parasitófora y, posteriormente se diferencian en amastigotes en el pH ácido de la vacuola. Es en este compartimento donde prolifera por fisión binaria, evadiendo a su vez la respuesta inmune mientras se replica. Después de múltiples divisiones, los amastigotes lisan a los macrófagos liberando los parásitos que pueden infectar nuevos macrófagos [Killick, 1979].

Finalmente, el ciclo de vida de *Leishmania* se cierra cuando los amastigotes son ingeridos por otro mosquito y dentro del tubo digestivo de éste los amastigotes se transforman a promastigotes, los cuales se multiplicarán y podrán infectar a otros hospederos.

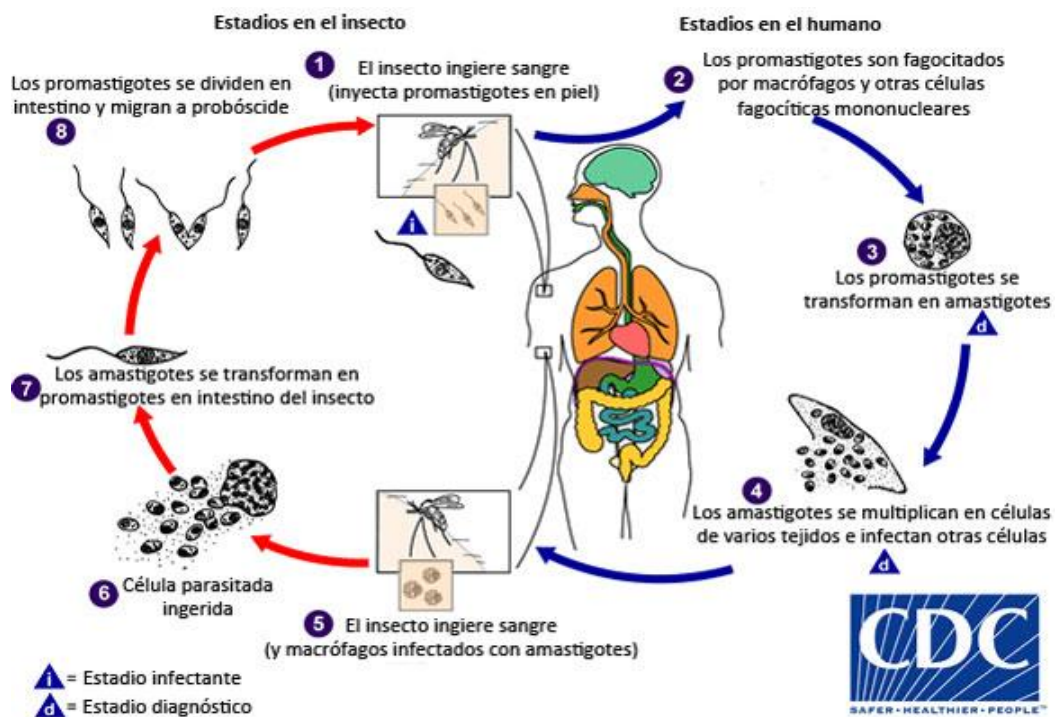


Figura 4. Ciclo de vida de *Leishmania*. El mosquito infectado inoculará los promastigotes metacíclicos al mamífero, estos son fagocitados y se transformarán a amastigotes. En el interior de los macrófagos se replicarán hasta lisis de la célula para proseguir con la infección. El mosquito al ingerir sangre de los

mamíferos (humano) infectados tomará los amastigotes de la piel y dentro del intestino del insecto se transformarán a promastigotes metacíclicos. Las flechas rojas indican las fases que se llevan a cabo en el vector y las flechas azules son las etapas en el interior de los macrófagos de los mamíferos (humano). Fuente CDC, (2019)

1.6 Formas clínicas de la enfermedad leishmaniasis

1.6.1 Leishmaniasis cutánea (LC)

La LC se manifiesta desde unas pocas semanas hasta meses después de la picadura del mosquito, dependiendo de las especies de *Leishmania*. Los primeros síntomas son subjetivos y sólo afectan de manera local. En el sitio de la picadura aparece una lesión que inicia como un punto eritematoso, después se forma una pápula en general no mayor a un 1cm de tamaño y posteriormente se forma una úlcera (Fig. 5), la cual puede verse expuesta en partes del cuerpo como la cara, los brazos y las piernas [Escalona, 2018; David & Craft, 2009].

Los pacientes pueden tener una o más lesiones. Cada lesión representa una picadura de mosquito la cual es llamada leishmaniasis cutánea localizada (LCL). Sin embargo, hay casos en los que se manifiesta como una enfermedad diseminada llamada leishmaniasis cutánea difusa (LCD). Esta se caracteriza por anergia, es decir falta de respuesta inmunitaria celular a antígenos del parásito, permitiendo la diseminación de este por vía tisular o por linfa con desarrollo de nódulos en casi toda la piel, a excepción de piel cabelluda [David & Craft, 2009]. En América, los agentes causales de la LCD son *L. amazonensis* y *L. mexicana* principalmente, pero también se ha registrado a *L. braziliensis* en pacientes coinfectados con Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) [Zerpa & Convit., 2009].

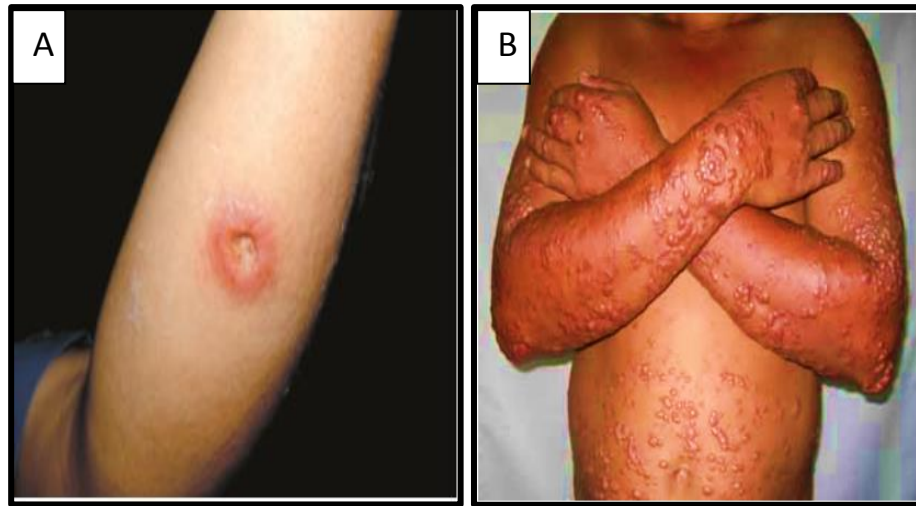


Figura 5. Paciente con leishmaniasis cutánea. (A) Úlcera de paciente con LCL [Vargas et. al., 2011]. (B) Nódulos en pacientes con leishmaniasis cutánea difusa [Zerpa & Convit, 2009].

1.6.2 Leishmaniasis visceral (LV)

Se le conoce también como enfermedad negra o “kala azar”. Los pacientes presentan fiebre, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia (bazo e hígado agrandados), o hepatomegalia (agrandamiento del hígado) (Figura 6), palidez (causada por anemia grave), linfadenopatía, pancitopenia e hipergammaglobulinemia entre 3 a 8 meses después de la picadura del vector infectado. Es causada principalmente por *L. donovani*, y *L. infantum* (Syn. *L. chagasi*); sin embargo, los pacientes inmunodeprimidos e infectados con otras especies de *Leishmania*, por ejemplo, *L. amazonensis* y *L. tropica* pueden llegar a manifestar este cuadro clínico [Ríos & Sousa, 2010]. La enfermedad puede ser asintomática y de fácil resolución, pero generalmente tiene un curso crónico y puede ser fatal a pesar del tratamiento [Piscopo & Mallia, 2006], ya que en ocasiones los síntomas y signos físicos dependen de la duración de la enfermedad, el estado nutricional del paciente, la presencia de complicaciones debido a coinfección con el virus VIH o pacientes inmunosuprimidos. Después de semanas o meses de enfermedad, la mayoría de los pacientes con LV mueren con infecciones bacterianas secundarias, neumonía, insuficiencia cardíaca, disentería, sarampión u otras infecciones [Davidson, 2017].

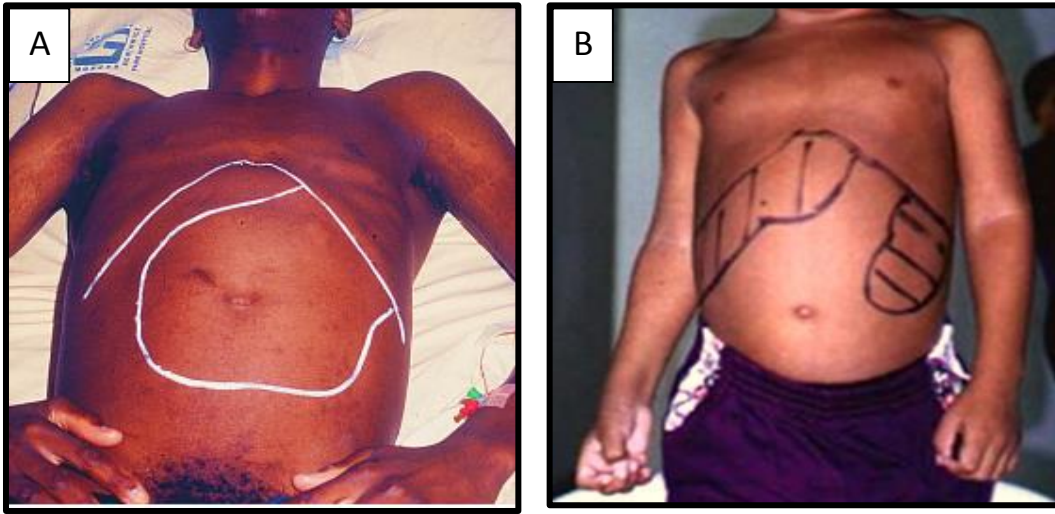


Figura 6. Pacientes con leishmaniasis visceral. (A). Agrandamiento del bazo (esplenomegalia). (B). Agrandamiento del hígado y bazo (hepatoesplenomegalia). Davidson (2017) y Sánchez (2019).

1.6.3 Leishmaniasis Mucocutánea (LMC)

También conocida como espundia. Se caracteriza por inflamación granulomatosa de la mucosa de la nariz, cavidad oral y faringe (Figura 7). Puede existir destrucción del tabique nasal. El periodo de incubación más frecuente es de 1 a 3 meses. Las especies más frecuentemente asociadas a este tipo de leishmaniasis son: *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, y *L. amazonensis* [Yuil & Sousa, 2010; Pisopo & Mallia., 2006].



Figura 7. Pacientes con leishmaniasis mucocutánea. Deterioro del tabique nasal. Fotografía tomada de OPS/OMS y Davidson (2017).

1.7 Diagnóstico y Tratamientos contra Leishmaniasis

El diagnóstico de laboratorio para esta enfermedad incluye el aislamiento, visualización por medio de una impronta y el cultivo del parásito a partir de tejido infectado. También es posible realizar una detección serológica de anticuerpos contra antígenos. O bien, detectar el DNA del parásito mediante técnicas de PCR que además de ser un diagnóstico rápido también se pueden identificar las especies de *Leishmania* involucradas en el cuadro clínico.

En cuanto a tratamientos, en la actualidad existen dos series de medicamentos en uso: los antimoniales y los no antimoniales. El tratamiento básico de la enfermedad consiste en la administración de antimoniales pentavalentes como: estibogluconato sódico (Pentostam®), antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime®), de primera generación y pentamidina o anfotericina B, ambas de segunda generación [Corpas, 2015]. Sin embargo, se han realizado varios ensayos con otros medicamentos e incluso vacunas como prospectos con el objetivo de encontrar alguna opción terapéutica satisfactoria.

1.7.1 Antimoniales pentavalentes

Fueron desarrollados en 1945 y han sido considerados como el tratamiento para todas las formas de leishmaniasis. La administración es realizada por vía intravenosa (IV), intramuscular (IM) o directamente en las lesiones [Mitropoulos *et al.*, 2010]. La dosis dependerá del tipo de complejo antimonio, de la zona geográfica, de la forma clínica que el paciente manifieste, además de la edad del paciente. Sin embargo, el rango de dosis recomendado es de 10 a 20 mg/kg/día durante un período mínimo de 20 días [Haldar & Roy, 2011; Oliveira *et al.*, 2011].

En cuanto al mecanismo de acción sobre *Leishmania*, se proponen tres modelos: El primero de ellos explica que el antimonio pentavalente (Sb (V)) podría sufrir una reducción biológica a una forma trivalente de antimonio mucho más activa y tóxica (Sb (III)) que exhibe actividad leishmanicida, estudios han revelado que esta reducción es estimulada por la fase amastigote del parásito y también podría tener lugar dentro de los macrófagos [Haldar & Roy, 2011; Sereno *et al.*, 1998]. El segundo modelo sugiere que los antimoniales inhiben la glucólisis, la oxidación de ácidos

grasos, e inducen la disminución de la biosíntesis energética del amastigote [Arias, 2009; Haldar & Roy, 2011]. Por otro lado, de acuerdo al tercer modelo, los antimoniales eliminan amastigotes mediante la activación del sistema inmune del huésped. Estudios han revelado que estos fármacos activan macrófagos para inducir generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y óxido nítrico eliminado así a los parásitos [Haldar & Roy, 2011].

A pesar de ser fármacos de primera elección, también se ha observado que su aplicación ha conllevado a reacciones adversas en el paciente como: dolor músculo-esquelético, náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, cefalea, anorexia, astenia, fatiga, fiebre, exantema, eritema y urticaria [Oliveira *et al.*, 2011].

1.7.2 Pentamidina

La pentamidina (Lomidina®) es una molécula de gran interés en el tratamiento de leishmaniasis visceral y mucocutánea [Corpas, 2015].

El régimen de este fármaco tiene la ventaja de ser de corta duración. A pesar de esto, existen reacciones adversas como: dolor músculo-esquelético, anorexia, dolor abdominal, náuseas, vómitos, cefalea, astenia, fatiga y alteraciones en el sentido del gusto tales como el sabor metálico o amargo [Oliveira *et al.*, 2011].

1.7.3 Anfotericina B

Es un antibiótico, derivado de una cepa de *Streptomyces nodosus*. Pertenece al grupo de los fármacos leishmanicidas de segunda generación y es usado extensivamente en el caso de fallas en el tratamiento con compuestos antimoniales. Este fármaco tiene dos presentaciones: una como desoxicolato de anfotericina B y la otra unida a liposomas o “liposomal”, cabe resaltar que esta última tiene mayor eficacia, ya que se incorpora con más facilidad a los monocitos en donde ejerce su acción leishmanicida [OPS, 2011].

En cuanto al mecanismo de acción en *Leishmania*, anfotericina B se une al ergosterol, un esterol encontrado especialmente en las membranas celulares de *Leishmania*, deteriorando así la

integridad de las mismas, y como consecuencia hay una pérdida de potasio y otros contenidos celulares, lo que desencadena en la muerte del parásito. Sin embargo, se ha encontrado que este fármaco también se une al colesterol (principal esteroide de las membranas de células humanas), lo que ocasiona reacciones secundarias en pacientes, particularmente a nivel renal [OPS, 2011], así como también vómitos, escalofríos, disnea leve y eritema [Oliveira *et al.*, 2011].

1.7.4 Otros tratamientos

Se ha registrado a la miltefosina como el primer fármaco oral leishmanicida en India desde el 2002 [Mayor, 2016]. Tiene la ventaja de que no presenta toxicidad para el corazón, pero sí puede presentar toxicidad en riñones, por ello se requieren controles periódicos de perfil renal en sangre [OPS, 2011].

Los imidazoles orales como: metronidazol, ketoconazol, miconazol, cotrimazol, posaconazol, itraconazol, fluconazol y terbinafina también han demostrado ser efectivos frente a los diferentes cuadros clínicos que presenta la enfermedad leishmaniasis [Mayor, 2016]. Sin embargo, su alta toxicidad ha reducido su uso.

Por otra parte, algunos metabolitos secundarios aislados de algunas plantas, han sido estudiados como nuevos fármacos antiprotozoarios [Tiuman *et al.*, 2011]. La actividad biológica de los extractos de plantas se ha atribuido a compuestos que pertenecen a diversos grupos químicos como: los alcaloides, flavonoides, fenilpropanoides, esteroides y terpenoides [Tiuman *et al.*, 2011]. Tal es el caso del extracto metanólico del árbol *Bursera arida*, del cual se ha obtenido un extracto metanólico que ha sido probado sobre *L. mexicana* donde se observó una reducción en el tamaño de la lesión y carga parasitaria obteniendo un CI_{50} de 0.021mg/ml [Ávila, 2015].

También se han probado compuestos metálicos y organometálicos (combinación entre una estructura metálica y residuos orgánicos) en especial de fármacos quimioterapéuticos como nuevos agentes antiparasitarios, ya que esto puede conllevar a compuestos menos tóxicos y más activos [Corpas, 2015], además, se ha considerado que la familia *Tripanosomatidae* (grupo donde se incluye al género *Leishmania*) podría tener ciertas rutas metabólicas parecidas a las de células tumorales [Kenet, 1979].

Se analizó el efecto *in vitro* de Platino (II) sobre amastigotes de *L. donovani* donde se obtuvo el 100% de inhibición de crecimiento [Lowe, 1999]. También se analizó el efecto del complejo de oro HAuCl₄ sobre cultivos de promastigotes de *L. mexicana* donde se observó actividad antiproliferativa, los autores refieren que esta actividad puede asociarse a procesos que involucran la intercalación del fármaco sobre el DNA del parásito [Navarro, 2007].

Otro compuesto metálico que fue analizado es el sulfato de zinc, el cual fue probado contra promastigotes de *L. major* y *L. tropica* (especies causantes de leishmaniasis cutánea) donde se obtuvo la inhibición del crecimiento de los parásitos conforme la concentración aumentó, así mismo, se dio tratamiento vía oral a un grupo de ratones con este compuesto donde se observó una disminución de hasta un 90% de la lesión en los ratones tratados [Najim, 1998].

A pesar de la existencia de un amplio y variado arsenal terapéutico, la terapia actual contra la leishmaniasis no es del todo eficaz ya que la respuesta a los distintos medicamentos depende de la forma clínica y de la especie infectante, además de que la mayoría de los tratamientos resultan ser tóxicos, caros o difíciles de administrar en condiciones del terreno debido a que esta enfermedad está asociada a zonas pobres donde la mayoría de veces no hay un hospital o consultorio médico donde existan los materiales apropiados para aplicar tratamientos [Sánchez, 2019; Navin, 1993].

1.8 Casiopeínas®: Generalidades

A inicios de los años 80's en la facultad de Química de la UNAM, un conjunto de investigadores encabezados por la Dra. Lena Ruiz Azuara iniciaron un proyecto para la síntesis y desarrollo de fármacos contra el cáncer llamados Casiopeínas®, los cuales contienen un centro de cobre, un metal esencial para la unión con diferentes ligantes bidentados [Ruiz, 2013].

Aunque actualmente existen tratamientos contra diferentes tipos de cáncer como por ejemplo el *cisplatino* (compuesto coordinado con una molécula central de platino) [Rendón & Tenorio., 1998], se ha visto que éste presenta reacciones adversas en pacientes, además de tener un costo elevado por ser un fármaco de importación. Es por ello que surge la idea de diseñar compuestos con un centro de cobre, un metal esencial en los sistemas biológicos y que está distribuido de

manera natural principalmente en cerebro, riñón, hígado y corazón, el cual se espera que inhiba células cancerígenas y la vez sea menos tóxico que el *cisplatino* [Bravo & Tovar, 2002].

Las fórmulas generales de estos compuestos son: $[Cu(N-N)(N-O)] NO_3$ y $[Cu(N-N)(O-O)] NO_3$.

Dónde:

(N-N) = Ligante de tipo diimina (fenantrolinas o bipyridinas substituidas)

(N-O) = Ligante aminoacidatos o péptidos

(O-O) = Ligante donador (acetilacetionato o salicilaldehidato)

1.8.1 Antecedentes de Casiopeínas®

Las Casiopeínas® están conformadas por más de 100 compuestos organizados en nueve familias para facilitar su estudio (Tabla 1), En los últimos años las Casiopeínas® se han sometido a varias evaluaciones preclínicas para identificar propiedades toxicológicas y farmacológicas sobre diferentes tipos de células cancerosas y se ha dado más atención a los compuestos más prometedores.

Se ha evaluado de manera *in vitro* compuestos como Cas IIgly sobre la viabilidad de diferentes líneas tumorales como CaLo (carcinoma cérvico-uterino) donde se observó un 23% de viabilidad con 10µg/ml del compuesto, mientras que, con el fármaco de referencia *cisplatino* se obtuvo un 56% de viabilidad con la misma dosis. Se obtuvo un resultado similar con la línea celular HCT-15 (carcinoma de colon), donde se obtuvo un 42% de viabilidad en comparación al *cisplatino* con un 45% [Chiapa, 2007]. También se demostró que puede inducir apoptosis y necrosis en las líneas tumorales CH1, L1210 [Vizcaya *et al.*, 2000] y en presencia de ácido ascórbico es capaz de disminuir la viabilidad de células HeLa [Alemón *et al.*, 2008]. Por otro lado, Cas III-ia ha sido evaluada sobre la viabilidad en células de la línea celular U-373 (glioma maligno), donde se obtuvo un 50% de inhibición de proliferación celular, mientras que con *cisplatino* se obtuvo un 31% de inhibición [Chiapa, 2007]. Barrón (2006) reportó que también las líneas celulares HeLa, SK-LU-1, MCF-7 sufren apoptosis al ser tratadas con Cas III-ia. Otras Casiopeínas® también evaluadas

fueron Cas III-Ea y III-La, que de acuerdo a Sánchez (2018) mostraron un efecto antiproliferativo y muerte celular dependiente de caspasas sobre las líneas celulares de carcinoma de cabeza y cuello.

En cuanto a la actividad antineoplásica *in vivo* se ha reportado que las líneas celulares HeLa y PC-3 trasplantadas a un ratón, demostraron actividad antitumoral cuando estos fueron tratados con Cas III-ia, II gly y III-La por vía intraperitoneal, ya que no se mostró un aumento estadísticamente significativo al medir el volumen tumor en comparación al testigo positivo durante un mes de tratamiento [Carvalho, 2007]. También se experimentó el efecto antineoplásico de Cas II gly sobre glioma maligno C6 en modelo murino donde se observó una reducción en el volumen tumoral e índice proliferativo del 15%, en comparación al control con un índice proliferativo de 60%. En este último ensayo no hubo evidencia de toxicidad en hígado, corazón y riñón [Trejo, 2005].

Por otra parte, estudios de citotoxicidad y genotoxicidad han revelado que Cas IIgly disminuye el índice mitótico (IM) y proliferación celular en linfocitos humanos en fases G1/S y G2/M, así como aberraciones cromosómicas estructurales a dosis altas [Atilano, 2007]. En otros estudios se ha encontrado que el crecimiento celular e IM de linfocitos humanos y médula ósea no disminuye significativamente después de estimular con los metalofármacos Cas I gly, Cas II gly y Cas III-ia [Sánchez & Gracia., 2004]. Marín (2003) que Cas III-ia y Cas IIgly tienen actividad sobre mitocondrias de hígado de rata Wistar ya que inhibe la fosforilación oxidativa y provoca daño en la membrana de este tipo de células.

Tabla 1. Las Casiopeínas están clasificadas en nueve sub familias de acuerdo a sus sustituyentes y estructura.

Familia	Fórmula general
Casiopeína® I	[Cu(4,7-difenil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína® II	[Cu(4,7-dimetil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína® III	[Cu(N-N(O-O))]NO ₃
Casiopeína® IV	[Cu(4,4'-dimetil-bipiridina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína® V	[Cu(5R-fenantrolina)(N-O)]NO ₃

Casiopeína® VI	[Cu(5,6-dimetil-fenantrolina)(O-N)NO ₃
Casiopeína® VII	[Cu(fenantrolina)(O-N)(NO ₃
Casiopeína® VIII	[Cu(3,4,7,8-tetrametil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína® IX	[Cu(bipiridina)(O-N)]NO ₃

1.8.2 Posibles mecanismos de acción de las Casiopeínas®

Se ha reportado que el mecanismo de acción de los complejos de cobre reside en tres mecanismos principales: la interacción con el DNA, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y toxicidad mitocondrial que finalmente desencadena en muerte celular.

A partir de varias investigaciones se ha obtenido que las Casiopeínas® inhiben el crecimiento celular y degradan el DNA de células cancerosas debido a que en conjunto se potencia el incremento de ROS cuando hay agentes reductores, lo que sugiere una oxidación que podría desencadenar en la fragmentación del DNA y terminar en apoptosis [Bravo-Gómez *et al.*, 2015].

Por otro lado, se ha estudiado también la manera en la que se une la estructura de una Casiopeína al DNA. Inicialmente, los anillos aromáticos extendidos de estos compuestos permiten que sus ligandos se unan de diferentes maneras como: modo de unión intercalante para complejos fenantrolinas, unión en surco menor, enlace de coordinación entre el metal y el grupo fosfato [Becco *et al.*, 2012]; y sustitución parcial de ligandos con algunos grupos de coordinación con el ADN [Kachadourian *et al.*, 2010].

Particularmente Cas IIgly provoca un desequilibrio en proteínas importantes para la codificación del ADN mitocondrial en líneas celulares de cáncer de pulmón humano, interesantemente este compuesto es capaz de utilizar Glutatión (GSH) como fuente de electrones para la catalización de una reacción tipo Fenton lo que conlleva a una sobreproducción de ROS [Erxleben, 2018] desencadenando en la inestabilidad de la célula y finalmente en muerte celular.

Por lo tanto, la muerte celular podría ser el resultado de las diferencias estructurales en la geometría de cada compuesto metálico, entre ligandos unidos al centro metálico Cobre mediante interacciones no covalentes con diferentes grados de intensidad, así como también la influencia del número de anillos aromáticos y la estabilidad de cada Casiopeína® [Bravo-Gómez *et al.*, 2015].

1.8.3 Casiopeína III-ia

Este compuesto coordinado $[\text{Cu}(4, 4'\text{-dimetil-2, 2'}\text{-bipiridina})(\text{acetilacetonato})\text{H}_2\text{O}]\text{NO}_3$, está conformado por un centro metálico de Cu II, por dos ligantes bidentados, uno de ellos es donador de oxígenos y otro donador de nitrógenos, tiene una geometría cuadrada plana (Figura 8) [Sement *et al.*, 2017]. Es un polvo fino que se caracteriza por ser homogéneo, de color azul (claro), presenta solubilidad en agua y metanol. Su peso molecular es de 426.91 g/mol que incluye dos moléculas de agua [Bravo & Tovar, 2002]. En solución acuosa y en refrigeración por 16 días presenta un 3.8% de degradación, presenta inestabilidad a las luz si se presenta en solución acuosa, se descompone a pH muy ácido (pH=2) o muy básico (pH>8), bajo condiciones de congelación es estable en plasma humano y en sangre por 72 horas [Becco *et al.*, 2012]. Ha demostrado tener actividad citostática, citotóxica y antineoplásica en modelos tanto *in-vitro* como *in-vivo*, así como una baja toxicidad en linfocitos en experimentos *in vitro* y actualmente se encuentra en etapa preclínica.

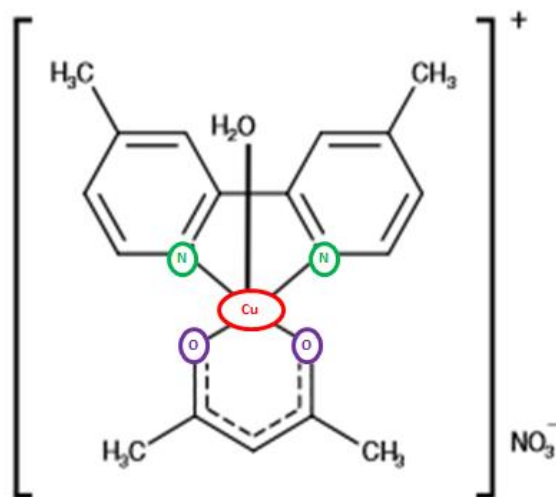


Figura 8. La molécula Cas III-ia tiene un centro metálico de cobre [II] (rojo), a éste se encuentran unidos dos ligantes bidentados: acetilacetonato (morado) y 4,4'-dimetil bipiridina (verde).

CAPÍTULO 2: JUSTIFICACIÓN

En México una parasitosis de interés médico es la leishmaniasis. En la actualidad existen varios medicamentos para el tratamiento de esta enfermedad. Cada uno de estos presentan ventajas, pero también una eficacia limitada debido a que la respuesta a cada uno de los medicamentos depende de la forma clínica y de la especie infectante y no hay un fármaco generalmente eficaz. Además, entre los factores contraproducentes a los tratamientos actualmente disponibles están los esquemas terapéuticos prolongados, con altas dosis, efectos adversos tales como mialgias, artralgias, anorexia, náuseas y dolor de cabeza, los cuales provocan que muchos pacientes no concluyan el tratamiento. Esto favorece la reactivación de la lesión y la aparición de resistencia al medicamento [Sement, 2017; Robledo *et al.*, 1999]. Es por ello que resulta necesario encontrar nuevas alternativas terapéuticas de bajo costo y menos invasivas para contrarrestar esta enfermedad.

Previamente se ha reportado actividad antiproliferativa de diferentes compuestos de coordinación como las Casiopeínas[®] cuyo centro metálico es el Cobre y otros compuestos con diferentes iones metálicos como el Mn, Fe, Co, Ni y Zn en el parásito *Entamoeba histolytica*, causante de la enfermedad Amebiasis [García *et al.*, 2012]. Así mismo, se evaluaron tres Casiopeínas[®] (Cas II-gly, Cas III-Ea, Cas III-ia) en epimastigotes del parásito *Trypanosoma cruzi* donde se obtuvo una actividad anti-trypanosomal comparado con el fármaco de referencia Nifurtimox[®] [Becco *et al.*, 2012]. Estos antecedentes apoyan la posibilidad de que el compuesto coordinado de cobre Casiopeína III-ia posea actividad antiparasitaria y pueda eliminar la infección por *Leishmania mexicana*.

CAPÍTULO 3: HIPÓTESIS

- El compuesto de coordinación de cobre II (Casiopeína III-ia) tiene un efecto tóxico sobre el parásito *Leishmania mexicana*.

CAPÍTULO 4: OBJETIVO GENERAL

- Analizar el efecto *in vitro* del compuesto Casiopeína III-ia sobre el parásito *Leishmania mexicana*.

4.1 Objetivos particulares

- Analizar el efecto *in vitro* que ejerce Cas III-ia sobre la viabilidad en promastigotes de *L. mexicana*.
- Analizar el efecto *in vitro* que ejerce Cas III-ia sobre macrófagos murinos.
- Analizar el efecto *in vitro* que ejerce Cas III-ia sobre la viabilidad de promastigotes en macrófagos infectados con *L. mexicana*.
- Evaluar la evolución de la enfermedad en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* y que fueron tratados vía tópica con Cas III-ia.

CAPÍTULO 5: MÉTODO Y MATERIALES

5.1 Obtención del compuesto Ca III-ia

El compuesto Casiopeina® III-ia fue donado por la Dra. Lena Ruiz Azuara del departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química, UNAM.

5.2 Animales de Laboratorio

Para la realización de este estudio se utilizaron ratones de la cepa BALB/c los cuales fueron proporcionados por el bioterio de la Unidad de Investigación en 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 de producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

5.3 Obtención y aislamiento de *Leishmania mexicana*

Los promastigotes de *L. mexicana* de la cepa Lacandona (LAC) fueron previamente aislados de un paciente con LCL y se mantuvieron en condiciones de laboratorio. Para mantener su virulencia se infectaron ratones BALB/c donde se inocularon 1×10^6 promastigotes en cojinete plantar. Posteriormente los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y a través de una jeringa para insulina se aspiraron los parásitos de la lesión. Los parásitos fueron cultivados en medio 199 (Gibco® 12350-039) suplementado con 10% con suero fetal bovino (SFB) a 26 °C. Para mantener el cultivo se realizaron diferentes pases y se cuidó el crecimiento de este a través de cuantificación de promastigotes mediante una cámara de Neubauer.

Para la realización del presente estudio los promastigotes de *L. mexicana* fueron cultivados en medio 199, suplementado con 10% de SFB y cosechados en el cuarto día de crecimiento (fase metacíclica); se tomó una alícuota de promastigotes, los cuales fueron lavados a través

de tres centrifugaciones de 1200rpm por 10 minutos cada uno con PBS (Phosphate Buffered Saline) y se ajustaron a un millón por condición para cada experimento. Los promastigotes se mantuvieron en medio 199 Hanks suplementado con 10% de SFB.

5.4 Análisis de Ca III-ia sobre promastigotes

Se realizaron 10 concentraciones diferentes del compuesto Ca III-ia a partir de la solución stock. Primero se pesó 1mg del compuesto y se diluyó en 1.5 ml de PBS. A partir de este se tomaron 10 concentraciones: 7.5, 15, 30, 45, 75, 90, 120, 150, 225, 300 μ M. Se utilizó una placa de 24 pozos en donde a cada pozo se le colocó una concentración diferente de Cas III-ia, enseguida se agregó 1 millón de promastigotes. Para el control negativo, sólo se colocó el millón de promastigotes. Finalmente, cada pozo se aforó a 1 ml con medio 199 Hanks suplementado con 10% de SFB. La placa se incubó a 26 °C durante 48 horas y posteriormente se realizó una prueba de viabilidad mediante un conteo en cámara de Neubauer en donde se tomó una alícuota por cada condición y se diluyó a una proporción de 1:2 con glutaraldehído. Este experimento se realizó por triplicado.

5.5 Obtención de macrófagos murinos

Se utilizaron macrófagos murinos de la línea celular RAW 262.7, los cuales fueron previamente descongelados. Este proceso consistió en resuspender una alícuota de macrófagos en medio RPMI y centrifugar a 1200 rpm en 10 minutos. Los macrófagos fueron cultivados en placas con medio RPMI y 10% de SFB y se incubaron durante 76 horas a una temperatura de 37 °C para favorecer su adhesión. Posteriormente los macrófagos fueron cosechados con PBS frío, se transfirió el PBS a un tubo (Falcon® 352054) y se centrifugó a 1200 rpm por 10 minutos y se ajustaron a un millón por condición para cada experimento.

5.6 Análisis de viabilidad en macrófagos murinos en contacto con el compuesto Ca III-ia

Se trabajaron las siguientes concentraciones: 0.75, 1.5, 7.5, 15 μ M. Además, se consideró un segundo stock que consistió en diluir 10 μ l del stock inicial (1 mg de Ca III-ia en 1.5 ml de

PBS) en medio RPMI aforando a 1 ml; con ello se trabajaron las siguientes concentraciones: 0.015, 0.075, 0.15, 0.45 μ M.

En una placa se agregó un millón de macrófagos, cada una de las concentraciones del fármaco Ca III-ia antes mencionadas y se aforó a 1ml con medio RPMI suplementado con 10% de SFB. La placa fue incubada a 37 °C por 24 horas.

Después, se realizó una prueba de viabilidad de macrófagos con la técnica Azul tripán, que consistió en tomar una alícuota de cada condición y agregarle el colorante azul tripán en una proporción 1:2. Mediante una cámara de Neubauer se observaron los parásitos al microscopio y se cuantificaron solamente los macrófagos vivos, que se distinguieron por no teñirse con el colorante. Este experimento se realizó por triplicado.

5.7 Evaluación del efecto de Ca III-ia en la sobrevida de promastigotes de *L. mexicana*

Se utilizaron 500,000 macrófagos de la línea celular RAW 262.7 y 5 millones de promastigotes en el cuarto día de crecimiento en las siguientes condiciones:

1. Macrófagos + Medio RPMI suplementado con 10% SFB
2. Macrófagos + Casiopeina III-ia + Medio RPMI suplementado con 10% SFB
3. Macrófagos + promastigotes + Medio RPMI suplementado con 10% SFB
4. Macrófagos + promastigotes + Casiopeina III-ia + Medio RPMI suplementado con 10% SFB.

Los 500,000 macrófagos se colocaron en cada una de las condiciones y se aforaron a 1ml con medio RPMI suplementado con 10% SFB, se dejaron adherir por 24 horas a 37 °C. Posteriormente se eliminó el medio de cada pozo y se realizó un lavado con PBS a temperatura ambiente y se agregaron 5 millones de promastigotes en el pozo correspondiente. Se aforó a 1ml con medio RPMI y se dejó incubar a una temperatura de 37 °C por 24 horas.

Transcurrido el tiempo de 24 horas se revisó la placa al microscopio óptico para observar promastigotes fagocitados por los macrófagos y, se realizó un lavado con PBS a temperatura ambiente para eliminar parásitos sin fagocitar. 24 horas después se verificó la fagocitosis para cada condición, se eliminó el medio RPMI y se colocó medio 199 Hanks en cada pozo,

posteriormente se estimuló la condición 2 y 4 con una concentración de 0.075 y 1.5 μM de Ca III-ia, la placa se mantuvo a una temperatura de 37 °C; 24 horas después se eliminó el estímulo y se agregó medio 199 Hanks y se dejó incubar a 26 °C por 48 horas; durante este periodo de tiempo se observó al microscopio si el compuesto Cas III-ia estimuló o inhibió la liberación de parásitos en el medio de cultivo.

En caso de observarse liberación de parásitos se realizó una prueba de viabilidad: Se tomó una alícuota de las condiciones 2 y 4, se diluyó con glutaraldehído en una proporción 1:10 y se realizó un conteo de parásitos vivos al microscopio con la cámara de Neubauer.

5.8 Infección de cojinete plantar en modelo murino con *L. mexicana*

Con una jeringa para insulina de 0.5ml con aguja de 31G se inocularon 250,000 promastigotes de *L. mexicana* cepa LAC en un volumen de 10 μl de PBS en la zona del cojinete plantar de la pata trasera izquierda de cada uno de los ratones y, durante un mes se monitoreo el progreso de la infección.

5.9 Evaluación de la evolución de la enfermedad en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* y que fueron tratados vía tópica con Ca III-ia

Para evaluar la evolución de Leishmaniasis, se trató la infección de *L. mexicana* en cojinete plantar de tres de los ratones con una solución acuosa del compuesto Ca III-ia. Los tres ratones restantes se usaron como control negativo.

El tratamiento consistió en la aplicación de 200 μl de Ca III-ia sobre la epidermis del cojinete plantar infectado con la ayuda de un algodón durante cinco días a la semana por un mes. Cada semana se evaluó y midió con un vernier (Truper®) el cojinete plantar de los seis ratones. Al finalizar el tratamiento se sacrificaron los ratones por dislocación cervical y se obtuvo un corte de cada cojinete infectado, se fijaron en formol al 10% v/v. El tejido obtenido se incluyó en parafina y se realizaron cortes de 4 μm en el micrótopo, los cuales se tiñieron con eosina hematoxilina.

Para el análisis de resultados se observaron los cortes al microscopio óptico Microphot-FXA (Nikon®), se tomaron diez imágenes de cada corte: dos de ellos con un aumento de 6x y los

ocho restantes con un aumento de 60x correspondiente a 1 milímetro cuadrado de tejido. Cabe destacar que para medir la carga parasitaria de cada corte sólo se tomaron en cuenta las imágenes aumentadas a 60X.

5.10 Herramientas computacionales y estadísticas

Para el análisis de Ca III-ia sobre la viabilidad en promastigotes de *L. mexicana* y macrófagos murinos de la línea celular RAW 262.7 se obtuvo el valor de la Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) con el software Compusyn.

Para analizar los cortes del tejido infectado con *L. mexicana* se trabajó con el software ImageJ 1.50i para 64 bits el cual permitió realizar un conteo de parásitos en cada una de las fotografías. Para verificar los resultados anteriores también se trabajó con el programa FIGI el cual permitió crear un algoritmo capaz de delimitar los parásitos de otras células estableciendo un rango de tamaño y de esta manera se procesó y se estimó la cantidad de parásitos por cada imagen.

Para el análisis estadístico se calculó la media y la desviación estándar de todos los resultados y fueron normalizados a 100. Se utilizó la prueba estadística de U de Mann-Whitney y se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0.05$.

CAPÍTULO 6: RESULTADOS

6.1 Análisis el efecto *in vitro* que ejerce Ca III-ia sobre la viabilidad en promastigotes de *L. mexicana*

Al analizar el efecto del compuesto Cas III-ia sobre la viabilidad en promastigotes de *L. mexicana* se pudo identificar que hubo un efecto dosis-dependiente después de 48 horas. Se observó una viabilidad menor al 50% desde la concentración 7.5 μM . Cabe destacar que a partir de la concentración 15 μM se obtuvo una viabilidad menor al 10%, lo que demuestra la potente actividad leishmanicida del compuesto. Al analizar los resultados en el software Compusyn se determinó un valor de CI_{50} de 10.03 μM

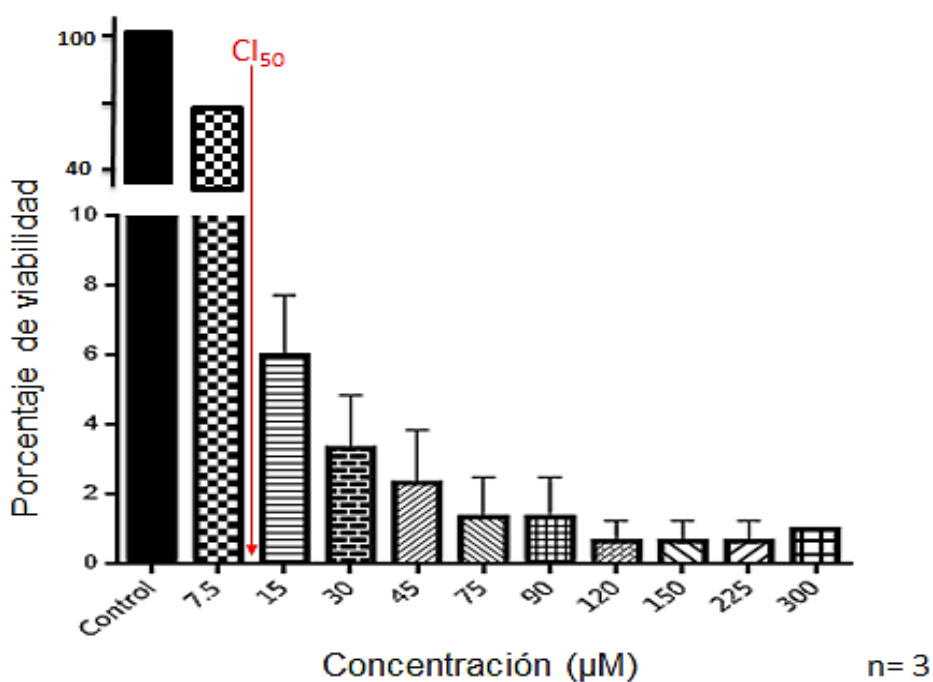


Figura 9. Análisis del efecto de diferentes concentraciones de Cas III-ia sobre promastigotes del parásito *Leishmania mexicana*, donde se puede observar un comportamiento dosis-dependiente y encontrando un valor CI_{50} de 10.03 μM (flecha roja). Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis estadístico U Mann-Whitney (* $p < 0.05$)

6.2 Análisis del efecto *in vitro* que ejerce el compuesto Casiopeina® III-ia sobre macrófagos murinos

Al evaluar el compuesto Cas III-ia sobre macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7, se observó un efecto dosis-dependiente después de 24 horas. A partir de las concentraciones 7.5 y 15 μM se obtuvo una viabilidad en macrófagos murinos menor al 10%, en relación al control sin estímulo. También se observó que a partir de la concentración 0.45 μM , los macrófagos presentaban una viabilidad igual o menor al 50% comparándolo con el control, mientras que con las concentraciones 0.015 y 0.075 μM no se observó efecto alguno en la viabilidad de los macrófagos, comparado con el control sin estímulo. Al analizar los datos en el software Compusyn se determinó que el valor CI_{50} de la Ca III-ia es de 0.98 μM .

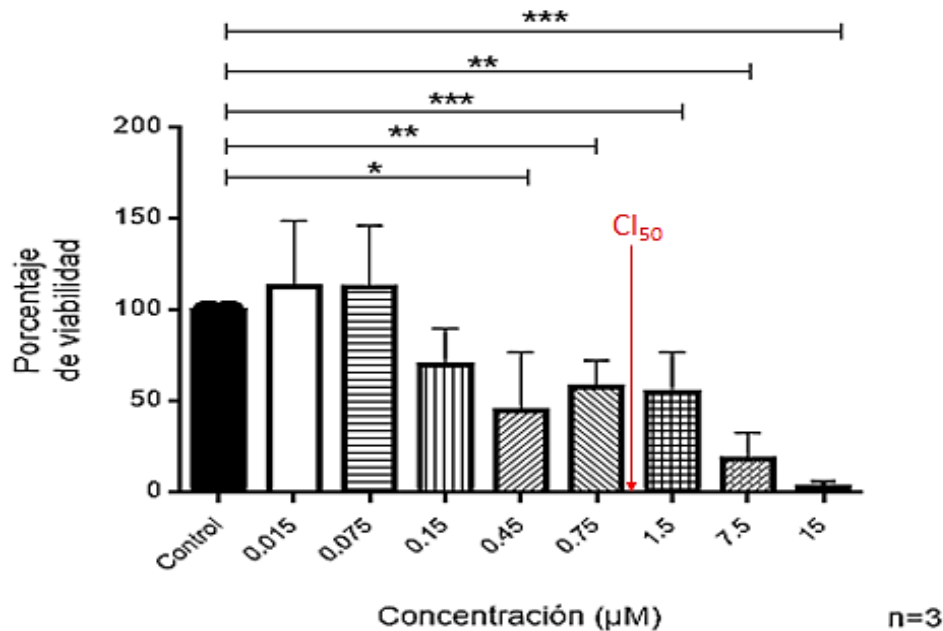


Figura 10. El análisis del efecto de Cas III-ia sobre macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7 demuestra un comportamiento dosis-dependiente, encontrándose un valor CI_{50} de 0.98 μM (flecha roja). Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes. Análisis estadístico U Mann-Whitney (* $p < 0.05$).

6.3 Análisis del efecto *in vitro* que ejerce Cas III-ia sobre la viabilidad de promastigotes en macrófagos infectados con *L. mexicana*

Se analizó el efecto de Cas III-ia sobre macrófagos RAW 264.7 que fueron infectados con promastigotes de *L. mexicana*. Debido a que los macrófagos resultaron ser considerablemente más sensibles al estímulo de Cas III-ia en experimentos anteriores, se establecieron dos concentraciones: una concentración cercana al valor de CI_{50} obtenida en macrófagos y otra concentración a la cual el macrófago no resultara afectado (1.5 y 0.075 μM), como se muestra en la Figura 11.

Después de 48 horas del estímulo con Cas III-ia a una concentración de 1,5 μM sobre macrófagos, se observó una liberación de promastigotes aproximadamente del 90% en relación al grupo de macrófagos infectados con parásitos y sin estímulo (Control negativo), mientras que con una concentración de 0.075 μM se observó una liberación del 70%, resultando ser estadísticamente significativo en relación al control negativo.

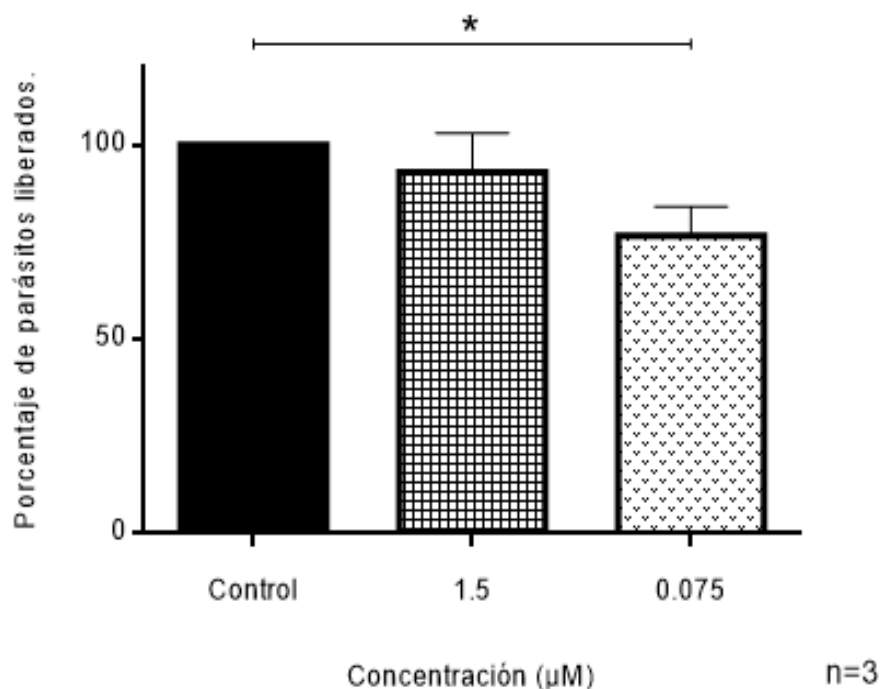


Figura 11. El análisis del efecto que ejercen las concentraciones 1.5 y 0.075 μM de Cas III-ia sobre macrófagos infectados con *L. mexicana*. Se observa un porcentaje de liberación de promastigotes del 90% y 70% respectivamente. Las barras representan el promedio \pm de la

desviación estándar. Se realizaron tres experimentos independientes. Análisis estadístico U Mann-Whitney (*p<0.05).

6.4 Evaluación de la evolución de la enfermedad en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* y que fueron tratados vía tópica con Ca III-ia

Al evaluar la evolución de la enfermedad en ratones BALB/c durante cinco semanas de tratamiento con el compuesto Ca III-ia (Figura 12), se observó que en la primer semana de tratamiento no hubo una diferencia en la inflamación en cojinete plantar de ambos grupos de ratones. A partir de la segunda semana de tratamiento, aumentó el tamaño del cojinete de 6 a 9 mm de longitud, en comparación al cojinete de los ratones tratados con el compuesto Cas III-ia donde se observó que la inflamación aumentó de 6 a 8 mm. A partir de la tercera semana de tratamiento se observó un incremento de 9 a 10 mm en el cojinete de ratones control y un incremento de 8 a 9 mm en los ratones tratados con la Casiopeína®.

Después de evaluar la enfermedad en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* y que fueron tratados vía tópica con Ca III-ia durante cinco semanas, con ayuda del software ImajeJ 1.50i se realizó un conteo de la carga parasitaria del cojinete plantar de cada grupo de ratones. Se observó una ligera disminución de parásitos en el grupo de ratones tratados con el compuesto, en comparación al grupo sin tratamiento (Figura 13). En la Figura 14 se representa una muestra de la carga parasitaria del grupo que no fue tratado con el compuesto, en comparación a la siguiente imagen donde se observan menos parásitos post-tratamiento.

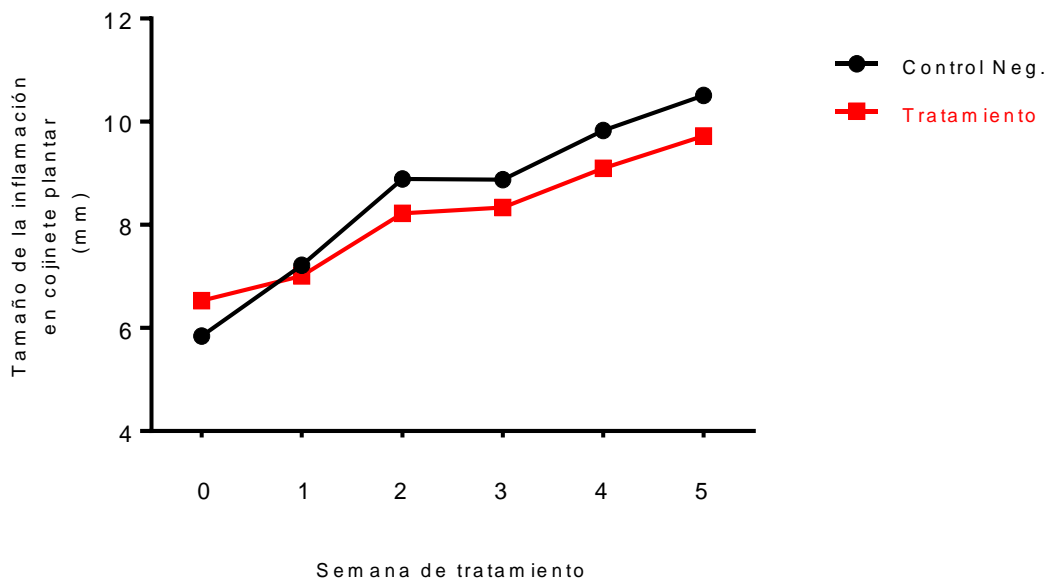


Figura 12. Evolución de la enfermedad en ratones BALB/c tratados durante cinco semanas con el compuesto Ca III-ia.

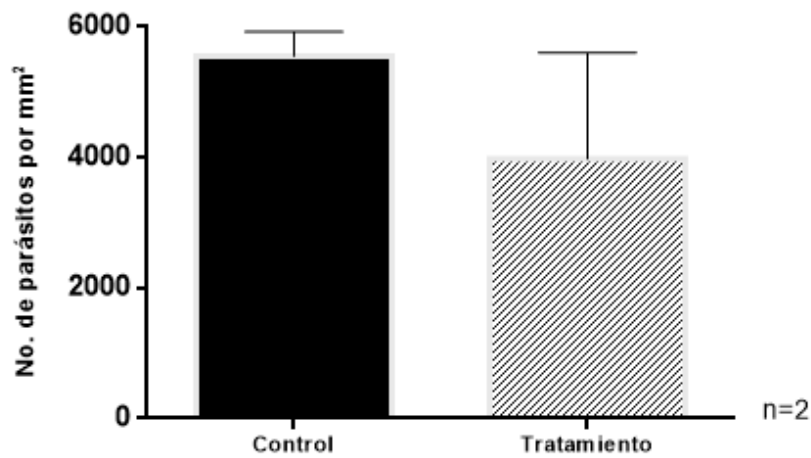


Figura 13. Carga parasitaria en tejido de cojinete plantar de ratón BALB/c infectado con *L. mexicana* y que fueron tratados vía tópica con Ca III-ia. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar.

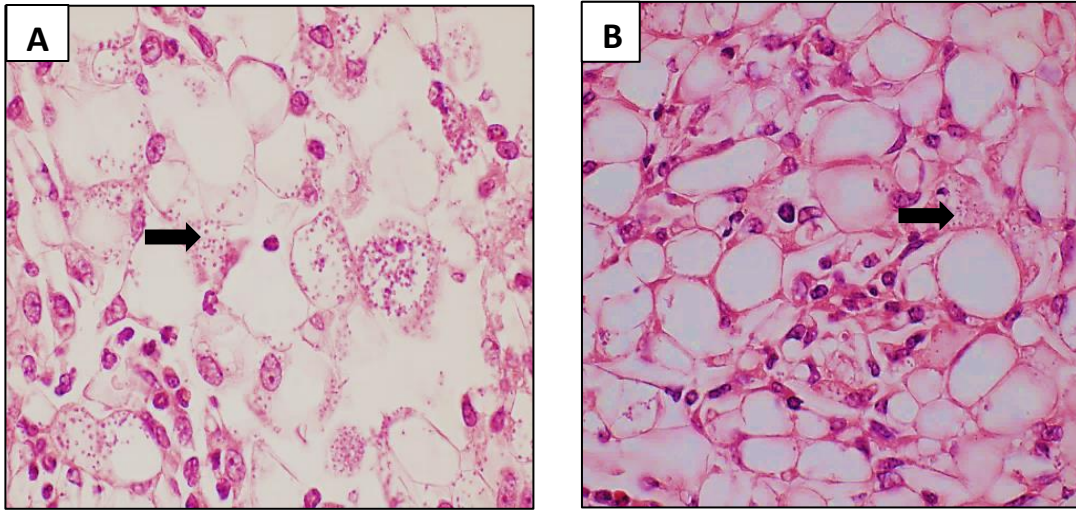


Figura 14. Análisis de la carga parasitaria en cojinete plantar de ratones Balb/c infectados con *L. mexicana*. (A) Corte histológico del cojinete plantar de ratones que no recibieron tratamiento. (B) Corte histológico del cojinete plantar de ratones con tratamiento de Ca III-ia durante cinco semanas. Las flechas color negro indican la posición de los parásitos en el tejido. Cortes de 4 micras teñidos con hematoxilina/eosina, aumento 60x.

CAPÍTULO 7: DISCUSIÓN

La leishmaniasis es una parasitosis de la cual se tienen registros en México desde el año 1909, los primeros casos fueron reportados en el estado de Quintana Roo en trabajadores que extraían chicle de un árbol conocido como Chicozapote. Posteriormente se identificaron casos en estados como Oaxaca, Tabasco y algunos países como Belice, Guatemala y Brasil [Martínez *et al.*, 2011]. Los tratamientos contra esta enfermedad en ocasiones son escasos, además, algunas veces los parásitos pueden ser resistentes al tratamiento o bien, los pacientes pueden presentar efectos secundarios [Oliveira *et al.*, 2011]. Es por ello que es necesaria la obtención de nuevas alternativas para el tratamiento contra la Leishmaniasis. En el presente proyecto se analizó la actividad leishmanicida de Cas III-ia, un compuesto coordinado con un centro metálico de cobre. Se observó que Cas III-ia disminuyó la viabilidad de promastigotes de *L. mexicana* desde concentraciones bajas (7.5 μM) en cultivos *in vitro*. Este es el primer estudio donde se ha reportado la actividad de Casiopeínas® en *Leishmania* ya que anteriormente se había evaluado sobre *Trypanosoma cruzi* donde también se demostró actividad *in vitro* por parte de este compuesto en epimastigotes, obteniendo un valor CI_{50} de 6.9 μM [Becco *et al.*, 2012]. No obstante, también se han probado otros compuestos con bases metálicas con actividad antiparasitaria. Uno de estos fue el compuesto coordinado con cobre CuClH_4 , el cual posee actividad leishmanicida (CI_{50} 3.4 μM) a 48 horas después de su interacción [López, 2019] e incluso resultó tener una actividad dosis-dependiente similar a la que se encontró en los resultados obtenidos en el presente estudio. Por otro lado, otro grupo de investigadores reportaron que algunas de las especies como *L. major* y *L. tropica* mostraron más sensibilidad a compuestos metálicos como el zinc en comparación al antimonio pentavalente [Minodier & Parola., 2007]. También se ha evaluado la actividad biológica del iridio, rodio y cobre contra *L. donovani*, donde se obtuvo actividad leishmanicida [Gil *et al.*, 2007], lo que demuestra que complejos coordinados

con ciertos metales podrían ser muy buena alternativa contra *Leishmania*. Sin embargo, estos dos últimos estudios no reflejan que tan tóxicos podrían ser estos metales en células sanas.

En cuanto al presente estudio, a pesar de que las dosis aplicadas del compuesto Cas III-ia resultaron ser bastante tóxicas para los parásitos (Figura 9), interesantemente también resultaron ser significativamente tóxicas a las 24 horas para la línea celular RAW 264.7 a excepción de las dosis más bajas 0.015 y 0.075 μM (Figura 10). Es importante resaltar que los macrófagos juegan un papel crucial en la leishmaniasis, ya que son activadores de la respuesta inmune, células presentadoras de antígenos y están encargadas de la fagocitación y posterior eliminación del patógeno, además de ser la célula hospedera del parásito *Leishmania*. Es por ello que es importante determinar el potencial tóxico del compuesto Ca III-ia sobre ésta célula hospedera.

Este también es el primer estudio donde se evaluó la toxicidad de este compuesto coordinado específicamente sobre macrófagos, ya que hasta ahora, los sistemas de prueba más utilizados para determinaciones toxicológicas de Casiopeínas[®] han sido linfocitos [Sánchez & Gracia, 2004], en los cuales se ha reportado que Cas III-ia resultó ser un compuesto poco tóxico [Sánchez, 2006]. Se han realizado otros estudios donde se evaluó la toxicidad de iones de Cobre sobre macrófagos. En el 2000 se encontró que la viabilidad de líneas celulares de macrófagos era dependiente de la dosis aplicada, pero la proliferación no se vio afectada después de cuatro semanas de exposición al Cobre [Wataha *et al.*, 2000]. También se estudió la inducción de apoptosis por Cu^{2+} en macrófagos de la línea celular J774.A, donde se encontró que el Cobre por sí sólo no afecta la viabilidad del macrófago, en cambio, al agregar un agente quelante (8-hidroxiquinolina) se indujo apoptosis después de 6 horas [Pang & Chau, 1999]. De acuerdo con los autores anteriores podríamos inferir que el cobre necesita estar anclado a otros ligandos para causar un daño significativo en macrófagos. Sin embargo también se ha reportado que el compuesto coordinado CuClH_4 no tuvo efecto sobre la viabilidad de macrófagos RAW 264.7 [López, 2019], lo que nos hace reafirmar la idea de Bravo-Gómez en el 2015 quien postuló que el grado de toxicidad de cada compuesto coordinado se debe a la geometría y diferencias estructurales.

Aunque aún no podemos puntualizar el mecanismo de acción sobre el macrófago en específico, si podemos inferir que la alta producción de radicales libres por parte de Ca III-ia posiblemente pudo desencadenar cierta inestabilidad celular que finalizó en muerte celular del macrófago. Se sabe que esta reacción puede dañar proteínas, lípidos de membrana [Achard *et al.*, 2012] y además es uno de los mecanismos de acción de este complejo sobre distintas líneas tumorales [Marín *et al.*, 2016]. A pesar de ello, es necesaria la realización de más pruebas con más variables y no se descarta la probabilidad de un comportamiento diferente sobre macrófagos murinos de líneas celulares primarias y macrófagos humanos, ya que se ha demostrado que líneas celulares y macrófagos humanos presentan una susceptibilidad diferente a medicamentos en experimentos de laboratorio [Mesa *et al.*, 2010].

En el caso de los macrófagos infectados con promastigotes de *L. mexicana*, el tratamiento con Ca III-ia a una concentración de 0.075 μM no afectó la viabilidad del macrófago y se obtuvo un 70% de liberación de parásitos post-tratamiento (Figura 11). Sin embargo, la muerte del 30% de amastigotes nos da un indicio de que Ca III-ia podría estar comportándose como un compuesto inmunomodulador. Muchas de las formas de acción de los inmunomoduladores están basadas en la alteración que producen en la actividad de las células inmunes, cambios en la expresión genética, transporte intracelular de proteínas, etc., lo cual induce cambios celulares que pueden influir en el inicio, consecución y regulación de la respuesta inmune [Pell & Aston, 1995]. Ca III-ia está conformado por un centro metálico que es el Cobre, que es un elemento esencial para el funcionamiento del sistema inmune, donde la deficiencia de cobre tiene un efecto sobre macrófagos y neutrófilos [Percival, 1998]. Por lo anterior se sugiere que podría regular algunas funciones de distintas células del sistema inmune [Pang & Chau, 1999]. Se ha reportado que la adición de iones de Cu^{2+} a macrófagos RAW 264.7 mejoró su capacidad de destrucción de algunas bacterias como *E. coli* y *Salmonella* después de una hora y 24 horas, respectivamente [Achard *et al.*, 2012; White *et al.*, 2009]. Incluso se obtuvo un mayor efecto al coordinarlo con otros ligandos [Achard *et al.*, 2012], lo que demuestra que el macrófago utiliza este ión metálico para potenciar su función antimicrobiana. En cuanto al mecanismo de acción

en específico, se ha reportado que las células de mamíferos requieren de una maquinaria para regular el Cobre como elemento esencial para la vida. Las proteínas como Ctr1, ATP7A, ATP7B son de gran importancia para la captación y distribución interna de este ión metálico dentro de una célula [Festa & Thiele, 2011]. Interesantemente, en el trabajo de White *et al.*, (2009) observaron que la captación de Cobre incrementó las proteínas Ctr1 y ATP7A después de tratar macrófagos RAW 264.7 con agentes proinflamatorios como: IFN- γ o LPS. Puesto que en células tratadas con IFN- γ detectaron el ATP7A dentro de los fagosomas a través de microscopía de inmunofluorescencia. Esto resalta la posibilidad de que el transporte de cobre dependiente de ATP7A al fagosoma podría ser importante para la erradicación de bacterias y otros patógenos como parásitos intracelulares. Con todo lo anterior podríamos atribuir que el compuesto Ca III-ia tuvo en efecto sobre el macrófago que ayudó en la eliminación del 30% amastigotes.

En el caso de los experimentos *in vivo* realizados en el presente estudio, el tratamiento en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* fue aplicado vía tópica con el objetivo de facilitar su aplicación en terrenos difíciles y minimizar la posibilidad de efectos adversos, ya que los fármacos de primera línea contra Leishmaniasis se aplican parenteralmente y resultan ser muy invasivos. En experimentos preliminares se observó una tendencia a la disminución en la evolución de la enfermedad cinco semanas post-tratamiento, además de una ligera disminución en la carga parasitaria en cojinete plantar con respecto al control sin tratamiento. Aunque estadísticamente el número de ratones no fue considerable para realizar un análisis estadístico, este experimento da un panorama general del comportamiento del compuesto para así considerar más variables en los próximos experimentos.

CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

A partir de los objetivos planteados y considerando los resultados obtenidos en el presente estudio, se concluye que el compuesto Ca III-ia demostró tener un efecto antiproliferativo sobre promastigotes del *L. mexicana*. A pesar de que los macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7 resultaron ser más sensibles a Ca III-ia, a concentraciones bajas no se alteró la viabilidad de la célula. En cuanto al análisis de viabilidad de amastigotes dentro de macrófagos, se obtuvo un 70% de sobre-vida del parásito en comparación al control sin estímulo, por lo que se infiere que el compuesto está activando al macrófago potenciando la eliminación del parásito. Por otro lado, la evolución de la enfermedad en ratones después de ser tratados con el compuesto, no mostró una diferencia significativa respecto al control sin estímulo. Sin embargo, al obtener la carga parasitaria del cojinete plantar infectado de los ratones, se observó una ligera disminución de parásitos con respecto al control. Con todo esto se puede considerar que el compuesto Ca III-ia podría conformar una nueva alternativa para el tratamiento de leishmaniasis cutánea. Aun así, es necesaria la realización de más experimentos sobre una línea celular primaria, incrementar el número de experimentos en ratones, modificar la vía de administración del compuesto, así como también analizar el mecanismo de acción del compuesto sobre el parásito, con el fin de obtener la mayor información sobre las propiedades farmacocinéticas y toxicológicas de la Cas III-ia y así poder desarrollar un medicamento que optimice todas sus propiedades terapéuticas.

CAPÍTULO 9: BIBLIOGRAFÍA

- Achard, M. E., Stafford, S. L., Bokil, N. J., Chartres, J., Bernhardt, P. V., Schembri, M. A., & McEwan, A. G. (2012). Copper redistribution in murine macrophages in response to Salmonella infection. *Biochemical Journal*, 444(1), 51-57.
- Alemón R., Muñoz J., Ruiz L., Gracia I. (2008). Casiopeína Igly induced cytotoxicity to HeLa cells depletes de levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide. *Toxicology*, 22(3), 710-715.
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, Jannin J. & Boer M. WHO Leishmaniasis Control Team. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*, 7(5), e35671.
- Arias G. (2009). Evaluación de cinco derivados de los benzimidazoles contra promastigotes metacíclicos y macrófagos infectados con amastigotes de *Leishmania mexicana*. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.
- Atilano A. (2007). Evaluación de daño genotóxico, citotóxico y citostático inducido por Casiopeína II gly en cultivos de linfocitos humano. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Ávila J. (2015). Caracterización del efecto del extracto metanólico de la corteza de *Bursera Arida* sobre *Leishmania mexicana*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Barron L. (2006). Influencia del metabolismo en la actividad antiproliferativa y apoptótica del quelato mixto de cobre Casiopeína III-ia en tres líneas tumorales y en linfocitos humanos. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Becco, L., Rodríguez, A., Bravo, M. E., Prieto, M. J., Ruiz-Azuara, L., Garat, B., & Gambino, D. (2012). New achievements on biological aspects of copper complexes Casiopeínas®: Interaction with DNA and proteins and anti-Trypanosoma cruzi activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 109, 49-56.

- Bravo, M.E., Tovar, A. (2002). Diseño, Síntesis y caracterización de compuestos de coordinación de cobre Casiopeínas®. Historia química de un proyecto exitoso. Primer Congreso de Casiopeínas®. Unidad de Seminarios Ex Hacienda El Chorrillo, Taxco, Guerrero.
- Bravo-Gómez, M. E., Campero-Peredo, C., García-Conde, D., Mosqueira-Santillán, M. J., Serment-Guerrero, J., & Ruiz-Azuara, L. (2015). DNA-binding mode of antitumoral copper compounds (Casiopeinas®) and analysis of its biological meaning. *Polyhedron*, 102, 530-538.
- Buffet, P. (2015). Leishmaniasis: Información para su control y tratamiento. Congreso Nacional de Parasitología. Paris Francia: GSL System.
- Carvalho-Chaigneau, F.; C. Trejo-Sólis; C. Gómez-Ruiz; E. Rodríguez-Aguilera; L. Macías-Rosales; E. Cortéz-Barberena; C. Cedillo-Peláez; I. Gracia-Mora; V. Marina-Madrid y F. Constantino-Casas. 2008. Casiopeína III-ia induce apoptosis in HTC-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *Biometals* 21(1), 17-28
- CDC - DPDx - Leishmaniasis. (2019). Retrieved from <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>
- Chiapa N. (2007). Evaluación in vitro de la sinergia de 2 Casiopeínas® (III-ia y IIgly) y otros fármacos comerciales en líneas tumorales humanas. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Cordero N. (2010). Evaluación de los efectos toxicológicos inducidos por un compuesto de Cu (Casiopeina IIgly) durante las fases G1-S y G2-M mediante el ensayo de micronúcleos in-vitro. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Cordoba C, Albertos N, Andrade FJ, Cantolara SB. (1993). Leishmaniasis: Estudio epidemiológico preliminar en una localidad de la zona endémica del estado de Tabasco. *Salud Pública Mex.* 35: 345-50
- Corpa V. (2015). Nuevas perspectivas en el tratamiento de la Leishmaniosis: Evaluación de derivados Hidroxámicos y (-) a-Bisabolol. Tesis de Doctorado. Universidad de Granada. Granada.
- David, C. V., & Craft, N. (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic therapy*, 22(6), 491-502.

Davidson, R. (2017). Leishmaniasis. *Infectious Diseases*, 1059-1064.e1.

DGE : <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>

doi: 10.1016/j.tmaid.2006.09.004

Erxleben, A. (2018). Interactions of copper complexes with nucleic acids. *Coordination Chemistry Reviews*, 360, 92–121.

Escalona Montaña, A. (2018). Estudio funcional de la proteína fosfatasa de *Leishmania* y análisis de su participación en la infección de macrófagos. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.

Festa, R., & Thiele, D. (2011). Copper: An essential metal in biology. *Current Biology*, 21(21), R877-R883.

García-Ramos, J., Toledano-Magaña, Y., Talavera-Contreras, L., Flores-Álamo, M., Ramírez-Delgado, V., & Morales-León, E. et al. (2012). Potential cytotoxic and amoebicide activity of first row transition metal compounds with 2,9-bis-(2',5'-diazahexanyl)-1,1-phenanthroline (L1). *Dalton Transactions*. 41(34), 10164.

Gil, E., Cunha, L., Goncalves, A., Souza, A., & Valderrama Nefrón, A. (2007). Importancia de los Compuestos Inorgánicos en el Tratamiento de la Leishmaniasis. *Latin American Journal Of Pharmacy (Formerly Acta Farmacéutica Bonaerense)*, 26(3), 454-61.

Haldar, A., Sen, P., & Roy, S. (2011). Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. Retrieved from <https://www.hindawi.com/journals/mbi/2011/571242/>

Hepburn, N. C. (2003). Cutaneous leishmaniasis: current and future management. *Expert review of anti-infective therapy*, 1(4), 563-570.

Herdwaldt, B.L., Leishmaniasis. *Lancet*, 1999. 354(9185): p. 1191-9

Pang, J.-H. S., & Chau, L.-Y. (1999). Copper induced apoptosis and immediate early gene expression in macrophages. *Atherosclerosis*, 146(1), 45–52.

Kachadourian, R., Brechbuhl, H. M., Ruiz-Azuara, L., Gracia-Mora, I., & Day, B. J. (2010). Casiopeína Ilgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Toxicology*, 268(3), 176-183.

- Kinnamon, K. E., Steck, E. A., Rane, D. (1978). Activity of antitumor drugs against african trypanosomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 16(2), 157-160
- Killick, R. (1979). Biology of Leishmania in phlebotomine sandflies. *Biology of the Kinetoplastida*, 2(1), 395-460.
- López Palma, R. (2019). Análisis del efecto de los compuestos H2Salbu, H4Salbu, CuClH4, y ClH4bu sobre la viabilidad de Leishmania mexicana. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.
- Lowe, G., Droz, A. S., Vilaivan, T., Weaver, G. W., Tweedale, L., Pratt, J. M., Croft, S. L. (1999). Cytotoxicity of (2,2':6',2''-Terpyridine) platinum (II) Complexes to Leishmania donovani, Trypanosoma cruzi and Trypanosoma brucei. *Journal of Medicinal Chemistry*, 42(6), 999–1006.
- Marín Medina, A., García Ramos, J., Ruíz Azuara, L., & Carrillo Nava, E. (2016). Investigation on the self-association of an inorganic coordination compound with biological activity (Casiopéina III-ia) in aqueous solution. *Chemistry Central Journal*, 10(65), 2-10.
- Marín, A., Gracia, I., Ruiz, L., Moreno, R. (2003). Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopéinas®) on mitochondrial functions. *Biochemical Pharmacology*, 65(12), 1979–1989.
- Martínez, F. V., Guerrero, E. T., Arenas, R., & Cedillo, M. Q. (2011). Leishmaniasis en México. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*, 39(4), 163-183.
- Mayor Moro, M. (2016). Avances en la terapia oral de Leishmaniasis. Madrid, España.
- Mesa, C. V., Muñoz, D. L., Echeverry, M., Velez, I. D., & Robledo, S. M. (2010). Susceptibilidad in vitro a infección por Leishmania y sensibilidad a medicamentos difiere según tipo de macrófagos. Macrófagos e infección por Leishmania spp. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 42(3), 200-211.
- Minodier, P., & Parola, P. (2007). Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 5(3), 150-158.
- 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.

- Najim, R. A., Sharquie, K. E., & Farjou, I. B. (1998). Zinc Sulphate in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis: an in Vitro and Animal Study. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 93(6), 831–837.
- Navarro, M., Hernández, C., Colmenares, I., Hernández, P., Fernández, M., Sierraalta, A., & Marchán, E. (2007). Synthesis and characterization of [Au(dppz)₂]Cl₃. DNA interaction studies and biological activity against *Leishmania (L) mexicana*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 101(1), 111–116.
- Navin, T. R., Arana, B. A., Arana, F. E., Berman, J. D., & Chajón, J. F. (1992). Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *Journal of Infectious Diseases*, 165(3), 528-534.
- Oliveira, L. F., Schubach, A. O., Martins, M. M., Passos, S. L., Oliveira, R. V., Marzochi, M. C., & Andrade, C. A. (2011). Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Tropica*, 118(2), 87-96.
- Organización Panamericana de la Salud. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. (2011). *Manual de diagnóstico y tratamiento de las leishmaniasis*. Paraguay
- Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. (2015). *Informe epidemiológico de las Américas*.
- Pell, J. M., & Aston, R. (1995). Principles of immunomodulation. *Livestock Production Science*, 42(2-3), 123-133.
- Percival, S. (1998). Copper and immunity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 67(5).
- Pisopo TV, Mallia AC. (2006). Leishmaniasis. *Postgrad Méd*, 82: 649-57.
- Rendón Garrido, E., & Tenorio Miranda, E. (1998). *Tesis de Licenciatura*. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Ríos, J. M. R., & Sousa, O. (2010). Inmunología en la infección por *Leishmania*: conceptos actuales. *Revista Médica Científica*, 23(1), 11-23.
- Robledo, S. M., Valencia, A. Z., & Saravia, N. G. (1999). Sensitivity to Glucantime® of *Leishmania Viannia* isolated from patients prior to treatment. *The Journal of parasitology*, 360-366.

- Ruiz Azuara, L. (2013). Desarrollo de farmacos de base metalica antitumorales y antiparasitarios. In IV Congreso Nacional de Tecnología Aplicada a Ciencias de la Salud. Cholula, Puebla.
- Sánchez Bartz, F. (2006). Determinación de la capacidad genotóxica , citotóxica y citostática de las Casiopeínas Igli, IIgli y III-ia en linfocitos, médula ósea de ratón y linfocitos humanos en cultivo. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Sánchez Bartéz, F., & Gracia Mora, I. (2004). Estudio de los efectos genotóxicos, citostáticos y citotóxicos de la Casiopeína III-ia en médula ósea y sangre periférica de ratón. In Primer Congreso de Química Médica. Dedicado a la investigación en cáncer. Productos naturales, sintéticos, orgánicos e inorgánicos (pp. 120-123). Oaxaca, México.
- Sánchez C. (2018). Enfecto antiproliferatio y proapoptótico de las Casiopeínas III-Ea y III-La en dos líneas celulares de carcinoma de cabeza y cuello. Tesis de Licenciatura. Facultad de Odontología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.
- Sanchez, J. (2019). OPS/OMS | Leishmaniasis cutánea y mucosa. Retrieved from https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417:2012-leishmaniasis-cutanea-mucosa&Itemid=39345&lang=es
- Sanchez, J. (2019). PAHO/WHO | Visceral Leishmaniasis. Retrieved from https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6420:2012-leishmaniasis-visceral&Itemid=39347&lang=en
- Sereno, D., Cavaleyra, M., Zemzoumi, K., Maquaire, S., Ouaisi, A., & Lemesre, J. L. (1998). Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(12), 3097-3102.
- Serment Guerrero, J., Bravo-Gomez, M., Lara-Rivera, E., & Ruiz-Azuara, L. (2017). Genotoxic assessment of the copper chelated compounds Casiopeinas: Clues about their mechanisms of action. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 166, 68-75.
- Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. (2015). Manual para el diagnóstico, tratamiento y control de las leishmaniasis. (pp.1-37). Ciudad de México.

- Tiuman, T. S., Santos, A. O., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B. P., & Nakamura, C. V. (2011). Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases*, 15(8), e525-e532.
- Trejo-Solís, C., Palencia, G., Zúniga, S., Rodríguez-Ropon, A., Osorio-Rico, L., Luvia, S. T., & Cruz, A. (2005). Cas Ilgly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through Caspase-Dependent and Caspase-Independent mechanisms. *Neoplasia*, 7(6), 563-574.
- Velasco Castrejón, O., Guzmán Bracho, C., Rivas Sánchez, B., Aguilar Torrentera, F., & Hernández Márquez, G. (1994). La leishmaniasis con especial referencia a México. Colección de Cuadernos Técnicos, InDRE, SSA. México DF.
- Vizcaya A., Rivero A., Riuz L., Kass G., Kelland L., Orr R., Dobrota M. (2000). Induction of apoptosis by novel coppee-based anticancer compound, Casiopeina II, in L1210 murine leukaemia and CH1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicology*, 14: 1-5.
- Wataha, J., Looockwood, P., & Schedle, A. (2000). Effect of silver, copper, mercury, and nickel ions on cellular proliferation during extended, low-dose exposures. *Journal Biomedical Material Reserch.*, 52(2), 360-4.
- White, C., Lee, J., Kambe, T., Fritsche, K., & Petris, M. (2009). A Role for the ATP7A Copper-transporting ATPase in Macrophage Bactericidal Activity. *Journal Of Biological Chemistry*, 284(49), 33949–33956.
- Zerpa, O., & Convit, J. (2009). Leishmaniasis cutánea difusa en Venezuela. *Gazeta Médica da Bahia*, (79).