



**Facultad de Ciencias  
Farmacéuticas y Alimentarias**

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

**TESIS DE DOCTORADO:**

***APROXIMACIÓN AL MODO DE ACCIÓN DE HIDRAZONAS  
DERIVADAS DE CROMANOS Y SAPOGENINAS COMO  
AGENTES LEISHMANICIDAS.***

**PRESENTADA POR**

**YULIETH ALEXANDRA UPEGUI ZAPATA**

**Como requisito parcial para optar a título  
de Doctora en Ciencias Farmacéuticas**

**TUTORES:**

**Dres. Luis Fernando Echeverri López y Sara María Robledo Restrepo**

**Medellin 2020**



## Tabla de contenido

|  |    |
|--|----|
| ÍNDICE DE FIGURAS .....  | 6  |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....  | 7  |
| AGRADECIMIENTOS .....  | 9  |
| RESUMEN.....   | 11 |
| ABSTRACT.....  | 13 |
| 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....   | 15 |
| 2. MARCO TEÓRICO .....   | 17 |
| 2.1 Leishmaniasis .....  | 17 |
| 1.2 Ciclo de vida .....  | 18 |
| 1.3 Interacción macrófago-parásito.....  | 20 |
| 1.4 El tratamiento de la leishmaniasis y su problemática.....  | 22 |
| 1.5 Desarrollo de nuevos agentes leishmanicidas y retos para lograrlo .....  | 24 |
| 1.6 Blancos terapéuticos en <i>Leishmania</i> .....  | 25 |
| 1.7 Moléculas candidatas a leishmanicidas: Hidrazonas derivadas de cromanos y saponinas. ...   | 26 |
| 2. INTRODUCCIÓN A LA TESIS Y LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL. ....  | 29 |
| 3. OBJETIVOS .....   | 34 |
| 3.1 OBJETIVO GENERAL .....   | 35 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....   | 35 |
| DESARROLLO DEL TRABAJO.....  | 36 |
| 4. CAPÍTULO 1: Efectividad y citotoxicidad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de las hidrazonas de cromanos TC1 y TTC2 y las saponinas triterpénica SS en <i>Leishmania</i> spp..... | 36 |
| 4.1 Introducción. ....   | 37 |
| 4.2. Metodología .....   | 37 |
| 4.2.1 Síntesis de hidrazonas de cromano: .....   | 37 |
| 4.2.2. Aislamiento y purificación de saponina triterpénica .....   | 38 |
| 4.2.3 Cultivo de líneas celulares y cultivos primarios: .....  | 38 |
| 4.2.4. Cultivos de parásitos:.....   | 38 |
| 4.2.5. Evaluación de la Citotoxicidad <i>in vitro</i> : .....  | 40 |
| 4.2.6. Actividad leishmanicida <i>in vitro</i> .....   | 40 |
| 4.2.7. Actividad leishmanicida <i>in vivo</i> . ....   | 41 |
| 4.2.8 Análisis de datos: <i>in vitro</i> .....   | 42 |
| 4.3 Resultados .....   | 44 |
| 4.3.1. Actividad citotóxica <i>in vitro</i> . ....   | 44 |

|  |    |
|--|----|
| 4.3.2. Actividad leishmanicida .....   | 45 |
| 4.3.3. Eficacia terapéutica de la combinación de TC1 o TC2 con SS.....   | 49 |
| 3.3.4 Toxicidad preliminar in vivo de los ungüentos de TC1 y TC2 combinados con SS: .....  | 52 |
| 4.4 Discusión.....   | 54 |
| 5. CAPÍTULO 2: Determinación del modo de acción de las hidrazonas de cromanos TC1 y TC2 y la saponina triterpénica SS sobre <i>Leishmania</i> spp .....            | 57 |
| 5.1 Introducción .....   | 58 |
| 5.2 Metodología .....  | 59 |
| 5.2.1. Especies de <i>Leishmania</i> . .....   | 59 |
| 5.2.2. Efecto en la morfología de <i>Leishmania</i> . .....  | 59 |
| 5.2.3. Efecto en la membrana plasmática .....  | 60 |
| 5.2.4. Efecto en los niveles de ATP intracelular .....   | 60 |
| 5.2.5. Efecto en el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). .....   | 61 |
| 5.2.6. Efecto en el estrés celular. ....   | 62 |
| 5.2.7. Efecto sobre proteasas de <i>Leishmania</i> spp .....   | 64 |
| 5.2.8. Actividad inhibitoria sobre <i>Captepsina B</i> . .....   | 65 |
| 5.2.9. Efecto en la capacidad de reinfección. ....   | 66 |
| 5.2.10 Análisis de los datos. ....   | 67 |
| 5.3 Resultados .....   | 67 |
| 5.3.1. Efecto en la morfología de <i>Leishmania</i> . .....  | 67 |
| 5.3.2. Efecto sobre el metabolismo energético. ....  | 68 |
| 5.3.3. Efecto en el estrés celular .....   | 70 |
| 5.3.4. Efecto sobre proteasas. ....  | 71 |
| 5.3.5. Efecto en la capacidad de re infección de amastigotes pre-tratados. ....  | 75 |
| 6. CAPITULO 3. Análisis del efecto de las hidrazonas de cromanos TC1 y TC2 y la mezcla de saponinas triterpénicas SS sobre la interacción parásito-hospedero. .... | 81 |
| 6.1 Introducción .....   | 82 |
| 6.2 Metodología. ....  | 83 |
| 6.2.1 Toxicidad en células infectadas. ....  | 83 |
| 6.2.2 Cinética de la efectividad de compuestos sobre macrófagos infectados con <i>L. braziliensis</i> : .....  | 83 |
| 6.2.3 Efecto en la morfología de macrófagos infectados con <i>L. pifanoi</i> : .....   | 83 |
| 6.2.4 Efecto sobre compartimientos ácidos (lisosomas-Fagolisosoma): .....  | 84 |
| 6.2.5 Producción de Especies reactivas de Oxígeno.....   | 84 |

|  |     |
|--|-----|
| 6.2.6. Producción de Oxido Nítrico .....   | 85  |
| 6.2.7. Detección de cuerpos lipídicos.....   | 85  |
| 6.2.8 Determinación de los efectos metabólicos de las moléculas sobre el exometaboloma de macrófagos con y sin infección por <i>L. amazonensis</i> ..... | 85  |
| 6.2.9. Análisis de datos.....  | 87  |
| 6.3 Resultados .....   | 88  |
| 6.3.1 Citotoxicidad en células infectadas.....   | 89  |
| 6.3.2. Cinética de la efectividad de compuestos sobre macrófagos infectados con <i>L. braziliensis</i> .....   | 90  |
| 6.3.3. Cambios morfológicos en macrófagos con <i>L. pifanoi</i> .....  | 90  |
| 6.3.4 Efecto sobre compartimientos ácidos (lisosomas-fagolisosomas).....   | 91  |
| 6.3.5 Acción microbicida en macrófagos.....  | 92  |
| 6.3.6. Cuerpos lipídicos.....  | 98  |
| 6.3.7 Cambios en el metaboloma.....  | 98  |
| 6.4 Discusión.....   | 108 |
| 7. CONCLUSIONES .....  | 117 |
| 8. PERSPECTIVAS .....  | 119 |
| 9. PRODUCTIVIDAD .....   | 121 |
| 10. BIBLIOGRAFÍA.....  | 124 |
| 11. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....  | 134 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Estructuras químicas de los compuestos TC1, TC2 y mezcla de saponinas triterpénicas SS.
2. Eficacia terapéutica de ungüentos de TC1 y TC2 combinados con una mezcla de saponinas triterpénicas (SS) vs. antimonio de meglumina en el modelo para leishmaniasis cutánea por *Leishmania braziliensis* en piel de dorso de hámster.
3. Evolución de leishmaniasis cutánea causada por *L. braziliensis* en hámster dorado tratado con la formulación de TC1: SS al 4% en proporción 1:1, 1:3 y 3:1.
4. Efecto del tratamiento en el peso.
5. Microscopia electrónica de transmisión de amastigotes axénicos de *L. pifanoi*.
6. Metabolismo energético en *Leishmania* tras la exposición a las hidrazonas derivadas de cromano TC1, TC2 y la mezcla de saponinas SS.
7. Despolarización de la membrana mitocondrial en amastigotes.
8. Perfil zimográfico de actividad proteasa.
9. Capacidad Infecciosa de amastigotes liberados pre-tratados.
10. Cinética de efectividad sobre amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*.
11. Microscopia electrónica de transmisión de macrófagos J774 infectados con *L. pifanoi*.
12. Caracterización de compartimentos ácidos en macrófagos J774 infectados con *L. pifanoi* mediante la tinción con LysoTracker Red.
13. Cinética de producción de ROS postratamiento con SS y TC1.
14. Cinética de producción de ROS pos tratamiento con SS y TC2.
15. Producción de ON.
16. Cuerpos lipídicos células con y sin infección por *L. braziliensis*.
17. Análisis de componentes principales de macrófagos con y sin infección por *L. amazonensis*.
18. Análisis de componentes principales de macrófagos con y sin infección por *L. amazonensis* tratados con las moléculas.
19. Ácido docosahexaenoico (DHA) como marcador de la infección por *L. amazonensis*.
20. Metabolitos diferencialmente expresados entre células infectadas vs no infectadas.
21. Alteración del metabolismo de purinas en células con y sin infección con *L. amazonensis* tratadas con SS.
22. Metabolismo del triptófano.

## LISTA DE ABREVIATURAS

aa: Aminoácidos

AIL: Amastigotes liberados de macrófagos U937

AMB: Anfotericina B

AMC: Z-Phe-Arg-amidomethylcoumarin

ATP: Adenosina trifosfato

BSA: Albúmina sérica bovina

CA074: L-3-trans-(propilcarbamoil-)oxirano-2-carbonil)-L-isoileucil-L-prolina

CE<sub>50</sub>: Concentración efectiva media

CI<sub>70</sub>: Concentración infectiva cincuenta

COX: Ciclo oxigenasa

DHA: Ácido Docosahexaenoico

DMNPE: ({D-luciferin-1[-(4,5-dimetoxi-2-nitrofenil) etill ester]})

DO: Densidad óptica

HaPDM: Macrófagos peritoneales de hámster

huMDF: Fibroblastos derivados de monocitos humanos

H<sub>2</sub>DCF-DA: 2',7'-dihidrofluoresceína

IA3: Ácido 3 indol acético

IMF: Índice medio de fluorescencia

IP: Índice de producción

IS: Índice de selectividad

KCN: Cianuro de potasio

LC: Leishmaniasis cutánea

LM: Leishmaniasis mucosa

LPS: Lipopolisacarido

LV: Leishmaniasis visceral

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo) 2,5-difeniltetrazol

M1: Macrófagos proinflamatorios

M2: macrófagos reguladores

NAD: Nicotina adenina dinucleótido

NNN: Novy-MCNeal-Nicolle

NMR: Resonancia magnética nuclear

ON: Óxido Nítrico

PBS: Buffer fosfato salino

PMA: Forbol 12 miristato 13 acetato

Rh 123: Rodamina 123

RNAi: Ácido ribonucleico interferente

ROS: Especies reactivas del oxígeno

SFB: Suero fetal bovino

SS: Mezcla de saponinas triterpénicas extraídas del arilo de *Sapindus saponaria*

TCA: Ciclo del ácido tricarbóxico

TC1: (Tiocromano-4-ilideno) benzoico hidrazona

TC2: (Cromano-4-ilideno) benzoico hidrazona

TEM: Microscopia electrónica de transmisión

TMRM: Tetramethylrhodamina metilester

Trp: Triptófano

UAF: Unidades arbitrarias de Fluorescencia

$\Delta\Psi_m$ : Potencial de membrana mitocondrial

5-HIAA: Ácido 5 hidroxiquinolínico



## **AGRADECIMIENTOS**

### *Lo que la tesis me enseñó*

Durante este proceso he aprendido que hacer lo que nos gusta, hace que los caminos se vuelvan mucho más livianos y con mayores satisfacciones personales, valga aclarar que no es que no haya sido duro, sino que cada momento difícil, marco un valioso aprendizaje más a nivel emocional que científico.

Cada transformación de objetivo, cada materia difícil, cada reto de conocer y explorar la ciencia en otro contexto geográfico y cultural e incluso en otro idioma, fue lo que obtuve al haber elegido hacer otra tesis, estos retos se han convertido en los momentos más duros, pero más relevantes de mi vida. El tener dificultades con mis tutores, por estilos, por interpretaciones, por tiempo e incluso por plata, las dificultades de los desembolsos de Colciencias, las dificultades administrativas de mi linda UdeA, los métodos que nunca logre estandarizar. Me enseñaron, que el problema hace parte de la vida y la manera de asumirlo, es lo que nos marca y nos enseña. Hoy, considero que ha sido la situación más afortunada, más aún al ser una microbióloga que decide cursar un doctorado en ciencias farmacéuticas y que a pesar que la tesis quedo muy biológica, aprendí mucho del arte del diseño y desarrollo de nuevos candidatos a medicamentos, y espero que nuestra alternativa terapéutica pueda llegar a implementarse de manera masiva y podamos impactar en las poblaciones que nos motivan a trabajar en esto.

Para agradecer, quiero iniciar con mi Dios, por la gran fortaleza que me dio y porque cada que le pedí me respondió, de maneras inesperadas, pero nunca omitió respuesta. Luego a mi madre, por su apoyo incondicional durante mis momentos de risa, de llanto e incluso de queja, porque siempre tuvo una linda sonrisa y un; “esto es lo que amas hacer”. A mis tutores a quienes admiro; el profesor Luis Fernando Echeverri, por toda la motivación, porque no se jubiló y logró sacar una tesis más, porque siempre con un ensayo mas íbamos a lograr el resultado más importante, porque creyó en mí y me dejo ser en este proceso. A mi tutora la profesora Sara Maria Robledo, mujer que admiro por su pujanza y humanismo, porque siempre permitió vivir nuevas experiencias, aunque después hilar esta historia se volvió una complicación.

Al PECET, porque ha sido mi casa de formación, porque al lado de Sara he aprendido lo que hoy puedo compartir y enseñar, porque cada día aprendo y cada nuevo experimento y

nueva tarea me ayuda a formarme profesionalmente, por que más que lo académico, también hay una parte emocional que ha fortalecido en mi, y por ello estoy inmensamente agradecida.

Cada agradecimiento se relaciona a un momento de la tesis: Al profesor Luis Fernando Torres y al profesor Wiston Quiñones por siempre darme las moléculas y los dibujos. Lina Yepes, Tatiana Pineda y Luis González por sus manos y apoyo en los largos experimentos de metabolómica y por llorar al momento de las muestras evaporadas. A Didier Tirado, por su comprensión, a María Fernanda Flores por la ayuda en las extracciones de proteínas y análisis zimográfico, a Manuela Giraldo y Carolina Duque por los ensayos en miles de cajas de petri para aislar amastigotes. A Jorge Higueta por orientarme en el análisis de los datos de metabolómica. A Sebastian por tener paciencia y enseñarme a manejar R. A Adriana Restrepo por la edición de mis escritos, Alejandra Prieto, Mónica Echeverri y Eduardo Upegui por siempre dar palabras motivadoras. A mi profesor de inglés Allen Baena por haberme hecho la experiencia menos difícil.

Al doctor Luis Rivas, por recibirme en el centro de investigaciones biológicas-CIB en Madrid y enseñarme sobre la bioenergética de *Leishmania*, al equipo de trabajo Monserrat Nacher, Lorena RG y Paula Martltu. A María Ramos por recibirme en su hogar y enseñarme la hermosa Madrid, a mis amigas Abigail y Deisy de la iglesia Alenza.

En Canadá, agradecimientos a la doctora Beata Mickiewicz, por darme la oportunidad para ir a la pasantía en a los grupos de investigación del doctor Ian Lewis, quien ofreció sus métodos para conocer el metabolismo en el modelo de amastigotes intracelulares y el doctor Lash Gedamu, por enseñarme que lo más importante es disfrutar la vida y que el mejor momento del día es cuando se comparte un café. A mi amiga Camila Meira quien amaneció en el laboratorio conmigo, a Rajni por enseñarme todos los nombres en ingles de los elementos del laboratorio. A Stephen Kotaifani por enseñarme ingles. A los amigos que me regalo el frio de Canadá; Emilio, Mildred Correa, Clayton Lachance y Michelle Klatt.

¡A todos por hacer de esta oportunidad, una historia llena de agradecimientos con nombre propio!

## RESUMEN

La leishmaniasis es un problema de salud pública, que afecta países tropicales y subtropicales, esta enfermedad parasitaria transmitida por vectores tiene un amplio espectro clínico, que va desde una lesión auto limitada en piel, hasta la afectación en mucosas y vísceras. Actualmente, la principal problemática es la escasez de alternativas terapéuticas, la poca adherencia, efectos adversos y el surgimiento de resistencia a los medicamentos disponibles. Por ello, es necesario trabajar en la búsqueda de nuevas entidades químicas capaces de eliminar el parásito y regenerar el tejido afectado.

Las hidrazonas derivadas de cromanos (TC1 y TC2) son compuestos a los que recientemente se les reportó una importante actividad antileishmania, demostrada en estudios tanto *in vitro* como *in vivo*. En el presente trabajo, se confirmó la citotoxicidad y efectividad *in vitro* sobre diferentes especies de *Leishmania* al igual que la eficacia terapéutica *in vivo*, así como también el modo de acción de las hidrazonas derivadas de cromanos solas y en mezcla con una saponina triterpénica extraída de *Sapindus saponaria* (SS).

La citotoxicidad, varió dependiendo del tipo de célula, siendo menor cuando se evaluaron en combinación. Por su parte, los compuestos puros fueron más activos contra los amastigotes intracelulares de *Leishmania*, en comparación a los promastigotes y a los amastigotes axénicos. Los estudios *in vivo* mostraron que las mezclas de TC1 o TC2 con SS en proporción 1:1, lograron la curación en el 100% de los hámsters tratados, sin signos asociados de toxicidad.

Se encontraron dos tipos de efectos ocasionados por las moléculas, los primeros directos sobre el parásito y los segundos indirectos definidos como alteraciones en la relación parásito-célula hospedadora. Igualmente se detectó que SS afecta directamente el metabolismo energético del parásito, siendo la mitocondria la diana principal, al encontrarse afectada su ultraestructura, el potencial de membrana y los niveles de ATP. La afectación mitocondrial que causan las hidrazonas solo se reflejó en pérdida de los niveles de ATP. Adicionalmente se demostró un aumento de la producción de ROS tras la administración de todas las moléculas, aumento que no pudo ser compensado en el tiempo. Contrario a lo esperado para moléculas del tipo saponina, no se encontró ningún efecto en la permeabilidad de membrana citoplasmática a las concentraciones ensayadas. Por último,

la administración de TC1, TC2 y SS inhibió la actividad de proteasas de cisteína de *L. braziliensis*, pero en *L. mexicana* solo fueron inhibidas por SS. Se encontró actividad inhibitoria < 30% sobre la proteasa de cisteína catepsina B de *L. braziliensis* y *L. donovani*; esta última utilizada como control ya que se ha estudiado ampliamente esta proteasa en esa especie.

La actividad inhibitoria de proteasas se relacionó con la pérdida de infectividad de los amastigotes tratados con todas las moléculas, el mayor efecto se obtuvo con TC1 donde la infectividad se disminuyó en un 68%. La acción indirecta se asoció con la alteración en la relación parásito - macrófago en diferentes aspectos; reducción de la voluminosidad del fagolisosoma al tratamiento con las hidrazonas de cromano, pero sin cambio en el pH del compartimiento ni el número de lisosomas. Con la aplicación de mezclas, estos compartimientos ácidos se ubicaron juntos dentro de la célula sugiriendo una mayor actividad oxidativa. Todos los tratamientos causaron un aumento de la producción de Oxido Nítrico (NO), en macrófagos infectados y tratados, consolidando así un cambio en el fenotipo del macrófago (pro-inflamatorio), lo que favorece la eliminación del patógeno, siendo el efecto mucho más rápido y de mayor intensidad con TC1 y TC2.

Aproximaciones metabólicas apoyan la hipótesis de esta conversión a fenotipo inflamatorio de los macrófagos infectados tratados, al reprimirse la acumulación en el medio de IA3 (ácido 3-indol-acético), metabolito inhibitor de la respuesta inflamatoria, el cual es secretado en células infectadas exclusivamente. El tratamiento con SS afectó el metabolismo del triptófano, desfavoreciendo el desarrollo intravacuolar de *Leishmania*, ya que el parásito es auxótrofo, esto podría explicar el efecto parasitostático observado. Las hidrazonas afectan también el metabolismo del triptófano evitando la producción de I3A y 5-HIAA.

Este estudio, permitió demostrar el potencial terapéutico de un producto constituido por la mezcla de TC1 o TC2 y SS, para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea causada por *L. braziliensis*. Este efecto curativo se debe a la capacidad de estos compuestos para afectar la supervivencia del parásito a nivel intravacuolar y bloquear su capacidad para infectar nuevas células.

**Palabras claves:** Hidrazonas derivadas de cromano, *Sapindus saponaria*, *Leishmania* spp eficacia terapéutica, modo de acción, metabolismo energético, proteasas, infectividad, actividad microbicida en macrófagos, metabolismo del triptófano.

## ABSTRACT

Currently, there are few therapeutic alternatives for the treatment of Leishmaniasis. Therefore, the search for new molecules capable of eliminating the parasite and regenerating the affected tissue is a priority. In this work, the action mode of hydrazones compounds derived from chromane (TC1, TC2), and mixtures of triterpene saponins (SS, extracted from *Sapindus saponaria*) was determined. To that, *in vitro* effects on different species of Leishmania as well as *in vivo* therapeutic efficacy were carried out.

The cytotoxicity of the compounds varied depending on the cell type, being lower when they were evaluated in combinations. On the other hand, the compounds were more active against Leishmania's intracellular amastigotes than axenic promastigotes and amastigotes. *In vivo* studies showed that combinations of TC1 or TC2 with SS in 1:1 amount achieved healing in 100% of treated hamsters, without signals associated with toxicity.

A direct effect on the parasite's energy metabolism was detected, and mitochondria was the primary target. Changes in its ultrastructure and mitochondrial membrane potential were observed with SS administration. Besides, there was a loss of ATP caused by chromane hydrazones, and increased production of ROS after treatment administration; the parasite did not compensate for this increase during the time of the assay. Contrary to expectations, no effect was found on cytoplasmic membrane permeability. Similarly, the administration of compounds inhibited the activity of cysteine protease both *L. mexicana* and *L. braziliensis*. Besides, there was a slight action on the activity of cathepsin B of *L. donovani* and *L. braziliensis*. These findings possibly were related to losing the infectivity of the parasites.

An indirect action was also detected, which related to the alteration in the parasite-macrophage ratio in different respects, such as reducing the volume of the phagolysosome with the administration of the chromane hydrazones, but there was no change in the pH of the compartment or the number of lysosomes. Production of ON was increased in macrophages infected and treated with substances, suggesting changes in the phenotype of macrophage (pro-inflammatory), which facilitates the elimination of the pathogen. Several

metabolic approaches support this conversion, for example, inhibition of IA3 excretion by SS and TC1, as this is an inhibitory metabolite of the inflammatory response, which is excreted in the infected cells exclusively. Also, different metabolic pathways were affected that prevent the intra-vacuolar development of *Leishmania*, such as tryptophan and arginine. Likewise, there was a blockage in the uptake of other amino acids and purines, metabolites for which the parasite is mostly auxotrophic. All this consolidates a parasitostatic effect.

This work shows the potential of this combination therapy for the treatment of cutaneous Leishmaniasis, caused by several species. The healing effect seems to be due quite possibly to the ability of the compounds applied to affect the survival of the parasite at the intravacuolar level, blocking its ability to infect new cells.

**Keywords:** Chromane hydrazone; *Sapindus saponaria*; *Leishmania* spp; Efficacy; Mode of action; Energy metabolism; Proteases; reinfection process; microbicidal action; Tryptophan metabolism.

# **1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa causada por parásitos protozoos del género *Leishmania*, que a su vez son transmitidos al humano por la picadura de insectos Phlebotomíneos (Akhoundi M, 2016). La transmisión ocurre de manera endémica en países de la región tropical y subtropical donde coexisten los parásitos, los vectores y los reservorios.

La complejidad de la enfermedad al involucrar diferentes actores hace difícil también el control de la misma, puesto que hay que intervenir cada uno de ellos. Es así, como los programas de lucha anti-vectorial han sido poco exitosos además de excesivamente costosos. Por otro lado, las medidas de control de reservorios son imposibles de implementar, no solo por lo costoso sino principalmente por aspectos éticos y porque aun no se conocen todas las especies que pueden servir como tales. Es así como la única alternativa se ha concentrado en el tratamiento farmacológico de los casos.

Los compuestos de antimonio pentavalente, la anfotericina B, el isotionato de pentamidina y la miltefosina, son los únicos medicamentos avalados disponibles para el tratamiento de todas las formas de leishmaniasis, el empleo de dichos fármacos tienen varias desventajas, entre ellas, las altas dosis que se asocian con moderada o alta toxicidad, esquemas terapéuticos prolongados y de administración parenteral que disminuyen la adherencia y esto a su vez favorece la circulación de parásitos cada vez menos sensibles a los medicamentos, adicionalmente los costos de la terapia que se vuelven excesivos para los países endémicos (Singh y Sivakumar, 2004; Croft y Coombs, 2003). La falta cada vez mayor de medicamentos efectivos evidencia la necesidad de buscar nuevas y mejores alternativas para el tratamiento de la enfermedad.

Adicionalmente la Leishmaniasis se considera una enfermedad “huérfana” o “desatendida” debido al poco interés de la industria farmacéutica para desarrollar una alternativa terapéutica (Chatelain y Don, 2009), por ello la OMS a través de estrategias como el programa especial para la investigación en enfermedades tropicales (Tropical Disease Research-TDR) y enfermedades huérfanas o desatendidas (Neglected Tropical Disease-NTD), han determinado como prioridad el desarrollo y descubrimiento de nuevos tratamientos que sean accesibles a las comunidades afectadas, seguros, y que permitan obtener una mejor adherencia al tratamiento al ser de administración fácil y de corta duración, además de un costo que pueda ser asumido por los países endémicos

En la búsqueda de alternativas terapéuticas, los grupos QOPN y PECET, han desarrollado una formulación para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea, forma clínica más frecuente en Colombia. Esta alternativa terapéutica está basada en la combinación de una mezcla de saponinas triterpénicas de *Sapindus saponaria*, e hidrazonas derivadas de cromo. La administración tópica logra la curación clínica, a través de la desaparición de la úlcera y reepitelización de la piel en el modelo Hámster (patente WO 2014167517 A3).



Continuando con el proceso de desarrollo de este potencial tratamiento contra la Leishmaniasis Cutánea (LC) localizada, se planteó como objetivo de este proyecto doctoral, realizar una aproximación a varios mecanismos bioquímicos involucrados en la respuesta terapéutica de *Leishmania* spp, haciendo fuerte énfasis en *L. braziliensis*; esta es la segunda especie en importancia en nuestro país y de sensibilidad reducida a los tratamientos de primera línea.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Leishmaniasis**

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa causada por parásitos protozoos del género *Leishmania*, que a su vez son transmitidos al humano a través de la picadura de insectos Phlebotomíneos del género *Lutzomyia* y *Phlebotomus* (Akhoundi, 2016). La leishmaniasis, es endémica en 98 países de las regiones tropical y subtropical, con 350 millones de personas en riesgo de adquirir la infección y con 12 millones de personas infectadas y 2 millones de personas enfermas cada año (WHO, 2010).

Existen tres manifestaciones clínicas de la enfermedad; visceral (LV), cutánea (LC) y mucosa (LM). La LC se manifiesta de varias maneras: como nódulos, placas o úlceras en la piel. La LM se manifiesta con úlceras en las mucosas de la región oro-naso-faríngea, y la LV con lesiones en tejido hematopoyético de médula ósea, hígado, bazo y páncreas (WHO, 2010). La presentación de una u otra depende de la ubicación anatómica de la infección y de la especie del parásito. Se han descrito alrededor de 53 especies de *Leishmania*, de estas, 20 se han asociado con la infección en humanos (Akhoundi, 2016).

La LV es una infección potencialmente fatal causada por *L. infantum* y *L. donovani*; se presenta principalmente en niños menores de 4 años, adultos jóvenes del este africano e India y en adultos con VIH (Pace, 2014). Los síntomas frecuentes son fiebre, malestar, escalofríos, pérdida de peso, anorexia y distensión abdominal. El desarrollo del parásito en los órganos conlleva a la acumulación de células fagocíticas, conduciendo a hiperplasia secundaria en células retículo endoteliales manifestándose clínicamente como esplenomegalia y hepatomegalia (Braga, 2013). En Colombia según el Instituto Nacional de Salud-INS en 2018, se reportaron 17 casos de LV correspondiente al 0,2 %.

La LC es una lesión en piel que aparece como consecuencia de la picadura del mosquito infectado. Esta se caracteriza por su polimorfismo clínico, que varía desde una infección localizada, donde los parásitos se reproducen en dermis y como consecuencia de la respuesta inmune se genera un granuloma, hasta LC difusa y LC diseminada donde no se forma eficientemente el granuloma, conduciéndose a la diseminación de los parásitos a otros sitios diferentes al sitio de la picadura. La típica lesión ulcerada se caracteriza por ser indolora con forma redondeada, bordes elevados e indurados y fondo limpio (Vélez, 2015). En Colombia las principales especies responsables de esta manifestación clínica son *L. panamensis* y *L. braziliensis* (Salgado, 2019), especies que también se relacionan con la diseminación a mucosas (Romero, 2007). En Colombia según el INS en 2018 se reportaron 6.426 casos de Leishmaniasis, de los cuales 6.319 (98,3 %) correspondieron a LC y 90 casos (1,4 %) fueron de LM.

La LM se produce como consecuencia de una infección en piel, con especies de *Leishmania* que tienen la capacidad de diseminarse vía linfática o hematogena hasta mucosas orales y de vías respiratorias altas, generando allí la infección, causando un proceso inflamatorio que puede progresar hacia la necrosis y destrucción del tejido cartilaginoso (Pace, 2014).

## **1.2 Ciclo de vida**

*Leishmania* es un protozoo perteneciente a la familia *Tripanosomatidae* orden *Kinetoplastida*, género *Leishmania*. Este se caracteriza por tener un ciclo de vida heteroxeno, en el cual se pueden distinguir morfológicamente dos estadios; uno extracelular en el insecto (mosquitos hematófagos de las especies *Flebotomos* y *Lutzomia*) y uno intracelular en el hospedero mamífero.

Cuando ocurre la picadura del vector infectado, este inocula en el mamífero promastigotes metacíclicos, lo cual junto al daño del epitelio y los antígenos de la saliva del vector provocan una respuesta inflamatoria; las primeras células en responder son los neutrófilos

junto a las “natural killer” y células dendríticas, proceso que juega un papel fundamental en la resolución de la infección o la progresión hacia la enfermedad (Carlsen, 2015). En el caso que conduce al desarrollo de la enfermedad, las especies de *Leishmania* se aprovechan de la tendencia de los neutrófilos a morir por apoptosis y simultáneamente a la señal de reclutamiento de macrófagos que al llegar a la lesión fagocitan los neutrófilos apoptóticos e infectados y los parásitos libres opsonizados, promoviendo el ingreso del parásito a su célula hospedera por excelencia donde se transforma en amastigote. La replicación del parásito conduce a la ruptura de la célula e inducción del reclutamiento de más macrófagos en el sitio de la infección, continuándose este ciclo de reproducción en el hospedero vertebrado (Maurer, 2009). Para resistir al ambiente hostil del macrófago, el parásito utiliza una serie de mecanismos de supervivencia que incluyen la inhibición de enzimas hidrolíticas, producción de óxido nítrico, vías de señalización del hospedero, producción de citoquinas y la presentación antigénica (Cecílio, 2014).

El proceso inflamatorio ocasionado por la acumulación de células fagocíticas en un intento ineficaz por eliminar los parásitos de *Leishmania* en piel, contribuye a la patogénesis de la enfermedad, caracterizada por la excesiva fibrosis y la formación del granuloma (Maurer, 2006).

La picadura de flebotómíneos en los hospederos conduce a la infección del vector, al alimentarse con amastigotes intra y extracelulares. Los cambios de pH y temperatura que enfrenta en el nuevo hospedero, inducen la transformación morfológica mediante el fenómeno de metaciclogénesis permitiendo al promastigote madurar desde el estadio procíclico hasta metacíclico el cual es infectivo para un nuevo hospedero vertebrado (Dostálová, 2012).

### 1.3 Interacción macrófago-parásito

*Leishmania* tiene un ciclo de vida digenético, donde se pasa de un estadio extracelular, que se desarrolla en el intestino del insecto vector, a un estadio intracelular obligado, que evoluciona dentro del macrófago, célula ejecutora del sistema mononuclear fagocítico, derivada de monocitos circulantes que se generan en medula ósea en el tejido hematopoyético (Van, 1972). Actualmente se conoce, además, que hay otros orígenes durante la ontogenia y de allí surgen varios linajes que persisten y a esto se debe una gran diversidad funcional (Gautier, 2012).

El macrófago tiene varias funciones, desde el desarrollo, la homeostasis, la reparación de tejidos y la función inmunológica mediando la actividad microbicida y presentación antigénica (Wynn TA, 2013). El macrófago está normalmente en tejido como un macrófago M0; el microambiente en que este se encuentre puede proveer diferentes señales que lo activan y dirigen hacia un macrófago funcional que puede ser del tipo M1- fenotipo de activación clásico, o fenotipo de activación alternativo, denominado M2 (Arango G, 2014).

El macrófago M1 es un subtipo pro-inflamatorio que posee propiedades microbicidas (Covarrubias, 2013); su activación se produce como consecuencia de la subpoblación Th1 de linfocitos, que producen varias citoquinas, principalmente Interferón gama (IFN- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), lo cual es crucial para la eliminación de patógenos intracelulares a través de estrés oxidativo. La célula incrementa la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), incluyendo anión superóxido, peróxido de hidrogeno, radicales hidroxilos y óxido nítrico (NO) (Scott, 2016), este último radical es uno de los marcadores más importantes en este fenotipo, dado que hay alta expresión de óxido nítrico sintasa (NOS<sub>2</sub>); la cual toma arginina para producir NO.

Por su parte, el macrófago M2, es un subtipo anti-inflamatorio/regulatorio que juega un papel importante en la resolución de la inflamación y la reparación tisular (Anderson, 2002). Su activación se da por los linfocitos Th2, con la producción de IL-4 e IL-13; este fenotipo se caracteriza por la biosíntesis de poliaminas a través de la activación de arginasa-

1, la cual utiliza la arginina, con la subsecuente producción de urea y ornitina, metabolitos necesarios para la síntesis de colágeno y la proliferación celular respectivamente en condiciones normales (Odegaard, 2011). Para *Leishmania* esta característica se ha descrito que favorece el crecimiento intracelular y la progresión de la enfermedad (Arango G, 2014).

El macrófago, es la célula hospedadora por excelencia de *Leishmania* spp. Esta célula tiene un papel dual posterior a la invasión; en primer lugar, se puede generar una cascada de señalización que causa la eliminación del parásito, y, en segundo lugar, aunque esto no es jerárquico, debido a las estrategias que tiene el parásito para evadir el mecanismo de defensa del macrófago y en general del hospedador mamífero, esta célula puede proveer el ambiente adecuado para la supervivencia y replicación del parásito. Esta respuesta está medida por la polarización *in situ* que ocurra al momento de la infección.

En condiciones *in vivo*, el establecimiento y mantenimiento de la infección es muy complejo debido a la participación de diferentes actores como la saliva del insecto vector y la inoculación de parásitos muertos y apoptóticos, factores que favorecen una invasión silenciosa por la inducción de citoquinas anti-inflamatorias como TGF- $\beta$  (Fadok, 1998, Ravichandran, 2010). La participación de polimorfos nucleares neutrófilos (PMNN), células reclutadas en el momento de la picadura del vector y que actúan engolfando promastigotes, los cuales en su interior bloquean o retardan la capacidad del promastigote de morir por apoptosis (Kilpatrick, 2006), evento esencial para la llegada de un número suficiente de células presentadoras de antígeno (dendríticas y macrófagos) al sitio de la inoculación (Cecilio, 2014). Las células presentadoras de antígeno adquieren la infección al fagocitar los PMMN infectados o los promastigotes libres. Posterior a este evento, la supervivencia intravacuolar se favorece debido a la secreción de TGF- $\beta$  e IL-10 por las células infectadas, señalización anti-inflamatoria que se da en respuesta a la eliminación de los PMNN (Van, 2004). Adicionalmente, *Leishmania* como mecanismo de protección de su nicho, inhibe también la apoptosis del macrófago infectado, garantizando con ello, tiempo para transformarse al estadio de amastigote, el cual está completamente adaptado a residir y multiplicarse en el fagolisosoma (Cecilio P, 2014).

#### 1.4 El tratamiento de la leishmaniasis y su problemática

Actualmente los medicamentos recomendados para el tratamiento de la leishmaniasis son de cinco tipos: los antimoniales pentavalentes (SbV), estibogluconato de sodio (Pentostam®) o antimoniato de meglumina (Glucantime®), la anfotericina B, la miltefosina, el isetionato de pentamidina y la paramomicina (WHO, 2010). Todos ellos tienen una eficacia que varía entre el 60 y 98% dependiendo de numerosos factores pero especialmente de la especie de *Leishmania* causante de la infección, pero con varias desventajas para su uso como son una alta toxicidad asociada a altas dosis por tiempo prolongado lo que disminuye la adherencia al tratamiento. Por otro lado, el uso parenteral y los efectos adversos inciden en los altos costos asociados al tratamiento, que en algunos casos requieren atención intra hospitalaria (Sundar, 2001; Frézard, 2009). El mecanismo de acción de la mayoría de estas terapias, es desconocido, por lo cual se dificulta la optimización de estos tratamientos.

De todas las alternativas disponibles, la terapia de elección como primera línea en la mayoría de los países endémicos para LC son los SbV utilizados desde 1940 (Pace, 2014) a pesar de tener grandes limitaciones como su administración diaria parenteral, graves efectos adversos y generación de resistencia (Frézard, 2009), que ha llevado a prohibir su uso en el estado de Bihar-India (Sundar, 2001). Los efectos adversos pueden ser generales como artralgias, mialgia, pérdida del apetito, náuseas, vómito, entre otros. Se presentan efectos adversos graves como elevación transitoria de las enzimas hepáticas, cambios electrocardiográficos, falla renal aguda, pancreatitis y leucopenia (Lyra, 2016). Aproximaciones al mecanismo de acción han demostrado que el SbV es una prodroga que se transforma en el interior del macrófago y el parásito a su forma trivalente (SbIII) (Torres, 2010). El SbIII ingresa por la aquagliceropirina, el transportador aquaporin I, o a través de transportadores de fosfato en amastigotes (Gourbal, 2004). La muerte del parásito se produce por fragmentación del ADN, induciéndose apoptosis,  $\beta$  oxidación de ácidos grasos y fosforilación de adenosina difosfato (Singh, 2012). También se ha reportado que se

presenta inhibición de la glicólisis incrementando el flujo intracelular de tioles por bloqueo de la tripanotion reductasa (El Fadili, 2005).

El deoxicolato de anfotericina B es utilizado en casos de LV, en su formulación liposomal AmBisome®. Aunque es efectiva, logrando un 95% de curación con una sola dosis, se presentan efectos adversos graves como nefrotoxicidad y trombocitopenia además de la necesidad de administrarse intrahospitalario (Sundar, 2010). Esta molécula interactúa con esteroides principalmente el ergosterol, compuesto mayoritario de la membrana de *Leishmania* y ausente en la membrana celular de mamíferos, formándose poros que conducen a la lisis del parásito (Paila, 2010).

La miltefosina, originalmente utilizado como anticanceroso, es la única administrada vía oral; sin embargo se reportan efectos adversos gastrointestinales, erupciones alérgicas en piel, daño hepático y renal. Se restringe su uso en maternas debido a su potencial teratogénico (WHO, 2010); además, farmacológicamente tiene un tiempo de vida media en sangre muy prolongado, por lo que se cree favorece la aparición de resistencia (Rajasekaran, 2015). Se sabe que induce la apoptosis, desconociéndose aun el mecanismo exacto como lo hace, en promastigotes tratados hay una disminución del contenido de lípidos de membrana y la unión a fosfatidiletanolamida llevando a la inhibición de la actividad enzimática (Losieau, 2006).

La pentamidina, es usada principalmente en India; es administrada vía intramuscular o en infusión intravenosa. Se presentan efectos adversos graves como diabetes mellitus, hipoglicemia severa, choque, miocarditis, toxicidad hepática y renal (WHO, 2010). Su mecanismo de acción es poco conocido, la molécula ingresa al promastigote a través del transportador de arginina y poliamina; se acumula en mitocondria uniéndose al complejo II, disminuyendo potencial de membrana, adicionalmente inhibe la topoisomerasa II (Singh, 2012).

La paramomicina se utiliza en casos de falla al tratamiento con antimoniales. Este antibiótico aminoglicosido se administra vía intramuscular; se reporta dolor y edema en el

sitio de aplicación (WHO, 2010), los efectos adversos graves incluyen nefrotoxicidad, ototoxicidad y raramente hepatotoxicidad (Hendrickx, 2012). Con relación al mecanismo de acción en *Leishmania*, aproximaciones experimentales sugieren como blanco la síntesis de proteínas al inhibir la translocación y el reciclaje de subunidades ribosomales (Rajasekaran, 2015).

### **1.5 Desarrollo de nuevos agentes leishmanicidas y retos para lograrlo**

Se dispone de diferentes estrategias para el descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos, entre ellas: La evaluación de la actividad antiparasitaria de productos naturales y derivados sintéticos, el desarrollo de análogos sintéticos de agentes existentes, el diseño de inhibidores de moléculas blanco específicas del parásito y compuestos revertidores de resistencia a medicamentos. También se consideran, la evaluación de actividad de compuestos existentes para otras enfermedades (segundos usos) y la optimización de terapias con medicamentos existentes (Rosenthal, 2003).

La localización intracelular del patógeno (amastigote), el pH bajo del fagolisosoma y la sensibilidad diferencial entre especies constituyen dificultades en la búsqueda de medicamentos leishmanicidas (Palacios, 2017). Adicionalmente, el medicamento debe inducir un cambio en la respuesta inmune que module hacia la resolución (respuesta inflamatoria) y finalmente a la reparación del tejido. Por último, el compuesto candidato debe tener una farmacocinética adecuada que le permita ingresar al granuloma atravesando el tejido fibrótico para llegar al macrófago infectado. De esta manera un candidato a leishmanicida puede actuar directa o indirectamente. La forma directa ocurre con la llegada de la molécula de interés hasta el citoplasma del parásito y bloqueo de alguna función biológica en el parásito. La forma indirecta se da por la alteración de alguna función en la célula hospedadora o en el ambiente extracelular que modifica las condiciones intravacuolares, afectando con ello la supervivencia del parásito o también, valiéndose de la plasticidad del macrófago para cambiar su fenotipo, pasando de un estado permisivo a la infección hacia una actividad microbicida eficiente y con ello permitiendo la eliminación del parásito.



Por todo esto, el conocimiento del modo de acción de los candidatos a drogas está contemplado en los desarrollos preclínicos, con el fin de prever no solo efectos tóxicos, sino la probabilidad de éxito terapéutico y la aparición de resistencia.

### **1.6 Blancos terapéuticos en *Leishmania***

Para dilucidar mecanismos de acción, se utilizan herramientas como transcriptómica, proteómica y metabolómica, que permiten observar de una manera única o multifactorial como y donde ocurre la modulación de procesos biológicos específicos tras la evaluación de una variable como es en este caso la terapia.

Conocer la bioquímica del parásito se convierte así en una herramienta fundamental al momento de estudiar mecanismos de acción; en el caso de *Leishmania spp*, luego de la determinación del genoma de *L. major* (Ivens, 2005), *L. infantum*, *L. braziliensis* (Peacock, 2007) y *L. mexicana* (Rogers, 2011), la generación de conocimiento sobre procesos vitales en el parásito permitieron detectar potenciales blancos moleculares.

Un blanco terapéutico en enfermedades parasitarias es una enzima, molécula o proceso celular en el cual no existe duda de su inexistencia en el hospedador o que a pesar de tener homologos en humanos estos sean diferentes en gran medida. Estos pueden ser:

**a. Procesos exclusivos de tripanosomatidos;** biosíntesis de esteroides, producción de GPI (Glucosilfosfatidilinositol) para mediar el ingreso a la célula hospedera, vías glicolíticas compartimentalizadas (Chawla, 2010), el sistema glioxidasa para detoxificación el Metilglioxal (Vickers, 2004), las vías de salvamento para utilizar las bases de purina de su célula hospedera y sus transportadores de nucleosidos (McConvill, 2007).

**b. Procesos vitales para todos los eucariotas, pero desarrolladas por enzimas homologas,** como la regulación redox, que en *Leishmaniaes* mediada por la actividad de la tripanotiosintasa y reductasa. La biosíntesis de folato (Chawla, 2010) y homólogos de la topoisomerasa (Davies, 2006), kinasas dependientes de ciclina y MAP kinasas, enzimas

importantes para los proceso de división celular, proliferación y diferenciación (Bengs, 2005).

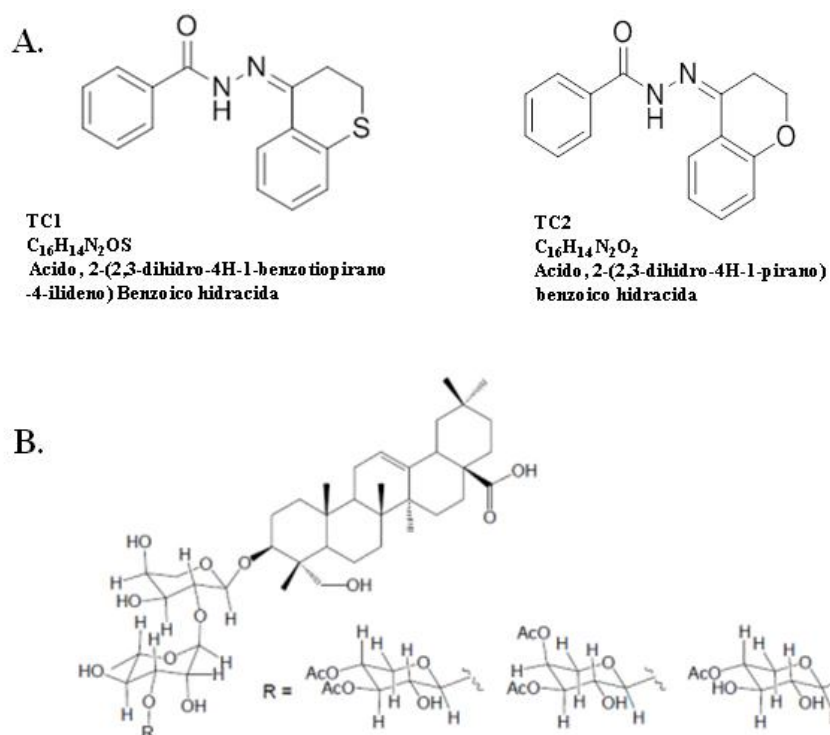
### **1.7 Moléculas candidatas a leishmanicidas: Hidrazonas derivadas de cromanos y saponinas.**

El principal interés actualmente es obtener moléculas nuevas más activas, a través de la búsqueda de sustancias con esqueletos novedosos y acción sobre nuevos blancos terapéuticos, un adecuado comportamiento farmacocinético-farmacodinámico; además una producción factible de escalarse industrialmente.

Encaminados en ese propósito, los grupos de QOPN y PECET de la Universidad de Antioquia han venido trabajando en diferentes estrategias. Una de ellas involucra el núcleo cromano como punto de partida para su optimización a moléculas más efectivas. El cromano tiene una amplia variedad de actividades biológicas reportadas, relativa facilidad para su síntesis y además ofrece a los químicos al ser un núcleo pequeño muchas posibilidades de realizar variantes en el tipo de anillo, el tamaño del mismo y el tipo de sustituyente. Este núcleo se encuentra en benzylideno-4-cromanonas, flavanonas, isoflavanonas, espirocromanonas y modificaciones en C-4 como hidrazonas y oxima derivados (Emami, 2015).

Resultados previos identificaron dos hidrazonas derivadas de cromanos: el benzoic acid, 2-(2,3-dihidro-4H-1-benzotiopiran-4-ilideno) hidrazida (**TC1**) y el benzoic acid, 2-(2,3-dihidro-4H-1-benzopirán-4-ilideno) hidrazide (**TC2**) (figura 1A), con alta efectividad contra *L. braziliensis* y moderada para *L. panamensis* ( $CE_{50} < 20\mu\text{g/mL}$  y  $CE_{50} > 20 < 70\mu\text{g/mL}$  respectivamente) y con un perfil de citotoxicidad moderado y alto respetivamente. Los dos compuestos, evaluados en soluciones acuosas aplicadas sobre las úlceras de LC en hámsteres infectados con *L. braziliensis*, a una dosis de 1.3mg/kg/día durante 10 días, produjeron curación (reepitelización completa de la úlcera sin reactivación durante 3 meses postratamiento) del 60% (TC1) y 80% (TC2). Un ungüento al 4% para

cada molécula, administrado diariamente durante 28 días produjo los mismos resultados, demostrándose la eficacia *in vivo* para estos dos compuestos (Upegui, 2019).



**Figura 1.** Estructuras de. A. TC1 y TC2 B. Mezcla de saponinas triterpénicas SS

Adicionalmente se encontró que modulan la producción de mediadores inflamatorios que participan en la activación de la respuesta microbicida del macrófago, favoreciendo la resolución de la enfermedad. El potencial antileishmania de TC1 y TC2 se incrementa gracias a su actividad cicatrizante, la cual puede estar influenciada por la producción temprana de IFN- $\gamma$  y la disminución de TGF- $\beta$ 1 en los fibroblastos derivados de monocitos humanos (huMDF). Además, carecen de efectos genotóxicos, citotóxicos *in vitro* y no tóxicos en el modelo animal para LC en dorso de hámster dorado (Upegui, 2019).

Por otro lado, en otro trabajo previo se encontró que el extracto total y las fracciones de la resina del chumbimbo (*Sapindus sapinaria*, Sapindaceae), a una concentración de 50 $\mu$ g/mL tenían una actividad mayor al 50% en amastigotes de *L. panamensis*. Las moléculas puras, todas saponinas mostraron mejor perfil de actividad que el extracto crudo con CE<sub>50</sub> de alrededor de 2 $\mu$ g/mL en amastigotes intracelulares y < 16  $\mu$ g/mL en amastigotes axénicos de *L. panamensis*, en comparación con las CE<sub>50</sub> del extracto crudo que fueron 14.5 y 57.7

$\mu\text{g/mL}$  para amastigotes intracelulares y axénicos, respectivamente (Correa, 2014). Cuando se evaluó la actividad *in vivo* del extracto crudo y tres fracciones cromatográficas en hamsteres infectados con *L. panamensis*, no se observó curación de la úlcera luego de terminado el de tratamiento a la dosis de 40mg/kg/día x 10 días administrado vía oral, sin embargo para dos de las fracciones (3S-E, 3S-F), se encontró una disminución del 14% en la carga parasitaria, y la fracción 3S-D no permitió el aumento del tamaño de la úlcera y redujo en un 31% la carga parasitaria con respecto al control (Correa, 2014).

La combinación de medicamentos es una estrategia que se ha utilizado en otras enfermedades parasitarias como malaria y recientemente se viene trabajando en la evaluación de combinaciones de terapias en leishmaniasis (Momeni, 2002., Sadeghian, 2006). Por ello, y basados en los resultados previamente obtenidos con TC1, TC2 y con las fracciones de *S. saponaria*, se decidió evaluar la actividad antileishmania de la mezcla de las tres fracciones de *S. saponaria*, denominada SS (figura 1B) en combinación con TC1 (TC1:SS) y con TC2 (TC2:SS), con el fin de desarrollar una formulación conteniendo dos moléculas (ingredientes activos) que actúen sobre blancos terapéuticos diferentes, para no solo aumentar la eficacia y disminuir los efectos colaterales sino también prevenir la generación de resistencia en el parásito.

A la fecha solo se tienen antecedentes sobre estas moléculas de sus efectividad *in vitro* e *in vivo*, estructuralmente se sugiere por el núcleo que las compone, pueden estar atacando algunos blancos terapéuticos a saber; 1. El grupo cromano se ha relacionado con una alteración de la función mitocondrial (Coimbra et al., 2018) incluso autores como Monzote et al., 2011, aseguran que su acción es justo sobre el Complejo III de la cadena transportadora de electrones. 2. Para las hidrazonas derivadas de cromano se ha documentado la acción sobre proteasas de *Leishmania* (Desai, 2004), y 3. Las saponinas han demostrado tener actividad destabilizante sobre membranas (Santos et al., 1997)

En nuestro estudio, estos antecedentes nos permitieron realizar una guía orientadora hacia la búsqueda del mecanismo de acción, buscando así, tres procesos principalmente; balance energético, actividad proteasa y estabilidad de membranas, de acuerdo a estos hallazgos se diseñaron diferentes estrategias experimentales para seguir la búsqueda del modo de acción.

## **2. INTRODUCCIÓN A LA TESIS Y LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.**

El propósito del presente trabajo fue determinar el modo de acción de dos hidrazonas derivadas de cromano TC1 y TC2 usadas de manera individual o combinada con una mezcla de saponinas triterpénicas SS. Para ello se confirmó su efectividad *in vitro* sobre diferentes especies de *Leishmania* y determinó la respuesta terapéutica de un prototipo de medicamento para LC basado en la combinación de ambos tipos de moléculas.

El propósito del trabajo estuvo fundamentado en procesos generales en el parásito: actividad anti-*Leishmania* (*in vitro* e *in vivo*) de los diferentes compuestos y su efecto en procesos vitales del parásito, entre otros, el metabolismo energético, el balance redox, la respuesta a estrés celular y la morfología. Se considera que, por ser procesos generales y no específicos, los resultados podrían ser extrapolados entre las diferentes especies de *Leishmania*. Adicionalmente se realizó una aproximación sobre como las moléculas rompen el equilibrio que se da entre el parásito y su célula hospedadora y como esto responde nuestra pregunta orientadora; ¿Cuál es el modo de acción de las hidrazonas derivadas de cromano TC1 y TC2 y la mezcla de saponinas triterpénicas SS sobre *Leishmania spp*?

El esquema de la presente tesis comprende un marco teórico general de las diferentes temáticas, adicional a tres capítulos: 1. Efectividad y citotoxicidad *in vitro* e *in vivo* de las hidrazonas de cromanos TC1 y TC2 y la saponina triterpénica SS en *Leishmania spp*, 2. Determinación del modo de acción de las hidrazonas de cromanos TC1 y TC2 y la saponina triterpénica SS sobre *Leishmania spp*, y 3. Análisis del efecto de las hidrazonas de cromanos TC1 y TC2 y la mezcla de saponinas triterpénicas SS sobre la interacción parásito-hospedero. En cada capítulo se muestra una fase del desarrollo de nuestra investigación, comprendiendo una introducción, el desarrollo metodológico, resultados y discusión relacionada. Finalmente se tienen los apartados de conclusiones y perspectivas.

La metodología utilizada se seleccionó teniendo en cuenta tres factores: la forma clínica y las especies de *Leishmania*, el modelo experimental y aspectos logísticos:

- *La forma clínica de la enfermedad y las especies de Leishmania:* Se usaron varias especies de *Leishmania*, causantes tanto de LC como son *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana* y *L. pifanoi*, como de LV como son *L. donovani* y *L. infantum*. Sin embargo, si se hizo especial énfasis en el uso de *L. braziliensis*, por ser la especie que junto a *L. panamensis* causan la mayoría de los casos de LC y LMC en Colombia (INS, 2018). Aunque hay diversidad genética y biológica entre las especies de *Leishmania*, estas divergencias evolutivas del género, existe un alto grado de sintenia (S L Figueiredo, 2019) y dicha variabilidad genética está más relacionada a características sutiles como la expresión de factores virulencia relacionados con el espectro de la enfermedad (Sunter, 2018) pero también la sensibilidad a medicamentos de uso actual para el tratamiento de la leishmaniasis (Palacios, 2017).
- *El modelo experimental:* Tanto los ensayos *in vitro* como los ensayos *in vivo*, pueden involucrar el uso de los diferentes estadios biológicos: promastigotes o amastigotes. Los promastigotes, que son el estadio que se desarrolla en el insecto vector se obtienen de cultivos axénicos en laboratorio. Y para el caso de los amastigotes, que es el estadio biológico que se desarrolla en el hospedero mamífero, estos se obtienen ya sea mediante cultivos axénicos a temperaturas superiores a los 30°C, o a partir de la infección de macrófagos con promastigotes para la subsecuente conversión en amastigotes intracelulares.

Por todas las razones anteriores, se emplearon diferentes tipos de estrategias experimentales, según los siguientes factores:

- *Modelo amastigotes axénicos (AA):* En este sistema solo se tiene el amastigote, independiente si este es obtenido de cultivo continuo (*L. pifanoi*) o liberados de macrófagos U937 (**AIL**), en este tipo de cultivo se evalúa el efecto del tratamiento directamente sobre el amastigote, no existe ninguna intervención de la célula hospedadora o de sus metabolitos que condicionen una respuesta celular.

- *Modelo amastigotes intracelulares (AI)*: En este modelo el parásito se encuentra al interior del fagolisosoma, estructura formada por el macrófago posterior a la fagocitosis del promastigote, en cuyo interior ocurre la transformación a amastigote, que es el estadio responsable de la presentación clínica. Los experimentos realizados en este modelo tienen en cuenta la participación de la célula como agente fundamental en la relación hospedero patógeno, y los efectos observados pueden ser consecuencia tanto del parásito como del macrófago.
- *Promastigotes axénicos (PA)*: En este sistema se evalúa el estadio que está presente en el insecto vector. Aunque no es el estadio contra el cual se desarrollan los compuestos leishmanicidas, este estadio ofrece la ventaja de tener una alta tasa de crecimiento, por lo cual obtener grandes cantidades de parásitos es factible. Adicionalmente son parásitos más activos metabólicamente y muy ricos en factores de virulencia, por lo que evaluar procesos como replicación, actividad proteasa y metabolismo energético es más eficiente.
- Se define como modelo ideal *in vitro* los amastigotes intracelulares. Sin embargo, se presentaron dos dificultades. Primero, obtener grandes cantidades de parásitos para algunos experimentos (metabólica, proteómica), y segundo detectar el efecto directo de los compuestos en los parásitos cuando estos son intracelulares. También hubo problemas logísticos, debido a las restricciones para el transporte de material microbiológico entre en algunos de los países con los cuales se realizó el trabajo colaborativo, o eventualmente la adaptación del modelo a las condiciones de laboratorios en otros países no se logró.
- *-Aspectos logísticos*: Como se carece de bases bioquímicas diferentes suficientes para seleccionar un blanco, se exploraron diferentes opciones experimentales, tales como determinar el efecto sobre la membrana, mitocondria, cambios morfológicos, funcionales y metabólicos, entre otros. Sin embargo, no en todos los laboratorios que participaron en este proyecto se tenían todos esos modelos, entonces se utilizaron los modelos disponibles o que podían ser estandarizado durante el tiempo



de la estancia doctoral. Por ejemplo, en el laboratorio en péptidos Antibióticos eucarióticos (CIB-Madrid) regulaciones nacionales impedían trabajar con *L. braziliensis* por lo cual las aproximaciones en amastigotes se realizaron en *L. pifanoi*. Por su parte, en el grupo de metabolómica de la Universidad de Calgary (Ian-Lab) solo se logró estandarizar el modelo en amastigotes intracelulares de *L. amazonensis*.

En la Tabla 1 se resumen los modelos usados en las diferentes metodologías empleadas en el presente estudio.

**Tabla1.** Metodologías utilizadas en cada modelo experimental

| <b>Modelo</b>                               | <b>PA</b> | <b>AA</b> | <b>AIL</b> | <b>AI</b> |
|---|-----------|-----------|------------|-----------|
| Muerte celular                              | X         | X         |            | X         |
| Niveles de ATP                              | X         |           |            |           |
| Despolarización de la membrana mitocondrial |           | X         | X          |           |
| Permeabilidad de membrana                   | X         | X         | X          |           |
| Actividad proteasa                          | X         |           | X          |           |
| Producción de ROS                           |           | X         | X          |           |
| Estrés celular                              |           | X         | X          |           |
| Repuesta microbicida                        |           |           |            | X         |
| Ultraestructura                             |           | X         |            | X         |
| Metabolómica                                |           |           |            | X         |

PA: Promastigotes axénicos, AA: Amastigotes axénicos, AIL: Amastigotes intracelulares liberados, AI: Amastigotes intracelulares

### **3. OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar los efectos a nivel celular de las hidrazonas derivadas de cromanos (TC1, TC2) y una mezcla de saponinas triterpénicas de *S. saponaria* (SS) solos o en combinación sobre *Leishmania* spp.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Determinar el efecto citotóxico de las hidrazonas de cromanos TC1 y TC2 y una mezcla de saponinas triterpénicas de *S. saponaria* SS, solas o en combinación en células de diferentes orígenes.
2. Confirmar la efectividad como leishmanicidas de las hidrazonas de cromanos TC1, TC2 y una mezcla de saponinas triterpénicas de *S. saponaria* SS.
3. Determinar el modo de acción de las hidrazonas de cromanos TC1 y TC2 y una mezcla de saponinas triterpénicas de *Sapindus saponaria* SS sobre *Leishmania* spp.
4. Determinar el efecto de las hidrazonas de cromanos TC1 y TC2 y una mezcla de saponinas triterpénicas de *Sapindus saponaria* SS sobre la interacción parásito-hospedero.

## **DESARROLLO DEL TRABAJO**

### **4. CAPÍTULO 1: Efectividad y citotoxicidad *in vitro* e *in vivo* de las hidrazonas de cromanos TC1 y TTC2 y las saponinas triterpénica SS en *Leishmania* spp.**

## 4.1 Introducción.

El desarrollo de alternativas terapéuticas para enfermedades desatendidas como la leishmaniasis se ha intensificado en los últimos veinte años, sin embargo, aún no hay ninguna opción nueva avalada comercialmente para leishmaniasis cutánea. Una estrategia para incrementar la efectividad de los medicamentos es el uso de terapias combinadas que actúen sobre blancos farmacológicos diferentes de forma simultánea (Sundar, 2013), o el desarrollo de formulaciones que contengan varios principios activos. Con ello, además de aumentar la eficacia, se esperaría poder reducir las dosis, la duración del tratamiento, los efectos secundarios y sobre todo la inducción de resistencias, lo que, a su vez, podría disminuir los costos de atención en salud de los pacientes.

Dos grupos de investigación de la Universidad de Antioquia, el de Química Orgánica de Productos Naturales y el PECET, han abordado durante más de una década la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas contra la leishmaniasis cutánea. De esta manera se han obtenido tres moléculas activas contra *L. braziliensis* y *L. panamensis* respectivamente, dos hidrazonas derivadas de cromano, TC1 y TC2 y una mezcla de saponinas triterpénicas aisladas de *Sapindus saponaria*, denominada SS (Upegui, 2019; Correa, 2014); la elucidación del modo de acción de ellas es objeto de esta tesis. Sin embargo, para ello previamente es necesario determinar nuevamente la citotoxicidad y efectividad sobre diferentes especies de *Leishmania*. Adicionalmente, se validó la respuesta terapéutica en hámster de un ungüento conteniendo mezclas, TC1: SS y TC2: SS en el modelo experimental de leishmaniasis cutánea causada por *L. braziliensis*.

## 4.2. Metodología

*4.2.1 Síntesis de hidrazonas de cromano:* Los compuestos fueron sintetizados según la metodología de Vargas (2018) y Upegui (2019). Brevemente, una solución de cromano o 4-tiocromanona y la respectiva hidrazona se mezclaron en etanol, luego se adicionó gota a gota ácido acético al 5% en etanol. La mezcla se calentó y puso sobre agua fría, se filtró

para secado y cristalización. Los compuestos fueron identificados por Resonancia Magnética Nuclear (NMR 2D) y espectrometría de masas (Echeverri, 2015).

*4.2.2. Aislamiento y purificación de saponina triterpénica:* La mezcla de saponinas se obtuvo de acuerdo con el procedimiento reportado por Correa et al, 2014. Brevemente, extracción del arilo con etanol y purificación fraccional por columna de sephadex LH-20, y luego cromatografía en columna usando CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9:1 v:v) en sílica gel; se tomaron las fracciones de acuerdo al estudio de Correa et al, 2014, y se trabajó con una mezcla equimolar de saponinas, que difieren básicamente en las sustituciones en la parte glicosídica de la molécula, se obtuvo un perfil de HPLC/MS de dicha mezcla (figura 1B). Esta decisión se tomó ya que previamente se demostró que la mezcla tenía el mismo efecto que cada compuesto puro.

*4.2.3 Cultivo de líneas celulares y cultivos primarios:* Se usaron las líneas celulares U937 (promonocitos humanos, CRL-1593.2), células promieloblastos humanos HL-60 (CCL-240), monocitos humanos THP-1 (TIB-202), J774 (macrófagos de ratón, TIB-67), osteoblastos Saos-2 (HTB-85), fibroblastos Detroit-551 (CCL-110), fibroblastos MRC-5 (CCL-171), células epiteliales hepáticas HepG2 (HB-8065) y enterocitos caco2 (HTB-37), crecidas en condiciones estándar en Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) medium o Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SFB) y antibióticos (100 U/mL penicilina y 0.1 mg/mL estreptomicina), respectivamente. También se usaron macrófagos peritoneales de hámster (HaPDM) obtenidos luego de la inyección intraperitoneal de tioglicolato de sodio al 0.4% en PBS (3 mL) en la cavidad abdominal y cultivadas en medio RPMI con 10% de FBS (Mesa, 2010). Todas las células se incubaron a 37°C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>.

*4.2.4. Cultivos de parásitos:* Los ensayos de efectividad *in vitro* se realizaron en las siguientes cepas y especies de *Leishmania*: *L. braziliensis* cepa silvestre (MHOM/CO/88/UA301-wt) y transfectada con la proteína verde fluorescente (MHOM/CO/88/UA301-EGFP), *L. donovani* transfectada con el gen de la luciferasa 3Luc (MHOM/SD/00/1S-2D), *L. pifanoi* (MHOM/VE/60/Ltrod), *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. panamensis* transfectada con la proteína verde fluorescente

(MHOM/CO/87/UA140-EGFP), *L. infantum* (M/CAN/ES/96/BCN) y *L. mexicana* (MHOM/MX/85/NAN1).

Los parásitos de *L. donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis* y *L. mexicana*, se mantuvieron en el estadio de promastigote en RPMI-1640 suplementado con HEPES y bicarbonato de sodio, 10% de FBS y 1% de antibióticos, a 26 °C. Por su parte los promastigotes de *L. braziliensis* y *L. panamensis* se mantuvieron en medio bifásico NNN (Novy-MCNeal-Nicolle) a 26 °C, realizando repique a un medio nuevo cada 15 días.

Los amastigotes intracelulares se obtuvieron mediante la infección de las células U937. Para ello, los promastigotes ajustados a una concentración de  $2 \times 10^5$  cell/mL se cultivaron en medio bifásico NNN modificado y fase durante 5 días a 26 °C, alcanzándose la fase estacionaria temprana. Por su parte, los parásitos del subgénero *Leishmania* se crecieron en medio RPMI-1640 suplementado con HEPES y NaHCO<sub>3</sub> al 10% FBS durante 6 días a 26 °C. Simultáneamente, las células U937 fueron transformadas a macrófagos en presencia de Forbol 12 miristato 13 acetato (PMA), ajustando las células a  $3 \times 10^5$  cel/ml en medio RPMI-1640 al 10% de FBS, y 0.1 µg/mL de PMA e incubadas durante 72 h a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. La infección se realizó en medio RPMI-1640 con una proporción parásitos/célula de 13:1 para *L. braziliensis*, 30:1 para *L. panamensis*, 7:1 para *L. amazonensis* y 6:1 para *L. infantum*. Cada pozo se lavó 3 veces con buffer fosfato salino (PBS) para retirar los parásitos no internalizados y se adicionó medio nuevo. Las células infectadas se dejaron 24 h más para permitir la multiplicación de los parásitos intracelulares, y luego proceder con el ensayo de efectividad de los compuestos.

Los amastigotes axénicos de *L. pifanoi* se obtuvieron mediante cultivo continuo a 32 °C en cámara de humedad, en medio 199 suplementado con 1,25 gr glucosa, 2,5 gr tripticasa, 500 µL gentamicina, 0.375 gr glutamina, 25 mg hemina y 10% de SFB (Luque, 2010). Se realizó cambio de medio cada día por medio para mantener los parásitos en fase exponencial de crecimiento.

4.2.5. *Evaluación de la Citotoxicidad in vitro*: Se evaluó la citotoxicidad *in vitro* de los compuestos TC1, TC2 y SS solos o en combinación a proporción 1:1 (p/p). Para la preparación de los compuestos, se realizó una solución stock a 1mg/mL (p/v) en DMSO de cada compuesto, posteriormente para realizar las mezclas TC1 y TC2 con SS en proporción 1:1 se tomó igual volumen de cada una y se mezcló. Esta mezcla 1:1 fue utilizada para cada experimento. Cada línea celular se mantuvo en las condiciones estándar, para este ensayo se ajustaron las células en suspensión a  $1 \times 10^5$  células/mL, células adherentes a  $2.5 \times 10^5$  células/mL y  $5 \times 10^5$  células/mL para el cultivo primario haMDP sometidos a la acción de los compuestos a 6 diluciones base 1:2 a partir de 200µg/mL, e incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 h. Transcurrido el tiempo se determinó la viabilidad celular usando el método de MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo) 2,5-difeniltetrazol, Sigma) (Upegui, 2014). Sobre cada pozo se adicionaron 20 µL de MTT (5 mg/mL), el plato se incubó de nuevo a 37 o 34°C durante 3 h. Se cuantificó la cantidad de formazán producido por las células viables según las densidades ópticas (D.O) obtenidas en VariosKanflash (Thermo) con lecturas a 570 nm. Como control de citotoxicidad se usaron células expuestas a doxorubicina (DOXO) y anfotericina B (AMB). Como control de viabilidad se usaron células cultivadas en el medio de cultivo sin ningún tratamiento.

4.2.6. *Actividad leishmanicida in vitro*. La actividad leishmanicida se evaluó tanto sobre promastigotes de *L. donovani*, *L. infantum*, *L. panamensis*, *L. amazonensis* y *L. braziliensis* como en amastigotes axénicos de *L. pifanoi*, utilizando el método MTT descrito en los ensayos de citotoxicidad. En este caso, los promastigotes y amastigotes axénicos, en fase de crecimiento logarítmica se ajustaron a  $2 \times 10^6$  células/mL en medio RPMI-1640 (para promastigotes) o medio 199 (para amastigotes axénicos), al 10% de SFB. Los parásitos se sometieron a la actividad de los compuestos individuales o en combinación en 6 diluciones dobles seriadas iniciando en 50 µg/mL. Se incubó la mezcla a 26 °C para promastigotes y 32 °C para amastigotes axénicos durante 72 y 96 h, respectivamente. A diferencia del ensayo de citotoxicidad, la absorbancia se midió a 595 nm en el lector de microplatos (Bio-Rad CA, USA).



La actividad leishmanicida en amastigotes intracelulares de *L. braziliensis* y *L. panamensis*, se evaluó por citometría de flujo de acuerdo con la metodología previamente reportada (Pulido, 2012). En amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* y *L. infantum* la actividad anti-leishmania se evaluó mediante microscopia óptica usando tinción de Giemsa (Palacios, 2017). En ambas técnicas, luego de 24 h de infección, las células infectadas se trataron con cada uno de los compuestos individuales o en mezclas en cuatro diluciones base 1:4 a partir de 50 µg/mL, e incubadas durante 72 h a la temperatura adecuada.

Para la lectura por citometría de flujo las células se removieron con tripsina/EDTA, se lavaron y suspendieron en PBS y luego fueron analizadas en un citómetro de flujo (Cytomics FC 500MPL, Brea, CA), a 488 nm excitación y 525 nm emisión usando láser de argón y contando 10.000 eventos. Por su parte, para la lectura por microscopia de luz, se depositaron laminillas en cada pozo del plato al inicio del experimento; al finalizar el tiempo de evaluación las células se lavaron con PBS y se fijaron con metanol absoluto durante 2 minutos, luego del secado se colorearon con la solución de Giemsa, proporción 1:6, durante 20 minutos a temperatura ambiente; luego las placas se fijaron con Permout® sobre una lámina porta objetos para inspección por microscopia bajo aumento de 1000X, donde se determinó la infección contando 100 células en cada pozo y registrando el número de amastigotes en cada célula infectada. Como control de actividad anti-Leishmania se usó anfotericina B (AMB).

#### *4.2.7. Actividad leishmanicida in vivo.*

*4.2.7.1 Formulaciones de TC1 y TC2 en combinación con SS:* Los ungüentos fueron preparados conteniendo una mezcla al 4% de TC1/TC2 y SS en proporción 1:1 (Principio activo). Se tomó como base lanolina anhidra al 55%, vaselina 39%, glicerina 1% y 1% de la mezcla de conservantes (Nipagin ácido-Nipagin sódico 0.02-0.3%). Para la preparación de las mezclas de principio activo, se reunieron los sólidos y posteriormente se incorporaron al ungüento base a una concentración del 4%. De esta manera se obtuvieron 3 formulaciones, una conteniendo un 4% de la mezcla de los principios activos TC1 o TC2 y SS en proporciones de 1:1, 1:3 y 3:1 hidrazona de cromano: mezcla de saponinas (p/p).

4.2.7.2. *Eficacia terapéutica de ungüentos de hidrazonas derivadas de cromano combinadas con SS*: Hámster dorados (*Mesocricetus auratus*) hembras y machos, se infectaron con  $10 \times 10^7$  promastigotes metacíclicos de *L. braziliensis* en piel de dorso como ha sido descrito por Robledo et al. (2012). Posterior al desarrollo de la úlcera en el sitio de la inoculación (de 2 a 6 semanas pos inoculo), los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 7 grupos (5 animales por grupo). Seis grupos fueron tratados tópicamente con 40mg por día de cada ungüento durante 28 días, el grupo faltante se usó como control y recibió 200 µg intralesionales de antimonio de meglumina tres veces por semana durante 28 días de tratamiento (MA-28), para prepararlo se liofilizaron ampollas de glucantime, se calculo la cantidad de principio activo presente en el liofilizado y se ajusto en PBS para que hubiesen 200 µg de SbV en cada 100µL de PBS esteril, este es el volumen a administrar intralesional en cada individuo en cada aplicación. Luego de terminado el tratamiento, se hizo seguimiento a los animales durante 90 días. La eficacia de cada compuesto se determinó de acuerdo a la evolución del tamaño de la lesión postratamiento. El área de la úlcera (ancho y largo) y el peso se midieron al final de tratamiento y cada mes postratamiento durante tres meses, los tiempos evaluados fueron pre tratamiento (D0), fin de tratamiento (D28), y los días 30, 60 y 90 pos tratamiento (PTD).

Estos ensayos contaron con el aval del Comité de Bioética para la experimentación con animales de la Universidad de Antioquia; acta No. 91 del 25 de septiembre de 2014.

4.2.8 *Análisis de datos: in vitro* cada ensayo se realizó por triplicado en al menos dos experimentos independientes. Los datos se expresan como el valor promedio +/- la DS.

La actividad citotóxica y leishmanicida se determinó según la concentración letal media ( $CL_{50}$ ) y la concentración efectiva media ( $CE_{50}$ ), mediante el analisis de dosis respuesta en el programa estadístico GraphPad Prisma, donde se ponen las variables viabilidad o % de inhibición de la infección versus la concentración de la molécula evaluada.

El porcentaje de viabilidad, para células, promastigotes y amastigotes axénicos, evaluados mediante el método de MTT, se calculó con la siguiente fórmula, donde las densidades ópticas (D.O) del pozo control corresponden al 100 % de viabilidad:

$$\% V = \frac{\text{D.O células expuestas}}{\text{D.O células control}} \times 100$$

A su vez, el porcentaje de mortalidad corresponde a 100 - % viabilidad

El grado de citotoxicidad en células mamíferas se estableció según los valores de CL<sub>50</sub>, usando una escala previamente establecida en nuestro laboratorio, a saber: Tóxico: CL<sub>50</sub> < 100 µg/mL; Medianamente tóxico: CL<sub>50</sub> > 100 y < 200 µg/mL y potencialmente no tóxico: CL<sub>50</sub> > 200 µg/mL.

Para la Actividad leishmanicida en amastigotes intracelulares, medida por citometría de flujo, primero se calculó el porcentaje de células infectadas según el número de eventos positivos fluorescencia verde (parásitos) y células mediante análisis de diagrama de puntos, al igual que la carga parasitaria según el análisis de la Intensidad de Fluorescencia Media (IFM) para el canal de fluorescencia verde. Cuando los parásitos no estaban transfectados se contaron por microscopía óptica 100 células y el número de amastigotes en cada célula, de allí se obtuvo el porcentaje de células infectadas y la carga parasitaria. Como control se utilizaron macrófagos infectados sin tratamiento.

Luego, se calculó el porcentaje de inhibición de la infección obtenido para cada compuesto a la concentración evaluada usando las siguientes formulas:

$$\% \text{ infección} = \frac{\text{Células infectadas en presencia de compuesto}}{\text{Células infectadas en ausencia de compuesto (control negativo)}} \times 100$$

A su vez, el porcentaje de inhibición corresponde a 100 - % infección.

La actividad de los compuestos se clasificó según los valores de  $CE_{50}$ , usando la escala arbitraria previamente establecida en nuestro laboratorio: Activo:  $CE_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$ ; medianamente activo:  $CE_{50} > 20$  y  $< 70 \mu\text{g/mL}$  y potencialmente no activo  $CE_{50} > 70 \mu\text{g/mL}$ .

Finalmente, se calculó el índice de selectividad (IS) dividiendo la actividad citotóxica en la línea celular U937 entre la actividad leishmanicida obtenida en amastigotes intracelulares de *L. braziliensis* ( $IS = CL_{50}/CE_{50}$ ).

La efectividad *in vivo* se estimó comparando el tamaño de las lesiones antes y después del tratamiento, para cada individuo. La respuesta terapéutica determinada como el porcentaje de reducción del área de la úlcera, se midió como cura (cicatrización del 100% del área de la lesión y aparición de pelaje), mejoría (reducción del tamaño de la lesión  $>20\%$ ), falla (Incremento del tamaño de la lesión), recaída (reactivación de la lesión después que hubo cura).

Para determinar la toxicidad asociada a la administración de los tratamientos, se realizó seguimiento al peso, adicionalmente a la determinación de los niveles séricos de BUN (Nitrógeno ureico en sangre), Creatinina y ALT (Alanina Aminotransferasa) postratamiento, analitos que permiten evaluar la toxicidad renal y hepática, como consecuencia de la administración de los tratamientos.

### **4.3 Resultados**

*4.3.1. Actividad citotóxica in vitro.* En general, los compuestos tuvieron entre alta a moderada citotoxicidad contra las líneas celulares de macrófagos U937, THP-1, HL-60 y J774, con valores de  $CL_{50} < 164 \mu\text{g/mL}$ , excepto para la mezcla TC2:SS que fue potencialmente no citotóxica para las células THP1. Para los haPDM las hidrazonas de

cromanos TC1 y TC2 mostraron citotoxicidad baja, con valores de  $CL_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ , SS mostró una actividad citotóxica alta, con una  $CL_{50}$  de  $33,9 \pm 4,6 \mu\text{g/mL}$ ; la citotoxicidad de las combinaciones para los HaPDM fue moderada, con valores de  $CL_{50}$  de  $127,4 \pm 10,2$  y  $181 \pm 5,0 \mu\text{g/mL}$  para TC1: SS y TC2: SS, respectivamente. Sobre otros linajes celulares la toxicidad fue mucho menor, en general hubo efectos potencialmente no tóxicos sobre fibroblastos MRC5, SaoS<sub>2</sub> y células hepáticas HepG2, sobre la línea celular Caco2 hubo un efecto marginal para los compuestos, excepto para SS, pues la citotoxicidad se considera alta con  $CL_{50} 84,1 \pm 4,4 \mu\text{g/ml}$ .

4.3.2. *Actividad leishmanicida.* Los compuestos fueron activos únicamente en el estadio de amastigote, con actividad entre alta ( $< 20 \mu\text{g/mL}$ ) y moderada ( $> 20$  y  $< 70 \mu\text{g/mL}$ ) (Tabla 2). Las actividades más altas se observaron para amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*, en los cuales la combinación de los compuestos mostró reducciones de la  $CE_{50}$  alrededor de un 50%. El compuesto SS, mostró actividad baja para amastigotes axénicos de *L. pifanoi*.

**Tabla 1.** Actividad citotóxica de las hidrazonas de cromanos TC1 y TC2 y la saponina triterpenica de *Sapindus saponaria* SS, solas o en combinación

| Tipo          | CL <sub>50</sub> (µg/mL) |           |           |           |               |              |           |      |          |            |
|---------------|--------------------------|-----------|-----------|-----------|---------------|--------------|-----------|------|----------|------------|
|               | Macrófagos/Monocitos     |           |           |           | Ósea          | Fibroblastos | Hep       | Int  |          |            |
|               | U937                     | HL-60     | THP-1     | J774      | MDP Ha        | SAO2         | Detroit   | MRC5 | HepG2    | Caco 2     |
| <b>TC1</b>    | 88,1±3,6                 | 124,0±3,1 | 85,2±5,1  | 83,7±2,4  | >200          | >200         | 190,7±7,2 | >200 | >200     | 137,9±7,2  |
| <b>TC2</b>    | 85,1±3,7                 | 112,2±7,8 | 88,3±6,2  | 72,9±2,4  | >200          | >200         | >200      | >200 | >200     | 178,2±7,1  |
| <b>SS</b>     | 63,5±1,2                 | 110,6±2,3 | 125,7±1,5 | 43,9±2,9  | 33,9 ± 4,6    | >200         | 118,5±8,6 | >200 | >200     | 84,1±4,4   |
| <b>TC1:SS</b> | 70,4±1,8                 | 94,1±5,3  | 164,1±5,9 | 81,2±0,2  | 127, 4 ± 10,2 | >200         | 184,4±8,1 | >200 | >200     | 119,6±4,1  |
| <b>TC2:SS</b> | 99,7±1,9                 | 78,7±3,6  | >200      | 145,7±9,9 | 181 ± 5,0     | 96,9±5,3     | >200      | >200 | >200     | 120,6±10,1 |
| <b>AMB</b>    | 28,8±1,2                 | >200      | <200      | 52,7±3,7  | 17,5 ± 3,2    | >200         | 118,1±6,4 | >200 | 27,7±2,0 | 57,8±0,2   |
| <b>DOXO</b>   | 0,13±0,006               | 0,2±0,07  | 0,3±0,05  | 0,5       | <0,15±0,001   | 0,3±0,2      | 0,5±0,1   | <0,5 | 0,4±0,2  | 0,5±0,1    |

Los datos representan la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) en µg/mL de cada compuesto ± D.S, determinado por el algoritmo de dosis repuesta en el programa GraphPad Prima, para diferentes líneas celulares de macrófagos, líneas óseas, fibroblásticas, hepáticas e intestinales. Los medicamentos control son; DOXO: Doxorubicina y AMB: anfotericina B. MDP Ha: Macrófagos peritoneales de hámster. Cada evaluación fue realizada en al menos dos experimentos individuales por triplicado.

*Actividad leishmanicida.* Los compuestos fueron activos únicamente en el estadio de amastigote, con actividad entre alta (< 20 µg/mL) y moderada (>20 y <70 µg/mL) (Tabla 2). Las actividades más altas se observaron para amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*, en los cuales la combinación de los compuestos mostró reducciones de la CE<sub>50</sub> alrededor de un 50%. El compuesto SS, mostró actividad baja para amastigotes axénicos de *L. pifanoi*.

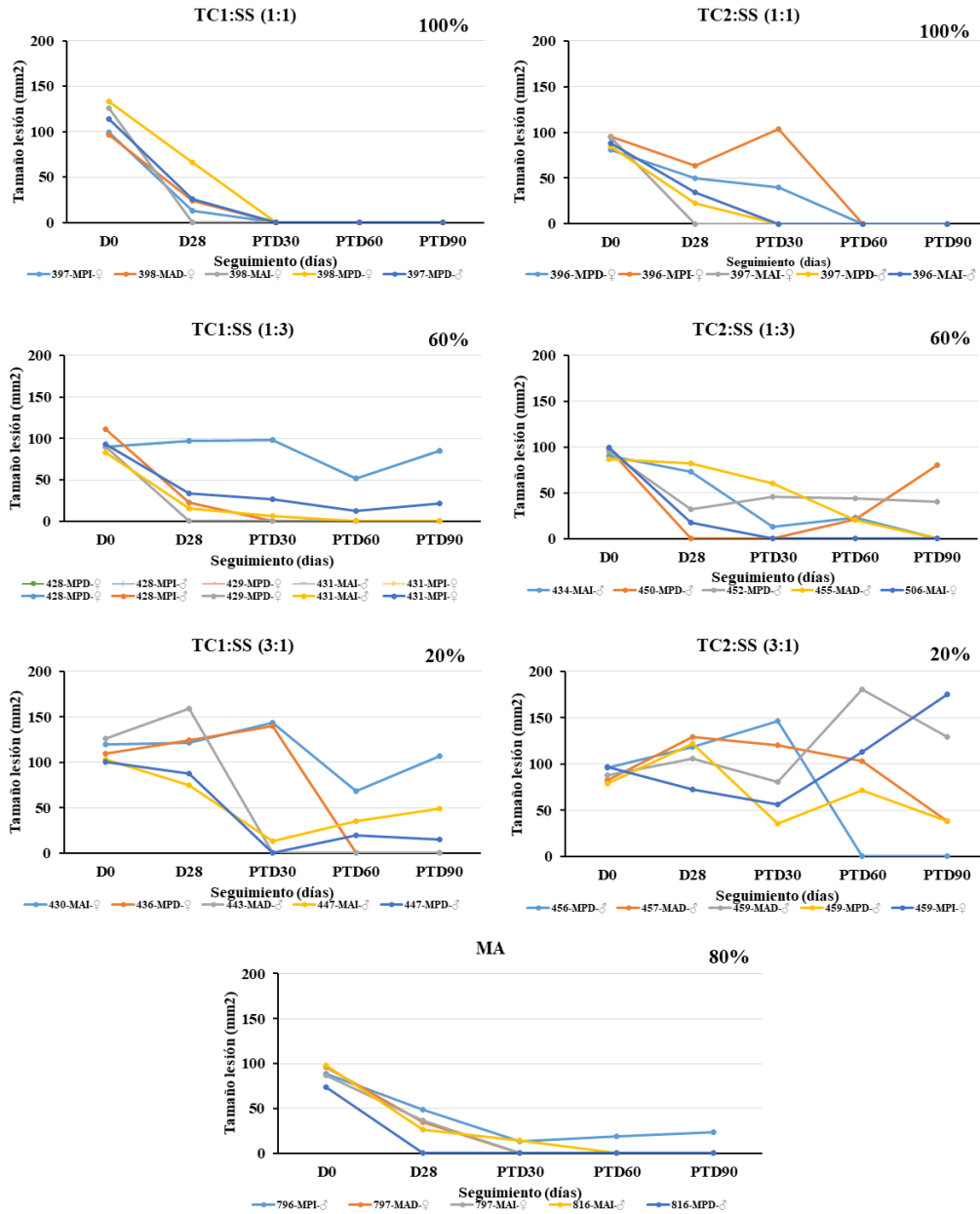
**Tabla 2. Sensibilidad de especies de *Leishmania*.**

| Promastigotes <sup>1</sup> |         | Amastigote        |                        |                      |                       |                    | IS    |
|----------------------------|---------|-------------------|------------------------|----------------------|-----------------------|--------------------|-------|
|                            |         | AA                |                        | AI                   |                       |                    |       |
|                            |         | <i>L. pifanoi</i> | <i>L. braziliensis</i> | <i>L. Panamensis</i> | <i>L. amazonensis</i> | <i>L. infantum</i> |       |
| TC1                        | > 50    | 17,9 ± 3,1        | 12,1±4,1               | 52,3±13,1            | 24,2 ± 4,7            | 15,8 ± 2,1         | 7,3   |
| TC2                        | > 50    | 13,2 ± 4,2        | 25,5±0,9               | 63,3±11,2            | 18,9 ± 4,1            | 19,1 ± 4,6         | 3,3   |
| SS                         | > 50    | >50               | 20,8±6,4               | 20,7±0,02            | >20                   | 45,7 ± 4,1         | 3,1   |
| TC1:SS                     | > 50    | 13,4 ± 3,7        | 7,7±2,4                | 13,3 ± 0,9           | 14,7 ± 3,4            | 18,8 ± 2,3         | 9,1   |
| TC2:SS                     | > 50    | 17,1 ± 5,3        | 13,6±6,8               | 14,2 ± 0,2           | 14,6 ± 3,9            | 18,5 ± 0,9         | 7,3   |
| Control                    | 3,4±0,6 | 0,037 ± 0,004     | 0,69±0,16              | 0,24 ± 0,1           | 0,37 ± 0,01           | Nd                 | 41,7* |

Los datos representan la concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>) en µg/mL de cada compuesto ± D.S. Los medicamentos control son; Anfotericina B para efectividad en todas las especies de *Leishmania* excepto *L. pifanoi* donde se uso Miltefosina. IS (Índice de selectividad= CL<sub>50</sub> en células U937/ CE<sub>50</sub> en amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*). AA: Amastigotes axénicos, AI: Amastigotes intracelulares en macrófagos U937. \* Se calcula con respecto a la CL<sub>50</sub> de la Anfotericina B (28.8±1.2 µg/mL). <sup>1</sup> *L. infantum*, *L. donovani*, *L. amazonensis*, *L. brazileinsis* y *L. panamensis*.



*4.3.3. Eficacia terapéutica de la combinación de TC1 o TC2 con SS.* La combinación de hidrazonas derivadas de cromano TC1 o TC2 con SS se evaluó en tres combinaciones diferentes: 1:3, 1:1 y 3:1 (hidrazona de cromano: saponina, respectivamente, relación peso/peso) siendo la proporción 1:1 la más efectiva, con 100% de curación al aplicarse diariamente durante 28 días, para ambas mezclas, seguida de la combinación 1:3, con 60% de curación (Figura 2). Aunque la respuesta terapéutica al final de seguimiento pos tratamiento, es igual con un 100% de curación para los animales tratados con las formulaciones en proporción 1:1, se evidencia que la respuesta terapéutica es más rápida para TC1:SS, en donde al mes pos tratamiento el 100% de los animales están curados, por su parte en TC2:SS la curación al mes pos tratamiento es solo en 3 individuos y a los 2 meses pos tratamiento se alcanza la cura clínica de todos los animales.



**Figura 2. Eficacia terapéutica de ungüentos de TC1 y TC2 combinados con una mezcla de saponinas triterpénicas (SS) vs. Antimonio de meglumina en el modelo para leishmaniasis cutánea por *L. braziliensis* en piel de dorso de hámster.** Los datos muestran la evolución del tamaño de la lesión en mm<sup>2</sup> luego del tratamiento con 40mg de TC1: SS o TC2:SS (1:3), TC1:SS o TC2:SS (1:1) y TC1:SS o TC2SS (3:1) diario por 28 días o Antimonio de meglumina intralesional 200µg tres veces por semana durante 28 días. El área de la lesión se midió pretratamiento (D0), fin de tratamiento (D28), y cada 30 días por 3 meses correspondiente a (PTD) 30, 60 y 90.

La respuesta terapéutica determinada como el porcentaje de reducción del área de la úlcera, se midió como cura (cicatrización del 100% del área de la lesión y aparición de pelaje); mejoría (reducción del tamaño de la lesión >20%); falla (Incremento del tamaño de la lesión); recaída (reactivación de la lesión después que hubo cura). \* Todas las combinaciones se realizaron en porcentaje peso/peso; porcentaje final de la mezcla de compuestos en el ungüento 4%\*\* El porcentaje de curación obtenido por cada tratamiento se muestra en la parte superior derecha de cada gráfica.

Por su parte, la mezcla 3:1 mostró los resultados de eficacia más bajos, del 49% y 20% de curación para TC1: SS y TC2: SS, respectivamente El tratamiento con antimonio de meglumina produjo la cura de 3/5 hámster (60%), una falla y una mejoría. En síntesis, la eficacia terapéutica de ambas hidrazonas es igual cuando se combinan en proporción 1:1 con SS. Las combinaciones 3:1 producen la menor respuesta terapéutica, con tan solo el 40% y 20% de curación para TC1: SS y TC2: SS, respectivamente.

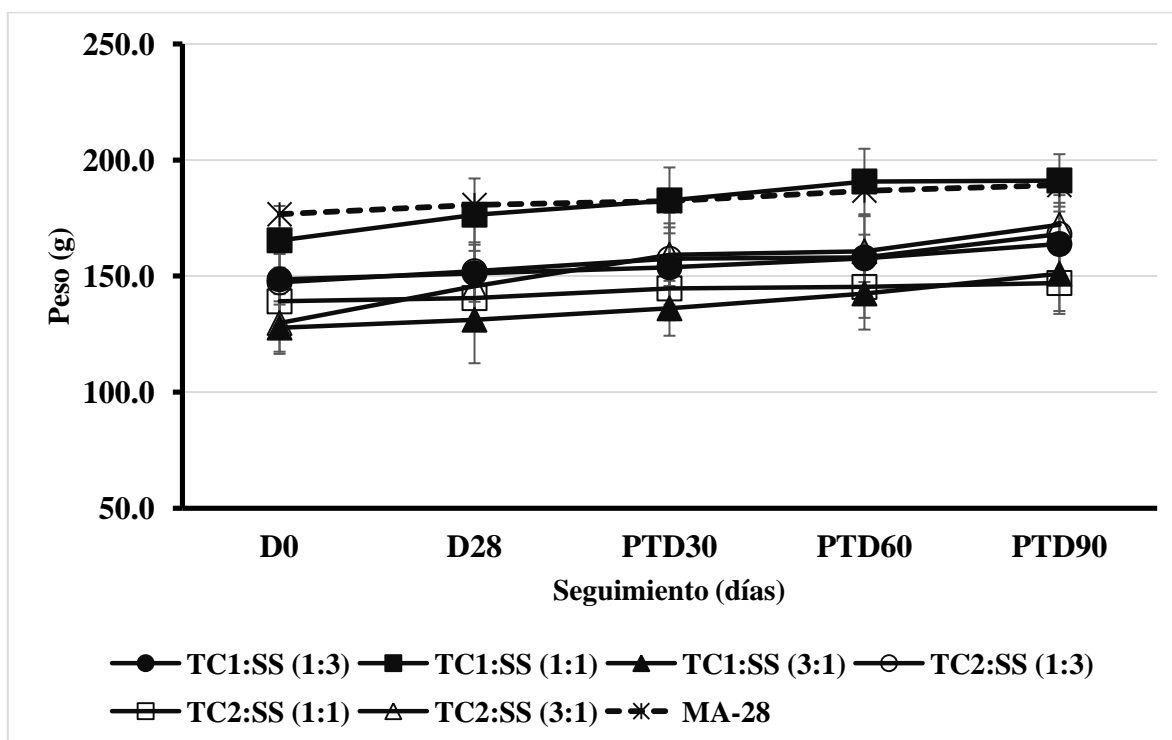
En la figura 3 se muestra un resultado clínico representativo de las lesiones de un hámster que se curó con la terapia combinada de cada hidrazona de cromano combinada con SS en proporción 1:1, 1:3 y 3.1.



**Figura 3. Evolución de leishmaniasis cutánea causada por *L. braziliensis* en hámster dorado tratado con la formulación de TC1: SS al 4% en proporción 1:1, 1:3 y 3:1. Las fotos representan un hámster por cada grupo: Antes del tratamiento (A) y al final del estudio, día 90 postratamiento (B).**

**3.3.4 Toxicidad preliminar in vivo de los ungüentos de TC1 y TC2 combinados con SS:** Los tratamientos con las diferentes combinaciones de hidrazonas de cromano con SS no produjeron ningún efecto sobre el peso de los hámsteres, por el contrario, se observó una ganancia del peso del 4-30% con relación al peso que tenía cada individuo al inicio del tratamiento. La evolución del peso se muestra en la figura 4. Adicionalmente no se

encontraron alteraciones del perfil hepático y renal ni antes ni durante la administración del tratamiento, los resultados a 8 días de iniciado el tratamiento, fueron; ALT: TC1:SS  $56.6 \pm 12.2$  y TC2:SS  $63.2 \pm 29.3$  U/L, siendo los valores de referencia [22-108 U/L], de igual manera ocurrió para Creatinina con valores de  $0.39 \pm 0.07$  y  $0.44 \pm 0.03$  y BUN  $29.8 \pm 3$  y  $31 \pm 3.5$  para TC1:SS y TC2:SS respectivamente [valores de referencia: Creatinina; 0.3-1 mg/dl, BUN; 25-55 mg/dl].



**Figura 4. Efecto del tratamiento en el peso.** Hámster dorados (n= 5 por grupo) tratados vía tópica durante 28 días con 40mg del ungüento de TC1:SS y TC2:SS en proporciones 1:3, 1:1, 3:1 para cada una. Hámsteres tratados con antimonio de meglumina (MA-28) intralesional 200 µg tres veces por semana durante 28 días. Los datos representan la media  $\pm$  DS del peso en gramos por cada grupo de tratamiento. El peso se tomó antes del tratamiento (D0), al final del tratamiento (D28) y cada 30 días por 3 meses, correspondientes a días pos tratamiento (PTD) 30, 60 y 90.

#### 4.4 Discusión

Algunas terapias combinadas en leishmaniasis se han estudiado usando tanto los medicamentos avalados como combinaciones de estos con compuestos nuevos, encontrándose pocos resultados prometedores (Momeni, 2002., Machado, 2018., Dastgheib, 2012, Firooz, 2006). Algunos ejemplos de terapias combinadas que han mostrado mejor eficacia terapéutica fue la aplicación de pentoxifilina oral más glucantime IM por 20 días (Sadeghian, 2006), y ketoconazol oral más glucantime intralesional (El-Sayed, 2010). Aun así, a la fecha no se cuenta con ninguna terapia combinada recomendada en las guías de atención farmacológica para esta enfermedad.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial terapéutico de las hidrazonas de cromano TC1 y TC2, detectados como compuestos con actividad leishmanicida en modelo *in vivo* para LC (Upegui, 2019), y de la saponina triterpénica previamente reportada también con actividad anti-*Leishmania* (Correa, 2014). Una subclase ya se había reportado como potenciales leishmanicidas por otros autores, como las hidrazonas derivadas de tiocromanona (Vargas, 2018) y de benzofenonas (Al-Kahraman, 2012), efectivas contra *L. panamensis* y *L. major*, respectivamente, así como también las 7-cloro-4-quinolinil hidrazonas, que han mostrado actividad contra especies de *Leishmania* del nuevo y el viejo mundo (Coimbra, 2013). Similarmente, algunas saponinas como el ácido oleánico y la saponina triterpénica PX6518, exhibieron resultados promisorios *in vitro* e *in vivo* para leishmaniasis visceral y cutánea (Melo, 2016, Inocencio, 2011).

En este caso en particular, se diseñó la combinación de hidrazonas con la mezcla de triterpenos, con la hipótesis de que el efecto de la aplicación tópica de los primeros podía ser incrementado si conjuntamente se encontraba en la formulación una molécula que favoreciera su solubilidad o permeabilidad en las diferentes capas de la epidermis; ya que es reconocido el comportamiento de las saponinas como agentes tensoactivos.

Los compuestos fueron selectivos sobre *Leishmania* spp, ya que todos mostraron citotoxicidad alta sobre líneas de macrófagos y baja citotoxicidad en cultivos primarios,

excepto SS quien mostró moderada citotoxicidad en MDPHa (Macrófagos peritoneales de hamster). La efectividad fue exclusiva sobre el estadio de amastigote, con efectividad similar sobre las distintas especies de *Leishmania* evaluadas, excepto en el caso de SS en *L. pifanoi*, donde no hubo inhibición del desarrollo de amastigotes axénicos, y en *L. panamensis* donde la sensibilidad fue moderada a las hidrazonas TC1 y TC2 con CE<sub>50</sub> entre 50 y 60 µg/mL. Este resultado es muy interesante debido a la diversidad clínica que tiene la leishmaniasis, puesto que la presentación clínica depende de la especie del parásito, por lo cual esta terapia podría ser candidata a tratar no solo casos de LC por *L. braziliensis* y *L. panamensis*, principales especies reportadas en Colombia, sino además de otras especies distribuidas geográficamente en las Américas como *L. amazonensis* y *L. mexicana* (Akhoundi, 2016). Incluso, al ser efectiva contra especies que causan leishmaniasis visceral, evidencia su amplio espectro de actividad, aunque para implementarse en el tratamiento de esta presentación clínica, nuestros resultados solo sugieren efectividad *in vitro*, y se haría necesario cambiar la formulación para comprobar su efectividad *in vivo*, su seguridad e implementación en este tipo de leishmaniasis, ya que nuestro diseño está orientado a la aplicación tópica de los principios activos.

El diagnóstico de la leishmaniasis cutánea se realiza por métodos parasitológicos que usualmente no requieren la clasificación hasta especie, por lo cual la administración del tratamiento se indica sin conocer la especie responsable, aunque se conoce que la efectividad a fármacos es diferencial (Palacios, 2017). En este sentido, estas moléculas al tener efectividad sobre diferentes especies en el mismo rango de CE<sub>50</sub>, podrían obviar fallas terapéuticas debidas a especies naturalmente resistentes. Aun así, faltaría realizar *in vitro* ensayos de efectividad en cepas aisladas de pacientes para determinar nuevamente la efectividad.

En el modelo animal no se evidenció ningún efecto tóxico luego de 90 días postratamiento, incluso los animales ganaron entre un 4 a un 30% de peso en todos los grupos de tratamiento y la curación de las lesiones en dorso de hámster fue del 100% al utilizar la formulación al 4% en proporción 1:1 para las combinaciones de TC1 o TC2 y SS. Se encontró que a medida que disminuye la concentración de la saponina la efectividad

decrece, encontrándose para TC1:SS 3:1 dos 2 curas, 2 mejorías y una recaída, por su parte en TC2:SS en la misma proporción la respuesta fue mucho mas pobre con 2 mejorías, 2 fallas y solo 1 cura clínica; mostrando con ello que el SS, tiene una actividad no solo como surfactante dentro de la formulación sino además tiene un efecto directo sobre la viabilidad del parásito. Adicional a ello, esta buena respuesta terapéutica se contrasta con la pobre eficacia in vivo que había mostrado Correa et al, 2014 tras la administración oral de la mezcla de saponinas, evidenciando que la optimización de la ruta de administración, formulación y administración conjunta con las hidrazonas, cambia completamente el perfil de efectividad in vivo.

Un estudio observacional en ejecución en caninos con leishmaniasis cutánea, ha mostrado que la formulación de TC2:SS causa la curación de las lesiones en diferentes ubicaciones anatómicas y con distintos tiempos de evolución. Todos estos resultados permiten sugerir que la formulación en ungüento al 4% conteniendo TC1 o TC2 y SS en proporción 1:1, hidrazona de cromano:saponina, posee potencial para convertirse en una alternativa para el tratamiento tópico de la LC. Estos resultados sirven de base para futuros ensayos clínicos que validen su seguridad y eficacia.



**5. CAPÍTULO 2: Determinación del modo de acción de las hidrazonas de cromanos TC1 y TC2 y la saponina triterpénica SS sobre *Leishmania* spp**

## 5.1 Introducción

La leishmaniasis al ser una enfermedad ocasionada por la presencia de un parásito intracelular obligado en el hospedero mamífero; representa un reto en el diseño de nuevos tratamientos, ya que una terapia ideal debería solo eliminar el parásito sin causar ningún efecto sobre la célula hospedadora (Reguera, 2014).

Por otra parte, el modo de acción de una sustancia es el estudio de las interacciones específicas que ocurren entre esta y un sustrato o molécula blanco; sin embargo, se debate las diferencias entre el modo de acción y el mecanismo de acción, relacionando los efectos fisiológicos y bioquímicos en un caso, y en otro describiendo específicamente sus interacciones con una molécula a nivel celular (Iorio, 2010). Es especialmente importante conocer cómo y donde funciona un medicamento, no solo para diseñar su forma farmacéutica, sino también para considerar sus efectos secundarios y riesgos toxicológicos.

Para realizar un abordaje sobre el modo/mecanismo de acción de las moléculas, se pueden tomar antecedentes estructurales que permitan orientar la realización de estudios fenotípicos, o aproximaciones bioinformáticas, de las interacciones entre la molécula y diferentes blancos cristalizados del modelo infeccioso a trabajar. Para el caso de nuestras moléculas, estructuralmente se ha relacionado el núcleo cromosómico con alteraciones de la función mitocondrial en tripanosomatidos (Coimbra et al, 2018, Monzote, et al, 2011), el complejo de las hidrazonas con inhibición sobre proteasas de *Leishmania* spp (Desai, 2004), y las saponinas adicional a su actividad desestabilizante de membranas en general (Santos et al, 1997) han sido exploradas sutilmente en *Leishmania* en estudios in sílico, documentándose la posibilidad de que estas alteren la síntesis de ergosterol, infiriéndose efectos directos sobre la membrana citoplasmática del parásito (Melo et al, 2010).

Debido al potencial terapéutico identificado para los compuestos TC1, TC2 y SS, el presente trabajo evaluó el efecto de los compuestos puros o en combinación sobre varios procesos bioquímicos, en diversas especies y estadios de *Leishmania*. Específicamente se estudió el efecto sobre el metabolismo energético, la estabilidad de membrana, la respuesta

al estrés celular y la actividad sobre proteasas, efectos que habían sido documentados tanto in silico como in vitro sobre moléculas relacionadas estructuralmente lo cual se usó como estrategia para determinar el modo de acción sobre el parásito.

## 5.2 Metodología

5.2.1. *Especies de Leishmania*. *L. braziliensis* cepa silvestre (MHOM/CO/88/UA301-wt) y transfectada con la proteína verde fluorescente (MHOM/CO/88/UA301-EGFP), usada para los ensayos de permeabilidad de membrana, estrés oxidativo, despolarización de la membrana mitocondrial, cuerpos lipídicos y actividad proteasa y efecto inhibitorio sobre Catepsina b. Para los ensayos de medición de niveles de ATP, se usó la misma cepa de *L. braziliensis* y la cepa *L. donovani* (MHOM/SD/00/1S-2D) ambas transfectadas con el gen de la luciferasa 3Luc. La cepa de *L. pifanoi* (MHOM/VE/60/Ltrod), se usó en los ensayos de microscopía electrónica de transmisión (TEM), permeabilidad de membrana, estrés oxidativo, despolarización de la membrana mitocondrial y cuerpos lipídicos. Por su parte, la cepa de *L. mexicana* (MHOM/MX/85/NAN1), se usó como control en el ensayo de actividad proteasa.

5.2.2. *Efecto en la morfología de Leishmania*. Los amastigotes axénicos de *L. pifanoi* se cultivaron en condiciones estándar, se ajustaron a  $2 \times 10^6$  amastigotes/mL y se incubaron con los diferentes compuestos, individuales o en combinación, a una concentración equivalente a la CE<sub>70</sub> durante 24 h a 32°C en cámara de humedad. Terminado los tiempos de incubación los amastigotes axénicos se lavaron y fijaron con glutaraldehído al 3%, durante 1 hora a 4°C seguido de los pasos de hidratación y deshidratación (Luque, 2010). Las muestras fueron embebidas en resina Epon 812 y observadas en el TEM (JEOL-1230 USA Inc. MA, USA).

Posterior a la adquisición de las fotografías, se realizó el análisis de imágenes en el software ImageJ, en el cual se tomaron 20 fotografías por cada condición experimental y se cuantificó el tamaño de los amastigotes (área), el número de valuolas por amastigote, y el área de las vacuolas.

5.2.3. *Efecto en la membrana plasmática.* Para determinar el efecto de los diferentes compuestos y mezclas de compuestos en la permeabilización de la membrana plasmática, promastigotes de *L. donovani* y amastigotes axénicos de *L. pifanoi* se ajustaron a  $2 \times 10^7$  parásitos/mL, en medio Hanks-Glu más  $1 \mu\text{M}$  de la sonda Sytox Green (Luque, 2007). Luego,  $100 \mu\text{L}$  de la suspensión de parásitos fueron transferidos a cada pozo de una placa de 96 pozos. Seguidamente, se adicionaron  $100 \mu\text{L}$  de cada compuesto o combinación de éstos a  $50 \mu\text{g/mL}$ . Puesto que el acceso de la sonda a los ácidos nucleicos intracelulares sólo ocurre cuando hay disrupción de la membrana que permite el acceso de la sonda, se registró el cambio de la fluorescencia ocasionada por la unión de la sonda al DNA cada 60 segundos durante 1h utilizando el lector de microplatos (Polar Star Galaxy, BMG, Germany) a  $485 \text{ nm}$  excitación y  $520 \text{ nm}$  de emisión. Como control de permeabilización total se usó 1% Triton X-100, el cual fue utilizado además para definir la señal de máxima fluorescencia.

El efecto en la permeabilización de membrana también se evaluó en promastigotes de *L. braziliensis*. En este caso, las mediciones se realizaron a 1, 2 y 24 h para determinar la ocurrencia tardía del efecto luego de administrados los compuestos. Para las mediciones al terminar los periodos de incubación, se tomaron  $300 \mu\text{L}$  de la solución de parásitos a  $2 \times 10^5$  parásitos/mL expuestos a  $50 \mu\text{g/mL}$  de cada compuestos o sus combinaciones, se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos y se suspendieron en  $300 \mu\text{L}$  de yoduro de propidio a  $50 \mu\text{g/mL}$  que da una respuesta similar a la producida por la sonda Sytox Green, Molecular Probes. Luego de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, se registró la fluorescencia en un citómetro (Cytomics FC 500MPL, Brea, CA), a  $488 \text{ nm}$  excitación y  $610 \text{ nm}$  emisión usando láser de argón y contando 10.000 eventos.

Como Control de permeabilidad se utilizaron promastigotes previamente lavados con PBS, fijados durante 30 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehído al 4% y permeabilizados con triton X 100 al 0.5% durante 15 minutos. Estos se pusieron en la solución de yoduro de propidio como los demás grupos experimentales.

5.2.4. *Efecto en los niveles de ATP intracelular.* Promastigotes de *L. donovani*-3Luc y *L. braziliensis*-Luc en fase logarítmica se ajustaron a  $2 \times 10^7$  parásitos/mL en solución Hanks-Glu. Se adicionó el sustrato ({D-luciferin-1[-(4,5-dimethoxy-2-nitrofenil) etil ester]})

(DMNPE) - luciferina a 50  $\mu\text{M}$  y luego, 90  $\mu\text{L}$  de la solución de parásitos se transfirió a cada pozo de un microplato de 96 pozos; se hizo lectura de la luminiscencia tomándose este dato como el punto cero. Luego se administraron los compuestos o las combinaciones de estos a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se registró el cambio en la luminiscencia cada 60 segundos durante una hora en el lector de microplatos. Parásitos en solución de Hansk-Glu sin tratar se incluyeron como control sin tratamiento. Como control de permeabilidad se utilizó Triton X 100 al 1%, como control de afectación mitocondrial se utilizó Naftoquinona al 1.5  $\mu\text{M}$  (Luque, 2001).

Los resultados se expresaron como el porcentaje de luminiscencia, para cada condición experimental tomada cada minuto durante 1 hora. El valor inicial de Luminiscencia se asumió como el 100%, valor que normalmente decrete a medida que se consume el ATP disponible.

5.2.5. *Efecto en el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )*. Para la evaluación del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) en amastigotes axénicos se siguió el método de tinción con Rhodamina 123 (Rh 123) la cual en condiciones normales debe acumularse al interior de la mitocondria (Carvalho, 2011). Los amastigotes de *L. pifanoi* se ajustaron a  $2 \times 10^7$  parásitos/mL en medio 199 y se adicionaron los compuestos individuales o en combinación a la concentración equivalente a cada  $\text{CE}_{70}$ . Los parásitos en presencia de cada compuesto o sus combinaciones se incubaron durante 1 y 4 h a 32 °C. Se utilizó como control cianuro de potasio (KCN) a 20 mM incubado durante 40 minutos, tiempo en el cual se garantizaba la viabilidad de las células durante el ensayo. Pasado este tiempo, los parásitos se lavaron dos veces con PBS, centrifugando a 13000 rpm durante 4 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL de la solución de Rh 123 a 0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Los parásitos se incubaron a 32 °C durante 10 minutos y se centrifugaron nuevamente para lavado con PBS y 1% de albúmina sérica bovina (BSA).

El pellet fue suspendido en 200  $\mu\text{L}$  de PBS y transferido a un microplato para su lectura en un lector de microplatos a 488 nm de excitación y 520 nm de emisión (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific, USA).

Para la evaluación del potencial de membrana mitocondrial en amastigotes de *L. braziliensis* obtenidos a partir de macrófagos infectados, se utilizó una modificación de la técnica de Carvalho, et al (2011) usando la sonda Tetrametilrodamina Metil Ester (TMRM) en lugar de Rh 123. Aquí, luego de 72h de infección de macrófagos U937 con promastigotes de *L. braziliensis*, se liberaron los amastigotes utilizando el embolo de una jeringa. El lisado de células se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos; se tomó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente 10 minutos 4000 rpm. Los amastigotes obtenidos se ajustaron  $4 \times 10^6$  parásitos/mL en medio RPMI-1640 libre de rojo de fenol, pH 5.5 y suplementado con FBS al 10%. En cada pozo de un microplato de 96 pozos se dispensaron 100  $\mu$ L de la suspensión de parásitos seguido de la adición de 100  $\mu$ L de cada compuesto o mezcla de compuestos a una concentración equivalente a la  $CE_{90}$ . Los platos se incubaron durante 1 o 4 h. Como control se utilizó NaCN a 20 mM durante 30 minutos. Luego, se adicionaron 100 $\mu$ L de sonda a una concentración de 100  $\mu$ M, incubando a 34 °C durante 20 minutos. Los platos se centrifugaron a 3500 rpm durante 8 minutos y se re suspendieron en 100  $\mu$ L de PBS, luego se transfirieron a un plato oscuro de 96 pozos y se realizó lectura de la fluorescencia en el lector de microplatos a una longitud de excitación de 548 nm y 573 nm de emisión.

Los resultados son expresados como las unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF) para cada condición experimental, y fueron comparadas con los controles; amastigotes sin tinción, amastigotes en medio de mantenimiento estándar, amastigotes sometidos a los agentes destabilizantes del  $\Delta\Psi_m$ , KCN y NaCN para *L. pifanio* y *L. braziliensis* respectivamente.

*5.2.6. Efecto en el estrés celular.* Se determinó según la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la formación de cuerpos lipídicos. La generación de ROS en amastigotes axénicos de *L. pifanoi* y amastigotes intracelulares de *L. braziliensis* liberados por acción mecánica se midió por fluorescencia utilizando la sonda 2'7'dihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCF-DA) (Carvalho, 2011). Los parásitos se ajustaron a  $1 \times 10^7$  células/mL en medio M199 o RPMI sin rojo de fenol pH 5.5 con 10% FBS, para amastigotes de *L. pifanoi* y *L. braziliensis*, respetivamente. Los parásitos se incubaron a 32°C en presencia de los diferentes compuestos y mezclas a sus respectivas  $CE_{90}$ , durante 1 o 4 h. Luego de un

lavado por centrifugación con PBS, los parásitos se resuspendieron en 100  $\mu$ L de la sonda H<sub>2</sub>DCF-DA (0.2  $\mu$ g/mL de solución de Hanks) y transferidos a microplatos oscuros de 96 pozos, e incubados 1h a 32°C protegidos de la luz. La diclorofluoresceína resultante de la oxidación de la H<sub>2</sub>DCF-DA por ROS en *L. pifanoi* se cuantificó en el lector de microplacas (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific, USA) a una longitud de onda de 495 nm de excitación y 527 nm de emisión. En *L. braziliensis* la cuantificación de la diclorofluoresceína resultante de la oxidación de la H<sub>2</sub>DCF-DA por ROS se realizó en el citómetro de flujo (LSR Fortesa, BD Biosciences, USA), según la intensidad media de fluorescencia (IMF). Como control positivo se utilizó antimicina a 0.3 $\mu$ g/mL para los ensayos con *L. pifanoi* y rotenona a 50 $\mu$ g/mL para los ensayos con *L. braziliensis*.

Por su parte, la formación de cuerpos lipídicos se determinó en amastigotes axénicos de *L. pifanoi* y amastigotes intracelulares de *L. braziliensis* liberados mediante acción mecánica, siguiendo la metodología descrita por Godinho, et al (2013) y tinción con Rojo de Nilo. Los amastigotes de *L. pifanoi* se ajustaron a  $2 \times 10^7$  parásitos/mL en medio 199 con 10% de FBS, mientras que los amastigotes de *L. braziliensis* se ajustaron a  $4 \times 10^6$  parásitos/mL en medio RPMI-1640 libre de rojo de fenol, pH 5.5 y suplementado con FBS al 10%. Luego, 100  $\mu$ L de la suspensión de parásitos se dispensaron en cada pozo de un microplato y luego se adicionaron 100  $\mu$ L cada compuesto individual o sus combinaciones a una concentración equivalente a la CE<sub>90</sub>. Los platos se incubaron durante 24 h a 34 °C. Terminada la incubación se hizo recuento de los parásitos y se ajustaron la concentración de  $1 \times 10^7$  amastigote/ mL para *L. pifanoi*, y  $3 \times 10^6$  amastigotes/mL de *L. braziliensis*. La tinción se realizó con 10  $\mu$ g/mL de rojo de Nilo durante 20 minutos a 34 °C; luego los parásitos se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos. El pellet se resuspendió en 200  $\mu$ L de PBS. La lectura se hizo en un lector de microplatos (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific, USA) a una longitud de excitación de 485 nm y de emisión de 538nm.

Los resultados se expresaron como las UAF para cada una de las condiciones experimentales evaluadas, utilizando siempre un control sin tinción, el control de parásitos sin exposición a ningún compuesto y el medicamento control Antimicina A o Rotenona para *L. pifanoi* y *L. braziliensis* respectivamente en la inducción de ROS. Para el caso de cuerpos lipídicos, no se usó un medicamento que indujese este efecto sino que se usó el

control basal de cuerpos lipídicos para determinar si los tratamientos aumentaban la aparición de esta estructura celular.

Los resultados en ROS, fueron expresados como el Índice de producción, valor que se obtiene de dividir la Fluorescencia basal de los parásitos sin compuesto (UAF control) entre las UAF de cada condición experimental a 1 y 4 horas. Valor que representa cuantas veces más con respecto al valor basal se producen especies reactivas del oxígeno consecuencia del tratamiento.

*5.2.7. Efecto sobre proteasas de Leishmania spp.* Promastigotes de *L. mexicana* y *L. braziliensis* ajustados  $2.5 \times 10^6$  parásitos/ mL de medio de Scheneider al 10% de FBS, se incubaron durante 2 h a 26 °C, en presencia de cada compuesto individual, a la concentración equivalente a la  $CE_{90}$  determinada para promastigotes. Los parásitos se lavaron cuatro veces con PBS centrifugando cada vez 10 minutos a 4,000 rpm y a 4 °C. El pellet se concentró a  $3 \times 10^8$  promastigotes y se adicionaron 200  $\mu$ L de agua ultra pura. La ruptura de membranas se hizo con 10 ciclos de sonicación de 5 minutos cada uno, con intervalos de 1 minuto entre ciclo y ciclo, usando ultrasonido (Branson 2510, Marshall Scientific, USA) bajo estrictas condiciones de frio. Luego de confirmarse la lisis total de los parásitos mediante observación al microscopio convencional, el lisado se centrifugó a 15,000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Se cuantificaron las proteínas por el método del ácido bicinonínico utilizando como proteína estándar BSA (Albumina de suero bovino, BSA por sus siglas en ingles), con la cual se creó la curva de cuantificación en  $\mu$ g/ $\mu$ L de proteína proporcional a la absorbancia obtenida a 595 nm en un lector de microplatos (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific, USA). Los lisados totales fueron almacenados a -80°C hasta su uso.

El estudio zimográfico se realizó de acuerdo con la metodología propuesta por Cuervo et al. (2006), con algunas modificaciones. Las proteínas de *Leishmania* (90  $\mu$ g) en 60  $\mu$ L de buffer de muestra (100mM TRIS-HCL pH8.0, 150mM NaCl, 10% Glicerol, 0.6% triton X 100, y una pizca azul de bromofenol), se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Luego, 20  $\mu$ L del buffer (conteniendo 30  $\mu$ g de proteína) se corrieron en SDS-PAGE al 10% copolimerizado con gelatina al 0.1% durante 105 minutos a 120V constantes. Luego de la electroforesis, los geles se lavaron 2 veces con 0.1M acetato de sodio pH 5.5 al 2.5%



de Triton X100, durante 30 minutos a 4 °C. Luego, los geles se lavaron cuatro veces con agua destilada para retirar los residuos de detergente. Los geles se colocaron en buffer de reacción [0.1M acetato de sodio, 1mM DTT a pH 5.5], a 37°C durante 24 h, para permitir la actividad proteasa. Por último, los geles se colorearon con azul de Coomassie a temperatura ambiente, durante 20 minutos. La actividad proteasas se evidenció como bandas no coloreadas en el gel debido a la degradación de la gelatina, la interpretación de los datos es de carácter cualitativo, al evidenciar la presencia o no de la degradación de la gelatina.

Para identificar el tipo de proteasa activa, se realizó el mismo procedimiento descrito previamente en presencia de dos inhibidores de proteasas de cisteína: Leupeptina y Trans-epoxisuccinil-L-leucilamido- (4-guanidino) butano, E-64. Para esto, luego del lavado de los geles, se incubaron en el buffer de reacción conteniendo 25 µM de Leupeptina o 10 µM de E-64 durante 4 y 2 h respectivamente, a 37°C. Se lavaron nuevamente los geles como previamente se describió y se incubaron de nuevo en el buffer de reacción durante 24 h a 37 °C. Finalmente, se hizo la tinción con Coomassie y se visualizaron los geles en busca de la inhibición de la degradación de la gelatina causada por la correspondiente familia de proteasas.

*5.2.8. Actividad inhibitoria sobre Captepsina B.* Promastigotes de *L. donovani* y *L. braziliensis* en fase exponencial de crecimiento se lavaron dos veces con PBS y centrifugaron 10 minutos a 3000 rpm (Sorvall RT6000 centrifuge) y se resuspendieron en 100mL de medio 199 al 10% SFB a una concentración de  $1 \times 10^6$  parásitos/mL. Cada cultivo se incubó con TC1, TC2 o SS a 50µg/mL durante 2 h a 25°C. Como control se usaron parásitos en medio con la misma cantidad de DMSO usada para ajustar los tratamientos.

Para la preparación de los lisados, los parásitos fueron concentrados y lavados con PBS y resuspendidos en una proporción de  $5 \times 10^8$  parásitos por cada 300µL de buffer de lisis (20 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0, 4 mM NaCl). Luego en estrictas condiciones de frío, se sonicaron en 3 ciclos de 30 segundos a 45mv y centrifugaron a 13 000 rpm por 20 minutos para retirar el debridado celular. La cantidad de proteínas se cuantificó con el método del ácido bicinonónico usando Pierce BCA Protein Assay kit, realizando una curva para determinar la cantidad de proteína presente por µL de muestra.

La actividad enzimática de los lisados fue determinada con el sustrato fluorogénico Z-Phe-Arg-amidometilcoumarina (AMC) previamente descrita por Somanna A, (2002). Brevemente, en plato de 96 pozos se depositaron 2 µg del lisado por pozo (concentración final 0.01 µg/µL de proteína) se incubaron con 40 µM del sustrato Z-Phe-Arg-AMC en buffer de ensayo (100 mM acetato de sodio, pH 5.5, 10 mM dithiothreitol, 0.1 % Triton X-100, 1 mM EDTA and 0.5 % DMSO; pH at 6.0) a 37°C por 10 minutos.

La actividad enzimática específica de Catepsina B fue medida adicionando el inhibidor específico CA074 (L-3-trans-(propilcarbamoil)-oxirano-2-carbonil)-L-isoleucil-L-prolina). La fluorescencia emitida producto de la actividad proteolítica de Z-Phe-Arg-AMC fue determinada en un lector de ELISA cada 5 minutos durante 30 minutos a 355 nm de excitación y 460nm de emisión.

Los valores se expresaron como las UAF, las cuales se transformaron a % de Fluorescencia con respecto a la cantidad de fluorescencia emitida por la actividad enzimática de captepsina B, en los extractos de parásitos sin tratamiento que determinaban el corte del 100%, de aquí sale el dato de la inhibición en la actividad enzimática en cada condición experimental.

*5.2.9. Efecto en la capacidad de reinfección.* Para determinar el efecto de los compuestos individuales o sus combinaciones en la capacidad infectiva de los amastigotes sometidos a cada tratamiento, en cajas de petri P100 se fijaron con PMA  $5 \times 10^6$  células U937 y se infectaron con promastigotes de *L. braziliensis*-EGFP, siguiendo el protocolo descrito previamente. Luego de 72 h, las células infectadas se trataron con cada compuesto o sus combinaciones a la concentración correspondiente a la  $CE_{70}$ . Después de 24 h de exposición a los compuestos, se lavaron las células con PBS y se liberaron los amastigotes mediante acción mecánica con el embolo de una jeringa de tuberculina. El lisado de células se lavó con PBS y centrifugaron a 400 rpm durante 8 minutos, para eliminar las células intactas. Se tomo el sobrenadante y se ajustaron los amastigotes a  $2,25 \times 10^6$  amastigotes/mL en medio RPMI-1640 con 10% de SFB. Cuatrocientos µL de esta suspensión se adicionaron en cada pozo de un plato de 24 pozos conteniendo 100.000 macrófagos U937 previamente diferenciados con PMA, para obtener una proporción de parásitos por célula de 3:1. Las células se expusieron a los amastigotes pre-tratados y

liberados durante 24 h con incubación a 34 °C, 5% de CO<sub>2</sub>. Luego, cada pozo se lavó con PBS para eliminar los parásitos no internalizados y los detritos celulares, y se reemplazó el medio con RPMI-1640 fresco con 10% SFB. Los platos se incubaron durante 96 h a 34 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y pasado este tiempo se desprendieron las células y se evaluó el número de células infectadas, así como también la cantidad de parásitos en las células infectadas según la IMF (Intensidad media de fluorescencia) por citometría de flujo (Cytomics FC 500MPL, Brea, CA), como se describió previamente.

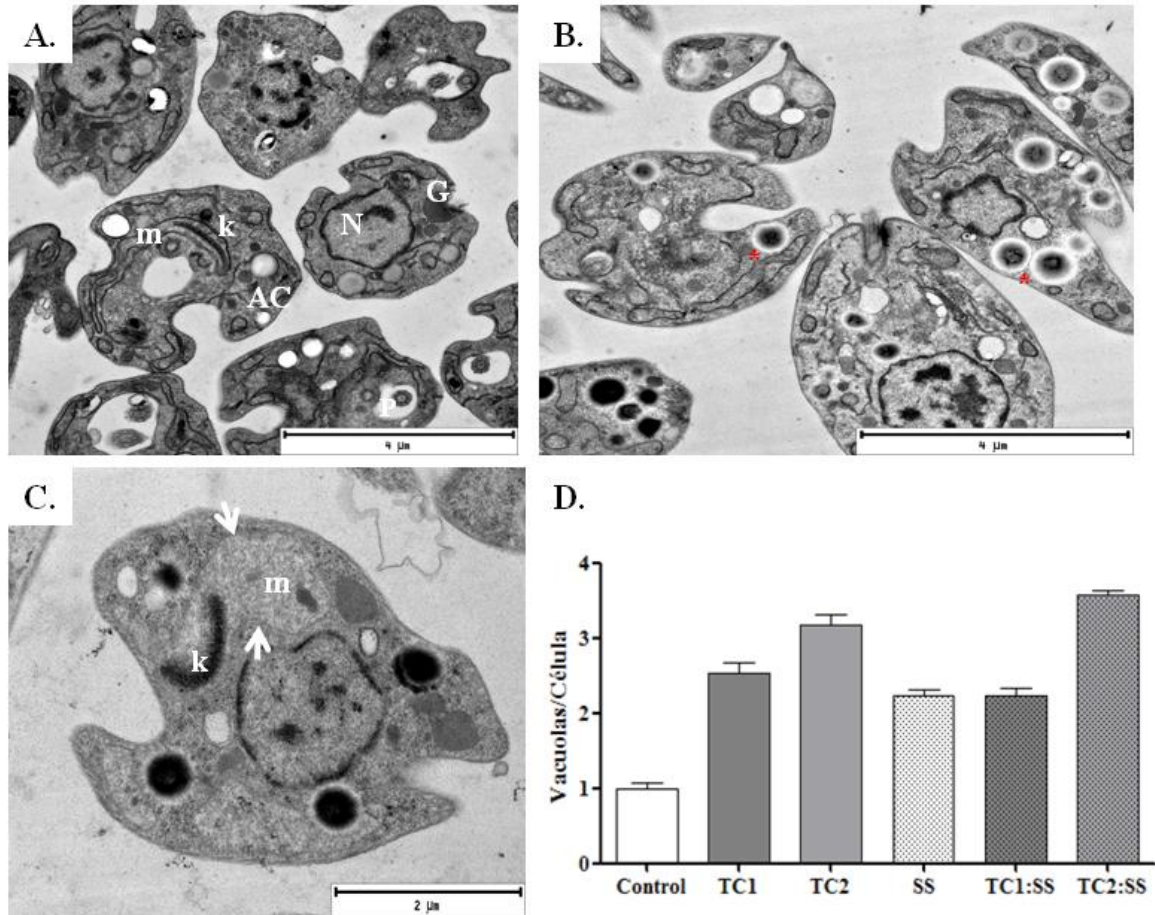
*5.2.10 Análisis de los datos.* Cada ensayo se realizó por triplicado en al menos dos experimentos independientes. Los datos se expresan como el valor promedio +/- la DS. Para el análisis de los datos se realizaron comparaciones entre grupos utilizando Anova de dos vías, así como también la prueba de Bonferroni para realizar las comparaciones entre grupos de datos paramétricos o de Kruskal Wallis para datos no paramétricos. Se consideraron significativas las diferencias con un valor  $p < 0.05$ .

### **5.3 Resultados**

En el presente trabajo, se realizó la exploración al modo de acción considerando solo las afectaciones causadas directamente sobre el parásito, en diferentes estadios de desarrollo al ser sometidos a la acción de las moléculas solas o en combinación

*5.3.1. Efecto en la morfología de Leishmania.* El análisis TEM de los amastigotes axénicos mostró tres hallazgos importantes:

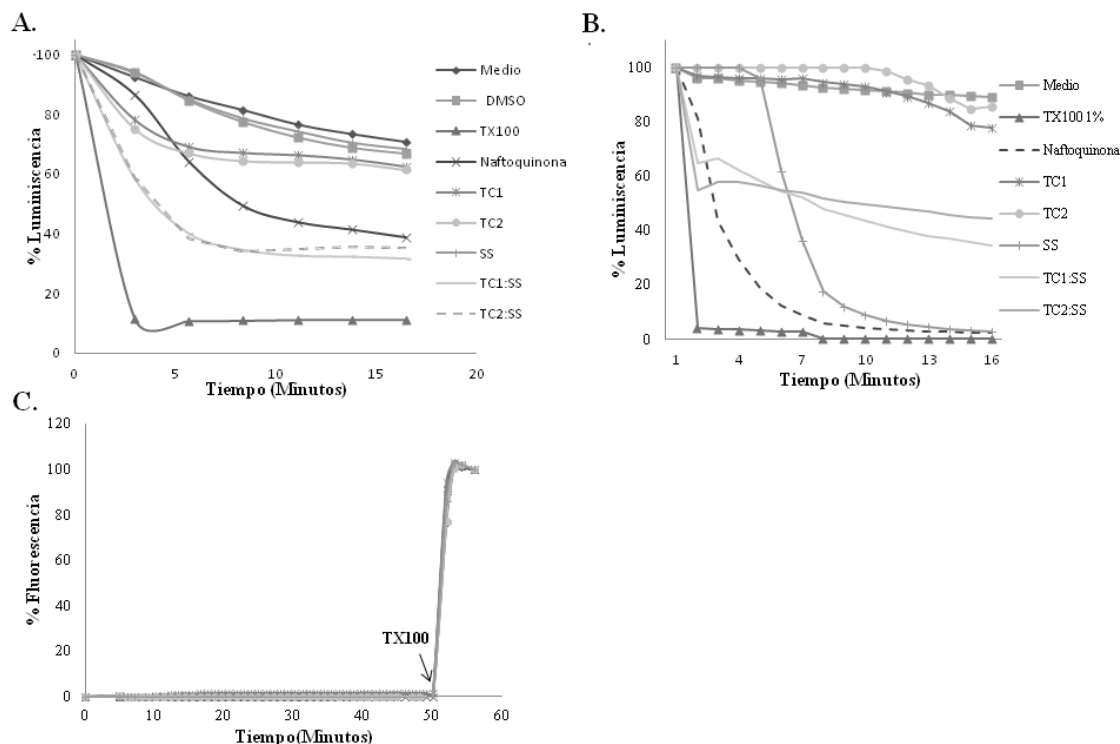
- i) Los compuestos, modificaron la morfología de los amastigotes, especialmente SS, que produjo además un aumento en el tamaño del parásito,
- ii) Hubo un aumento en el número de vacuolas electro-densas en los parásitos tratados, y,
- iii) se confirmó estructuralmente la afectación de la mitocondria causada por SS, evidenciada como un hinchamiento de su membrana (Figura 5).



**Figura 5. Microscopía electrónica de transmisión de amastigotes axénicos de *L. pifanoi*.** Las fotografías muestran parásitos luego de 24 h. A. amastigotes sin tratamiento, B: tratados con TC1. C: Tratados con SS. D: Gráfico de barras de la proporción vacuolas por célula. Los asteriscos muestran estructuras electrodensas compatibles con cuerpos lipídicos, las flechas muestran el hinchamiento de la mitocondria. m: mitocondria, k: kinetoplasto, G: glicosoma, N: Núcleo, AC: ácido calcisoma.

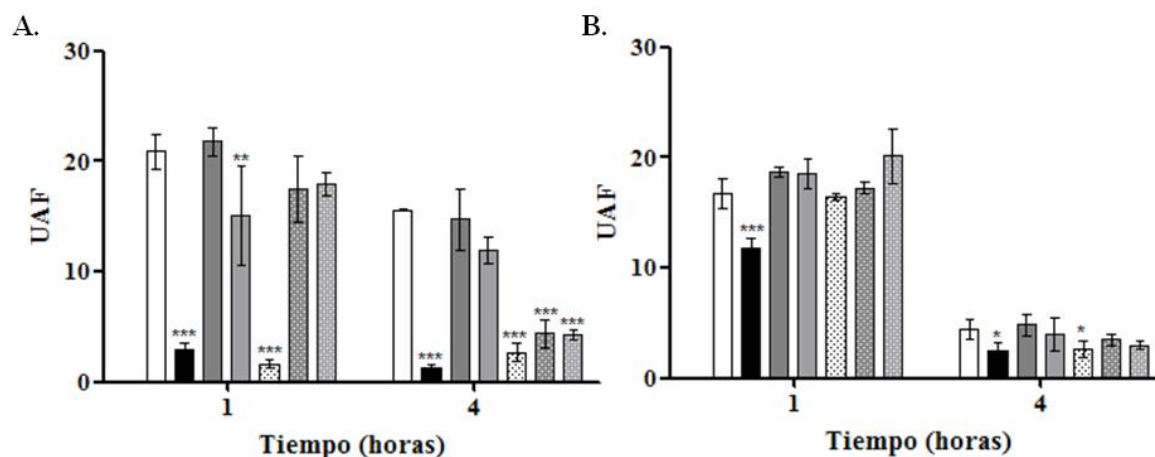
5.3.2. *Efecto sobre el metabolismo energético.* En *L. donovani* los compuestos produjeron una disminución rápida en los niveles de ATP, de alrededor de un 30%, en los parásitos expuestos a TC1 y TC2 y del 60% con las combinaciones con SS (Figura 6A). Por su parte, en *L. braziliensis*, SS mostró un fuerte efecto depletando el parásito de ATP a un nivel comparable con la naftoquinona, medicamento usado como control de afectación mitocondrial, mientras que las mezclas redujeron los niveles de ATP entre un 30-40% aproximadamente, por su parte TC1 y TC2 no mostraron efecto en los niveles de ATP en *L.*

*brazileinsis* (Figura 6B). Para determinar el posible origen de esa disminución, se evaluó la integridad de la membrana plasmática, sin encontrar efectos significativos sobre la misma en ninguna de las especies de *Leishmania* evaluadas (Figura 6C). Por otro lado, se encontró que la adición de compuestos produjo una alteración del potencial electroquímico mitocondrial evidenciado por la disminución de la acumulación intracelular de rodamina 123.



**Figura 6. Metabolismo energético en *Leishmania* tras la exposición a las hidrazonas derivadas de cromano TC1, TC2 y la mezcla de saponinas SS.** Determinación de la variación de los niveles de ATP en promastigotes *L. donovani* cepa 3LUC (Panel A) y *L. braziliensis* LUC (Panel B). Bajo las condiciones del ensayo, los niveles de luminiscencia son directamente proporcionales a la concentración intracelular de ATP en el citoplasma. Panel C, ensayo de permeabilización de la membrana plasmática en amastigotes (*L. pifanoi*) y promastigotes (*L. infantum* y *L. donovani*): unidades arbitrarias de fluorescencia dependiente de la unión de la sonda SYTOX green a ácidos nucleídos como consecuencia de la formación de poros en la membrana. Los compuestos fueron probados a 50  $\mu\text{g/mL}$ .

En *L. pifanoi*, SS causó una pérdida significativa del potencial de membrana mitocondrial tras 1 h de incubación, mientras que para TC1 y TC2 este efecto únicamente se observó cuando se usaron en combinación con SS y después de 4 h de incubación (Figura 7A). Esto mismo se detectó también en amastigotes liberados de *L. braziliensis*, cuando se evaluaron por la tinción con TMRM (Figura 7B).



**Figura 7. Despolarización de la membrana mitocondrial en amastigotes.** *L. pifanoi* (Panel A) y amastigotes liberados de *L. braziliensis* (Panel B), la pérdida de la acumulación del colorante en la mitocondrial indica la alteración del potencial de membrana. De izquierda a derecha los grupos experimentales sin tinción, control (barra blanca), KCN ó NaCN (Barra negra), TC1 (Barra gris oscuro), TC2 (Barra gris clara), SS (barra punteada), TC1:SS (gris oscuro punteada), TC2:SS (Gris claro punteada). UAF: Unidades arbitrarias de fluorescencia.

5.3.3. *Efecto en el estrés celular.* Todos los tratamientos indujeron estrés oxidativo, siendo más evidente en amastigotes axénicos de *L. pifanoi*, donde con solamente 1 h de incubación los niveles de ROS aumentaron hasta 5 veces respecto al control sin tratamiento. Por su parte, los amastigotes liberados de *L. braziliensis* mostraron una respuesta más tardía y discreta, observándose que a 1 h de incubación solo el 5% de la población incrementó la producción de ROS casi el doble con relación a la producción basal, la que aumentó un poco más a las 4 h post exposición (Tabla 3), mientras que la rotenona usada como control,

logró inducir el efecto en un 87%. A 4 h post tratamiento, el porcentaje de eventos positivos para ROS fue 95.5% en parásitos expuestos a rotenona, 22.1% en expuestos a TC1, 31.4% a TC2, 20.8% expuestos a SS, 23.1% en expuestos a TC1: SS y 25.2% en parásitos expuestos a TC2:SS. En todos los tratamientos, hubo un incremento en la presencia de cuerpos lipídicos detectados por la tinción de rojo de nilo, tras 24 h de la exposición.

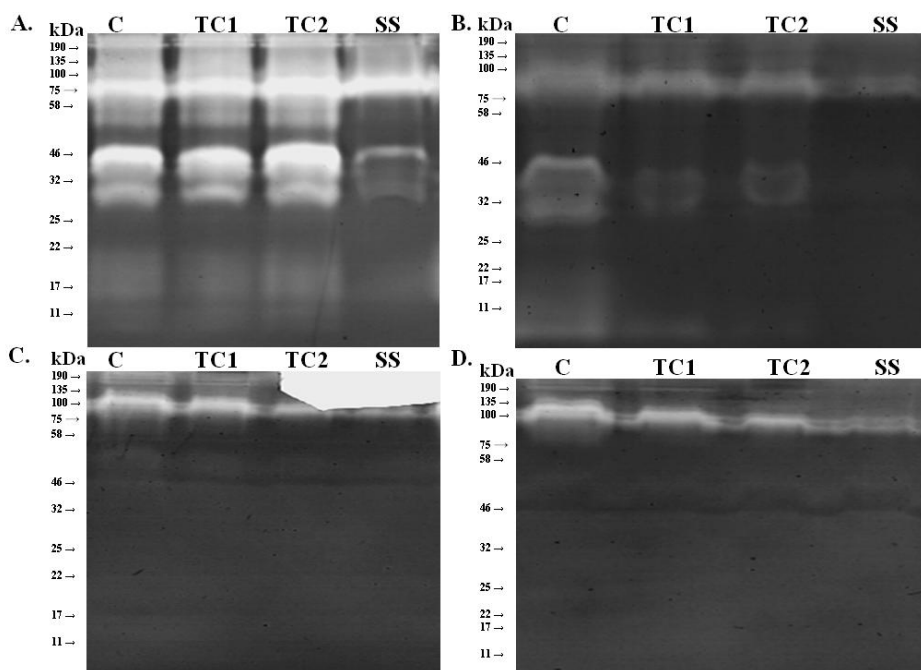
**Tabla 3. Estrés celular.**

| Compuestos | <i>L. pifanoi</i> |           |                   | <i>L. braziliensis</i> |                        |                   |
|------------|-------------------|-----------|-------------------|------------------------|------------------------|-------------------|
|            | ROS               |           | Cuerpos lipídicos | ROS                    |                        | Cuerpos lipídicos |
|            | 1 h               | 4 h       | 24 h              | 1 h                    | 4 h                    | 24 h              |
| Control    | 1,8 ± 0,4         | 0,8 ± 0,1 | NA                | 1,9 ± 0,2 <sup>a</sup> | 5,5 ± 0,5 <sup>a</sup> | NA                |
| TC1        | 5,3 ± 0,9*        | 2,0 ± 0,2 | 0,7 ± 0,02        | 1,2 ± 0,2              | 2,3 ± 0,1              | 1,3 ± 0,01        |
| TC2        | 6,9 ± 0,6*        | 2,1 ± 0,1 | 0,9 ± 0,03        | 1,1 ± 0,4              | 2,5 ± 0,5              | 1,6 ± 0,05        |
| SS         | 4,8 ± 0,5*        | 1,7 ± 0,1 | 0,8 ± 0,04        | 2,7 ± 0,6              | 1,5 ± 0,3              | 0,4 ± 0,07        |
| TC1:SS     | 6,0 ± 1,5*        | 2,1 ± 0,1 | 1,2 ± 0,02        | 0,8 ± 0,2              | 1,5 ± 0,3              | 1,0 ± 0,01        |
| TC2-SS     | 4,8 ± 0,1*        | 2,2 ± 0,3 | 1,2 ± 0,04        | 0,6 ± 0,1              | 1,7 ± 0,4              | 1,0 ± 0,07        |

La tabla muestra el índice de producción IP [relación entre el valor basal (control sin tratamiento) dividido cada tratamiento] para especies reactivas de Oxígeno (ROS) determinadas con la sonda de H<sub>2</sub>DCF-DA y cuerpos lipídicos mediante la tinción de Rojo de Nilo. Como control se uso; Antimicina A 0.3µg/mL en *L. pifanoi* y Rotenona 50µg/mL para *L. braziliensis*, incubados durante una hora. Para la tinción con Rojo de Nilo se usaron amastigotes en medio para determinar la cantidad basal de cuerpos lipídicos. \*Diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de tratamiento y el valor basal.

**5.3.4. Efecto sobre proteasas.** Luego de 2 h de exposición, la saponina SS inhibió proteasas totales de promastigotes de *L. mexicana* y *L. braziliensis*, mientras que las hidrazonas TC1 y TC2 solo mostraron efecto inhibitorio en las proteasas totales de promastigotes de *L. braziliensis*. El efecto inhibitorio se evidenció por la desaparición de una banda con un peso relativo de entre 32 a 46 kDa (Figura 8A y 8B). Toda vez que esta misma actividad se

observó para los inhibidores de proteasas de cisteína Leupeptina y E-64 (Figura 8C y 8D), los resultados sugieren que el efecto inhibitorio mostrado por SS y las hidrazonas TC1 y TC2 ocurre sobre ese mismo tipo de proteasa.



**Figura 8. Perfil zimográfico de actividad proteasa.** Actividad enzimática detectable en cada extracto de promastigotes de *L. mexicana* (A) y *L. braziliensis* (B). Extracto de promastigotes de *L. mexicana* + Inhibidor Leupeptin (C) + inhibidor E64 (D). C: Control lisado de promastigotes sin tratamiento. TC1, TC2 y SS se probaron a la CE<sub>90</sub>.

La evaluación de la inhibición de la actividad enzimática de Catepsina B, en lisados totales de promastigotes de *L. donovani* y *L. braziliensis* luego de 2 h de exposición a los tratamientos a 50µg/mL, mostró que hay un efecto sutil de todos los tratamientos sobre esta proteasa de cisteína (Tabla 4). Aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, para *L. donovani*, el mejor efecto fue causado por TC2 y SS, mientras que en *L. braziliensis* el mejor efecto lo mostró TC1, seguido de TC2 y SS con de alrededor del 20%. El compuesto control CA074 ejerció una potente acción inhibitoria sobre la proteasa



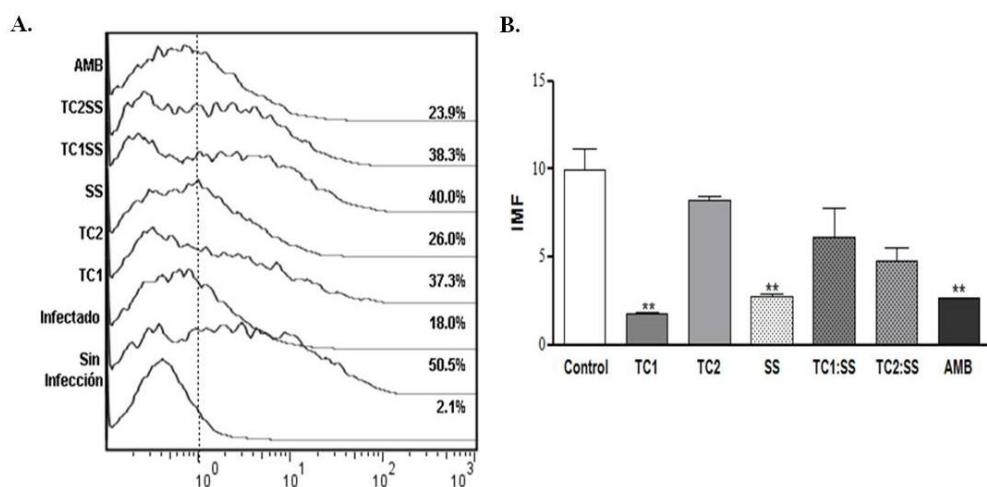
de cisteína catepsina B, indicando que la actividad observada va dirigida en parte contra esta enzima, mas no es completamente específica. Estos hallazgos se correlacionaron con la banda de inhibición observada en la zimografía realizada para *L. braziliensis* y *L. mexicana*, con una banda de inhibición alrededor de 34kDa, documentado para catepsina B (Figura 8A y 8B).

**Tabla 4. Inhibición de la actividad enzimática de Catepsina B en *L. donovani* y *L. braziliensis*.**

|              | Tiempo (minutos) |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |           |
|--------------|------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|              | 1                |           | 5         |           | 10        |           | 15        |           | 20        |           | 25        |           | 30        |           |
|              | <i>Ld</i>        | <i>Lb</i> | <i>Ld</i> | <i>Lb</i> | <i>Ld</i> | <i>Lb</i> | <i>Ld</i> | <i>Lb</i> | <i>Ld</i> | <i>Lb</i> | <i>Ld</i> | <i>Lb</i> | <i>Ld</i> | <i>Lb</i> |
| <b>TC1</b>   | 6,9±0,8          | 36,7±2,6  | 7,4±0,9   | 35,0±2,4  | 7,6±0,8   | 34,9±3,2  | 7,6±0,8   | 33,8±2,5  | 8,2±0,8   | 33,4±2,5  | 8,3±0,8   | 32,5±2,6  | 8,2±0,7   | 32,0±2,6  |
| <b>TC2</b>   | 22±9,6           | 19,1±7,0  | 19,5±7,7  | 18,6±9,4  | 18,7±7,9  | 17,5±1,1  | 18,1±7,5  | 15,3±9,9  | 18,0±7,3  | 15,0±1,2  | 17,3±7,2  | 14,2±1,2  | 16,9±6,6  | 12,9±1,3  |
| <b>SS</b>    | 19,6±0,6         | 19,4±8,3  | 18,7±1,0  | 17,6±9,8  | 17,9±0,6  | 16,0±1,0  | 16,9±0,9  | 14,1±1,1  | 16,6±0,6  | 12,7±1,2  | 15,9±0,6  | 11,4±1,3  | 15,5±1,0  | 9,7±1,4   |
| <b>CA074</b> | 91,2±0,4         | 84,6±9,9  | 75,2±2,2  | 83,4±7,9  | 74,8±2,5  | 83,2±1,4  | 74,3±2,5  | 82,5±1,3  | 74,2±2,7  | 82,0±1,3  | 73,6±2,8  | 81,5±1,5  | 73,3±2,8  | 81,1±1,7  |

Los datos representan el porcentaje de inhibición de la actividad enzimática de catepsina B, luego de 2 h de exposición a 50µg/mL de cada uno de los tratamientos. *Ld*: *Leishmania donovani*, *Lb*: *Leishmania braziliensis* CA074: Inhibidor específico de la función de Catepsina B

5.3.5. *Efecto en la capacidad de re infección de amastigotes pre-tratados.* En general la inhibición de proteasas se relacionó con una disminución en la capacidad del parásito para infectar células. Es así como la exposición de células infectadas a los compuestos durante 24 h y posterior liberación de los amastigotes para reinfectar células, causó disminución significativa de la capacidad infectiva de estos amastigotes pretratados con los compuestos de manera individual o en mezclas, especialmente para TC1 y SS. Sin embargo, el porcentaje de células infectadas en ausencia de tratamiento fue de  $47.5 \pm 4.9$  en las células tratadas con TC1 fue  $15.6\% \pm 3.4$ , con TC2  $36.7\% \pm 0.8$ , con SS  $23.1\% \pm 0.1$ , y para TC1: SS  $36.6\% \pm 4.8$  y TC2:SS  $34.1\% \pm 5.9$  (Figura 9A). Por su parte, el porcentaje de células infectadas con parásitos pretratados con anfotericina B (AMB) fue de  $23.4\% \pm 0.8$ . Al calcular los porcentajes de disminución de la reinfección se encontró que la inhibición fue de 68% para parásitos tratados con TC1, 22.7% para los tratados con TC2, 51.4% para SS, 22.9% para los tratados con TC1: SS, 28.2% para los tratados con TC2: SS y de 50.7% para parásitos expuestos a AMB.



**Figura 9. Capacidad Infectiva de amastigotes liberados pre-tratados.** A. Histograma de células infectadas con amastigotes liberados de células expuestas durante 24 h a cada uno de los tratamientos solos o en combinación. B. IMF: Índice medio de fluorescencia, representación de la carga parasitaria por célula. Cada experimento se realizó por triplicado en al menos dos experimentos independientes. \*\*  $p < 0.01$

Además, la disminución en la cantidad de células infectadas fue directamente proporcional al IMF, el cual hace referencia a la cantidad relativa de amastigotes intracelulares, así como también con la capacidad de replicación de los parásitos intracelulares en un periodo de 96 h, dado que las células infectadas con los amastigotes pretratados, mostraron 4 o 5 veces menor carga parasitaria con TC1 y SS, respectivamente (Figura 9B). Los valores de IMF obtenidos para cada tratamiento fueron  $9.9 \pm 1.2$  (células sin tratamiento),  $1.8 \pm 0.1$  (células infectadas y tratadas con TC1),  $8.3 \pm 0.2$  (células infectadas y tratadas con TC2),  $2.7 \pm 0.2$  (células infectadas y tratadas con SS),  $6.1 \pm 1.7$  (células infectadas y tratadas con TC1:SS),  $4.8 \pm 0.7$  (células infectadas y tratadas con TC2-SS) y  $2.6 \pm 0.01$  (células infectadas y tratadas con AMB). En síntesis, se observa que, en cuanto a las células infectadas, la potencia inhibidora es  $TC1 > SS > TC2$ :  $SS > TC1$ :  $SS > TC2$ . Inclusive TC1 fue más activo que AMB, y SS fue similar a este medicamento.

#### 5.4 Discusión

Esta investigación se realizó considerando no solo la diversidad de especies de *Leishmania*, sino además la disponibilidad de modelos estandarizados para el estudio de procesos específicos. Por tal razón, aunque se puso especial atención en el efecto sobre *L. braziliensis* por su importancia en nuestro contexto geográfico, se realizaron aproximaciones en otras especies, de tal manera que se determinaron los efectos en los niveles de ATP en promastigotes de *L. donovani* transfectadas con luciferasa. Posteriormente se hicieron ensayos sobre amastigotes axénicos de cultivo continuo en *L. pifanoi* puesto que es un excelente modelo para evaluar modificaciones en el estadio del amastigote, el cual es difícil de mantener en condiciones de cultivo continuo en otras especies de *Leishmania*. Además, se determinaron los efectos en proteasas usando promastigotes de *L. mexicana* como control por la alta expresión de estas enzimas.

Todos los compuestos y las mezclas afectaron procesos como la producción de ROS,  $\Delta\Psi_m$  y niveles de ATP, efectos asociados directa o indirectamente al funcionamiento de la mitocondria; organela que, en *Leishmania*, es la principal responsable del metabolismo

energético, ya que proporciona el 70% de la producción de ATP. Además, está implicada en la homeóstasis del calcio, el balance redox, la respuesta a estrés y la inducción de apoptosis (Menna, 2014). Por ello ha sido definida como diana tanto esencial como accesoria en diferentes tripanosomátidos (Sundar, 2018).

Varios tratamientos leishmanicidas actúan sobre el funcionamiento de la mitocondria. Es el caso de la pentamidina, utilizada tanto para el tratamiento de tripanosomiasis africana como para casos de leishmaniasis resistente a antimoniales pentavalentes. Esta droga induce un colapso en el potencial de membrana mitocondrial conduciendo a un desbalance en el contenido de calcio intracelular (Vercesi, 2000). En *Leishmania*, el contenido intracelular de calcio se mantiene debido a las reservas existentes entre el retículo endoplásmico, la mitocondria y los ácido-calcisomas (Docampo, 2001). La pentamidina también inhibe el complejo II de la mitocondria induciendo apoptosis (Mehta, 2004). Así mismo, la miltefosina, medicamento de segunda línea para el tratamiento de la leishmaniasis, afecta la mitocondria inhibiendo el complejo IV (citocromo C oxidasa), última enzima involucrada en el transporte de electrones (Luque, 2007). Su desestabilización conduce a la muerte del parásito, aunque afecta también el metabolismo de lípidos, ya que en tripanosomátidos la síntesis de ácidos grasos especializados ocurre en mitocondria (De Souza, 2009).

Al comparar nuestros hallazgos con estos antecedentes de afectación mitocondrial por miltefosina y pentamindina, encontramos que de los tres compuestos evaluados, la mezcla de saponinas triterpénicas SS produjo efectos funcionales en  $\Delta\Psi_m$  y niveles de ATP, así como también efectos estructurales; evidenciados como hinchamiento de la organela. Por su parte, las hidrazonas TC1 y TC2 produjeron una leve reducción de los niveles de ATP en *L. donovani*, sin alteración del  $\Delta\Psi_m$ , es decir, un efecto únicamente funcional, que podría deberse a un blanco farmacológico intramitocondrial diferente a la estabilidad de la membrana de esta organela, como la fosforilación oxidativa, la glicólisis o en el ciclo del ácido tricarbóxico, que en *Leishmania* ocurre a nivel mitocondrial (Sundar, 2018). Se descartó que este efecto fuera producto de alteraciones a nivel de la integridad de la membrana plasmática, mediante la técnica de Sytox Green y tinción con yoduro de propidio, ya que se conoce que la pérdida de los niveles de ATP, en los ensayos utilizando

los parásitos tranfectados con Luciferasa pueden ocurrir por afectación mitocondrial o por ruptura de la membrana citoplasmática lo que causa que no se detecte la señal (Luque, 2001). Otros autores han estudiado algunos derivados de hidrazonas a partir de otros núcleos estructurales, encontrándose conclusiones concordantes con nuestros hallazgos, como la acumulación de ROS en promastigotes de *L. amazonensis* y disfunción mitocondrial (Coimbra, 2018), o del núcleo cromano que se sugiere afecta directamente el complejo III mitocondrial (Monzote, 2011).

En el presente trabajo se demostró además la ocurrencia de estrés oxidativo inducido por las moléculas ensayadas, posiblemente como consecuencia del bloqueo de la cadena transportadora de electrones, que redirige los electrones de la cadena respiratoria hacia su incorporación al oxígeno y producción de especies reactivas. Dicho estrés oxidativo puede actuar como estímulo de señalización, que en concentraciones elevadas supone la inducción de apoptosis (Menna, 2014). En los resultados obtenidos, se observó que los amastigotes axénicos de *L. pifanoi* y amastigotes liberados de *L. braziliensis* después de cuatro horas de exposición a los compuestos solos o en combinación, mantienen niveles altos de ROS, sugiriendo la incapacidad del parásito para balancear nuevamente el equilibrio redox, lo que podría conducir a la muerte de este. Este mecanismo ha sido documentado en antimoniales pentavalentes, y está acompañado de pérdida del potencial de membrana mitocondrial y aumento del calcio citosólico (Sudhandiran, 2003).

Otro efecto de estrés celular detectado fue el incremento de cuerpos lipídicos lo que indica la presión que causan cada uno de los tratamientos sobre los parásitos, tanto a nivel intracelular como en cultivo axénico. Este tipo de estructuras han sido descritas como respuesta a estrés celular en tripanosomatidos posterior al uso de diferentes tipos de medicamentos (Rodrigues, 2008).

Uno de los principales efectos observados en el presente trabajo fue la afectación sobre proteasas y su asociación con el bloqueo de la infectividad de amastigotes pretratados. Se encontró que tanto TC1 como TC2 inhibieron la actividad de proteasa en promastigotes de *L. braziliensis*. Esto podría deberse a su reacción con el grupo tiol de la cisteína,

provocando la acción inhibitoria sobre proteasa de cisteína, como lo describió Romero (2017). Sorpresivamente, también se observó una fuerte actividad inhibitoria de proteasa con la mezcla de saponinas triterpénicas SS, tanto en *L. braziliensis* como *L. mexicana*. A pesar de que se ha documentado la actividad leishmanicida de saponinas, la inhibición de proteasas en *Leishmania* ha sido poco explorada. La mayoría de los estudios utilizan las saponinas como adyuvantes y no como ingrediente activo, debido a sus propiedades surfactantes, facilitando procesos de absorción. Sin embargo, algunas saponinas se han reportado como inhibidoras de metaloproteinasas en el modelo de keratinocitos humanos (oh, 2015). Algunos antecedentes experimentales sobre el modo de acción de saponinas sugieren una interacción con CPY51 e inhibición de la síntesis de ergosterol (Melo, 2016). Se sabe además que las saponinas tienen efectos desestabilizantes sobre las membranas de células, llegando incluso a causar lisis en los glóbulos rojos (Santos, 1997). A pesar de esto, en el presente trabajo no se encontraron alteraciones en la permeabilidad de membrana sobre el estadio de amastigote ni promastigotes de diferentes especies luego de exposición a la mezcla de saponinas triterpénicas aisladas de *S. saponaria*.

Las proteasas en *Leishmania* son de crucial importancia, ya que están relacionadas con procesos vitales del parásito como invasión, supervivencia dentro del macrófago y modulación de la respuesta inmune (Silva, 2014). En este trabajo se encontró que los amastigotes liberados de macrófagos infectados expuestos durante 24 h a los compuestos, pierden la capacidad de infectar macrófagos *in vitro*, y disminuyen su supervivencia al interior del macrófago, después de 96 h de infección. Este efecto es coherente con las funciones de supervivencia dentro del macrófago y la modulación de la repuesta inmune, que ha sido documentadas en general para las peptidasas en *Leishmania* (Machado, 2019).

Nosotros demostramos, además, de la disminución de la infectividad y supervivencia posterior a los tratamientos, que hubo un efecto sutil tanto de las hidrazonas derivadas de cromanos TC1 y TC2 como de SS, sobre la proteasa de cisteína catepsina B de *L. donovani* y *L. braziliensis*. Esta enzima se expresa de manera constitutiva durante el ciclo de vida del parásito, siendo crucial para la supervivencia dentro del macrófago (Somanna, 2002). Esta enzima ha sido postulada como un blanco terapéutico y un candidato a vacuna contra

*Leishmania* spp hace más de tres décadas: Estudios en *L. mexicana* demostraron que los parásitos sin esta enzima son incapaces de generar lesiones en ratones lo que se traduce en un efecto protector contra la infección (Alexander, 1998). Incluso su potencial se ha extendido a otros tripanosomatidos como *T. brucei*, ya que el efecto de RNAi contra esta enzima previene la mortalidad en animales infectados, logrando la ausencia de esplenomegalia, curación parasitológica en sangre y aumento de la expectativa de vida (Abdulla, 2008).

En síntesis, todos los resultados sugieren que TC1, TC2 y las saponinas de SS afectan diferentes blancos y procesos celulares a saber. Todos afectan el balance redox y la actividad enzimática de proteasas de cisteína en *L. braziliensis*. A pesar de que ambos tipos de moléculas tienen efecto mitocondrial, en SS es tanto funcional ( $\Delta\Psi_m$  y niveles de ATP) como estructural, mientras para TC1 y TC2 solo funcional a nivel de disminución de los niveles de ATP. Sin embargo, el resultado más importante es la pérdida de la capacidad infectiva y replicativa de amastigotes pretratados principalmente con TC1 y SS, ya que esto implica un bloqueo importante en el comportamiento del parásito que conducirá a una incapacidad para sobrevivir en la célula hospedadora. Todo esto desemboca los resultados obtenidos *in vivo* con la curación total de hámsters infectados con leishmania tratados con TC1:SS y TC2:SS, demostrando el potencial terapéutico de esta formulación.



**6. CAPITULO 3. Análisis del efecto de las hidrazonas de cromanos TC1 y TC2 y la mezcla de saponinas triterpénicas SS sobre la interacción parásito-hospedero.**

## 6.1 Introducción

Al momento de desarrollar una nueva alternativa terapéutica contra *Leishmania*, se debe tener en cuenta el nicho ecológico donde se encuentra el parásito, de tal manera que, si el medicamento tiene una acción directa, no solo debe alcanzar niveles sanguíneos o *in situ* adecuados, sino además atravesar al menos tres membranas celulares: membrana del macrófago, la del fagolisosoma y el glicocalix de *Leishmania*. Si la acción es indirecta, este debe modificar la relación que se ha establecido entre la célula hospedadora y el patógeno, ya que, al perturbarla, se puede desestabilizar procesos críticos en el parásito que conducen probablemente su muerte (McConville, 2007).

En este sentido, aunque *Leishmania* es un patógeno especializado capaz de residir en el interior del macrófago dentro de un fagolisosoma funcional, su supervivencia depende del estado de activación de la célula hospedadora, lo que determina la disponibilidad de nutrientes que puede captar el amastigote. Por ello *Leishmania* está equipado con diferentes estrategias que promueven un estado de polarización del macrófago hacia un perfil regulatorio, lo que favorece su establecimiento y proliferación celular (Arango G, 2014).

En este capítulo, se trata de determinar si la administración de los cromanos TC1, TC2 y la mezcla de saponinas SS, administradas de manera individual o en mezclas, modifican la relación establecida entre el parásito y el macrófago, y si esta puede ser la responsable de la adecuada respuesta terapéutica observada en el modelo animal: Para esto se evaluaron la viabilidad celular, cambios morfológicos, producción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, cuerpos lipídicos y estudio del metabolismo sobre el exometaboloma en células con y sin infección sometidas a las moléculas, mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas. Esta última estrategia experimental nos permitió determinar, como la adquisición de nutrientes desde el medio hacia el macrófago se modifica desde la infección con *L. amazonensis* y como este patrón cambia producto de la administración de los tratamientos.

## 6.2 Metodología.

*6.2.1 Toxicidad en células infectadas.* Se evaluó la citotoxicidad *in vitro* de los compuestos TC1, TC2 y SS solos o en combinación a proporción 1:1, siguiendo la metodología de MTT descrita en el capítulo 1. Los macrófagos U937 se infectaron con promastigotes de *L. braziliensis* procedimiento descrito en el capítulo 1. Para ello macrófagos U937 con y sin infección por *L. braziliensis* se ajustaron a  $2.5 \times 10^5$  células/mL en platos de 96 pozos y se sometieron a la acción de los compuestos a 6 diluciones base 1:2 a partir de 200 µg/mL, e incubadas a 34°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 h. Como control de toxicidad en este ensayo se utilizó anfotericina B.

*6.2.2 Cinética de la efectividad de compuestos sobre macrófagos infectados con L. braziliensis:* Se determinó la cinética de eliminación de la infección en células infectadas con *L. braziliensis* cada 24 h durante 4 días. Las células infectadas se sometieron a la acción de la CE<sub>50</sub> de los compuestos solos o en combinación, para este caso se usó una densidad de macrófagos de 300.000 células/mL depositando un mL en plato de 24 pozos. La infección se realizó en una proporción 13:1 parásitos/célula según la metodología descrita en el capítulo 1. Luego de terminado cada tiempo con el tratamiento, las células fueron removidas del pozo con trypsin/EDTA, se lavaron y suspendieron en PBS. Se analizó el porcentaje de células infectadas por citometría de flujo en Cytomics FC 500MPL, Brea, CA, a 488 nm excitación y 525 nm emisión usando láser de argón y contando 10.000 eventos.

*6.2.3 Efecto en la morfología de macrófagos infectados con L. pifanoi:* Macrófagos J774 se infectaron con amastigotes axénicos de *L. pifanoi* en una proporción 4:1 (parásito por célula) e incubados durante 4 h a 32 °C en cámara de humedad. Pasado este tiempo, se descartaron los parásitos no internalizados con cuatro lavados con PBS; luego se adicionó 1 mL de medio RPMI-1640 con 10% SBF y los platos se incubaron durante 24 h adicionales. Luego, las células se sometieron a la acción de los tratamientos por 24 h. Una vez finalizada la incubación las células se lavaron y fijaron con glutaraldehído al 3%, durante 1 hora a 4°C seguido de los pasos de hidratación y deshidratación (Luque, 2010). Las muestras fueron embebidas en Epon 812 resin y observadas en el TEM (JEOL-1230 USA Inc. MA, USA).

6.2.4 *Efecto sobre compartimientos ácidos (lisosomas-Fagolisosoma)*: para evaluar la ubicación, cantidad y pH relativo de lisosomas, se infectaron células J774 con amastigotes de *L. pifanoi*. En platos de 24 pozos, conteniendo laminillas, se sembraron 200.00 células/mL en medio DMEM al 10% de FBS. Las células se incubaron a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> durante 24 h y luego se realizó la infección y el tratamiento como se describió para los ensayos de TEM. Luego de la infección las células se lavaron con Hanks-Buffer (Hank 155mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM HEPES). Para garantizar el mantenimiento del sistema, se puso la concentración equivalente del tratamiento en la solución buffer, y con esta solución se realizaron los lavados y la tinción a 100nM de LysoTracker red durante 30 minutos, incubando a 32 °C, protegido de la luz. La lectura se realizó mediante observación al microscopio de fluorescencia (Eclipse 50i fluorescence, Nikon, Japon). Como control positivo, se utilizó nigericina a 10µM durante 10 minutos, ionóforo que permite ver la despolarización de los compartimientos ácidos intracelulares y ha sido usado en *L. donovani* (Vercesi, 2000). Para la visualización se tomó una gota del líquido que había en cada pozo y se puso en un portaobjetos. Se visualizó en el microscopio de fluorescencia, se tomaron fotos tanto en campo claro y oscuro para realizar la visualización y fusión de las imágenes.

6.2.5 *Producción de Especies reactivas de Oxígeno*. La generación de ROS se midió utilizando H<sub>2</sub>DCF-DA (2'7'dihidrofluoresceína) descrito previamente (Carvalho L, 2011), modificado para macrófagos U937 con y sin infección con *L. braziliensis* wt. El experimento se realizó en platos de 24 pozos con una densidad celular de 3 x 10<sup>5</sup> células por pozo, los tratamientos se administraron a la CE<sub>90</sub>, como control de producción de ROS se utilizó LPS (Lipopolisacarido) a 1µg/mL. Se realizó una cinética a 1, 4, 24 y 48 h pos tratamiento, pasado el tiempo de incubación se retiró el medio y se adicionaron 100µL de la solución de H<sub>2</sub>DCF-DA a 0.2 µg/mL, luego las células fueron desprendidas mecánicamente y transferidas a un plato de 96 pozos e incubadas durante 1 h a 34° o 37°C para células con y sin infección respectivamente, luego se leyó por citometría de flujo Cytomics FC

500MPL, Brea, CA, a 488 nm excitación y 525 nm emisión usando láser de argón y contando 10.000 eventos.

*6.2.6. Producción de Oxido Nítrico.* Se evaluó en macrófagos U937 con y sin infección con *L. braziliensis* wt. Se realizó en platos de 24 igual a lo usado para la detección de ROS, se administraron los tratamientos en RPMI al 10% de SFB a la CE<sub>90</sub>, como control se utilizó PMA 1µg/ml, se realizaron lecturas a 24, 48 y 72 h postratamiento. Luego de terminado el periodo de incubación, se retiró el medio y se adicionaron 200µL de la sonda DAF-FM diacetato (4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína diacetato) a 30µM en RPMI sin rojo de fenol, esto se incubó durante 1 hora a 34°C para las células infectadas o a 37°C para las células sin infectar. Luego de terminado el tiempo, las células se desprendieron con el embolo de una jeringa y se re suspendieron en un vial que contenía 500 µL de PBS al 10% SFB, se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 1800 rpm/5min, el pellet se resuspendió en 200 µL de PBS y se leyó por citometría de flujo Cytomics FC 500MPL, Brea, CA, a 488 nm excitación y 525 nm emisión usando láser de argón y contando 10.000 eventos. Se determinó el número de células positivas y el IMF.

*6.2.7. Detección de cuerpos lipídicos.* Se determinó de acuerdo con la metodología propuesta por Godinho (2013), mediante la tinción con Rojo de Nilo descrita previamente. La prueba se realizó en macrófagos U937 con y sin infección con *L. braziliensis*-wt (cepa silvestre). Obtenidos como se ha descrito anteriormente. Los tratamientos se administraron a la CE<sub>90</sub>. Se incubaron durante 24 h a 34°C o 37°C para células con y sin infección respectivamente. Terminada la incubación se desprendieron las células y se ajustaron 3x10<sup>5</sup> células/mL en 500µL de RPMI sin rojo de fenol con 10 µg/mL de Rojo de Nilo, se incubó a 34 o 37°C para células con y sin infección durante 20 minutos, se centrifugaron a 1800rpm/5min, el pellet se resuspendió en 200µL de PBS y se transfirieron a un plato de 96 pozos. La fluorescencia debida a la acumulación del colorante en los cuerpos lipídicos se leyó a 485nm de excitación y 538nm emisión en varioskanFlash.

*6.2.8 Determinación de los efectos metabólicos de las moléculas sobre el exometaboloma de macrófagos con y sin infección por L. amazonensis.* Se evaluó el exometaboloma total

de células con y sin infección con *L. amazonensis* sometidos a la CE<sub>90</sub> de los compuestos puros o en combinación, mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS (Orbitrap) [Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometer (Thermo-Fisher)]).

En plato de 24 pozos, se sembraron  $5 \times 10^5$  células U937 que se transformaron con PMA como se ha descrito previamente y se infectaron con promastigotes metacíclicos de *L. amazonensis*, estos se obtuvieron en medio M199 al 10% SFB (2.2 gr NaHCO<sub>3</sub>, 5.96 gr HEPES, 100nM Adenosina, 23nM Ácido fólico, 2mM Glutamina, 20μg/mL Penicilina/estreptomicina por litro), durante 5 días a 27°C.

La infección se realizó a una relación de trece parásitos/célula correspondiente a la concentración infectiva 70 (CI<sub>70</sub>) en RPMI sin SFB durante 6 h a 34°C, 5% CO<sub>2</sub>. Luego se lavó 3 veces con PBS a 34°C para eliminar los parásitos no internalizados. Se adicionó 1mL de RPMI al 10% SFB y se incubó durante 24 h. Se administraron los tratamientos a la CE<sub>70</sub> y se mantuvieron las mismas condiciones. Se tomó muestra de sobrenadante a las 24, 48 y 72 h postratamiento para cada compuesto solo o en combinación por triplicado en al menos 3 experimentos independientes. En cada tiempo se tomaron 200 μL del sobrenadante en un vial de 1.5mL, inmediatamente la muestra se sumergió por 20 segundos en un baño de etanol/agua a 0°C, para frenar el metabolismo. Luego en estrictas condiciones de frío (2-4°C) se centrifugó a 3000rpm/ 5 minutos, para eliminar detritos celulares y parásitos extracelular. 80μL del sobrenadante se mezclaron con 240μL de una solución al 75% de MeOH, los detritos producto del proceso de extracción se eliminaron con centrifugación a 12.000rpm/5min a 4°C. Se tomo el sobrenadante y se almacenó hasta su análisis a -80°C.

El análisis de metabolitos se realizó utilizando una columna Synchronis HILIC (longitud: 100mm, diámetro 2.1mm, tamaño de partícula 1.7μm). La elución se llevó a cabo con un gradiente (A) 20mM formato de amonio pH 3 en agua y (B) ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo y flujo de 600μL/minuto. La elución de la columna comenzó con un 100% del disolvente B. En un intervalo de 2 minutos. Luego este se redujo a un 80% y se mantuvo

durante 5 minutos, seguido de un aumento del solvente A hasta el 95% en 3 minutos y sostenido 2 minutos, luego de esto el sistema retornó a las condiciones iniciales del solvente por 3 minutos. Además fueron analizadas por UHPLC/MS en una columna HILIC en modo negativo durante 15 minutos en el espectrómetro de masas Q Exactive™ HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ Mass Spectrometer. Con un rango de masas de 50-750 m/z, la exactitud del ensayo fue de 1ppm.

6.2.9. *Análisis de datos.* Cada ensayo se realizó por triplicado en al menos dos experimentos independientes. Los datos se expresan como el valor promedio +/- la DS. Para el análisis de los datos se realizaron comparaciones entre grupos utilizando Anova de dos vías, así como también el test de Bonferroni para realizar las comparaciones entre grupos de datos paramétricos o de Kruskal Wallis para datos no paramétricos. Se consideraron significativas las diferencias con un valor  $p < 0.05$ .

En el análisis de la cinética de muerte mediante citometría de flujo, se evaluaron los eventos con tamaño y granularidad ajustada para las células U937 y señal FL1-positivos (Células infectadas con *L.braziliensis* GFP), para cada condición experimental. Se asumió el 100% de infección como la cantidad de FL1+ en el control y se realizó una regla de tres para determinar la inhibición de la cantidad de células infectadas en cada grupo de tratamiento para cada tiempo de evaluación. Los resultados se expresan como el % de células infectadas  $\pm$  DS.

Para el análisis TEM y la tinción con lysotracker red, las imágenes fueron procesadas en el software imageJ y se realizaron comparaciones con relación al control de células infectadas. En el caso de la tinción de los lisosomas, se realizó una aproximación cuantitativa, al delimitar el perímetro de 200 células en campo claro y determinar las UAF (Unidades Arbitrarias de fluorescencia) por célula en campo oscuro, valores que fueron expresados como UAF  $\pm$  DS.

Para el análisis de ROS y ON, se tomaron los eventos FL-1 Positivos (Fluorescencia positiva), por la hidrólisis de la sonda para detectar especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, y la IMF (Intensidad media de fluorescencia), parámetro que indica la cantidad de ROS o ON relativo por cada célula, con este último parámetro se calculó el índice de

producción IP [relación entre el valor basal (control sin tratamiento) dividido cada tratamiento], para determinar cuantas veces mas los tratamientos inducen la producción de estas especies reactivas.

Los datos obtenidos de las corridas de espectrometría de masas fueron transformados al formato mzXML para ser analizados en el software EI-MAVEN 2018 usando una lista de metabolitos conocidos para el análisis target (Análisis dirigido a metabolitos conocidos), tal lista fue obtenida por el laboratorio del Dr. Ian Lewis mediante la adquisición de estándares comerciales y corridos en el equipo Orbitrap mediante el mismo método. Luego de realizar manualmente la selección de los metabolitos donde las intensidades superaran una señal de  $1 \times 10^3$  (valor de intensidad de la señal de iones que se considera ruido instrumental), se obtuvo la matriz de datos en el formato CSV.file y este se analizó en el software online de acceso libre MetaboAnalyst, los datos se normalizaron de acuerdo a la intensidad media de la señal de iones de cada metabolito, seguido de su transformación logarítmica, se realizó análisis de fold change y t-test para muestras pareadas o Anova para análisis por grupos, también el análisis de componentes principales, estrategia del análisis multivariado que permite explicar la variación entre grupos experimentales a partir de una gran cantidad de datos.

### **6.3 Resultados**

En el presente trabajo, el abordaje al modo de acción se realizó teniendo en cuenta la participación del macrófago en el desarrollo del parásito en el hospedero vertebrado (intracelular). Esta aproximación es más adecuada, aunque mas compleja tanto experimentalmente como al momento de analizar, en comparación a los ensayos donde se aísla el parásito. Así mismo, trabajar con estos sistemas complejos (Macrófago infectado) se acerca mas a la realidad de una terapia, la cual puede mostrar eficacia por acción directa o indirecta sobre el parásito, ya que si alteramos el nicho ecológico del parásito al modificarse la relación que se establece entre la célula hospedadora y el patógeno, esto puede conducir también a la eliminación del parásito, al potenciar la capacidad microbicida del macrófago.



Adicionalmente, se dispuso de un modelo para análisis metabolómico con *L. amazonensis*, en el cual se exploraron las alteraciones metabólicas como consecuencia de la infección y el tratamiento con las hidrazonas derivadas de cromanos TC1 y TC2 y la saponina triterpénica SS. Estudio que se realizó en el exometaboloma, o sea a nivel extracelular, el cual nos habla de los metabolitos que son captados por la célula para la realización de sus procesos vitales, como también de los productos de transformación que son excretados al medio ya sea por ser desechos o moléculas de señalización que permiten remodelar el espacio extracelular favoreciendo o no la eliminación del parásito.

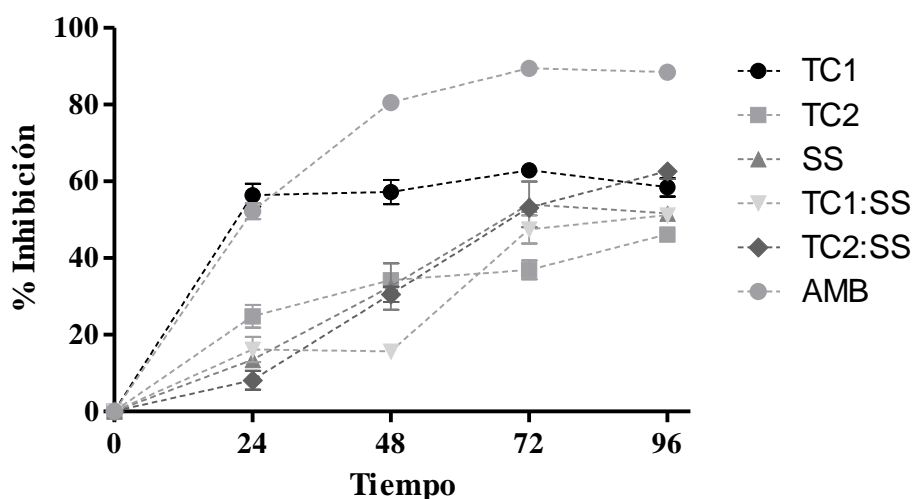
*6.3.1 Citotoxicidad en células infectadas.* Se encontró actividad diferencial entre los macrófagos U937 con y sin infección por *L. braziliensis*. Al someter a los tratamientos las células sin infección no se detectó ningún efecto tóxico, mientras que en las células infectadas se observó una citotoxicidad moderada, excepto para TC2, en el cual no hubo citotoxicidad (Tabla 5).

**Tabla 5. Citotoxicidad de los compuestos sobre monocitos y macrófagos.**

| Compuesto | CL <sub>50</sub> µg/mL |                               |                            |
|-----------|------------------------|-------------------------------|----------------------------|
|           | Monocitos U937         | Macrófagos U937 Sin infección | Macrófagos U937 Infectados |
| TC1       | 88,1±3,6               | >200                          | 154,9 ± 5,5                |
| TC2       | 85,1±3,7               | >200                          | >200                       |
| SS        | 63,5±1,2               | >200                          | 64,3 ± 8,9                 |
| TC1:SS    | 70,4±1,8               | >200                          | 65,6 ± 10,1                |
| TC2:SS    | 99,7±1,9               | >200                          | 114,3 ± 5,5                |
| AMB       | 28,8±1,2               | >200                          | 159,8 ± 11,1               |

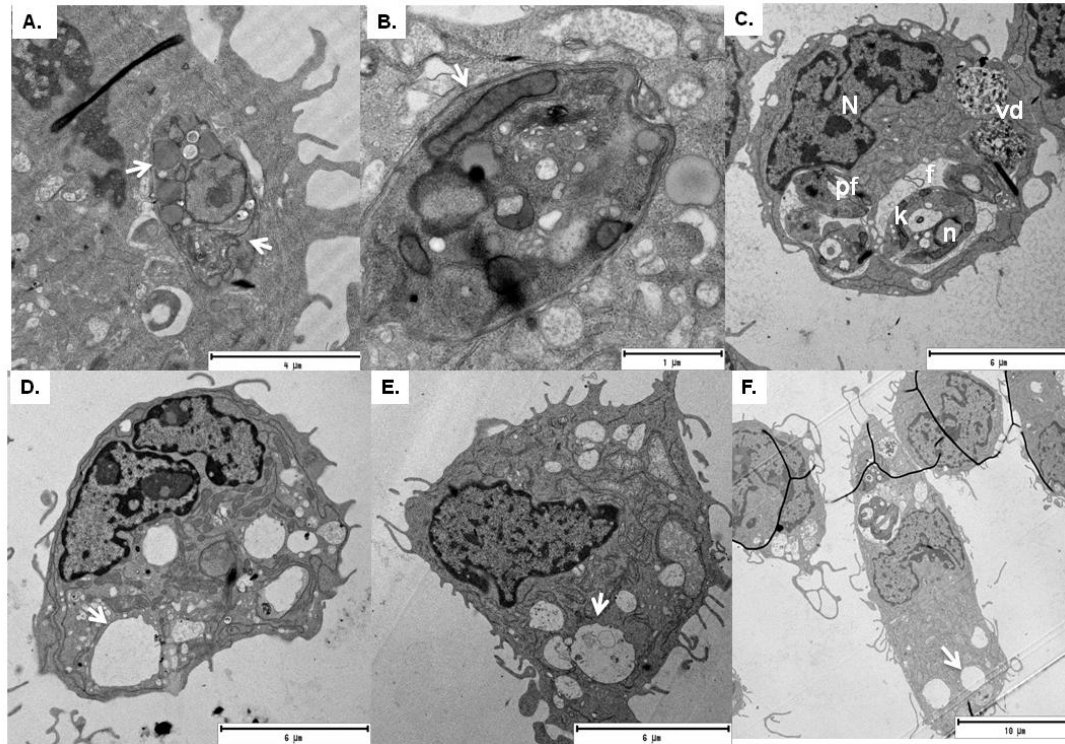
Los datos muestran la CL<sub>50</sub> ± DS para cada tratamiento. Los macrófagos fueron obtenidos tras la activación con PMA e infectados con *L. braziliensis*. AMB: Anfotericina B.

6.3.2. *Cinética de la efectividad de compuestos sobre macrófagos infectados con L. braziliensis.* Para TC1, el efecto de inhibición del 50% de la infección se logró a las 24 h, para los demás tratamientos el efecto fue gradual, alcanzándose un valor similar sólo a las 72 h (Figura 10).



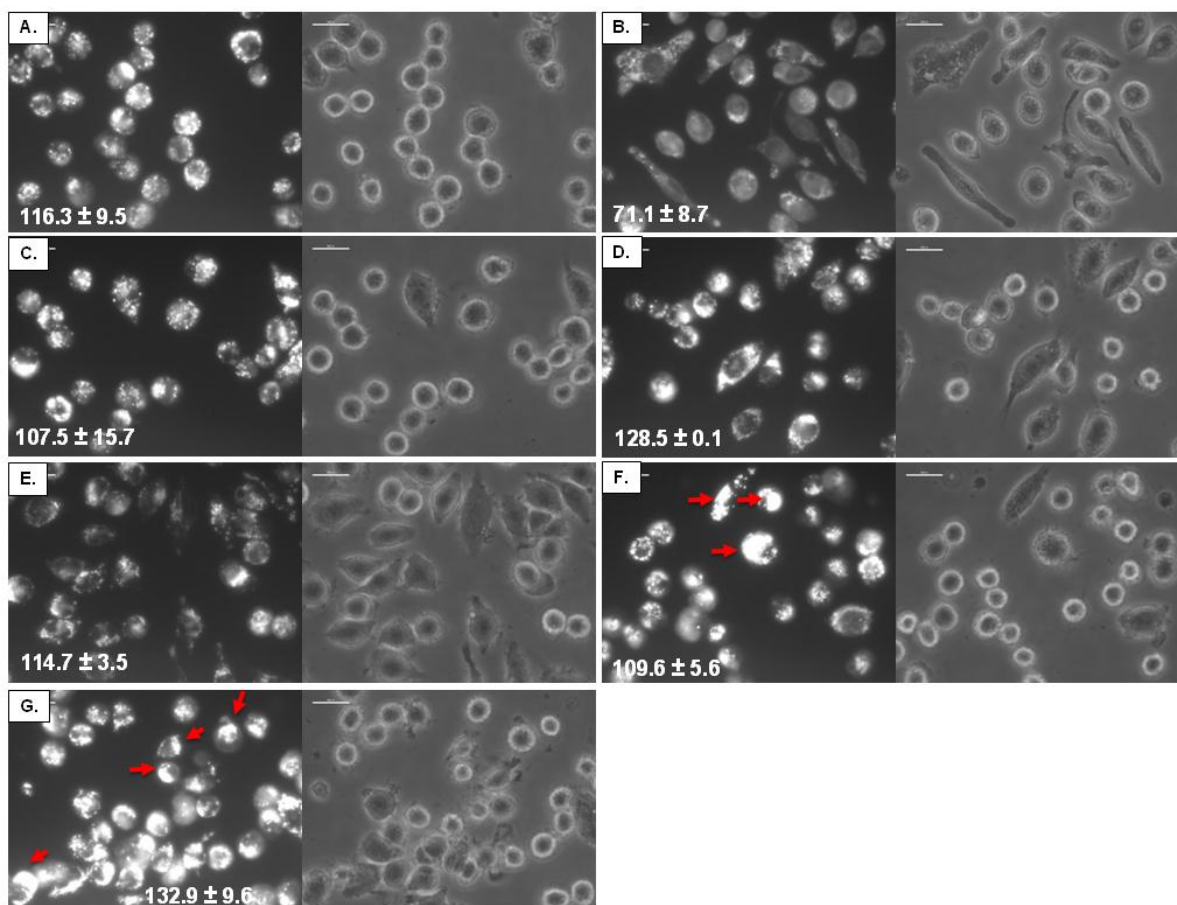
**Figura 10. Cinética de efectividad de las moléculas sobre amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*.** La gráfica muestra el porcentaje de inhibición de la infección en cada periodo de tiempo para cada tratamiento a la  $CE_{50}$ . AMB: Anfotericina B.

6.3.3. *Cambios morfológicos en macrófagos con L. pifanoi.* Los macrófagos infectados tratados con TC1 y TC2 durante 24 h, mostraron un aumento del tamaño y alargamiento celular, junto a la aparición de mayor número de vacuolas de degradación en comparación a los macrófagos infectados sin tratamiento. El principal cambio morfológico observado fue la disminución del tamaño del fagolisosoma (Figura 11A y 11B) y la pérdida aparente de su contenido en comparación con el control sin tratamiento (Figura 11C). En los parásitos se observaron abundantes glicosomas observados como estructuras electro-densas. Para el tratamiento con SS, se observaron abundantes vacuolas vacías (Figura 11D); para el caso de las combinaciones TC1: SS y TC2: SS, se detectó una reducción de la carga parasitaria, con un alargamiento celular importante y abundantes vacuolas vacías en comparación al control de macrófagos infectados sin tratamiento (Figura 11E y 11F).



**Figura 11. Microscopia electrónica de transmisión de macrófagos J774 infectados con *L. pifanoi*.** (A), (B). TC1 y TC2; pérdida de voluminosidad del fagolisosoma, abundantes vacuolas electrodensas, en comparación al control de macrófagos infectados sin tratamiento (C). (D). SS vacuolas vacías. (E). TC1: SS. F. TC2: SS. Las imágenes son representativas de lo obtenido para cada condición experimental. f: Fagolisosoma N: Núcleo Macrófago n: Núcleo *Leishmania pifanoi* k: Kinetoplasto pf: Bolsillo flagelar Vd: Vacuolas de degradación parasitaria.

6.3.4 *Efecto sobre compartimentos ácidos (lisosomas-fagolisosomas)*. No se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa entre el control de células infectadas y el control de despolarización de compartimentos ácido nigericina con los tratamientos TC1, TC2, SS y sus mezclas, no se encontraron cambios en el pH o la cantidad de compartimentos ácidos (Figura 12). Sin embargo, en comparación a los controles de células infectadas (Figura 12A) se observó un desplazamiento hacia un solo polo de la célula el cual es evidente en los grupos tratados con las combinaciones de TC1: SS y TC2: SS (Figura 12F y 12G), e incluso se encontró en el análisis de imágenes un aumento en las UAF obtenidas con la combinación TC2: SS.

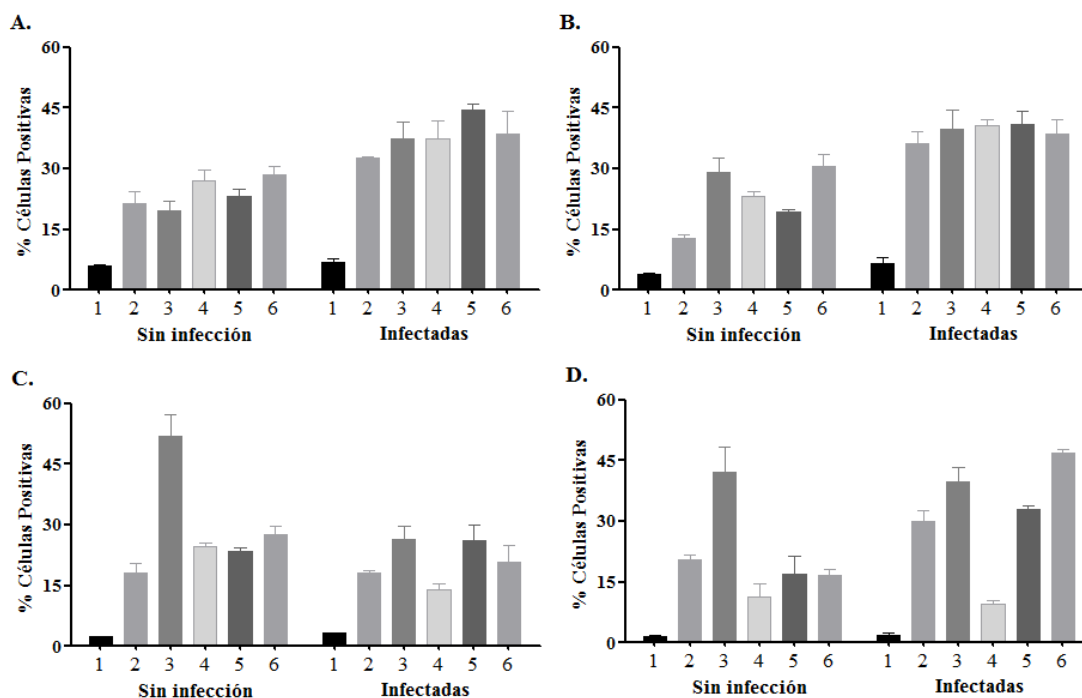


**Figura 12. Caracterización de compartimientos ácidos en macrófagos J774 infectados con *L. pifanoi* mediante la tinción con LysoTracker Red.** A. Control, B control positivo, células con Nigericina 10 $\mu$ M. C: TC1, D: TC2, E: SS, F: TC1:SS, G: TC2:SS. Las flechas rojas indican la localización polarizada de los compartimientos ácidos en la célula. Los números en la imagen corresponden a las UAF mediante el análisis en ImageJ.

### 6.3.5 Acción microbicida en macrófagos

*Producción especies reactivas del oxígeno.* Se encontró que el porcentaje de células positivas para ROS (%CellsROS+) fue mayor en las células infectadas en todos los tiempos de evaluación, excepto a las 24 h, pues en este último fue igual tanto en el control de células infectadas como no infectadas. Como control inductor de la producción de ROS se utilizó LPS y su efecto solo se detectó luego de 4 h postratamiento, principalmente en las células sin infectar. Para el caso de las células infectadas, a pesar de que se observó un aumento de %CellsROS+, este fue muy leve comparado con el control basal de células infectadas (Figuras 13 y 14).

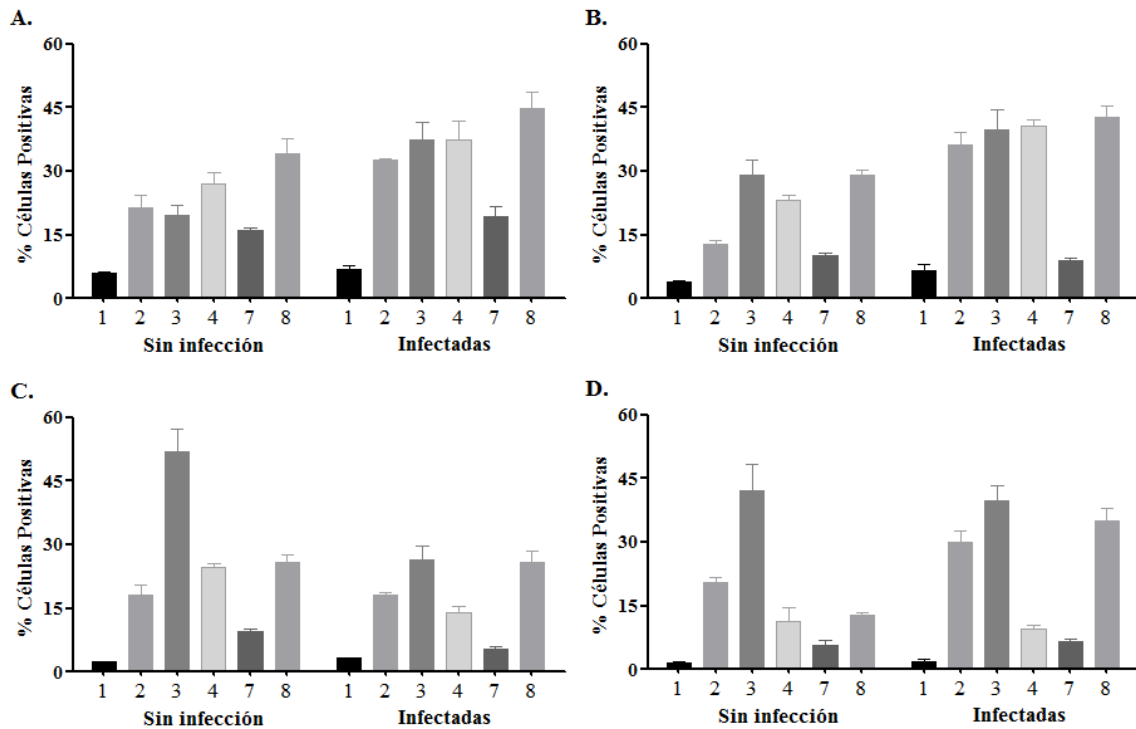
Se observó además un aumento del %CellsROS+ en todos los tiempos evaluados tanto de las células infectadas como no infectadas, principalmente a una hora postratamiento con TC1. El Índice de Producción (IP), evidenció que todo el tiempo hubo al menos el doble de la producción basal, la cual se sostuvo incluso por 48 h. Al contrario, con el tratamiento con TC2, hubo una disminución significativa del %CellsROS+ en todos los tiempos evaluados. En este caso el IP fue cercano a 1 (Figura 14). Al igual que lo observado con TC1, el tratamiento con SS produjo un aumento de %CellsROS+, principalmente en las células sin infectar, pero en este caso el aumento solo se observó a las 24 h postratamiento y el IP fue 2.4, es decir mucho mayor que en todos los grupos, e incluso que en el LPS, en todos los tiempos de evaluación en las células infectadas (Figura 13, Tabla 6).



**Figura 13. Cinética de producción de ROS postratamiento con SS y TC1.** La gráfica muestra el % de células positivas para ROS mediante citometría de flujo. A. 1 h, B. 4 h, C. 24 h, D. 48 h. 1 Control sin tinción, 2 Control basal, 3 LPS 1µg/mL, 4 SS, 5 TC1, 6 TC1:SS.

El aumento en el %CellsROS+ también se observó con TC1: SS, pero a las 48 h postratamiento y en células infectadas con un IP de 1.7, mayor al obtenido para TC1 puro pero menor que el de SS, indicando que el potencial oxidativo es ocasionado por SS

(Figura 13, Tabla 6). Sin embargo, el tratamiento con TC2 sólo disminuyó el %CellsROS+, al combinarse con SS con un aumento en el %CellsROS+ mayor en las células infectadas. El IP, fue mucho mayor cuando se administran en mezclas (Tabla 6).



**Figura 14. Cinética de producción de ROS postratamiento con SS y TC2.** La gráfica muestra el % de células positivas para ROS mediante citometría de flujo. A. 1 h, B. 4 h, C. 24 h, D. 48 h. 1 Control sin tinción, 2 Control basal, 3 LPS 1µg/mL, 4 SS, 7 TC2, 8 TC2:SS.

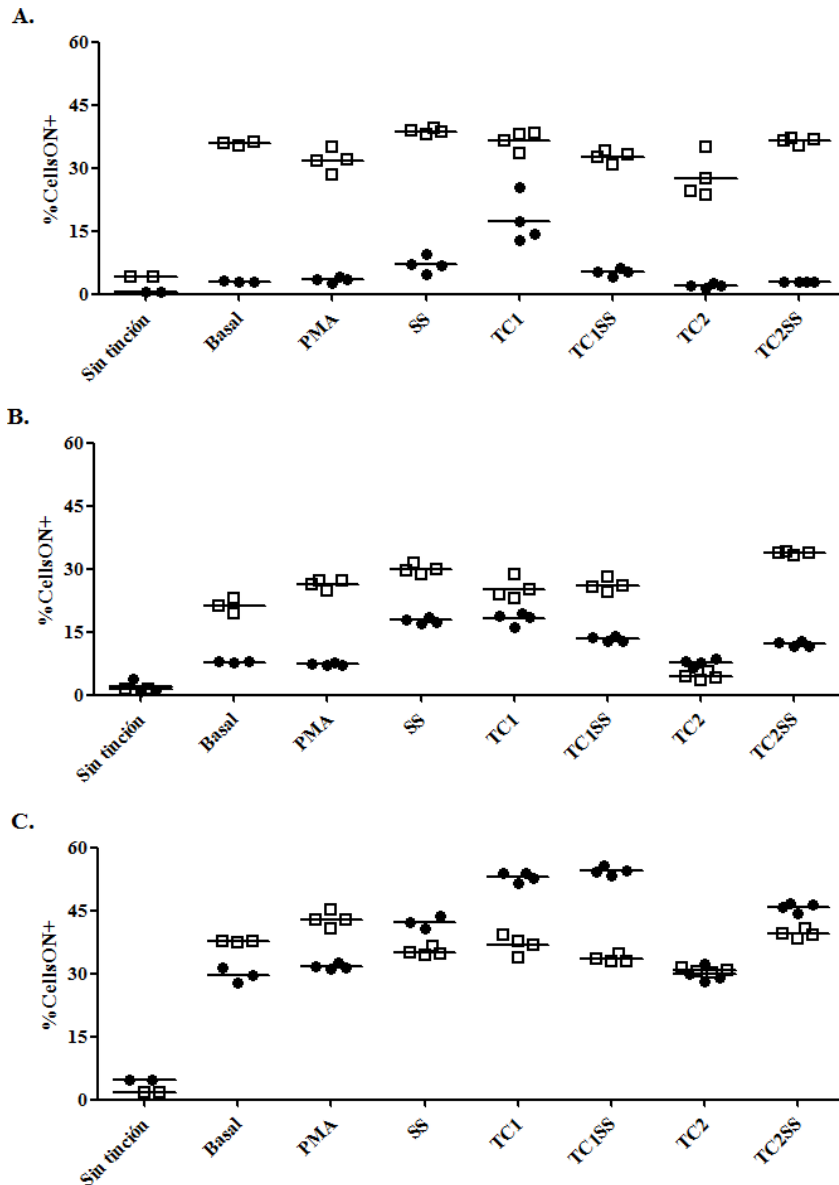
*Especies reactivas del Nitrógeno.* Hubo una pequeña proporción de células positivas para NO en las células infectadas, la cual fue aumentando al pasar el tiempo de evaluación 24H (Figura 15A), 48 H (Figura 15B) y 72H pos-infección (Figura 15C). El porcentaje de células positivas para ON (%cellsON+) entre células infectadas vs. no infectadas fue de  $3.1 \pm 0.1$  vs.  $35.8 \pm 0.7$  a las 24 h, de  $7.7 \pm 0.2$  vs.  $21.1 \pm 2.6$  a las 48 h y de  $29.5 \pm 2.3$  vs.  $37.7 \pm 0.2$ , a las 72h. Como control se utilizó PMA, el cual aumentó levemente la cantidad de ON detectada luego de las 48 h, principalmente en las células sin infectar (Figura 15B).

**Tabla 6. Índice de Producción especies Reactivas del oxígeno.**

| Tiempo (h)     | Especies reactivas del Oxígeno |          |          |          |          |          |          |          |
|----------------|--------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                | 1                              |          | 4        |          | 24       |          | 48       |          |
| Característica | Inf                            | No Inf   | Inf      | No Inf   | Inf      | No Inf   | Inf      | No Inf   |
| LPS            | 1,3±0,1                        | 1,1±0,5  | 2,1±0,1  | 1,8±0,3  | 3,1±0,0  | 3,8±0,1  | 2,3±0,4  | 3,6±0,1  |
| SS             | 1,2±0,2                        | 3,0±0,3↑ | 1,7±0,1  | 1,9±0,0  | 6,5±0,0↑ | 2,4±0,1↓ | 3,1±0,3↑ | 1,4±0,1↓ |
| TC1            | 1,4±0,1                        | 1,5±0,4↑ | 1,5±0,1↓ | 1,6±0,2  | 1,9±0,1↓ | 1,1±0,0↓ | 0,9±0,0↓ | 0,8±0,1↓ |
| TC1:SS         | 3,1±0,2↑                       | 1,9±0,4↑ | 2,4±0,2  | 2,3±0,3↑ | 1,2±0,1↓ | 1,3±0,0↓ | 1,7±0,3  | 1,5±0,3↓ |
| TC2            | 0,9±0,1                        | 1,0±0,4  | 1,4±0,0↓ | 1,3±0,3↓ | 0,6±0,0↓ | 1,0±0,0↓ | 0,5±0,1↓ | 0,7±0,1↓ |
| TC2:SS         | 2,0±0,1↑                       | 2,4±0,5↑ | 2,1±0,2  | 2,5±0,3↑ | 2,7±0,1  | 1,7±0,0↓ | 1,9±0,2  | 1,5±0,0↓ |

Los datos muestran el índice de producción IP [relación entre el valor basal (control sin tratamiento) dividido cada tratamiento] para especies reactivas del oxígeno. Inf: células infectadas con *L. braziliensis* wt. No Inf: células sin infectar. \* Control positivo: LPS 1µg/mL para ROS↓↑ disminución o aumento con relación al control basal.

Solo a las 48 h todos los tratamientos, excepto TC2, estimularon la producción de NO en las células no infectadas. Para el caso de las células infectadas desde las 24 h postratamiento se observó un aumento significativo del número de células positivas al tratarse con TC1 y SS; este efecto que persistió durante todos los tiempos de evaluación. Por su parte, las combinaciones de los compuestos aumentaron el %cellsNO+ gradualmente a medida que aumentó el tiempo de tratamiento (Figura 15C).



**Figura 15. Producción de NO.** % de células positivas para NO mediante citometría de flujo. A. 24H, B. 48 h, C. 72 h. □ Células sin infección, ●Células Infectadas



Con relación al IP de óxido nítrico, se encontró que el SS es un fuerte inductor de la producción de este radical oxidativo, el mayor IP fue de 4 en células infectadas tratadas con SS a las 48. Para las hidrazonas derivadas de cromano (TC1 y TC2), la producción fue muy similar al control de PMA, IP de alrededor de 1, en todos los tiempos de evaluación (Tabla 7).

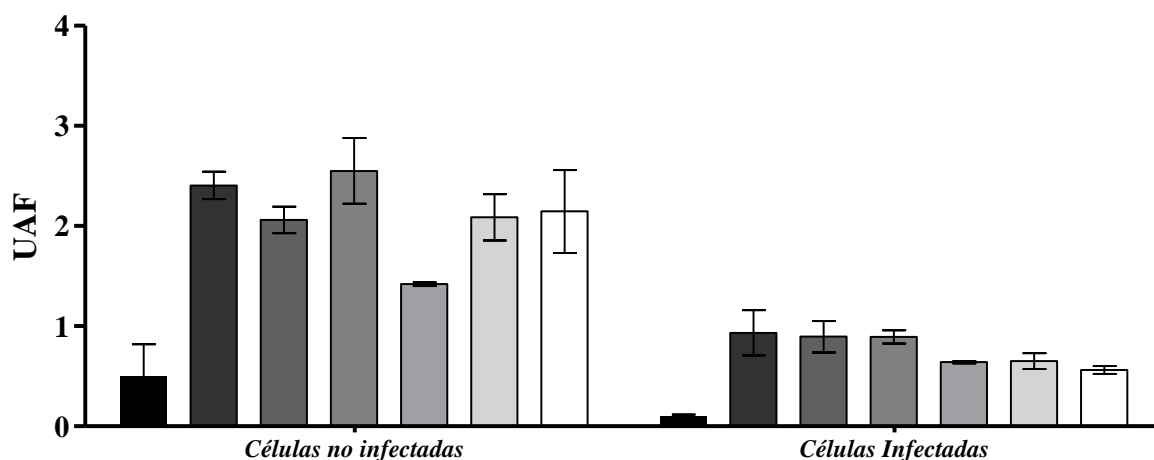
La aplicación de TC2 generó un comportamiento diferencial entre las células infectadas y no infectadas. En estas últimas hubo una disminución de %cells NO+, mientras que en las células infectadas este valor permaneció estable, de manera similar a lo observado en las células control de infección (Figura 15B y 15C).

**Tabla 7. Índice de Producción especies Reactivas del Nitrógeno.**

| Tiempo | Especies reactivas del Nitrógeno |          |          |          |          |          |
|--------|----------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
|        | 24                               |          | 48       |          | 72       |          |
|        | Inf                              | No Inf   | Inf      | No Inf   | Inf      | No Inf   |
| PMA    | 1,1±0,2                          | 0,9±0,0  | 0,7±0,0  | 1,0±0,1  | 0,8±0,1  | 1,1±0,1  |
| SS     | 1,4±0,2                          | 2,8±0,3↑ | 4,1±0,2↑ | 4,2±0,0↑ | 3,2±0,4↑ | 2,4±0,1↑ |
| TC1    | 1,0±0,2                          | 2,0±0,2↑ | 1,3±0,2  | 1,2±0,4  | 1,0±0,3  | 1,2±0,1  |
| TC1:SS | 1,1±0,3                          | 1,0±0,1  | 1,3±0,3  | 2,1±0,1↑ | 1,6±0,1  | 1,1±0,1  |
| TC2    | 1,5±0,2                          | 1,0±0,2  | 1,6±0,1  | 1,1±0,3  | 1,0±0,3  | 0,9±0,0  |
| TC2:SS | 1,1±0,2                          | 1,4±0,0  | 2,0±0,2↑ | 2,0±0,1↑ | 1,8±0,0↑ | 1,2±0,1  |

Los datos muestran el índice de producción IP [relación entre el valor basal (control sin tratamiento) dividido cada tratamiento] para Inf: células infectadas con *L. braziliensis* wt. No Inf: células sin infectar. \* Control positivo: PMA 1µg/mL para NO↓↑ disminución o aumento con relación al control basal.

6.3.6. *Cuerpos lipídicos*. En general se observó que la acumulación de cuerpos lipídicos fue mucho menor en las células infectadas. Con relación a la acción de los tratamientos, no hubo un efecto notable. Para el caso de SS en las células sin infección se observó un efecto leve de disminución en la cantidad de cuerpos lipídicos (Figura 16).

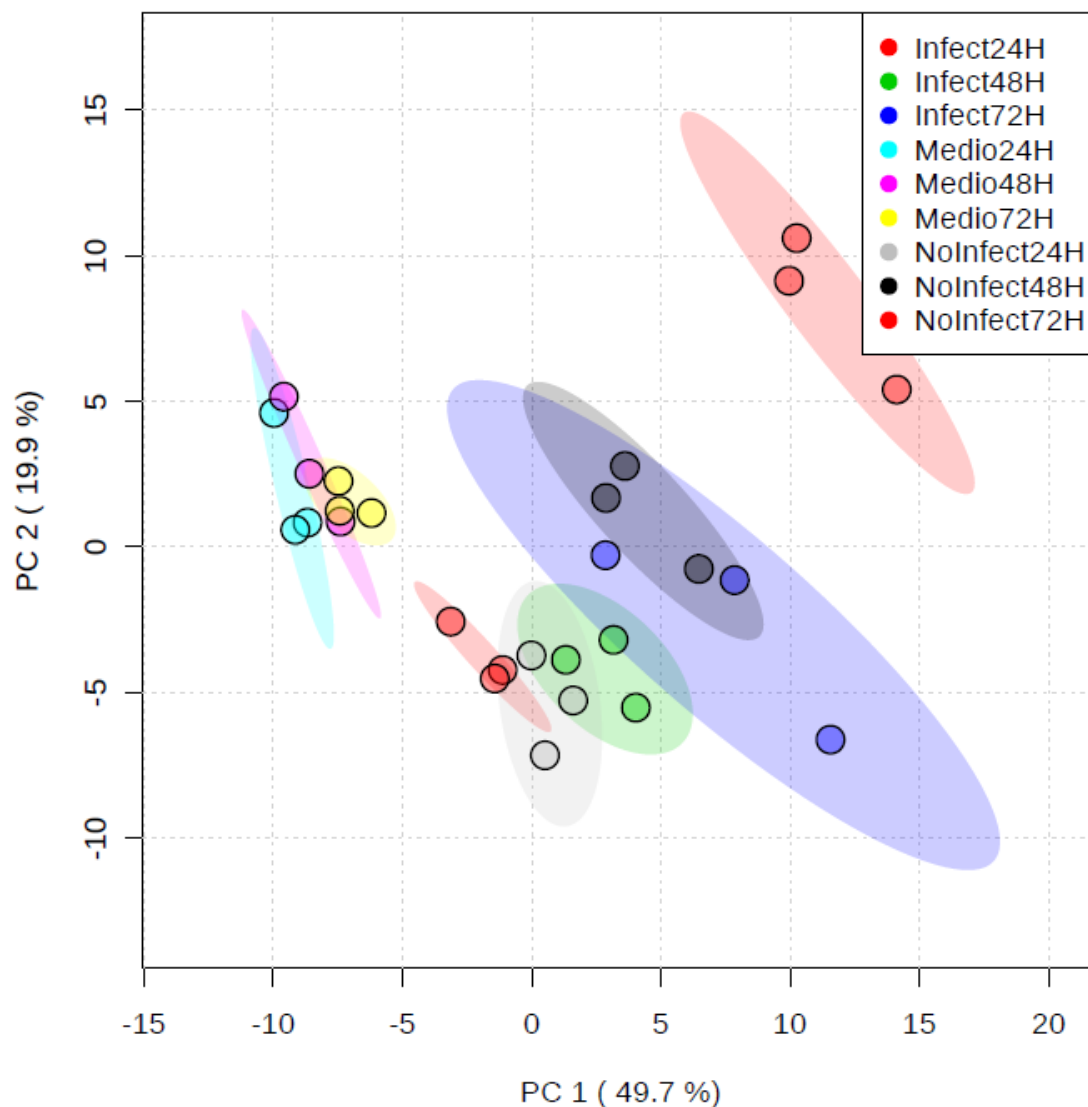


**Figura 16. Cuerpos lipídicos células con y sin infección por *L. braziliensis*.** La gráfica muestra la tinción con rojo de nilo de cuerpos lipídicos posterior a 24 h de exposición a los tratamientos a la CE<sub>90</sub>. En tonos de oscuro a claro: Control sin tinción, control basal teñido, TC1, TC2, SS, TC1: SS y TC2: SS.

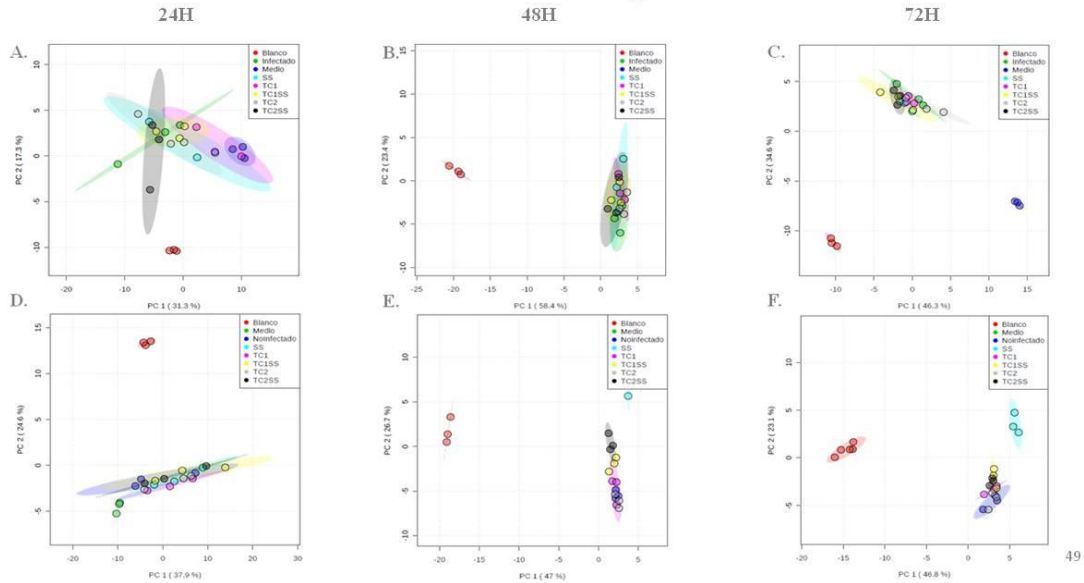
6.3.7 *Cambios en el metaboloma*. Se estudió el exometaboloma de macrófagos U937, infectados (Ci) y sin infección (Ni) con *L. amazonensis*, en un modelo *in vitro* que se estandarizó en el laboratorio del doctor Ian Lewis de la Universidad de Calgary. La evaluación se realizó con una cinética a 24, 48 y 72h, con muestras obtenidas del medio (exometaboloma), todos los datos se suministran en el Material Suplementario 1.

Se encontró que los macrófagos U937 no sufren fuertes afectaciones metabólicas producto de la infección con *L. amazonensis* en los tiempos de evaluación, la mayor discriminación se dio a las 24 y 72 horas para células no infectadas e infectadas respectivamente (Figura 17). Tampoco hubo discriminación entre los grupos de tratamiento según el análisis de

componentes principales (Figura 18A-18D), excepto para el SS el cual tuvo un comportamiento diferencial a 48 y 72 horas en células sanas (Figura 18E y 18F)

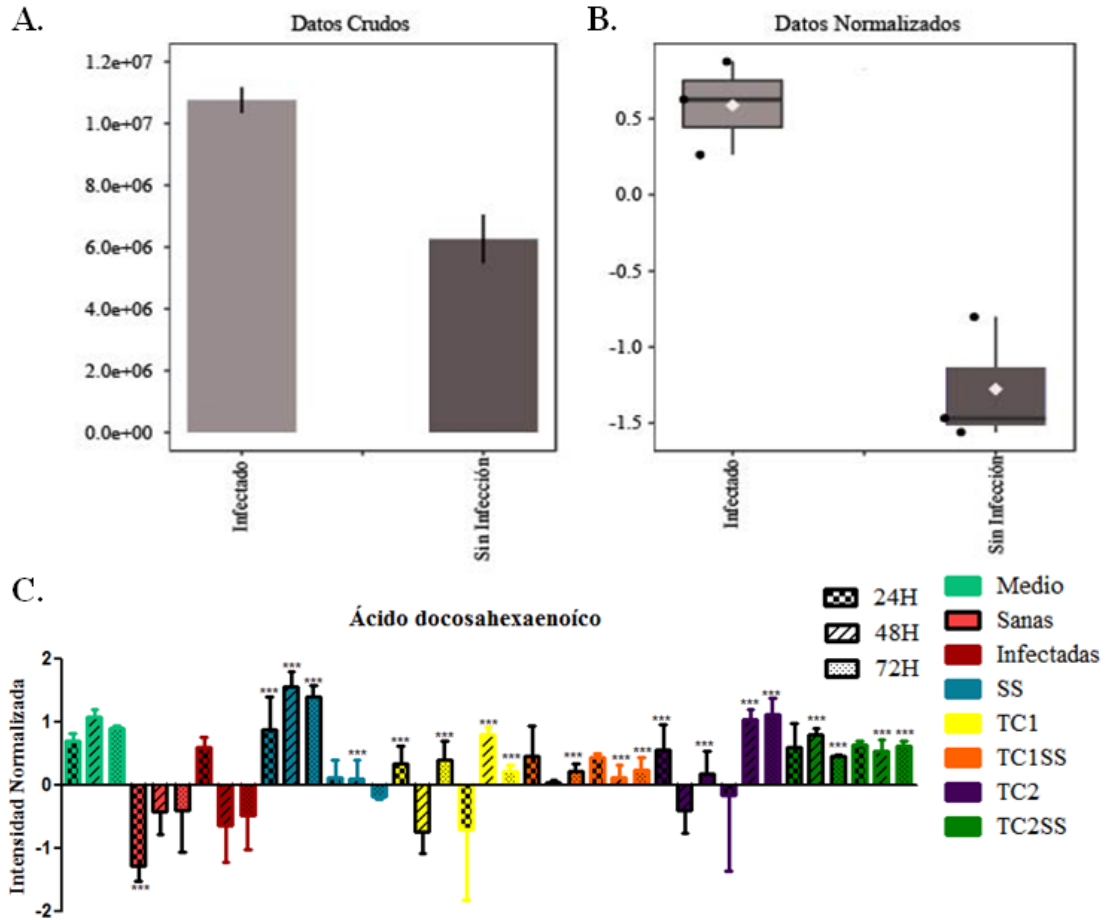


**Figura 17. Análisis de componentes principales de macrófagos con y sin infección por *L. amazonensis*.** Células con y sin infección por *L. amazonensis* en los diferentes tiempos de evaluación 24, 48 y 72H post infección.



**Figura 18. Análisis de componentes principales de macrófagos con y sin infección por *L. amazonensis* tratados con las moléculas.** Células con y sin infección por *L. amazonensis* tratadas. Azul celeste: SS. Rosado: TC1. Amarillo: TC1S:SS. Gris: TC2. Negro: TC2:SS. A. Células infectadas, B. Células infectadas, C. Células infectadas, D. Células sanas, E. Células sanas, F. Células sanas.

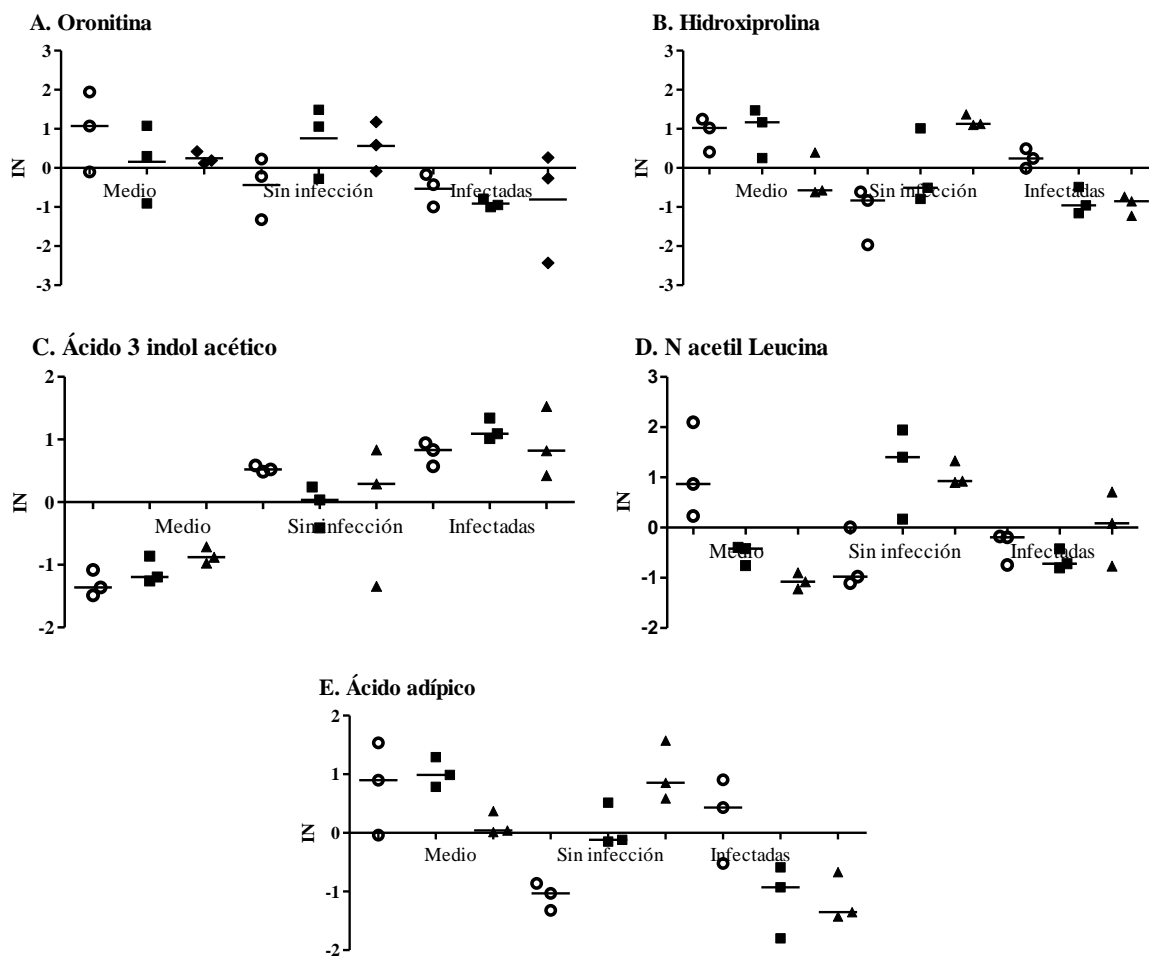
Pocas fueron las diferencias entre los controles experimentales; Ci (células infectadas) y Ni (células sin infección). El ácido docosahexaenoico, fue el único marcador de la infección por *L. amazonensis* a las 24 h pos-infección, con diferencias estadísticamente significativas ( $p= 3.03 \times 10^{-5}$ , t test) (Figura 19A, 19B). Este metabolito se vio alterado por la administración de las moléculas, ya que se promovió su excreción (o la acumulación) al medio, tanto en Ci como Ni (Figura 19C).



**Figura 19. Ácido docosahexaenoico (DHA) como marcador de la infección por *L. amazonensis*.** A. Intensidad de la señal para DHA datos crudos. B. Intensidad de la señal para DHA datos normalizados. C. Comportamiento normalizado de DHA tras la administración de los tratamientos. Análisis posthoc Anova \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$ , comparación entra cada grupo de tratamiento versus su control infectadas o sin infección.

Posteriormente se realizó el análisis de las veces de cambio, “fold change”, para determinar más marcadores de la infección por *L. amazonensis*; en este caso se consideró como significativo, adicional al valor  $p < 0.05$ , cuando hubo un aumento o disminución de al menos 3 veces. Se encontraron cinco metabolitos expresados diferencialmente entre células

infectadas y no infectadas en los tres tiempos de evaluación: ornitina, hidroxiprolina, ácido 3-indolacético, leucina y ácido adípico (Figura 20).



**Figura 20. Metabolitos diferencialmente expresados entre células infectadas vs no infectadas.** Anova p.valor <0.05. Se muestra la intensidad normalizada para cada metabolito. ○ 24 h, ■ 48 h, ◆72 h. A. Ornitina, B. Hidroxiprolina, C. Ácido 3-indolacético (I3A), D. N-acetil leucina, E. Ácido adípico, IN: Intensidad de fluorescencia normalizada.

### 6.3.7.1 Efecto del tratamiento en el metabolismo de macrófagos con y sin infección

El análisis metabolómico se desarrolló de la siguiente manera.

Los valores basales del medio además de definir la presencia o ausencia de metabolitos específicos en el medio de cultivo indican la estabilidad del compuesto a analizar; una disminución es causada probablemente por descomposición y un incremento es ocasionado por la formación de metabolitos por descomposición de otros, lo que origina falso incrementos.

Por otra parte, los niveles en macrófagos sin infección (Ni) e infectados (Ci) permiten definir en primera instancia si el parásito ocasiona un cambio en el metabolismo normal del macrófago. Luego las comparaciones se realizan entre el efecto que tienen las sustancias TC1, TC2, SS en ambos tipos de macrófagos, y a su vez estas con los controles Ni y Ci. Los cambios en los metabolitos de una vía específica se analizan en cuanto a su participación en el bloqueo o activación de una vía metabólica.

#### *6.3.7.2 Metabolismo de purinas.*

El método analítico permitió detectar la presencia de inosina, hipoxantina, xantosina, xantina y guanina; se analizó el contenido de estos metabolitos en el medio, en los tres tiempos de evaluación, para el análisis y descripción se toma como referencia el esquema de la ruta de salvamento de purinas para *L. donovani* propuesto por Boitz et al, 2012, el cual se utilizó junto al esquema de nuestros resultados (Figura 21A).

Solo se graficaron los resultados de SS y las mezclas, dado que TC1 y TC2 no causaron ninguna alteración en esta ruta (Material Suplementario S1, S2, S3). Ninguno de los metabolitos se encontró diferencialmente expresado entre macrófagos infectados y sin infección, a continuación, se describen los principales cambios detectados con SS y algunas de sus mezclas.

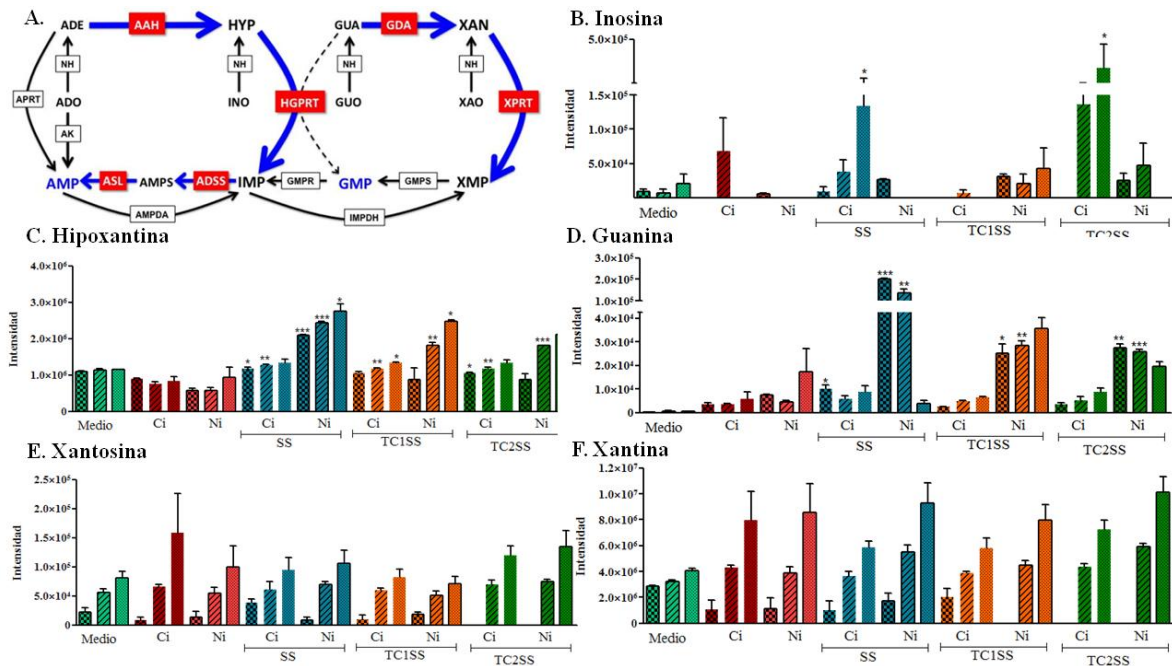
**INOSINA** (figura 21B). Las células infectadas tratadas con SS incrementan en un 100% los niveles de inosina en el sobrenadante (Intensidad  $X= 9.4 \times 10^3$ ) a las 72 horas en macrófagos infectados, en un efecto claramente causado por SS, ya que en las células infectadas sin la adición de este compuesto no hay inosina (Intensidad  $X=0$ ). Es probable que esta acumulación en el sobrenadante de dichos macrófagos tratados sea ocasionada por

un bloqueo en la utilización de esta sustancia por el parásito, ya que no se estaría dando la transformación de esa inosina en hipoxantina que sería el siguiente paso en la ruta metabólica. Esto podría descompensar esta ruta, ya que el parásito es auxótrofo para este metabolito implicado en la síntesis de purinas por la ruta del salvamento. Sin embargo, el parásito tiene otras vías para suplir esta deficiencia, como la hipoxantina, guanina, xantina y xantosina (Figura 21A), por lo cual el bloqueo causado por SS no necesariamente es mortal, lo cual explicaría parcialmente el efecto parasitostático de SS.

Este mismo proceso se aprecia, con la administración de la mezcla TC2: SS, tanto a las 48 como a las 72 horas (Intensidad  $X= 1.37 \times 10^5$ ,  $2.69 \times 10^5$  respectivamente), que nuevamente es claramente atribuible a SS, dado que como se dijo anteriormente, el compuesto TC2 no causó cambios en la inosina.

**HIPOXANTINA** (Figura 21C). SS causa una acumulación en el sobrenadante de los macrófagos sanos en todos los tiempos 24h ( $I= 2.1 \times 10^6$ ) 48h ( $I= 2.4 \times 10^6$ ) y 72h ( $I= 2.8 \times 10^6$ ), siendo diferente al comparar con las células no infectadas 24 y 48h ( $I= 5.7 \times 10^5$ ) 72h ( $I= 9.3 \times 10^5$ ). Sin embargo, extrañamente hubo menor cantidad de hipoxantina en el sobrenadante de macrófagos tratados infectados, lo que podría sugerir el aumento del uso de hipoxantina por las células infectadas tratadas con SS, ya que el parásito al tener bloqueado el paso de inosina a hipoxantina trata de activar otra ruta que supla el efecto.





**Figura 21. Alteración del metabolismo de purinas en células con y sin infección con *L. amazonensis* tratadas con SS.** Ci: Células infectadas, Ni: Células sin infección. Tiempos de evaluación: 24H, 48H, 72H. Análisis T student \* p<0.05. \*\* p<0.01 \*\*\* p<0.001, comparación entra cada grupo de tratamiento versus su Ci o Ni en cada periodo de tiempo. A. ruta de salvamento de purinas propuesto para *L. donovani* por Boitz et al, 2012: ADE: Adenina, ADO: adenosina, HYP: Hipoxantina, INO: Inosina, GUA: guanina, GUO: guanosina, XAN: xantina, XAO: Xantósina.

**GUANINA** (Figura21D). Al tratar con SS los macrófagos infectadas tienen poca guanina en el sobrenadante con valores de intensidad de  $9.9 \times 10^3$ ,  $5.8 \times 10^3$ ,  $8.8 \times 10^3$  para 24, 48 y 72H; sin embargo, los macrófagos sin infección sorprendentemente tienen alta cantidad de guanina en el medio a las 24 y 48 horas con intensidades de  $1.9 \times 10^5$  y  $1.4 \times 10^5$ , diferencia que es alrededor de dos escalas logarítmicas (100) entre la respuesta al tratamiento de SS en células infectadas y no infectadas. De esta manera parece correcta la presunción de que el bloqueo en el uso de inosina como precursor de la hipoxantina en macrófagos sin infección se compensa activando la síntesis de guanina. Este efecto también podría presentarse en macrófagos infectados, pero en este caso el parásito la utiliza y por ello no hay presencia de ella en el sobrenadante.

Resumiendo, en macrófagos no infectados hay mucha guanina y en macrófagos infectados hay poca guanina, lo que indica que el parásito está captando el exceso de guanina inducido por la acción del SS, compensando con ello la dificultad para utilizar la inosina.

**XANTINA** y **XANTOSINA** (Figura 21E y 21F): No se observan cambios en el comportamiento de las xantinas entre células infectadas y sin infección, como tampoco tras la administración de las moléculas.

#### 6.3.7.3 *Metabolismo del Triptófano.*

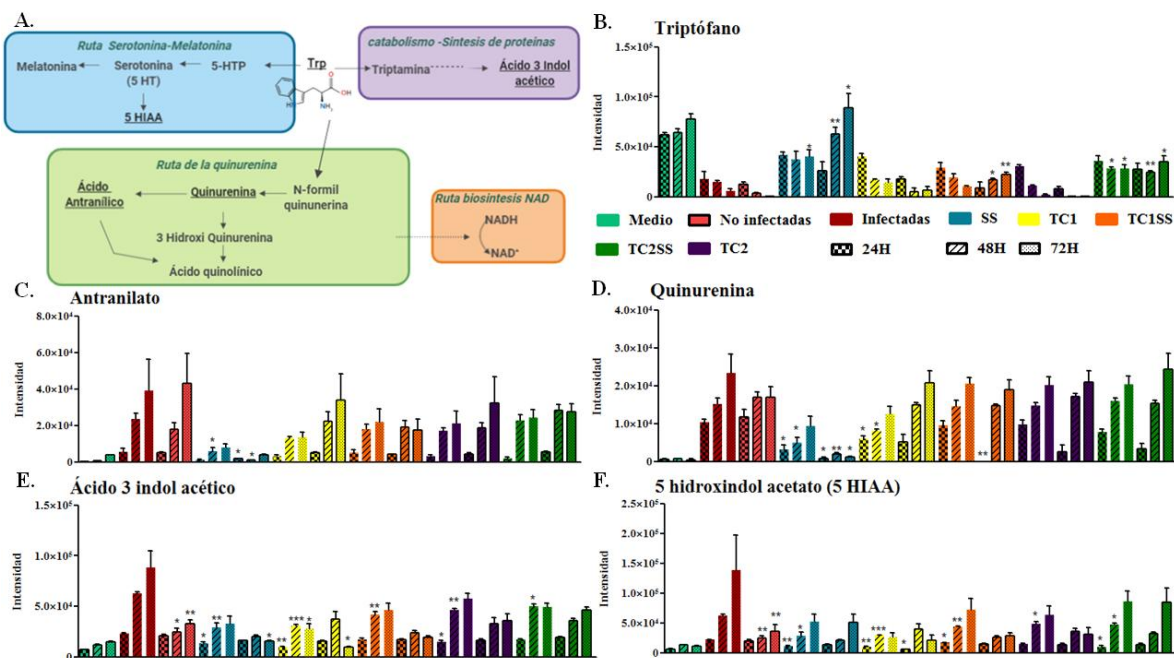
El triptófano (Trp), es un aminoácido esencial tanto para el macrófago como para el parásito, este debe tomarlo de su célula hospedera, en el material suplementario 4 se muestran los mapas de calor del catabolismo de este aminoácido. Este aminoácido participa principalmente en tres procesos; síntesis de proteínas, producción de serina y melatonina y la formación de ácido quinolínico, principal precursor de la coenzima NAD (nicotina adenina dinucleótido) (Figura 22A).

El medio de cultivo contiene triptófano ( $I = 6.6 \times 10^4$ ), tanto los macrófagos infectados como no infectados captan mucho triptófano reduciendo la intensidad en al menos una escala logarítmica (10) o incluso a valores 0 a las 72H, la administración de SS inhibe la captación de triptófano así; los macrófagos no infectados tratados con SS tienen tanto como el medio basal, indicando que no hay captación. Por su parte los macrófagos infectados tratados con SS captan poco triptófano, teniendo valores de intensidad promedio de  $4.2 \times 10^4$ ,  $3.7 \times 10^4$  y  $4.1 \times 10^4$  a las 24, 48 y 72H respectivamente. De esta manera se concluye que la captación fue muy poca (inhibición parcial de la captación). Este mismo efecto se observa en las mezclas, pero en menor intensidad, esto puede ser atribuible a que en las mezclas la concentración de SS está reducida a la mitad, aun así, se observa la disminución en la captación del aminoácido (Figura 22B).

Los macrófagos con o sin infección producen antranilato y este se secreta al medio con una tendencia creciente a medida que pasa el tiempo. La administración de SS produce una

reducción en la producción de antranilato y como consecuencia ya no se detecta de manera importante en el medio de los macrófagos infectados o no infectados, lo que puede ser consecuencia de la poca captación de triptófano que se describió previamente (Figura 22C).

La quinurenina, se acumula en el medio (macrófagos infectados  $3.7 \times 10^3$ ,  $1.1 \times 10^4$ ,  $1.9 \times 10^4$ , macrófagos no infectados  $5.3 \times 10^3$ ,  $2.3 \times 10^4$ ,  $3.9 \times 10^4$  a 24, 48 y 72H); la administración de SS conduce a que esta acumulación sea menor, tanto en macrófagos infectados como macrófagos no infectados (macrófagos no infectados  $1.8 \times 10^3$ ,  $1.0 \times 10^3$ ,  $3.8 \times 10^3$ , macrófagos infectados  $1.1 \times 10^3$ ,  $5.9 \times 10^3$ ,  $7.9 \times 10^3$  a 24, 48 y 72H) en este caso TC1 tiene ese mismo efecto en Ci a las 24 y 48H (Figura 22D).



**Figura 22. Metabolismo del triptófano.** En la gráfica se muestran los principales pasos del metabolismo del aminoácido, las barras representan la intensidad promedio para los metabolitos que fueron diferencialmente expresados entre macrófagos infectados (barras sin borde) o no infectados (barras con borde negro) vs cada uno de los tratamientos. Análisis T student \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$ , comparación entre cada grupo de tratamiento versus macrófagos infectados o no infectado en cada periodo de tiempo. A. rutas del metabolismo de triptófano, B. Triptófano, C. Antranilato, D. Quinurenina, E. Ácido 3 indol acético, F. 5 HIAA.

El catabolismo del triptófano dirigido a la síntesis de proteínas, es alterado significativamente por la infección, induciendo el aumento en el medio de I3A (Ácido 3-indolacético). La administración de los tratamientos SS, TC1, TC2 y las mezclas alteran este patrón en macrófagos infectados, en todos los tiempos de evaluación, con poca cantidad en el medio. Por eso podría ser que los macrófagos infectados tienen la misma cantidad relativa de I3A de los no infectados (Figura 22E).

En la ruta catabólica que se dirige hacia la formación de serotonina y melatonina, se encontró que el 5-hidroxi-indol acetato ó 5-HIAA (Figura 22F), tiene una tendencia diferencial entre macrófagos infectados y no infectados. En el primer caso se produce y secreta al medio este metabolito. Por su parte cuando se administran los tratamientos TC1, TC2, SS y las mezclas, esa acumulación en el medio no se da en macrófagos infectados.

En conclusión, la ruta del catabolismo del triptófano está reprimida en diferentes pasos; se sugiere que el principal efecto es el bloqueo en la captación del mismo, que ocurre tanto en macrófagos infectados como en no infectados tras la administración de SS y las mezclas que lo contienen. Luego de esto se afectan cuatro metabolitos que están corriente abajo en la ruta de catabolismo de este aminoácido; estas ocurren predominantemente en macrófagos infectados, que son incapaces de producir y secretar al medio extracelular intermediarios metabólicos como el antranilato y la quinurenina como consecuencia del tratamiento con SS. Por otro lado, se suma al efecto de SS el efecto inhibitor de las hidrazonas TC1 y TC2 en las conversiones del I3A y 5-HIAA, causando que estos tampoco se acumulen en el medio como ocurre en las condiciones normales para macrófagos infectados. Esto indica que ambos tipos de moléculas están afectando la ruta del catabolismo del aminoácido, potenciándose el efecto de SS por las hidrazonas en los dos últimos metabolitos mencionados.

## **6.4 Discusión**

El macrófago, es la célula hospedadora por excelencia de *Leishmania* spp. Esta célula tiene un papel dual posterior a la fagocitosis del parásito; en primer lugar, puede generar una cascada de señalización que causa la eliminación del parásito. En segundo lugar, aunque esto no es jerárquico, puede modular la respuesta de esta célula y transformarlo en un nicho adecuado para su supervivencia, esto lo realiza gracias a múltiples factores de virulencia, un estadio capaz de sobrevivir intracelularmente y la modulación de la polarización *in situ* que ocurra al momento de la infección de la respuesta inmune.

El amastigote de las especies de *Leishmania* es un estadio con una baja tasa de replicación, que se desarrolla en el fagolisosoma, el cual se considera un ambiente limitado de nutrientes, y donde el parásito reside en un estado quiescente metabólicamente, que se asocia con su mayor resistencia a diferentes condiciones de estrés como temperatura y ROS. En este compartimiento, hay una alta degradación de proteínas, funcionando los aminoácidos libres como el principal recurso para la supervivencia (McConville, 2011). Por otro lado, el parásito se encuentra bajo la presión de las defensas oxidativas del macrófago, lo cual requiere una adaptación al estrés oxidativo muy eficiente (Saunders, 2014).

Metabólicamente, se ha establecido que los macrófagos proinflamatorios (M1) y reguladores (M2), se diferencian principalmente por el metabolismo de la arginina, siendo esta utilizada para la síntesis de óxido nítrico mediante la enzima óxido nítrico sintasa inducible (NOS<sub>2</sub>). Para macrófagos M2, al final de la ruta hay un aumento en la producción de poliaminas consecuencia del metabolismo del mismo aminoácido, pero dirigido hacia la producción de urea y ornitina (Odegaard, 2011). Otras diferencias bioquímicas son la captación y oxidación de ácidos grasos, la cual es mucho mayor en macrófagos M2 que M1, lo cual se correlaciona con la producción de altos niveles de COX 2 y COX 1 (ciclo oxigenasa) para M1 y M2 respectivamente (Martinez, 2006). Otro metabolito diferenciador es el hierro, pues los macrófagos M1 se encuentran en un estado que retiene el hierro, mientras que los M2 lo excreta al medio extracelular (Cairo, 2011). La vía glicolítica, es altamente utilizada por macrófagos M1, incluso se postula que los niveles intracelulares altos de succinato se correlacionan con una potenciación de la glicolisis. Por su parte en los M2 el principal mecanismo de generación de energía es la fosforilación oxidativa

(Tannahil, 2013). Adicionalmente, la captación de folatos es alta en M2 comparado con M1 (Puig-Kroger, 2009). Todos estos hallazgos se correlacionan con la actividad microbicida que tiene el macrófago M1 y las funciones de regulación inmune, remodelación de la matriz extracelular y proliferación documentadas para M2.

En este sentido, sugerimos que las moléculas TC1, TC2 y SS cambian el fenotipo del macrófago, pasando de un tipo M2 permisivo a la infección a un M1 que ejecuta una acción microbicida, de tal manera que el efecto de los compuestos es tanto directo (Capítulo 2) como indirecto. Actualmente se sabe que el macrófago puede fluctuar entre sus dos fenotipos dependiendo del estímulo extracelular en que se encuentre. Se soporta este cambio del fenotipo principalmente por la producción de ON, especie reactiva del nitrógeno que diferencia ambos fenotipos; su producción fue estimulada por la administración de todos los tratamientos. También hubo cambios ultraestructurales, como abundantes prolongaciones y vacuolas de degradación tras el tratamiento con las hidrazonas, junto a un aumento de ROS tanto en los macrófagos tratados; este último efecto se relaciona con la reducción del fagolisosoma, lo que consideramos contribuiría a una mayor concentración de ROS intravacuolar, con la posterior reducción de la supervivencia del parásito. Se confirmó que la afectación de la fagolisosoma fue solo estructural; no se encontró alteración en el número de los lisosomas que lo componen ni el pH, lo que significa que no hubo afectación funcional del mismo. Además, los resultados obtenidos con la tinción con Lysotracker red, sugieren una ubicación particular de lisosomas hacia un extremo del macrófago infectado tratados con las mezclas, disposición que puede estar potenciando la eliminación del parásito.

El metabolismo es un área del conocimiento con complejas interpretaciones; en esta investigación se realizó un abordaje al metabolismo de macrófagos con y sin infección por *L. amazonensis* y se analizó cómo la administración de las moléculas modifica el metabolismo en procesos celulares a saber: metabolismo de purinas, y aminoácidos.

Los resultados relacionados al metabolismo de la arginina mostraron que los macrófagos en estado de infección tienden a captar ornitina, hidroxiprolina y acumular fumarato, además

de tener baja producción de NO, lo que coincide con un fenotipo M2. Esto podría explicarse como consecuencia del alto estrés oxidativo al que está sometida tanto la célula como el parásito, por lo cual es importante internalizar estos metabolitos y sintetizar poliaminas como la espermidina, crucial en el balance redox de ambos organismos. De hecho, se observó un aumento en la concentración basal de ROS en las células infectadas, lo que implica la necesidad de sintetizar este tipo de poliaminas para compensar la acción oxidativa producto de la infección. Este aumento en la cantidad de ROS basal en las células infectadas se debe además al tipo de metabolismo de los amastigotes, el cual usa como fuente principal los aminoácidos y la respiración mitocondrial, la que aumenta los niveles endógenos de ROS por la fuga de su peróxido de la cadena transportadora de electrones (Naderer, 2008).

Para ornitina e hidroxiprolina existe una interconexión entre los procesos del metabolismo de arginina, la producción de glutatión e incluso el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Han sido estudiados los metabolitos intracelulares bajo similares condiciones experimentales, determinando que los macrófagos infectados con *Leishmania* se caracterizan por un aumento en la biosíntesis de poliaminas a través de la activación de arginasa-1, con la subsecuente producción de urea y ornitina (Arango, 2014). En este caso confirmamos indirectamente la activación de la arginasa-1 al determinar la producción basal de NO, la cual fue 10 veces menor en células infectadas respecto a las no infectadas. Esto implica que el metabolismo de la arginina se está desviando hacia la síntesis de poliaminas y no hacia la producción de citrulina por la NOS<sub>2</sub>, con subsecuente producción de especies reactivas del nitrógeno. Aun así, en esta ruta metabólica, no encontramos alteraciones importantes tras la administración de las moléculas de interés (Material Suplementario S4).

TC1, TC2 y SS indujeron un cambio en el cual las células infectadas tratadas aumentaron gradualmente la cantidad NO, porcentaje de células que fue incluso superior al de las células sin infección; esto se puede asumir como un cambio de fenotipo del macrófago. Este efecto ha sido documentado con la saponina Spergulin-A, aislada de *Glinus oppositifolius*, considerándose como una molécula inmuno-estimuladora por el aumento de

TNF- $\alpha$  y producción de NO después de la administración a amastigotes intracelulares de *L. donovani* (Banerjee, 2019).

Otro resultado importante estuvo en el metabolismo del triptófano, en el cual se encontraron alteraciones en las tres rutas metabólicas donde participa: síntesis de proteínas, síntesis de serotonina-melatonina y la ruta del ácido quinolínico. Las alteraciones fueron consecuencia de los tratamientos por SS, que reprimió la captación del aminoácido, conduciendo a una disminución en la concentración de los metabolitos corriente debajo de la vía, como el antranilato y quinurenina. Estos normalmente se incrementan en el medio extracelular tanto en macrófagos infectados como sanos: Por otra parte, las hidrazonas disminuyen los niveles de I3A y 5-HIAA en el medio, lo que podría deberse a un bloqueo en la síntesis de los mismos; estos metabolitos se encuentran con mayor abundancia en el sobrenadante de macrófagos infectados. Todos estos efectos en esta ruta metabólica conducen a una incapacidad de las células para la producción de NAD.

En *Leishmania* se ha descrito la importancia inmunoreguladora que tiene el catabolismo del triptófano hacia la producción de ácido quinolínico, que actúa como bloque biosintético para la producción de NAD, coenzima fundamental en múltiples procesos celulares principalmente en la producción de energía por la fosforilación oxidativa de NADH. Se ha descrito que la enzima IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase), primera implicada en el catabolismo del triptófano hacia quinurenina, juega un papel crucial. Ensayos en modelo animal demostraron que *L. major* induce un aumento en su expresión, ocasionando una reducción en la proliferación de linfocitos T, y causa una atenuación de la respuesta proinflamatoria (Makala, 2011), lo que se traduce en un estado permisivo para el desarrollo de la enfermedad. Esta función inmuno reguladora ha sido descrita en otros modelos de patógenos intracelulares (Mesquita, 2016).

La ausencia de la producción suficiente de quinurenina, derivado del bloqueo parcial de la captación de triptófano, afecta todos los ciclos que requieran la oxidación con NAD, principalmente el ciclo de Krebs; este debería regenerarse en la cadena transportadora de electrones cuyo aceptor final es el oxígeno, por lo cual todo ese equilibrio estaría



desbalanceado. Adicional a ello, *Leishmania* es auxotrofo para NAD<sup>+</sup>, usando nicotinamida como precursor, entre otros (Gazanion, 2011), de tal manera que la alteración de la disponibilidad de precursores para producir esta coenzima en el macrófago impactaría directamente en la supervivencia intravacuolar de *Leishmania*.

Otro metabolito relacionado al metabolismo de triptofano fue I3A (ácido 3-indolacético), relacionado al catabolismo de este y producción de proteínas; este es un marcador de la infección por *Leishmania*, la administración de los tratamientos TC1, TC2 y SS y las mezclas que lo contienen, actúan sobre células infectadas bloqueando la excreción de I3A. En *Leishmania*, no encontramos asociaciones sobre este metabolito; aun así, aproximaciones inmuno moduladoras realizadas sobre macrófagos RAW 264.7, demostraron que la administración de este compuesto induce una reducción de producción de citoquinas proinflamatorias IL -1 $\beta$  y MCP-1 (Krishnan, 2018), panorama que se ajusta al modelo de leishmaniasis en el cual la célula hospedadora no tiene una respuesta microbicida eficiente debido a la señalización celular reguladora. Datos publicados recientemente sobre fibroblastos derivados de monocitos humanos tratados con TC1, reportan a 6 h postratamiento un aumento en la producción del 88% para INF- $\gamma$  y >100% para COX2, ambos marcadores proinflamatorios (Upegui, 2019). Estos resultados validan la conversión a un fenotipo M1 de los macrófagos al someterse al tratamiento con TC1.

El ciclo del ácido tricarboxílico (TCA), sirve para la producción de bloques metabólicos precursores de múltiples vías y para la generación de moléculas de ATP. Estudios sobre el flujo bioenergético en macrófagos infectados con *L. infantum* reveló que inicialmente hay un metabolismo glicolítico anaerobio que luego cambia hacia un metabolismo principalmente mitocondrial luego de 18h pos infección. Esto indica la manipulación que ejerce el patógeno sobre el macrófago; también se encontró que la infección por amastigotes inhibe el TCA y la respiración mitocondrial, expresándose esto como un disminución del ATP intracelular y una alteración de la relación entre ATP/AMP intracelular en macrófagos infectados (Moreira, 2015). En este estudio metabólico en células infectadas, no se encontraron mayores alteraciones a nivel del TCA (Material

suplementario S5); aun así, todas las moléculas disminuyeron la disponibilidad de ATP en el parásito.

Metabólicamente, residir dentro del fagolisosoma proporciona un ambiente con abundantes micronutrientes producto de la degradación lisosomal; el amastigote toma purinas, vitaminas, aminoácidos esenciales, grupo hemo, fuentes de carbono y cationes (McConville, 2007). La obtención de estos metabolitos ocurre mediante rutas de salvamento con transportadores que son usualmente redundantes, como los de purinas. Se ha descrito que alteraciones en ellos se asocia con efectos sobre el crecimiento de los amastigotes (Liu, 2006), dado que el parásito necesita estos metabolitos como fuente principal de carbono (Naderer, 2008). Los resultados hallados indican que los macrófagos sanos e infectados captan hipoxantina y acumulan guanina e inosina, pero el tratamiento con la saponina SS altera estos dos procesos en macrófagos sanos. Esto sugiere que ese proceso también debería ocurrir en las células infectadas, solo que la activación de rutas de salvamento en el parásito, impide que esto suceda en células infectadas tratadas con SS y las mezclas. En este sentido, esto podría estar relacionado al modo de acción no parasiticida sino parasitostático, ya que el efecto en la ruta puede afectar parcialmente procesos como la replicación por la eficiencia disminuida de la ruta.

El amastigote también puede transportar macromoléculas como lípidos o glicoproteínas desde el fagolisosoma; por ejemplo, el parásito capta esfingolípidos que luego utiliza para sintetizar otros como la inositolfosfoceramida (Zhang, 2005). Actualmente se sabe que *Leishmania* no puede usar lípidos como fuente principal de carbono, dado que ha perdido dos genes de la vía del glioxilato, enzimas que son importantes para la conversión de acetil CoA, producto final de la  $\beta$ -oxidación para transformar los lípidos a azúcares (Ivens, 2005). En este trabajo encontramos dos lípidos que marcaron el estado de infección, pero más que una función metabólica para producción de energía o como precursor, parece que estuvieron asociados a procesos de señalización celular. Uno de ellos fue el ácido docosahexaenoico (DHA), ácido graso poli-insaturado, que ha sido caracterizado como crítico para el establecimiento de la infección por *Leishmania spp*, dado que hace permisiva la célula hospedadora al inducir una transformación hacia el fenotipo M2 en los macrófagos

(Paloque, 2019). Se encontró además que la infección promueve la captación de DHA, pero los tratamientos impiden este proceso; esta evidencia hace fuerte la hipótesis de que los tratamientos no solo tienen una acción directa sobre el parásito, sino que además modifican al macrófago hacia un fenotipo más proinflamatorio, capaz de hacer la eliminación del parásito. Por su parte, el ácido adípico, es tomado solo por las células infectadas; sin embargo, no encontramos en la literatura algún antecedente al respecto, por lo cual es importante determinar cuál sería la funcionalidad de este lípido en la relación parásito-hospedador.

Dada la alta actividad proteolítica del fagolisosoma, hay una alta disponibilidad de aminoácidos (aa), debido a la internalización de macromoléculas y su subsecuente degradación por proteasas lisosomales, lipasas y glicosidasas (Naderer, 2008). Estos juegan un papel crucial en el metabolismo intracelular de *Leishmania*, como una fuente de carbono, se sabe que alteraciones en la función lisosomal o en los mecanismos endocíticos para transportar aminoácidos, causan una pérdida de virulencia, además el parásito es auxótrofo para la mayoría de estos aminoácidos (McConville, 2007). También se conoce que los aa libres son captados mediante permeasas, enzimas que son sobre expresadas en el estadio de amastigote (Geraldo, 2005), adicionalmente se sobre expresan proteasas de cisteína para favorecer la actividad proteolítica (Besteiro, 2007) lo que hace alusión a la importancia de la captación de aa en este estadio parasitario.

En conclusión, la administración de las moléculas altera la relación hospedero-parásito, favoreciendo la actividad microbicida del macrófago y reprimiendo rutas metabólicas como la del triptófano, ruta de la cual el parásito es dependiente para su supervivencia, estos efectos, junto a los efectos que causan las moléculas sobre el parásito, permiten que haya una reducción de la carga parasitaria y de la reinfección gradualmente, lo cual conduce a la curación de las lesiones causadas por *Leishmania*.



## **7. CONCLUSIONES**

Los resultados del presente trabajo sugieren que la efectividad *in vitro* y la curación de las lesiones de hámster dorado con LC, causada por los ungüentos de las hidrazonas TC1 y TC2 combinadas con las saponinas triterpénicas SS, es producto de un efecto directo sobre parásito, ya que las moléculas en conjunto desestabilizan el metabolismo energético, el balance redox y la capacidad infectiva del parásito. Adicionalmente, hay efectos indirectos que cambian la relación establecida entre el parásito y la célula hospedadora, promoviendo el cambio del fenotipo de los macrófagos infectados y tratados hacia un fenotipo inflamatorio y bloqueando parcialmente la captación de triptófano y de purinas. Esto causa una alteración nutricional en el amastigote ya que este es auxótrofo para estas sustancias.

Los efectos específicos detectados fueron:

**1. Función mitocondrial:** Alteración en los niveles de ATP celular para todas las moléculas, efecto desestabilizante del potencial de membrana,  $\Delta\Psi_m$ , y de la ultraestructura, exclusivamente por SS.

**2. Actividad de proteasas:** Inhibición por la acción de hidrazonas de cromano y completamente por el SS.

**3. Producción de óxido nítrico:** Inducción en macrófagos infectados.

**4. Modificación del metabolismo del triptófano en macrófagos:** Con SS hubo disminución en la captación de triptófano, disminución en la producción y acumulación en el medio de antranilato, quinurenina, I3A y 5-HIAA. Las hidrazonas TC1 y TC2 redujeron la producción y acumulación en el medio de I3A y 5-HIAA.

Todo esto en conjunto conduce a un bloqueo de la producción de los intermediarios metabólicos para la síntesis de la Coenzima NAD.

**5. Cambios en el metabolismo de purinas:** SS bloquea el uso de la inosina en las células infectadas, con leves cambios en los niveles de hipoxantina, pero grandes en guanina.

En especial, la modificación de las dos rutas metabólicas mencionadas anteriormente explicaría los efectos leishmanioestáticos de las sustancias ensayadas.

**6. Generación de marcadores de infección:** Se encontraron varios metabolitos o procesos metabólicos que son marcadores de la infección por *L. amazonensis*, como la acumulación a 24 h de DHA, la captación de ácido adípico, metabolitos de la arginina (ornitina, hidroxiprolina) y del triptófano (ácido 3 indol-acético-IA3).

## **8. PERSPECTIVAS**

A través de esta tesis se ha demostrado que dos hidrazonas, solas o en combinación con una mezcla de saponinas tienen efecto curativo sobre la leishmaniasis cutánea en el modelo de hamsters, y que además estos compuestos actúan sobre diferentes blancos celulares así como en la relación célula hospedera-parásito. Sin embargo, aún quedan varias acciones por desarrollar para definir más claramente los blancos y los mecanismos de acción.

Entre estas acciones se encuentran:

- Conocer cuál es la proteasa o familia de proteasas sobre las que actúa cada una de las moléculas estudiadas.
- Estudiar los efectos sobre los complejos mitocondriales de *Leishmania* para determinar su especificidad.
- Analizar el modo como los tratamientos inducen el cambio de fenotipo en macrófagos infectados hacia un perfil proinflamatorio.
- Realizar ensayos *in vivo* para determinar citoquinas *in situ*, para estudiar la modulación de la respuesta inmune en las lesiones.
- Determinar la importancia del ácido adípico en la infección por *Leishmania*.
- Confirmar las hipótesis sobre el uso de las bases de purinas, en las cuales se sugiere que hay un bloqueo en el paso de inosina a hipoxantina, pero que el parásito compensa este efecto parcialmente con la sobre expresión de hipoxantina y guanina, es necesario realizar estudios de metabolómica diferencial con metabolitos intracelulares marcados.
- Estudiar las alteraciones en el metabolismo del triptófano a nivel del funcionamiento de transportadores en amastigotes y en macrófago, para explicar por qué no se da la captación de este aminoácido después de la administración de SS.



## **9. PRODUCTIVIDAD**

Además de que esta tesis se generó en varios proyectos de investigación financiados por la Universidad de Antioquia y COLCIENCIAS, también ha generado conocimiento apropiable por la sociedad, como se describe a continuación

#### ***Presentaciones en eventos***

- Actividad Leishmanicida *in vitro* de una mezcla de hidrazonas derivadas de cromanos y sapogeninas triterpénicas de *Sapindus saponaria*, aproximaciones metabólicas. Yulieth Upegui, Luis Fernando Echeverri, Sara M Robledo. 4 Reunión Colombiana Leishmaniasis y Enfermedad de Chagas. Bogotá (Colombia) 1 - 3 abril 2019.
- Antileishmanial Activity of Synthetic Hydrazones and Natural Sapogenins Fernando Echeverri, Sara Robledo, Yulieth Upegui, Wiston Quiñones, Fernando Torres, Gustavo Escobar, Rosendo Archbold. Elsevier. 20th Tetrahedron Symposium, Bangkok (Thailandia), Junio 18-21, 2019
- *In vitro* studies of *Leishmania* spp death caused by the combined application of *Sapindus saponaria* triterpene sapogenins and chroman's derived hydrazones. Yulieth A. Upegui Zapata, Fernando Echeverri, Wiston Quiñones, Montserrat Nacher, Luis I. Rivas López, Sara M. Robledo. CSIC. I Euroindoamerican Natural Products Meeting, Madrid del 29 de mayo al 1 de Junio, 2018.
- Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo como modo de muerte de amastigotes de *Leishmania* spp. producida por la mezcla de hidrazonas derivadas de cromanos y sapogeninas triterpénicas de *Sapindus saponaria*. Yulieth Alexandra Upegui Zapata, Montserrat Nacher, Luis I. Rivas López, Wiston Quiñones, Luis Fernando Echeverri, Sara María Robledo Restrepo. Tercera Reunión Colombiana de Leishmaniasis y enfermedad de Chagas y XVI Simposio PECET: Avances en la investigación de enfermedades tropicales, Medellín del 21 al 23 de marzo de 2018.

### ***Publicaciones***

- Vargas E, Echeverri F, Upegui YA, Robledo SM, Quiñones W. Hydrazone Derivatives Enhance Antileishmanial Activity of Thiochroman-4-ones. *Molecules*. 2017 29, 23 (1). pii: E70.
- **Upegui Y**, Rios K, Quiñones Wiston, Echeverri F, Archold R, Murillo JD, Torres F, Escobar G, Vélez ID, Robledo SM. Chroman-4-one hydrazones derivatives: synthesis, characterization, and in vitro and in vivo antileishmanial effects. *Medicinal chemistry research*. 2019. 28(12): 2184–99.
- **Upegui YA**, Echeverri F, Quiñones W, Torres F, Nacher M, Rivas L, dos Santos Meira C, Gedamu L Escobar G, Archbold R, velez ID, Robledo SM. Mode of action of a formulation containing hydrazones and saponins against leishmania spp. Role in mitochondria, proteases and reinfection process. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2020, 13: 94–106

## **10. BIBLIOGRAFÍA**

- Anderson CF, Mosser DM. A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J Leukoc Biol.* 2002. 72(1):101-6.
- Abdulla MH, O'Brien T, Mackey ZB, Sajid M, Grab DJ, McKerrow JH. RNA interference of *Trypanosoma brucei* cathepsin B and L affects disease progression in a mouse model. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008. 2(9): e298.
- Akhouni M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016.10(3): e0004349.
- Alexander J, Coombs GH, Mottram JC. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J Immunol.* 1998. 161: 6794–6801.
- Al-Kahraman YM, Yasinzi M, Singh GS. Evaluation of some classical hydrazones of ketones and 1,2-diketones as antileishmanial, antibacterial and antifungal agents. *Arch. Pharm. Res.* 2012. 35(6):1009–13.
- Arango Duque G, Descoteaux A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol.* 2014. 5:491.
- Banerjee S, Mukherjee N, Gajbhiye RL, Mishra S, Jaisankar P, Datta S, Das Saha K. Intracellular anti-leishmanial effect of Spergulin-A, a triterpenoid saponin of *Glinus oppositifolius*. *Infect Drug Resist.* 2019 .12:2933-42.
- Bengs F, Scholz A, Kuhn D, Wiese M. LmxMPK9, a mitogen-activated protein kinase homologue affects flagellar length in *Leishmania mexicana*. *MolMicrobiol.* 2005. 55:1606–15.
- Besteiro S, Williams RA, Coombs GH, Mottram JC. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol.* 2007. 37: 1063–75.
- Braga, AS, Toledo Junior AC, Rabello A. Factors of poor prognosis of visceral leishmaniasis among children under 12 years of age. A retrospective monocentric study in Belo Horizonte, State of Minas Gerais, Brazil, 2001–2005. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013. 46(1):55–59.
- Boitz JM, Ullman B, Jardim A, Carter NS. Purine salvage in *Leishmania*: complex or simple by design?. *Trends Parasitol.* 2012. 28(8):345-52.
- Cairo G, Recalcati S, Mantovani A, Locati M. Iron trafficking and metabolism in macrophages: contribution to the polarized phenotype. *Trends Immunol.* 2011. 32:241–7.
- Carlsen ED, Liang Y, Shelite TR, Walker DH, Melby PC, Soong L. Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 2015.182(2):109-18.
- Carvalho L, Luque-Ortega JR, López-Martín C, Castanys S, Rivas L, Gamarro F. The 8 aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011. 55(9):4204-10.
- Cecílio P, Pérez-Cabezas B, Santarém N, Maciel J, Rodrigues V, Cordeiro da Silva A. Deception and manipulation: the arms of leishmania, a successful parasite. *Front Immunol.* 2014. 5:480.

- Chatelain, E., Don, R. Drug discovery for neglected diseases: View of a public-private partnership In Antiparasitic Antibacterial Drug Discovery by Paul M. Selzer (Ed) Wiley – VCH. 2009. 3: 33-43
- Chawla B, Madhubala R. Drug targets in *Leishmania*. J Parasit Dis. 2010. 34(1):1-13.
- Coimbra ES, Antinarelli LM, da Silva AD, Bispo ML, Kaiser CR, de Souza MV. 7-Chloro-4-quinolinyl hydrazones: A promising and potent class of antileishmanial compounds. Chem. Biol. Drug Des. 2013. 81(5):658–65.
- Coimbra ES, Antinarelli LMR, de A Crispi M, Nogueira TCM, Pinheiro AC, de Souza MVN. Synthesis, Biological Activity, and Mechanism of Action of 2-Pyrazyl and Pyridylhydrazone Derivatives, New Classes of Antileishmanial Agents. ChemMedChem. 2018. 13(14):1387-1394.
- Correa E, Quiñones W, Robledo SM, Carrillo L, Archbold R, Torres F, Escobar G, Herrera N, Echeverri F. Leishmanicidal and trypanocidal activity of *Sapindus saponaria*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 2014. 13(4): 311-23.
- Covarrubias A, Byles V, Horng. ROS sets the stage for macrophage differentiation. Cell Res. 2013. 23(8):984-5.
- Croft, S. L., Coombs, G.H. Leishmaniasis- current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. Trends in parasitology. 2003. 19: 504-508.
- Cuervo P, Sabóia-Vahia L, Costa Silva-Filho F, Fernandes O, Cupolillo E, DE Jesus JB. A zymographic study of metalloprotease activities in extracts and extracellular secretions of *Leishmania (Viannia) braziliensis* strains. Parasitology. 2006.132(Pt 2):177-85.
- Davies DR, Mushtaq A, Interthal H, Champoux JJ, Hol WG. The structure of the transition state of the heterodimeric topoisomerase I of *Leishmania donovani* as a vanadate complex with nicked DNA. J Mol Biol. 2006. 357:1202– 10.
- De Souza W, Attias M, Rodrigues JC. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). Int J Biochem Cell Biol. 2009. 41(10):2069-80.
- Dastgheib L, Naseri M, Mirashe Z. Both combined oral azithromycin plus allopurinol and intramuscular Glucantime yield low efficacy in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: a randomized controlled clinical trial. Int J Dermatol. 2012. 51(12):1508-11.
- Desai PV, Patny A, Sabnis Y, Tekwani B, Gut J, Rosenthal P, Srivastava A, Avery M. Identification of novel parasitic cysteine protease inhibitors using virtual screening. 1. The ChemBridge Database. J.Med. Chem. 2004. 47: 6609–15.
- Docampo R, Moreno SN. The acidocalcisome. Molecular and biochemical parasitology. 2001. 114(2):151–159.
- Dostálová A, Volf P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. Parasit Vectors. 2012. 5:276.
- Echeverri, F, Quiñones, W., Torres, F., Archbold, R., Escobar, G., Robledo, S., Velez, ID, Muñoz, D., Restrepo, A., Daza, J., Pulido, S., Correa, E. 2015. Patente USPTO 9168268 B1. Saponins and

chromans derivatives compositions against leishmaniasis, trypanosomiasis americana, malaria, trypanosomiasis africana and *Fasciola hepatica*

- El Fadili K, Messier N, Leprohon P, Roy G, Guimond C, Trudel N, Saravia NG, Papadopoulou B, Légaré D, Ouellette M. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005. 49:1988-93.
- El-Sayed M, Anwar AE. Intralesional sodium stibogluconate alone or its combination with either intramuscular sodium stibogluconate or oral ketoconazole in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis: a comparative study. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010. 24(3):335-40.
- Emami S, Ghanbarimasir Z. Recent advances of chroman-4-one derivatives: synthetic approaches and bioactivities. *Eur J Med Chem.* 2015. 93:539-63.
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells *in vitro* inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Investigat.* 1998. 101(4):890-8.
- Firooz A, Khamesipour A, Ghoorchi MH, Nassiri-Kashani M, Eskandari SE, Khatami A, Hooshmand B, Gorouhi F, Rashighi-Firoozabadi M, Dowlati Y. Imiquimod in combination with meglumine antimoniate for cutaneous leishmaniasis: a randomized assessor-blind controlled trial. *Arch Dermatol.* 2006. 142(12):1575-9.
- Frézard F, Demicheli C, Ribeiro R. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. *Molecules.* 2009. 14(7): 2317-36.
- Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, Helft J, Chow A, Elpek KG, Gordonov S, Mazloom AR, Ma'ayan A, Chua WJ, Hansen TH, Turley SJ, Merad M, Randolph GJ. Immunological Genome Consortium. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol.* 2012. 13(11):1118-28.
- Gazanion E, Garcia D, Silvestre R, Gérard C, Guichou JF, Labesse G, Seveno M, Cordeiro-Da-Silva A, Ouaiissi A, Sereno D, Vergnes B. The *Leishmania* nicotinamidase is essential for NAD<sup>+</sup> production and parasite proliferation. *Mol Microbiol.* 2011. 82(1):21-38.
- Geraldo MV, Silber AM, Pereira CA, Uliana SR. Characterisation of a developmentally regulated amino acid transporter gene from *Leishmania amazonensis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2005. 242: 275-80.
- Godinho JL, Georgikopoulou K, Calogeropoulou T, de Souza W, Rodrigues JC. A novel alkyl phosphocholine-dinitroaniline hybrid molecule exhibits biological activity *in vitro* against *Leishmania amazonensis*. *Exp Parasitol.* 2013. 135(1):153-65.

- Gourbal B, Sonuc N, Bhattacharjee H, Legare D, Sundar S, Ouellette M, et al. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J Biol Chem*. 2004. 279:31010-7.
- Hendrickx S, Inocência da Luz RA, Bhandari V, Kuypers K, Shaw CD, Lonchamp J, Salotra P, Carter K, et al. Experimental induction of paromomycin resistance in antimony-resistant strains of *L. donovani*: outcome dependent on in vitro selection protocol. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012. 6(5): e1664.
- Inocencia da Luz RA, Vermeersch M, Deschacht M, Hendrickx S, Van Assche T, Cos P, Maes L. In vitro and in vivo prophylactic and curative activity of the triterpene saponin PX-6518 against cutaneous *Leishmania* species. *J Antimicrob Chemother*. 2011. 66(2):350-3.
- Instituto Nacional de Salud. Informe de evento Leishmaniasis cutánea, mucosa y visceral. Colombia 2018. [Citado 13 de Julio de 2019].
- Iorio F, Bosotti R, Scacheri E, Belcastro V, Mithbaokar P, Ferriero R, Murino L, Tagliaferri R, Brunetti-Pierri N, Isacchi A, di Bernardo D. Discovery of drug mode of action and drug repositioning from transcriptional responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. 107(33):14621-6.
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 2005. 309: 436–42.
- Kilpatrick LE, Sun S, Mackie D, Baik F, Li H, Korchak HM. Regulation of TNF mediated antiapoptotic signaling in human neutrophils: role of delta-PKC and ERK1/2. *J Leukoc Biol*. 2006. 80(6):1512–21.
- Krishnan S, Ding Y, Saedi N, Choi M, Sridharan GV, Sherr DH, Yarmush ML, Alaniz RC, Jayaraman A, Lee K. Gut Microbiota-Derived Tryptophan Metabolites Modulate Inflammatory Response in Hepatocytes and Macrophages. *Cell Rep*. 2018. 23(4):1099-1111
- Landfear SM. Molecular genetics of nucleoside transporters in *Leishmania* and African trypanosomes. *Biochem Pharmacol*. 2001. 62: 149–55.
- Liu W, Boitz JM, Galazka J, Arendt CS, Carter NS, Ullman B. Functional characterization of nucleoside transporter gene replacements in *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 2006. 150: 300–7.
- Losieau PM, Bories C. Mechanism of drug action and drug resistance in *Leishmania* as basis for therapeutic target identification and design of antileishmanial modulators. *Curr Trop Med Chem*. 2006. 6:539-50.
- Luque-Ortega JR, Rivero-Lezcano OM, Croft SL, Rivas L. *In vivo* monitoring of intracellular ATP levels in *Leishmania donovani* promastigotes as a rapid method to screen drugs targeting bioenergetic metabolism. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001. 45(4):1121-5.
- Luque-Ortega JR, Rivas L, Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2007. 51:1327–32.



- Luque-Ortega JR, Rivas L. Characterization of the leishmanicidal activity of antimicrobial peptides. *Methods Mol Biol.* 2010. 618:393-420.
- Lyra MR, Passos SR, Pimentel MI, Bedoya-Pacheco SJ, Valete-Rosalino CM, Vasconcellos EC, Antonio LF, Saheki MN, Salgueiro MM, Santos GP, Ribeiro MN, Conceição-Silva F, Madeira MF, Silva JL, Fagundes A, Schubach AO. Pancreatic toxicity as an adverse effect induced by meglumine antimoniate therapy in a clinical trial for cutaneous Leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2016. 58:68.
- Machado PA, Carneiro MPD, Sousa-Batista AJ, Lopes FJP, Lima APCA, Chaves SP, Sodero ACR, de Matos Guedes HL. Leishmanicidal therapy targeted to parasite proteases. *Life Sci.* 2019. 219:163-81.
- Machado PRL, Ribeiro CS, França-Costa J, Dourado MEF, Trinconi CT, Yokoyama-Yasunaka JKU, Malta-Santos H, Borges VM, Carvalho EM, Uliana SRB. Tamoxifen and meglumine antimoniate combined therapy in cutaneous leishmaniasis patients: a randomised trial. *Trop Med Int Health.* 2018. 23(9):936-942.
- Makala LH, Baban B, Lemos H, El-Awady AR, Chandler PR, Hou DY, Munn DH, Mellor AL. *Leishmania major* attenuates host immunity by stimulating local indoleamine 2,3-dioxygenase expression. *J Infect Dis.* 2011. 203(5):715–25.
- Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol.* 2006. 177:7303–11.
- Maurer M, Dondji B, von Stebut E. What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol.* 2009. 198(3):137 - 46.
- Maurer M, Lopez Kostka S, Siebenhaar F, Moelle K, Metz M, Knop J, et al. Skin mast cells control T cell-dependent host defense in *Leishmania major* infections. *FASEB J.* 2006. 20(14): 2460-7.
- McConville MJ, de Souza D, Saunders E, Likic VA, Naderer T. Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. *Trends Parasitol.* 2007. 23(8):368-75.
- McConville MJ, Naderer T. Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol.* 2011. 65: 543–561.
- Mehta A, Shaha C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *J Biol Chem.* 2004. 279(12):11798-813.
- Melo TS, Gattass CR, Soares DC, Cunha MR, Ferreira C, Tavares MT, Saraiva E, Parise-Filho R, Braden H, Delorenzi JC. Oleonic acid (OA) as an antileishmanial agent: Biological evaluation and in silico mechanistic insights. *Parasitol Int.* 2016. 65(3):227-37.
- Menna-Barreto RF, de Castro SL. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. *Biomed Res Int.* 2014. 2014:614014.

- Mesa CV, Muñoz DL, Echeverry M, Velez ID, Robledo SM. Susceptibilidad in vitro a infección por *Leishmania* y sensibilidad a medicamentos difiere según tipo de macrófagos. Rev. Univ. Ind. Santander. Salud. 2010. 42(3): 200-11.
- Mesquita I, Varela P, Belinha A, Gaifem J, Laforge M, Vergnes B, Estaquier J, Silvestre R. Exploring NAD<sup>+</sup> metabolism in host-pathogen interactions. Cell Mol Life Sci. 2016. 73(6):1225-36.
- Momeni AZ, Reiszadae MR, Aminjavaheri M. Treatment of cutaneous leishmaniasis with a combination of allopurinol and low- dose meglumine antimoniate. International Journal of Dermatology. 2002. 41(7):441- 3.
- Monzote L, Stamberg W, Patel A, Rosenau T, Maes L, Cos P, Gille L. Synthetic Chromanol Derivatives and Their Interaction with Complex III in Mitochondria from Bovine, Yeast, and *Leishmania*. Chemical Research in Toxicology. 2011. 24 (10): 1678-85.
- Moreira D, Rodrigues V, Abengozar M, Rivas L, Rial E, Laforge M, Li X, Foretz M, Viollet B, Estaquier J, Cordeiro da Silva A, Silvestre R. *Leishmania infantum* modulates host macrophage mitochondrial metabolism by hijacking the SIRT1-AMPK axis. PLoS Pathog. 2015. 11(3): e1004684.
- Moreno J, Alvar J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. Trends Parasitol. 2002. 18: 399–405.
- Naderer T, McConville MJ. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. Cell Microbiol. 2008. 10: 301–8.
- Odegaard JI, Chawla A. Alternative macrophage activation and metabolism. Annu Rev Pathol. 2011. 6:275–97.
- Oh SJ, Lee S, Kho YE, Kim K, Jin CD, Lim CJ. Stereoselective suppressive effects of protopanaxadiol epimers on UV-B-induced reactive oxygen species and matrix metalloproteinase-2 in human dermal keratinocytes. Can J Physiol Pharmacol. 2015. 93(1):91-5.
- Pace D. Leishmaniasis. J Infect. 2014. 69 Suppl 1: S10-8.
- Paila YD, Saha B, Chattopadhyay A. Amphotericin B inhibits entry of *Leishmania donovani* into primary macrophages. Biochem Biophys Res Commun. 2010. 399:429-33.
- Palacios G, Parodi A, Upegui YA, Montoya A, Pulido S, Vélez ID, Robledo SM. Studies in vitro on infectivity and sensitivity to antileishmanial drugs in New World *Leishmania* species transfected with the green fluorescent protein [pIR3(-)-eGFP]. Parasitology. 2017. 144(13):1718-25.
- Paloque L, Perez-Berezo T, Abot A, Dalloux-Chioccioli J, Bourgeade-Delmas S, Le Faouder P, Pujol J, Teste MA, François JM, Schebb NH, Mainka M, Rolland C, Blanpied C, Dietrich G, Bertrand-Michel J, Deraison C, Valentin A, Cenac N. Polyunsaturated fatty acid metabolites: biosynthesis in *Leishmania* and role in parasite/host interaction. J Lipid Res. 2019. 60(3):636-47.
- Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, Peters N, Adlem E, Tivey A, Aslett M, Kerhornou A, Ivens A, Fraser A, Rajandream MA, Carver T, Norbertczak H, Chillingworth T, Hance Z, Jagels K, Moule S, Ormond D, Rutter S, Squares R, Whitehead S, Rabbinowitsch E,

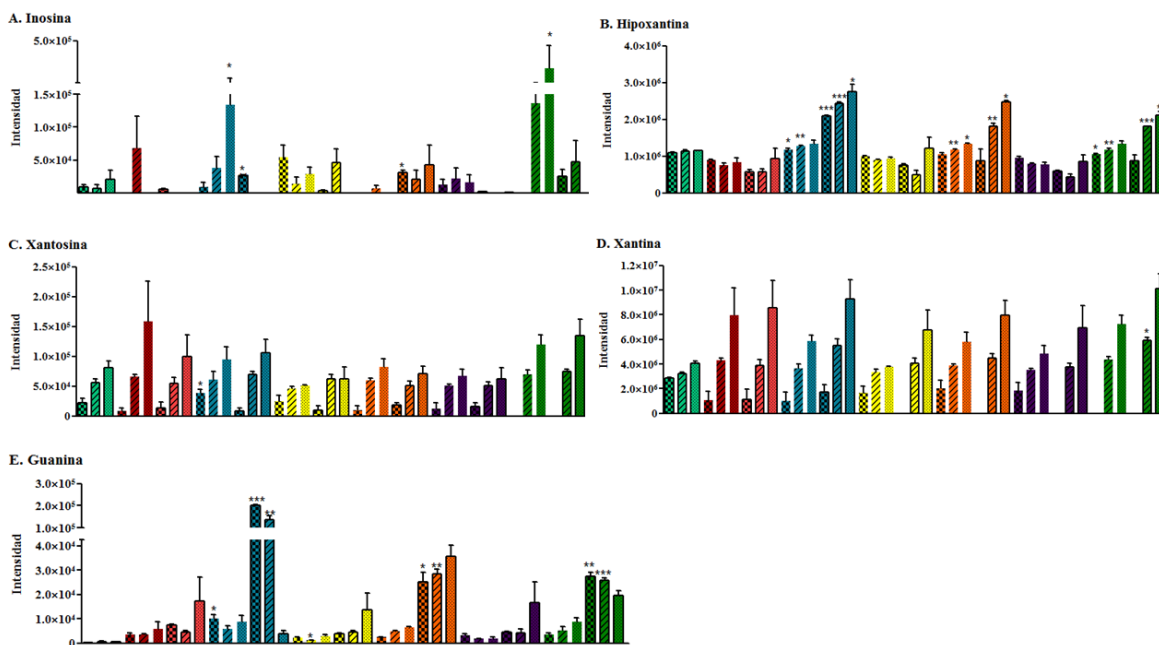
- Arrowsmith C, White B, Thurston S, Bringaud F, Baldauf SL, Faulconbridge A, Jeffares D, Depledge DP, Oyola SO, Hilley JD, Brito LO, Tosi LR, Barrell B, Cruz AK, Mottram JC, Smith DF, Berriman M. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet.* 2007. 39(7):839-47.
- Puig-Kroger A, Sierra-Filardi E, Dominguez-Soto A, Samaniego R, Corcuera MT, Gomez-Aguado F, et al. Folate receptor beta is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory macrophages. *Cancer Res.* 2009. 69:9395–403.
  - Pulido SA, Muñoz DL, Restrepo AM, Mesa CV, Alzate JF, Vélez ID, Robledo SM. Improvement of the green fluorescent protein reporter system in *Leishmania* spp. for the *in vitro* and *in vivo* screening of antileishmanial drugs. *Acta Trop.* 2012. 122: 36-45.
  - Rajasekaran R, Chen YP. Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. *Drug Discov Today.* 2015. 20(8):958-68.
  - Ravichandran KS. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *J Exp Med.* 2010. 207(9):1807–17.
  - Reguera RM, Calvo-Álvarez E, Alvarez-Velilla R, Balaña-Fouce R. Target-based vs. phenotypic screenings in *Leishmania* drug discovery: A marriage of convenience or a dialogue of the deaf?. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2014. 4(3):355-7.
  - Roberts SC, Tancer MJ, Polinsky MR, Gibson KM, Heby O, Ullman B. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. *J Biol Chem.* 2004. 279: 23668–78.
  - Rogers MB, Hilley JD, Dickens NJ, Wilkes J, Bates PA, Depledge DP, Harris D, Her Y, Herzyk P, Imamura H, Otto TD, Sanders M, Seeger K, Dujardin JC, Berriman M, Smith DF, Hertz-Fowler C, Mottram JC. Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Res.* 2011. 21(12):2129-42.
  - Robledo SM, Carrillo LM, Daza A, Restrepo AM, Muñoz DL, Tobón J, Murillo JD, López A, Ríos C, Mesa CV, Upegui YA, Valencia-Tobón A, Mondragón-Shem K, Rodríguez B, Vélez ID. Cutaneous leishmaniasis in the dorsal skin of hamsters: a useful model for the screening of antileishmanial drugs. *J Vis Exp.* 2012. 62, pii: 3533.
  - Rodrigues J.C.F, de Souza W. Ultrastructural alterations in organelles of parasitic protozoan induced by different classes of metabolic inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* 2008. 14(9): 925-938.
  - Romero M, Sánchez J. Una mirada a la epidemiología y al control de la leishmaniasis zoonótica en Colombia. *Biosalud.* 2007. 6: 99-111.
  - Romero AH, López SE. In silico molecular docking studies of new potential 4-phthalazinyl-hydrazones on selected *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* enzyme targets. *J Mol Graph Model.* 2017. 76:313-29.
  - Rosenthal PJ. Antimalarial drug discovery: Old and new approaches. *J Exp Biol.* 2003. 206 (21):3735 – 44.

- Sadeghian G, Nilforoushzadeh MA. Effect of combination therapy with systemic glucantime and pentoxifylline in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Dermatology*. 2006. 45(7):819- 21.
- Salgado-Almario J, Hernández CA, Ovalle CE. Geographical distribution of *Leishmania* species in Colombia, 1985-2017. *Biomédica*. 2019. 39: 278-90.
- Santos WR, Bernardo RR, Peçanha LM, Palatnik M, Parente JP, Palatnik de Sousa CB. Haemolytic activities of plant saponins and adjuvants. Effect of *Periandra mediterranea* saponin on the humoral response to the FML antigen of *Leishmania donovani*. *Vaccine*. 1997. 15(9):1024-9.
- Saunders EC, Ng WW, Kloehn J, Chambers JM, Ng M, McConville MJ. Induction of a stringent metabolic response in intracellular stages of *Leishmania mexicana* leads to increased dependence on mitochondrial metabolism. *PLoS Pathog*. 2014. 10(1):e1003888.
- Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 2016. 16(9):581-92.
- Singh N, Kumar M, Singh RK. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med*. 2012. 5(6):485-97.
- Singh, S., Sivakumar, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother*. 2004. 10:307-315.
- Silva-Almeida M, Souza-Silva F, Pereira BA, Ribeiro-Guimarães ML, Alves CR. Overview of the organization of protease genes in the genome of *Leishmania* spp. *Parasit Vectors*. 2014. 20(7):387.
- S L Figueiredo de Sá B, Rezende AM, Melo Neto OP, Brito MEF, Brandão Filho SP. Identification of divergent *Leishmania (Viannia) braziliensis* ecotypes derived from a geographically restricted area through whole genome analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019. 13(6):e0007382.
- Somanna A, Mundodi V, Gedamu L. Functional analysis of cathepsin B-like cysteine proteases from *Leishmania donovani* complex. Evidence for the activation of latent transforming growth factor beta. *J Biol Chem*. 2002. 277(28):25305-12.
- Sudhandiran G, Shaha C. Antimonial-induced increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J Biol Chem*. 2003. 278(27):25120-32.
- Sundar S. Drug resistance in indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health*. 2001. 6(11):849–54.
- Sundar S, Chakravarty J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. *Expert Opin Pharmacother*. 2013. 14(1):53–63.
- Sundar S, Chakravarty J, Agarwal D, Rai M, Murray HW. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med*. 2010. 362(6): 504–12.
- Sundar S, Singh B. Emerging therapeutic targets for treatment of leishmaniasis. *Expert Opin Ther Targets*. 2018. 22(6):467-486.

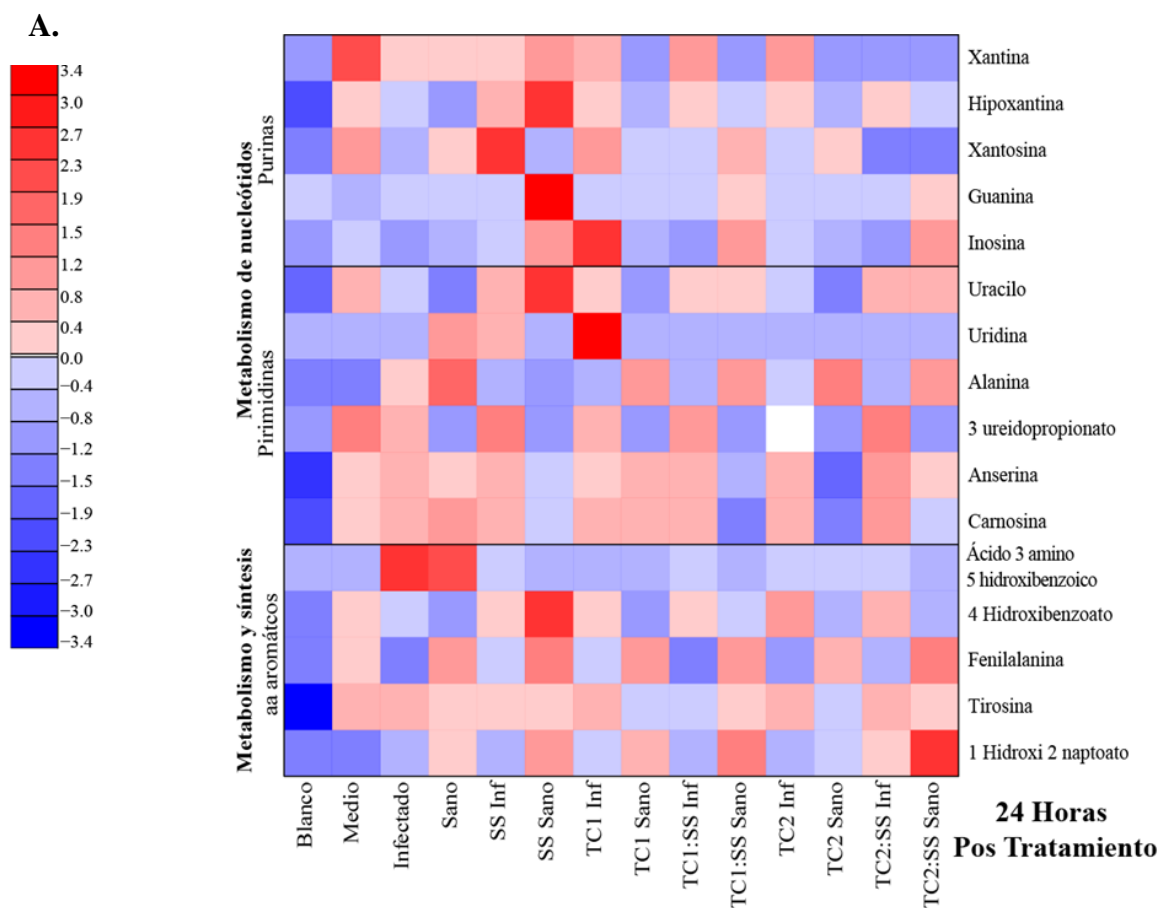
- Sunter J, Gull K. Open Biol. Correction to ‘Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding’. 2018. 8(8): 180134.
- Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, et al. Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. Nature. 2013. 496:238–42.
- Torres DC, Aداui V, Ribeiro-Alves M, Romero GA, Cupolillo E, Dujardin JC, et al. Targeted gene expression profiling in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania guyanensis* parasites isolated from Brazilian patients with different antimonial treatment outcomes. Infect Genet Evol. 2010. 10:727-33.
- Upegui Y, Gil JF, Quiñones W, Torres F, Escobar G, Robledo SM, Echeverri F. Preparation of rotenone derivatives and *in vitro* analysis of their antimalarial, antileishmanial and selective cytotoxic activities. Molecules. 2014. 19(11):18911-22.
- Upegui Y, Rios K, Quiñones Wiston, Echeverri F, Archold R, Murillo JD, Torres F, Escobar G, Vélez ID, Robledo SM. Chroman-4-one hydrazones derivatives: synthesis, characterization, and *in vitro* and *in vivo* antileishmanial effects. Medicinal chemistry research. 2019. 28(12): 2184–99.
- Van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. Bull World Health Organ. 1972. 46(6):845-52.
- Van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. J Immunol. 2004. 173(11):6521-5.
- Vargas E, Echeverri F, Upegui YA, Robledo SM, Quiñones W. Hydrazone Derivatives Enhance Antileishmanial Activity of Thiochroman-4-ones. Molecules. 2018. 23(70): 1-12.
- Vélez ID, Jiménez A, Vásquez D, Robledo SM. Disseminated Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: Report of 27 Cases. Case Rep Dermatol. 2015. 7(3):275-86.
- Vercesi AE, Rodrigues CO, Catisti R, Docampo R. Presence of a Na(+)/H(+) exchanger in acidocalcisomes of *Leishmania donovani* and their alkalization by anti-leishmanial drugs. FEBS Lett. 2000. 473(2):203-6.
- Vickers TJ, Greig N, Fairlamb AH. A trypanothione-dependent glyoxalase I with a prokaryotic ancestry in *Leishmania major*. Proc Natl AcadSci USA. 2004. 101:13186–91.
- World health Organisation. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26 March 2010. WHO Technical Report Series 949.
- Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease. Nature. 2013. 496(7446): 445–55.
- Zhang K, Hsu FF, Scott DA, Docampo R, Turk J, Beverley SM. *Leishmania* salvage and remodelling of host sphingolipids in amastigote survival and acidocalcisome biogenesis. Mol. Microbiol. 2005. 55: 1566–78.

## **11. MATERIAL SUPLEMENTARIO.**

**S1: Datos completos - análisis totalidad metabólica. Archivo de Excel.**



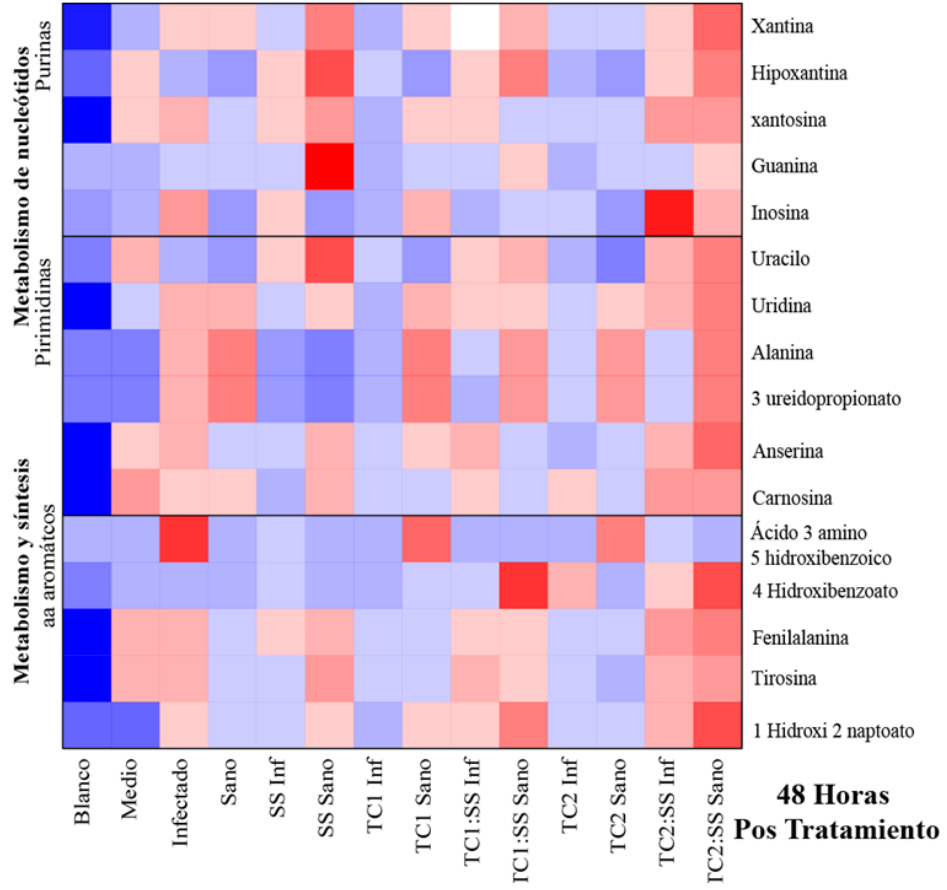
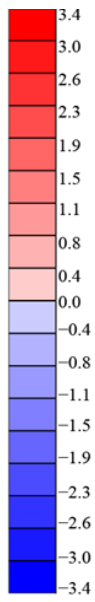
**Figura S1. Afectación del metabolismo de purinas por las moléculas.** Tiempos de evaluación: 24H 48H 72H Análisis T student \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$ , comparación entre cada grupo de tratamiento versus control infectado: barras sin borde o control sin infección: barras con borde. Verde esmeralda: Medio. Rojo: Células infectadas. Rosado: Células sin infección. Azul: SS. Amarillo: TC1. Naranja: TC1:SS. Morado: TC2. Verde oscuro: TC2:SS.

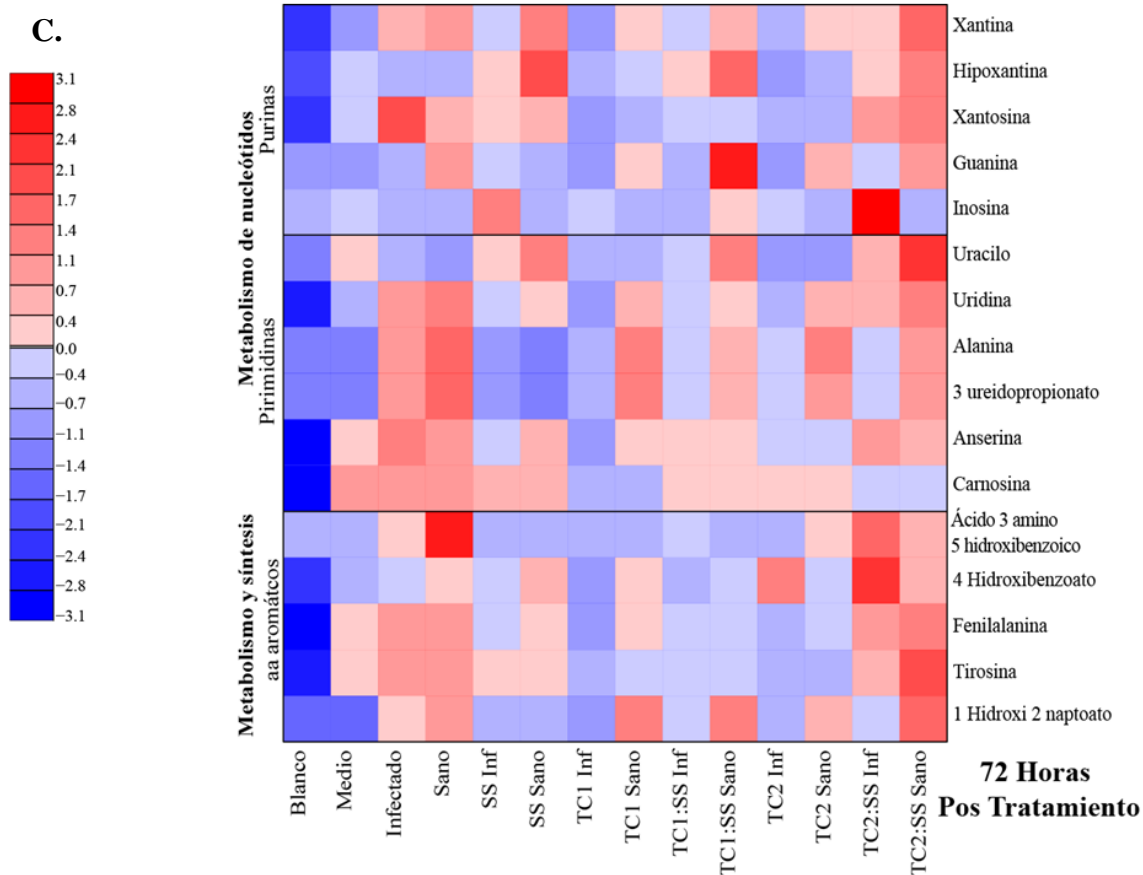


**Figura S2. Alteración del metabolismo de purinas en células con y sin infección con *L. amazonensis* tratadas con SS.** Tiempos de evaluación: 24H 48H 72H Análisis T student \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.01$  \*\*\*  $p < 0.001$ , comparación entra cada grupo de tratamiento versus su Ci o Ni en cada periodo de tiempo. Barras con borde: Células infectadas (Ci), Barras sin borde: Células sin infección (Ni). Rojo: Ci. Rosa: Ni. Azul: SS. Amarillo: TC1. Naranja: TC1:SS. Morado: TC2. Verde: TC2:SS.

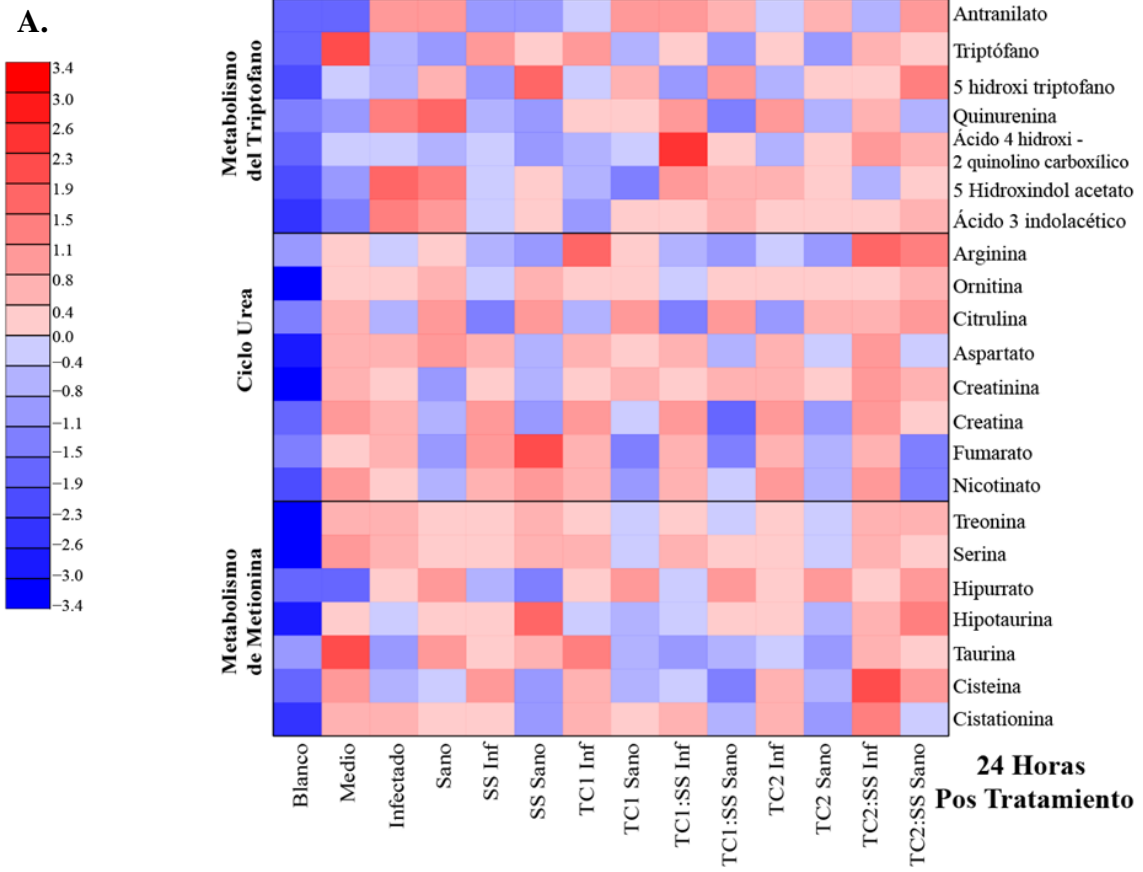


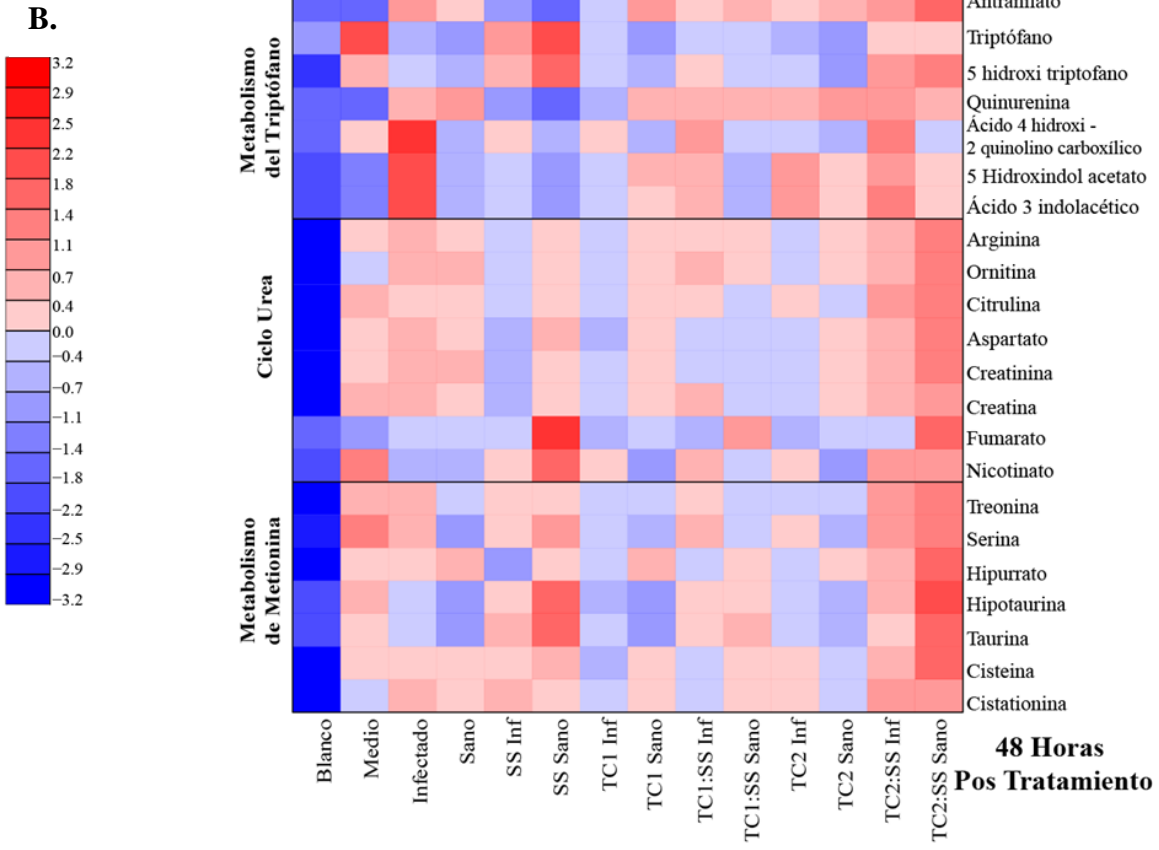
**B.**

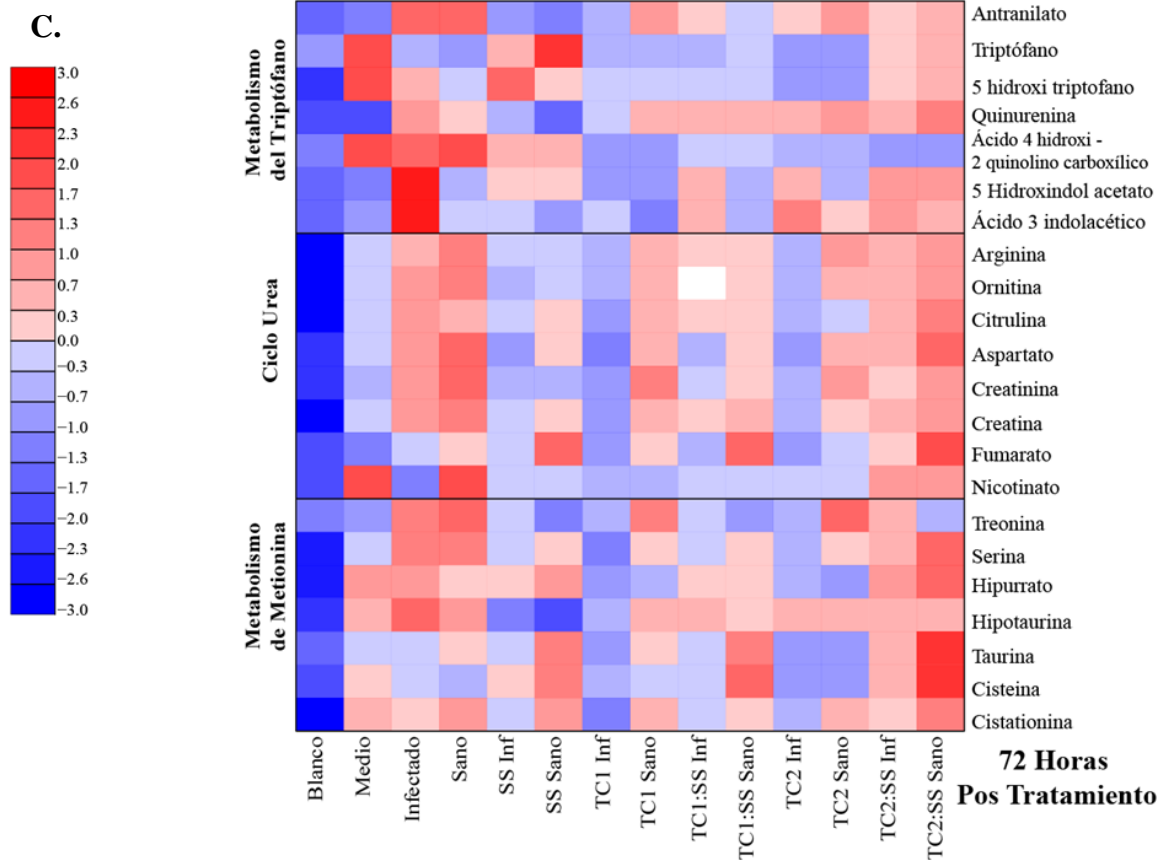




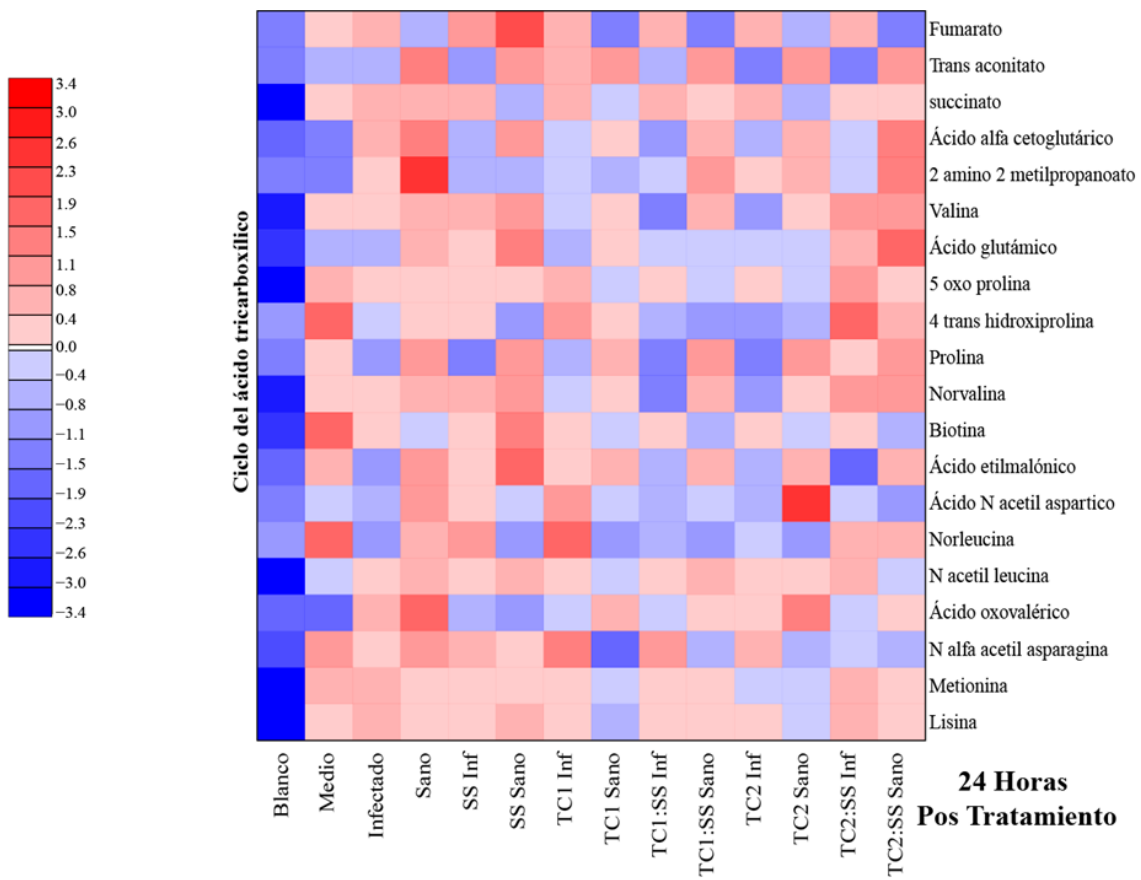
**Figura S3. Metabolismo y síntesis de nucleótidos y aminoácidos aromáticos.** La figura muestra el mapa de calor resultado del análisis del exometaboloma de células con y sin infección por *L. amazonensis* tratadas con TC1, TC2, SS solas o en combinación 1:1 (hidrazona:saponina). En escala de color se encuentran las intensidades de cada metabolito normalizadas. Puntos de evaluación pos tratamiento: A. 24H, B. 48H, C. 72H.

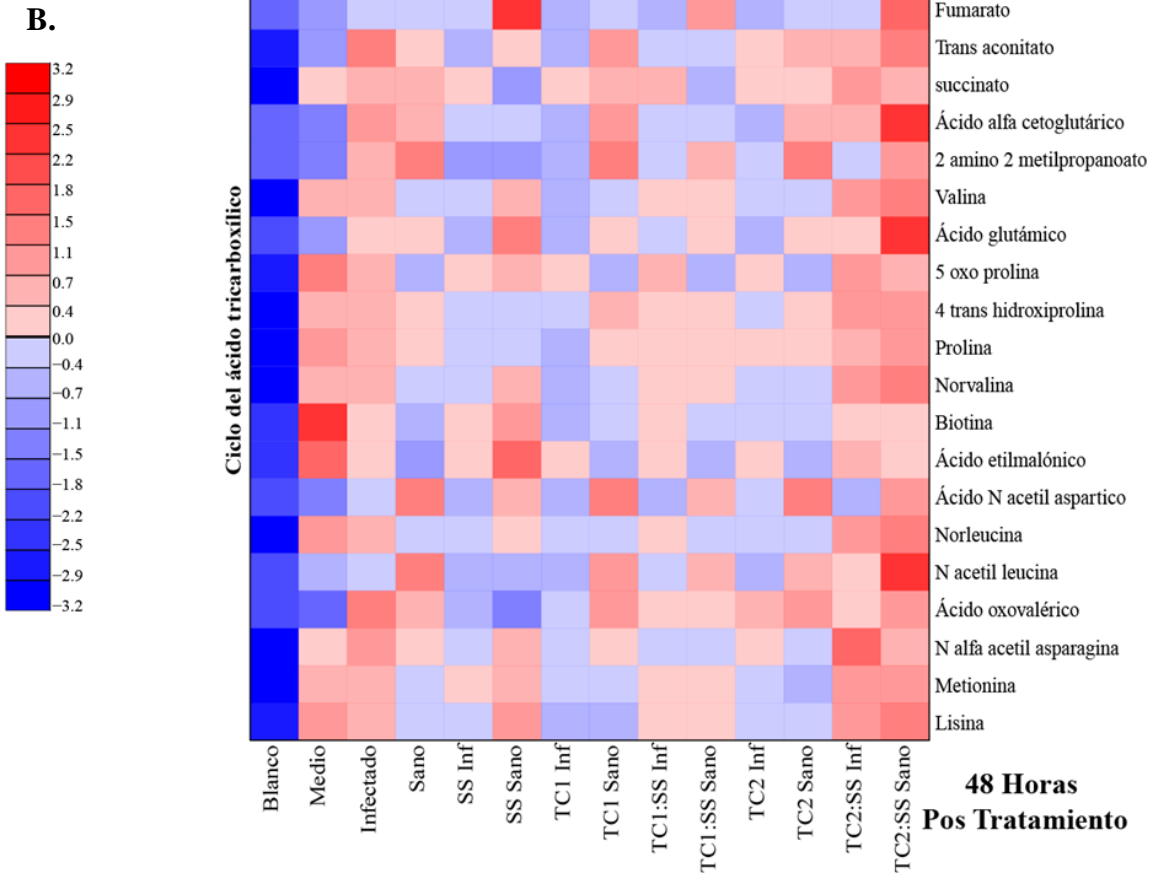


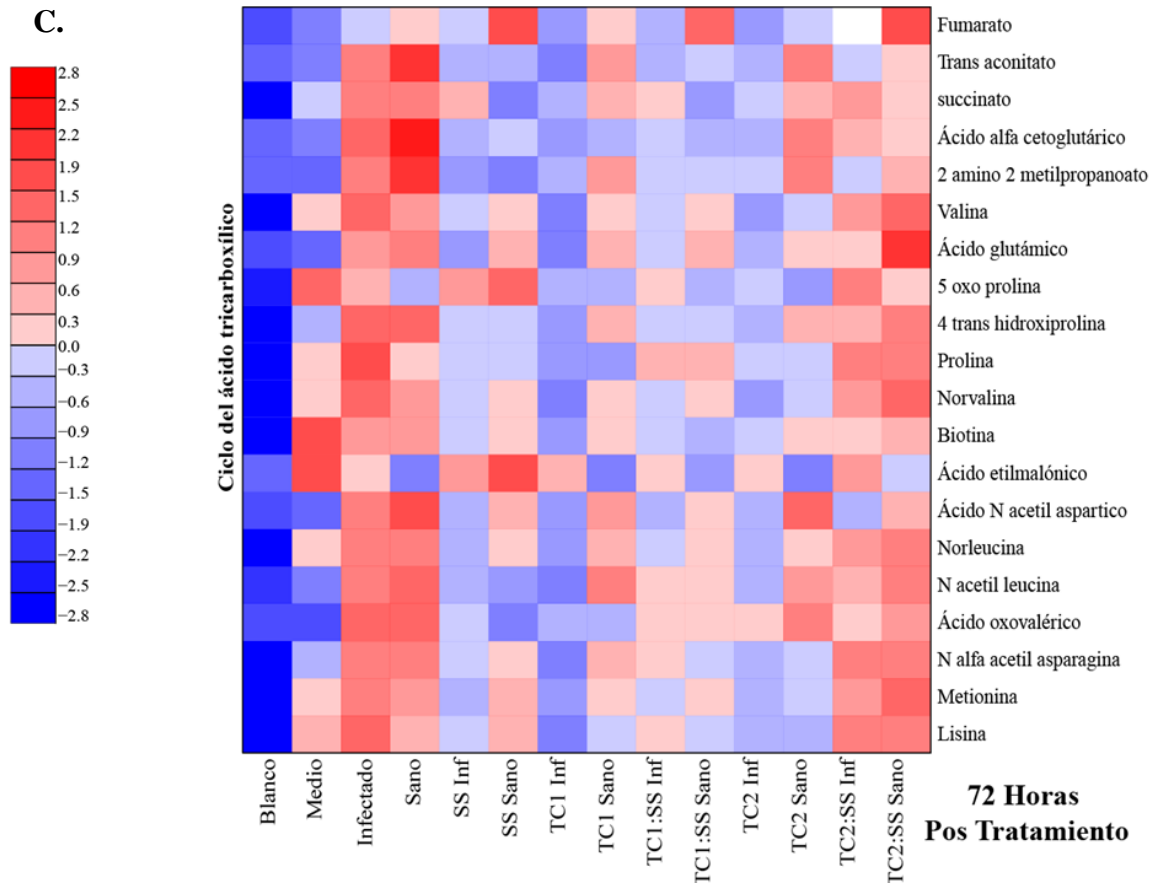




**Figura S4. Metabolismo del Triptófano, Arginina y Metionina.** La figura muestra el mapa de calor resultado del análisis del exometaboloma de células con y sin infección por *L. amazonensis* tratadas con TC1, TC2, SS solas o en combinación 1:1 (hidrazona:saponina). En escala de color se encuentran las intensidades de cada metabolito normalizadas. Puntos de evaluación pos tratamiento: A. 24H, B. 48H, C. 72H.







**Figura S5. Mapa de calor: Ciclo del Acido tricarbóxico.** La figura muestra los resultados del análisis del exometaboloma de células con y sin infección por *L. amazonensis* tratadas con TC1, TC2, SS solas o en combinación 1:1 (hidrazona:saponina). En escala de color se encuentran las intensidades de cada metabolito normalizadas. Puntos de evaluación pos tratamiento: A. 24h, B. 48h, C. 72h.