



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Evaluación de la actividad in vitro de 3 chalconas
sintéticas contra parásitos intracelulares de
*Leishmania infantum***

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Carlos Alberto YAURI CRUZ

ASESORES

Dr. César Máximo FUERTES RUITÓN

Mg. Denis Helan CASTILLO PAREJA

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Yauri, C. Evaluación de la actividad in vitro de 3 chalconas sintéticas contra parásitos intracelulares de *Leishmania infantum* [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2019.

HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

INFORMACIÓN GENERAL	
Título del Proyecto	Evaluación de la actividad <i>in vitro</i> de 3 chalconas sintéticas contra parásitos intracelulares de <i>Leishmania infantum</i>
Área de investigación (*)	Ciencias Farmacéuticas
Ubicación geográfica donde se desarrolla la investigación (incluir localidades y/o coordenadas geográficas)	<ul style="list-style-type: none"> • Av. Honorio Delgado 430, Urb Ingeniería, Lima - Perú • Jr. Puno N° 1002-Lima-Perú
Institución que financia si corresponde	Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT N° 144 - 2015 - DE) Instituto de Investigación para el Desarrollo de Francia (IRD)
Año o rango de años que abarcó	2016-2018
DATOS DEL TESISISTA	
Apellidos y Nombres	Yauri Cruz, Carlos Alberto
Número de matrícula	10040025
DNI	47624521
Indicar si es egresado o si aún está cursando estudios, de ser así especificar el año de estudios	Egresado
Código ORCID (opcional)	-
DATOS DEL ASESOR	
Apellidos y Nombres	Fuertes Ruitón, César Máximo
Código docente: 027154	Categoría: Principal Clase: Tiempo completo
Máximo grado alcanzado	Doctor
Código ORCID (obligatorio)	0000-0002-6170-3549
Título profesional	Químico Farmacéutico
Departamento Académico al que pertenece	Departamento de Química Básica y Aplicada
Instituto de investigación al que pertenece	Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara"
Grupo de investigación al que pertenece Indicar si es coordinador, miembro o adherente del grupo de investigación	Coordinador del Grupo Nature

(*) Según documentos oficiales de la Facultad



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

Evaluación de la actividad *in vitro* de 3 chalconas sintéticas contra parásitos intracelulares de *Leishmania infantum*

Que presenta el Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

CARLOS ALBERTO YAURI CRUZ

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

DECROCITO (8) SOBRESALIENTE

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 10 de octubre de 2019.

Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera
Presidente

Dr. Luis Miguel Visitación Félix Veliz
Miembro

Dr. Yovani Martín Condorhuamán Figueroa
Miembro

Mg. Nelson Bautista Cruz
Miembro

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"

DEDICATORIA

*Este trabajo se lo dedico a Dios por darme la vida, la fuerza de voluntad
y las oportunidades del día a día.*

*A mis padres, Carlos y María, por su inmenso amor,
por las enseñanzas de vivir en este mundo con valores
y de hacer las cosas con esfuerzo y pasión.*

Gracias a ambos por la vida maravillosa que me dieron

*A mis hermanitos Jhoel y Beberli, a quienes espero ser un buen ejemplo,
gracias por sus palabras y ser mi motivación.*

*A las personas que he conocido a lo largo del camino, quienes me han enseñado
el valor de la amistad, el trabajo en equipo y el calor de un segundo hogar.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de todo corazón:

*A mi querida Facultad, por la formación académica, los momentos vividos
y porque ahí conocí a un sin número de personas maravillosas;*

a todos ustedes gracias por todo lo vivido,

siempre estarán en mi corazón.

A mi asesor de tesis, el Dr. César Máximo Fuertes Ruytón, quien además de un

excelente maestro es un gran amigo;

a él le agradezco mi formación universitaria, sus sabios consejos

y el haberme formado y guiado en el camino de la investigación.

A los chicos del grupo de estudio A.S.E.D.I.R.E.N del cual formé parte: Gustavo, Pacla,

Resita, Renald, Alejandro, Liz, Ery, Rocío, Viviana, Carlitos, Heden, Kaysser,

gracias por su amistad y por permitir haberlos guiado en varias ocasiones.

A los doctores Michel Sauvain, Valérie Julian Vanessa Adawi y Denis Castillo

gracias por la oportunidad de ser parte de su equipo de investigación

y hacer este proyecto de tesis posible.

AL FONDECYT por el contrato que me otorgó para ser partícipe del proyecto

"Evaluación de Chalcenas contra el parásito intracelular Leishmania "

en el marco del cual desarrollé mi proyecto de tesis.

*A la M^c Inés Castro Duenicio quien en conjunto con la Dra. Valérie Julian permitieron
implicarme en la síntesis de los compuestos orgánicos evaluados en el proyecto*

*A los chicos del laboratorio 208 del LID- UPEL, Karina, Yesenia, Milagros, Maricruz,
Remina, Daniela, Manuel, Daniel, Kevin y Jesús. Gracias por su amistad
y por ese calor de hogar que me brindaron durante mi estancia en el LID- UPEL,
gracias por todas las enseñanzas que de ustedes aprendí.*

Fuente de Financiamiento:

Esta tesis fue desarrollada gracias al financiamiento del Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT), a través del Proyecto de Investigación “Evaluación de Chalconas contra el parásito intracelular Leishmania” (FONDECYT N° 144 - 2015 - DE) en colaboración con el Instituto de Investigación para el Desarrollo de Francia (IRD)

ABREVIATURAS

LV: Leishmaniosis Visceral

LC: Leishmaniosis Cutánea

LDPK: Leishmaniosis Dérmica Pos Kala-azar

LCD: Leishmaniosis Cutánea Difusa

LM: Leishmaniosis Mucosa

LMC: Leishmaniosis Mucocutánea

LPG: Lipofosfoglicano

DMF: N, N-dimetilformamida anhidra

MOMCI: Metoximetil cloruro

K₂CO₃: Carbonato de Potasio

MgSO₄: Sulfato de magnesio

TLC: Thin Layer Chromatography (Cromatografía en Capa fina)

UV: Ultravioleta

MPLC: Medium-Pressure Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida a media presión)

MAA: Medium for Axenically grown Amastigotes

MAA20: Medio MAA suplementado al 20% de SFB

SFB: Suero Fetal Bovino

PBS: Phosphate Buffered Saline (Buffer Fosfato Salino)

ADN: Ácido desoxiribonucleico

MTT: [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]

CC₅₀: concentración citotóxica 50

IC₅₀: concentración inhibitoria al 50%

IS: Índice de Selectividad

SD: Desviación estándar

μM: MicroMolar

ÍNDICE

ABREVIATURAS

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMEN

ABSTRACT

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Objetivo general	2
1.2	Objetivos específicos	2
1.3	Hipótesis	2
II.	GENERALIDADES	3
2.1.	Antecedentes	3
2.2.	Marco teórico	5
2.2.1.	Género <i>Leishmania</i>	5
2.2.2.	Ciclo de vida del patógeno	6
2.2.3.	Ciclo del parásito dentro del vector	9
2.2.4.	Ciclo del parásito dentro de hospedero vertebrado	11
2.2.5.	Leishmaniosis	11
2.2.5.1.	Epidemiología y manifestaciones clínicas	12
2.2.5.1.1.	Leishmaniosis Visceral	12
2.2.5.1.2.	Leishmaniosis Cutánea	14
2.2.5.1.3.	Leishmaniosis Dérmica Post Kala-azar	15
2.2.5.1.4.	Leishmaniosis Cutánea Difusa	15
2.2.5.1.5.	Leishmaniosis Mucosa	16
2.2.5.1.6.	Leishmaniosis Mucocutánea	16
2.2.5.2.	Leishmaniosis en Perú	17
2.2.5.3.	Propagación de Leishmaniosis	18
2.2.5.4.	Tratamiento	18
2.2.6.	Flavonoides	20
2.2.6.1.	Chalconas	20

2.2.6.2.	Síntesis química de chalconas	22
III.	PARTE EXPERIMENTAL	23
3.1.	Unidades de Investigación	23
3.2.	Materiales, equipos y reactivos	23
3.3.	Animales de experimentación	27
3.4.	Métodos	27
3.4.1.	Chalconas	28
3.4.1.1.	Síntesis de la “chalcona 42”	28
3.4.2.	Identificación de las chalconas	29
3.4.3.	Disolución de los compuestos	29
3.4.4.	Ensayos biológicos	29
3.4.4.1.	Identificación de los parásitos	29
3.4.4.2.	Mantenimiento de los parásitos	31
3.4.4.3.	Curva de Crecimiento	31
3.4.4.4.	Cinética de Infección	32
3.4.4.5.	Ensayos de Citotoxicidad	34
3.4.4.5.1.	Sobre macrófagos peritoneales	34
3.4.4.5.2.	Sobre la Línea Celular Raw Cell	36
3.4.4.6.	Evaluación anti- <i>Leishmania in vitro</i>	38
3.4.4.6.1.	Sobre promastigotes procíclicos	38
3.4.4.6.2.	Sobre amastigotes axénicos	40
3.4.4.6.3.	Sobre amastigotes intracelulares (o intramacrofágicos)	42
3.4.4.7.	Índice de Selectividad	44
3.4.4.8.	Plan de análisis	44
IV.	RESULTADOS	45
V.	DISCUSIÓN	71
VI.	CONCLUSIONES	77
VII.	RECOMENDACIONES	78
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
IX.	ANEXOS	88

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Proporciones macrófago: parásito para el desarrollo de la cinética de infección	32
Tabla 2. Diseño experimental para determinar la actividad citotóxica sobre macrófagos de ratón	35
Tabla 3. Diseño experimental para determinar la actividad citotóxica sobre la línea celular RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™)	37
Tabla 4. Diseño experimental para determinar la actividad antileishmanial en promastigotes procíclicos	39
Tabla 5. Diseño experimental para determinar la actividad antileishmanial en amastigotes axénicos	41
Tabla 6. Diseño experimental para determinar la actividad antileishmanial sobre amastigotes intracelulares	43
Tabla 7. Característica químico-estructural de las chalconas en estudio	46
Tabla 8. Porcentaje de rendimiento de cada una de las reacciones para la obtención de la CHALCONA 42	47
Tabla 9. Constantes de acoplamiento e integraciones de las señales del espectro RMN ¹ H de la CHALCONA 40	48
Tabla 10. Constantes de acoplamiento e integraciones de las señales del espectro RMN ¹ H de la CHALCONA 42	49
Tabla 11. Constantes de acoplamiento e integraciones de las señales del espectro RMN ¹ H de la CHALCONA 43	49
Tabla 12. Ensayos de citotoxicidad sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c	55
Tabla 13. Prueba de Tukey para comparaciones múltiples	56

Tabla 14. Ensayos de citotoxicidad sobre la línea celular RAW 264.7	57
Tabla 15. Prueba de Tukey para comparaciones múltiples	58
Tabla 16. Actividad anti-leishmania de las chalconas sobre promastigotes de <i>L. infantum</i>	59
Tabla 17. Comparaciones por parejas de los compuestos	60
Tabla 18. Actividad anti- <i>Leishmania</i> de las chalconas sobre promastigotes de <i>L. amazonensis</i>	61
Tabla 19. Comparaciones por parejas de los compuestos	62
Tabla 20. Actividad anti-leishmania de las chalconas sobre amastigotes axénicos de <i>L. infantum</i>	63
Tabla 21. Comparaciones por parejas de los compuestos	64
Tabla 22. Actividad anti-leishmania de las chalconas sobre amastigotes intramacrofágicos de <i>L. infantum</i>	67
Tabla 23. Actividad anti- <i>Leishmania</i> de las chalconas sobre amastigotes intramacrofágicos de <i>L. amazonensis</i>	69
Tabla 24. Índice de selectividad de los compuestos	70

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Clasificación de especies del género <i>Leishmania</i>	7
Figura 2. Ciclo de vida del parásito intracelular <i>Leishmania</i> sp	8
Figura 3. Vector de Leishmaniosis	9
Figura 4. Estructura del mosquito vector de Leishmaniosis	10
Figura 5. Ciclo del parásito dentro del vector	10
Figura 6. Distribución geográfica de las principales especies causantes de LV	13
Figura 7. Esplenomegalia en un paciente con Leishmaniosis Visceral	14
Figura 8. Manifestaciones clínicas de LC	15
Figura 9. Variantes clínicas de LC	16
Figura 10. Casos de Leishmaniosis por distrito, 2018	17
Figura 11. Estructura base de flavonoides	20
Figura 12. Chalconoide. Estructura base de las chalconas	21
Figura 13. Actividades biológicas reportadas para chalconas y derivados	21
Figura 14. Reacciones conocidas para la síntesis química de chalconas	22
Figura 15. Estructura base de las chalconas en estudio	45
Figura 16. Cristales de la Chalcona 42	47
Figura 17. Curva de crecimiento de la especie <i>Leishmania infantum</i>	50
Figura 18. Curva de crecimiento de la especie <i>Leishmania amazonensis</i>	51
Figura 19. Gráfico del número de amastigotes por macrófago para la especie <i>L. infantum</i>	52

Figura 20. Gráfico del porcentaje de infección de los macrófagos con parásitos de <i>L. infantum</i>	52
Figura 21. Gráfico de la carga parasitaria por <i>L. infantum</i>	53
Figura 22. Gráfico del número de amastigotes por macrófago para la especie <i>L. amazonensis</i>	53
Figura 23. Gráfico del porcentaje de infección de los macrófagos con parásitos de <i>L. amazonensis</i>	54
Figura 24. Gráfico de la carga parasitaria por <i>L. amazonensis</i>	54
Figura 25. Actividad citotóxica media de las chalconas sintéticas sobre macrófagos peritoneales de ratón	55
Figura 26. Actividad citotóxica media de las chalconas sintéticas sobre la línea celular RAW 264.7	57
Figura 27. Actividad anti-Leishmania de las chalconas sintéticas sobre promastigotes de <i>L. infantum</i>	59
Figura 28. Actividad anti-Leishmania de las chalconas sintéticas sobre promastigotes de <i>L. amazonensis</i>	61
Figura 29. Actividad anti-Leishmania de las chalconas sintéticas sobre amastigotes de <i>L. infantum</i>	63
Figura 30. Macrófago infectado con parásitos de <i>Leishmania</i>	65
Figura 31. Control de macrófagos infectados con parásitos de <i>L. infantum</i>	66
Figura 32. Actividad anti-Leishmania de las chalconas sintéticas sobre amastigotes intramacrofágicos de <i>L. infantum</i>	66
Figura 33. Control de macrófagos infectados con parásitos de <i>L. amazonensis</i>	68
Figura 34. Actividad anti- <i>Leishmania</i> de las chalconas sintéticas sobre amastigotes intramacrofágicos de <i>L. infantum</i>	68

RESUMEN

La leishmaniosis es una enfermedad tropical desatendida cuyo tratamiento es costoso, doloroso y genera múltiples reacciones adversas graves. En el presente estudio se determinó la actividad anti-*Leishmania* de tres chalconas de origen sintético contra parásitos de *Leishmania infantum*, causantes de leishmaniosis visceral. La identidad de las chalconas fue confirmada a través de espectros RMN de protón y fueron etiquetadas como “chalcona 40”, “chalcona 42” y “chalcona 43”. Se desarrollaron tres modelos de evaluación *in vitro* los cuales emplearon promastigotes procíclicos, amastigotes axénicos y amastigotes intramacrofágicos. Adicionalmente se evaluó la citotoxicidad de los compuestos utilizando macrófagos peritoneales de ratón BALB/C y la línea celular “Raw Cell”. Las tres chalconas fueron poco activas y selectivas contra los promastigotes, sin embargo, para los amastigotes axénicos la actividad y selectividad fue mayor, observándose en la chalcona 43 un IC_{50} de 2,6 μ M, una citotoxicidad (CC_{50}) de 421,4 μ M y un índice de selectividad (IS) de 162, $IS = CC_{50}/IC_{50}$. En el modelo de amastigotes intramacrofágicos se observó la mayor actividad en la chalcona 42 (11,1 μ M) con una moderada actividad citotóxica (70,7 μ M) presentando una selectividad similar a la chalcona 43 de 7. Se concluye que las chalconas 42 y 43 son los compuestos más activos del estudio contra los amastigotes axénicos e intramacrofágicos de *L. infantum*.

Palabras Clave: Actividad anti-*Leishmania*, *Leishmania infantum*, chalconas, chalconas sintéticas, leishmaniosis visceral, modelos *in vitro*

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected tropical disease whose treatment is costly, painful and generates multiple serious adverse reactions. In the present study, the anti-*Leishmania* activity of three synthetic chalcones was determined against *Leishmania infantum*, parasites causing visceral leishmaniasis. The identity of the chalcones was confirmed through proton NMR spectra and the chalcones were labeled as "chalcone 40", "chalcone 42" and "chalcone 43". Three *in vitro* evaluation models were developed which employ procyclic promastigotes, axenic amastigotes, and amastigotes intramacrophagic. Additionally, the cytotoxicity of the compounds was evaluated using BALB/C mouse peritoneal macrophages and the cell line "Raw Cell". The three chalcones were not very active and selective against promastigotes, however, the axenic amastigotes activity and selectivity were higher, observing in the chalcone 43 an IC_{50} of 2,6 μ M, a cytotoxicity (CC_{50}) of 421,4 μ M and therefore a selectivity index (SI) of 162 ($SI = IC_{50}/CC_{50}$). In the model of intra-macrophage amastigotes, the most active compound was chalcone 42 (11,1 μ M) with a moderated cytotoxic (70,7 μ M), showing a selectivity similar to chalcone 43 of 7. It is concluded that chalcones 42 and 43 are more active against axenic and intra-macrophagic amastigotes of *Leishmania infantum*.

Key Words: Anti-*Leishmania* activity, *Leishmania infantum*, chalcones, synthetic chalcones, visceral leishmaniasis, *in vitro* models.

I. INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis es una enfermedad zoonótica de los trópicos y subtropicos. Esta condición involucra un amplio espectro de manifestaciones clínicas que cursa desde una úlcera en la piel hasta la inflamación de órganos como el hígado o bazo, llegando a ser mortal. En el Perú se presentan la forma cutánea y mucocutáneas, la forma visceral es aún ausente(1).

El agente causante de la Leishmaniosis lo conforman parásitos protozoarios del género *Leishmania* que se transmiten a través de la picadura de mosquitos vectores. La leishmaniosis visceral es causada en el Viejo Mundo por *Leishmania donovani* y *Leishmania infantum* y en el Nuevo Mundo por *Leishmania infantum* (= *Leishmania chagasi*). Los casos de leishmaniosis visceral en el Nuevo Mundo se ubican principalmente en Brasil, sin embargo, ya se reportan casos de Leishmaniosis visceral en Paraguay y Argentina, países que se consideraban ajenos a esta enfermedad. En Brasil son más las zonas que reportan casos de Leishmaniosis visceral y en el Viejo Mundo los casos de Leishmaniosis (en general) se están extendiendo, siendo el cambio climático uno de los factores a los cuales se les atribuye la causa de esta expansión (2).

A pesar del número importante de personas infectadas con este parásito, no existe interés por parte de las empresas farmacéuticas en desarrollar nuevos fármacos contra la leishmaniosis. Los fármacos utilizados en la terapia actual son antiguos, muy tóxicos, de tratamiento largo, y además se observan casos de resistencia(3). Ante ello se busca el descubrimiento de nuevas moléculas de origen natural o sintético que superen las limitaciones de los tratamientos actuales.

Las chalconas son un grupo de moléculas a las que se les atribuye múltiples dianas y/o actividades farmacológicas, entre ellas las antiparasitarias. El interés por este tipo de moléculas radica también en la sencillez de su estructura y por ende de su síntesis, que abarataría su costo (4). Diversas chalconas naturales o de síntesis química han demostrado tener actividad significativa contra diferentes especies de *Leishmania*, y algunas han demostrado ser muy selectivas(5). En el presente trabajo se desarrolla por primera vez la evaluación de tres nuevas chalconas de origen sintético contra parásitos de *Leishmania infantum*, causantes de leishmaniosis visceral en el Viejo y Nuevo Mundo. Para ello se evaluó la actividad anti-*Leishmania* de las chalconas utilizando tres modelos *in vitro* de evaluación de *lead compounds* contra estos parásitos.

1.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad anti-*Leishmania in vitro* de 3 chalconas sintéticas sobre parásitos intracelulares de *Leishmania infantum*.

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Obtener por síntesis química la “chalcona 42”.
- 2 Determinar la citotoxicidad de las chalconas sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c y sobre la línea celular de macrófagos “RAW cell”.
- 3 Determinar la actividad anti-*Leishmania in vitro* de 3 chalconas sintéticas sobre promastigotes de *Leishmania infantum*.
- 4 Determinar la actividad anti-*Leishmania in vitro* de 3 chalconas sintéticas sobre amastigotes axénicos de *Leishmania infantum*.
- 5 Determinar la actividad anti-*Leishmania in vitro* de 3 chalconas sintéticas sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania infantum*.

1.3. HIPÓTESIS

Las tres chalconas sintéticas del estudio presentan actividad anti-*Leishmania* contra parásitos intracelulares de *Leishmania infantum*.

II. GENERALIDADES

2.1 ANTECEDENTES

La leishmaniosis comprende un grupo de enfermedades parasitarias causadas por protozoarios del género *Leishmania* y transmitida por insectos vectores. Se presenta en zonas endémicas de regiones tropicales y subtropicales en 98 países, incluyendo Perú (6). La leishmaniosis es una enfermedad espectral al manifestarse en diversas formas clínicas que varían en síntomas y gravedad: leishmaniosis cutánea (LC; úlceras en la piel), leishmaniosis mucosa (LM; lesiones desfigurantes en mucosa oral y nasofaríngea, usualmente precedidas por LC) y leishmaniosis visceral (LV; sistémica, pudiendo ser mortal) (7). A la fecha, no se dispone de una vacuna efectiva contra leishmaniosis (8). Las medidas de control son el diagnóstico y la quimioterapia temprana. Sin embargo, el tratamiento de primera línea (antimoniales pentavalentes) es largo, costoso, tóxico y de administración parenteral; además, su eficacia viene siendo afectada por resistencia parasitaria y el incremento de casos de falla terapéutica clínica. La anfotericina B, usada como droga de segunda línea, es altamente tóxica y de costo elevado (9,10).

Las chalconas (1,3-diaril-2-propen-1-ona) son precursores de metabolitos secundarios de tipo flavonoides e isoflavonoides en plantas que han venido siendo estudiadas como nueva clase de sustancias anti-*Leishmania* (11,12). Dos recientes estudios muestran interés en las chalconas por sus actividades anti-*Leishmania* y por la relevancia de profundizar en el estudio de estas moléculas; el primer estudio mostró la actividad *in vitro* de cuatro chalconas sintéticas sobre promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. braziliensis* (13) y el segundo estudio reveló que la estructura de la 2',4'-dihidroxichalcona es un ligando útil para optimización química en la búsqueda de nuevas drogas anti-*Leishmania* (14).

Estudios colaborativos entre la Universidad Peruana Cayetano Heredia y el equipo de Lima del Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD) comprobaron la actividad leishmanicida de chalconas aisladas de plantas medicinales utilizadas contra la leishmaniosis. La actividad obtenida fue mejorada mediante una serie original de chalconas preparadas por síntesis química en la Universidad de Louisville (EE.UU.). Estas nuevas chalconas fueron evaluadas a nivel *in vitro* contra parásitos de *Leishmania amazonensis*, responsables de Leishmaniosis Cutánea en el Nuevo Mundo. Nueve de

estas chalconas presentaron actividad y selectividad comparable a la de anfotericina B con índices de selectividad de 10 a 70. Cinco de estas chalconas se evaluaron a nivel *in vivo* sobre ratones infectados con *L. amazonensis*, y dos de estos compuestos (*chalcona 42* y *chalcona 43*) mostraron una reducción significativa de la carga parasitaria comparada con controles infectados no tratados. Estos trabajos fueron objeto de una patente (15) y de dos publicaciones (16,17).

El presente trabajo de investigación extendió la evaluación de tres de estas chalconas de origen sintético sobre parásitos de *Leishmania infantum*, una especie de mayor interés causante de Leishmaniosis visceral que presenta tasas más altas de morbilidad y mortalidad a nivel global (18). El presente estudio espera brindar mayor oportunidad de desarrollo industrial de las chalconas en evaluación.

2.2 MARCO TEÓRICO

2.2.1 Género *Leishmania*

El género *Leishmania* comprende parásitos protozoarios que ciclan asexualmente dentro de dos organismos diferentes. El primer hospedero lo constituye el tracto digestivo de mosquitos flebótomos que cumplen el rol de vector (hospedero invertebrado). El segundo hospedero comprende fagocitos de una amplia gama de organismos vertebrados como roedores, cánidos, hyrax, marsupiales, el humano, entre otros. Dentro del vector los parásitos se encuentran bajo la forma del flagelado y móvil promastigote; y dentro del hospedero vertebrado se encuentran bajo la forma del inmóvil amastigote intracelular. Esta característica de poder colonizar dos hospederos diferentes hace del género *Leishmania* un género heteroxeno, específicamente dixeno, así como lo son también los géneros *Trypanosoma* y *Phytomonas*, pertenecientes a la misma familia (Familia Trypanosomatidae) (19,20).

Los parásitos de *Leishmania* pertenecen al Reino protista, Clase Kinetoplastea, Subclase Metakinetoplastina, Orden Trypanosomatida, Familia Trypanosomatidae, Subfamilia Leishmaniinae y al Género *Leishmania*. La familia *Trypanosomatidae* consta de 11 géneros de los cuales *Leptomonas*, *Crithidia* (monoxenos) y *Leishmania* (dixeno) conforman la Subfamilia Leishmaniinae (21).

Lainson y Shaw dividieron inicialmente a las especies de *Leishmania* que infectaban mamíferos en los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*. Esta división se estableció en función a las zonas del intestino del mosquito vector donde se desarrollaban los parásitos. Así, los parásitos del subgénero *Leishmania* eran parásitos suprapilóricos (o suprapilarianos) ya que su desarrollo se daba únicamente en el intestino medio y anterior del vector. Y los parásitos del subgénero *Viannia* eran peripilóricos (o peripilarianos) ya que su desarrollo iniciaba en el intestino posterior antes de migrar hacia el intestino medio y anterior (22).

En la actualidad existen aproximadamente 54 especies de *Leishmania*, excluyendo a aquellas especies cuya identidad es la misma a la de otra especie reportada anteriormente (sinónimos), e incluyendo al subgénero *Sauroleishmania*, que infecta principalmente a reptiles menores. De estas especies, al menos 21 son patógenas para el ser humano. Se muestra en la Figura 1 la clasificación de las especies de *Leishmania* propuesta por Akhoundi y col, basado en métodos moleculares (23).

Cupolillo y col. dividen además a las especies de *Leishmania* en dos linajes filogenéticos referidos como la sección *Euleishmania* y *Paraleishmania*, al primero se le asignan 4 subgéneros y al segundo especies particulares junto a especies del antiguo género *Endotrypanum* (24).

2.2.2 Ciclo de vida de *Leishmania*

El ciclo inicia cuando un mosquito flebótomo infectado con promastigotes de *Leishmania* se alimenta de la sangre de un mamífero “sano” y durante el proceso le inocula los parásitos. Los promastigotes que ingresaron son fagocitados por macrófagos y dentro de ellos se transforman en amastigotes. Estos amastigotes se multiplican y generan la lisis del fagocito para finalmente infectar a más células. Cuando otro mosquito se alimenta de la sangre del mamífero infectado (o reservorio), ingiere también las células infectadas con los amastigotes. Estos amastigotes se transformarán dentro del mosquito vector en promastigotes para finalmente ser inoculados en un nuevo hospedero mamífero en la siguiente ingesta de sangre, completando así el ciclo (25).

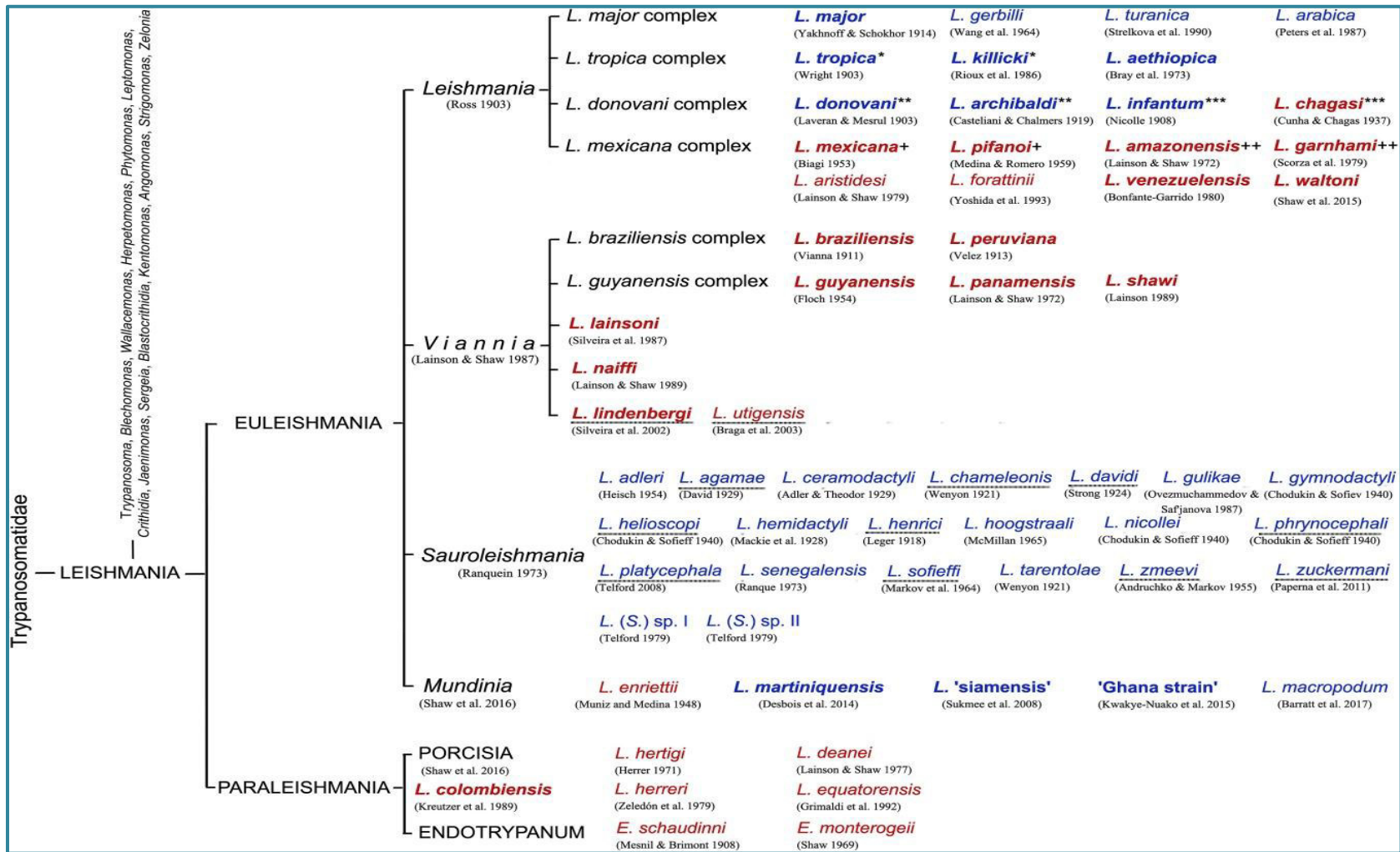


Figura 1. Clasificación de especies del género *Leishmania*. *, +: Sinónimos; diferentes números de asteriscos (*) o “mas” (+) indican qué especies son sinónimas. Subrayado: Sin clasificación final. Los nombres de *Leishmania* entre comillas son nombres no oficiales y sin descripciones formales. Las especies patógenas a los humanos están en negrita. Las especies del viejo y nuevo mundo se destacan en azul y rojo, respectivamente. *L. 'siamensis'* y *L. martiniquensis* también se encuentran en el Nuevo Mundo. Fuente: Akhouni, 2017(23).

Dadas las condiciones de pH y temperatura del tubo digestivo del vector (7,4 y 24 °C, aproximadamente), los parásitos se mantienen bajo la forma del móvil promastigote, de estructura alargada y de unos 14-20 µm de largo con un único flagelo. Dentro del hospedero mamífero la temperatura interna y de la piel es de aproximadamente 37 y 34 °C respectivamente; aquí los parásitos se encuentran bajo la forma del inmóvil amastigote de estructura redondeada u oval de unos 2 a 5 µm de diámetro y localizados dentro de células fagocitarias (macrófagos principalmente) (26).

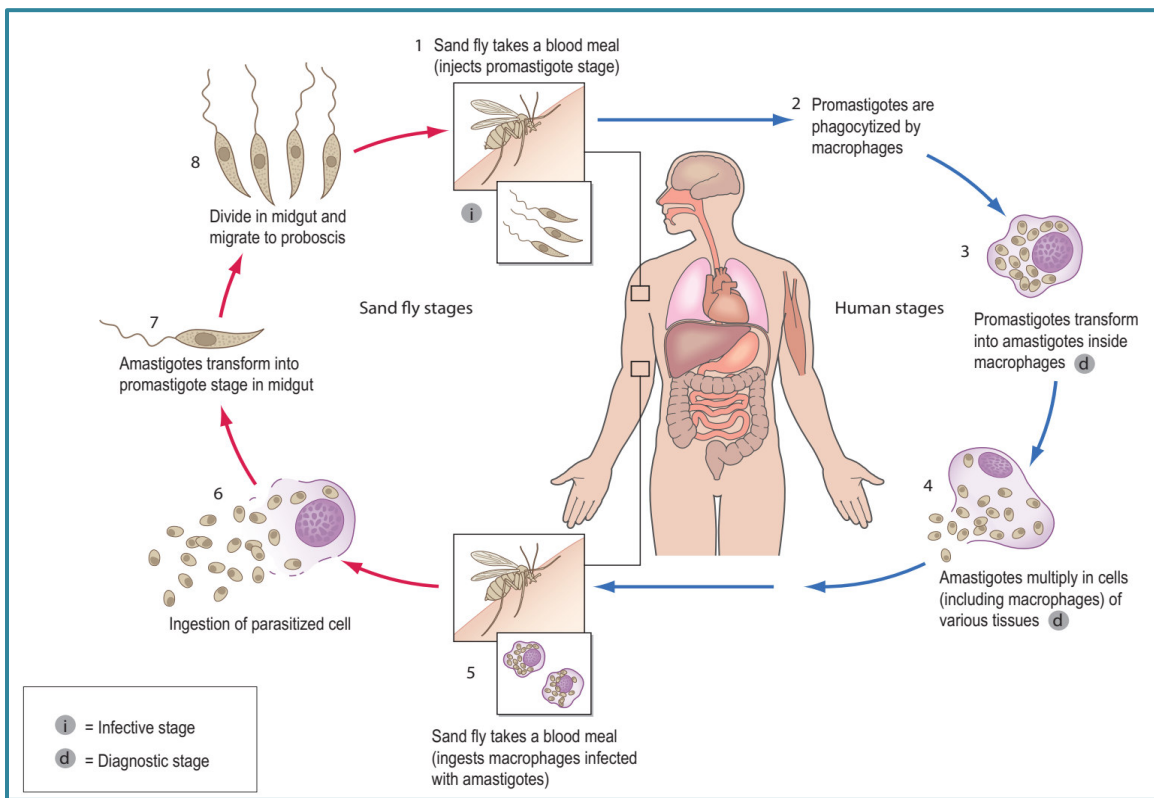


Figura 2. Ciclo de vida del parásito intracelular *Leishmania* sp. Se muestran las dos etapas de desarrollo del parásito que comprende el tracto digestivo del mosquito flebótomo y los macrófagos del hospedero mamífero. Fuente: Boelaert, 2014 (27).

2.2.3 Ciclo del parásito dentro del vector

El vector de la leishmaniosis consta de mosquitos flebótomos de la subfamilia Phlebotominae, pertenecientes al género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo. Estos mosquitos son de pequeño tamaño, entre 1,5 a 2 mm de largo y se encuentran distribuidos principalmente en regiones tropicales y subtropicales. Las hembras de estos mosquitos son las que se alimentan de sangre (hematófagas) e introducen el parásito al humano (Figura 3). Tienen distintas denominaciones dependiendo de la zona endémica en las que se encuentren, “mosquito de la arena” en el viejo mundo (género *Phlebotomus*); en el Perú se le conoce como “manta blanca” o “titira” (género *Lutzomyia*) (28).



Figura 3. Vector de Leishmaniosis. Mosquito hembra vector de leishmaniosis alimentándose de sangre (*Phlebotomus papatasi*). Fuente: Maroli 2013 (2).

El desarrollo del parásito dentro del vector dependerá tanto de la especie parasitaria como del vector. Las características de la transformación del parásito dentro del vector permitieron su agrupación en los subgéneros *Leishmania*, *Viannia* y *Sauroleishmania*. Las especies del presente estudio pertenecen al subgénero *Leishmania* (*Leishmania* *infantum* y *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*), por lo que describiremos brevemente su desarrollo dentro del vector (22).

Cuando los parásitos del subgénero *Leishmania* ingresan al intestino medio del vector, los amastigotes comienzan a transformarse en promastigotes procíclicos (débilmente móviles y en constante ciclo de división), luego se transforman en promastigotes nectomónadas (forma alargada y fuertemente móvil). Estos últimos se dirigen hacia la parte anterior del intestino medio hasta llegar a la Válvula Estomodeal (o cardíaca, CV/SV) (29).

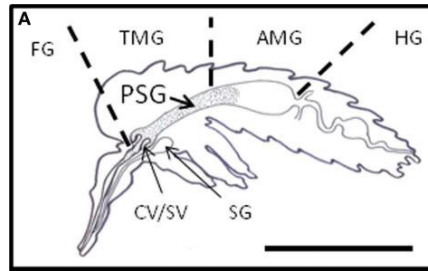


Figura 4. Estructura del mosquito vector de Leishmaniasis. Se distingue el intestino anterior (FG), el intestino medio (MG) (región torácica del intestino medio (TMG) y región abdominal del intestino medio (AMG)) y el intestino posterior (HG)
Fuente: Rogerz 2012 (30).

Una vez en la CV, los nectomónadas se transforman en promastigotes leptomónadas (formas más pequeñas que reanudan la multiplicación del parásito). Algunos leptomónadas (y nectomónadas) se diferencian en haptomónadas. Los leptomónadas se diferencian en promastigotes metacíclicos, la forma infecciosa del parásito. Los parásitos producen el bloqueo a la entrada del intestino del vector ocasionando que este los regurgite antes de ingerir la sangre del mamífero(31).

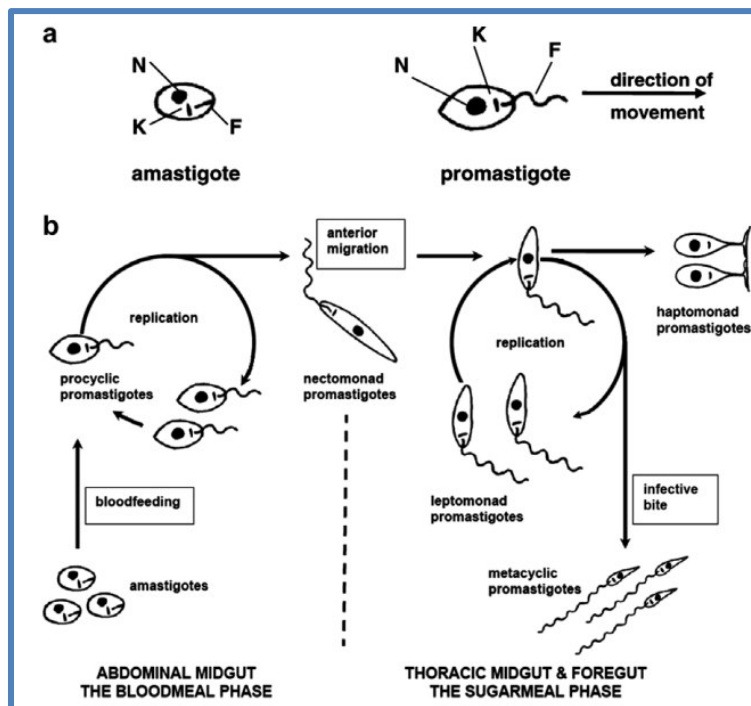


Figura 5. Ciclo del parásito dentro del vector. Fuente Bates 2003 (32).

2.2.4 Ciclo del parásito dentro de hospedero vertebrado

El proceso infeccioso dentro del hospedero vertebrado dependerá de la respuesta inmune de este y del tipo de parásito que ha sido inoculado. Una vez que los promastigotes metacíclicos fueron inoculados en el humano, una serie de células fagocitarias se dirigirán al sitio de infección estimuladas por la ruptura de los capilares superficiales donde el mosquito hizo la herida. Las células que se infectarán con estos parásitos involucran neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas e incluso fibroblastos. Estos parásitos también modularán la producción de citoquinas y por ende la respuesta inmune del hospedero(33).

Una de las primeras células del sistema inmune que interactúa con el parásito son las células asesinas naturales (NK). Estas células son directamente inactivadas por la proteína de membrana GP63 (leishmanolisina), evitándose así la liberación temprana de IFN- γ (respuesta inmune Th1). Los neutrófilos son las primeras células fagocíticas que llegan a la herida y fagocitan a los promastigotes metacíclicos. Estos sufren rápidamente apoptosis y son fagocitados por células dendríticas y por los macrófagos (34).

Dentro del macrófago, los promastigotes alteran la estructura del fagosoma que los contiene por acción del lipofosfoglicano (LPG) y se transforman en amastigotes estimulados por el cambio de temperatura y el bajo pH del fagosoma. Los amastigotes se multiplican y lisan a los macrófagos, infectando a más de estos. Estos evaden el sistema inmune por la presencia de fosfatidilserina (PS) en su superficie, un fosfolípido presente en células apoptóticas del hospedero que estimula una respuesta no agresiva proinflamatoria. Cuando un nuevo mosquito flebótomo “sano” ingiera la sangre de este hospedero (o reservorio), llevará consigo a los macrófagos infectados iniciando un nuevo ciclo una vez los parásitos ingresen al tubo digestivo del mosquito (35,36).

2.2.5 Leishmaniosis

La leishmaniosis comprende un complejo grupo de “Enfermedades Tropicales Desatendidas” que afecta principalmente a países en vías de desarrollo (37). Es endémica en grandes áreas de los trópicos, subtropicos y la cuenca mediterránea envolviendo a más de 98 países. Es causada por protozoarios del género *Leishmania* y transmitida a través de la picadura de mosquitos flebótomos hembras (1).

2.2.5.1 Epidemiología y manifestaciones clínicas

Existen seis manifestaciones clínicas de la enfermedad definidas por el parásito, la localización en los tejidos infectados y de la situación inmune del hospedero. Comprenden la Leishmaniosis visceral o Kala-azar (LV), Leishmaniosis dérmica post Kala-azar (LDPK), Leishmaniosis cutánea (LC), Leishmaniosis cutánea difusa (LCD), Leishmaniosis mucosa (LM) y Leishmaniosis mucocutánea (LMC) (38).

Existen aproximadamente 350 millones de personas en riesgo y 12 millones de casos confirmados de Leishmaniosis. Las formas más frecuentes son la visceral (LV) y cutánea (LC). Se estima que a nivel global ocurren aproximadamente de 0,2 a 0,4 millones de casos de Leishmaniosis visceral y de 0,7 a 1,2 millones de casos de Leishmaniosis cutánea por año (6).

Más del 90% de los casos de Leishmaniosis visceral ocurren en 6 países: India, Bangladesh, Sudán, Sudán del Sur, Brasil y Etiopía. Los casos de Leishmaniosis cutánea se encuentran más distribuidos en el mundo ocupando las regiones de las Américas, la cuenca Mediterránea y Asia occidental, cada uno con un tercio del total de casos. Los 10 países donde se encuentra la más alta incidencia de Leishmaniosis cutánea (75% de casos) son Afganistán, Argelia, Colombia, Brasil, Irán, Siria, Etiopía, Sudán del Norte, Costa Rica y Perú (39).

2.2.5.1.1 Leishmaniosis Visceral (LV)

También conocida como kala-azar o “fiebre negra” en hindi. Es causada en el Viejo Mundo por *L. donovani* y *L. infantum* (en algunos casos por *L. tropica* (40,41) y *L. major* (42), y en el Nuevo Mundo es causada por *L. infantum* (sinónimo, *L. chagasi*) y algunos casos atribuidos a *L. amazonensis* (43).

La LV causada por *L. donovani* se extiende en el este de África, el noreste de la India, Nepal y Bangladesh; causa la forma más severa de LV cuando no es tratada. La causa de LV por *L. infantum* se extiende en el Mediterráneo, Asia (Medio Oriente y Sudoeste) y en América del Sur (denominado inicialmente como *L. chagasi*) como se muestra en la figura 6, afecta principalmente a niños y personas inmunocomprometidas (44).

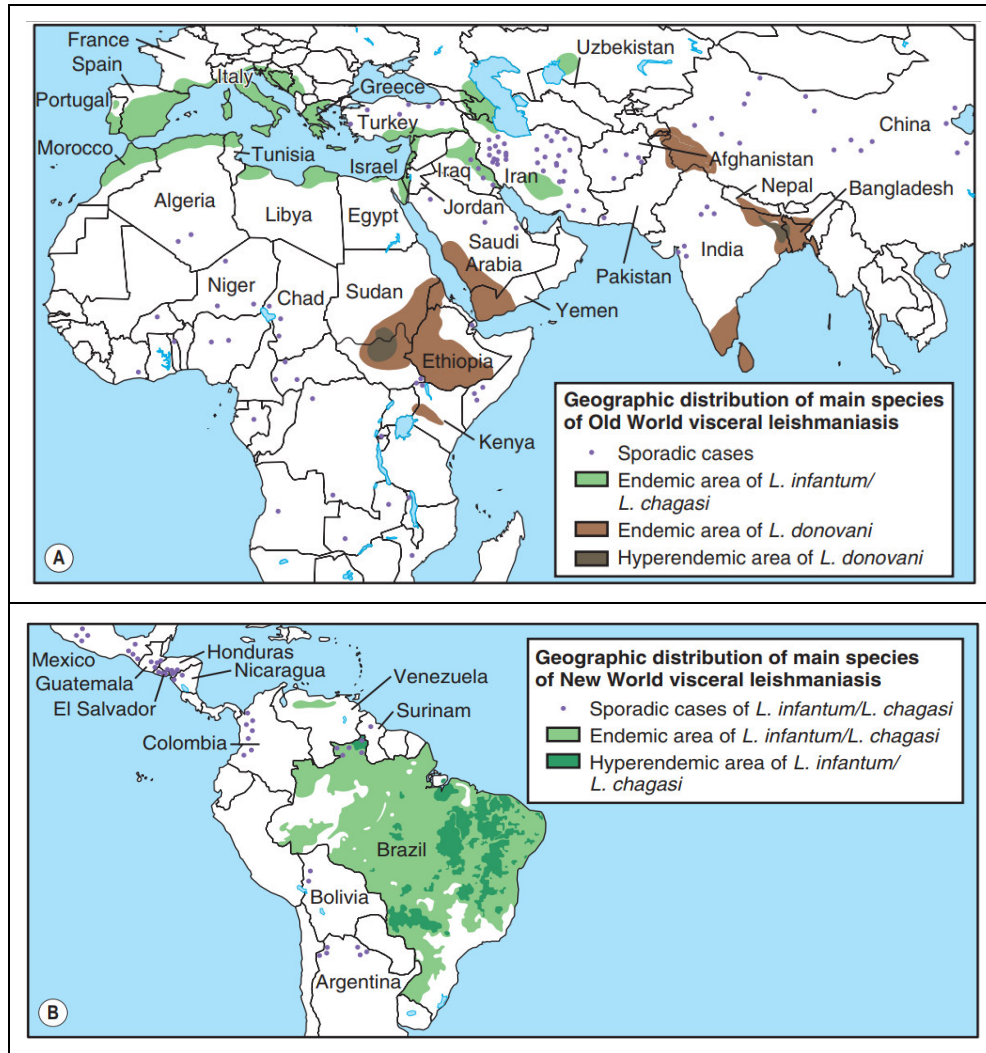


Figura 6. Distribución geográfica de las principales especies causantes de LV. En el Viejo Mundo, A; y en el Nuevo Mundo, B. Fuente, Berkowitz, 2012

(44)

Los síntomas para la LV son no específicos y de aparición engañosa. Aparece como una pequeña mácula, pápula o úlcera con presencia de amastigotes, que suele resolverse antes de la aparición de los síntomas característicos. Los signos y síntomas entre niños y adultos no difieren significativamente. Entre los factores que predisponen la aparición de la enfermedad clínica se encuentran la malnutrición y la inmunodepresión (18).

Los síntomas frecuentes son fiebre, malestar, escalofríos, pérdida de peso, anorexia y molestias en el hipocondrio izquierdo. Los signos clínicos frecuentes son esplenomegalia no dolorosa a la palpación, con o sin hepatomegalia, y palidez de las membranas

mucosas. El oscurecimiento de la piel de la cara, las manos, los pies y el abdomen se observa habitualmente en la India (el término hindi kala-azar significa “fiebre negra” o “fiebre mortal”) (45,46).



Figura 7. Esplenomegalia en un paciente con Leishmaniosis Visceral. Fuente. Boelaert 2014 (27).

2.2.5.1.2 Leishmaniosis cutánea (LC)

La Leishmaniosis cutánea en el Viejo Mundo es causada por especies del subgénero *Leishmania* (principalmente *L. tropica*, *L. major* y *L. aethiopica*). Reciben el nombre de úlcera oriental, *bouton d'Orient*, *bouton de Crète*, *bouton d'Alep*, *bouton de Briska*, mal de Alepo, hervor de Bagdad o hervor de Delhi (47). En el Nuevo Mundo es causada por especies del subgénero *Leishmania* y *Viannia*, principalmente por los complejos *L. mexicana* y *L. braziliensis* respectivamente. Rara vez se aíslan parásitos de *L. infantum* de este tipo de lesiones (48). Localmente reciben el nombre de uta (Perú), úlcera de Chiclero o herpes labial (México), dicera de Baurid (Brasil) y pian del bosque (*pian bois*, Guyana). Colectivamente son referidas como Leishmaniosis Cutánea Americana o Leishmaniosis Tegumentaria Americana (49).

Las características clínicas son variables. La enfermedad inicia en el sitio donde fueron inoculados los promastigotes y se observa el desarrollo de una pápula o nódulo que crece lentamente y tarda 1 semana como mínimo en alcanzar su tamaño final. Luego se forma una costra en el centro que se desprende y forma una úlcera de 5 cm aproximadamente, con bordes elevados e induración periulcerosa variable (46). La lesión puede llegar a ser seca e indolora con o sin cicatriz desfigurante (*L. tropica*), indolora, inflamada y ulcerada (*L. major*) (50,51) o indolora y nodular (*L. braziliensis*) (52).

Algunos autores diferencian la leishmaniosis cutánea simple de las leishmaniosis cutánea diseminada, leishmaniosis cutánea difusa y leishmaniosis cutánea post kala-azar (53).



Figura 8. Manifestaciones clínicas de LC. En el Viejo Mundo causada por *Leishmania major*, A; *Leishmania tropica*, B. (Fuente: Magill, 2013 (25)), y en el Nuevo Mundo por *L. peruviana*, C. En esta última se observa la lesión típica ulcerosa con bordes elevados y endurecidos. Fuente: Boelaert 2014 (27)

2.2.5.1.3 Leishmaniosis Dérmica Post Kala-azar (LDPK)

La LDPK es un síndrome cutáneo observado en algunas personas diagnosticadas con LV y que llevaron un tratamiento con antimoniales pentavalentes. Se observa en un 5 a 10% de pacientes con LV de la India y en un 50% de pacientes con LV en Sudán (África Oriental). Es causada por *L. donovani* y las lesiones van desde una mácula hiperpigmentada hasta el desarrollo de nódulos que asemejan un caso de lepra (54,55). Dado que las lesiones por LDPK pueden durar hasta por más de 20 años, se considera que las formas nodulares de LDPK juegan un rol como reservorio inter-epidémico en el ciclo de transmisión (56).

2.2.5.1.4 Leishmaniosis Cutánea Difusa (LCD)

La LCD es una variante no común de LC que se observa en pacientes con un defecto específico en la inmunidad celular. En el Viejo Mundo es causada por *L. aethiopica* y en el Nuevo Mundo por *L. mexicana* y *L. amazonensis*. Se caracteriza por empezar como una lesión localizada (mácula o pápula) que no forma úlcera, luego se forman nódulos o placas cutáneas muy diseminadas en otras áreas de la piel. No se observa ulceración y la afectación mucosa se limita a los bordes de los orificios nasales y labios. Estas lesiones son muy ricas en parásitos y nunca se curan espontáneamente, además son resistentes a la terapia clásica (57,58)

2.2.5.1.5 Leishmaniosis Mucosa (LM)

En el Viejo Mundo son raros los casos de leishmaniosis cutánea que afecten las zonas mucosas del cuerpo. Los pocos casos reportados son generados por *L. major* y casos aislados de pacientes con LV o LDPK con lesiones en la mucosa bucal, nasal y/o genital causados por *L. infantum* y *L. donovani* (59,60). En el Nuevo Mundo recibe el nombre de “Leishmaniosis Mucocutánea” y afecta las zonas mucosas llegando a ocasionar lesiones desfigurantes. Se describe en el siguiente punto.

2.2.5.1.6 Leishmaniosis Mucocutánea (LMC)

La Leishmaniosis Mucocutánea está restringida al Nuevo Mundo y es vista comúnmente en países como Bolivia, Brasil y Perú, y menos común en el norte de Sudamérica y América Central. Es una complicación rara de LC que ocurre en menos del 5% de estos casos. Se le conoce localmente como “espundia” y es causada principalmente por *L. braziliensis* y menos probable por *L. panamensis* y *L. guyanensis* (61).

Forma una lesión cutánea que continua con un periodo variable de latencia, luego se observa una lesión mucosa que puede diseminarse localmente o de forma metastásica. Generalmente comienza en la mucosa nasal observándose congestión nasal con epistaxis ocasional. La lesión nasal evoluciona a una úlcera y conduce a la perforación del tabique nasal (signo característico) con ausencia de dolor. En un estado avanzado el incremento del tejido necrosado genera mutilaciones desfigurantes donde la nariz y la boca pueden desaparecer totalmente (62).



Figura 9. Variantes clínicas de LC. Lesión Nodular por LDPK en una mujer de Kenia, A (25). LC difusa causada por *L. aethiops*, B (27). Lesión por Leishmaniosis mucocutánea, C (25)

2.2.5.2 Leishmaniosis en Perú

La Leishmaniosis es un problema de Salud Pública en el Perú. Las transmisiones ocurren en aproximadamente el 74% de la superficie nacional. Se distinguen dos formas principales de Leishmaniosis: Leishmaniosis andina (LC) o “uta” y Leishmaniosis selvática (LMC) o “espundia” (63). Según el último informe de la PAO el Perú representa el 6,63% del total de casos de Leishmaniosis reportados en las Américas en el 2017 (64). La Dirección General de Epidemiología (DGE) reportó 5187 casos de LC y 430 casos de LMC en el 2018. Además, 534 de estos casos son nuevos con una incidencia acumulada de 1,7 casos por 100 mil habitantes en el 2018 (65).

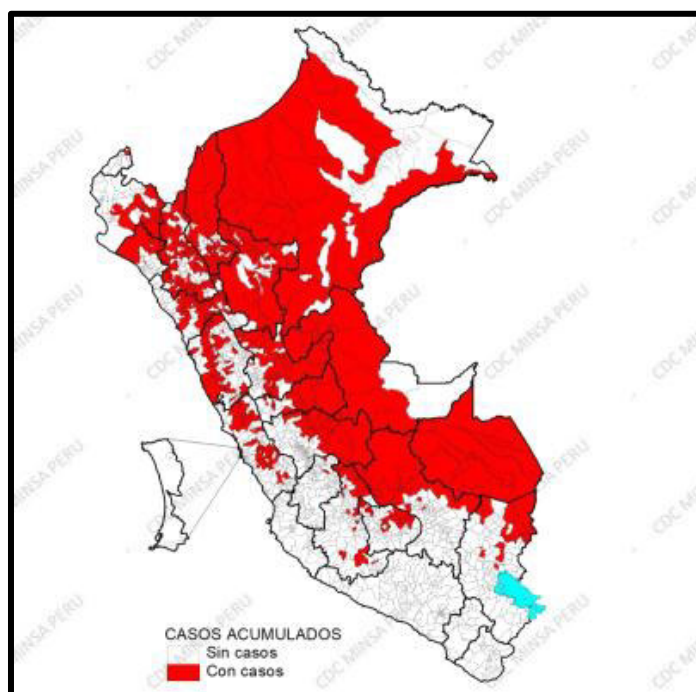


Figura 10. Casos de Leishmaniosis por distrito, 2018. 549 distritos reportaron al menos un caso de leishmaniosis, concentrados el 54% de estos en el departamento de Madre de Dios, Cusco, Cajamarca, Junín, Amazonas y Piura. Fuente. Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades – MINSA.

2.2.5.3 Propagación de Leishmaniosis

Existen múltiples reportes de casos de leishmaniosis cutánea y visceral en zonas que se consideraban libres de esta enfermedad, tanto en el Viejo como en el Nuevo Mundo. La causa principal es atribuida a la propagación del mosquito vector como producto del cambio climático (temperatura media y precipitaciones) y de cambios ecológicos ocasionados por el hombre como el uso de la tierra, el riego, la construcción de represas, la deforestación y la urbanización (66,67).

En Europa la presencia del mosquito vector estaba limitada a la parte sur en la zona del Mediterráneo, incluso también en zonas extra Mediterráneas del Este y Oeste europeo. Sin embargo, ahora se reporta su presencia en Europa Central al norte de los Alpes, en zonas que se creía exenta de estos mosquitos, y que en la actualidad países como Alemania, Bélgica y Austria, además de los vectores, ya han notificado los primeros casos de leishmaniosis no asociadas con viajes a zonas endémicas (68,69).

En América son aproximadamente 21 los países con casos autóctonos de leishmaniosis cutánea. La Leishmaniosis visceral por *L. infantum* estaba limitada solo a algunas regiones de Brasil, sin embargo esta condición ya se reporta en países como Paraguay y Argentina así como en otras regiones del Brasil exentas de esta enfermedad (2,70).

Estudios predictivos sugieren un incremento en los casos de Leishmaniosis por los factores de riesgo ya mencionados. Y para el caso de Leishmaniosis visceral debida a *L. infantum* se debe considerar que el parásito utiliza animales reservorios domésticos como el perro principalmente, predisponiendo al aumento de casos de LV en zonas urbanas (71–73).

2.2.5.4 Tratamiento

El tratamiento para la leishmaniosis comprende una corta lista de moléculas registradas dentro de las que destacan las sales de antimonio pentavalente, la anfotericina B, la miltefosina, la paromomicina y la pentamidina. Muchas de estas moléculas generan severos efectos adversos y una resolución variable de la enfermedad. Los reportes de falla terapéutica de estas drogas están asociados a mecanismos de resistencia de los parásitos, a condiciones del hospedero (estado nutricional e inmunidad), a la especie parasitaria (por su locación en los tejidos) e incluso a las condiciones ambientales (3).

En muchos países los fármacos de primera línea lo constituyen las sales de antimonio pentavalente (Sb^{+5}) como el estibogluconato de sodio (Pentostam®), el antimoniato de meglumine (Glucantime®), y sales de antimonio trivalente (Sb^{+3}) como el tartrato de potasio y antimonio; sin embargo, estos presentan severos efectos adversos ligados a cardiotoxicidad, pancreatitis, nefrotoxicidad y hepatotoxicidad. A ello se suma el largo y doloroso tratamiento (28 a 30 días) a base de inyecciones diarias (IM, IV o IL) que no siempre culmina en la resolución total de la infección. Estas sales son obsoletas principalmente en algunas regiones de la India ligadas a un tema de resistencia, siendo la anfotericina B la droga de primera línea en esas zonas (74).

El polieno anfotericina B es una de las drogas más eficaces para el tratamiento de la leishmaniosis y puede ser encontrada como droga de primera o segunda línea. Sin embargo, posee severos efectos adversos asociados a miocarditis y nefrotoxicidad, y se requiere de una administración intravenosa lenta. Existen diferentes formulaciones (complejo lipídico, forma coloidal y forma liposomal) que mantienen o mejoran su eficacia y disminuyen su toxicidad, pero son más caras y limitan su acceso en los países en vías de desarrollo (75).

El alquilofosfolípido miltefosina es la única droga de administración oral; es más segura y efectiva que las otras drogas, pero es cara, con posible asociación a teratogenicidad y puede generar vómitos y diarrea. La pentamidina presenta una eficacia dependiente de la especie parasitaria y generalmente se administra en combinación con otras drogas. El aminoglicósido paromomicina presenta también una eficacia dependiente de la especie del parásito, es una droga efectiva bien tolerada y se administra por vía dérmica (para LC) o intramuscular (para LV) pero genera nefrotoxicidad severa, ototoxicidad y hepatotoxicidad (76).

Los ensayos clínicos registrados evalúan principalmente asociaciones y nuevas formulaciones de las drogas ya registradas y el uso de vacunas que puedan prevenir la infección. Es poco el número de estudios clínicos que evalúan nuevos compuestos lo cual motiva el desarrollo de la presente investigación (77).

2.2.6 Flavonoides

Los flavonoides son un grupo muy variado de metabolitos secundarios que se encuentran desarrollando múltiples funciones en el desarrollo de las plantas. Son de bajo peso molecular y se encuentran frecuentemente bajo formas glucosiladas y esterificadas. Su estructura base consta de dos anillos "A" y "B" unidos por un anillo de 3 carbonos (estructura base $C_6-C_3-C_6$). Ambos anillos se forman por rutas biosintéticas diferentes: el anillo A por múltiples condensaciones de tres acetatos y el anillo B por la ruta del shikimato vía fenilalanina (78).

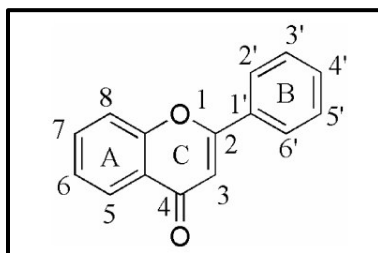


Figura 11. Estructura base de flavonoides. Fuente: Wang 2018(79)

Aunque existen flavonoides con una base diferente al esqueleto $C_6-C_3-C_6$, la forma tradicional de clasificarlos es en función al carbono del anillo C que se une el anillo B, distinguiéndose así a 1) flavonoides cuyo anillo B se encuentra unido a la posición 3 del anillo C, llamados isoflavonoides, 2) flavonoides cuyo anillo B se encuentra unido a la posición 4 del anillo C, llamados neoflavonoides y 3) flavonoides cuyo anillo B se encuentra unido a la posición 2 del anillo C, donde encontramos diversas estructuras diferenciadas por el grado de insaturación y oxidación del anillo C, distinguiéndose a las flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, flavanoles o catequinas, antocianinas y las moléculas de interés para la presente investigación, las chalconas (79,80).

2.2.6.1 Chalconas

Las chalconas son un grupo de compuestos de tipo flavonoide de cadena C abierta que se encuentran de manera natural en las plantas. Aunque son más conocidas como uno de los pigmentos que otorga coloración amarillo-anaranjada a las flores, se hallan distribuidas en diversos tejidos vegetales y son intermediarios centrales en la biosíntesis de flavonoides e isoflavonoides. Son moléculas de estructura pequeña no quirales y presentan una lipofilia relativamente alta (81).

Su estructura base es el 1,3-diaril-2-propen-1-ona también conocido como chalconoide, cuyo anillos A y B se unen por un sistema carbonilo α,β -insaturado de tres carbonos que lo distingue de otros flavonoides que presentan un anillo C heterocíclico. Se presentan como isómeros *trans* o *cis*, siendo el isómero *trans* termodinámicamente más estable (4).

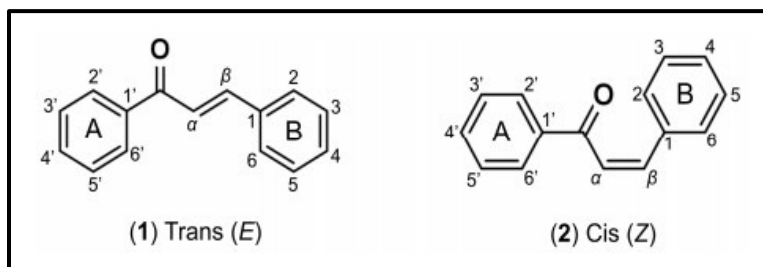


Figura 12. Chalconoide, estructura base de las chalconas. Isómeros *cis* y *trans*

Las chalconas presentan múltiples actividades biológicas dentro de las que destacan la actividad anti-inflamatoria, anti-cancerígena, anti-oxidante, anti-gota, anti-histamínica, anti-espasmódica, hipnótica, entre otras como se observa en la figura 12. Existe un interés particular en estas moléculas por su amplia variedad de actividades biológicas, su simplicidad estructural que las hacen de síntesis sencilla y por el bajo costo que esta síntesis involucra. Las chalconas reportadas con actividades farmacológicas prometedoras proceden tanto de recursos vegetales como de síntesis química; esta última como copia de una estructura natural original o del diseño de nuevas estructuras (82).

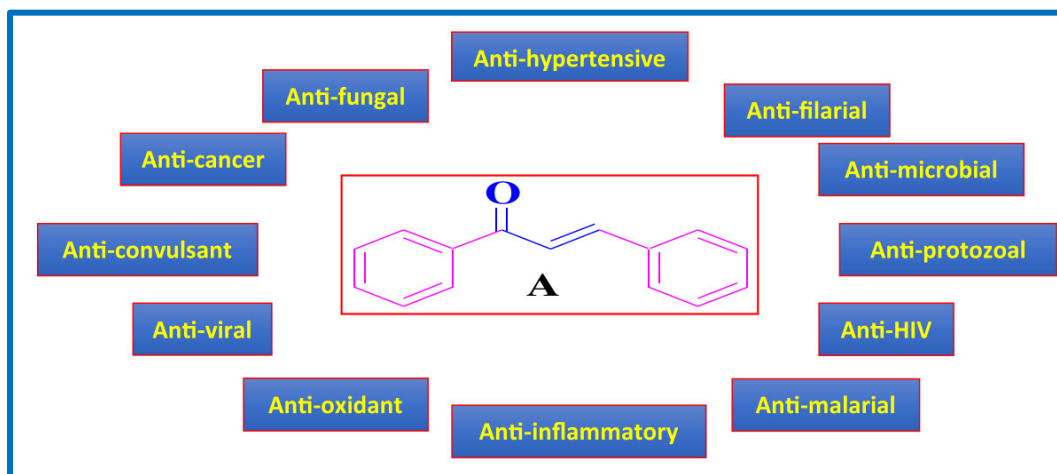


Figura 13. Actividades biológicas reportadas para chalconas y derivados.

Fuente: Singh 2014 (82).

2.2.6.2 Síntesis química de chalconas

Las chalconas son sintetizadas naturalmente (biosíntesis) dentro de diversas especies vegetales mediante la acción de enzimas Chalcona Sintetas (CHS) pertenecientes a una súperfamilia de enzimas homodiméricas. Por síntesis química se obtienen principalmente mediante la condensación de dos sistemas aromáticos, siendo la condensación de Claisen-Schmidt la vía clásica o más empleada. Nuevos métodos de síntesis surgieron debido al creciente interés por estas moléculas. Estos nuevos métodos emplean reactantes de naturaleza diferente a los de la vía clásica, nuevos catalizadores o cambios de las condiciones en las que se desarrollan la reacción. Estos métodos comprenden la reacción de acoplamiento de Heck carbonilativo, la reacción de acoplamiento, el acoplamiento de isomerización de Sonogashira, la reacción de deuteración de flujo continuo, la reacción de acoplamiento de Suzuki-Miyaura, entre otros. La elucidación estructural de los compuestos finales se realiza por métodos espectrofotométricos principalmente la Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN ^1H) (83).

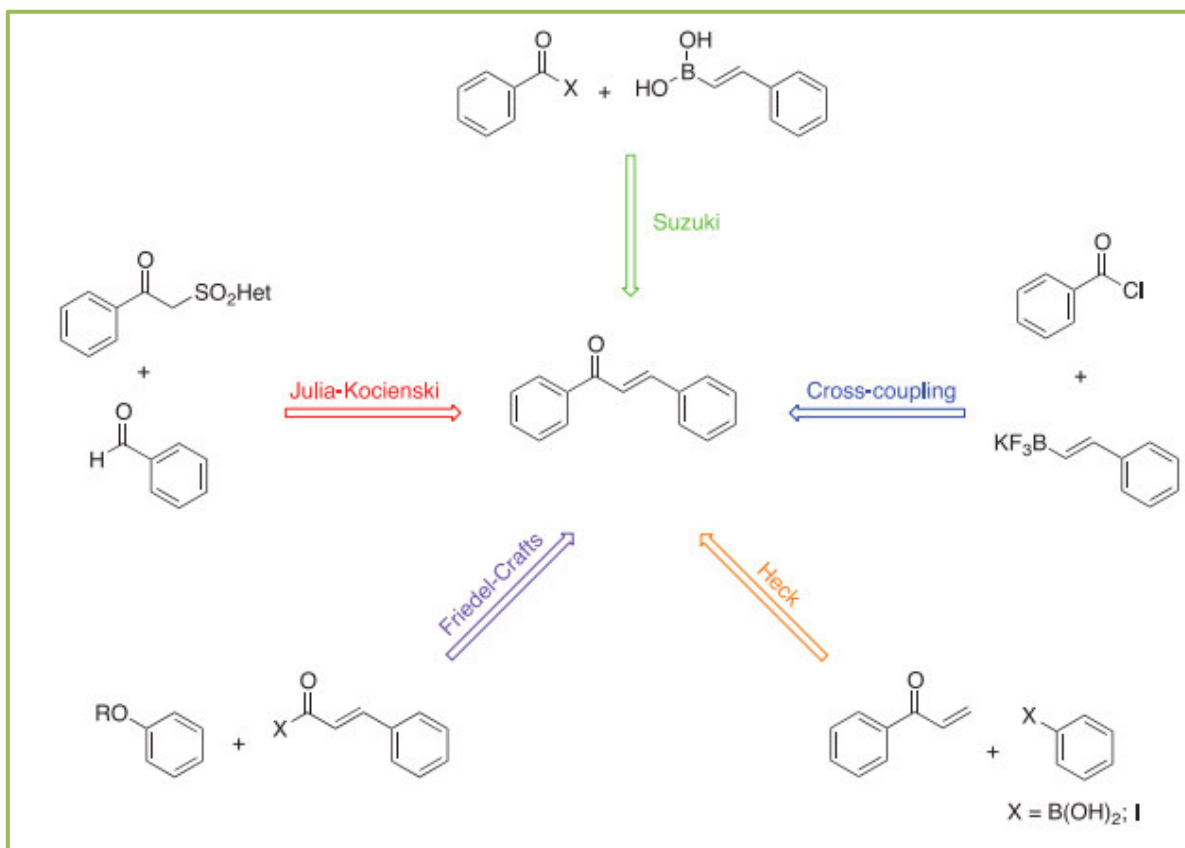


Figura 14. Reacciones conocidas para la síntesis química de chalconas.

Fuente: Matos 2015 (4).

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Unidades de Investigación

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Parasitología de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID) y en el Laboratorio Andino-Amazónico de Química de la Vida (LMI LAVI), ambos localizados en la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

3.2 Materiales, equipos y reactivos

3.2.1 Materiales

Vasos de precipitación, matraces, varillas de vidrio, embudos.

Balones esmerilados de una boca

Balones esmerilados de doble boca

Embudos de separación

Refrigerante de vidrio

Columnas de vidrio para cromatografía

Placas de silica gel 60 F254 para TLC. *Merck 1055530001*

Papel filtro

Pinza de relojero estéril

Cámara de Neubauer. *BrandTM*

Tips de 200 y 1000 μ L. *Axygen[®]*

Pipetas serológicas estériles de 1, 5 y 10 mL, *Falcon[®]*

Frascos de cultivo celular de 25 cm² *Falcon[®]*

Tubos cónicos de centrifuga de 15 mL, *Falcon[®]*

Tubos cónicos de centrifuga de 50 mL, *Falcon[®]*

Tubos de microcentrifuga de 1,5 mL, *Eppendorf[®]*

Placas de 96 pozos de fondo plano estériles, *Falcon*®

Placas Petri de plástico de 60 x 10 mm de diámetro, estériles *Falcon*®

Laminillas de 4 x 4 mm estériles *Corning*® #2

Tubos de vidrio con tapa rosca de baquelita

Tabla de disección

Estuche de disección: pinzas y tijeras

Jeringas de 10 mL estériles de empaque unitario

Agujas (21G y 26G) estériles de empaque unitario

Cell scrapper. *Falcon*®

Contenedor de congelación *Mr. Frosty*™

Crioviales

3.2.2 Equipos de laboratorio

Hot plate con agitación magnética. *ThermoFisher*

Rotaevaporador *Buchi*

MPLC *Buchi*

Estufa

Revelador UV

Cámara de TLC

Cabina de Bioseguridad Clase II A2. *Gelair BSB A4*

Incubadora de 37 °C y 32 °C al 5% de CO₂. *Nuaire*

Lector de microplacas. *Plate Chameleon (Hidex)*

Centrífuga refrigerada. *Hettich. D-78532 Tuttlingen*

Tanque de Nitrógeno

Microscopio óptico. *Olympus*

Microscopio invertido. *Olympus CK40*

Micropipetas (20, 200 y 1000 μL). Eppendorf®

Micropipeta multicanal de 50 y 200 μL . Eppendorf®

Pro-Pipeteador eléctrico

Vortex

Refrigeradora

3.2.3 Reactivos y otros

2, 4, 6-trihidroxiacetofenona-monohidratada. *Sigma-Aldrich T64602*

N,N-dimetilformamida anhidra (DMF). *Sigma-Aldrich 227056*

Carbonato de potasio anhidro: K_2CO_3

Metoximetil cloruro (MOMCl). *Sigma-Aldrich 100331*

Dimetilsulfato ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$). *Sigma-Aldrich D186309*

Piperonal. *Sigma-Aldrich P49104*

KOH p.a

MgSO_4 p.a

Metoximetil cloruro (MOMCl)

Tamiz molecular

Silica gel Fase Normal

Revelador Vainillina- H_2SO_4

Argón

Acetato de Etilo

Éter de petróleo

Metanol

Agua desionizada

Medio de cultivo 199. *Sigma-Aldrich M0393*

Suero Fetal Bovino (SFB). *Sigma-Aldrich F6178*

Glutamina 200 mM 100X. *Gibco 25030*

Penicilina/ Streptomycin

Tripsina-EDTA 0,05% 1X. *Gibco 25300*

Colorante Azul de Tripán. *Sigma-Aldrich T-8154*

Colorante rojo neutro estéril al 1% p/v (en agua destilada o PBS estéril).

Hemina

Alcohol 70°

Agar sangre de conejo

[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT). *Sigma-Aldrich*

Dimetil sulfóxido (DMSO). *Sigma-Aldrich D4540*

M199 suplementado: Medio de cultivo 199 suplementado a una concentración final del 10% de SFB, 1% de L-glutamina (2 mM), penicilina/estreptomycin (100 U/mL y 100 µg/mL, respectivamente), a un pH final de 7,4.

MAA: Medio de cultivo 199 suplementado con hepes, bicarbonato de sodio, glucosa y agar triptocaseína de soya, a un pH final de 5,8.

MAA20: Medio *MAA* suplementado al 20% de SFB, 1% de L-glutamina (2 mM, penicilina/estreptomycin (100 U/mL y 100 µg/mL, respectivamente) y hemina a un pH final de 6,5.

3.2.4 Material biológico

Para los ensayos anti-*Leishmania* se utilizaron cultivos parasitarios de la especie *Leishmania (Leishmania) infantum* cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263, aquí referida como “*L. infantum*”, y como modelo referencial se utilizaron cultivos parasitarios de la especie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* cepa MPRO/BR/72/M1841-LV-79, aquí referida como “*L. amazonensis*”. La especie *L. infantum* fue proporcionada por el Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD) de Francia y la especie *L. amazonensis* fue proporcionada por el Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” (IMTAvH). Ambas especies se encontraban criopreservadas bajo la forma de promastigotes procíclicos.

Para ensayos de citotoxicidad se utilizaron cultivos celulares de macrófagos de ratón de la línea RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™), referida aquí como “raw cell”. Esta línea celular fue proporcionada por el Instituto de Medicina Tropical “Alexander von Humboldt” (IMTAvH) en un criovial.

3.3 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones machos *Mus musculus* cepa BALB/c de seis a ocho semanas de edad para la extracción de macrófagos peritoneales. Estos macrófagos fueron utilizados en los ensayos de actividad anti-*Leishmania* (en el modelo de amastigotes intracelulares) y para ensayos de citotoxicidad. Los ratones fueron adquiridos en el Bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) y su manipulación se realizó acorde a lo aprobado por el comité de ética la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

3.4 Métodos

3.4.1 Chalconas

Se trabajó con tres chalconas de origen sintético descritas previamente por Aponte y col (17). Estas chalconas mantuvieron la denominación de “chalcona 40”, “chalcona 42” y “chalcona 43”. La chalcona 40 y la chalcona 43 fueron proporcionadas por el “Laboratorio Andino-Amazónico de Química de la Vida” (LMI-LAVI), localizado en la Universidad Peruana Cayetano Heredia. La chalcona 42 se obtuvo mediante síntesis química en el mismo laboratorio como se detalla a continuación.

3.4.1.1 Síntesis de la “chalcona 42” (16,17)

Síntesis de la acetofenona

Se disolvió 3 g de 2,4,6-trihidroxiacetofenona-monohidratada (16 mmol) en 30 mL de DMF y luego se le añadió 6,9 g de K_2CO_3 (49 mmol). Esta mezcla fue agitada en un *hot plate* durante 3 horas a temperatura ambiente y en presencia de argón. Luego se le añadió 2,75 mL de MOMCl (36 mmol) y se dejó acondicionar el sistema durante una hora. Luego de este tiempo se sometió el sistema a 60 °C durante 2 horas. La solución fue filtrada y particionada entre acetato de etilo y una solución saturada de NaCl. La fase orgánica fue secada con $MgSO_4$ y evaporación. Se purificó este producto mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil el sistema éter de petróleo: acetato de Etilo (8,5:1,5). Se realizó el TLC de las fracciones obtenidas y se juntaron aquellas que mantenían la misma razón de flujo (RF). Se realizó y analizó el espectro RMN¹H de las fracciones y se identificó y escogió la que correspondía al compuesto 2,4-dimetoximetil-6-hidroxiacetofenona.

Se disolvió 0,5 g (1,95 mmol) de la 2,4-dimetoximetil-6-hidroxiacetofenona en 5 mL de DMF y en seguida se le añadió 0,8 g (5,9 mmol) de K_2CO_3 y 0,2 mL (2,15 mmol) de dimetilsulfato. Esta mezcla fue agitada durante 24 horas a temperatura ambiente y en presencia de argón. Se purificó este producto mediante cromatografía en columna utilizando como fase móvil éter de petróleo: acetato de etilo (8,5:1,5) para obtener 2,4-dimetoximetil-6-metoxiacetofenona.

Condensación aldólica

La 2,4-dimetoximetil-6-metoxiacetofenona (190 mg, 0,70 mmoles) más piperonal (122 mg, 0,82 mmoles), más KOH (855 mg, 4 mmol), H₂O (855 µL) y CH₃OH (1710 µL) fueron agitados a temperatura ambiente durante 24 horas en presencia de argón. Se añadió 10 mL de agua desionizada y la solución fue extraída con acetato de etilo (2 x 5 mL). La fase orgánica fue secada con ayuda de MgSO₄ y evaporación. El extracto crudo fue sometido a cromatografía en columna usando como fase móvil éter de petróleo: acetato de etilo (8:2). El producto aislado correspondió a la CHALCONA 42.

3.4.2 Identificación de chalconas(17)

Las tres chalconas fueron analizadas por RMN¹H y se compararon los datos del desplazamiento de sus señales, sus constantes de acoplamiento e integraciones con los descritos en la literatura.

3.4.3 Disolución de los compuestos

Las chalconas fueron disueltas en DMSO a una concentración final de 10 mM (≈10 000 µM). La anfotericina B fue disuelta en DMSO a una concentración final de 1 mM (≈1 000 µM). Para ambas disoluciones se considera que la muestra se encuentra a una concentración inicial de DMSO al 100%.

3.4.4 Ensayos biológicos

3.4.4.1 Identificación de los parásitos(84)

Los parásitos fueron descriopreservados y re-cultivados en tubos de vidrio con medio bifásico compuesto por una fase sólida de agar sangre y una fase líquida de medio *M199 suplementado*. El éxito de la descriopreservación se confirmó mediante la observación en microscopio invertido de la movilidad y el crecimiento poblacional de los parásitos. Los parásitos fueron adaptados a medio monofásico por una semana y fueron utilizados para ser a) identificados, b) criopreservados y c) cultivados.

La identidad de los parásitos fue confirmada mediante tipificación por PCR-RFLP teniendo como diana un fragmento del gen *hsp70*. Los parásitos, adaptados al medio *M199 suplementado*, fueron llevados a un tubo cónico de 15 mL y centrifugados a 1500g por 10 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet formado fue lavado dos veces con PBS por centrifugación y almacenado a -20 °C. La extracción del ADN se llevó a cabo utilizando el kit de extracción de ADN *High Pure PCR Template Preparation* de Roche®. El ADN extraído fue almacenado a -20 °C hasta su procesamiento.

El ADN aislado fue sometido a una primera digestión empleando la enzima EcoRII. La digestión con EcoRII se llevó a cabo por una noche y con esta primera digestión se identificó a la especie *L. amazonensis*. Para la identificación de la especie *L. infantum* se realizó una segunda digestión utilizando la enzima MluI, muestra fue digerida por una noche también. Los productos de las digestiones fueron corridos en gel de agarosa al 1% en una cámara electroforética horizontal, a 60mA por una hora. La identificación se llevó a cabo comparando el patrón electroforético de las muestras con la de los respectivos estándares (Anexo 8).

Nota:

- * EcoRII permite diferenciar entre las especies *L. mexicana*, *L. guyanensis*, *L. infantum*, *L. amazonensis*. Entre las especies *L. guyanensis/L. panamensis* y *L. infantum/L. donovani* se mantiene el mismo patrón de bandas con esta enzima.
- * MluI permite diferenciar *L. donovani* de *L. infantum* (con quien mantiene un mismo patrón de bandas con EcoRII).

Los parásitos identificados fueron criopreservados. Se utilizó parásitos en crecimiento exponencial (tercer día después del último sub-pasaje) y adaptados al medio *M199 suplementado*. Los parásitos fueron centrifugados y resuspendidos en un medio de cultivo M199 suplementado al 20% de SFB y 10% de glicerol estéril (crioprotector). La concentración final de parásitos fue de 1×10^6 parásitos/mL. Se distribuyeron en crioviales de 1 mL y se almacenaron en un contenedor de congelación (Mr. Frosty™) a -20 °C por una hora, a -70 °C por un día y finalmente fueron almacenados en nitrógeno líquido.

3.4.4.2 Mantenimiento de los parásitos(85)

Los parásitos fueron cultivados como promastigote en medio bifásico (fase sólida de agar sangre y fase líquida de medio *M199 suplementado*) en tubos de vidrio. Se mantuvieron a 24 ± 2 °C en una atmósfera normal (sin CO₂) con sub-pasajes cada 3 días. Una semana previa a cada experimento, los parásitos eran adaptados al medio *M199 suplementado* en frascos de cultivo celular de 25 cm².

Para la especie *L. infantum* se cultivaron amastigotes axénicos procedentes de la transformación de los promastigotes. Se utilizaron promastigotes de cinco días desde el último sub-pasaje (fase estacionaria). Estos promastigotes fueron centrifugados por 10 minutos a 1500g a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y reemplazado por medio de cultivo *MAA20* y llevado a un frasco de cultivo celular de 25 cm². La transformación fue inducida por el incremento de la temperatura a 37 °C por 96 horas en una atmósfera al 5% de CO₂. Los sub-pasajes eran realizados cada 3 días.

3.4.4.3 Curva de crecimiento (85)

Se utilizaron promastigotes adaptados al sistema monofásico (*M199 suplementado*) y con último sub-pasaje no mayor a tres días. En condiciones de esterilidad se renovó el medio de cultivo por centrifugación y se determinó la concentración parasitaria por conteo óptico en una cámara de Neubauer. Se prepararon concentraciones iniciales (día cero) de 1×10^6 parásitos/mL (*L. amazonensis*) y 3×10^6 parásitos/mL (*L. infantum*). El volumen final fue de 5 mL contenidos en un frasco de cultivo de 25 cm². Los parásitos fueron incubados a 24 ± 2 °C en una atmosfera normal. Por 6 días se homogenizaron y extrajeron 50 µL del cultivo para determinar la concentración diaria de los parásitos. Se utilizó PBS para realizar las diluciones correspondientes y luego se llevaron 10 µL de la dilución final a la cámara de Neubauer. El recuento se realizó en un microscopio óptico y se contó el número de parásitos en los cuatro cuadrantes laterales de la cámara. Cada recuento se realizó por triplicado. El cálculo del número de parásitos por mL se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\# \text{ de Parásitos/mL} = \left(\frac{\Sigma \text{ parásitos de 4 cuadrantes}}{4} \right) \times \text{FD} \times 10^4$$

FD: Factor de dilución

10⁴: Factor de conversión de la cámara

3.4.4.4 Cinética de Infección (17)

Se aislaron macrófagos de la cavidad peritoneal de ratones machos *Mus musculus* cepa BALB/c según el procedimiento detallado en la citotoxicidad. En una microplaca de fondo plano, a los que previamente se les había colocado una lámina de vidrio estéril por pozo, se colocaron 5×10^4 macrófagos por pozo. Estos macrófagos fueron incubados por una noche a 37 °C y 5% de CO₂, al día siguiente se añadieron los parásitos en las proporciones indicadas en la tabla 1. Se incubaron por 2 horas a 37°C para *L. infantum* y 33 °C para *L. amazonensis* en una atmósfera al 5% de CO₂. Se realizaron tres lavados para descartar a los parásitos no internalizados y se dejó incubar. Las láminas de vidrio fueron diariamente fijadas con metanol, teñidas con colorante Giemsa y montadas en portaobjetos para posteriormente realizar el recuento de los amastigotes por macrófago infectado

Tabla 1. Proporción macrófago: parásito para el desarrollo de la cinética de infección

Especie parasitaria	Proporción macrófago / parásito
<i>L. infantum</i>	1:10
	1:20
<i>L. amazonensis</i>	1:1
	1:2

Las láminas fueron observadas en el microscopio óptico y se contó el número de amastigotes fagocitados en cada macrófago. El recuento incluyó macrófagos infectados y no infectados (cero amastigotes) hasta alcanzar una muestra de 100 macrófagos. De estos datos se determinó el:

Número de amastigotes intracelulares:

$$\# \text{ amastigotes intracelulares} = \left(\frac{\sum \text{ amastigotes (en los 100 macrófagos)}}{\# \text{ de macrófagos infectados}} \right)$$

Porcentaje de infección:

$$\% \text{ de infección} = \left(\frac{\# \text{ de macrófagos infectados}}{\text{Total de macrófagos}} \right) \times 100\%$$

Carga parasitaria:

$$\mathbf{Carga\ parasitaria} = (\# \text{ amastigotes intracelulares}) \times (\% \text{ de infección})$$

Reemplazando:

$$= \left(\frac{\sum \text{ amastigotes (en los 100 macrófagos)}}{\text{Total de macrófagos}} \right) \times 100$$

$$= \left(\sum \text{ amastigotes (en los 100 macrófagos)} \right)$$

3.4.4.5 Ensayos de citotoxicidad(86)

3.4.4.5.1 Ensayo de citotoxicidad sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c

La determinación de la concentración citotóxica media (CC_{50}) de los compuestos se determinó a través de un micrométodo enzimático utilizando el reactivo colorimétrico [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT). Se extrajeron macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratones machos *Mus musculus* cepa BALB/c. Para ello, los ratones fueron sacrificados en una cámara de CO_2 y colocados sobre una tabla de disección para exponer el peritoneo. Se inoculó 5 mL de medio de cultivo M199 frío (4 °C) en la cavidad peritoneal evitando perforar los intestinos. Luego se extrajo el volumen inoculado con la jeringa y se llevó el contenido a un tubo cónico y se centrifugó a 150g por 5 minutos a 4 °C. Se renovó el medio de cultivo y se tomó 95 μ L del cultivo para llevarlo a un tubo de microcentrífuga que contenía 5 μ L de colorante rojo neutro, se incubó por 15 minutos a 37 °C y 5% de CO_2 y se determinó la concentración inicial por recuento óptico.

Se colocaron 5×10^4 macrófagos en cada pozo de la microplaca de fondo plano y después de una hora de incubación a 37 °C y 5% de CO_2 se lavaron los pozos con PBS temperado (37 °C) para finalmente colocar 100 μ L de medio *M199 suplementado* temperado. Luego se dejó incubar por una noche bajo las mismas condiciones.

Al día siguiente se renovó el medio con 50 μ L de *M199 suplementado* temperado y se añadieron los compuestos (chalconas) contenidos en 50 μ L de volumen para obtener concentraciones finales por debajo de los 400 μ M (200, 100, 50 y 25 μ M). Se utilizó anfotericina B como droga de referencia y macrófagos sin exposición a algún compuesto como control de crecimiento. Se incubó la microplaca por 48 horas a 37 °C y 5% de CO_2 . Se agregó 20 μ L de MTT a 5 mg/mL y se incubó por otras 4 horas. Se agregaron 100 μ L de buffer de lisis (50% isopropanol – 10% dodecil sulfato de sodio) y se homogenizó por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se leyó la absorbancia de cada pozo a 595 nm en un lector de microplacas y se determinó el CC_{50} de los compuestos.

Diseño Experimental:

Tabla 2. Diseño experimental para determinar la actividad citotóxica de los compuestos sobre macrófagos de ratón

	Grupo Experimental	Control positivo	Control de Crecimiento	Blanco	Control de solvente
Macrófagos (0,5x10⁶ MΦ/mL)	0,5x10 ⁵ MΦ (100 μL)	0,5x10 ⁵ MΦ (100 μL)	0,5x10 ⁵ MΦ (100 μL)	-	0,5x10 ⁵ MΦ (100 μL)
Medio Solo	50 μL	50 μL	100 μL	100 μL	50 μL
Chalcona	50 μL				
Anfotericina B		50 μL			
DMSO 1%					50 μL

- Grupo experimental:** Grupo conformado por macrófagos expuestos a cuatro concentraciones diferentes de las tres chalconas en evaluación.
- Control positivo de actividad citotóxica:** Grupo conformado por macrófagos expuestos a cuatro concentraciones diferentes de la droga de referencia anfotericina B.
- Control de Crecimiento:** Grupo conformado por macrófagos sin exposición a algún compuesto.
- Blanco:** Grupo conformado por medio de cultivo (libre de microorganismos).
- Control de Solvente:** Grupo conformado por macrófagos expuestos a la máxima concentración de DMSO en los compuestos (No mayor al 1%).

El porcentaje de inhibición fue calculado según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \left(\frac{\text{OD control} - \text{OD compuesto}}{\text{OD control}} \right) \times 100$$

La concentración citotóxica que inhibe el 50% del crecimiento de los macrófagos (CC₅₀) fue calculado a través del análisis probit en una plantilla de Excel.

3.4.4.5.2 Ensayo de citotoxicidad sobre la línea celular RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™)(86)

La línea celular RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) fue cultivada en medio *M199 suplementado* a 37 °C y 5% de CO₂. Las células fueron desadheridas con tripsina y un raspador de células (*cell scraper*) para ser trasladadas a un tubo cónico a 4 °C (baño frío). Se determinó la concentración de las células por mililitro tomando 50 µL del cultivo y llevándolo a un tubo de microcentrífuga que contenía 50 µL de azul de tripán. Inmediatamente se llevó 10 µL del contenido a una cámara de Neubauer para proceder a su conteo.

Se colocaron 1×10^4 macrófagos en cada pozo de una microplaca de fondo plano y se incubó por 2 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Después se renovó el medio añadiendo 50 µL de medio *M199 suplementado*. Se añadieron los compuestos (chalconas) contenidas en 50 µL de medio de cultivo para obtener concentraciones finales por debajo de los 400 µM (200, 100, 50 y 25 µM). Se utilizó anfotericina B como droga de referencia y macrófagos solos como control de crecimiento (sin drogas). Se dejó incubar por 48 horas a 37 °C y 5% de CO₂. Se agregó 20 µL de MTT (5 mg/mL) y se incubó por otras 4 horas a 37 °C y 5% de CO₂, luego se agregaron 100 µL de buffer de lisis (50% isopropanol – 10% dodecil sulfato de sodio) y se homogenizó por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se leyó la absorbancia de cada pozo a 595 nm en un lector de microplacas Plate Chameleon (Hidex).

Diseño Experimental:

Tabla 3. Diseño experimental para determinar la actividad citotóxica sobre la línea celular RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™)

	Grupo Experimental	Control positivo	Control de Crecimiento	Blanco	Control de solvente
Línea Celular (10⁵ MΦ/mL)	10 ⁴ células (100 μL)	10 ⁴ células (100 μL)	10 ⁴ células (100 μL)	-	10 ⁴ células (100 μL)
Medio Solo	50 μL	50 μL	100 μL	100 μL	50μL
Chalcona	50 μL				
Anfotericina B		50 μL			
DMSO 1%					50 μL

- Grupo experimental:** Grupo conformado por la línea celular *raw cell* expuesta a cuatro concentraciones diferentes de las tres chalconas en evaluación.
- Control positivo de actividad citotoxicidad:** Grupo conformado por la línea celular *raw cell* expuesta a cuatro concentraciones diferentes de la droga de referencia anfotericina B.
- Control de Crecimiento:** Grupo conformado por la línea celular *raw cell* sin exposición a algún compuesto.
- Blanco:** Grupo conformado por medio de cultivo (libre de microorganismos).
- Control de Solvente:** Grupo conformado por la línea celular *raw cell* expuesta a la máxima concentración de DMSO en los compuestos (No mayor al 1%).

El porcentaje de inhibición fue calculado según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \left(\frac{\text{OD control} - \text{OD compuesto}}{\text{OD control}} \right) \times 100$$

La concentración citotóxica que inhibe el 50% del crecimiento celular (CC₅₀) fue calculado a través del análisis probit en una plantilla de Excel.

3.4.4.6 Evaluación anti-*Leishmania in vitro* de las chalconas

3.4.4.6.1 Sobre promastigotes procíclicos de *L. infantum* y *L. amazonensis*(13)

La determinación de la concentración inhibitoria media (IC_{50}) de los compuestos se determinó a través de un micrométodo enzimático utilizando el reactivo colorimétrico MTT. Los siguientes procedimientos fueron llevados a cabo en condiciones estériles en una cabina de flujo laminar. Se utilizaron promastigotes de ambas especies en fase de crecimiento exponencial adaptados al sistema monofásico. Se renovó el medio de cultivo por centrifugación, se contó los parásitos en la cámara de Neubauer y se preparó un cultivo a una concentración final de 2×10^6 parásitos/mL. En una microplaca de 96 pozos se colocaron 1×10^5 parásitos contenidos en 50 μ L de cultivo. Todos los pozos fueron llenados con estos 50 μ L menos los pozos correspondientes al blanco, a los que se le añadieron únicamente 50 μ L de medio de cultivo (sin parásitos).

Se prepararon 4 concentraciones por debajo de los 100 μ M (40, 20, 10 y 5 μ M) del stock de las chalconas a través de diluciones seriadas con medio de cultivo *M199 suplementado*. Se llevaron 50 μ L de estas diluciones a los pozos que contenían a los parásitos, menos al control de crecimiento y al blanco de medio. La droga de referencia fue anfotericina B evaluándose 4 concentraciones de esta por debajo de los 10 μ M. La tabla 4 muestra el contenido de cada grupo experimental.

Los pozos ubicados a los bordes de la placa fueron completados con 200 μ L de agua estéril para evitar el efecto de borde. La placa fue incubada por 72 horas a 24 ± 2 °C en una atmósfera normal. Después del periodo de incubación se agregó 20 μ L de MTT a una concentración de 5 mg/mL. Se incubó por 4 horas y se agregó 100 μ L de buffer de Lisis (50% isopropanol – 10% dodecil sulfato de sodio) y se homogenizó por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se leyó la absorbancia de cada pozo a 595 nm en un lector de microplacas. Tres experimentos fueron realizados independientemente.

La viabilidad de los parásitos se observó por la formación de un precipitado púrpura debido a la reducción del MTT por enzimas deshidrogenasas mitocondriales presentes en los parásitos vivos, el resultado se contrastó con un control de crecimiento parasitario.

Diseño Experimental

Tabla 4. Diseño experimental para determinar la actividad anti-*Leishmania* en promastigotes procíclicos

	Grupo Experimental	Control positivo	Control de Crecimiento	Blanco	Control de solvente
Parásitos 2x10 ⁶ parásitos/mL	50 µL	50 µL	50 µL		50 µL
Chalcona	50 µL				
Anfotericina B		50 µL			
Medio Solo			50 µL	100 µL	
DMSO 1%					50 µL

- Grupo experimental:** Grupo conformado por los parásitos de *Leishmania* expuestos a 4 concentraciones diferentes de las tres chalconas en evaluación
- Control positivo de actividad anti-*Leishmania*:** Grupo conformado por los parásitos de *Leishmania* expuestos a 4 concentraciones diferentes de la droga de referencia anfotericina B.
- Control de Crecimiento:** Grupo conformado por los parásitos de *Leishmania* sin exposición a algún compuesto.
- Blanco:** Grupo conformado por medio de cultivo (libre de microorganismos).
- Control de Solvente:** Grupo conformado por los parásitos de *Leishmania* expuestos a la máxima concentración de DMSO presente en los compuestos (No mayor al 1%).

El porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito fue calculado según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \left(\frac{\text{OD control} - \text{OD compuesto}}{\text{OD control}} \right) \times 100$$

La concentración inhibitoria del 50% del crecimiento del parásito (IC₅₀) fue calculado a través del análisis probit en una plantilla de Excel.

3.4.4.6.2 Sobre amastigotes axénicos de *Leishmania infantum*

La determinación de la concentración inhibitoria media (IC_{50}) de los compuestos se determinó mediante el micrométodo enzimático descrito anteriormente. Fueron utilizados amastigotes axénicos en fase de crecimiento exponencial. El medio de cultivo fue renovado por centrifugación a 1800 g por 10 minutos a 22 °C, y luego se determinó la concentración inicial de los parásitos. Se preparó un cultivo a una concentración de 4×10^6 parásitos/mL. Se colocó en cada pozo de una microplaca de 96 pozos 2×10^5 parásitos contenidos en 50 μ L del cultivo preparado. Los pozos ubicados a los bordes de la microplaca fueron completados con 200 μ L de agua destilada estéril para evitar el efecto de borde.

Se muestra el contenido de los pozos por cada grupo experimental en la tabla 5. Se prepararon 4 concentraciones diferentes de las chalconas, menores a los 100 μ M (16, 8, 4 y 2 μ M) y 4 concentraciones de la droga de referencia anfotericina B menores a los 10 μ M. Se añadieron a la microplaca junto a los parásitos. La microplaca fue incubada por 72 horas a 37 °C y 5% de CO_2 . Después del periodo de incubación se agregaron 20 μ L de MTT (5 mg/mL) y se incubó por otras 4 horas en las mismas condiciones. Se agregó 100 μ L de buffer de Lisis (50% isopropanol – 10% dodecil sulfato de sodio) y se homogenizó por 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se leyó la absorbancia de cada pozo a 595 nm en un lector de microplacas Plate Chameleon (Hidex). Se realizaron tres experimentos independientes.

Diseño Experimental:

Tabla 5. Diseño experimental para determinar la actividad anti-*Leishmania* en amastigotes axénicos

	Grupo Experimental	Control positivo	Control de Crecimiento	Blanco	Control de solvente
Parásitos 4x10 ⁶ parásitos/mL	50 µL	50 µL	50 µL		50 µL
Chalcona	50 µL				
Anfotericina B		50 µL			
Medio Solo			50 µL	100 µL	
DMSO 1%					50 µL

- Grupo experimental:** Grupo conformado por parásitos de *Leishmania* expuestos a cuatro concentraciones diferentes de las chalconas en evaluación.
- Control positivo de actividad anti-*Leishmania*:** Grupo conformado por los parásitos de *Leishmania* expuestos a cuatro concentraciones diferentes de la droga de referencia anfotericina B.
- Control de Crecimiento:** Grupo conformado por los parásitos de *Leishmania* sin exposición a algún compuesto.
- Blanco:** Grupo conformado por medio de cultivo (libre de microorganismos).
- Control de Solvente:** Grupo conformado por los parásitos de *Leishmania* expuestos a la máxima concentración de DMSO en los compuestos (No mayor al 1%).

El porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito fue calculado según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \left(\frac{\text{OD control} - \text{OD compuesto}}{\text{OD control}} \right) \times 100$$

La concentración inhibitoria del 50% del crecimiento del parásito (IC₅₀) fue calculado a través del análisis probit en una plantilla de Excel.

3.4.4.6.3 Sobre amastigotes intracelulares (o intramacrofágicos)

Se aislaron los macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratones machos *Mus musculus* cepa BALB/c y se colocaron $0,5 \times 10^5$ macrófagos en cada pozo de una microplaca de fondo plano a la que previamente se les había colocado laminillas de vidrio estériles. Estos macrófagos fueron incubados por una noche a 37 °C y 5% de CO₂. Al día siguiente, los macrófagos fueron infectados con amastigotes de *Leishmania infantum* y promastigotes estacionarios de *Leishmania amazonensis* (modelo referencial) en proporciones de 1:5 y 1:2, respectivamente. Se incubaron por 4 horas a 37 °C para *Leishmania infantum* y por 2 horas a 33 °C para *Leishmania amazonensis*, en una atmósfera al 5% de CO₂. Luego se realizaron de dos a tres lavados para descartar aquellos parásitos no internalizados y se dejó incubar.

Al día siguiente se renovó el medio de cultivo eliminando el medio de cultivo de cada pozo y añadiendo 90 µL de medio fresco. El stock de chalconas fue disuelto en medio de cultivo *M199 suplementado* y se añadieron 10 µL de las chalconas según el esquema de la tabla 6. Las chalconas fueron testeadas a concentraciones finales por debajo de los 200 µM (100, 50, 25, 12,5 µM). Se dejó incubando por 48 horas a las temperaturas correspondientes al 5% de CO₂. La concentración final de DMSO no fue mayor al 1%

A las 48 horas las células fueron fijadas y teñidas con colorante Giemsa y se contó a) el número de células infectadas y b) la cantidad de amastigotes por cada macrófago infectado. Se utilizó como control la anfotericina B a concentraciones entre los 0,05 y 2 µM.

Diseño Experimental:

Tabla 6. Diseño experimental para determinar la actividad anti-*Leishmania* sobre amastigotes intracelulares

	Grupo Experimental	Control positivo	Control de Crecimiento	Blanco	Control de solvente
Macrófagos ($0,5 \times 10^6$ MΦ/mL)	$0,5 \times 10^5$ MΦ (100 μL)	$0,5 \times 10^5$ MΦ (100 μL)	$0,5 \times 10^5$ MΦ (100 μL)	$0,5 \times 10^5$ MΦ (100 μL)	$0,5 \times 10^5$ MΦ (100 μL)
<i>L. amazonensis</i>	1×10^5	1×10^5	1×10^5		1×10^5
<i>L. infantum</i>	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$		$2,5 \times 10^5$
Chalcona	10 μL				
Anfotericina B		10 μL			
Medio Solo	90 μL	90 μL	100 μL	100 μL	
DMSO 1%					100 μL

L.a: *Leishmania amazonensis* *L.i:* *Leishmania infantum*

- Grupo experimental:** Grupo conformado por macrófagos infectados con parásitos de *Leishmania* expuestos a cuatro concentraciones diferentes de las tres chalconas en evaluación.
- Control positivo de actividad anti-*Leishmania*:** Grupo conformado por macrófagos infectados con parásitos de *Leishmania* expuestos a cuatro concentraciones diferentes de la droga de referencia anfotericina B.
- Control de Crecimiento:** Grupo conformado por macrófagos infectados con parásitos de *Leishmania* sin exposición a algún compuesto.
- Blanco:** Grupo conformado por macrófagos y medio de cultivo sin exposición a algún compuesto.
- Control de Solvente:** Grupo conformado por macrófagos infectados con parásitos de *Leishmania* expuestos a la máxima concentración de DMSO de los compuestos (No mayor al 1%).

Los porcentajes de inhibición se calcularon a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \left(\frac{\text{CP control} - \text{CP compuesto}}{\text{CP control}} \right) \times 100$$

Donde:

CP: Carga parasitaria en el recuento de 100 macrófagos. El cálculo de la CP se detalla en la metodología, apartado 3.4.4.4.

La dosis inhibitoria del 50% del crecimiento del parásito (IC_{50}) fue calculado a través del análisis Probit en una plantilla de Excel.

3.4.4.7 Índice de Selectividad (IS)(17)

Se determinó el índice de selectividad de las chalconas de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$IS = \frac{CC_{50}}{IC_{50}}$$

Dónde:

CC_{50} : concentración citotóxica media sobre los macrófagos peritoneales.

IC_{50} : Concentración inhibitoria media sobre los parásitos.

3.4.4.8 Plan de análisis

Todos los datos fueron subidos a una hoja de Excel para su posterior análisis. La CC_{50} e IC_{50} fueron determinadas por análisis de regresión (Probit) en una plantilla de Excel. La CC_{50} e IC_{50} fue definida como la concentración de la muestra que reduce en un 50% la absorbancia de los controles no tratados (control de crecimiento).

Los resultados de CC_{50} e IC_{50} fueron comparados entre las chalconas y la droga de referencia mediante el análisis de varianza de un solo factor y la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis; las comparaciones entre los grupos mediante la prueba de Tukey. Este análisis se realizó en los programas estadísticos Epi Info v7 y SPSS v22. El grado estadístico significativo se estableció para un valor $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

4.1 CHALCONAS

4.1.1 Descripción de las Chalconas

Como se mencionó en la metodología, las chalconas 40 y 43 fueron proporcionadas por el LMI-LAVI y la chalcona 42 se obtuvo por síntesis química. Las chalconas del estudio presentan la estructura base mostrada en la figura 15, descrita por Aponte y col (17). Físicamente son sólidos no cristalinos de tono amarillo (chalcona 42 y 43) y parduzco (chalcona 40) como se observa en la tabla 7.

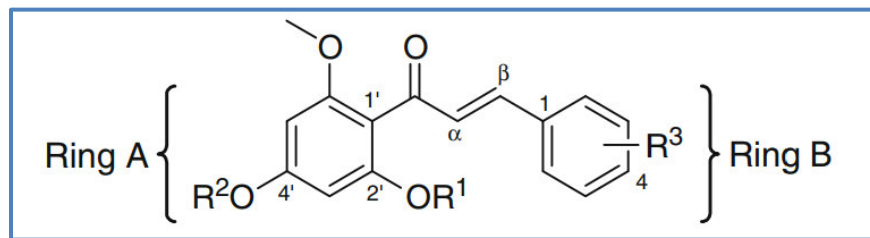
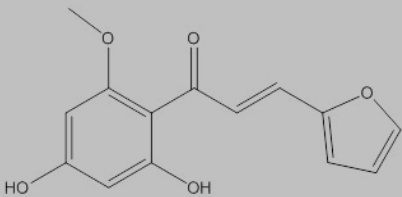
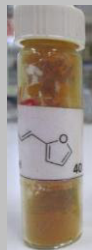
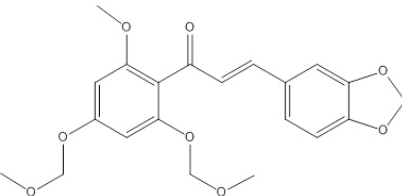

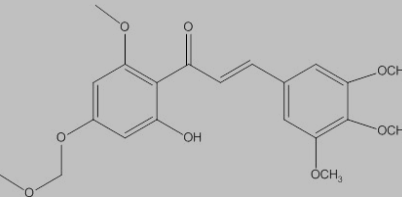



Figura 15. Estructura base de las chalconas en estudio

Tabla 7. Característica químico-estructural de las chalconas en estudio

Chalconas	Estructura	Anillo A	Anillo B	Nombre	Presentación
Chalcona 40		2',4'-Dihydroxy	(R ₃) 2-Furanyl	(2E)-1-(2,4-Dihydroxy-6-methoxyphenyl)-3-(2-furanyl)-2-propen-1-one.	
Chalcona 42		2',4' -Dimethoxy methyl	3,4-Methylenedioxy	(2E)-3-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-1-(2,4-dimethoxymethyl-6-methoxyphenyl)-2-propen-1-one.	
Chalcona 43		2'-Hydroxy-4'-methoxymethyl	3,4,5-Trimethoxy	(2E)-1-(2-Hydroxy-4-methoxymethyl-6-methoxyphenyl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2-propen-1-one.	

4.1.2 Síntesis Química de la Chalcona 42

La tabla 8 muestra los porcentajes de rendimiento de las reacciones que conllevaron a la síntesis de la chalcona 42. Se observa que la primera y segunda reacción presentan un bajo rendimiento. La ecuación química de las reacciones se detalla en el anexo 3.

Tabla 8. Porcentajes de rendimiento de cada reacción en la obtención de la Chalcona 42

Reacción	Reactante	Peso	Producto	Peso	Rendimiento
1	2,4,6-trihidroxiacetofenona	3 g	2,4-dimetoximetil-6-hidroxiacetofenona	1 g	24%
2	2,4-dimetoximetil-6-hidroxiacetofenona	500 mg	2,4-dimetoximetil-6-metoxiacetofenona	380 mg	15%
3	2,4-dimetoximetil-6-metoxiacetofenona	190 mg	CHALCONA 42	211 mg	75%

Al final de la síntesis se obtuvieron 211 mg de un sólido no cristalino de color amarillo tenue correspondiente a la chalcona 42 como se observa en la figura 16.



Figura 16. Cristales de la Chalcona 42

4.1.3 Identificación de las Chalconas

La identificación de la chalconas se llevó a cabo analizando los espectros RMN ^1H de las 3 chalconas y comparándolos con los reportados previamente por Aponte y col. (17). Se muestran las constantes de acoplamiento e integraciones de las señales para cada chalcona y los espectros RMN ^1H se muestran en los anexos 5, 6 y 7.

Tabla 9. Constantes de acoplamiento e integraciones de las señales del espectro RMN ^1H de la CHALCONA 40 (500 MHz, Chloroform-*d*)

Señal	Datos del producto	Datos de Literatura (500 MHz)(17)
1	7.78 (d, J=15.3Hz,1H)	7.70 (d, J=15.5Hz,1H)
2	7.59 (d, J=15.3Hz,1H)	7.44 (d, J=15.5Hz,1H)
3	7.54 (s, 1H)	7.43 (s, 1H)
4	6.69 (d, J=3.4Hz,1H)	6.58 (d, J=3.5Hz,1H)
5	6.52 (dd, J=3.4Hz,1.8Hz,1H)	6.41 (dd, J=2,3Hz,1H)
6	6.04 (d, J=2.2Hz,1H)	5.91 (d, J=2Hz,1H)
7	5.97 (d, J=2.3Hz,1H)	5.87 (d, J=2Hz,1H)
8	3.95 (s, 3H)	3.82 (s, 3H)

Tabla 10. Constantes de acoplamiento e integraciones de las señales del espectro RMN ^1H de la CHALCONA 42 (500 MHz, Chloroform-*d*)

Señal	Datos del producto	Datos de Literatura(17) (500MHz)
1	7.32 (s, 1H)	7.21 (d, J=16.5Hz,1H)
2	7.08 (d, J= 1.7Hz,1H)	6.98 (s, 1H)
3	7.01 (dd, J=8.1, 1.7Hz,1H)	6.90 (d, J=8Hz,1H)
4	6.81 (m, 2H)	6.71 (m, 2H)
5	6.52 (d, J= 2.0Hz,1H)	6.44 (s, 1H)
6	6.39 (d, J= 1.9Hz,1H)	6.31 (s, 1H)
7	6.02 (s, 2H)	5.89 (s, 2H)
8	5.22 (s, 2H)	5.12 (s, 2H)
9	5.13 (s, 2H)	5.04 (s, 2H)
10	3.78 (s, 3H)	3.68 (s, 3H)
11	3.54 (s, 3H)	3.42 (s, 3H)
12	3.41 (s, 3H)	3.01 (s, 3H)

Tabla 11. Constantes de acoplamiento e integraciones de las señales del espectro RMN ^1H de la CHALCONA 43 (500 MHz, Chloroform-*d*)

Señal	Datos del producto	Datos de Literatura(17) (500MHz)
1	7.80 (d, J=15.5Hz,1H)	7.75 (d, J=15.5Hz,1H)
2	7.74 (d, J=15.6Hz,1H)	7.66 (d, J=15.5Hz,1H)
3	6.90 (s, 2H)	6.81 (s, 2H)
4	6.30 (d, J=2.3Hz,1H)	6.23 (s, 1H)
5	6.10 (d, J=2.3Hz,1H)	6.05 (s, 1H)
6	5.23 (s, 2H)	5.17 (s, 2H)
7	3.94 (s, 12H)	3.88 (s, 12H)
8	3.52 (s, 3H)	3.47 (s, 3H)

4.2 ENSAYOS BIOLÓGICOS

4.2.1 Curva de Crecimiento

Se observan las curvas de crecimiento de las especies trabajadas. Los puntos representan la media de las concentraciones parasitarias con su respectiva desviación estándar.

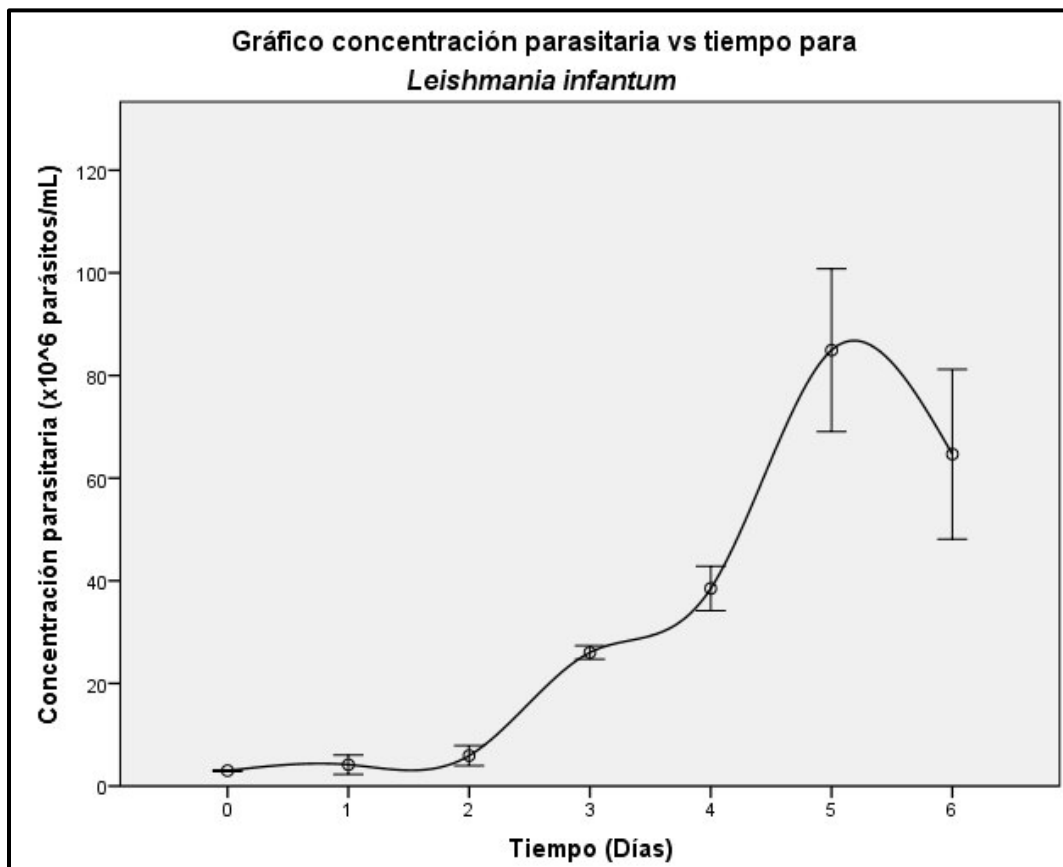


Figura 17. Curva de crecimiento de la especie *Leishmania infantum*

Se observa para *Leishmania infantum* un crecimiento exponencial que inicia entre el segundo y tercer día de evaluación hasta el quinto día, aproximadamente. A partir de este último se observa una desaceleración del crecimiento dando inicio a la fase estacionaria de la curva.

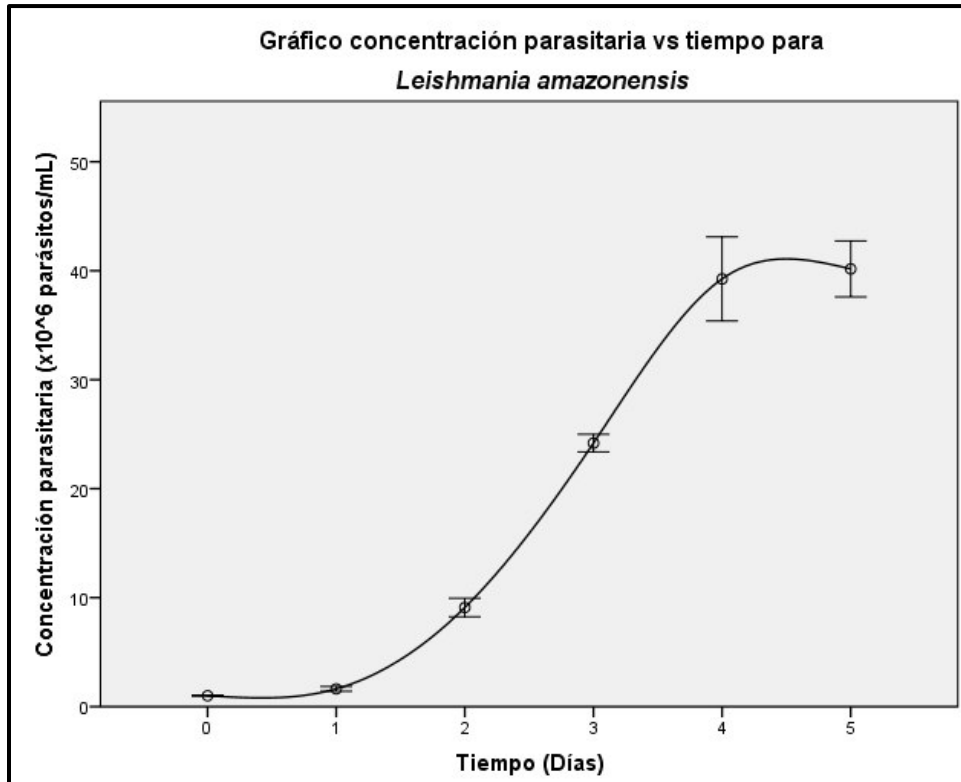


Figura 18. Curva de crecimiento de la especie *Leishmania amazonensis*

Se observa para *Leishmania amazonensis* un crecimiento exponencial del segundo hasta el cuarto día, aproximadamente. A partir del cuarto día hay una desaceleración del crecimiento dando inicio a la fase estacionaria de la curva.

4.2.2 Cinética de Infección de los amastigotes intramacrofágicos

Se observa en la Figura 19 que después de las 24 horas de incubación existen aproximadamente dos amastigotes dentro de cada macrófago infectado. Este resultado se observa para ambas proporciones “macrófago: parásito” evaluadas. Sin embargo, en los ensayos se agregaron 10 y 20 parásitos por cada macrófago cultivado (según corresponda la proporción macrófago: parásito) lo que evidencia una poca capacidad infectiva de los promastigotes de *L. infantum* sobre los macrófagos de ratón.

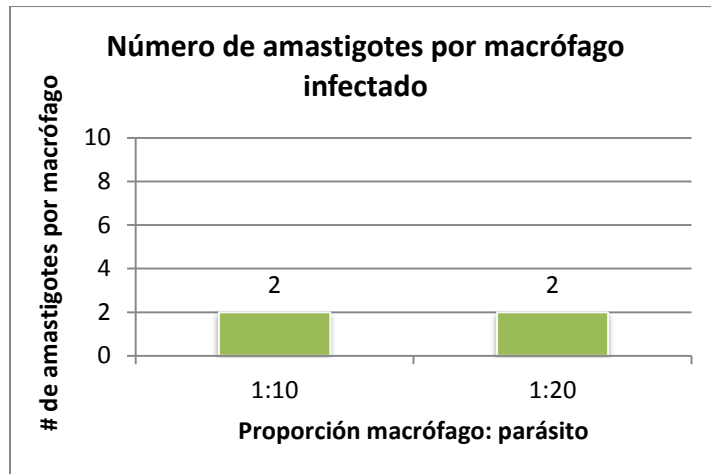


Figura 19. Gráfico del número de amastigotes por macrófago para la especie *L. infantum*. Datos procesados después de 24 horas de incubación.

Las proporciones macrófago: parásito 1:10 y 1:20 para la especie *L. infantum* también generaron un porcentaje de infección y carga parasitaria bajos como se observa abajo en las figuras 20 y 21. Dado estos resultados, se optó por emplear cultivos de amastigotes axénicos de *L. infantum* en las infecciones de los macrófagos.

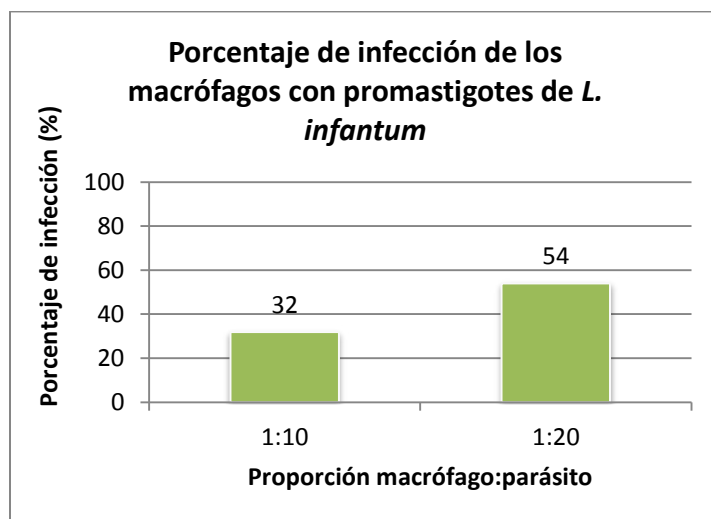


Figura 20. Gráfico del porcentaje de infección de los macrófagos con parásitos de *L. infantum*. Datos procesados después de 24 horas de incubación.

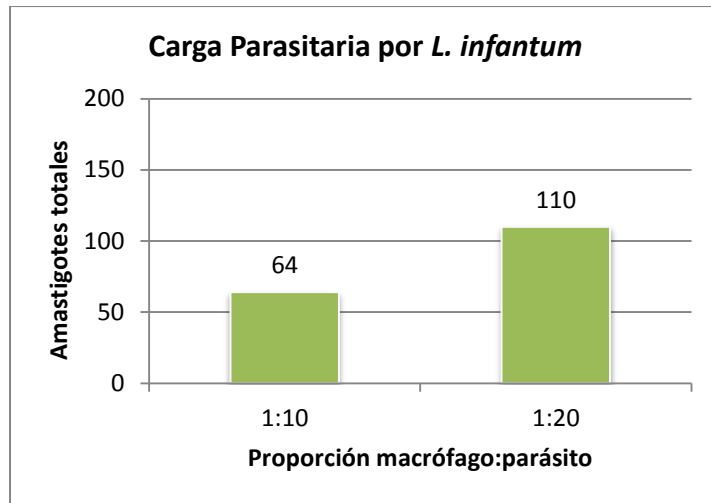


Figura 21. Gráfico de la carga parasitaria por *L. infantum*. Esta evaluación corresponde a Datos procesados después de 24 horas de incubación.

La cinética de infección de los promastigotes de *L. amazonensis* muestra una correspondencia entre el número de parásitos agregados y el que se observa dentro de los macrófagos infectados, además se observa que el número de amastigotes por macrófago incrementa durante los siguientes días. Se muestra el seguimiento de la proporción 1:2 durante 4 días. Los resultados de la proporción 1:1 se muestran en el anexo 10.

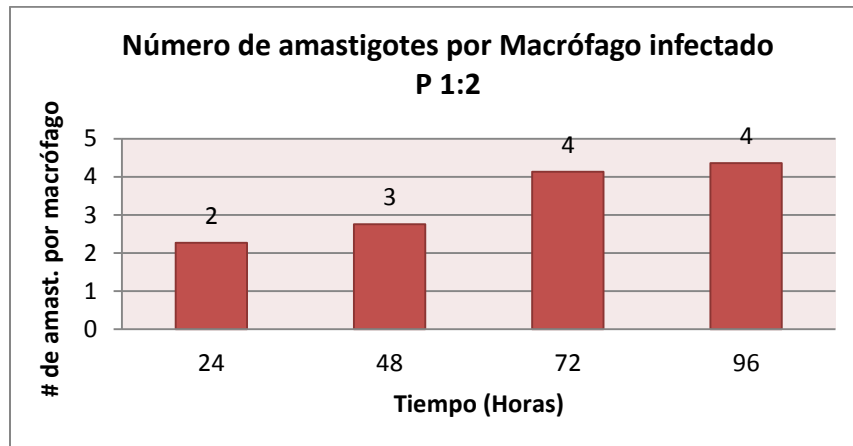


Figura 22. Gráfico del número de amastigotes por macrófago para la especie *L. amazonensis*

Además, se observa un mayor porcentaje de infección después de las 24 horas de incubación y que incluso este aumenta durante los siguientes 4 días (Figura 23). El incremento de estas dos variables genera el incremento de la carga parasitaria (Figura 24).

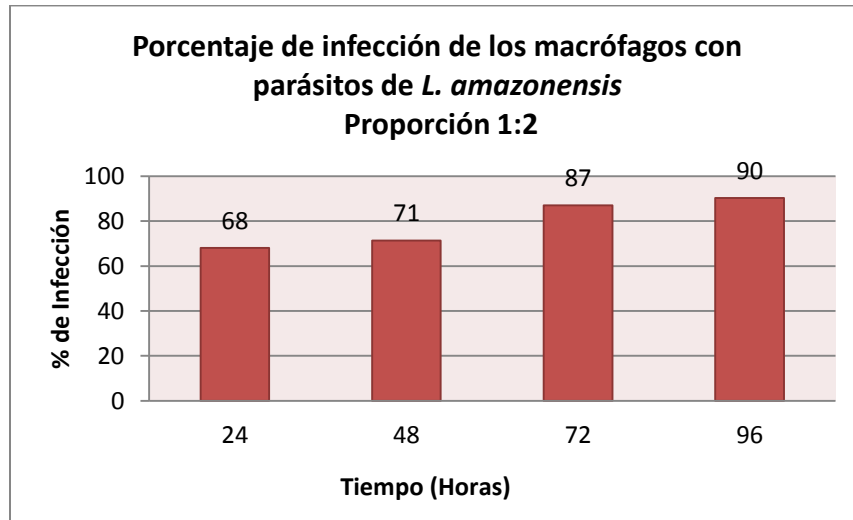


Figura 23. Gráfico del porcentaje de infección de los macrófagos con parásitos de *L. amazonensis*

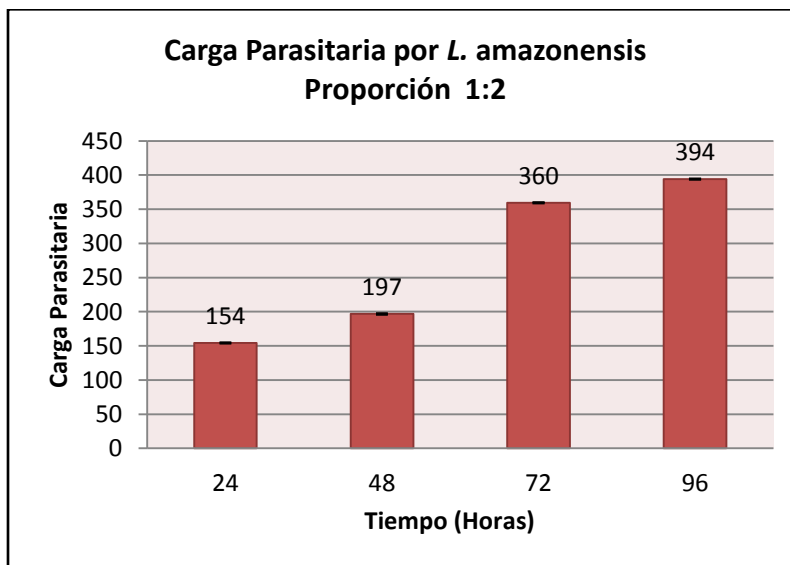


Figura 24. Gráfico de la carga parasitaria por *L. amazonensis*

4.2.3 Ensayo de Citotoxicidad

4.2.3.1 Sobre macrófagos residentes de la cavidad peritoneal de ratón BALB/c

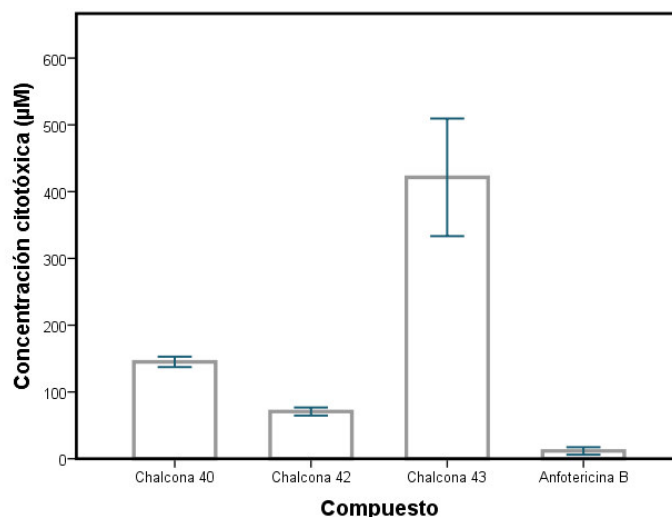


Figura 25. Actividad citotóxica media de las chalconas sintéticas sobre macrófagos peritoneales de ratón.

Se observa en la figura 25 que las chalconas 40, 42 y 43 presentan valores más altos de CC_{50} comparados a la droga de referencia anfotericina B. Valores más altos de CC_{50} indican menor citotoxicidad. Podría decirse que la chalcona 43 presenta la menor citotoxicidad en el análisis y la anfotericina B es el compuesto más citotóxico sobre los macrófagos de ratón.

Tabla 12. Ensayos de citotoxicidad sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c

Compuestos	Concentración Citotóxica 50 CC_{50} (µM)		CC_{50} promedio (µM)	Valor de p
Chalcona 40	151	139	145 ± 8	0,003
Chalcona 42	75	66	71 ± 6	
Chalcona 43	359	484	421 ± 88	
Anfotericina B	8	16	12 ± 6	

La significancia es calculada para un $p < 0,05$ mediante el análisis ANOVA.

Los resultados de la tabla 12 muestran para la chalcona 43 el valor más alto de CC_{50} de 421 μ M. La chalcona 42 es la chalcona con el valor más bajo de CC_{50} de 71 μ M. La droga de referencia presenta un CC_{50} de 11,7 μ M. El valor de $p < 0,05$ indica que existe diferencia significativa entre los grupos por lo que se realizó la prueba *post hoc* de Tukey.

Tabla 13. Prueba de Tukey para comparaciones múltiples

(I) Compuesto	(J) Compuesto	Sig.
	Chalcona 42	,438
Chalcona 40	Chalcona 43*	,012
	Anfotericina B	,124
	Chalcona 40	,438
Chalcona 42	Chalcona 43*	,005
	Anfotericina B	,593
	Chalcona 40*	,012
Chalcona 43	Chalcona 42*	,005
	Anfotericina B*	,003
	Chalcona 40	,124
Anfotericina B	Chalcona 42	,593
	Chalcona 43	,003

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

La CC_{50} de las chalconas 40 y 42 no es significativamente diferente a la de la droga de referencia. La CC_{50} de la chalcona 43 es significativamente mayor a la CC_{50} de la droga de referencia y a la CC_{50} de las chalconas 40 y 42, por lo que la chalcona 43 es significativamente el compuesto menos citotóxico del análisis.

4.2.3.2 Sobre la línea celular RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™)

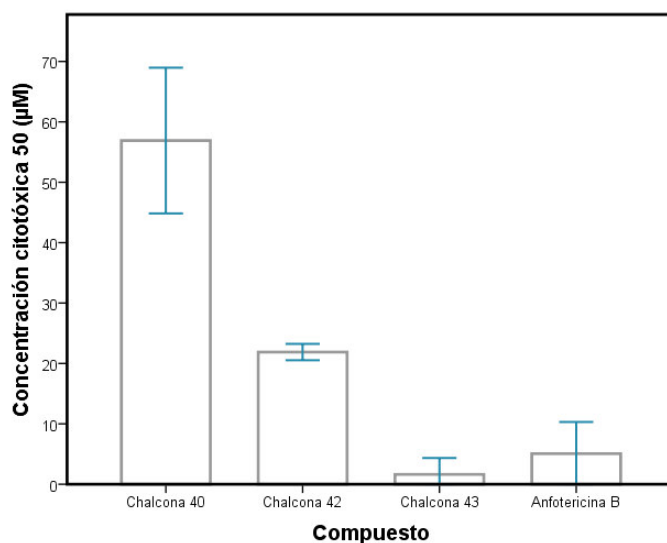


Figura 26. Actividad citotóxica media de las chalconas sintéticas sobre la línea celular RAW 264.7

Se observa en la figura 26 que las chalconas 40, 42 presentan valores más altos de CC_{50} comparados a la droga de referencia anfotericina B y a la chalcona 43. Valores más altos de CC_{50} indican menor citotoxicidad sobre las *raw cell*. Podría decirse que la chalcona 40 presenta la menor citotoxicidad en el análisis y la chalcona 42 es el compuesto más citotóxico sobre las *raw cell*.

Tabla 14. Ensayos de citotoxicidad sobre la línea celular RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™)

Compuestos	Concentración Citotóxica CC_{50} (µM)			CC_{50} Promedio (µM)	Valor de p
	46	70	55		
Chalcona 40	46	70	55	57 ± 12,1	0,00003
Chalcona 42	21	23	22	22 ± 1,4	
Chalcona 43	0,0	0,1	4,8	1,6 ± 2,7	
Anfotericina B	0,7	10,9	3,7	5,1 ± 5,2	

La significancia es calculada para un $p < 0,05$ mediante el análisis ANOVA.

Los resultados de la tabla 14 muestran para la chalcona 40 el valor más alto de CC_{50} de 57 μ M. La chalcona 43 es la chalcona con el valor más bajo de CC_{50} de 1,6 μ M. La droga de referencia presenta un CC_{50} de 5,1 μ M. El valor de $p < 0,05$ indica que existe diferencia significativa entre los grupos por lo que se realizó la prueba *post hoc* de Tukey.

Tabla 15. Prueba de Tukey para comparaciones múltiples

(I) Compuesto	(J) Compuesto	Sig.
	Chalcona 42*	,001
Chalcona 40	Chalcona 43*	,000
	Anfotericina B*	,000
	Chalcona 40*	,001
Chalcona 42	Chalcona 43*	,026
	Anfotericina B	,062
	Chalcona 40*	,000
Chalcona 43	Chalcona 42*	,026
	Anfotericina B	,922
	Chalcona 40*	,000
Anfotericina B	Chalcona 42	,062
	Chalcona 43	,922

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

Se observa que la CC_{50} de las chalconas 42 y 43 no es significativamente diferente a la de la droga de referencia. La CC_{50} de la chalcona 40 es significativamente mayor a la CC_{50} de la droga de referencia y a la CC_{50} de las chalconas 42 y 43, por lo que la chalcona 40 es significativamente el compuesto menos citotóxico del análisis. Además, la CC_{50} de la chalcona 42 es significativamente mayor a la CC_{50} de la chalcona 43.

4.2.4 Evaluación de la actividad anti-*Leishmania in vitro* de las chalconas

4.2.4.1 Sobre promastigotes procíclicos de *L. infantum* y *L. amazonensis*

Leishmania infantum

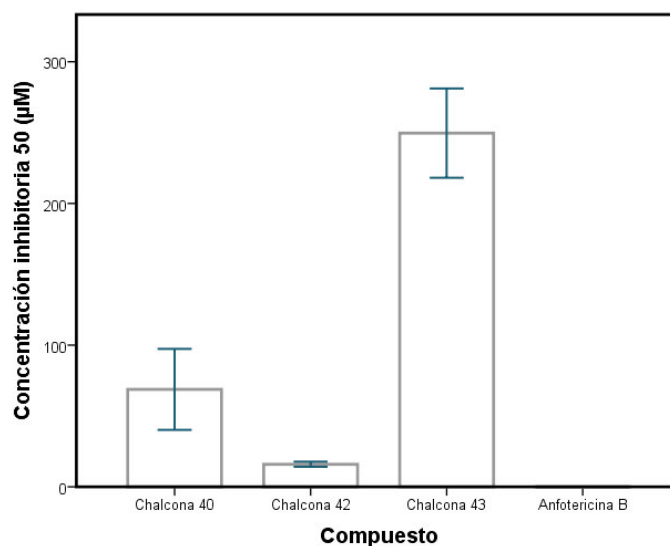


Figura 27. Actividad anti-*Leishmania* de las chalconas sintéticas sobre promastigotes de *L. infantum*.

Se observa en la figura 27 que la chalcona 42 presenta el valor más bajo de IC₅₀ comparado a las demás chalconas. Valores más bajos de IC₅₀ indican mayor actividad anti-*Leishmania* sobre los promastigotes de *L. infantum*. La chalcona 43 presenta valores más altos IC₅₀, que indica una menor actividad de este compuesto sobre los promastigotes de *L. infantum*.

Tabla 16. Actividad anti-*Leishmania* de las chalconas sobre promastigotes de *L. infantum*

Compuestos	Actividad anti- <i>Leishmania</i>			IC ₅₀ (µM) PROMEDIO	Valor de p
	40	70	97		
Chalcona 40	40	70	97	69 ± 29	0,016
Chalcona 42	14	18	16	16 ± 1,8	
Chalcona 43	214	263	272	250 ± 32	
Anfotericina B	0,05	0,06	0,06	0,06 ± 0,01	

La significancia es calculada para un $p < 0,05$ mediante la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes

En la tabla 16 se observa que la chalcona 42 muestra la mayor actividad anti-*Leishmania* sobre los promastigotes de *L. infantum*, con un IC₅₀ de 16 ± 1,8 µM. La chalcona 43 presenta la menor actividad anti-*Leishmania* sobre los promastigotes de *L. infantum* con un IC₅₀ de 249,6 ± 31,5 µM. El valor de p<0,05 indica que existe diferencia significativa entre los grupos por lo que se realizaron las comparaciones por parejas.

Tabla 17. Comparaciones por parejas de los compuestos

(I) Compuesto	(J) Compuesto	Sig.
	Chalcona 42	1,000
Chalcona 40	Chalcona 43	1,000
	Anfotericina B	0,249
	Chalcona 40	1,000
Chalcona 42	Chalcona 43	0,249
	Anfotericina B	1,000
	Chalcona 40	1,000
Chalcona 43	Chalcona 42	0,249
	Anfotericina B*	0,013
	Chalcona 40	0,249
Anfotericina B	Chalcona 42	1,000
	Chalcona 43*	0,013

Cada fila prueba la hipótesis nula de que las distribuciones de la muestra I y la muestra J son iguales. Se muestran las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). * El nivel de significancia es 0,05.

Se observa que la IC₅₀ de las chalconas 40 y 42 no es significativamente diferente a la de la droga de referencia. La IC₅₀ de la chalcona 43 es significativamente mayor a la IC₅₀ de la droga de referencia, por lo que la chalcona 43 presenta menos actividad anti-*Leishmania* sobre los promastigotes de *L. infantum* que la anfotericina B.

Leishmania amazonensis

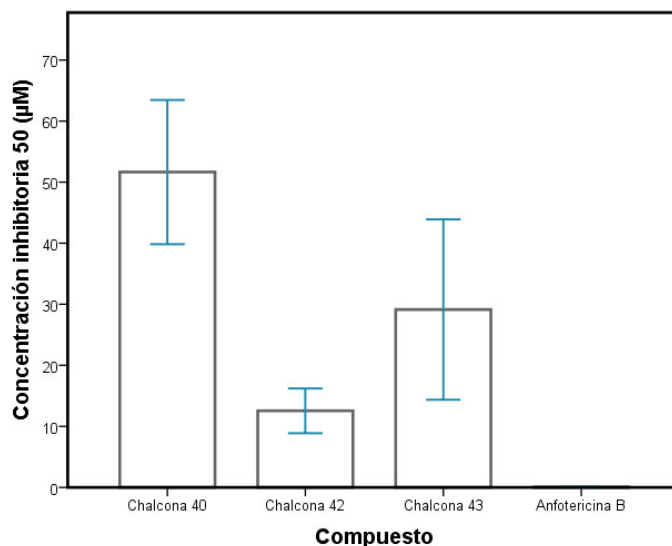


Figura 28. Actividad anti-*Leishmania* de las chalconas sintéticas sobre promastigotes de *L. amazonensis*.

Se observa en la figura 28 que la chalcona 42 presenta el valor más bajo de IC₅₀ comparado a las demás chalconas. Valores más bajos de IC₅₀ indican mayor actividad anti-*Leishmania* sobre los promastigotes de *L. amazonensis*. La chalcona 40 presenta valores más altos IC₅₀ lo que podría indicar una menor actividad de este compuesto sobre los promastigotes de *L. amazonensis*.

Tabla 18. Actividad anti-*Leishmania* de las chalconas sobre promastigotes de *L. amazonensis*

Compuestos	Actividad anti- <i>Leishmania</i>			IC ₅₀ (µM) PROMEDIO	Valor de p
	IC ₅₀ (µM)				
Chalcona 40	38	59	58	52 ± 11,8	0,023
Chalcona 42	8	14	16	13 ± 3,7	
Chalcona 43	14	30	44	29 ± 14,8	
Anfotericina B	0,05	0,06	0,07	0,06 ± 0,01	

La significancia es calculada para un $p < 0,05$ mediante la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes

En la tabla 18 se observa que la chalcona 42 presenta un IC₅₀ de 13 ± 3,7 µM sobre los promastigotes de *L. amazonensis*, este valor es similar al que se obtuvo con los promastigotes de *L. infantum* (16 ± 1,8 µM). La chalcona 43 fue 9 veces más activa sobre parásitos de *L. amazonensis* (IC₅₀ 29 ± 14,8) que sobre los parásitos de *L. infantum* (249,6 ± 31,5 µM). El valor de p<0,05 indica que existe diferencia significativa entre los grupos por lo que se realizaron las comparaciones por parejas.

Tabla 19. Comparaciones por parejas de los compuestos

(I) Compuesto	(J) Compuesto	Sig.
	Chalcona 42	0,420
Chalcona 40	Chalcona 43	1,000
	Anfotericina B	0,019
	Chalcona 40	0,420
Chalcona 42	Chalcona 43	1,000
	Anfotericina B	1,000
	Chalcona 40	1,000
Chalcona 43	Chalcona 42	1,000
	Anfotericina B	0,249
	Chalcona 40*	0,019
Anfotericina B	Chalcona 42	1,000
	Chalcona 43	0,249

Cada fila prueba la hipótesis nula de que las distribuciones de la muestra I y la muestra J son iguales. Se muestran las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). * El nivel de significancia es 0,05.

Se observa que la IC₅₀ de las chalconas 42 y 43 no es significativamente diferente a la de la droga de referencia. La IC₅₀ de la chalcona 40 es significativamente mayor a la IC₅₀ de la droga de referencia, por lo que la chalcona 43 presenta menos actividad anti-*Leishmania* sobre los promastigotes de *L. amazonensis* que la anfotericina B.

4.2.4.2 Sobre amastigotes axénicos de *Leishmania infantum*

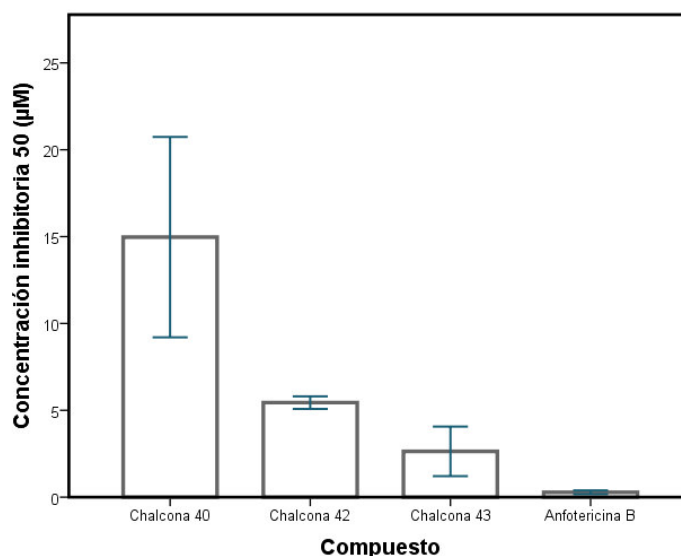


Figura 29. Actividad anti-*Leishmania* de las chalconas sintéticas sobre amastigotes de *L. infantum*.

Se observa en la figura 29 que la chalcona 43 presenta el valor más bajo de IC₅₀ comparado a las demás chalconas. Valores más bajos de IC₅₀ indican mayor actividad anti-*Leishmania* sobre los amastigotes de *L. infantum*. La chalcona 40 presenta los valores más altos de IC₅₀ lo que podría indicar una menor actividad de este compuesto sobre los amastigotes axénicos de *L. infantum*.

Tabla 20. Actividad anti-*Leishmania* de las chalconas sobre amastigotes axénicos de *L. infantum*

Compuestos	Actividad anti- <i>Leishmania</i>			IC ₅₀ (µM) PROMEDIO	Valor de p
	IC ₅₀ (µM)				
Chalcona 40	21,4	13,4	10,2	15,0 ± 5,8	0,0156
Chalcona 42	5,2	5,9	5,3	5,4 ± 0,4	
Chalcona 43	4,2	2,1	1,5	2,6 ± 1,4	
Anfotericina B	0,4	0,2	0,3	0,3 ± 0,1	

La significancia es calculada para un $p < 0,05$ mediante la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes

En la tabla 20 se observa que la chalcona 43 presenta un IC₅₀ de 2,6 ± 1,4 µM en este modelo *in vitro*. Las tres chalconas presentan valores de IC₅₀ menores a los observados sobre los promastigotes de *L. infantum*. La droga de referencia mostró menor actividad anti-*Leishmania* sobre los amastigotes de *L. infantum* (IC₅₀ de 0,3 ± 0,1) que sobre los promastigotes de *L. infantum* (IC₅₀ de 0,06 ± 0,01 µM). El valor de p<0,05 indica que existe diferencia significativa entre los grupos por lo que se realizaron las comparaciones por parejas.

Tabla 21. Comparaciones por parejas de los compuestos

(I) Compuesto	(J) Compuesto	Sig.
	Chalcona 42	1,000
Chalcona 40	Chalcona 43	0,249
	Anfotericina B	0,013
	Chalcona 40	1,000
Chalcona 42	Chalcona 43	1,000
	Anfotericina B	0,249
	Chalcona 40	0,249
Chalcona 43	Chalcona 42	1,000
	Anfotericina B	1,000
	Chalcona 40	0,013
Anfotericina B	Chalcona 42	0,249
	Chalcona 43	1,000

Cada fila prueba la hipótesis nula de que las distribuciones de la muestra I y la muestra J son iguales. Se muestran las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). * El nivel de significancia es 0,05.

Se observa que la IC₅₀ de las chalconas 42 y 43 no es significativamente diferente a la de la droga de referencia. La IC₅₀ de la chalcona 40 es significativamente mayor a la IC₅₀ de la droga de referencia, por lo que la chalcona 40 presenta menor actividad anti-*Leishmania* sobre los amastigotes de *L. infantum* que la anfotericina B.

4.2.4.3 Sobre amastigotes amastigotes intracelulares (o intramacrofágicos)

La determinación del IC₅₀ en este modelo *in vitro* requiere de la determinación de la carga parasitaria y este a su vez del recuento de amastigotes residentes en los macrófagos. El recuento se realiza ópticamente a través de la tinción Giemsa como se describió en la metodología. En la tinción Giemsa de las láminas puede observarse en los macrófagos y en los parásitos al citoplasma de un color azul pálido y al núcleo de un color púrpura. Además, puede observarse en los parásitos una pequeña estructura púrpura oscura en forma de vara que corresponde al Kinetoplasto.

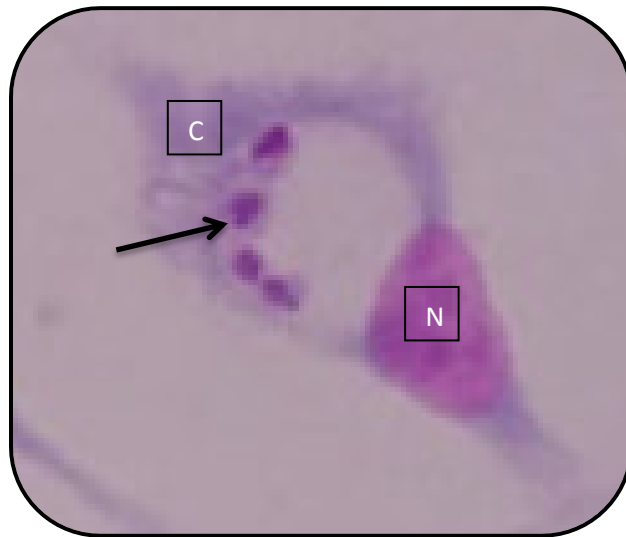


Figura 30. Macrófago infectado con parásitos de *Leishmania*.
Citoplasma del macrófago, C, Núcleo del macrófago, N. Se observan 4 amastigotes dentro del macrófago. La flecha indica el kineplasto de un amastigote.

Los amastigotes de *L. amazonensis* generan dentro de los macrófagos la extensión de las vacuolas fagocíticas. Adentro de esta vacuola, los amastigotes se multiplican formando una especie de “collar”. Los amastigotes de *L. infantum* no generan esta estructura de collar, observándose de manera individual dentro del macrófago.

Leishmania infantum

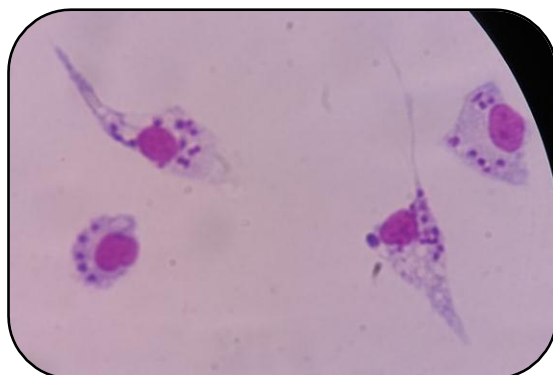


Figura 31. Control de macrófagos infectados con parásitos de *L. infantum*. Se observan los amastigotes dentro de los macrófagos de manera individual sin formación de grandes vacuolas.

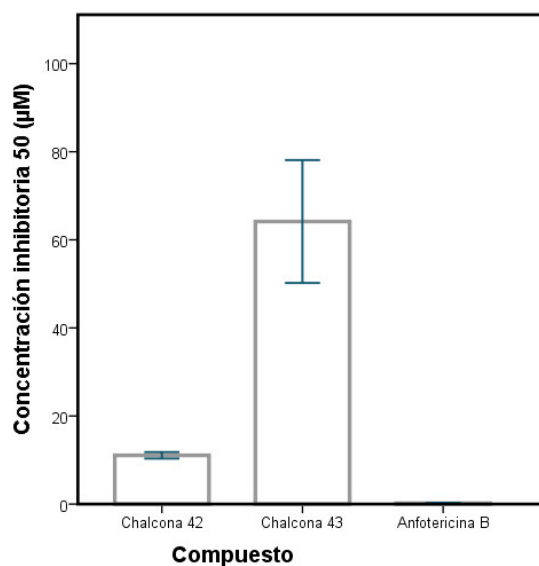


Figura 32. Actividad anti-*Leishmania* de las chalconas sintéticas sobre amastigotes intramacrofágicos de *L. infantum*.

Se observa en la figura 32 que la chalcona 42 presenta el valor más bajo de IC_{50} comparado a las demás chalconas. Valores más bajos de IC_{50} indican mayor actividad anti-*Leishmania* sobre los amastigotes intramacrofágicos de *L. infantum*.

Tabla 22. Actividad anti-*Leishmania* de las chalconas sobre amastigotes intramacrofágicos de *L. infantum*

Compuestos	Actividad anti- <i>Leishmania</i>		IC ₅₀ (μM) PROMEDIO	Valor de p
	IC ₅₀ (μM)			
Chalcona 40	>150	>150	>100	-
Chalcona 42	12	11	11 ± 0,7	
Chalcona 43	74	54	64 ± 14	0,102
Anfotericina B	0,2	0,1	0,2 ± 0,09	

La significancia es calculada para un $p < 0,05$ mediante la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes. Para este análisis no se consideró a la chalcona 40.

En este modelo de infección *in vitro* para las tres chalconas se observan valores de IC₅₀, mayores a los observados en los ensayos sobre los amastigotes axénicos. La chalcona 42 evidenció la mayor actividad con un IC₅₀ de 11 ± 0,7 μM y la chalcona 40 pareció no ser muy efectiva ya que presentó un IC₅₀ mayor a los 150 μM. Para anfotericina B los valores de IC₅₀ son casi similares a los vistos sobre los amastigotes axénicos. El valor de $p > 0,05$ indica que no existe diferencias significativas entre los grupos.

Leishmania amazonensis

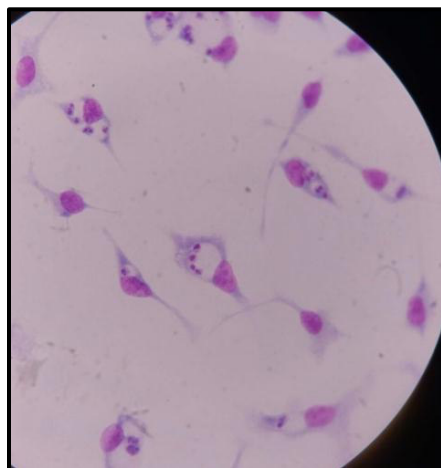


Figura 33. Control de macrófagos infectados con parásitos de *L. amazonensis*. Se observan los amastigotes dentro de los macrófagos formando grandes vacuolas.

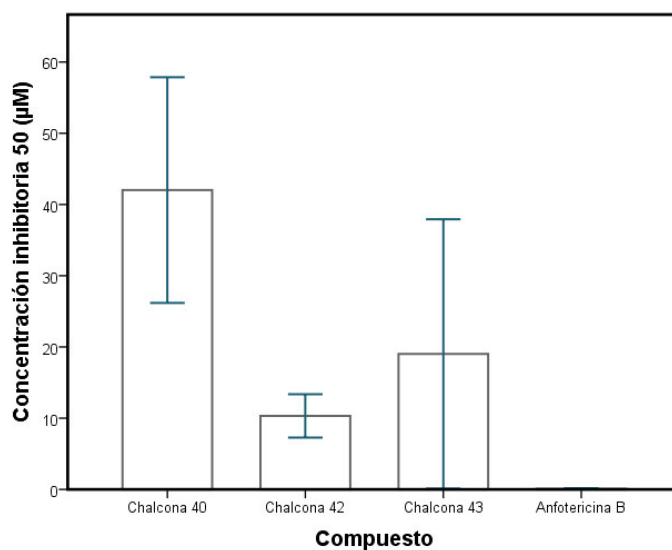


Figura 34. Actividad anti-*Leishmania* de las chalconas sintéticas sobre amastigotes intramacrofágicos de *L. infantum*.

Se observa en la figura 34 que la chalcona 42 presenta el valor más bajo de IC₅₀ comparado a las demás chalconas. Valores más bajos de IC₅₀ indican mayor actividad anti-*Leishmania* sobre los amastigotes intramacrofágicos de *L. infantum*. La chalcona 40 presenta los valores más altos de IC₅₀ lo que indica una menor actividad de este que las demás chalconas.

Tabla 23. Actividad anti-*Leishmania* de las chalconas sobre amastigotes intramacrofágicos de *L. amazonensis*

Compuestos	Actividad anti- <i>Leishmania</i>		IC ₅₀ (μM)	Valor de p
	IC ₅₀ (μM)		PROMEDIO	
Chalcona 40	53	31	42 ± 16	0,16
Chalcona 42	13	8	10 ± 3	
Chalcona 43	32	6	19 ± 18,9	
Anfotericina B	0,1	0,1	0,1 ± 0,05	

La significancia es calculada para un $p < 0,05$ mediante la prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes.

Sobre los amastigotes intramacrofágicos de *L. amazonensis* se observaron IC₅₀ por debajo de los 50 μM siendo la chalcona 42 la más activa con un valor de IC₅₀ de 10,3 ± 3,0 μM. El valor de $p > 0,05$ indica que no existe diferencias significativas entre los grupos incluida la droga de referencia.

4.2.5 Índice de Selectividad

Tabla 24. Índice de selectividad de los compuestos

Compuestos	Citotoxicidad	Actividad Anti- <i>Leishmania</i>									
	Macrófagos peritoneales	Promastigotes				Amastigotes axénicos		Amastigotes intramacrofágicos			
		<i>L. infantum</i>		<i>L. amazonensis</i>		<i>L. infantum</i>		<i>L. infantum</i>		<i>L. amazonensis</i>	
		CC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	IS	IC ₅₀ (μM)	IS	IC ₅₀ (μM)	IS	IC ₅₀ (μM)	IS	IC ₅₀ (μM)
Chalcona 40	145	68,8 ± 28,6	2	51,7 ± 11,8	3	15 ± 5,8	10	>100	<1	42	4
Chalcona 42	70,7	15,9 ± 1,8	4	12,5 ± 3,7	6	5,4 ± 0,4	13	11,1	6	10,3	7
Chalcona 43	421,4	249,6 ± 31,5	2	29,1 ± 14,8	15	2,6 ± 1,4	162	64,2	7	19	22
Anfotericina B	11,7	0,06 ± 0,01	195	0,06 ± 0,01	195	0,3 ± 0,1	39	0,2	59	0,1	117

IC₅₀: Concentración inhibitoria media

IS: Índice de Selectividad

CC₅₀: concentración citotóxica media

Se observa en la tabla 24 el resumen de las actividades anti-*Leishmania* de las chalconas 40, 42 y 43 halladas sobre cada modelo *in vitro* desarrollado. El índice de selectividad fue calculado dividiendo la concentración citotóxica media (CC₅₀) sobre la concentración inhibitoria media (IC₅₀). Se observa de manera general una selectividad mayor sobre los amastigotes axénicos e intramacrofágicos que sobre los promastigotes. La chalcona 43 muestra la mayor selectividad sobre los amastigotes axénicos de *L. infantum* (IS=162) y sobre los amastigotes intramacrofágicos (IS= 7). La chalcona 42 presenta la mejor actividad anti-*Leishmania* en todos los ensayos con un índice de selectividad moderado.

V. DISCUSIÓN

La leishmaniosis es una enfermedad zoonótica y desatendida de zonas tropicales y subtropicales. A pesar del total de casos nuevos anuales y de la población en riesgo, existe poco interés por parte de las industrias para desarrollar nuevos fármacos contra esta enfermedad. El tratamiento actual se caracteriza por su alta toxicidad además de ya reportarse casos de resistencia. Las chalconas son moléculas de gran interés por la sencillez de su síntesis y por la variedad de actividades farmacológicas demostradas, entre ellas la de agentes leishmanicidas (4). Las chalconas del presente estudio (chalcona 40, chalcona 42 y chalcona 43) fueron menos citotóxicas que la droga de referencia anfotericina B. La chalcona 42 mostró actividad anti-*Leishmania* similar a la droga de referencia en todos los modelos *in vitro* desarrollados.

Se muestra en la tabla 8 el rendimiento de cada una de las reacciones implicadas en la síntesis de la chalcona 42. El material de inicio fue la 2,4,6-trihidroxiacetofenona, la cual fue sometida a una protección selectiva de los grupos hidroxilos en posición 2 y 4 utilizando clorodimetiléter (MOMCl). En una reacción posterior se metiló el grupo hidroxilo en posición 6 y el producto obtenido fue sometido a la condensación aldólica del tipo Claisen Schmidt (con Piperonal), que permitió la obtención de la Chalcona 42. En este caso las reacciones limitantes fueron las dos primeras reacciones en las que se obtuvieron porcentajes de rendimiento menores al 30%. Si bien estos porcentajes de rendimiento contrastan con los descritos en la literatura (por ejemplo 65% para la primera reacción), esto se debe probablemente a que la adición lenta de MOMCl en la reacción de protección de los grupos hidroxilos en posición 2 y 4 sea una operación crítica y necesita de mayor cuidado para evitar su polimerización. Se analizó el espectro RMN ^1H de la chalcona 42. De igual forma se analizó el espectro RMN ^1H de las chalconas 40 y 43. Se compararon los datos del desplazamiento de sus señales, así como sus respectivas constantes de acoplamiento e integraciones, con los descritos en la literatura (15) como se muestra en las tablas 9 10 y 11. Esto permitió confirmar la identidad de las chalconas y por lo tanto se procedió a realizar los bioensayos de actividad *in vitro*. En el anexo 2 se muestra la estructura química de los compuestos. Las chalconas 42 y 43 presentan estructuras químicas correspondientes a chalconas precursoras de flavonoides. La estructura química de la “chalcona 40” corresponde a un compuesto tipo chalcona o derivado de chalcona donde el anillo B es reemplazado por una molécula de furano, un compuesto orgánico heterocíclico aromático de 5 miembros con un átomo de oxígeno.

Las curvas de crecimiento mostradas en las figuras 17 y 18 permitieron establecer las condiciones para el desarrollo de los diferentes ensayos *in vitro*. A partir de estas curvas de crecimiento se determinó que para la evaluación de la IC₅₀ sobre los promastigotes de ambas especies debería de utilizarse parásitos hasta los tres días de crecimiento (desde el último sub-pasaje realizado), ya que hasta esa fecha los parásitos se mantenían en la fase logarítmica de la curva, es decir, en una constante división celular. Para la infección de los macrófagos en los ensayos sobre amastigotes intracelulares, se determinó en la curva de crecimiento que para *L. amazonensis* se debían de utilizar parásitos con sub-pasajes no menor a los 4 días y para *L. infantum* se debían de utilizar parásitos con sub-pasajes no menor a los 5 días. En esos respectivos días se daba inicio a la fase estacionaria de la curva que significa la desaceleración en el crecimiento poblacional de los parásitos por la escasez de nutrientes. Estos cambios nutritivos (y en ocasiones de pH) generan en los parásitos de *Leishmania* la aparición de la forma metacíclica de los promastigotes, que se caracterizan por su poder infectivo sobre células fagocitarias como los macrófagos, ya que las formas procíclicas (de la fase exponencial) son incapaces de generar infección de los macrófagos (87). Con estos resultados se procedió al desarrollo de la cinética de infección que permitió establecer la proporción o cantidad de parásitos mínimos que se debían de utilizar para generar infección de los macrófagos. Para el caso de *L. amazonensis* fue evidente la alta infección que generaban estos parásitos sobre los macrófagos empleándose pocas cantidades de los parásitos y estableciéndose la proporción macrófago: parásito “1:2” como la ideal como se observa en las figuras 22, 23 y 24. Esta buena capacidad infectiva pudo deberse a que se emplearon parásitos que no tenían mucho tiempo de haberse aislados de un hospedero mamífero; este tiempo no era mayor a las 5 semanas. Para el caso de *L. infantum* se emplearon proporciones macrófago: parásito “1:20” y aun así se observó un bajo poder infectivo de los parásitos como se observa en la figura 19, 20 y 21. La probable causa de esta infección débil puede ser el tiempo prolongado en el que estos parásitos se mantuvieron como cultivos celulares lejos de un modelo de infección animal. Por esta razón para *L. infantum* se procedió a transformar los promastigotes en amastigotes axénicos y emplear estos amastigotes en la infección de los macrófagos; ya que existen trabajos previos que utilizan la misma cepa y emplean amastigotes axénicos en una proporción macrófago: parásito de “1:5” para lograr infectar a los macrófagos (88).

Los resultados de los ensayos de citotoxicidad sobre los macrófagos peritoneales de ratón de la tabla 12 mostraron que las chalconas ensayadas (chalcona 40, 42 y 43) son siete

veces menos tóxicas que la droga de referencia anfotericina B ($CC_{50} = 11,7 \mu\text{M}$). Esta baja citotoxicidad encontrada en las chalconas del estudio es también reportada con otras chalconas y también en otros compuestos fenólicos procedentes de la ruta del shikimato (86,89,90). Estos resultados fueron importantes para determinar las concentraciones de las chalconas que se debían emplear en los ensayos de evaluación anti-*Leishmania* sobre los amastigotes intramacrofágicos. También se realizaron ensayos de citotoxicidad sobre la línea celular RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™) “Raw cell”. Los resultados de la Tabla 14 muestran que sobre esta línea celular las chalconas 40 y 42 exhiben una citotoxicidad menor a la de la droga de referencia anfotericina B ($5,1 \mu\text{M}$), y la chalcona 43 una citotoxicidad similar. Se observa que existe mayor citotoxicidad de las chalconas sobre la línea celular raw cell que sobre los macrófagos aislados de la cavidad peritoneal de ratón. Esta diferencia puede ser atribuida a una posible acción de las chalconas en estudio sobre las alteraciones del ciclo celular. Las raw cell son una línea celular de macrófagos de ratón (*Mus musculus*) procedentes de tumor. Estos macrófagos proceden de una transformación estimulada por el virus de la leucemia murina de Abelson. Existen investigaciones que demuestran la actividad anticancerígena de diversas chalconas sobre diferentes líneas celulares de cáncer (91). Esto podría explicar la citotoxicidad encontrada por las chalconas en estudio sobre la línea celular raw cell. Esta línea celular de macrófagos no se empleó en los ensayos *in vitro* de infección con parásitos de *Leishmania* debido a su constante división celular que generaría valores de porcentajes de infección (probablemente bajos) alejados de lo que ocurre en un sistema normal de macrófagos, cuya especialización (y/o diferenciación) hace que estos no se multipliquen. Por otro lado, las raw cell se emplean para evaluar la respuesta inmune de los macrófagos, ya sea por estimulación con drogas o agentes propios del sistema inmune. Ejemplos de esta respuesta la encontramos en la resolución de la carga parasitaria (debida a *Leishmania*) por acción del mismo macrófago estimulado por drogas (86,92). Esta acción de ciertas drogas se llama efecto inmunomodulador y se mide a través de la evaluación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), óxido nítrico (NO), interferón γ , entre otros, presentes en el macrófago (93–97). Diversas chalconas y compuestos fenólicos han demostrado también tener efectos moduladores sobre los macrófagos (13). Los resultados de citotoxicidad sobre las raw cell podrían permitir establecer concentraciones para la determinación de un posible efecto inmunomodulador.

Los parásitos del género *Leishmania* presentan dos estadios diferenciados, el promastigote y el amastigote. Ambos estadios han sido utilizados en la evaluación *in vitro*

de potenciales moléculas anti-*Leishmania* y también en la evaluación de susceptibilidad de cepas clínicas. Cada modelo *in vitro* presenta ventajas y desventajas, pero en conjunto direccionan la posible naturaleza del mecanismo de acción del compuesto. En el presente estudio se desarrollaron tres diferentes evaluaciones *in vitro* en la determinación preliminar de potenciales “lead compounds” contra la leishmaniosis.

El primer ensayo *in vitro* es el “ensayo sobre promastigotes procíclicos”, la forma que se encuentra en el mosquito vector, cuya ventaja es su sencillez y bajo costo en relación a los otros ensayos. El valor predictivo de este ensayo sobre potenciales lead compounds es bajo, a menos que se evalúen moléculas cuya actividad o mecanismo de acción sea no específica del estadio parasitario, como lo son las drogas de referencia anfotericina B y miltefosina. Para la evaluación de las chalconas con este modelo *in vitro* se empleó anfotericina B como droga de referencia, cuyo valor de IC₅₀ contra los promastigotes de *L. infantum* y *L. amazonensis* fue de $0,06 \pm 0,01 \mu\text{M}$ (para ambas especies), determinándose además un índice de selectividad (IS) de 195. Un valor similar de IC₅₀ para anfotericina B fue el reportado por Giraldi y Col., quienes hallaron un IC₅₀ de $0,03 \pm 0,01 \mu\text{M}$ para anfotericina B sobre promastigotes de *L. infantum* y además un IS de 83, calculado con un CC₅₀ sobre la línea celular J774A.1 (88), diferente a la que utilizamos que fueron macrófagos aislados de ratón. Souza y col. obtuvieron un IC₅₀ para anfotericina B de $0,3 \pm 0,02 \mu\text{M}$ en una cepa de *Leishmania amazonensis* diferente a la empleada en el presente estudio (98). La diferencia de los IC₅₀ de anfotericina B con los de Souza y col. puede deberse a una diferencia en los parámetros empleados en los ensayos. Souza inicia su evaluación con un cultivo de 1×10^7 parásitos/mL mientras que en el presente estudio se inició con 1×10^6 parásitos/mL. Una mayor concentración de parásitos requerirá una mayor concentración de droga para inhibir su crecimiento. La cepa de *L. amazonensis* que se empleó se caracteriza por un crecimiento explosivo como se observa en la curva de crecimiento justificando así la concentración inicial empleada (Figura 17). Frente a los promastigotes procíclicos de *L. infantum*, la chalcona 42 mostró ser la más activa con un IC₅₀ de $15,9 \pm 3,7 \mu\text{M}$ y la más selectiva con un IS de 4. Los sesquiterpenoides aislados por Giraldi mostraron ser activos contra promastigotes de *L. infantum* sin embargo ninguno de ellos fue selectivo (IS $\leq 0,1$) por ser más citotóxicos, a diferencia de las chalconas que evaluamos que se caracterizan por su baja citotoxicidad. Ortali y col. evaluaron la actividad de 2 chalconas sintéticas “6” y “16” sobre promastigotes de *L. infantum* y sobre otras especies como *L. donovani*, *L. tropica* y *L. major*; además de reportar una alta actividad en sus moléculas “6” y “16” (IC₅₀ igual a $1,6 \mu\text{M}$ para ambas

moléculas); describe también que entre las especies que utilizó, *L. infantum* fue la especie más sensible a sus chalconas (99). Este resultado reportado por Ortali y col. evidencia la diferencia que existe entre las especies parasitarias respecto a su respuesta a determinadas drogas o compuestos, observado claramente en este estudio para la chalcona 43 frente a los promastigotes de *L. infantum* y *L. amazonensis*, siendo *L. infantum* más sensible a esta chalcona ($29,1 \pm 14,8 \mu\text{M}$). Respecto a los ensayos sobre los promastigotes de *L. amazonensis*, la chalcona 42 resultó ser la más activa con un IC_{50} de $12,5 \pm 3,7 \mu\text{M}$, pero fue la chalcona 43 la más selectiva con un IS de 15 (Tabla 24).

El segundo modelo de evaluación *in vitro* es el de “amastigotes axénicos” en *L. infantum*, cuyo cultivo es más complejo que el de los promastigotes, además de que es posible solo para algunas especies de *Leishmania*. El valor predictivo de este ensayo para escalar a modelos *in vivo* es más alto que el de los promastigotes. Esto se debe a que este modelo en amastigotes axénicos se aproxima al estadio responsable de la patogenia en el ser humano, el amastigote. Algunas drogas de referencia específicas para alguno de los estadios del parásito lo constituyen las sales de antimonio pentavalente, que presentan actividad sobre los amastigotes pero muy poca sobre los promastigotes. Se observa en la tabla 16 que la droga de referencia anfotericina B mostró un IC_{50} promedio de $0,3 \pm 0,11 \mu\text{M}$, similar a lo reportado por Girardi y Col. ($0,34 \pm 0,2 \mu\text{M}$), quien empleó la misma cepa de *L. infantum* empleando ensayos de luminiscencia para la detección de la actividad anti-*Leishmania* de sus compuestos (88). Cabanillas y col. obtuvieron un IC_{50} de $0,1 \mu\text{M}$ para anfotericina B sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis* (100). Las chalconas en estudio (chalcona 40, 42 y 43) fueron previamente evaluadas por Aponte y col. sobre amastigotes axénicos de *L. amazonensis*, y reportaron a la chalcona 40 como la de mayor actividad y selectividad ($4,6 \pm 1,1 \mu\text{M}$ y $\text{IS}=83,5$, respectivamente), a la chalcona 42 como la de menor actividad y selectividad ($11,7 \pm 4,1 \mu\text{M}$ y $\text{IS}=12$, respectivamente) y la droga de referencia anfotericina B presentaba un IC_{50} de $0,1 \pm 0,01 \mu\text{M}$ (17). En la tabla 18 y 24 se observa que la chalcona 40 presenta la menor actividad y selectividad sobre los amastigotes axénicos de *Leishmania infantum* ($15 \pm 5,8 \mu\text{M}$, $\text{IS}=10$, respectivamente) y la chalcona 43 es más activa y selectiva sobre estos amastigotes ($2,6 \pm 1,4 \mu\text{M}$ y $\text{IS}=162$, respectivamente). La diferencia de los IC_{50} de las chalconas comparadas al trabajo de Aponte y col. se atribuye a la especificidad de las chalconas en estudio sobre la especie parasitaria y que podría variar también sobre los amastigotes de otras especies de *Leishmania* como se discutió en el ensayo sobre los promastigotes. En la tabla 24 se observa también que las tres chalconas presentan una mayor actividad sobre los

amastigotes ($IC_{50} < 20 \mu M$) que sobre los promastigotes de *L. infantum*, evidenciándose la especificidad de las chalconas ligada al estadio parasitario de *Leishmania infantum*.

El tercer modelo de evaluación *in vitro* es el de “amastigotes intracelulares o amastigotes intramacrofágicos”. Este modelo involucra el cultivo de macrófagos para su posterior infección con los parásitos, haciéndolo el ensayo más complejo y costoso. El valor predictivo de este ensayo para escalar a modelos *in vivo* es más alto y esto se debe a que aquí el parásito se encuentra dentro de una célula fagocitaria que es la condición que ocurre en el humano y donde también intervienen aspectos como la respuesta del macrófago tanto al amastigote como a la droga. Se observa en la tabla 22 y 23 que el IC_{50} para la droga de referencia anfotericina B fue de $0,2 \mu M$ para *L. infantum* y $0,1 \mu M$ para *L. amazonensis*, respectivamente. El estudio de Aponte y col. reportó para anfotericina B valores de IC_{50} de $0,4 \mu M$, $0,1 \mu M$ y $0,1 \mu M$ sobre amastigotes intracelulares de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. peruviana*, respectivamente. Cabanillas y col. reportaron para anfotericina B un IC_{50} de $0,15 \pm 0,03 \mu M$ sobre amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* (100), similar a lo determinado en el presente estudio para *L. amazonensis*. Respecto al estudio previo de las chalconas 40, 42 y 43 realizado por Aponte y col., éste reporta para las tres chalconas valores de IC_{50} dependientes de la especie parasitaria, así la chalcona 40 se presenta como la más activa de las tres sobre amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* ($IC_{50} = 16,9 \mu M$) pero como la menos activa sobre amastigotes intracelulares de *L. braziliensis* ($IC_{50} = 30,4 \mu M$). Un caso similar ocurre para la chalcona 43 quien mostró la mejor actividad sobre los amastigotes intracelulares de *L. peruviana* y *L. braziliensis*, pero fue la chalcona menos activa sobre los amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* ($IC_{50} = 29,7 \mu M$) (88). En el presente estudio reportamos la actividad de estas chalconas sobre los amastigotes intracelulares de *L. infantum*, la especie causante de la forma mortal de Leishmaniosis. En la tabla 22 y 24 se observa que la chalcona 40 no mostró actividad alguna por debajo de los $100 \mu M$. La chalcona más activa fue la chalcona 42 con un IC_{50} de $11,1 \mu M$ y un IS de 6. Si bien la chalcona 43 presentó un IC_{50} de $64,2 \mu M$, esta chalcona presentó una selectividad similar a la de la chalcona 42 (IS=6) debido a la baja citotoxicidad de la chalcona 43 ($CC_{50} > 200 \mu M$).

VI. CONCLUSIONES

1. Se obtuvo la chalcona 42 por síntesis química con un porcentaje de rendimiento bajo comparado a otras síntesis químicas de chalconas reportadas en la literatura.
2. La chalcona 43 fue significativamente menos citotóxica sobre los macrófagos de ratón comparada a la droga de referencia anfotericina B. La chalcona 40 fue significativamente menos citotóxica sobre la línea Raw cell comparada a la droga de referencia anfotericina B.
3. La chalcona 42 fue la chalcona con mejor actividad anti-*Leishmania* sobre los promastigotes de *L. infantum*, sin embargo, dicha actividad no fue significativamente diferente a la droga de referencia anfotericina B.
4. La chalcona 42 y 43 mostraron gran actividad anti-*Leishmania* sobre los amastigotes de *L. infantum*. Esta actividad fue mayor sobre los amastigotes que sobre los promastigotes de *L. infantum*, aunque dicha actividad no fue significativamente diferente a la droga de referencia anfotericina B.
5. La chalcona 42 fue la chalcona que mostró la mejor actividad contra los amastigotes intramacrofágicos de *L. infantum*, sin embargo, dicha actividad no fue significativamente diferente a la droga de referencia anfotericina B.

VII. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar estudios que puedan explicar los posibles mecanismos de acción de las chalconas evaluadas. Uno de estos estudios podría ser los que evalúan la respuesta del macrófago frente a un parásito intracelular. Estos estudios son llamados estudios de inmunomodulación y evalúan diferentes parámetros relacionados con la respuesta del macrófago como la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS y, la producción de óxido nítrico (NO). Otros estudios relacionados también evalúan la inactivación de la enzima arginasa o de alguna vía de esta, ya sea esta inactivación para el macrófago o también la del parásito.
2. Se recomienda realizar estudios de actividad anti-*Leishmania* sobre amastigotes intramacrofágicos empleando macrófagos humanos y de igual manera estudios de citotoxicidad sobre macrófagos humanos (o alguna línea celular humana para citotoxicidad). Y como algo adicional evaluar estas chalconas sobre modelos de actividad anticancerígena *in vitro* debido a los resultados singulares que se obtuvieron sobre la línea celular Raw.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Pigott DM, Bhatt S, Golding N, Duda KA, Battle KE, Brady OJ, et al. Global distribution maps of the Leishmaniasis. *eLife*. 2014; 3: e02851.
- 2 Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN, Gradoni L. Phlebotomine sandflies and the spreading of Leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol*. 2013; 27(2):123–47.
- 3 Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, Barrett MP, López-Vélez R, García-Hernández R, et al. Drug resistance and treatment failure in Leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11(12):1–24.
- 4 Matos MJ, Vazquez-Rodriguez S, Uriarte E, Santana L. Potential pharmacological uses of chalcones: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*. 2015; 25(3):351–66.
- 5 de Mello MVP, Abrahim-Vieira B de A, Domingos TFS, de Jesus JB, de Sousa ACC, Rodrigues CR, et al. A comprehensive review of chalcone derivatives as antileishmanial agents. *Eur J Med Chem*. 2018;150:920–9.
- 6 Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012; 7(5): e35671.
- 7 Reithinger R, Dujardin J, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous Leishmaniasis. *Clin Dermatol*. 2007; 25(2): 203–11.
- 8 Mutiso JM, Macharia JC, Gicheru MM. A review of adjuvants for vaccine candidates. *J Biomed Res*. 2010; 24(1): 16–25.
- 9 Llanos-Cuentas A, Tulliano G, Araujo-Castillo R, Miranda-Verastegui C, Santamaria-Castrellon G, Ramirez L, et al. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in Cutaneous Leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis*. 2008; 46(2): 223–31.
- 10 Arevalo J, Ramirez L, Adai V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, et al. Influence of *Leishmania (Viannia)* Species on the Response to Antimonial Treatment in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2007; 195(12): 1846–51.
- 11 Boeck P, Bandeira Falcão CA, Leal PC, Yunes RA, Filho VC, Torres-Santos EC, et al. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. *Bioorganic Med Chem*. 2006; 14(5): 1538–45.

- 12 Gupta S, Shivahare R, Korthikunta V, Singh R, Gupta S, Tadigoppula N. Synthesis and biological evaluation of chalcones as potential antileishmanial agents. *Eur J Med Chem.* 2014; 81: 359–66.
- 13 de Mello TFP, Bitencourt HR, Pedroso RB, Aristides SMA, Lonardon MVC, Silveira TG V. Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Exp Parasitol.* 2014; 136(1):27–34.
- 14 Passalacqua TG, Torres FAE, Nogueira CT, De Almeida L, Del Cistia ML, Dos Santos MB, et al. The 2',4'-dihydroxychalcone could be explored to develop new inhibitors against the glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Leishmania* species. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2015;25(17):3564–8.
- 15 Hammond G, Aponte J, Gilman R, Sauvain M, Vaisberg A., inventors; Hammond G, assignee. Compounds, their syntheses, and their uses. United States patent US 2011/0190325 A1 2011 Aug 4.
- 16 Aponte C, Vera M, Ma E, Zimic M, Quiliano M, Vaisberg AJ, et al. Synthesis, cytotoxicity, and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of new chalcones. *J. Med. Chem.* 2008; 51: 6230–4.
- 17 Aponte JC, Castillo D, Estevez Y, Gonzalez G, Arevalo J, Hammond GB, et al. *In vitro* and *in vivo* anti-*Leishmania* activity of polysubstituted synthetic chalcones. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2010; 20(1):100–3.
- 18 Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol.* 2014; 3(6):147–54.
- 19 Pan AA, Duboise SM, Eperon S, Rivas L, Hodgkinson V, Traub-Ceko Y, et al. Developmental life cycle of *Leishmania*-cultivation and characterization of cultured extracellular amastigotes. *J Eukaryot Microbiol.* 1993; 40(2):213–23.
- 20 Roque ALR, Jansen AM. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2014; 3(3):251–62.
- 21 Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(3):1–40.
- 22 Nieves E, Pimenta PFP. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). *J Med Entomol.* 2000; 37(1):134–40.
- 23 Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, et al. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol Aspects Med.* 2017; 57:1–29.

- 24 Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today*. 2000; 16(4):142–4.
- 25 Magill AJ. Leishmaniasis. In: Magill AJ, Hill DR, Solomon T, Ryan ET editors. *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Disease: Ninth Edition*. W.B. Saunders; 2012: 739–60.
- 26 Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9(8):604–15.
- 27 Boelaert M, Sundar S. Leishmaniasis. In: Farrar J, Hotez PJ, Junghanss T, Kang G, Lalloo D, White NJ editors. *Manson's Tropical Infectious Diseases: Twenty-Third Edition*. W.B. Saunders; 2014; p. 631–51.
- 28 Schlein Y. *Leishmania* and Sandflies: Interactions in the life cycle and transmission. *Parasitol Today*. 1993; 9(7):255–8.
- 29 Dostálová A, Volf P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasites and Vectors*. 2012; 5(1): 1–12.
- 30 Rogers ME. The role of *Leishmania* proteophosphoglycans in sand fly transmission and infection of the mammalian host. *Front Microbiol*. 2012; 3: 223 Available from: 10.3389/fmicb.2012.00223.
- 31 Gossage SM, Rogers ME, Bates PA. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: Implications for understanding the life cycle. *Int J Parasitol*. 2003; 33(10): 1027–34.
- 32 Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol*. 2007; 37(10): 1097–106.
- 33 Liese J, Schleicher U, Bogdan C. The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology*. 2008; 213(3–4): 377–87.
- 34 Ma J, Chen T, Mandelin J, Ceponis A, Miller NE, Hukkanen M, et al. Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci*. 2003; 60(11): 2334–46.
- 35 Séguin O, Descoteaux A. *Leishmania*, the phagosome, and host responses: The journey of a parasite. *Cell Immunol* . 2016; 309: 1–6.
- 36 Podinovskaia M, Descoteaux A. *Leishmania* and the macrophage: A multifaceted interaction. *Future Microbiol*. 2015; 10(1):111–29.
- 37 Da Silva BJM, Souza-Monteiro JR, Rogez H, Crespo-López ME, Do Nascimento JLM, Silva EO. Selective effects of *Euterpe oleracea* (açai) on *Leishmania*

- (*Leishmania*) *amazonensis* and *Leishmania infantum*. *Biomed Pharmacother*. 2018; 97: 1613–21.
- 38 Bern C, Maguire JH, Alvar J. Complexities of assessing the disease burden attributable to Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008; 2(10): e313.
 - 39 Desjeux P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004; 27(5):305–18.
 - 40 Sarkari B, Bavarsad Ahmadpour N, Moshfe A, Hajjarian H. Molecular evaluation of a case of visceral Leishmaniasis due to *Leishmania tropica* in Southwestern Iran. *Iran J Parasitol*. 2016; 11(1):126–30.
 - 41 Magill A, Grögl M, Gasser R, Sun W, Oster C. Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of operation desert storm. *The New England Journal of Medicine*. 1993; 328(19): 1383-87
 - 42 Karamian M, Motazedian MH, Mehrabani D, Gholami K. Leishmania major infection in a patient with visceral leishmaniasis: Treatment with Amphotericin B. *Parasitol Res*. 2007; 101(5): 1431–4.
 - 43 Aleixo JA, Nascimento ET, Monteiro GR, Fernandes MZ, Ramos AMO, Wilson ME, et al. Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006; 100(1): 79–82.
 - 44 Berkowitz FE. *Leishmania* Species (Leishmaniasis). In: Long S editor. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases: Fourth Edition*. Elsevier Inc.; 2012. 1285-1291.e2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00267-X>
 - 45 Mcgwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. *Q J Med*. 2014; 107(1): 7–14.
 - 46 OMS. Control de las Leishmaniasis. Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS. Ginebra 2010; 1–200.
 - 47 Jeronimo SMB, De Queiroz Sousa A, Pearson RD. Leishmaniasis. In: Guerrant RL, Walker DH, Weller PF, editors. *Tropical infectious diseases: principles, pathogens and practice*. 3rd ed. Edinburgh, Scotland: Saunders Elsevier; 2011: 696–706.
 - 48 Raja M, Gonzales Zamora JA. Visceral Leishmaniasis with cutaneous involvement caused by *Leishmania infantum-chagasi*. *ID Cases*. 2018; 11: 16–7.

- 49 Ramdas S. Cruel disease, cruel medicine: Self-treatment of cutaneous Leishmaniasis with harmful chemical substances in Suriname. *Soc Sci Med.* 2012 ;75(6): 1097–105.
- 50 Akilov OE, Khachemoune A, Hasan T. Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous Leishmaniasis. *Int J Dermatol.* 2007; 46(2): 132–42.
- 51 Paniz-Mondolfi AE, Talhari C, García Bustos MF, Rosales T, Villamil-Gomez WE, Marquez M, et al. American cutaneous Leishmaniasis in infancy and childhood. *Int J Dermatol.* 2017; 56(12): 1328–41.
- 52 Grimaldi G, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev.* 1993; 6(3):230–50.
- 53 Meireles CB, Maia LC, Soares GC, Teodoro IPP, Gadelha M do SV, da Silva CGL, et al. Atypical presentations of cutaneous Leishmaniasis: A systematic review. *Acta Trop.* 2017; 172: 240–54.
- 54 Zijlstra EE, Musa AM, Khalil EAG, El Hassan IM, El-Hassan AM. Post-kala-azar dermal Leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3(2): 87–98.
- 55 Zijlstra EE, Khalil EAG, Kager PA, El-Hassan AM. Post-kala-azar dermal Leishmaniasis in the Sudan: Clinical presentation and differential diagnosis. *Br J Dermatol.* 2000; 143(1):136–43.
- 56 Ramesh V, Singh R, Salotra P. Short communication: Post-kala-azar dermal Leishmaniasis - An appraisal. *Trop Med Int Heal.* 2007; 12(7): 848–51.
- 57 Gelanew T, Hurissa Z, Diro E, Kassahun A, Kuhls K, Schönián G, et al. Case report: Disseminated cutaneous leishmaniasis resembling post-kala-azar dermal Leishmaniasis caused by *Leishmania donovani* in three patients co-infected with visceral Leishmaniasis and human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome in. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 84(6): 906–12.
- 58 Azeredo-Coutinho RBG, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF, et al. First report of diffuse cutaneous Leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007; 101(7): 735–7.
- 59 Hammami-Ghorbel H, Ben Abda I, Badri T, Chelbi H, Fenniche S, Mokhtar I, et al. Mucosal Leishmaniasis of the lip: An emerging clinical form in Tunisia. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2015; 29(6): 1212–5.
- 60 Van Griensven J, Carrillo E, López-Vélez R, Lynen L, Moreno J. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20(4): 286–99.

- 61 Handler MZ, Patel PA, Kapila R, Al-Qubati Y, Schwartz RA. Cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. *J Am Acad Dermatol.* 2015; 73(6): 911–26.
- 62 Handler MZ, Patel PA, Kapila R, Al-Qubati Y, Schwartz RA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. *J Am Acad Dermatol.* 2015; 73(6): 897–908.
- 63 Lucas CM, Franke ED, Cachay MI, Tejada A, Cruz ME, Kreutzer RD, et al. Geographic distribution and clinical description of Leishmaniasis cases in Peru. *Am Soc Trop Med Hyg.* 1998; 59(2): 312–7.
- 64 Organización Panamericana de la Salud. Leishmaniasis. Informe Epidemiológico de las Américas. Washington; 2019. Disponible en: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/123456789/50505>
- 65 Centro Nacional de Epidemiología Prevención y Control de Enfermedades. Sala de situación de salud. Perú a la SE 01-2019. Disponible en: https://www.dge.gob.pe/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=14&Itemid=121
- 66 Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001; 95(3): 239–43.
- 67 Valderrama-Ardila C, Alexander N, Ferro C, Cadena H, Marín D, Holford TR, et al. Environmental risk factors for the incidence of American cutaneous Leishmaniasis in a sub-andean zone of Colombia (Chaparral, Tolima). *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 82(2): 243–50.
- 68 Bogdan C, Schonian G, Banuls AL, Hide M, Pratlong F, Lorenz E, et al. Visceral Leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clin Infect Dis.* 2001; 32(2): 302–6.
- 69 Poepl W, Obwaller AG, Weiler M, Burgmann H, Mooseder G, Lorentz S, et al. Emergence of sandflies (Phlebotominae) in Austria, a Central European country. *Parasitol Res.* 2013; 112(12):4231–7.
- 70 Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN. Urban parasitology: Visceral Leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol.* 2011; 27(9):403–9.
- 71 Koch LK, Kochmann J, Klimpel S, Cunze S. Modeling the climatic suitability of Leishmaniasis vector species in Europe. *Sci Rep.* 2017; 7(1):1–10.
- 72 Purse B V., Masante D, Golding N, Pigott D, Day JC, Ibañez-Bernal S, et al. How will climate change pathways and mitigation options alter incidence of vector-borne

- diseases? A framework for Leishmaniasis in South and Meso-America. PLoS One. 2017; 12(10):1–22.
- 73 Maia C, Cardoso L. Spread of *Leishmania infantum* in Europe with dog travelling. Vet Parasitol. 2015; 213(1–2): 2–11.
- 74 Savoia D. Recent updates and perspectives on Leishmaniasis. J Infect Dev Ctries. 2015; 9(6):588–96.
- 75 Perrone J, Menezes B De, Eduardo C, Guedes S, Luis A, Almeida DO, et al. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. 2015; 2015: 15–8.
- 76 Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, Nakamura C V. Recent advances in Leishmaniasis treatment. Int J Infect Dis. 2011; 15(8).
- 77 U.S. National Library of Medicine. Clinical Trials [Internet]. [cited 2018 Oct 30]. Available from: https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Leishmaniasis&Search=Apply&recrs=b&recrs=a&recrs=f&recrs=d&age_v=&gndr=&type=&rslt=
- 78 Veitch NC and Grayer RJ. Chalcones, Dihydrochalcones, and Aurones. In Andersen ØM, Markham KR editors. Flavonoids. Taylor & Francis Group; 2007; p. 1003-101.
- 79 Wang T, Li Q, Bi K. Bioactive flavonoids in medicinal plants : Structure, activity and biological fate. Asian J Pharm Sci. 2018; 13(1): 12–23.
- 80 Panche A, Diwan A, Chandra S. Flavonoids: an overview. J Nutr Sci. 2016; 5(e47):1–15.
- 81 Gomes MN, Muratov EN, Pereira M, Peixoto JC, Rosseto LP, Cravo PVL, et al. Chalcone Derivatives : Promising Starting Points for Drug Design. Molecules. 2017; 22(8):e1210.
- 82 Singh P, Anand A, Kumar V. Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. Eur J Med Chem. 2014; 85:758–77.
- 83 Zhuang C, Zhang W, Sheng C, Zhang W, Xing C, Miao Z. Chalcone : A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. Chemical Reviews 2017; 117 (12): 7762-7810.
- 84 Montalvo AM, Fraga J, Maes I, Dujardin JC, Van Der Auwera G. Three new sensitive and specific heat-shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012; 31(7):1453–61.
- 85 Zilberstein D, Shapira M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. Annu Rev Microbiol. 1994; 48:449–70.

- 86 Kolodziej H, Kiderlen AF. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitised RAW 264.7 cells. *Phytochemistry*. 2005; 66: 2056–71.
- 87 Wheeler RJ, Gluenz E, Gull K. The cell cycle of *Leishmania*: Morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Mol Microbiol*. 2011; 79(3): 647–62.
- 88 Girardi C, Fabre N, Paloque L, Ramadani AP, Benoit-Vical F, González-Aspajo G, et al. Evaluation of antiplasmodial and antileishmanial activities of herbal medicine *Pseudelephantopus spiralis* (Less.) Cronquist and isolated hirsutinolide-type sesquiterpenoids. *J Ethnopharmacol*. 2015; 170: 167–74.
- 89 Sousa-Batista AJ, Escrivani-Oliveira D, Falcão CAB, Da Silva Philipon CIM, Rossi-Bergmann B. Broad spectrum and safety of oral treatment with a promising nitrosylated chalcone in murine Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62(10).
- 90 Borsari C, Lucian R, Pozzi C, Poehner I, Henrich S, Trande M, et al. Profiling of flavonol derivatives for the development of antitrypanosomatidic drugs. *J Med Chem*. 2016; 59(16): 7598–616.
- 91 Mahapatra DK, Bharti SK, Asati V. Anti-cancer chalcones: Structural and molecular target perspectives. *Eur J Med Chem* . 2015; 98: 69–114.
- 92 Aceto MD, Lynchj VD, Thoms RK. Effects of drugs on conditioning in the rat II. Synthesis of a centrally active drug and the effects of nine drugs on operant conditioning and extinction. *J Pharm Sci*. 1961; 50(10): 823–7.
- 93 Maquiaveli C C, Oliveira AM, Vieira PC, da Silva ER. *Stachytarpheta cayennensis* extract inhibits promastigote and amastigote growth in *Leishmania amazonensis* via parasite arginase inhibition. *J Ethnopharmacol*. 2016; 192: 108–13.
- 94 Nêris PLN, Caldas JPA, Rodrigues YKS, Amorim FM, Leite JA, Rodrigues-Mascarenhas S, et al. Neolignan Licarin A presents effect against *Leishmania* (*Leishmania*) *major* associated with immunomodulation *in vitro*. *Exp Parasitol*. 2013; 135(2):307–13.
- 95 Ghonime M, Emara M, Shawky R, Soliman H, El-Domany R, Abdelaziz A. Immunomodulation of RAW 264.7 murine macrophage functions and antioxidant activities of 11 plant extracts. *Immunol Invest*. 2015; 44(3): 237–52.
- 96 Rodrigues KADF, Dias CNDS, Neris PLDN, Rocha JDC, Scotti MT, Scotti L, et al. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation *in vitro*. *Eur J Med Chem*. 2015; 106:1–14.

- 97 Rodrigues KADF, Amorim LV, Dias CN, Moraes DFC, Carneiro SMP, Carvalho FADA. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-*Leishmania* activity through immunomodulation in vitro. *J Ethnopharmacol.* 2015; 160: 32–40.
- 98 Souza AMT, Castro HC, Brito MA, Andrighetti-Fröhner CR, Magalhães U, Oliveira KN, et al. *Leishmania amazonensis* growth inhibitors: Biological and theoretical features of sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives. *Curr Microbiol.* 2009; 59(4): 374–9.
- 99 Ortalli M, Ilari A, Colotti G, De Ionna I, Battista T, Bisi A, et al. Identification of chalcone-based antileishmanial agents targeting trypanothione reductase. *Eur J Med Chem.* 2018; 152: 527–41.
- 100 Cabanillas BJ, Le Lamer AC, Castillo D, Arevalo J, Estevez Y, Rojas R, et al. Dihydrochalcones and benzoic acid derivatives from *Piper dennisii*. *Planta Med.* 2012; 78(9): 914–8.

ANEXOS

Anexo 1.

Aprobación del Comité de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Vicerrectorado de Investigación
Dirección Universitaria de Investigación
Ciencia y Tecnología - DUICT

CONSTANCIA R-022-14-16

El Presidente del Comité Institucional de Ética para el uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia hace constar que el comité de ética aprobó la **RENOVACIÓN** del proyecto de investigación señalado a continuación.

Título del proyecto : "Evaluación de chalconas contra el parásito intracelular Leishmania."

Código de inscripción : 65001

Investigador(es) principal (es) : Adauí Sicheri, Vanessa

La presente renovación será ratificada en la sesión del Comité más próxima. Cualquier enmienda, desviaciones y/u otras eventualidades deberá ser reportada a este Comité de acuerdo a los plazos y normas establecidas. El investigador reportará cada 6 meses el progreso del estudio y alcanzará un informe al término de éste.

La presente **RENOVACIÓN** tiene vigencia desde el 14 de diciembre del 2016 hasta el 13 de diciembre del 2017.

Así mismo el Comité toma conocimiento del Informe Periódico de Avances del estudio de referencia. Documento recibido en fecha 10 de noviembre del 2016.

Los trámites para su renovación deberán iniciarse por lo menos 30 días previos a su vencimiento.

Lima, 14 de diciembre del 2016


Dr. Carlos Espinoza Montes
Presidente
Comité Institucional de Ética en Investigación
para el uso de Animales



/sdm

Av. Honorio Delgado 430, Lima 31 / Apartado Postal 4314, Lima 100, Telefax: 482-4541

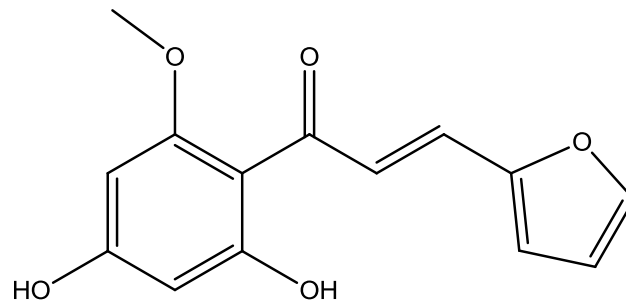
Teléfono: 319-0000 Anexo: 2271 / 2542

'e-mail: duict@oficinas-upch.pe <http://www.upch.edu.pe/vrinve/duict/>

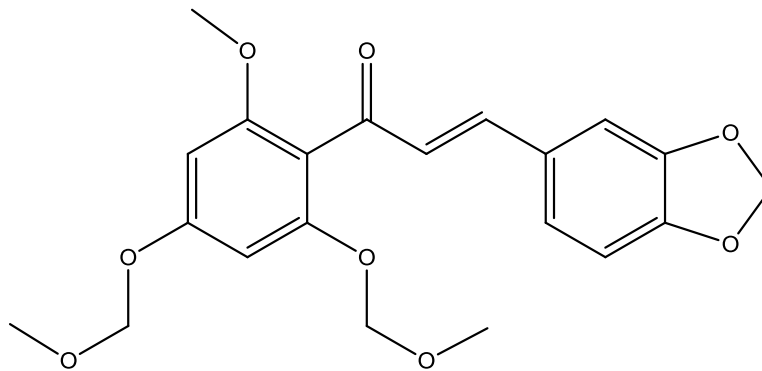
Anexo 2

Estructura química de las chalconas en estudio

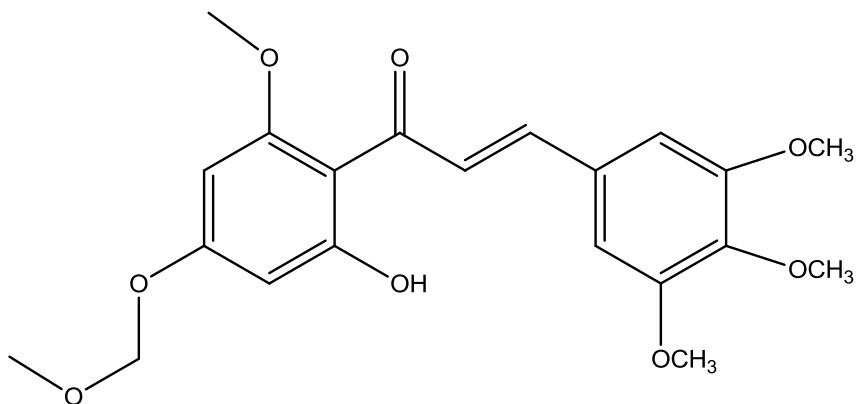
CHALCONA 40



CHALCONA 42

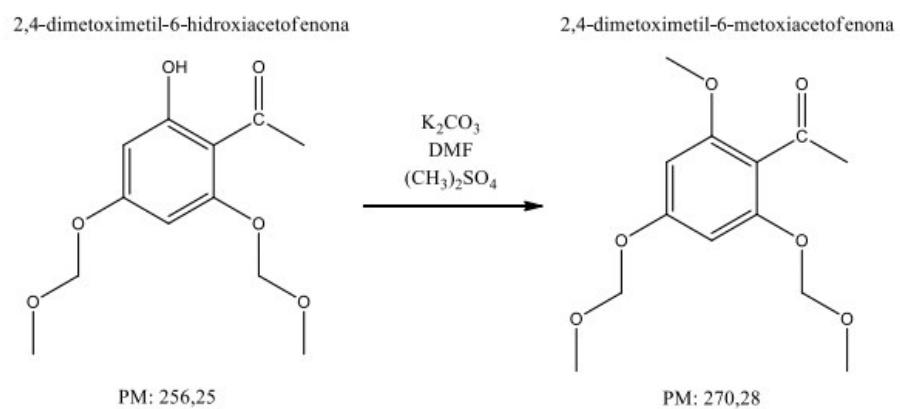
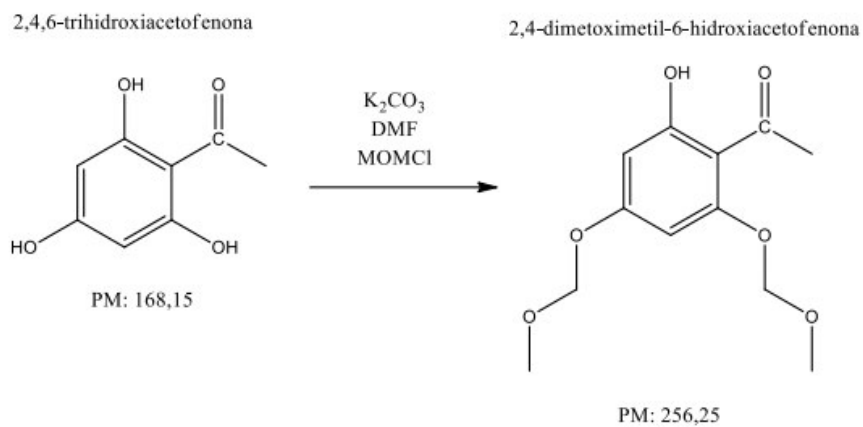


CHALCONA 43

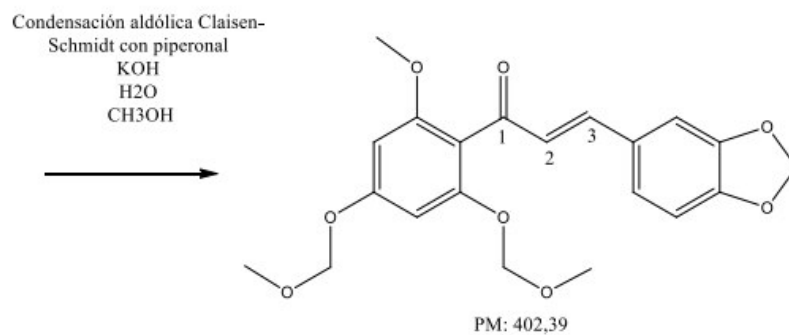


Anexo 3

Síntesis de la Chalcona 42



CHALCONA 42



Anexo 4

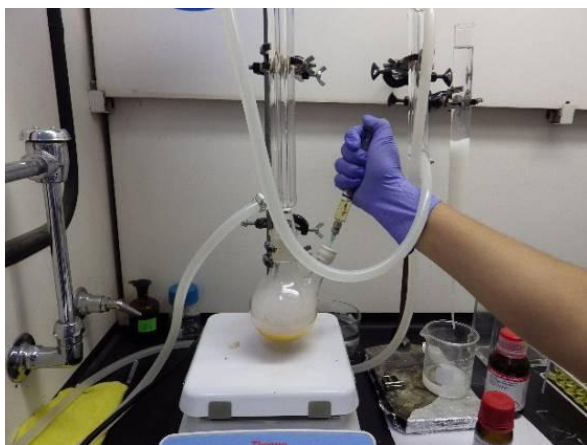
Proceso de Síntesis química



Sistema de reacción en presencia de Argón



Sistema de reflujo en presencia de Argón



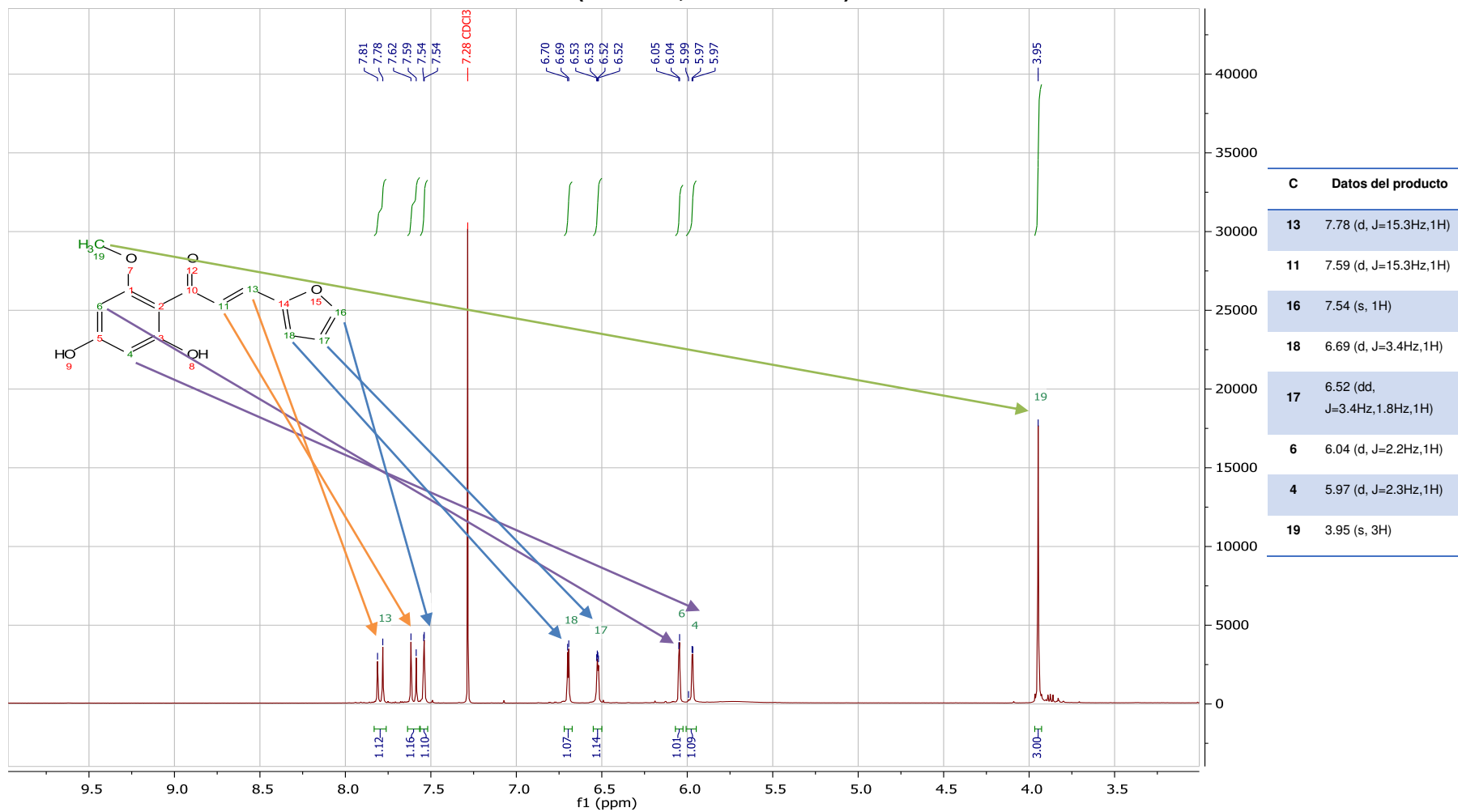
Adición de Reactivos



Purificación de productos

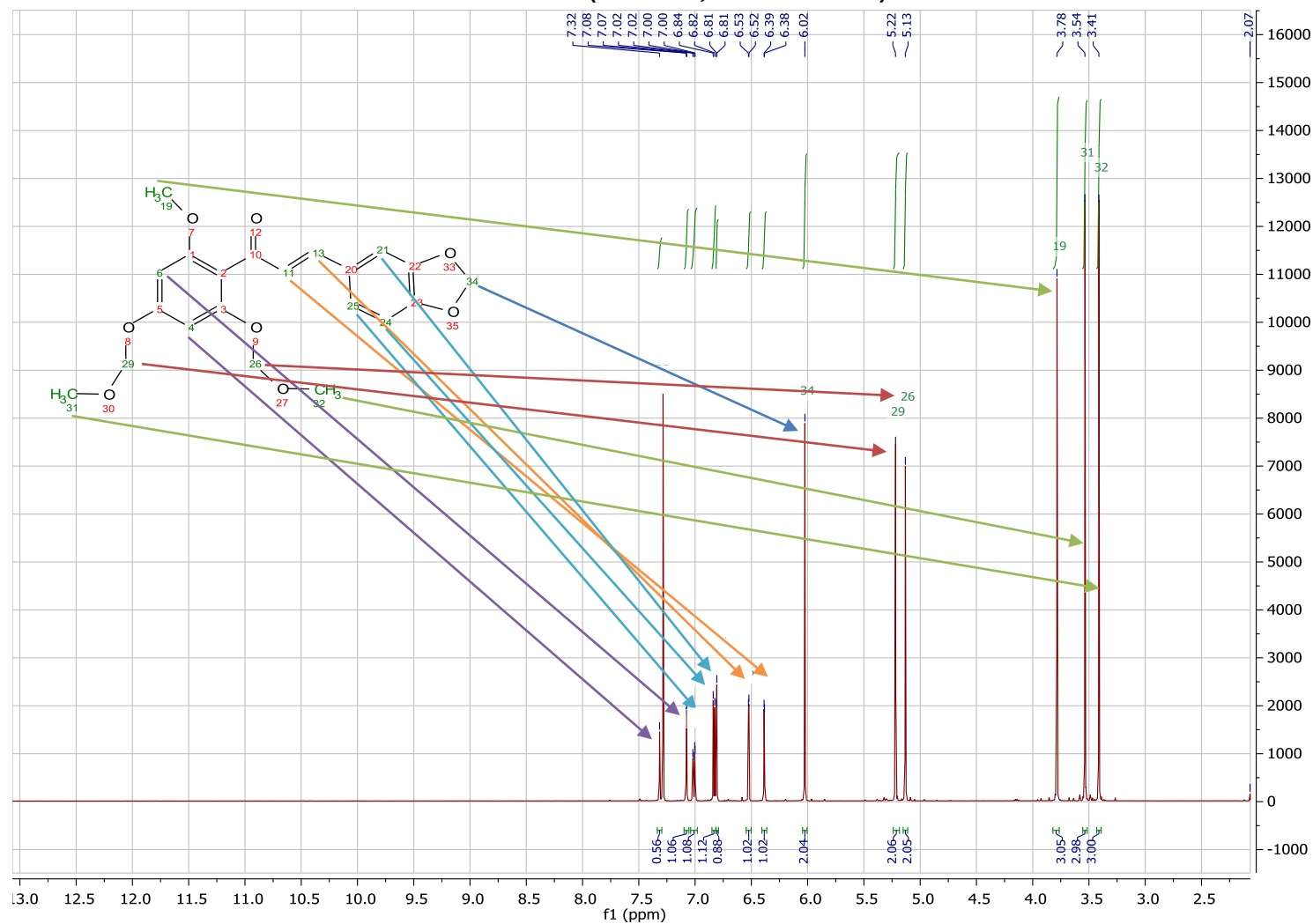
Anexo 5

ESPECTRO DE RMN ¹H DE LA CHALCONA 40 (500 MHz, Chloroform-*d*)



Anexo 6

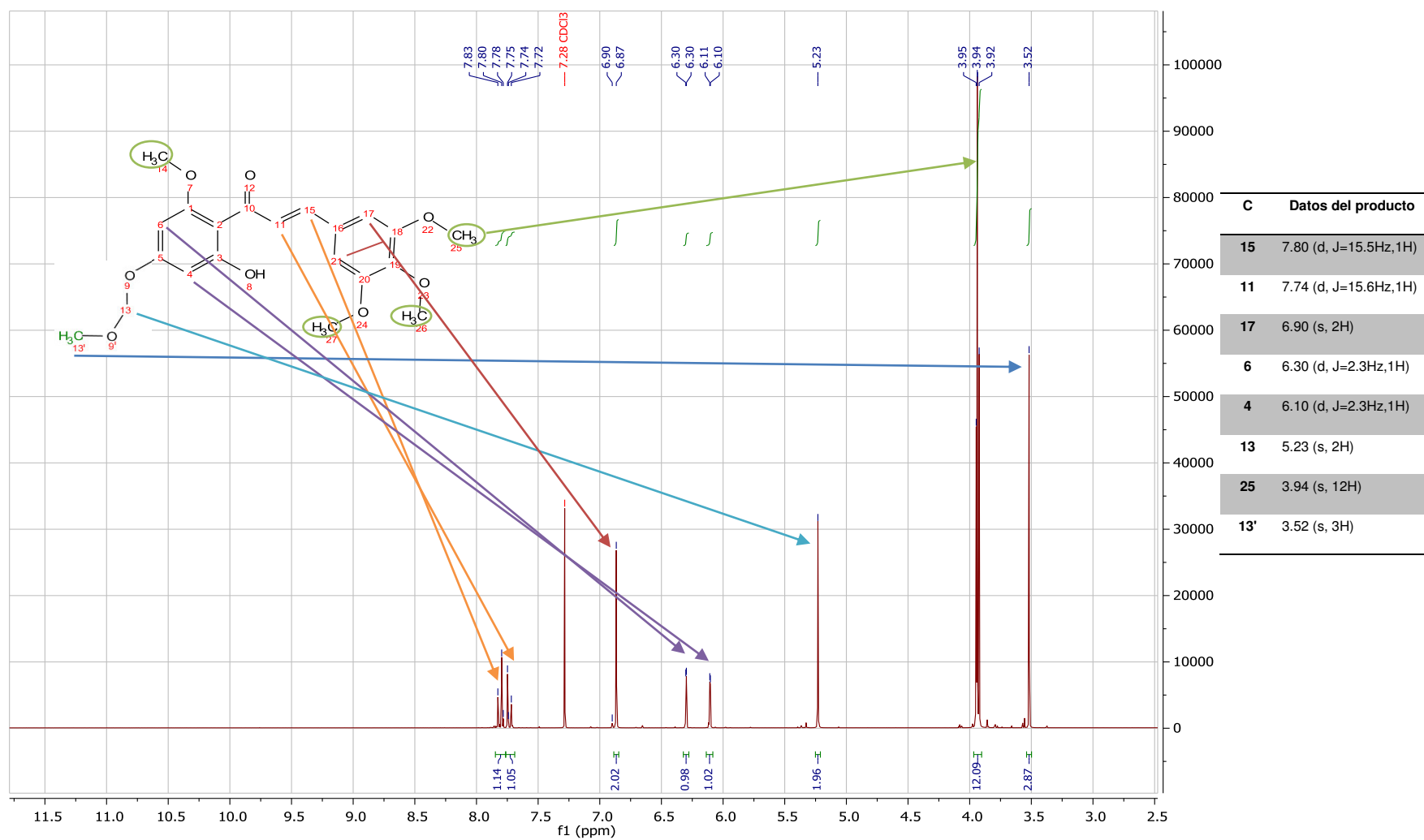
ESPECTRO RMN ¹H DE LA CHALCONA 42 (500 MHz, Chloroform-*d*)



C	Datos del producto
4	7.32 (s, 1H)
6	7.08 (d, J= 1.7Hz, 1H)
25	7.01 (dd, J=8.1, 1.7Hz, 1H)
24	6.81 (m, 2H)
13	6.52 (d, J= 2.0Hz, 1H)
11	6.39 (d, J= 1.9Hz, 1H)
34	6.02 (s, 2H)
29	5.22 (s, 2H)
26	5.13 (s, 2H)
19	3.78 (s, 3H)
31	3.54 (s, 3H)
32	3.41 (s, 3H)

Anexo 7

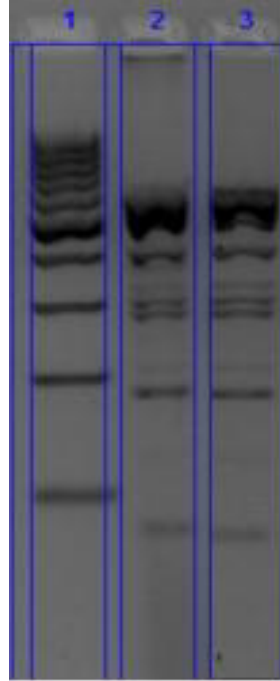
ESPECTRO RMN ¹H DE LA CHALCONA 43 ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-d)



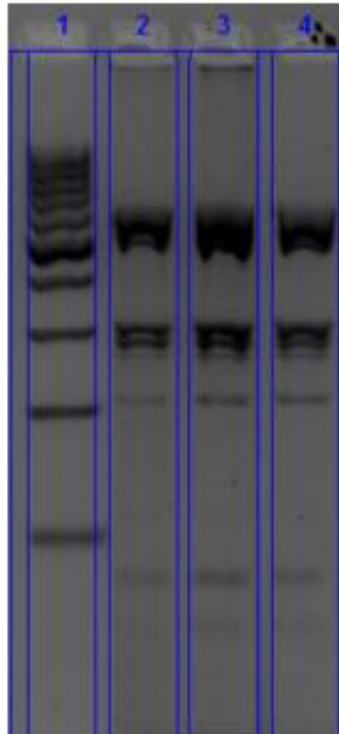
C	Datos del producto
15	7.80 (d, J=15.5Hz,1H)
11	7.74 (d, J=15.6Hz,1H)
17	6.90 (s, 2H)
6	6.30 (d, J=2.3Hz,1H)
4	6.10 (d, J=2.3Hz,1H)
13	5.23 (s, 2H)
25	3.94 (s, 12H)
13'	3.52 (s, 3H)

Anexo 8

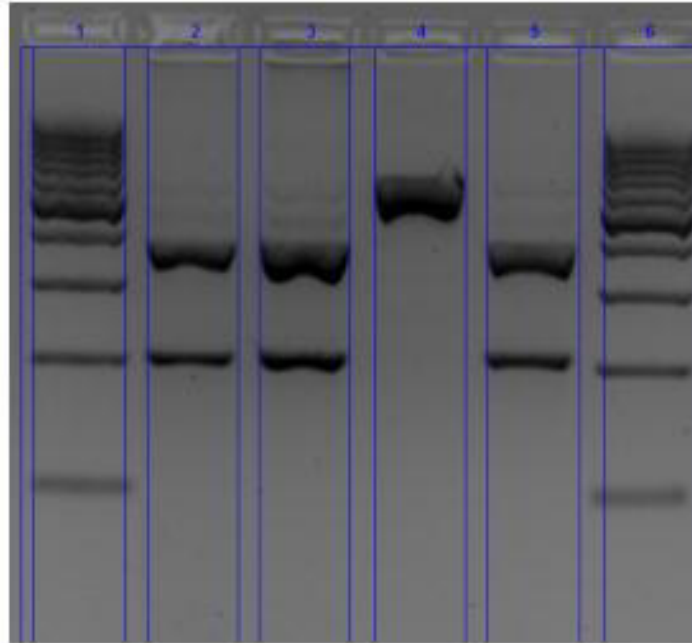
Patrones electroforéticos en la identificación molecular de las especies de *Leishmania* en estudio



Patrón electroforético en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos por PCR-RFLP utilizando Taq y EcoRII respectivamente, a partir de ADN de *Leishmania amazonensis*. Marcador de peso molecular 100bp, 1. Muestra de *Leishmania amazonensis* descriopreservada, 2. Control de *L. amazonensis*, 3.



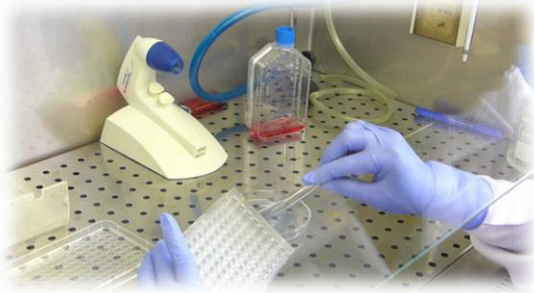
Patrón electroforético en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos por PCR-RFLP utilizando Taq y EcoRII respectivamente, a partir de ADN de *Leishmania infantum*. Marcador de peso molecular 100bp, 1. Muestra de *Leishmania infantum* descriptopreservada, 2. Muestra de *Leishmania infantum-luc*, 3. Control de *L. infantum*, 4.



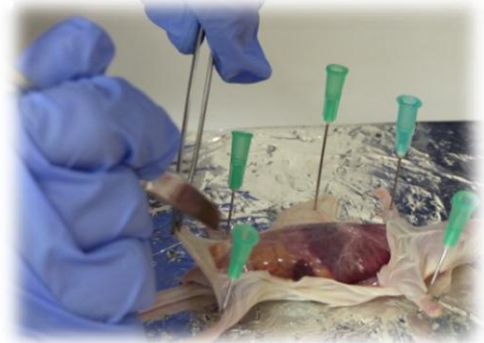
Patrón electroforético en gel de agarosa de los fragmentos obtenidos por PCR-RFLP utilizando Taq y Mull, respectivamente, a partir de ADNs de *Leishmania infantum*. Marcador de peso molecular 100bp, 1 y 6. Muestra de *Leishmania infantum* descriopreservada, 2. Muestra de *Leishmania infantum-luc*, 3. Control de *L. donovani*, 4. Control de *L. infantum*, 5.

Anexo 9

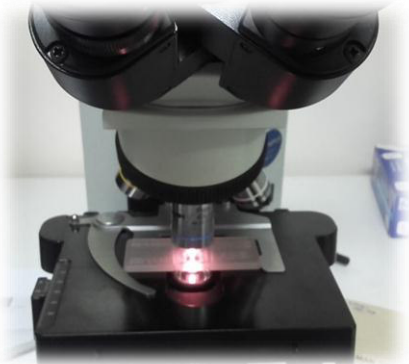
Extracción de macrófagos intraperitoneales de Ratón BALB/c



Preparación de placa. Se colocan laminillas de vidrio para la infección con los parásitos de *Leishmania*



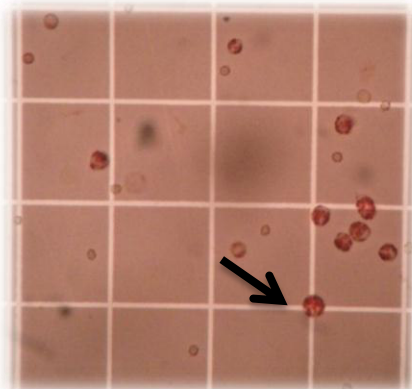
Exposición del peritoneo



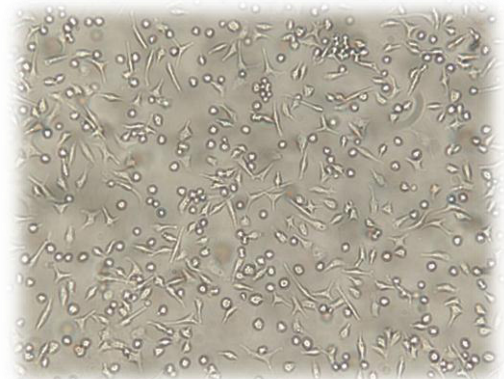
Observación en microscopio óptico. Previamente se añade neutral red.



Extracción de macrófagos



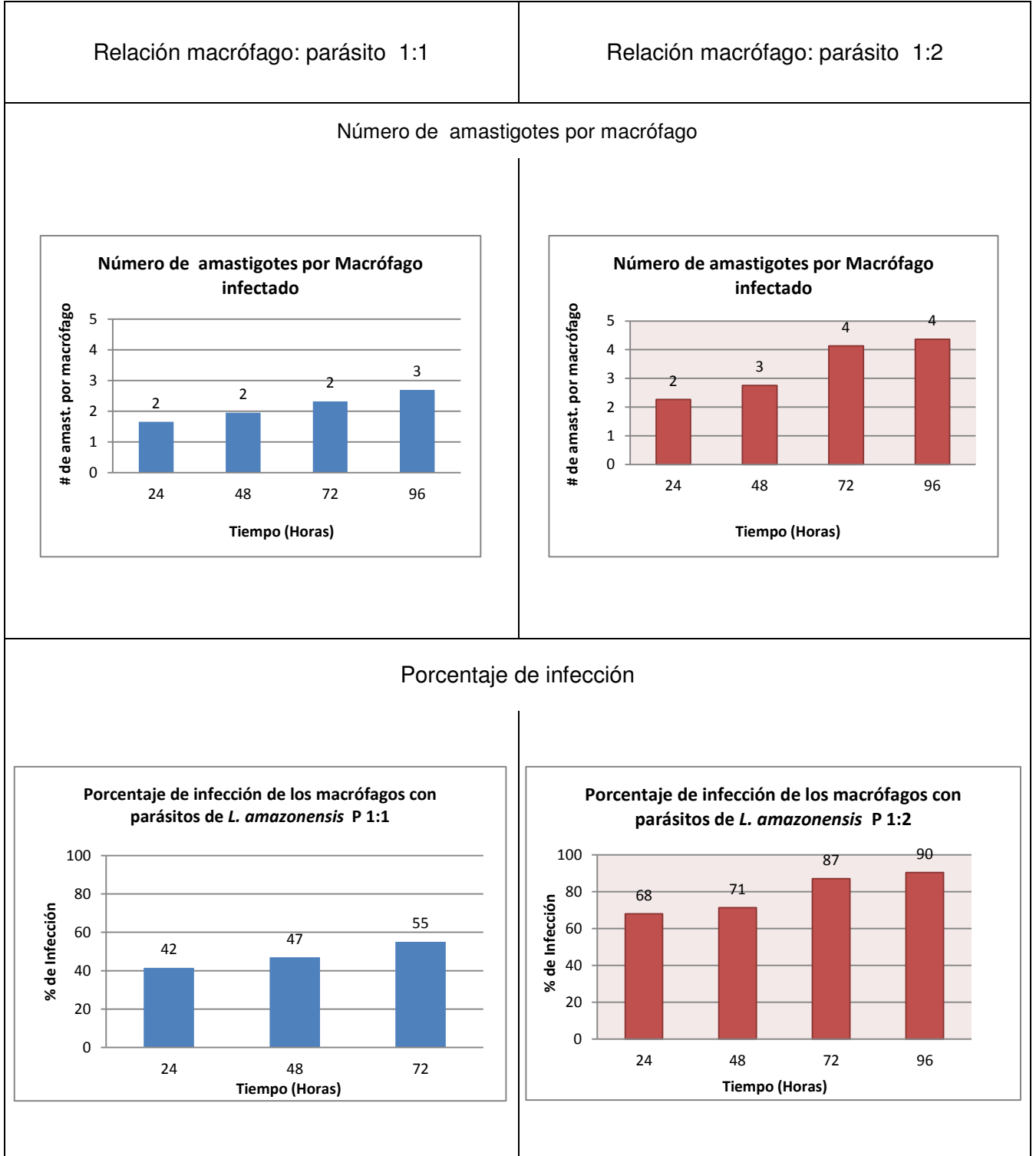
Recuento óptico de macrófagos en cámara de Neubauer



Macrófagos cultivados en las microplacas

Anexo 10

Cinética de Infección para la especie *L. amazonensis*



Relación macrófago: parásito 1:1

Relación macrófago: parásito 1:2

Carga parasitaria

