

## Leishmaniasis

### TRATAMIENTO

#### Evaluación *in vitro* e *in vivo* del efecto del aceite esencial de *Elettaria cardamomun* sobre parásitos de *Leishmania (Viannia) panamensis*

Ángela María Gómez, Norberto Chávez, Gabriela Delgado

Grupo de Inmunotoxicología, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

**Introducción.** La leishmaniasis es una parasitosis que afecta a 12 millones de personas en el mundo. En la población colombiana, se presenta con mayor frecuencia la leishmaniasis cutánea asociada a *Leishmania (Viannia) panamensis*. El tratamiento convencional emplea antimoniales pentavalentes, aunque la vía de administración y los efectos adversos generan bajo cumplimiento del tratamiento. La Organización Mundial de la Salud impulsa la búsqueda de medicamentos antileishmania; por ello, el empleo de aceites esenciales puede constituirse en una alternativa terapéutica frente a parasitosis como la leishmaniasis.

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad leishmanicida de *Elettaria cardamomun* sobre formas internas, tanto *in vitro* como *in vivo*, empleando el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) infectado con *L. (V.) panamensis*, como modelo experimental

**Materiales y métodos.** Se realizaron tres ensayos de citotoxicidad por triplicado sobre macrófagos de hámster para el aceite de cardamomo, evaluados mediante el método de resazurina. También, se desarrollaron tres ensayos de efectividad sobre formas intracelulares de *L. (V.) panamensis*, evaluados mediante el empleo de *SYBR safe* para determinar porcentajes de infección y, finalmente, un ensayo *in vivo* en hámsteres infectados con el parásito por vía intradérmica, posterior administración tópica del aceite esencial y evaluación de evolución clínica.

**Resultados.** Mediante el empleo del programa estadístico GraphPad Prism 5, se calculó la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) sobre macrófagos de hámster y la concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) sobre formas internas de *L. (V.) panamensis* del aceite de cardamomo, y se encontró una CL<sub>50</sub> de 486 µg/ml, y una CE<sub>50</sub> de 88 µg/ml, que mostró

actividad selectiva del aceite de cardamomo sobre *Leishmania*. La evaluación del tratamiento tópico con el aceite de cardamomo en úlceras de hámsteres infectados con *L. (V.) panamensis* mostró diferencias entre tratados y controles.

**Conclusiones.** El aceite esencial de *E. cardamomun* muestra actividad selectiva frente a la infección por *L. (V.) panamensis*.

• • •

#### Actividad antileishmania de compuestos aislados de *Raputia heptaphylla* (familia Rutáceae) y su efecto citotóxico sobre células dendríticas humanas

Diana Granados-Falla, Carlos Coy, Luis E. Cuca, Gabriela Delgado

Escuela de Biociencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín, y Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, Colombia

**Introducción.** Considerando los inconvenientes asociados al tratamiento de la leishmaniasis (elevada toxicidad, esquemas terapéuticos prolongados y la aparición de cepas del parásito resistentes a los medicamentos), es necesario desarrollar nuevas alternativas terapéuticas más seguras y eficaces.

Para ello, una alternativa llamativa al momento de buscar nuevas moléculas bioactivas es el estudio de compuestos derivados de especies vegetales. En el presente estudio determinamos la actividad antileishmania de compuestos aislados *Raputia heptaphylla*, así como su actividad citotóxica sobre células dendríticas.

**Materiales y métodos.** La actividad citotóxica sobre células dendríticas se evaluó mediante el uso de la prueba de detección del metabolismo de la resazurina. Las células dendríticas se obtuvieron de monocitos de sangre periférica con suficiente caracterización fenotípica (Lonza, Suiza) y su diferenciación *in vitro* se llevó a cabo enriqueciendo el medio de cultivo con citocinas recombinantes humanas (IL-4 y GM-CSF, BD, USA).

La evaluación de la actividad antileishmania se llevó a cabo mediante ensayos de citotoxicidad sobre promastigotes y ensayos de infección de

células dendríticas, asociándose una disminución en la emisión de fluorescencia (ensayos de resazurina), o una disminución en el porcentaje de células dendríticas infectadas (evaluado por microscopía de luz, tinción de Giemsa) con actividad antiparasitaria para algunos de los compuestos.

**Resultados.** En el presente estudio evidenciamos actividad antileishmania en dos compuestos aislados de *R. heptaphylla*, alcaloide N-metil-8-metoxi-flindersina con concentraciones efectivas 50 (CE<sub>50</sub>) de 9,4 µg/ml (sobre los promastigotes) y 6,4 µg/ml (sobre amastigotes intracelulares), y un seco-limonoide 11,19-dihidroxi-7-acetoxi-7-deoiochangina con una CE<sub>50</sub> de 14,4 µg/ml únicamente sobre los amastigotes intracelulares. Basándonos en la citotoxicidad inducida sobre las células dendríticas, evidenciamos índices de selectividad de 1,9 y 2,9 para el compuesto alcaloide y limonoide, respectivamente.

**Conclusiones.** Las evidencias recolectadas sugieren que dos compuestos derivados de la especie vegetal *R. heptaphylla*, presentan una actividad antileishmania llamativa frente a promastigotes y amastigotes intracelulares de *Leishmania* spp.

• • •

### Efecto de la pentamidina sobre promastigotes de *Leishmania panamensis* y de *Leishmania major*

Erika Torres, Gabriela Delgado  
Grupo de Investigación en Inmunotoxicología,  
Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias,  
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C.,  
Colombia

**Introducción.** La pentamidina es una de las alternativas terapéuticas para tratar la leishmaniasis cutánea. El conocimiento de su efecto sobre *Leishmania panamensis* y *L. major*, principales causantes de esta enfermedad del Nuevo y Viejo Mundo, respectivamente, contribuye en la determinación de su efecto leishmanicida y de los esquemas de tratamiento que se utilizan actualmente, buscando reducir sus efectos secundarios.

**Materiales y métodos.** Se sometieron promastigotes (en fase estacionaria) de *L. panamensis* y *L. major* (2 x 10<sup>5</sup> por pozo) a diferentes concentraciones de pentamidina, obtenidas mediante diluciones seriadas a partir de 6 µg/ml; los cultivos se incubaron a 26 °C por 72 horas. Los controles utilizados fueron promastigotes sin tratamiento y pozos con RPMI 1640. La efectividad del fármaco se determinó con base en la capacidad de los parásitos viables

para metabolizar la resazurina a resorufina; para esto, se agregaron 50 µl por pozo de resazurina a una concentración de 44 µM y, después de 48 horas de incubación a 26 °C, se determinaron las unidades de fluorescencia arbitraria en un espectrofluorómetro Tecan GENios Microplate Reader® (Tecan, Austria) con excitación a 535 nm y emisión a 595 nm, por medio del *software* Magellan4 (Tecan, Austria). Posteriormente, estos datos se utilizaron para obtener las concentraciones efectivas 50 (CE<sub>50</sub>) para cada una de las cepas, empleando el *software* estadístico GraphPad Prism, versión 5.00 (GraphPad Software, USA). Se realizaron tres experimentos independientes, cada uno por triplicado.

**Resultados.** La CE<sub>50</sub> en la cepa de *L. major* fue de 0,54±0,08 µg/ml y en la cepa de *L. panamensis* fue de 0,077±0,013 µg/ml.

**Conclusiones.** Las cepas estudiadas mostraron baja resistencia a la pentamidina, y *L. panamensis* fue la más sensible a este fármaco. Este estudio constituye el primer reporte sobre la sensibilidad de promastigotes de *L. major* a la pentamidina.

• • •

### Predicción de actividad anti-*Leishmania* en compuestos con acción antiinflamatoria y cicatrizante

Gustavo Blandón, Sara Robledo, Rodrigo Ochoa,  
Carlos Muskus  
Programa de Estudio y Control de Enfermedades  
Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín,  
Colombia

**Introducción.** La infección por *Leishmania* spp. implica una compleja interacción parásito-huésped, la cual desencadena un proceso inflamatorio que se cree que favorece o que participa en el desarrollo de la lesión en la piel, en el caso de la leishmaniasis cutánea.

Los tratamientos actuales para la leishmaniasis presentan problemas de toxicidad, altos costos y cepas de *Leishmania* spp. resistentes al medicamento. Por estos inconvenientes es necesario buscar nuevas alternativas terapéuticas. La selección de medicamentos con conocida actividad antiinflamatoria y, quizá, cicatrizantes, pero que, además, se les pudiera predecir actividad anti-*Leishmania* empleando herramientas bioinformáticas, podrían ser más efectivos para el tratamiento de esta enfermedad. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es predecir la actividad leishmanicida en un conjunto de medicamentos que tiene actividad antiinflamatoria y antiulcerante conocidas.

**Materiales y métodos.** Se buscaron medicamentos clasificados como antiinflamatorios y cicatrizante en el *Drug Bank*. Estos se analizaron con un programa que predice la actividad de la sustancia con base en su estructura química, generando un índice de actividad. A los medicamentos seleccionados se les verificaron los posibles blancos donde podrían actuar y su toxicidad.

Para obtener un punto de corte que permitiera la selección de los nuevos medicamentos que serían evaluados, inicialmente *in vitro*, se determinó el índice promedio de actividad de 30 medicamentos de la base de datos *Drug Bank* con conocida acción antiprotozoarias y anti-*Leishmania*.

**Resultados.** De los 86 medicamentos analizados, se predijeron 20 medicamentos con actividad antiprotozoaria y, de éstos, tres medicamentos aparecían con un buen porcentaje de actividad anti-*Leishmania* y, de los 20, sólo dos presentaron un nivel bajo de toxicidad.

**Conclusiones.** Es posible identificar rápidamente mediante herramientas bioinformáticas, medicamentos con potencial actividad anti-*Leishmania* y que, además, son antiinflamatorios y cicatrizantes que puedan ser evaluados en modelos *in vitro* e *in vivo*.

**Agradecimientos.** Colciencias proyecto código PRE00501023700.



### Permeabilidad en piel y actividad anti-*Leishmania* de liposomas ultradeformables de paromomicina

Indira Paola Hernández<sup>1</sup>, Jennifer del Pilar Rojas<sup>1</sup>, Jorge Aníbal Martinetti-Montanari<sup>2</sup>, Eder Lilia Romero<sup>2</sup>, María José Morilla<sup>2</sup>, Patricia Escobar<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

<sup>2</sup> Programa de Nanomedicinas, Departamento de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Quilmes, Argentina

**Introducción.** La paromomicina es un compuesto utilizado en el tratamiento tópico de la leishmaniasis cutánea. La hidrofiliidad de la paromomicina limita la absorción del compuesto en la piel e influye en su efectividad. El uso de liposomas ultradeformables para el transporte de paromomicina podría potenciar su actividad y facilitar su acceso a las capas más profundas de la piel donde se aloja el parásito.

El objetivo del estudio fue evaluar la actividad de liposomas ultradeformables de paromomicina contra *Leishmania* spp. y determinar su permeabilidad a

través de membranas biológicas en un sistema *in vitro*.

**Metodología.** Los liposomas ultradeformables de paromomicina fueron preparados y caracterizados fisicoquímicamente por métodos convencionales. La concentración de paromomicina fue cuantificada por HPLC. Se trataron amastigotes intracelulares de *Leishmania braziliensis* con paromomicina libre (20-1800 µM), liposomas ultradeformables de paromomicina (0,24-20 µM) y liposomas ultradeformables vacíos (0,001-0,1mM de fosfolípidos). La actividad antiparasitaria se determinó por recuento microscópico en láminas coloreadas con Giemsa. Los resultados se expresaron en concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>). Los ensayos de permeabilidad se realizaron en celdas de Franz con membranas de acetato de celulosa. La paromomicina y los liposomas ultradeformables de paromomicina (600 µg/ml) se adicionaron en el compartimento donador. Se tomaron muestras a las 2, 4, 8, 12 y 24 horas. Se determinó el perfil de liberación y el flujo de paromomicina y de liposomas ultradeformables de paromomicina (µg/cm<sup>2</sup> por hora).

**Resultados.** Los liposomas ultradeformables de paromomicina fueron más activos que la paromomicina libre contra los amastigotes intracelulares de *L. braziliensis* (CI<sub>50</sub>: 1,7 µM Vs. 175 µM). Los liposomas ultradeformables vacíos no fueron tóxicos para los amastigotes intracelulares en concentraciones menores de 0,1 mM de fosfolípidos. La difusión de liposomas ultradeformables de paromomicina a través de las membranas de acetato de celulosa fue mayor que la paromomicina libre.

**Conclusiones.** La incorporación de paromomicina en liposomas ultradeformables incrementó su actividad *in vitro* contra *L. braziliensis* y aumentó su difusión a través de membranas sintéticas.



### Determinación de la capacidad leishmanicida *in vitro* de compuestos de origen sintético sobre promastigotes de *Leishmania panamensis*

Jennifer Gutiérrez<sup>1</sup>, Juan C. Marín<sup>2</sup>, Dency Pacheco<sup>3</sup>, Erika Torres<sup>1</sup>, Gabriela Delgado<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Inmunotoxicología, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>2</sup> Grupo de Investigación en Principios Bioactivos en Plantas Medicinales, Departamento de Farmacia,

Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia

<sup>3</sup> Grupo de Investigación en Compuestos Heterocíclicos, Programa de Química, Universidad del Atlántico, Barranquilla, Colombia

**Introducción.** La leishmaniasis es una parasitosis transmitida por la inoculación de protozoarios del género *Leishmania* mediante la picadura de mosquitos de la familia *Phlebotominae*. Se caracteriza por presentar tres formas clínicas que van desde una forma leve, moderada a grave que puede ocasionar la muerte del paciente, denominadas: leishmaniasis cutánea, leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis visceral, las cuales están influenciadas, principalmente, por la condición inmunológica del individuo y la especie causante de la enfermedad.

Actualmente, el tratamiento de primera elección para esta enfermedad se basa en la administración de antimonio pentavalentes por vía intramuscular; sin embargo, se han reportado casos de toxicidad del tratamiento que han llevado incluso a la muerte del paciente y en algunos pacientes se ha reportado resistencia al tratamiento, por lo que la Organización Mundial de la Salud ha incentivado la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, entre las que se encuentra la búsqueda de nuevos principios activos que den solución a este problema.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue identificar el potencial leishmanicida de 34 compuestos sintéticos derivados benzo[1',2':6,7]quinolino[2,3-d]pirimidinada sobre promastigotes de *Leishmania panamensis* y, a su vez, determinar la citotoxicidad de los mismos sobre una línea de macrófagos de ratón (J774).

**Materiales y métodos.** La determinación de la viabilidad celular se realizó mediante la metodología de reducción de resazurina, posterior a la exposición durante 72 horas a cada uno de los compuestos y se realizaron los cálculos de la concentración letal 50 y de la concentración efectiva 50, usando el *software* Graph Pad Prism, versión 5.00.

**Resultados y conclusiones.** Los resultados obtenidos demuestran que 12 de los compuestos presentaban actividad leishmanicida sobre promastigotes de *L. panamensis*, con índices de selectividad entre 2 y 27, lo cual –con estudios más detallados–, podría sugerir que estos compuestos son promisorios para el tratamiento de la leishmaniasis.

• • •

## Caracterización de la flora utilizada por los kofan colombianos en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea

Juan Bernal, Andrés Lopez, Eilizabeth Murillo, Jonh Jairo Méndez  
Grupo GIPRONUT, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia

**Introducción.** La leishmaniasis cutánea, enfermedad provocada por un grupo de protozoos del género *Leishmania*, transmitida por las hembras del género *Lutzomyia*, ha tenido mayor incidencia en Colombia en los últimos años de la mano del incremento en los problemas que se vienen presentando con el Glucantime®, así como también la variada efectividad del fármaco, los efectos secundarios y la resistencia de los parásitos. La búsqueda de procedimientos alternos ha llevado a prestar una mayor atención al conocimiento ancestral de las comunidades indígenas sobre plantas antileishmania.

El propósito del trabajo fue mostrar los conocimientos y creencias de la práctica y manejo relacionado con la leishmaniasis cutánea, por parte de la comunidad indígena kofan en el piedemonte amazónico colombiano.

**Materiales y métodos.** Se aplicó un instrumento etnofarmacológico a “curacas” (médicos indígenas) kofan, al tiempo que se recolectaban ejemplares de las plantas para su determinación taxonómica en el herbario TOLI de la Universidad del Tolima. Además, se recolectaron muestras separadas para obtener cenizas, preparar decocciones con etanol al 96 % (1:10 vegetal/solvente, 60 °C, 30 minutos), realizar con los extractos así obtenidos los ensayos fitoquímicos preliminares y hacer un análisis de minerales por absorción atómica.

**Resultados.** Se encontraron 14 especies vegetales pertenecientes a 10 familias, y la Rubiaceae fue la más representativa. Las pruebas fitoquímicas preliminares se le realizaron a cada una de las plantas, teniendo en cuenta lo mencionado en las entrevista. En todas las muestras se encontraron polifenoles, terpenos y alcaloides. Los minerales más abundantes fueron Fe, Cu y Zn.

**Conclusiones.** El principio activo de las plantas utilizadas parece localizarse en hojas y tallos. La interacción de los metabolitos y la interacción de los minerales de cada una de las plantas pueden ser más complejas que la simple aplicación tópica. La sinergia que se pueden presentar podría ser la responsable de la efectividad de los tratamientos.



## Terapia fotodinámica contra *Leishmania* spp., uso de lipoproteínas de baja densidad como vehículo para la entrega selectiva de ftalocianina de aluminio clorada

Laura Elvira Sánchez<sup>2</sup>, Wilfredo Valdivieso<sup>1</sup>, Edgar A. Páez-Mozo<sup>2</sup>, Fernando Martínez<sup>2</sup>, Patricia Escobar<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Universidad Industrial de Santander, Facultad de Salud, Escuela de Medicina, Departamento de Ciencias Básicas, Bucaramanga, Colombia

<sup>2</sup> Centro de Investigaciones en Catálisis, Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander, Piedecuesta, Santander, Colombia

**Introducción.** La terapia fotodinámica utilizando ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl) constituye una alternativa promisoría en la leishmaniasis. La interiorización selectiva de la PcAlCl en las células infectadas se podría mejorar utilizando la lipoproteína de baja densidad (LDL) como vehículo, dado su reconocimiento por receptores-LDL expresado en las células infectadas.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto fototóxico de la PcAlCl precargada en LDL en células THP-1 infectadas con *Leishmania chagasi* y *L. panamensis*.

**Materiales y métodos.** La PcAlCl fue precargada en LDL (PcAlCl-LDL) mediante incubación durante 1 hora a 37 °C. Las células THP-1 infectadas con *Leishmania* spp. fueron tratadas con diluciones seriadas de PcAlCl o PcAlCl-LDL (0-5 µM), durante 3 y 24 horas e irradiadas (5 J/cm<sup>2</sup>, luz visible: 400-700nm). Las células control fueron mantenidas sin irradiar. El porcentaje de células infectadas se determinó después de 24 horas, por recuento microscópico, en láminas coloreadas con Giemsa. La actividad de los compuestos se expresó como concentraciones inhibitorias 50 (CI<sub>50</sub>) y 90 (CI<sub>90</sub>) obtenidas mediante regresión sigmoide.

**Resultados.** En amastigotes intracelulares de *L. chagasi*, el conjugado PcAlCl-LDL fue más fototóxico que la PcAlCl, con valores de CI<sub>50</sub> menores de 0,02 y 0,003 µM en contraste con los datos encontrados para la PcAlCl de más de 1,66 y más de 0,02 µM para 3 y 24 horas de incubación. No se observó actividad de PcAlCl-LDL y PcAlCl en amastigotes intracelulares de *L. panamensis* a las concentraciones utilizadas.

**Conclusiones.** El uso de la LDL como vehículo de transporte de PcAlCl favorece su actividad en las células infectadas con *L. chagasi*, disminuyendo el valor de CI<sub>50</sub> 6,66 veces respecto al uso de PcAlCl libre. Los amastigotes intracelulares de *L. chagasi*

fueron más sensibles al efecto fototóxico de PcAlCl y PcAlCl-LDL que los de *L. panamensis*.

• • •

## Modulación de la expresión de genes involucrados en la respuesta a fármacos tras la infección con *Leishmania panamensis* en macrófagos humanos

Laura Jimena Rojas, María Adelaida Gómez  
Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, Cali, Colombia

**Introducción.** Los mecanismos de interiorización, acumulación y distribución de medicamentos anti-leishmania en la célula huésped son desconocidos. Se han implicado acuagliceroporinas y transportadores ABC en el transporte y acumulación intracelular de compuestos antimoniales y miltefosina.

El objetivo de este estudio fue conocer *in vitro* el efecto de la infección con *Leishmania panamensis* y el tratamiento con Glucantime® y miltefosina en la modulación de la expresión de transportadores ABC, SLC y canales de acuagliceroporinas en macrófagos humanos.

**Materiales y métodos.** Se infectaron macrófagos humanos de la línea celular THP-1 con cepas de *L. panamensis* resistentes o sensibles a Glucantime® o miltefosina por 24 horas. La expresión de AQP9, AQP1, P-gp (MDR-1), MRP-1, ABCB6, ABCC2, ABCA3, SLC7A11 y SLC5A4 se evaluó por medio de qRT-PCR. Se realizó validación funcional de AQP9, ABCB6, SLC7A11, y ABCA3 mediante silenciamiento con shRNA y cuantificación de supervivencia intracelular de *L. panamensis*.

**Resultados.** Tanto la infección con *L. panamensis* como el tratamiento con medicamentos anti-leishmania modularon la expresión de los transportadores de fármacos en macrófagos humanos. La exposición de macrófagos a miltefosina indujo la expresión de P-gp y reprimió AQP1. La interacción de *L. panamensis* con el macrófago moduló la expresión de SLC5A4, AQP1, ABCB6 y ABCC2. El nivel de sensibilidad de *L. panamensis* a los fármacos anti-leishmania ejerce un efecto diferencial sobre la modulación de la expresión de MRP-1, SLC5A4, ABCB6, ABCC2, y AQP1. El silenciamiento de ABCA3 y ABCB6 en los macrófagos THP-1 promovió la supervivencia intracelular del parásito en respuesta al tratamiento con miltefosina o Glucantime®, respectivamente.

**Conclusiones.** La expresión de transportadores ABC, SLC y canales de acuagliceroporinas en macrófagos humanos es modulada por la infección

con *L. panamensis*, su nivel de sensibilidad a medicamentos y el tratamiento con fármacos anti-leishmania. Las variaciones en los niveles de expresión pueden modular la acumulación intracelular de los fármacos alterando la supervivencia del parásito.

Financiado por Colciencias código 222949326161: Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores 496 de 2009.



### Un modelo ulcerativo en ratón de leishmaniasis cutánea por *Leishmania (Viannia) panamensis* para investigar la interacción parásito-huésped y evaluar las medidas de intervención farmacológica e inmunológica

Natalia Muñoz<sup>1</sup>, Jhon Alexander Gómez<sup>1</sup>, Diana Patricia Colorado<sup>1</sup>, Miguel Roldán<sup>1,2</sup>, José Robinson Ramírez-Pineda<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Grupo Inmunomodulación, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Instituto de Patología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

**Introducción.** La leishmaniasis cutánea por *Leishmania (Viannia) panamensis* es una enfermedad de gran prevalencia en Colombia y Latinoamérica, cuya presentación clínica consiste, esencialmente, en la presencia de úlceras cutáneas. No existe un modelo en ratón que permita el estudio experimental *in vivo* de la interacción huésped-parásito.

El objetivo del presente trabajo fue caracterizar clínica, parasitológica e inmunológicamente un modelo ulcerativo en ratón de leishmaniasis cutánea causado por *L. (V.) panamensis*

**Materiales y métodos.** Se infectaron ratones BALB/c con *L. (V.) panamensis* en la dermis de la oreja y se hizo seguimiento clínico, parasitológico, histopatológico e inmunológico. Los análisis inmunológicos incluyeron la determinación de anticuerpos específicos, la medición de citocinas en ganglios linfáticos y esplenocitos y la caracterización *ex vivo* de las poblaciones celulares por citometría de flujo.

**Resultados.** Los animales presentaron una enfermedad ulcerativa, progresiva y crónica, típica de la leishmaniasis cutánea por *L. (V.) panamensis*, la cual se correlacionó directamente con el aumento de la carga parasitaria. El estudio histopatológico y citométrico evidenció un aumento progresivo del infiltrado inflamatorio histiocitario, linfoplasmocitario y de polimorfonucleares. La enfermedad transcurrió con una linfadenopatía

regional y una diseminación del parásito al ganglio linfático y al bazo, sin evidencia de enfermedad sistémica. Tanto en el ganglio linfático del drenaje, como en el bazo, se detectó una respuesta inmune adaptativa mixta caracterizada por la producción de IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IFN $\gamma$  y GM-CSF. Con la progresión de la enfermedad se incrementaron los niveles de anticuerpos específicos de tipo IgG1 e IgG2a.

**Conclusiones.** Se caracterizó, por primera vez, un modelo animal ulcerativo de leishmaniasis cutánea por *L. (V.) panamensis* que reproduce las características clínicas e inmunopatológicas de la leishmaniasis cutánea humana ocasionada por esta especie del parásito. Este modelo facilitará la comprensión de los mecanismos de patogénesis e inmunidad y el desarrollo de nuevas terapias y vacunas.



### Evaluación preliminar de persistencia y supervivencia de *Leishmania (Viannia)* en pacientes con leishmaniasis cutánea tratados con Glucantime®

Ricardo Obonaga, María Adelaida Gómez, Daniel Rodríguez-Pinto, Javier Martínez, Víctor Manuel Blanco, Nancy Gore Saravia  
Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, Cali, Colombia

**Introducción.** La medición de marcadores de viabilidad, como el 7SLARN, ha permitido la cuantificación del parásito en tejidos sanos de pacientes con leishmaniasis cutánea y en individuos con infección asintomática. Considerando que la persistencia de infección posterior al tratamiento contribuye a la recurrencia y generación de un reservorio de parásitos, nuestro objetivo fue determinar la factibilidad de medir la carga parasitaria y viabilidad de *Leishmania (Viannia)* después del tratamiento con Glucantime®.

**Métodos.** Como estrategia exploratoria, evaluamos la presencia de *Leishmania (Viannia)* en aspirados de lesiones y muestras extralesionales (hisopados de amígdalas y nasales) antes del tratamiento con Glucantime® y después de él (6 a 30 días) en 5 pacientes con leishmaniasis cutánea. Las muestras positivas por PCR del kADN/Southern blot fueron evaluadas por qRT-PCR del 7SLARN de *Leishmania (Viannia)* para determinar la viabilidad y la carga parasitaria.

**Resultados.** La PCR/Southern blot del kADN permitió detectar *Leishmania (Viannia)* en las

lesiones de todos los pacientes y en amígdalas o mucosa nasal de 3/5 (60 %) de los pacientes antes de iniciar el tratamiento. El qRT-PCR del 7SLARN permitió determinar la viabilidad en muestras extralesionales en 2/4 pacientes y en todos los aspirados de lesión antes del tratamiento. Al final de tratamiento se amplificó el kADN de los aspirados de las lesiones obtenidas de 2/4 pacientes mientras que las muestras de hisopados de amígdalas y mucosa nasal fueron negativas. No hubo amplificación del 7SLARN de las muestras después del tratamiento. El rango de la carga parasitaria normalizada fue de 1.426 a 5.140 parásitos por 1.000 células para aspirados y de 153 a 946 parásitos por 1.000 células para las muestras extralesionales.

**Conclusiones.** El qRT-PCR del 7SLARN permitió evidenciar la viabilidad y la carga parasitaria en lesiones y tejidos extralesionales de los pacientes antes del tratamiento. La persistencia de parásitos después del tratamiento en lesiones fue demostrable por la presencia del kADN, aunque no se logró amplificar el 7SLARN después del tratamiento, probablemente por la menor cantidad relativa de este blanco (40 veces menos que kADN) y la cercanía del muestreo al final de tratamiento.

Ayudado por Fogarty International Center, U.S. National Institutes of Health Global Infectious Disease Research Training Program, contrato 2D43TW006589 – 06; Colciencias, Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores 496 de 2009.



### Sensibilidad de *Leishmania (Viannia)* antes del tratamiento y después de la falla terapéutica con miltefosina en pacientes con leishmaniasis cutánea

Ricardo Obonaga, Olga Lucía Fernández, Víctor Manuel Blanco, Daniel Garcerant, Liliana Valderrama, Nancy Gore Saravia

Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas, Cali, Colombia

**Introducción.** La efectividad de la miltefosina para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea ha sido demostrada. No obstante, ya han sido reportados casos de falla terapéutica. Esto, junto con los reportes de tolerancia al medicamento *in vitro* observada en especies de *Leishmania (Viannia)* prevalentes en Colombia, hace relevante evaluar el impacto selectivo del tratamiento en la sensibilidad de los parásitos sobrevivientes.

**Métodos.** Se evaluó la sensibilidad a miltefosina en ocho cepas clínicas (cuatro pares) aisladas antes del tratamiento y durante la falla terapéutica

a miltefosina de cuatro pacientes. La dosis efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) en amastigotes se determinó con la carga parasitaria en macrófagos de la línea histiocítica U937 infectados con los aislamientos clínicos expuestos al medicamento. En promastigotes, la DE<sub>50</sub> se determinó con base en la citotoxicidad usando fosfatasa ácida como indicador de viabilidad. Los datos se analizaron usando *GraphPad Prism*, versión 5.0, y se utilizó la prueba de Mann Whitney ( $p > 0,05$ ) para las comparaciones de las cepas.

**Resultados.** El estadio de amastigote fue significativamente más sensible a la miltefosina (DE<sub>50</sub>, mediana, 8,62  $\mu$ M) que la forma promastigote (66,95  $\mu$ M) ( $p < 0,001$ ). La DE<sub>50</sub> de los amastigotes intracelulares de una línea resistente derivada mediante cultivo con concentraciones incrementales de miltefosina, aumentó de 1,55  $\mu$ M a más de 32  $\mu$ M, y para la forma promastigote, de 62,9  $\mu$ M a 103,1  $\mu$ M. El análisis de la DE<sub>50</sub> de las cepas de pacientes que fallaron al tratamiento con miltefosina mostró un incremento de 10  $\mu$ M a más de 32  $\mu$ M en amastigotes intracelulares de la cepa aislada durante la falla terapéutica en uno de los cuatro pacientes.

**Conclusiones.** La monoterapia con miltefosina para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea puede seleccionar poblaciones tolerantes al medicamento con la consecuencia de la reducción de la vida útil de este medicamento. El modelo de amastigotes intracelulares es más sensible para la evaluación de la sensibilidad a la miltefosina *in vitro* que el modelo de promastigotes.

Ayudado por Fogarty International Center, U.S. National Institutes of Health Global Infectious Disease Research Training Program, contrato 2D43TW006589-06; Colciencias, contrato 2229-408-20418; Colciencias, Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores 496 de 2009.



### Eficacia *in vitro* e *in vivo* del alquilisofosfolípido de edelfosina contra promastigotes y amastigotes de *Leishmania* spp. y en *Leishmania panamensis* resistente al antimonio pentavalente

Rubén E. Varela<sup>1,2</sup>, Janny A. Villa-Pulgarín<sup>1,2</sup>, Edward Yepes<sup>2,3</sup>, Ingrid Müller<sup>4</sup>, Manuel Modolell<sup>5</sup>, Diana L. Muñoz<sup>6</sup>, Sara M. Robledo<sup>6</sup>, Carlos Muskus<sup>6</sup>, Julio López-Abán<sup>3</sup>, Antonio Muro<sup>3</sup>, Iván D. Vélez<sup>6</sup>, Faustino Mollinedo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer, CSIC-

Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca, España

- <sup>2</sup> APOINTECH, Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias, Parque Científico de la Universidad de Salamanca, Salamanca, España
- <sup>3</sup> Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca, España
- <sup>4</sup> Department of Medicine, Section of Immunology, St. Mary's Campus, Imperial College London, London, UK
- <sup>5</sup> Department of Cellular Immunology, Max Planck Institut für Immunbiologie, Freiburg, Germany
- <sup>6</sup> Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

**Introducción.** La leishmaniasis es un grupo de enfermedades tropicales olvidadas causadas por el parásito *Leishmania*. El antimonio pentavalente es actualmente el medicamento de elección, cuando no hay resistencia. Los alquil-lisofosfolípidos tienen actividad parasitaria y el alquil-lisofosfolípido de miltefosina está aprobado clínicamente; sin embargo, la facilidad de desarrollar cepas resistentes *in vitro*, prevé acortar su permanencia en la clínica. El estudio evaluó la actividad anti-leishmania *in vivo* de la edelfosina, e *in vitro* frente a distintos alquil-lisofosfolípidos.

**Materiales y métodos.** La actividad antileishmania de la edelfosina, miltefosina, perifosina y erucilfosfolocolina se analizó, realizando ensayos de proliferación y citometría, en promastigotes y amastigotes axénicos de diferentes especies. El tratamiento oral de la leishmaniasis cutánea con edelfosina se evaluó utilizando modelos de ratón y hámster. Los parásitos resistentes a la miltefosina, edelfosina y antimonio pentavalente se obtuvieron usando concentraciones crecientes de cada compuesto. La producción de óxido nítrico (ON), en macrófagos J774, se cuantificó por el método de Griess.

**Resultados.** Se encontró una mayor inhibición de la proliferación *in vitro* ( $IC_{50}$ ) en el siguiente orden: edelfosina > perifosina > miltefosina > erucilfosfolocolina, en ambos amastigotes y promastigotes. La  $IC_{50}$  depende de la especie del parásito como de su estadio. La edelfosina causa apoptosis-like en el parásito, y en macrófagos destruye al parásito, independientemente del ON. *In vivo*, la edelfosina disminuye la carga parasitaria de ratones y hámsteres infectados con *Leishmania panamensis*, *L. braziliensis* y *L. panamensis* resistente al antimonio pentavalente. La resistencia *in vitro* a la miltefosina se generó más rápidamente que a la edelfosina.

**Conclusiones.** La edelfosina es el alquil-lisofosfolípido más potente *in vitro* contra *Leishmania* spp. y elimina *L. panamensis* resistentes al antimonio pentavalente. Además, su resistencia tarda en aparecer.

La edelfosina causa apoptosis independiente del ON en los dos estadios del parásito, y en los modelos animales disminuye significativamente la carga parasitaria.

• • •

### **Desarrollo de un sistema de alto rendimiento para la evaluación de compuestos leishmanicidas *in vitro* e *in vivo* en especies del Nuevo Mundo utilizando cepas fluorescentes estables**

Sergio A. Pulido, Diana L. Muñoz, Adriana M. Restrepo, Carol V. Mesa, Juan F. Alzate\*, Iván D. Vélez, Sara M. Robledo

Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, PECET, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

\*Dirección actual: Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

**Introducción.** El desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de la leishmaniasis requiere de metodologías de alto rendimiento para la determinación de la actividad de los nuevos compuestos tanto *in vitro* como *in vivo*. Los genes reporteros, como la proteína verde fluorescente, se ha convertido en una importante herramienta en diversos modelos gracias a su alta especificidad, sensibilidad y flexibilidad. El uso de la proteína verde fluorescente como un gen reportero elimina los inconvenientes presentados por los ensayos convencionales así como los encontrados con el uso de otros genes reporteros. La utilidad de la proteína verde fluorescente como gen reportero depende de la homogeneidad y estabilidad de la las cepas que expresan la proteína verde fluorescente. Se ha demostrado la expresión estable de la proteína verde fluorescente en cepas del Viejo Mundo usando vectores de integración, sin embargo, no existen reportes de este tipo en cepas del Nuevo Mundo.

**Materiales y métodos.** Se transfectaron cepas de *Leishmania panamensis* y *L. braziliensis* con un plásmido de integración que contenía la proteína verde fluorescente y se determinó la expresión por microscopía y por citometría de flujo. Además, la cepa de *L. panamensis* se usó para infectar líneas celulares en cultivo y hámsters para evaluar su



comportamiento y estabilidad durante un periodo prolongado.

**Resultados.** Las cepas de *Leishmania* del Nuevo Mundo transfectadas expresan la proteína verde fluorescente gracias a la inserción del gen en el *locus* de 18S ARN por medio de recombinación homóloga; también demostramos que la expresión de la proteína verde fluorescente es estable y homogénea durante todo el ciclo infectivo del parásito.

**Conclusión.** Las cepas fluorescentes generadas en este trabajo indican que son útiles para ensayos de evaluación de actividad leishmanicida *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Además, se pueden incorporar a metodologías automatizadas de alto rendimiento para la evaluación de compuestos leishmanicidas, como la citometría de flujo y la fluorimetría.



### La cinasa de colina de *Leishmania infantum* como un potencial blanco terapéutico para el tratamiento de la leishmaniasis

Sergio Pulido<sup>1</sup>, Jon Friesen<sup>2</sup>, Juan Alzate<sup>3</sup>, David Cedeño<sup>2</sup>, Marjorie Jones<sup>2</sup>, Sandra Duque<sup>4</sup>, Luz Ríos<sup>4</sup>, Sara M. Robledo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Chemistry Department, Illinois State University, Normal, IL, USA

<sup>3</sup> Grupo de Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>4</sup> Universidad de Manizales, Manizales, Colombia

**Introducción.** El estudio de la fisiología de *Leishmania* spp. y el conocimiento de los genomas de varias especies de *Leishmania* han ayudado al descubrimiento de nuevos blancos terapéuticos. En este contexto, la inhibición de la síntesis de fosfatidilcolina se perfila como una prometedora estrategia para el desarrollo de nuevos compuestos leishmanicidas. La cinasa de colina/etanolamina, por ser la primera enzima en esta ruta metabólica en eucariontes, podría ser un blanco terapéutico identificable en esta vía.

En este trabajo se presenta la descripción molecular y bioquímica de la cinasa de colina/etanolamina de *Leishmania infantum* y el efecto leishmanicida de inhibidores sintéticos de esta enzima, proponiéndola como un promisorio blanco terapéutico para el tratamiento de la leishmaniasis.

**Materiales y métodos.** Se clonó y se purificó la cinasa de colina/etanolamina de *L. infantum* y se realizaron experimentos para la determinación de los

parámetros cinéticos de la enzima. Paralelamente, se evaluó la actividad leishmanicida de compuestos sintéticos sobre amastigotes intracelulares y, posteriormente, su actividad inhibitoria sobre la enzima recombinante.

**Resultados.** La enzima caracterizada tiene una marcada actividad de cinasa de colina con una alta afinidad por el sustrato. La secuencia de aminoácidos difiere de las enzimas homólogas en otros organismos, incluyendo la humana. La actividad enzimática es inhibida por compuestos análogos del sustrato colina que muestran efectos leishmanicidas sobre amastigotes intracelulares *in vitro*.

**Conclusiones.** Se muestra la primera evidencia experimental de la existencia de una cinasa de colina en *Leishmania* spp. Este, igualmente, es el único indicio disponible de la existencia de la ruta clásica de biosíntesis de la fosfatidilcolina en el parásito, lo cual cuestiona lo propuesto por otros autores sobre la obtención de fosfatidilcolina en *Leishmania* spp. Finalmente, se describe una nueva familia de compuestos con actividad leishmanicida que actúan a través de la inhibición de la cinasa de colina en el parásito.



### Desarrollo, síntesis y evaluación del efecto de compuestos derivados de tetrahydroquinolinas sustituidas en C2, sobre la viabilidad de *Leishmania braziliensis* en la búsqueda de potenciales alternativas terapéuticas para el tratamiento de la leishmaniasis

Yael García-Marchán<sup>1</sup>, Daznia Bompert<sup>1</sup>, Jorge Núñez-Durán<sup>1</sup>, Daniel Rodríguez<sup>1</sup>, Vladimir V. Kouznetsov<sup>2</sup>, Calos M. Meléndez<sup>2</sup>, Felipe Sojo<sup>1,3</sup>, Francisco Arvelo<sup>1,3</sup>, Gonzalo Visbal<sup>4</sup>, Xenón Serrano-Martín<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Área de Salud, Instituto de Estudios Avanzados, Caracas, Venezuela

<sup>2</sup> Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

<sup>3</sup> Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

<sup>4</sup> Centro de Química, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela

**Introducción.** Desde los años 50, la terapia con medicamentos ha sido la alternativa para tratar la leishmaniasis. El arsenal quimioterapéutico de primera línea para combatir esta enfermedad ha sido: Glucantime® y Pentostan®. Estos fármacos producen serios efectos secundarios, a saber: dificultades cardíacas, insuficiencia

renal y complicaciones hepáticas, entre otros. Por esta razón, actualmente existen muchos grupos de trabajo enfocados en la búsqueda de medicamentos alternativos que sean seguros, económicos y efectivos en el tratamiento de esta enfermedad parasitaria.

**Materiales y métodos.** Por medio de evaluaciones con MTT y la construcción de curvas de crecimiento, estudiamos el efecto de 14 compuestos de la serie de tetrahydroquinolinas, sustituidas en C2, sobre la viabilidad de *Leishmania braziliensis* *in vitro*. Se estudió el efecto de los compuestos seleccionados sobre el potencial mitocondrial, los acidocalcisomas, el contenido de esteroides libres y la osmorregulación de los promastigotes tratados.

**Resultados.** De los 14 compuestos evaluados, 4 resultaron efectivos contra promastigotes de *L. braziliensis*, y fueron relativamente inocuos para la célula huésped (J774-G8). El compuesto CM100 resultó ser muy efectivo con valores de  $EC_{50}$  de 7  $\mu$ M. Mediante experimentos de fluorescencia, demostramos que el mencionado compuesto desestabiliza el potencial electrogénico de la mitocondria y genera la alcalinización de los acidocalcisomas de estos parásitos, afectando gravemente su bioenergética celular. Los experimentos de cromatografía de gases acoplada a masas, se encuentran actualmente en proceso para determinar el efecto de este compuesto sobre la biosíntesis de esteroides, esencial para estos tripanosomatídeos.

**Conclusiones.** Los compuestos derivados de tetrahydroquinolinas, sustituidas en C2, presentan un efecto importante sobre la viabilidad de los promastigotes de *L. braziliensis*, afectando pobremente a la célula huésped. Al evaluar los posibles mecanismos de acción de este efecto, encontramos que altera el correcto funcionamiento de los organelos energéticos, como la mitocondria y los acidocalcisomas.



### Potencial antiinflamatorio, cicatrizante y leishmanicida de productos naturales y sus derivados

Yesmit Karina Ríos<sup>1</sup>, Diana Lorena Muñoz<sup>1</sup>, Luis Fernando Echeverri<sup>2</sup>, Iván Darío Vélez<sup>1</sup>, Sara María Robledo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Química Orgánica de Productos Naturales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

**Introducción.** La leishmaniasis es considerada un problema de salud pública en los países donde la enfermedad es endémica, incluido Colombia. Es necesario encontrar medicamentos que superen las desventajas de los que están disponibles en el mercado, y una estrategia que pudiera ser usada en la búsqueda de un compuesto candidato para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea, es su comprensión como una enfermedad que transita por un proceso inflamatorio que permite al parásito persistir en el organismo, facilitar la progresión de las lesiones y su falta de cicatrización; por estas razones, una molécula capaz de modular esta respuesta y de estimular la cicatrización, permitiría acelerar estos procesos, constituyéndose en coadyuvantes de medicamentos ya existentes o como potenciales tratamientos para la leishmaniasis cutánea.

El propósito de esta investigación se centró en determinar el efecto de varios compuestos, de síntesis y derivados de productos naturales, sobre estas respuestas y sobre el parásito.

**Materiales y métodos.** La actividad citotóxica se evaluó sobre células U-937, BHK-21, Detroit 551, y sobre cultivos primarios de monocitos derivados de sangre periférica por el método MTT. La efectividad se evaluó *in vitro* contra amastigotes axénicos e intracelulares de *Leishmania (Viannia) panamensis*, por el método MTT y por citometría de flujo. Tanto la  $CL_{50}$  como la  $CE_{50}$  se calcularon por Probit. El potencial antiinflamatorio y cicatrizante se determinó usando ELISA para IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , MCP-1, COX-2 en sobrenadantes de cultivos de fibrocitos humanos y se realizó un test de cicatrización *in vitro* para evaluar el efecto de los extractos y de las moléculas sobre la migración de los fibroblastos humanos Detroit 551.

**Resultados.** Los compuestos que mostraron ser promisorios como agentes leishmanicidas con actividad antiinflamatoria o cicatrizante, fueron el extracto etanólico de caléndula, el aceite esencial de manzanilla y TC1 y TC2 con  $CE_{50}$  menores de 50  $\mu$ g/ml.

**Conclusiones.** Los compuestos evaluados pueden constituirse en coadyuvantes de medicamentos ya existentes o como potenciales tratamientos para la leishmaniasis cutánea.

