



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

---

**T E S I S**

**“EFECTO DEL COMPUESTO HA2 EN EL TRATAMIENTO  
DE LEISHMANIASIS CUTÁNEA DISEMINADA  
EXPERIMENTAL”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD**

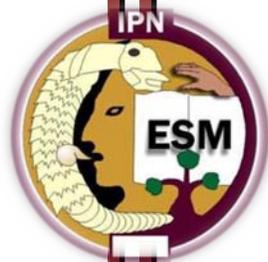
Presenta:

**Martha Patricia Rodríguez Sui Qui**

Directores de Tesis:

**Dra. en C. Norma del Carmen Galindo Sevilla**

**Dr. en C. Javier Mancilla Ramírez**



**México, D. F., Diciembre de 2011**



SIP-14-BIS

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 14:00 horas del día 30 del mes de Mayo del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESM para examinar la tesis titulada:

**“Efecto del compuesto HA2 en el tratamiento de leishmaniasis cutánea diseminada experimental”**

Presentada por la alumna:

**Rodríguez**

Apellido paterno

**Sui Qui**

Apellido materno

**Martha Patricia**

Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	2	0	6	1
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

**Maestría en Ciencias de la Salud**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

**Dra. Norma del Carmen Galindo Sevilla**

**Dr. Javier Mancilla Ramírez**

**Dr. Nelson Eduardo Álvarez Licona**

**Dra. María del Carmen Castillo Hernández**

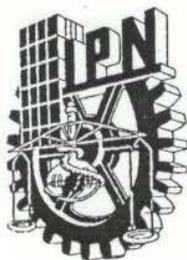
CAZADA MENDOZA  
CLAUDIA CALLELLA

**Dra. Claudia Camelia Calzada Mendoza**



PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES DE MEDICINA  
I.P.N.  
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
E INVESTIGACION  
CONTROL ESCOLAR

**Dr. Eleazar Lara Padilla**



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de México el día 30 del mes Mayo del año 2011, el que suscribe Martha Patricia Rodríguez Sui Qui alumna del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud con número de registro B092061 adscrito a La Escuela Superior De Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Norma del Carmen Galindo Sevilla y Dr. Javier Macilla Ramirez y cede los derechos del trabajo intitulado "Efecto del compuesto HA2 en el tratamiento de leishmaniasis cutánea diseminada experimental", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección prodriguez\_suiqui@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

*Martha Patricia Rodríguez Sui Qui*  
Martha Patricia Rodríguez Sui Qui

Nombre y firma

Este trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes: en el laboratorio de Infectología de la Torre de Investigación, y en el bioterio, bajo la dirección de la Dra. en C. Norma del Carmen Galindo Sevilla y del Dr. en C. Javier Mancilla Ramírez.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Instituto Politécnico Nacional, por brindarme la oportunidad de superarme académicamente.

A mis maestros que me han alentado a seguir estudiando y cuyos conocimientos he disfrutado enormemente.

A mis compañeros, que con su calidad humana, me han enseñado el valor de la amistad.

**ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS**

Gráfica I .....	51
Gráfica II .....	51
Gráfica III.....	53
Gráfica IV .....	52
Gráfica V .....	53
Gráfica VI .....	53
Gráfica VII.....	54
Gráfica VIII .....	54
Gráfica IX .....	55
Gráfica X .....	55

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla I .....	9
Tabla II .....	28
Tabla III .....	29
Tabla IV .....	30
Tabla V .....	30
Tabla VI .....	30
Tabla VII .....	31
Tabla VIII .....	31
Tabla IX .....	32
Tabla X .....	33
Tabla XI .....	34
Tabla XII .....	35
Tabla XIII .....	35
Tabla XIV .....	36
Tabla XV .....	36
Tabla XVI .....	37

## **ABREVIATURAS**

**DNA:** Ácido desoxirribonucleico.

**DHFR:** Dehidrofolatorreductasa

**ELISA:** Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.

**FNT $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa.

**IL:** Interleucina.

**INF $\gamma$ :** Interferón gamma.

**IM:** Intramuscular.

**KAP1:** Factor de transcripción temprana.

**KAP4:** Factor de transcripción intermedia.

**Kb:** kilobites.

**NK:** Linfocitos asesinos.

**NNN:** Novy, McNeal y Nicolle.

**NO:** Óxido nitroso.

**PCR :** Reacción en cadena de la polimerasa.

**RNA:** Ácido ribonucleico.

**Th1:** Linfocito T tipo 1

**Th2:** Linfocito T tipo 2

**VIH:** Virus de inmunodeficiencia adquirida.

## GLOSARIO

**Amastigote:** Familia del género de *Leishmania spp.* Tiene el flagelo reducido o ausente.

**Flagelo:** Filamento largo y delgado que sale del protoplasma de los protozoarios flagelados, como órgano locomotor.

**Flebotomo:** Nombre común que se da a los miembros de la familia *Psychodidae*. Son insectos pequeños de tamaño que, a diferencia de las demás especies de mosquitos, no emiten zumbido. El color varía desde pajizo claro a marrón oscuro.

**Leishmaniasis:** Se le llama así a la enfermedad causada por un protozooario del género *Leishmania*, de las especies *L. mexicana*, *L. brasiliensis* y *L. chagasi*.

**Lutzomya:** Género de la familia *Psychodidae*.

**Probóscide:** Boca de los insectos.

**Promastigote:** En el ciclo vital de los Trypanosomatida (familia del género de *Leishmania spp.*) se presentan diversas formas que se distinguen principalmente por la posición del flagelo. El promastigote tiene el flagelo anterior al núcleo, libre del cuerpo de la célula.

## RESUMEN

La Leishmaniasis es una parasitosis endémica que afecta aproximadamente a un millón de personas cada año. Es una de las más graves y se identifica como una enfermedad cutánea crónica, ocasionada por un parásito protozoo intracelular del género *Leishmania*.

Los viajeros que han sido contagiados en lugares endémicos, al regresar a su lugar de origen la enfermedad no se detecta oportunamente y su tratamiento es inapropiado. Si se agrega que las terapias con fármacos son tóxicas, los parásitos presentan resistencia a los tratamientos actuales o algunos pacientes de manera natural no responden a estos medicamentos, la afectación de las lesiones y el ataque al estado general la convierte en una enfermedad mutilante y discapacitante, por lo que es necesario buscar un nuevo medicamento que erradique la enfermedad.

Se probó un nuevo medicamento derivado de la triaminoquinazolina con ferroceno (HA2) y los ya existentes en el mercado: N-metil glucantime e hidroxiurea, en ratones BALB/c, comparando las lesiones y su efecto terapéutico. Observando que hay una remisión del 90 al 100 % en la curación de las lesiones cutáneas.

Palabras clave: leishmaniosis cutánea diseminada.

## **ABSTRACT**

The Leishmaniasis is an endemic parasitosis that affects about one million people each year. It is a disabling disease and is identified as a chronic skin disease, caused by an intracellular protozoan parasite of the genus *Leishmania*. Travelers who have been infected in endemic areas, returning to their place of origin the disease is not detected early and treatment is inappropriate. Adding that drug therapies are toxic, the parasites are resistant to current treatments or naturally some patients do not respond to these drugs, the involvement of injury and general malaise turns into a crippling and debilitating disease. It is necessary to seek a new drug that eradicated the disease. We tested a new drug derived from the triaminoquinazolina with ferrocene (HA2) and already on the market: N-methyl glucantime and hydroxyurea in BALB/c mice, comparing the injury and its therapeutic effect. Noting that there is a remission of 90 to 100% in healing of skin lesions.

Keywords: disseminated cutaneous leishmaniasis.

## ÍNDICE

	ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS.....	I
	ÍNDICE TABLAS.....	II
	ABREVIATURAS .....	III
	GLOSARIO.....	IV
	RESUMEN.....	V
	ABSTRACT.....	VI
	ÍNDICE.....	VII
I	MARCO TEÓRICO .....	1
	1.1 Antecedentes.....	1
	1.2 Historia .....	5
	1.3 Epidemiología .....	7
	1.4 Clasificación .....	8
	1.5 Ciclo de vida .....	10
	1.6 Reservorio .....	11
	1.7 Biología molecular y bioquímica de la leishmania .....	13
	1.8 Cuadro clínico .....	15
	1.9 Diagnóstico .....	16
	1.10 Tratamiento .....	17
	1.11 Respuesta inmunitaria del humano y del ratón .....	21
II	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y/O JUSTIFICACIÓN .....	24
III	HIPÓTESIS .....	25

	<b>VIII</b>	
<b>IV</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1</b>	<b>General .....</b>	<b>26</b>
<b>4.2</b>	<b>Específicos.....</b>	<b>26</b>
<b>V</b>	<b>DISEÑO METODOLÓGICO .....</b>	<b>26</b>
<b>5.1</b>	<b>Tipo de Estudio.....</b>	<b>26</b>
<b>5.2</b>	<b>Universo.....</b>	<b>26</b>
<b>5.3</b>	<b>Población .....</b>	<b>26</b>
<b>5.4</b>	<b>Tamaño de muestra .....</b>	<b>26</b>
<b>5.5</b>	<b>Definición de variables.....</b>	<b>26</b>
<b>5.5.1</b>	<b>Variable independiente .....</b>	<b>26</b>
<b>5.5.2</b>	<b>Variable dependiente.....</b>	<b>27</b>
<b>5.6</b>	<b>Material .....</b>	<b>27</b>
<b>5.7</b>	<b>Método .....</b>	<b>27</b>
<b>VI</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
<b>VII</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>38</b>
<b>VIII</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>40</b>
<b>IX</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>41</b>
<b>X</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>42</b>
<b>XI</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>51</b>

## I MARCO TEÓRICO

### 1.1 Antecedentes

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria que afecta a habitantes en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. La Organización Mundial de la Salud estima que hay alrededor de 350 millones de personas infectadas, con una incidencia anual de 2 millones (Pereira, 2010). En México en el año 2006, los casos reportados disponibles en el Boletín Epidemiológico de la Secretaría de Salud fueron 820. Se distribuyen al menos en 20 estados: Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas por el Norte; Veracruz, Tabasco, Campeche, Sur de Yucatán y Quintana Roo por el Golfo; Chiapas, Oaxaca, Guerrero, Michoacán, Jalisco, Nayarit y Sinaloa por el Pacífico y los estados de San Luis Potosí, Morelos, Puebla, Hidalgo y Durango, en el Centro de la República, considerándose un problema de Salud Pública (Davis, 2003; Epidemiología, 2007).

Se transmite por la picadura de alrededor de 30 especies de moscas areneras del género *Phlebotomus* (Viejo Mundo) y *Lutzomya* (Nuevo Mundo). Estos insectos pueden adquirir la infección de humanos y reservorios tales como roedores, cánidos y primates (Andrade, 2005). La transmisión entre humanos también puede ocurrir por contacto con material de una lesión, transplante de órganos, transfusión y a través de la placenta (Buffet, 2007). Se han identificado en México tres especies: *L. mexicana mexicana*, *L. braziliensis braziliensis* y *L. donovani chagasi* (Martínez, 2009).

La infección comienza cuando el parásito, en su fase promastigote metacíclico, penetra en la piel por la picadura de la hembra de la mosca vector y es fagocitado

por macrófagos dérmicos, células de Langerhans y monocitos. Algunos promastigotes son destruidos por leucocitos polimorfonucleares y otros se transforman en amastigotes en las células del sistema reticuloendotelial; en los fagolisosomas (vacuola parasitófora) pierden el flagelo y se transforman en amastigotes, multiplicándose por división binaria hasta que la célula infectada estalla y los amastigotes se diseminan hacia diferentes tejidos (Del Rosal, 2010). Cuando moscas libres de infección se alimentan de individuos infectados, ingieren las células con amastigotes que sufren cambios bioquímicos y morfológicos en el intestino medio del insecto, se multiplican y finalmente migran a la probóscide como promastigote metacíclico, altamente infectante y promastigotes, lo que completa el ciclo de transformación (García, 2004).

Los síntomas dependen de la especie o de la subespecie del parásito infectante, la distribución de los macrófagos infectados y en especial de la respuesta inmunitaria del huésped (Ramos, 2000). Es posible, una fase silenciosa de la parasitosis, en la que no hay lesiones visibles, pero el huésped se encuentra infectado (Desjeux, 2001). En orden ascendente de afección sistémica y gravedad clínica, hay 4 tipos principales de leishmaniosis en seres humanos clasificados como: cutánea localizada; cutánea diseminada o difusa; mucocutánea o “espundia” y visceral o “kala-azar” (Gómez, 2008).

La leishmaniosis cutánea localizada es conocida en México como “úlceras de los chicleros” debido a que fue encontrada en trabajadores que extraían la goma del árbol del chicle, afecta con frecuencia el pabellón auricular, produciendo una úlcera crónica, de curso progresivo, de fondo exudativo, generalmente indolora y mutilante (Jheman, 2008). Al principio los pacientes no son conscientes de los

síntomas, tienen la afección cutánea y si no se extiende piensan que cicatrizará y remitirá sola. En ocasiones se aplican medicamentos en forma local (Blum, 2004), se cura la lesión, pero posteriormente se presenta cansancio generalizado con el brote subsecuente, en otra parte del cuerpo (Missoni, 1993).

En el tipo mucocutánea hay afección del tracto respiratorio que involucra a la mucosa oral, nasal, faríngea y/o laríngea (Jhemman 2008). Las manifestaciones clínicas se presentan muchos meses después de haberse resuelto la enfermedad cutánea: inicia con una rinitis, se aprecia inflamación de la mucosa e hipertrofia vascular, con ulceración posterior que llega a comprometer el tabique nasal cartilaginoso. El progreso de la enfermedad es crónico. Puede involucrar el labio superior, paladar, pilares, úvula, epiglotis, cuerdas vocales, laringe y tráquea. Los cuadros severos se asocian a dificultad para respirar o deglutir; también se presenta disfonía, afonía e incluso asfixia, aunque estos estudios han sido descritos para *Leishmania braziliensis* (Llanos, 2007).

En la forma visceral, la infección puede ser asintomática, aguda o crónica. El tiempo de incubación es de meses, a veces años; la aparición de signos y síntomas es habitualmente insidioso y en ocasiones el único signo inicial es un nódulo, fiebre, palidez, anorexia, pérdida de peso, deficiencia en el crecimiento, tos, vómito, diarrea y epistaxis, esplenomegalia masiva acompañada de hepatomegalia, linfadenopatía, a veces generalizadas, sangrado gingival, equimosis y petequias en extremidades (Hashim, 1995). En etapas posteriores se ha descrito taquicardia, ictericia, distensión abdominal, ascitis y edema, sangrados y equimosis más importantes, alteraciones en piel y anexos, hiperpigmentación, lesiones verrucosas no ulceradas y alopecia. Los hallazgos de laboratorio indican

trombocitopenia ( $120.000/\text{mm}^3$ ), anemia normocítica normocrómica ( $10\text{g/dl}$ ), leucopenia de  $3.500/\text{mm}^3$  o hipoalbuminemia (Buffet, 2007).

La confirmación de laboratorio se basa en la demostración del parásito en improntas de lesiones cutáneas con tinción de Giemsa, intradermorreacción de Montenegro positiva y la biopsia cutánea (Banoo, 2007). En leishmaniasis visceral, la presencia de anticuerpos anti *Leishmania sp* en muestras de suero, el test de aglutinación directa y la ELISA positiva; la biopsia de hígado y el aspirado de médula ósea. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se ha convertido en la principal herramienta de diagnóstico y control, ya que muestra el ADN del parásito (Weigle, 2002), aunque su uso es limitado por su alto costo (Boggild, 2008).

Para las formas locales de la enfermedad hay erradicación con medicamento sistémico y aplicación tópica de cremas antimicóticas (González, 2002); pero, para la forma mucocutánea y diseminada, actualmente no hay una droga eficaz para su tratamiento, ya que no se cura por completo, aunque el paciente permanezca sin síntomas, el parásito subsiste en el organismo en estado latente y se convierte en una fuente de contagio que presenta remisiones y exacerbaciones (Croft, 2006; Santos, 2008; Singh, 2004).

Los pocos tratamientos disponibles son tóxicos para el hígado y riñones, poco efectivos y de pobre capacidad para erradicar la parasitosis. Además que deben ser solicitados a la Secretaría de Salud, porque no se venden en establecimientos comerciales (Bryceson, 2001; Norma Oficial mexicana; Mahajan, 2007). Tampoco ha habido suficiente interés para invertir en un nuevo medicamento, ya sea por la

poca rentabilidad en la comercialización de fármacos o por la insuficiente fuerza económica de los grupos poblacionales que la padecen.

Los medicamentos más empleados son la anfotericina B, la pentamidina y el antomoniato de N- metil- glucantime. Este último, con frecuencia, no se administra adecuadamente porque no se dispone en suficientes cantidades por su alto costo, lo que ha favorecido que se administre en forma intralesional y no intramuscular, en esquemas de menores dosis, situación que provoca ineficacia en el tratamiento (Alavi, 2002; Soto, 2002).

Con frecuencia, tampoco se realiza un seguimiento del paciente, se considera curado cuando no hay lesión visible, pero no se realiza un estudio genético de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para saber si realmente el parásito desaparece del organismo ( Allahverdiyev, 2004; Bensoussan, 2006).

Por lo tanto, el fracaso en el tratamiento se debe a causas diversas: la farmacocinética, el uso de dosis sub-óptimas, los altos costos del medicamento, la toxicidad de los compuestos y el incremento de la resistencia generada por estos parásitos (Bessselin, 2002; Bryceson, 2001). Por lo que es necesario encontrar un nuevo medicamento que erradique por completo al parásito.

## **1.2 Historia**

La leishmaniosis se describió en el año 1500 a.C., por El Razi en el Viejo Mundo. En el Nuevo Mundo, hay datos de la existencia de formas mucocutáneas en la época precolombina, que se deducen del estudio de los “huacos”, figurillas de arcilla de los incas peruanos (García, 2004). En 1885 Cunningham descubrió un protozooario en un botón de Dehli. En 1903 Leishman y Donovan identificaron el

parásito en la fiebre Dum-Dum (kala-azar o fiebre negra). Ese mismo año Ronald Ross denominó al agente *Leishmania donovani* en honor a los investigadores anteriores. También en ese año Wright descubrió el agente del botón de oriente llamándole *Leishmania tropica*.

En 1908 Nicolle y Sicre realizaron cultivos a partir de lesiones del botón de oriente, por lo que se desarrolló el medio de Nicolle, Navy y Macneal (NNN) en agar sangre.

En 1911 Wenyon sugirió que flebotomos era el vector. Gaspar Vianna descubrió *L. braziliensis* como agente etiológico de la leishmaniasis americana. En 1912 Aragao logró la transmisión experimental por inoculación, y Vianna administró con éxito el tártaro emético (antimonial) en Brasil.

En 1912 Farfán realizó una tesis relacionada con las “úlceras de los chicleros” en Campeche. En el mismo año, Seidelin describió la enfermedad en los trabajadores del chicle de la península de Yucatán, por lo que acuñó el término de “úlceras de los chicleros”.

En 1926, Montenegro desarrolló la intradermorreacción, que lleva su nombre, para el diagnóstico de leishmaniasis.

En 1942, Vilanova introduce el tratamiento intralesional con antimonio pentavalente.

En 1944 Millán y Chávez informaron el primer caso en el mundo de leishmaniasis cutánea diseminada, pero le denominaron leishmaniasis cutánea infantil y lo publicaron en una revista de escasa circulación internacional, por lo que Prado y colaboradores fueron reconocidos por su descubrimiento en 1948.

En 1952 Báez y colaboradores publicaron el primer caso de leishmaniasis visceral en México, en Huizuco, Guerrero.

En 1953, Biagi, en Escárcega, Campeche, designó como *Leishmania tropica mexicana* al agente infeccioso que producía la “úlceras de los chicleros”. En 1965 Márquez publicó un caso de leishmaniasis cutánea diseminada en México.

En 1985, De la Loma y colaboradores describen por primera vez la coinfección de leishmania y sida (VIH).

En 1987, Velasco y su grupo descubrieron *L. braziliensis* en el istmo de Tehuantepec. En 1997, Velasco Castrejón, aplicó la radiofrecuencia (termoterapia) como alternativa de tratamiento en Tabasco.

### **1.3 Epidemiología**

La leishmaniasis se encuentra distribuida en 88 países, en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. Se considera que 350 millones de personas en el mundo están en riesgo de infección. La prevalencia estimada es de 12 millones de casos. La forma más frecuente es la cutánea. En México la zona endémica con el mayor número de casos es en el sureste del País (Velasco, 1987). Las zonas geográficas situadas por debajo de los 1750 metros sobre el nivel del mar, con clima cálido, humedad relativa alta, entre 60 y 100% y temperatura media entre 15 y 30°C, lo que centra su actividad en los períodos nocturnos donde la temperatura baja y la humedad ambiente sube (Berman, 2005). Normalmente coincide con el momento de ponerse el sol hasta el amanecer, presentándose las condiciones adecuadas para la transmisión de la enfermedad cutánea y la proliferación de focos en bosques tropicales, donde aún es frecuente la presencia de reservorios y

vectores (Vera, 2005), en tanto que los bosques secos tropicales son el hábitat preferido de la leishmaniasis visceral (Hotez, 2004).

La leishmaniasis afecta a ambos sexos, aunque se reporta con mayor frecuencia en sujetos masculinos. Por lo que respecta a la edad, en el 2006 se reporta un incremento en la población infantil (Sánchez, 2004).

Los factores de riesgo, en zonas endémicas son la exposición debida a actividades laborales (campesinos, militares, chicleros, madereros, arqueólogos), o a la instalación de sus viviendas cerca de los focos de transmisión y de ciudades cercanas a los bosques y/o a las selvas tropicales. La coinfección con VIH se ha asociado a un incremento muy importante de la leishmaniasis visceral en zonas endémicas, ya que los pacientes se encuentran inmunodeprimidos y es más fácil que adquieran la infección (Calza, 2004; Cruz, 2006; Molina, 2003).

#### **1.4 Clasificación**

Los parásitos se subdividen en dos subgéneros; subgénero: *Viannia* y el subgénero *Leishmania*. En el primero, los promastigotes se desarrollan en el intestino medio-anterior (región Suprpylaria) y en el segundo, los parásitos se desarrollan en el intestino posterior (región Peripyalaria). La clasificación taxonómica aceptada actualmente incluye el complejo *L. mexicana* que comprende tres especies (*L. mexicana*, *L. enriettii* y *L. amazonensis*), aunque también se han identificado, *Leishmanias braziliensis* y *chagasi*; un complejo *L. donovani* con dos especies (*L. donovani*, *L. archibaldi*), la *L. infantum* dos también (*L. infantum* y *L. chagasi*), las especies *L. tropica* y *L. mayor*, *L. aethiopica*, y un grupo del subgénero *Viannia* con otras cuatro especies *L. brazillensis*, *L.*

*guayanensis*, *L. panamensis* y *L. peruviana*. Las diferentes especies son muy similares morfológicamente, aunque se diferencian por la movilidad electroforética de diferentes isoenzimas, por diferencias del DNA nuclear y del cinetoplasto, por las características de su multiplicación en el tubo digestivo del vector, en el hamster, así como su tamaño en el microscopio electrónico, y por anticuerpos monoclonales, patología y sensibilidad a fármacos, así como diferencias en las secuencias de DNA, encontradas por PCR (Schonian, 2003). Aunque existe una alta similitud morfológica entre las distintas especies de *Leishmania*, estas causan diferentes tipos de patologías en humanos, pudiendo provocar lesiones cutáneas, mucocutáneas o viscerales. Cada patología tiende a estar asociada a una especie o grupos de especies de *Leishmania* (Mendoza, 2002). Así la *L. tropica*, la *L. mexicana* y la *L. major* son algunas de las especies responsables de la leishmaniasis cutánea; *L. braziliensis*, produce la variante *localizada*, *difusa* y *mucocutánea* y *L. donovani* y *L. infantum* son algunas de las productoras de leishmaniasis visceral (Akilov, 2007).

Tabla I  
Clasificación de las leishmanias

Subgénero

LEISHMANIA (Ross, 1903)

ESPECIE	GEOGRAFÍA	TROPISMO	RESERVORIO
<i>Leishmania donovani</i>	Viejo Mundo	Visceral Y cutánea	Antroponótico
<i>L. donovani</i>	India, China, Bangladesh		
<i>L. archibaldi</i>	Sudán, Etiopía		
<i>Leishmania infantum</i>	Viejo Mundo	Visceral Y cutánea	Zoonótico y antroponótico
<i>L. infantum</i>	Asia, África		
<i>L. chagasi</i>	América central y Sur		
<i>Leishmania tropica</i>	Viejo Mundo	Cutánea	Antroponótica
<i>L. tropica</i>	Oriente, India		
<i>L. killicki</i>	Túnez		
<i>L. major</i>	África, Medio Oriente		
<i>L. arabica</i>	Arabia Saudí		
<i>L. gerbilli</i>	China, Mongolia		
<i>L. aethiopica</i>	Etiopía y Kenya	Cutánea y mucocutánea	Zoonótica
<i>Leishmania mexicana</i>	Nuevo Mundo		
<i>L. mexicana</i>	México, Belice,	Cutánea	

	Guatemala	Cutánea	Zoonótica
<i>L. amazonensis</i>	Brasil		
<i>L. enriettii</i>	Venezuela		

Subgénero

VIANNIA (Lainson and Shaw, 1977)

<i>Leishmania braziliensis</i>	Nuevo Mundo	Cutánea	Zoonótica
<i>L. braziliensis</i>	Brasil		
<i>L. peruviana</i>	Oeste de los Andes		
<i>Leishmania guayanensis</i>	Nuevo Mundo	Cutánea y mucocutánea	Zoonótica
<i>L. guayanensis</i>	Guayana Francesa, Guyana y Surinam		
<i>L. panamensis</i>	Panamá y Costa Rica		

### 1.5 Ciclo de vida

Este protozoo presenta un ciclo de vida dimórfico, realizando parte de su ciclo en el tubo digestivo del huésped invertebrado, bajo una forma flagelar denominada promastigote. Cuando el flebótomo parasitado ingiere sangre del huésped mamífero, inocula con su saliva los promastigotes metacíclicos presentes en la probóscide; muchos de estos parásitos son eliminados por el hospedero y otros alcanzan las células fagocíticas donde son englobados por una vacuola parasitófora (fagolisosoma) con la finalidad de eliminarlo. Dentro del macrófago, el parásito sufre un proceso de transformación bioquímica que conlleva a la pérdida del flagelo y otros cambios bioquímicos y moleculares que le permiten transformarse en amastigote intracelular que sobrevive dentro de esta célula del mamífero (Rusell, 2003).

Posteriormente, los macrófagos parasitados circulantes son ingeridos por otro flebótomo en cuyo destino se liberan los amastigotes, estas formas del parásito se transforman en la zona posterior del tubo digestivo en promastigotes procíclicos provistos de un flagelo corto, a los que se denominan nectomonadas. Estas formas promastigotas dentro del tracto digestivo del vector sufren una serie de

modificaciones morfológicas que conllevan a las formas infectivas denominadas formas metacíclicas que serán descargadas a un hospedero posteriormente permitiendo al parásito cerrar el ciclo biológico (Alexander, 2003; Killick, 1999).

Una vez transmitido al hospedero mamífero, la *Leishmania* pasa al torrente sanguíneo, donde debe evitar ser destruido por el sistema inmune del huésped, antes de infectar a los macrófagos. Los promastigotes metacíclicos poseen un glicocalix que le permite resistir la lisis del complemento. La resistencia a la lisis es debida, en parte, a las moléculas de lipofosfoglicano y a la metaloproteasa dependiente de zinc GP63 (guanidin fosfato 63) que se expresa en grandes cantidades en las membranas de los promastigotes metacíclicos. El lipofosfoglicano es también importante para la supervivencia de la *Leishmania* en el insecto vector, al ayudarlo a fijarse en el intestino del insecto (Alvar, 2006).

Un factor fundamental asociado a la virulencia es el tropismo de la especie, que hace que las especies viscerotropas: *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leishmania chagasi*, alcancen rápidamente cualquier área del sistema reticuloendotelial, mientras que las especies dermatropas como *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania aethiopica* se queden en la piel, aunque se ha visto que estas especies, en sujetos inmunodeprimidos, dan lugar a formas difusas o viscerales (Bassano, 2004).

## **1.6 Reservorio**

Las leishmanias parasitan mamíferos salvajes o domésticos, y se le denomina zoonosis. En zonas endémicas, la transmisión puede ser también antroponótica,

de humano a humano (*L. tropica*), a través del vector o a través de jeringas infectadas, por transfusión de sangre, sexual y congénita (Buffet, 2007).

Pueden distinguirse tres clases de huéspedes animales: primarios, secundarios e incidentales. Los huéspedes primarios de *Leishmania* son el refugio habitual del parásito y mantienen la enfermedad en su entorno, como reservorio estable, su adaptación al parásito hace que en el animal, la infección curse con benignidad o sin enfermedad aparente. El huésped secundario es el portador de los parásitos al entorno humano, facilitando la transmisión de este modo y los huéspedes incidentales tienen escasa relevancia en el mantenimiento o transmisión de la enfermedad (Cáceres, 1993).

Es una enfermedad compleja, ya que una especie determinada de *Leishmania* puede parasitar a huéspedes de diferentes grupos filogenéticos, por ejemplo, *L. major* puede infectar a primates, perros y roedores, e inversamente, un huésped concreto puede parasitar distintas especies de leishmania, como es el caso de la infección humana por *L. donovani*, *L. infantum*, *L. tropica*.

Los mamíferos que constituyen reservorios primarios de *Leishmania* pertenecen taxonómicamente a diferentes órdenes: Primates, los humanos; carnívora, el perro doméstico (*Canis familiaris*); la rata y otros roedores.

El perro infectado puede permanecer asintomático, aunque altamente infectivo, o bien desarrollar la enfermedad, aumentando su capacidad de infectar a los flebótomos que se alimentan de él. El zorro también puede estar parasitado, la rata negra, gallinas, équidos y gatos, pero sólo como huéspedes accidentales, y por tanto, sin valor epidemiológico (Desjeux, 2004).

### 1.7 Biología celular, molecular y bioquímica de la *Leishmania*

Este parásito, tiene un organelo denominado cinetoplasto en el que se concentra todo el DNA de su única mitocondria y que se localiza cerca del cuerpo basal del flagelo. Estudios de microscopia electrónica han revelado una red altamente ordenada que se reparte en agrupaciones circulares y concatenadas, denominadas maxicírculos (35 kb–50 kb) y minicírculos (0.8 kb–1.6 kb). El cinetoplasto representa un 10–15% del ADN del parásito (Feagin, 2000). En el mantenimiento de esta estructura participan cuatro histonas (KAP1 – KAP4). En el maxicírculo se codifican las subunidades de los complejos respiratorios de la mitocondria y en los minicírculos se codifican los pequeños RNAs indispensables para la corrección del RNA (Murray, 2005).

La replicación del cinetoplasto se inicia por los minicírculos de una manera muy organizada produciendo dos cinetoplastos hijos. Durante la fase S, los minicírculos individuales son liberados de una manera vectorial desde la red por la acción de una topoisomerasa II (Oliveira, 2000).

Presentan transcripción policistronica generándose RNAs inmaduros que contienen más de un gen, al igual que ocurre en organismos procariotas (Murray, 2000).

La maduración del mRNA se realiza a través de un proceso de transcripción, caracterizado por la adición de secuencias definidas en ambos extremos de cada uno de los transcritos (Shao, 2006).

El genoma de *Leishmania* tiene una elevada plasticidad, con abundancia de los procesos de amplificación génica que utilizan en caso de estrés como la exposición a fármacos. Los genes no suelen tener promotores individuales, por lo

que no pueden ser regulados a través de la iniciación de la transcripción. Cuando se necesitan niveles altos de ciertos transcritos, los genes aparecen con múltiples copias formando un tándem que se transcribe simultáneamente (Feagin, 2000).

La vía a través de la cual *Leishmania* entra en el macrófago se denominó fagocitosis mediada por receptor, y se ha demostrado que tanto glicoproteínas asociadas a membranas como lípidos de la superficie del parásito están implicados en la adhesión de éste a la membrana plasmática del macrófago (Abbas, 2004). Las proteínas de superficie pueden ser recicladas desde y hacia la superficie del parásito mediante una vía endocítica y exocítica en un organelo llamado bolsillo flagelar, que emerge del citoplasma celular en la región posterior de la célula. Este organelo también tiene la importante función de remover anticuerpos del huésped que se hayan unido al parásito. Para el reconocimiento interno del parásito también participan otros factores como: los receptores del macrófago, los de fibronectina, de la manosa-fucosa o receptores de complemento CR1 y CR3 (Silveira, 2004).

Recientemente se ha demostrado que los promastigotes metacíclicos cultivados *in vitro* y que alcanzan la fase estacionaria de crecimiento exponen más fosfatidilserina (PS) en la cara externa de la membrana y que la infectividad de estos parásitos podría estar determinada por este hecho (Terabe, 2004). La fosfatidilserina es un fosfolípido normalmente localizado en la cara interna de la membrana plasmática y es expuesta en exceso hacia la cara externa sólo cuando las células entran en apoptosis (Wu, 2006). El reconocimiento de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana conduciría a su internalización por los fagocitos

(Olivier, 2005) y se ha especulado que podría contribuir a la patología del desarrollo de la lesión.

### **1.8 Cuadro clínico**

La mayoría de las infecciones son asintomáticas, en la leishmaniasis cutánea, la mosca inocula promastigotes que entran en las células del sistema mononuclear fagocítico y se convierten en amastigotes. Se produce un pequeño eritema en el lugar de la picadura, que evoluciona a pápula y aumenta de tamaño. No hay dolor local ni sintomatología sistémica. Algunas curan en forma espontánea dejando una cicatriz visible. Otras se ulceran y presentan un borde definido e hiperpigmentado, que en ocasiones se infecta y debe aplicarse tratamiento bacteriológico. Las úlceras pueden ser secas o exudativas, en ocasiones la lesión no se ulcera, pero puede desarrollar hiperqueratosis o evolucionar a una forma nodular, o ser recurrente. La leishmaniasis cutánea difusa o diseminada, se considera una enfermedad crónica en la que aparecen pápulas o nódulos, principalmente en la cara y las extremidades, y pueden persistir por años. La cronicidad de la infección contribuye al desarrollo y mantenimiento de niveles altos de anticuerpos y niveles bajos de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (Rivas, 2004).

En la leishmaniasis mucocutánea o espundia, las lesiones aparecen meses o años después de que las lesiones cutáneas se hayan curado, por diseminación hematógena o linfática. Inicialmente se ve afectada la mucosa nasal y se produce la ulceración y la destrucción progresiva del tabique nasal, el paladar, los labios, la faringe y la laringe. En ausencia de tratamiento no existe cura espontánea.

En la leishmaniasis visceral el parásito afecta principalmente hígado y bazo. En los vasos sanguíneos se produce hipertrofia y su posterior taponamiento que va a producir necrosis en los tejidos, alterándose así su funcionamiento normal. El período de incubación aproximado es de 2 a 4 meses y los principales síntomas son fiebre alta, irregular de más de dos semanas, acompañada de astenia, pérdida de peso, anemia, dolor abdominal, hemorragia gingival y nasal.

### **1.9 Diagnóstico**

Después de la sospecha clínica de leishmaniasis cutánea, es necesario comprobar la presencia del parásito y para ello, se realizan una serie de pruebas (Faber, 2003), como son:

1. El examen directo, en el cual se toma una muestra del borde infiltrado de la lesión para comprobar la presencia o no de amastigotes. El hallazgo del parásito dependerá de la especie infectante y de la duración de la enfermedad.
2. La intradermorreacción de Montenegro (leishmanina) se trata de una respuesta de hipersensibilidad retardada. Una pápula > de 5 mm a las 48 a 72 horas es reactiva. Reporta de 80 a 100% de sensibilidad. Puede ser negativa en lesiones recientes (menos de 6 semanas) (Sadeghian, 2006).
3. La serología ELISA es positiva para Ig G en un 87 a 95 % de los casos y es empleada para el control y cura de esta patología.
4. La histología es una mejor opción, y para ello, se debe obtener una biopsia de piel, raspado o aspirado de la lesión, de 3 a 5 muestras de lugares distintos:

- a) **Tinción de Giemsa** para identificar amastigotes
- b) **PCR** identificación de la especie aislada, extrayendo el ácido desoxirribonucleico por reacción en cadena de la polimerasa. Es muy útil en el diagnóstico de casos con baja carga parasitaria (Schonian, 2003).
- c) **Cultivo en medio NNN** Se debe mantener al menos 4 semanas, pues el crecimiento puede ser lento, principalmente en casos con baja carga parasitaria. La especie se determina por anticuerpos monoclonales o sondas de DNA.
- d) **Método de cultivo microcapilar (MCM)**. Tubos microcapilares con agar, en donde se siembra la sangre infectada. Se incuban por 15 a 30 días y se considera positiva cuando se observan los amastigotes moviéndose.

### 1.10 Tratamiento

La utilización de medicamentos para combatir la leishmaniasis se remonta a la antigüedad. En Egipto se usaba el tártaro emético para combatir la enfermedad. Vianna en 1912, utilizó por primera vez el antimonio en pacientes con leishmaniasis mucocutánea. Escobel en 1917, utilizó el óxido de antimonio para la forma visceral. En la actualidad hay una gran cantidad de medicamentos, en el que su efecto terapéutico depende de la especie del parásito de que se trate: la leishmaniasis visceral es sensible a los antimoniales existiendo una resistencia a la leishmaniasis cutánea diseminada y mucocutánea (Frezard, 2009).

La leishmaniasis cutánea tiende a curar espontáneamente en varios meses dejando una cicatriz. El tratamiento mejora la cicatrización y previene la

diseminación parasitaria y las recaídas. No hay un tratamiento estándar, cada caso debe ser valorado individualmente ya que la respuesta a los diferentes medicamentos depende de la forma clínica de la especie infectante. Los antimoniales pentavalentes, parenterales o intralesionales, han sido durante décadas el único tratamiento disponible, en el Medical Letter se recomienda el estibogluconato sódico (Pentostam) o antimoniato de meglumina (Glucantime) por vía parenteral en dosis de 20 mg/Kg/día durante 20 días. Puede tener efectos adversos graves, aunque habitualmente éstos son reversibles (dolor musculoesquelético, falla renal, toxicidad hepática y cardíaca) cuando se administran por vía parenteral (Alvar, 2006). Para intentar disminuirlos se han propuesto pautas de tratamiento más cortas (10 días) en casos sin riesgo de diseminación mucosa. En los últimos años han aumentado los casos de fracaso terapéutico por resistencia parasitaria a los fármacos (Ouellette, 2004) o por inmunosupresión del paciente (Ritter, 2002).

La administración intralesional, de antimoniales pentavalentes en *leishmaniasis mexicana*, puede ser muy efectiva y tiene muchas ventajas: alcanza una alta concentración del fármaco en el lugar de la infección y se reducen la toxicidad sistémica y los costes derivados del tratamiento. Se administran 0.2 ml en la lesión y se repite la administración cada 1-3 semanas, con un número de dosis variable según la evolución (Ashutosh, 2007; Baiocco, 2009).

La pentamidina, se asocia frecuentemente con efectos secundarios (náuseas, anorexia, mareo, prurito, hipotensión, necrosis en el lugar de punción y alteraciones hematológicas y electrolíticas, principalmente cuando se administran dosis elevadas (Andersen, 2005; De Paula, 2003).

La miltefosina oral en dosis de 2.5 mg/Kg/día durante 28 días, en pacientes mayores de 12 años. Muestra una efectividad variable según la especie de *Leishmania*. Sus efectos secundarios más frecuentes son náuseas, mareo, dolor de cabeza y aumento de creatinina (Calvopina, 2006). Su principal ventaja es la administración oral.

La anfotericina B deoxicolato, es un antibiótico poliénico insoluble en agua y muy inestable, derivado del cultivo del *streptomyces nodosum*. También se emplea contra una gran variedad de micosis profundas. Es probable que la droga se una a las membranas que contengan colesterol en los diferentes tejidos. La droga se une en un 95% a lipoproteínas, ella cruza la placenta fácilmente, pero muy poco penetra al líquido cefalorraquídeo y humor vítreo. Es excretada por la orina lentamente, incluso 7-8 semanas después de terminar el tratamiento, se encuentran trazas en la orina. Los pacientes deben ser hospitalizados, y no es recomendable el empleo concomitante de esteroides, agentes nefrotóxicos y antineoplásicos. La dosis total es de 1-1.5 gr. Se presenta en polvo liofilizado, que contiene 50 mg de la droga. Se diluye en 10 c.c. de solución glucosada al 5%. Cada c.c. contiene 5 mg. la cantidad que se debe administrar, se diluye en 500 c.c. de solución glucosada al 5% y se administra en forma lenta, por vía intravenosa (4-6 horas). La primera dosis es de 10 mg para observar la tolerancia. Se aplican 3 ó 4 dosis semanales y se aumenta la concentración promedio de 0.2/ kg de peso cada vez, no excediendo la dosis máxima de 1 mg. Deben realizarse exámenes semanales de: orina, urea, creatinina, electrolitos, glóbulos blancos, sedimentación, bilirrubina, fosfatasas alcalinas, transaminasas. Es bastante efectiva, pero los efectos adversos son frecuentes: hiperpirexia, malestar

general, hipotensión, tromboflebitis, daño renal, hipopotasemia, anemia y hepatitis. También se ha empleado la anfotericina en combinación con el glucantime, y se debe tener presente, que si bien se aumenta la acción terapéutica de ambas drogas, igualmente se incrementan los efectos tóxicos. Las formulaciones lipídicas de anfotericina B son mucho menos tóxicas y han demostrado eficacia en el tratamiento de leishmaniasis visceral. Su coste ha limitado el uso en leishmaniasis cutánea.

La paramomicina (sulfato de aminosidina) es un antibiótico aminoglucósido que actúa inhibiendo la síntesis proteica. Se usa vía parenteral en casos de leishmaniosis visceral y de forma tópica (Leishcutan) para leishmaniasis cutánea, no está disponible en nuestro medio y debe reservarse para los casos de afectación mucosa.

El compuesto HA2, es una molécula nueva, derivada de la triaminoquinazolina con ferroceno. Se obtuvo por hibridación molecular y diseño asistido por computadora: Medline, Autdock 4 y VMD 1.8.3, como agente contra la leishmaniasis.

En el diseño se usó el híbrido B18 con dos dianas independientes, se eligieron las enzimas dehidrofolatorreductasa (DHFR) y PTR de *Leishmania mexicana*, debido a que se encuentran activas tanto en el estadio promastigote como amastigote del parásito y están reportadas como cristales para su estudio en medios computacionales. La DHFR es una diana validada en el campo de la química farmacéutica, dado que su inhibición provoca la muerte de los organismos patógenos. La molécula de estudio es la 2,4,6-triaminoquinazolina co-cristalizada con la PTR de *Leishmania major*, fragmento A de la molécula; y como fragmento B, el ferroceno (molécula que muestra actividad contra *Plasmodium falciparum* y

*Trypanosoma brucei*) unido mediante un conector. La molécula resultante es la HA2, síntesis del fragmento A para la obtención de la triaminoquinazolina.

### **1.11 Respuesta inmunitaria del humano y del ratón**

Una vez que el vector inoculara los parásitos se produce una reacción inflamatoria local, generada por macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y células NK. Esta inducción puede ser directa, cuando moléculas propias del parásito estimulan la llegada de neutrófilos o eosinófilos, o indirecta, cuando el parásito estimula la producción de citocinas, como la interleucina 8 (IL-8) o las proteínas inflamatorias del macrófago  $\alpha$  y  $\beta$  (MIP- $\alpha$  y  $\beta$ ) y proteína quimiotáctica del macrófago-1 (MCP-1), que a su vez inducen migración de neutrófilos, células NK y monocitos, respectivamente (Bovis, 2003; Liese, 2008). Al parecer las leishmanias, resultan beneficiadas al ser fagocitadas por los neutrófilos, porque escapan de los macrófagos y sobreviven más tiempo, inhibiendo las caspasa-3 conocida como inductora de apoptosis (Tacchini, 2000). Los neutrófilos antes de llegar a la apoptosis producen quimiocinas MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  y reclutan monocitos y macrófagos al sitio de la infección (Chertov, 2000).

Los macrófagos fagocitan los PMNs infectados identificando fosfatidil-serina en la superficie de las células apoptóticas. Este lípido normalmente se encuentra sólo en la cara interna de la membrana plasmática, pero en las células apoptóticas se redistribuye rápidamente hacia la superficie externa, donde puede ser reconocido por los receptores específicos de los fagocitos macrófagos (Janeway, 2003). Los neutrófilos activan a los linfocitos T vírgenes para que expresen CD28, ésta familia es miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, cuyo ligando son

moléculas coestimuladoras como B7-1 y B7-2 (CD80/CD86) y su función es la señalización a través de la cinasa P13, liberando segundas señales para activación de los linfocitos vírgenes e inducir la producción de  $\text{INF}$  factores quimiotácticos de células T.

Una vez que las células llegan al sitio de infección y entran en contacto con los parásitos, se inicia una lucha que puede derivar o no en el control de la infección. La leishmania es un parásito intracelular, por lo tanto los eosinófilos, monocitos, neutrófilos y mastocitos son capaces de fagocitar y albergar parásitos de leishmania, así como las células dendríticas o de Langerhans. No sólo es importante que estas células puedan tener parásitos en su interior, sino también con qué facilidad logran infectarse. Para el establecimiento de una respuesta inmune protectora se requiere que las células de la respuesta innata presenten antígenos parasitarios a los linfocitos T, para producir T CD4 y la activación de macrófagos para el control eficiente de los parásitos. Células como los macrófagos, los linfocitos B y las células dendríticas sirven como presentadoras de antígenos (CPA) de leishmania. Sin embargo, el parásito logra interferir con el funcionamiento de macrófago, y su capacidad presentadora se ve reducida (Mullin, 2001). Una de las moléculas que permite la interacción entre la célula presentadora y el linfocito es el complejo de histocompatibilidad (MHC) que, presenta una mayor expresión, aparición y disponibilidad o una mayor degradación (De Souza, 2003). La presentación de antígenos necesita también de la participación de moléculas coestimulantes, entre ellas, CD40, CD80 (B71), y CD86 (B72).

El promastigote de *Leishmania* se une a la superficie del macrófago por receptores del complemento 1 y 3 (CR1, CR3 y C3b) antes de ser internalizados. El CR1 del macrófago constituye el mayor ligando del promastigote maduro (Da Silva, 1998). Las integrinas de los macrófagos, sobre todo Mac-1 (CD11b CD18 o receptor carroñero, también se une a los microorganismos para facilitar su fagocitosis. Los receptores de opsoninas favorecen la fagocitosis de los microorganismos recubiertos de diferentes proteínas. El proceso de recubrir un microbio para convertirlo en objetivo de su fagocitosis se denomina opsonización y las sustancias que recubren los microorganismos se llaman opsoninas. Estas sustancias incluyen anticuerpos, proteínas del complemento y lecitinas. Además de la fagocitosis, los macrófagos producen tóxicos, leishmanicidas, como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) y el óxido nítrico (NO) (Serarslan, 2005), que son directamente tóxicos para el microorganismo. Los macrófagos al ser activados producen citocinas como: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-18, IL-12 e IFN- $\gamma$  (Kim, 2000). El CD40 presente en la superficie de los macrófagos activa dos interactúan con el ligando del CD40L presente en los linfocitos T activados y provoca producción de IL-12 por los macrófagos que a su vez actúan sobre las células T para inducir la producción de IFN- $\gamma$ , que es leishmanicida (Awasthi, 2003). Los parásitos sobreviven y persisten dentro de los macrófagos, evadiendo el sistema inmunológico del huésped para su propio beneficio, impidiendo que los macrófagos presenten a través del MHC clase II (Antoine, 1999), llevando a las células a disminuir la producción de IFN- $\gamma$  y células Th1, lo que a su vez conduce a la progresión de la enfermedad.

En ratones infectados, se ha encontrado, una mayor cantidad de parásitos cerca de los gránulos de eosinófilos y una relación directa entre la presencia de eosinófilos y la ausencia de amastigotes en la lesión. Oliveira en el 2004, encontró que ratones cuyos eosinófilos eran el 50% de las células circulantes, al ser infectados, no desarrollaron sintomatología y albergaron menos parásitos, lo que apoya el papel benéfico de los eosinófilos durante la infección. Apoyando otra hipótesis, se encontró que había relación entre la presencia de eosinófilos y los cambios necróticos encontrados en hámsteres infectados con *L. mexicana* (Pereira, 2002).

## **II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria endémica, mutilante y discapacitante, que afecta a gran parte de la población disminuyendo la calidad de vida de quien la padece. Hay pocos fármacos para ser utilizados en su tratamiento, de costo elevado, bastante tóxicos, poco efectivos y de baja capacidad para erradicar la parasitosis, por eso la necesidad de probar un medicamento que cure la enfermedad evitando secuelas posteriores y mejorando la calidad de vida, contribuyendo a la recuperación de su salud, de la economía familiar y social y disminuyendo los gastos que en materia de salud se distribuyen para este fin.

Así mismo, la acción tóxica directa de un compuesto sobre el parásito leishmania, puede no tener significado en un organismo infectado, en donde el huésped participa absorbiendo el compuesto, metabolizándolo y proporcionando rutas de

escape farmacológico o mecanismos de resistencia, por ello es importante determinar las características de administración, así como probar su efecto en un modelo animal infectado, en este caso el ratón, ya que semeja la infección en el humano, es de fácil manejo y de bajo costo.

### **III HIPÓTESIS**

El compuesto HA2 no reduce las lesiones de leishmaniasis cutánea diseminada experimental en el ratón BALB/c

### **IV OBJETIVOS**

#### **4.1 GENERAL**

Evaluar el efecto terapéutico del compuesto HA2 (triaminoquinazolina con ferroceno) en las lesiones de leishmaniasis cutánea diseminada en el ratón BALB/c.

#### **4.2 ESPECÍFICOS**

Comparar el efecto que el compuesto HA2 produce en las lesiones de leishmaniasis cutánea, con el efecto producido con metilglucantime e hidroxiurea.

Determinar la vía de administración del fármaco HA2

### **V DISEÑO METODOLÓGICO**

#### **5.1 TIPO DE ESTUDIO**

Experimental

## 5.2 TIPO DE DISEÑO

Fase I - Preclínico

## 5.3 CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO

Prospectivo

## 5.4 POBLACIÓN

Ratones singénicos BALB/c con leishmaniasis cutánea diseminada tipo experimental.

## 5.5 TAMAÑO DE MUESTRA

Método de muestreo y tamaño de la muestra no aplica, ya que se trata de un estudio experimental.

## 5.6 CRITERIOS DE INCLUSIÓN, NO INCLUSIÓN, EXCLUSIÓN Y DE ELIMINACIÓN

No aplica, en virtud de que no se muestrea a una población.

## 5.7. DEFINICIÓN DE VARIABLES

### 5.7.1 VARIABLE INDEPENDIENTE:

Efecto del compuesto HA2 (Triaminoquinazolina con ferroceno en las lesiones de leishmaniasis cutánea diseminada experimental, en el ratón BALB/c.

### 5.7.2 VARIABLE DEPENDIENTE:

Ratones con leishmaniasis cutánea diseminada experimental.

### 5.8 MATERIAL

Material de Laboratorio: reactivos, disolvente, material de vidrio, placas de 24 pozos, unidades de filtración para medios de cultivo, cámaras para lectura del contador de células, reactivos para tinción vital fluorescente de parásitos, medios de cultivo, pipetas, cajas de cultivo.

Ratones BALB/c, alimento para ratones, jaulas con cubierta de aislamiento, bebederos. Medicamentos: hidroxurea, glucantime y el medicamento de prueba, HA2.

Personal capacitado para realizar los estudios.

### 5.9 METODOLOGÍA

El estudio se realizó de el laboratorio de Infectología, cuarto piso, y en el Bioterio, del INPer, en un período comprendido entre mayo de 2009 a abril del 2011.

#### **Cultivo e inoculación de *leishmania mexicana*.**

Se cultivaron los parásitos en cajas de 25 cm<sup>2</sup> con un millón de parásitos por mililitro de *Leishmania mexicana* MNY/BZ/62/M379, se siguió su crecimiento durante una semana con observación diaria. Comprobando la viabilidad celular por el movimiento de los microorganismos.

Se contó la carga parasitaria en el microscopio óptico, y se inoculó  $1 \times 10^6$  parásitos de *Leishmania mexicana*, en ratones BALB/c, de aproximadamente 4 a 8 semanas de vida y con un peso de 20 a 25 gramos.

**Comprobación de la infección.** A los 15 días presentaban edema en el cojinete plantar, donde se habían inoculado las leishmanias. A los 4 meses presentaban lesiones en piel, acompañada de pérdida del pelo y costras mielicéricas. Se separaron por grupos. Se llevó a cabo el experimento administrándoseles el compuesto HA2 y los medicamentos ya existentes en el mercado, como Hidroxiurea y Glucantime para comparar el efecto del medicamento sobre las lesiones en piel.

### Experimento 1

Primero. Se realizó un estudio para evaluar el efecto del medicamento HA2 por vía oral, en dosis de 0.5 mg/mL por tres días (72 horas). Se les dio a beber el compuesto a seis ratones (6) con múltiples lesiones en piel y cola. El primer día ingirieron 26 mL, el segundo 50 mL, y el tercer día 30 mL (106 mL en total).

Tabla II  
Afección de los ratones infectados y posteriormente tratados con el compuesto HA2

Medicamento HA2 1 mg/mL	Diseminación # de lesiones	Lesión en cojinete plantar	Edema del cojinete plantar	Lesión en cola	Alopecia	Pelo hirsuto	Costras mielicéricas
Ratón 1	5	++	+	+++	+++	-	+
Ratón 2	4	++	+	++	++	-	+++
Ratón 3	3	-	-	+++	+++	-	++
Ratón 4	4	-	-	+++	++	-	+++
Ratón 5	4	-	-	++	+++	-	++
Ratón 6	5	-	-	+++	+	-	+++

+ Leve  
++ Moderada  
+++ Severa  
- No hay

Segundo. Se realizó un estudio para ver el efecto que el compuesto de prueba tenía en un ratón con múltiples lesiones en piel, tratado previamente con 20 mg de hidroxiurea (y en quién las lesiones no habían curado). Se le administró HA2

por tres días ingiriendo un total de 35 mililitros del fármaco. Un mes después se administró nuevamente el medicamento, a la misma dosis y el mismo tiempo de aplicación.

Tabla III  
Lesiones de ratón previamente tratado con 20 mg de Hidroxiurea

Medicamento HA2 1 mg/mL	Número de lesiones en el cuerpo	Lesión en cola	Pérdida de pelo	Costras mielicéricas
Ratón 1	5	=	+++	+++

+ Leve  
++ Moderada  
+++ Severa  
- No hay

## Experimento 2

Se realizó otro estudio para conocer el efecto del medicamento de prueba comparado con Hidroxiurea y Glucantime, que son los medicamentos de primera elección en leishmaniasis cutánea diseminada en humanos. Se evaluó el número de lesiones en el cuerpo, si tenían edema y/o lesión en el cojinete plantar donde había sido inoculada la leishmania, lesión en la cola, pérdida de pelo (alopecia) o pelo escaso y pequeño y costras mielicéricas.

1. El grupo A, fue el grupo control, seis (6) ratones a quienes no se les administró medicamento.
2. El grupo B, seis (6) ratones a quienes se le administró HA2 (disuelto en etanol) en dosis de 1 mg/mL por 3 días.
3. El grupo C, seis ratones (6) a quienes se le administró 1 mg/mL por 15 días de Hidroxiurea.
4. El grupo D, seis ratones (6) a quienes se le administró 100µ g/mL de Glucantime por vía intramuscular (IM) dosis única.

Tabla IV

## Grupo A Control (Sin medicamento)

Grupo A Control Sin medicamento	Diseminación # de lesiones	Lesión en cojinete plantar	Edema del cojinete plantar	Lesión en cola	Alopecia	Pelo hirsuto	Costras miceléricas
Ratón A1	5	+	-	++	++	++	++
Ratón A2	4	Tumor en pata derecha	++	++	++	+++	++
Ratón A3	3	+	-	++	++	+++	++
Ratón A4	3	++	-	++	++	-	++
Ratón A5	4	+	-	++	++	-	++
Ratón A6	2	+	-	++	++	-	++

+ Leve  
++ Moderada  
+++ Severa  
- No hay

Tabla V

## Grupo B Lesiones de los ratones que posteriormente fueron tratados con el compuesto HA2

Grupo B HA2 1mg/mL VO	Diseminación # de lesiones	Lesión en cojinete plantar	Edema del cojinete plantar	Lesión en cola	Alopecia	Pelo hirsuto	Costras miceléricas
Ratón B1	3	+	+	+++	+++	-	+++
Ratón B2	3	+++	++	++	+++	+++	+++
Ratón B3	2	+	+	++	+++	+++	+++
Ratón B4	4	+	+	++	+++	+++	+++
Ratón B5	4	++	-	++	+++	+	+++
Ratón B6	5	++	+	++	++	-	+++

+ Leve  
++ Moderada  
+++ Severa  
- No hay

Tabla VI

## Grupo C Lesiones de los ratones que posteriormente fueron tratado con Hidroxiurea

Grupo C HU 1 mg/mL VO	Diseminación # de lesiones	Lesión en cojinete plantar	Edema del cojinete plantar	Lesión en cola	Alopecia	Pelo hirsuto	Costras miceléricas
Ratón C1	3	++	+++	++	+++	-	+++
Ratón C2	3	+	++	++	++	-	++
Ratón C3	4	++	+	++	+++	-	+++
Ratón C4	5	++	+	++	++	-	++
Ratón C5	3	++	+	++	+++	-	++
Ratón C6	2	++	+	+++	++	-	+++

+ Leve  
++ Moderada  
+++ Severa  
- No hay

Tabla VII  
Grupo D Lesiones de los ratones que posteriormente fueron tratados con Glucantime

Grupo D Glucantime 100 mg/mL IM	Diseminación # de lesiones	Lesión en cojinete plantar	Edema del cojinete plantar	Lesión en cola	Alopecia	Pelo hirsuto	Costras mielicéricas
Ratón D1	5	+	+	+	++	+	+++
Ratón D2	4	+	+	++	+++	++	+
Ratón D3	3	+	+	++	+++	++	+++
Ratón D4	3	+	+	++	++	++	+
Ratón D5	3	+	+	++	+	++	++
Ratón D6	3	+	+	+++	+	++	-

+ Leve  
++ Moderado

+++ Severo  
- Sin lesión

### Experimento 3

Grupo E Se realizó otro estudio en cuatro ratones hembras (n=4) con lesiones diseminadas en piel, a dos se le administró el compuesto de prueba HA2 IM como dosis única de 1 mg/mL.

Y a otros dos, se les administró el compuesto por tres días.

Se tenían tres ratones como grupo control.

Tabla VIII  
Tipo de lesión en ratones hembras antes de la administración del compuesto HA2

Grupo E HA2 1 mg/mL IM	Diseminación # de lesiones	Lesión en cojinete plantar	Edema del cojinete plantar	Lesión en cola	Alopecia	Pelo hirsuto	Costras mielicéricas
Ratón E1	3	+	-	+	++	+	+++
Ratón E2	4	+	-	+	+	+	+
Ratón E3	3	-	-	++	++	-	+
Ratón E4	4	-	-	++	+	-	+

+ Leve  
++ Moderada

+++ Severa  
- No hay

## Experimento 4

Grupo F Se realizó otro estudio en ratones machos (n=5) infectados con lesiones diseminadas en piel (inoculados 10 meses antes) a quienes se les administro el medicamento de prueba HA2 en el agua de beber, por tres días: ingirieron 50 mL el primer día, 26 el segundo día y 20 mL el tercer día, sumando un total de 96 mL, a dosis de 2 mg/mL y también se aplicó el compuesto intralesional, untado con gel (5 mL de gel para ultrasonido).

Catorce días después se le administra nuevamente el medicamento por vía oral y tópica.

Tabla IX  
Grupo F Lesiones de ratones machos infectados

Grupo F HA2 1 mg/mL VO + Tópico	Diseminación # de lesiones	Lesión en cojinete plantar	Edema del cojinete plantar	Lesión en cola	Alopecia	Pelo hirsuto	Costras mielicéricas
Ratón F1	4	++	+	++	++	+	+++
Ratón F2	3	++	+	+++	+++	+	+++
Ratón F3	4	++	+	+	+++	+	+++
Ratón F4	5	+	+	++	+	+	++
Ratón F5	3	+	+	++	+	+	+

+ Leve  
++ Moderada

+++ Severa  
- No hay

## Experimento 5

Se realizó otro estudio para comparar el efecto del compuesto HA2 con diferentes vehículos y mezclas. HA2 (compuesto hidrosoluble), H2C (compuesto disuelto en ciclodextrina), HA2+ H2C (mezcla de ambos) y el grupo control.

## VI RESULTADOS

**Plan de análisis.** El análisis se realizó con un programa estadístico Microsoft Office Excel 2007 para Windows 2007. En todos los análisis se utilizó un intervalo de confianza al 95% y una probabilidad de  $p \leq 0.05$ .

En el primer experimento, se realizó una  $X^2$  (chi cuadrada). Variable cualitativa nominal.

En el segundo, una T de Wilcoxon (Variable cualitativa nominal, dos grupos relacionados, antes y después).

En el tercero, cuarto y quinto una  $X^2$  (chi cuadrada). Variable cualitativa nominal.

### Experimento 1

La acción sobre la piel del ratón es evidente, las lesiones desaparecieron al 4to día. A los 15 días continuaron sin lesiones, ganaron un poco de peso. Están reactivos, sin alteraciones en el comportamiento y sin sangrado en las evacuaciones. Siete meses después continúan sin lesiones.

Tabla X  
Efecto de las lesiones cutáneas con el compuesto HA2

Medicamento HA2 1 mg/mL	Diseminación # de lesiones	Lesión en cojinete plantar	Edema del cojinete plantar	Lesión en cola	Alopecia	Pelo hirsuto	Costras mielicéricas
Ratón 1	-	+	-	-	-	-	-
Ratón 2	-	+	-	+	-	-	-
Ratón 3	-	-	-	-	-	-	-
Ratón 4	-	-	-	+	-	-	-
Ratón 5	-	-	-	+	+++	-	-
Ratón 6	-	-	-	-	-	-	-

+ Leve  
++ Moderada  
+++ Severa  
- No hay

El ratón tratado previamente con hidroxurea (20 mg) que no había curado y que presentaba múltiples lesiones en piel, se le administro el fármaco HA2, tomó 35 mL en 72 horas, mostrando en 7 días disminución de 70% de su volumen total, y algunas lesiones en espalda, por lo que se le administró el fármaco nuevamente por tres días en dosis de 20 mL, 22mL, y 47.5 mL (en total 89.5 mL) mostrando remisión de las lesiones en un 100%. Se mantuvo así y falleció un año después del tratamiento, en total vivió tres años, lo que no hubiera sobrevivido sin tratamiento. Tenía una pata un poco inflamada. Su estado de salud era bueno y presentaba algunas costras melicéricas en la espalda, no investigamos el origen.

## Experimento 2

Fallecieron dos ratones del grupo control, al mes de haber iniciado el experimento y a los 3 y 4 meses después de haber sido inoculados.

Tabla XI

Grupo A. Ratones controles.

Medicamento HA2 1 mg/mL	Diseminación # de lesiones	Lesión en cojinete plantar	Edema del cojinete plantar	Lesión en cola	Alopecia	Pelo hirsuto	Costras melicéricas
Ratón 1	3	+	-	+++	+++	-	+++
Ratón 2	-	Tumor en pata derecha	++	++	+++	+++	+++
Ratón 3	5 Oreja derecha prurito	+	-	+++	+++	+++	+++
Ratón 4	5	+++	-	+++	++	+++	+++

+ leve  
 ++ Moderada  
 +++ Severa  
 +++++ Muy severa  
 - No hay

Tabla XII

Grupo B. Se les administró HA2 en dosis de 1 mg/mL por 3 días

GRUPO B HA2 1mg/mL	Diseminación # de lesiones	Lesión en cojinete plantar	Edema del cojinete plantar	Lesión en cola	Alopecia	Pelo hirsuto	Costras mielicéricas
Ratón B1	-	+	-	-	Base de cola	-	-
Ratón B2	-	I+++ Pérdida de un orjejo	++	++	Base de cola	+++	+++
Ratón B3	+++++ Oreja derecha prurito	Izquierdo	-	++	+	+++	+++
Ratón B4	+++ tronco	Izquierdo Pérdida de 2 orjejos	-	+	-	+++	-
Ratón B5	+++++	Izquierdo	-	+	-	+	+++
Ratón B6	-	-	+	-	+	-	+

+ Leve  
++ Moderada  
+++ Severa  
+++++ Muy severa  
- No hay

Los ratones del grupo B, a quienes se les administró el compuesto HA2, presentaron al principio pérdida de la movilidad de las extremidades en donde se les había aplicado el medicamento. Pero se observó remisión de las lesiones en un 33% al mes y medio, y a los dos meses presentaban remisión del 90% e incluso pelo en esa parte de piel.

Tabla XIII

Grupo C Hidroxiurea a dosis de 1 mg/mL vía oral por 3 días

GRUPO C Hidroxiurea a 1 mg/mL	Diseminación # de lesiones	Lesión en cojinete plantar	Edema del cojinete plantar	Lesión de cola	Alopecia	Pelo hirsuto	Costras mielicéricas
Ratón C1	-	Izquierdo Ortejos encorvados	+++	+	Base de cola	+	-
Ratón C2	-	Izquierdo pérdida de un orjejo	++	-	Inicio de cola	+	-
Ratón C3	Dorso Hipogonadismo	Izquierdo	-	+++	+++ dorso	+++	-
Ratón C4	-	Izquierdo	-	-	-	-	+++
Ratón C5	+++	Izquierdo	-	++	+++	++	+++

+ Leve  
++ Moderada  
+++ Severa  
- No hay

Falleció un ratón, de los tratados con hidroxiurea, las lesiones disminuyeron en un 50%, pero posteriormente volvieron a reactivarse, a los 7 meses estaban nuevamente con múltiples lesiones.

Tabla XIV  
Grupo D Glucantime 0.4 mg/mL vía IM dosis única

GRUPO D Glucantime	Diseminación # de lesiones	Lesión en cojinete plantar	Edema del cojinete plantar	Lesión de cola	Alopecia	Pelo hirsuto	Costras mielécéricas
Ratón D1	-	Izquierdo	+++	+	-	+++	+++
Ratón D2	-	Izquierdo	++	+	+++	+++	++
Ratón D3	Ojo derecho Oreja derecha	Izquierdo	-	-	-	+++	-
Ratón D4	-	Izquierdo	-	-	-	+++	-
Ratón D5	-	Izquierdo pérdida de 4 orjeos	-	-	-	+	-

+ Leve  
++ Moderada  
+++ Severa  
- No hay

Uno de los ratones del grupo D, tratados con Glucantime, murió; los otros presentaron remisión en un 70% de las lesiones.

### Experimento 3

Tabla XV  
Grupo E Los ratones hembras tratadas con el compuesto HA2 a dosis de 1 mg/ mL

GRUPO E Compuesto HA2	Diseminación # de lesiones	Lesión en cojinete plantar	Edema del cojinete plantar	Lesión en cola	Alopecia	Pelo hirsuto	Costras mielécéricas
Ratón E1	-	+	-	-	-	+	++
Ratón E2	-	+	-	-	-	+	-
Ratón E3	-	-	-	-	-	-	-
Ratón E4	-	-	-	-	-	-	-

+ Leve  
++ Moderada  
+++ Severa  
- No hay

Las lesiones disminuyeron casi por completo, pelo hirsuto en cabeza, aumento de peso y movilidad.

Uno de los ratones del grupo control falleció, nueve días después de iniciarse el experimento.

Otro perdió la extremidad completa del lado de la aplicación del vehículo.

Los ratones que recibieron 1 mg/mL de medicamento como dosis única, tuvieron pérdida de la movilidad de la extremidad en donde se aplicó el medicamento.

Uno de ellos, presentó disminución de la lesión casi por completo.

Los ratones que recibieron tres días de aplicación del medicamento, empeoraron sus lesiones y se necrosó la extremidad en donde se aplicó el medicamento. Pero continuaron vivos.

#### Experimento 4

La acción sobre la piel del ratón es evidente, las lesiones desaparecieron desde el 4to día, a los 15 días persisten ausentes las lesiones, y empieza a ganar peso, o verse “inflamado”. Le crece el pelo y se ve brillante, como si nunca se le hubiese caído.

Tabla XVI

Grupo F Efecto del compuesto HA2 en dosis de VO y tópica

Grupo F HA2 1 mg/mL VO + Tópico	Diseminación # de lesiones	Lesión en cojinete plantar	Edema del cojinete plantar	Lesión en cola	Alopecia	Pelo hirsuto	Costras mielicéricas
Ratón F1	1	-	+	++	+	+	+
Ratón F2	1	-	+	-	+	+	-
Ratón F3	-	-	+	+	-	+	-
Ratón F4	-	-	+	++	-	+	+
Ratón F5	-	-	+	++	-	+	+

+ Leve  
++ Moderada

+++ Severa  
- No hay

## **Experimento 5**

Las lesiones disminuyeron casi por completo con el medicamento HA2 y casi a la mitad con la combinación de las dos mezclas.

HA2 + H2C (diaminoquinazolina con ferroceno más ciclodextrina).

## **VII DISCUSIÓN**

La leishmaniasis es una de las enfermedades parasitarias más devastadoras que afecta al hombre y a los animales domésticos. A pesar de su grave impacto, todavía no se dispone de un medicamento capaz de erradicarla, ya que los existentes, son altamente tóxicos y han dejado de ser efectivos debido al incremento de resistencia al parásito y a las variaciones farmacocinéticas en la interacción fármaco-respuesta inmune del paciente, aunque la respuesta local y sistémica dependerá de la infectividad del parásito, su patogenicidad y su virulencia, para contrarrestar dichas defensas, eludiéndolas o anulándolas, al igual que en el modelo murino (Bolaji, 2008).

Cabe destacar que tanto el sistema inmunológico de los ratones, como el sistema humano presentan diferencias y son difíciles de comparar. En el estudio se inocularon los parásitos y en los humanos, el mosquito vector pica provocando reacciones de defensa o hipersensibilidad en algunas personas, lo que ocasiona que el cuerpo desencadene una serie mecanismos para destruir al parásito, que quizás no ocurra en forma tan drástica cuando se inocula, al igual que la piel del ratón y del humano son muy diferentes, en el sistema murino las células

dendríticas se crean en la médula ósea o el bazo, mientras que las células dendríticas de humanos se generan casi exclusivamente en la sangre periférica. Además existen muchos anticuerpos en el sistema humano que no existen en el murino y viceversa.

De igual forma el peso de un adulto promedio dista mucho del peso del ratón, y extrapolar la cantidad de medicamento es difícil ya que las dosis son mínimas.

De los 60 ratones estudiados, 20 ratones presentaron lesión única y los 40 restantes múltiples lesiones, similar a lo que ocurre en humanos, según lo citado en la literatura revisada, (Gamier 2002; Hepburn, 2003).

La hidroxiurea remitió las lesiones “in vivo” a la mitad, similar a lo reportado en la literatura para los amastigotes in vitro (Martínez, 2008).

Se administró la N-metil-glucamina por vía intramuscular, pero podría probarse por vía oral, diluida con beta.ciclodextrina, como los estudios reportados en la literatura (Demicheli, 2004).

En el estudio se probó un medicamento nuevo derivado del ferroceno encontrándose remisión de las lesiones cutáneas y un 100% de supervivencia de los animales experimentales, lo que nos ha alentado a pensar que se tiene la cura para esta enfermedad, sin embargo aún hay que hacer varias pruebas en otras especies animales para comprobar el efecto terapéutico del compuesto HA2 y con otros vehículos de aplicación, probando su absorción y el nivel celular en el cuál actúa el medicamento.

## VIII CONCLUSIONES

1. El medicamento HA2 remite significativamente las lesiones de leishmaniasis cutánea diseminada experimental en ratones singénicos BALB/c, por lo que se rechaza la hipótesis nula.
2. La vía de administración más efectiva es la oral por 15 días, a la dosis de 1mg/mL, hasta el momento, sólo se han usado dos dosis, 1 mg/mL, oral e IM
3. El tratamiento con el compuesto de prueba HA2 produce efectos significativamente mejores comparados con la hidroxiurea y el glucantime.
4. Las lesiones tratadas con hidroxiurea remitieron significativamente, pero posteriormente hubo rebote y las lesiones volvieron a salir.
5. Respecto al sexo, no hubo diferencias significativas, en el grado de curación de las lesiones.
6. El vehículo de dilución del compuesto HA2 que mostró mejor efecto sobre las lesiones de leishmaniasis cutánea experimental fue el etanol.
7. La aplicación intramuscular del compuesto HA2 ocasiona necrosis en el sitio de aplicación.
8. La administración oral y tópica del compuesto produce remisión significativamente mayor que con los otros compuestos.

## **IX RECOMENDACIONES**

1. Medir las lesiones con un vernier en dos de sus diámetros, sacar un promedio y multiplicarlo por pi ( $\pi=3.1416$ ) para conocer el diámetro de las lesiones y que los valores sean más significativos al compararlos con los obtenidos después del tratamiento.
2. Colocar a cada ratón en diferente jaula para poder cuantificar la cantidad de medicamento ingerido.
3. Realizar estudios para conocer a qué nivel celular, actúa el medicamento sobre el parásito.
4. Realizar estudios para conocer la biodisponibilidad del compuesto.
5. Invitar a la ciudadanía y a las personas que cuentan con los recursos para que en materia de investigación inviertan y se logre erradicar esta enfermedad, ya que los medicamentos actuales presentan varias dificultades: escasez y alto costo de las drogas, elevada toxicidad, diferencias en la respuesta individual, dependiendo de la especie de parásito involucrada y sobre todo del estado inmunológico del hospedero, que hay resistencia a los medicamentos y que el proceso de cicatrización es lento y hay cicatrices antiestéticas.
6. Fomentar el desarrollo de investigaciones para conocer más a fondo el comportamiento de la enfermedad en nuestro país.

## X REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A., Lichtman, A. (2004). Inmunología celular y molecular. Quinta edición. Aspectos inmunológicos de la leishmaniasis (pp.282-282). Madrid, España.: Elsevier.

Akilov, O., Khachemoune, Hasan, T. (2007). Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*, 46, 132-142.

Alavi, A. (2002). Evaluating the efficacy of allopurinol and meglumine antimoniate (Glucantime) in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Dermatol*, 41, 521-524.

Alexander, J. (2003). The interaction of Leishmania species with macrophages. *Advances in Parasitology*, 31, 175-253.

Alvar, J., Croft, S., Olliaro, P. (2006). Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol*, 61, 223-274.

Alvar, J., Yactayo, S., Bern, C. (2006). Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol*, 22, 552-557.

Allahverdiyev, A., Uzun, S., Bagirova, M., Durdu, M., Memisoglu, H. (2004). A sensitive new microculture Method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 70(3), 294-297.

Andersen, E., Cruz, M., Llanos, A. (2005). Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for Peruvian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 72, 133-7.

Andrade, F., Medina, S., Vargas, E. (2005). The histopathology of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania Mexicana* in the Yucatan peninsula, México. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, 47, 191-194.

Antoine, J., Prina, E., Jouanne, C., Bongrand, P. (1990). Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*- infected macrophages maintain an acid pH. *Infect Immun*, 58, 779-87.

Ashutosh, S., Goyal, N. (2007). Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*, *J Med Microbiol*, 56, 143-153.

Awasthi, A., Mathur, R., Khan A. (2003). CD40 signaling is impaired in L. major-infected macrophages and is rescued by a p38MAPK activator establishing a host-protective memory t cell response. *J Exp Med*, 197. 1037-43.

Baiocco, P., Colotti, G., Franceschini, S., Ilari, A. (2009). Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. *J Med Chem*, 52, 2603-2612.

Banoo, S., Bell, D., Bossuyt, P., Herring, A., Mabey, D., Poole, F., Smith, P., Sriram, N., et al. (2007). Evaluating diagnosis tests for infectious diseases: general principles. *Nat Rev Microbiol*, 5 (S), 17-27.

Bassano, S., Camargo, L. (2004). American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. *Rev Bras Epidemiol*, 7, 328-37.

Basselin, M., Barret, P. (2002). Resistance to pentamidina in *Leishmania Mexicana* involves exclusion of the drug from mitochondrion. *Antimicrob Agents Chemother*, 46, 3731-3738.

Bensoussan, E., Nasereddin, A., Jonas, F., Schnur, L., Jaffe, C. (2006). Comparisson of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol*, 44, 1435-1439.

Berman, J. (2005). Recent developments in leishmaniasis: epidemiology, diagnosis and treatment. *Curr Infect Dis Rep*, 7, 33-8.

Blum, J., Desjeux, P., Schwartz, E., Beck, B., Hatz, C. (2004). Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53, 158-166.

Boggild, A., Miranda, C., Espinosa, D., Arevalo, J., Martínez, D., et al. (2008). Optimization of Microculture and Evaluation of Miniculture for the Isolation of *Leishmania* Parasites from Cutaneous Lesions in Peru. *Am J Trop Med Hyg* 79(6), 847-852.

Bolaji, T., Buxbaum, L. (2008). Fc $\gamma$  RIII Mediates Inmunoglobulin G- Induced Interleukin-10 and Is Required for Chronic *Leishmania mexicana* Lesions. *Infection and Immunology*, 76(2), 623-631.

Bovis, L. (2003). *Leishmania* lipophosphoglycan reduces monocyte transendothelial migration: modulation of cell adhesion molecules, intercellular junctional proteins, and chemoattractans. *J Immunol*. 160, 1857-1865.

Bryceson, A. (2001). A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. *Trop Med Int Health*, 6, 928-934.

Buffet, P. (2007) *Leishmaniasis: Información para su control y tratamiento*. Instituto Pasteur, Paris.

Cáceres, G., Tapia, F. (1993). Inmunopatología de la lesion cutánea en la leishmaniasis cutánea americana. *Dermatología Venezolana*, 31, 28-30.

Calvopina, M., Gómez, E., Sindermann, H., Cooper, P., Hashiguchi, Y. (2006). Relapse of New World diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* after miltefosine treatment. *Am J Trop Med Hyg*, 75, 1074-1077.

Calza, L., D'Antuono, G., Marinacci, G., Manfredi, R., Colangeli, V., et al. (2004). Disseminated cutaneous leishmaniasis after visceral disease in a patient with AIDS. *J Am Acad Dermatol*, 50, 461-465.

Chertov, O., Yang, D., Howard, O., Oppenheim, J. (2000). Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunol Rev*, 177, 68-78.

Croft, S., Brun, R. (2003). In vitro and in vivo models for the identification and evaluation of drugs active against *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Trends Parasitol*, 19, 165-175.

Croft, S., Sundar, S., Fairlamb, A. (2006). Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev*, 19, 111-126.

Cruz, I., Nieto, J., Moreno, J., Cañavate, C., Desjeux, P., Alvar, J. (2006). *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res*, 123, 357-388.

Da Silva, R., Hall, B., Joiner, K. (1998). CR1, the C3b receptor, mediates binding of infective *Leishmania major* metacyclic promastigotes to human macrophages. *J Immunol*, 143, 617-22.

Davies, C., Kaye, P., Croft, S., Sundar, S. (2003). Leishmaniasis: new approaches to disease control. *British Medical Journal*, 326, 377-82.

Demicheli, C., Ochoa, R., Silva, J., De Melo, A. (2004). Oral delivery of meglumine antimoniate-beta-cyclodextrin complex for treatment of leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*, 48, 100-103.

De Paula, C., Sampaio, J., Cardoso, D. (2003). Estudio comparativo de la eficacia del isotionato de pentamidina administrada en tres dosis durante una semana y de N-metil-glucamina 20 mgSb /Kg/día durante 20 días para el tratamiento de leishmaniasis tegumentaria americana. *Rev Soc Bras Med Trop*, 36, 365-71.

De Souza, L., Lang, T., Prina, E. (2003). Intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes internalize and degrade MHC class II molecules of their host cells. *J Cell Sci*, 108, 3219-3231.

Del Rosal, T., Baquero, F., García, M.J. (2010). Leishmaniasis cutánea. *Rev Pediatr Aten Primaria*, 12 (46), 263-71.

Desjeux, P. (2001). Worldwide increasing risk for leishmaniasis. *Medical Microbiology and Immunology*, 190, 77-79.

Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 27, 305-318.

Epidemiología. (2007). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 24(6), semana 6.

Faber. W., Oskam, L., Van Gool, T., Kroon, N., Knecht-Junk, K. (2003). Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*, 49, 70-4.

Feagin, J. (2000). Mitochondrial genome diversity in parasites. *Int J Parasitol*, 30, 371-390.

Frezard, F., Demicheli, C., Ferreira, C., Costa, M. (2001). Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother*, 45, 913-916.

Frezard, F., Demicheli, C., Ribeiro, R. (2009). Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. *Molecules*, 14, 2317-2336.

Gamier, T., Croft, S. (2002). Tropical treatment for cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Investig Drugs*, 3, 538-544.

García, D. (2004). Leishmaniasis cutánea: estudio en el área sanitaria de Toledo. Tesis de doctorado, Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

Gómez C. J., Cervantes S.R. y Becker F.I. (2008). Observaciones sobre los efectos de inmunomodulación de *Leishmania major* en células del sistema inmune humano. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 39(2),16-21.

Gontijo, B., De Carvalho, M. (2003). Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Med Trop*, 36, 71-80.

González, U. (2002). Fluconazole for cutaneous leishmaniasis: looking for a better treatment. *Arch Dermatol*, 138, 1604-6.

Hashim, F. A., Ahmed, A. E., Hassan, M., et al (1995). Neurologic Changes in Viscera Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 52(2),149-154.

Hepburn, N. (2003). Cutaneous leishmaniasis: an overview. *J Postgrad Med*, 49, 50-54.

Hölscher, C. (2006). Impairment of alternative macrophage activation delays cutaneous leishmaniasis in nonhealing BALB/c mice. *J Immunol*, 176, 1115-1121.

Hotez, P., Remme, H., Buss, P., Alleyne, G., Morel, C. (2004). Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. *Clin Infect Dis*, 38, 871-878.

Jheman, Z., (2008). Leishmaniasis cutánea en el estado de Quintana Roo, México. *Dermatología Rev Mex*, 52(1), 3-9.

Killick, R. (1999). The biology and control of Phlebotomine Sand Flies. *Clin Dermatol*, 17, 279-89.

Kima, P., Constant, L., Hannum, M., Colmenares, K., Lee, A., et al (2000). Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*, 191, 1063-1068.

Krauth, R., Meiering, S., Schmidt, H. (2003). The parasite-specific trypanothione metabolism of trypanosome and leishmania. *Biol Chem* 384, 539-549.

Layegh, P., Yazdanpanah, M. (2007). Efficacy of Azithromycin versus Systemic Meglumine Antimoniate (Glucantime) in the treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 77(1), 99-101.

Leprohon, P., Legare, D., Girard, I., Papadopoulou, B., Oullette, M. (2006). Modulation of leishmania ABC protein gene expression throughout life stages and among drug-resistant parasites. *Eukaryot Cell*, 5, 1713-1725.

Liese, J., Schleicher, U., Bogdan, C. (2008). The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunology*, 213, 377-387.

Liñares G., Ravaschino, E., Rodríguez, J. (2006). Progress in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases. *Curr Med Chem*, 13, 335-360.

Llanos C.A., Echevarria J., Seas, C., Chang E., Cruz M., Álvarez, E., et al. (2007). Parenteral aminosidine is not effective for peruvian mucocutaneous Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 76(6), 1128-1131.

Mahajan, V., Sharma, N. (2007). Therapeutic options for cutaneous leishmaniasis. *J Dermatol Treat*, 18, 97-104.

Martínez H., Mancilla J., Quiñones L. and Galindo N. ((2008). Activity of hydroxyurea against *Leishmania mexicana*. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(10), 3642-3647.

Martínez. M., Espinoza, B. (2009). Importancia de las proteínas de superficie y secretadas en la capacidad infectiva de tres patógenos humanos. *El Residente*, 4(3), 92-96.

Mendoza, A., Luis, L., Fernández, O., Cupolillo, E., García, I. (2002). Molecular markers for species identification in the *Leishmania* subgenus *Viannia*. *Soc Med Hyg*, 96, 65-70.

Miranda, C., Llanos, A., Arevalo, I., Ward, B., Matlashewski, G. (2005). Randomized, double-blind clinical trial of topical imiquimod 5% with parenteral meglumine antimonate in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis*, 40, 1395-1403.

Missoni, E., Masala, G. (1993). Calor y leishmaniasis. Una revision de las implicaciones clínicas y biológicas. *Revista Peruana de Epidemiología*, 6(1), 27-32.

Molina R., Gradoni, L., Alvar, J. (2003). HIV and the transmission of *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol*, 97(Suppl. 2), 29-45.

Mullin, A., Foth, J., Ilgoutz, C., Callaghan, M., Zawadzki, L., McFadden, I., et al. (2001). Regulated degradation of an endoplasmic reticulum membrane protein in a tubular lysosome in *Leishmania Mexicana*. *Mol Biol Cell*, 12, 2364-2377.

Murray, H., Delph, Sh. (2000). Roles of Endogenous Gamma Interferon and Macrophage Microbicidal Mechanisms in Host Response to chemotherapy in Experimental Visceral leishmaniasis. *Infection and immunology*, 68(1), 288-293.

Murray, H., Berman, J., Davies, C., Saravia, N. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet*, 366, 1561-1577.

Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2002, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 21 de julio del 2003.

Oliveira, J., Melo, M., Gontijo, N. (2000). A sensitive method for assaying chemotaxic responses of *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol*, 96, 187-189.

Oliveira, S., Fonseca, S., Romao, P., Ferreira, S. (2004). Nitric oxide mediates the microbicidal activity of eosinophils. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 92 (suppl. 2), 233-235.

Olivier, M., Gregory, D, Forget, G. (2005). Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clinical Microbiology Review*, 18(2), 293-305.

Osorio, E., Robledo, S., Arango, G., Muskus, C. (2005). Leishmania: papel de la glicoproteína P en la medición de resistencia a medicamentos y estrategias de revisión. *Biomédica*, 25, 242-60.

Ouellette, M, Drummelsmith, J., Papadopoulou, B. (2004). Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat*, 7, 257-266.

Pereira, A., Pérez, M. (2010). Leishmaniosis. *Parasitología*. 1-10.

Ramos, C., Hernández, O., Sánchez, G., Monroy, A. (2000). Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* in a Mexican patient with human immunodeficiency virus infection. *Med Parasitol*, 95, 733-737.

REDVET (Revista Electrónica de Veterinaria, 2005). 6(8), 3-8.

Reithinger, R., Dujardin, J. (2007). Molecular Diagnosis of Leishmaniasis: Current Status and Future Applications. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(1), 21-25.

Reithinger, R., Dujardin J., Louzir H., Pirmez, C., et al (2007). Cutaneous Leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, 7, 581-96.

Ritter, U., Korner, H. (2002). Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*, 24, 295-301.

Rivas, L., Moreno, C., Alvar, J. (2004). Virulence and disease in leishmaniasis: what is relevant for the patient?. *Trends Parasitol*, 20, 297-301.

Russell, D., Zu, S., Chakraborty, P. (2003). Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania Mexicana*-infected macrophages. *J Cell Sci*, 103, 1193-1198.

Sadeghian, G., Momeni, A., Siadat, A., Usefi, P. (2006). Evaluation of leishmanin skin test and its relationship with the clinical form and duration of cutaneous leishmaniasis. *Dermatol Online J*, 12, 3.

Salaiza, S. N., Volkow P., Pérez T.R., Moll, H., Gillitzer, R., Pérez T. A., et al (1999). Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. *Tropical Medicine and International Health*, 4(12), 801-811.

- Sánchez, L., Sáenz, E., Pancorbo, J., Zegarra, R., Garcés, N., et al. (2004). Leishmaniasis. *Dermatol Peru*, 14, 82-98.
- Santos, D.O., Coutinho, C.E., Madeira, M.F., Bottino, C.G., Vieira, R.T., et al (2008). Leishmaniasis treatment-a challenge that remains: a review. *Parasitol Res*, 101, 1-10.
- Schonian, G., Nasereddin, N., Dinse, C., Schweynoch, C., Schallig, W., et al. (2003). PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diag Microbiol Dis*, 47, 349-358.
- Schriefer, A., Wilson, M., Carvalho, E. (2008). Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis*, 21(5), 483-488.
- Serarslan, G., Atik, E. (2005). Expression of inducible nitric oxide synthase in human cutaneous leishmaniasis. *Mol cell Biochem*, 280, 147-149.
- Serrano, M., Garcia, M. (2009). Amiodarone Destabilizes Intracellular Ca<sup>2+</sup> Homeostasis and Biosynthesis of Sterols in *Leishmania mexicana*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53, 1403-1410.
- Shao, J., Zhou, B., Chu, B., Yen, Y. (2006). Ribonucleotide reductase inhibitions and future drug design. *Curr. Cancer Drug Targets*, 6, 409-431.
- Silveira, F., Lainson, R., Corbett, C. (2004). Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99, 239-251.
- Singh, S., Sivakumar, R. (2004). Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother*, 10, 307-315.
- Solloa, M.E., Magaña. M.C. (2001). Leishmaniasis cutánea. Experiencia en el Hospital Central Militar. *Rev Sanid Milit*, 55(1), 10-14.
- Soto, J., Arana, B., Toledo, J., Rizzo, N., Vega, J., et al. (2004). Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, 38, 1266-1272.
- Soto, J., Toledo, J., Gutiérrez, P., Arboleda, M., Nicholls, R., et al. (2002). Treatment of cutaneous leishmaniasis with a topical antileishmanial drug (WR279396): phase 2 pilot study. *Am J Trop Med Hyg*, 66, 147-51.
- Sundar, S., Rai, M. (2002). Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis*, 15, 593-598.

Terabe, M., Kuramochi, T., Ito, M., Hatabu, T., Sanjoba, C., Chang, K., et al. (2004). CD4<sup>+</sup> cells are indispensable for ulcer development in murine cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*, 68, 4574-4577.

Uribarren Berrueta Teresa. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina, UNAM. [berrueta@servidor.unam.mx](mailto:berrueta@servidor.unam.mx)

Vargas, A., Canto, S., Centeno, D., Andrade, F. (1999). Response of cutaneous leishmaniasis (Chiclero s ulcer) to treatment with meglumine antimoniate in Southeast Mexico. *Am J Trop Med Hyg*, 960-963.

Vega, F. (2003). Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis*, 16, 91-101.

Velasco Castrejón, O. (1987). Las leishmaniasis en México. *Rev Latinoamer Microbiol*, 29, 119-26.

Vera, M., Galindo, F., Zambrano, P. (2005). Equipo de vigilancia y Control de Enfermedades Transmitidas por Vector. *Inf Quinc Epidemiol Nac*, 10, 35-9.

Weigle K., Labrada, L., Lozano, C., Santrich, C., Barker, D. (2002). PCR-based diagnosis of acute and chronic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia)*. *J Clin Microbiol*, 40, 601-606.

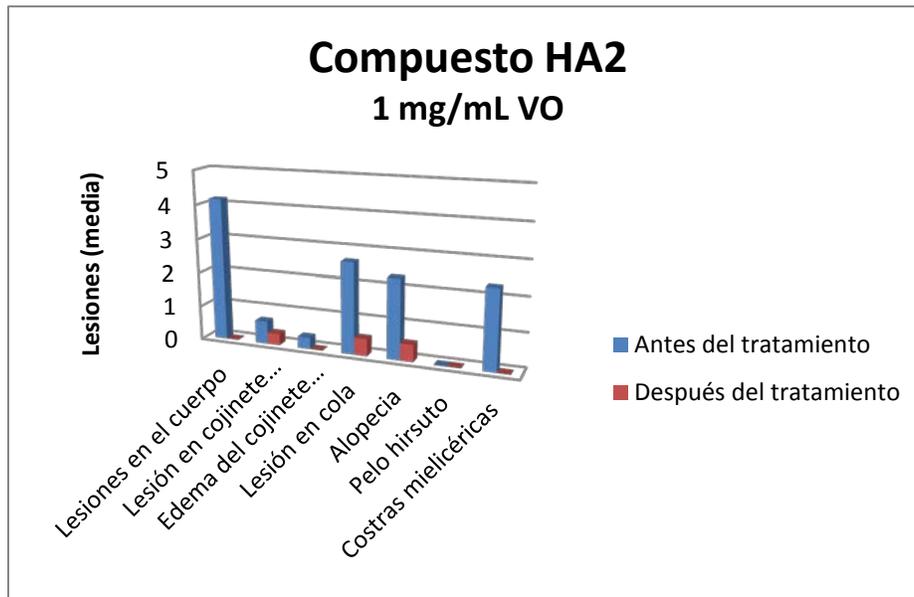
Wu, Y., Tibrewal, N., Birge, R. (2006). Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. *Trends Cell Biol*, 16, 189-197.

Xenón, M., Payares, G., De Lucca, M., Martínez, J. C., Mendoza, A., Benaim, G. (2009). Amiodarone and Miltefosine Act Synergistically against *leishmania mexicana* and Can Induce Parasitological Cure in a Murine Model of Cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), 5108-5113.

## XI ANEXOS

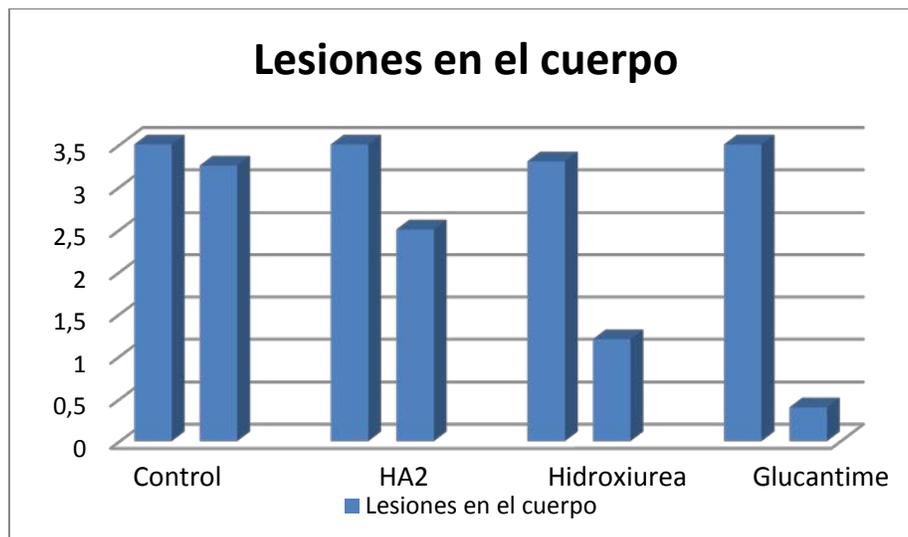
Gráfica I

**Experimento 1** Efecto del compuesto HA2 VO en dosis de 1mg/mL VO sobre las lesiones de *leishmania mexicana* en el ratón BALB/c



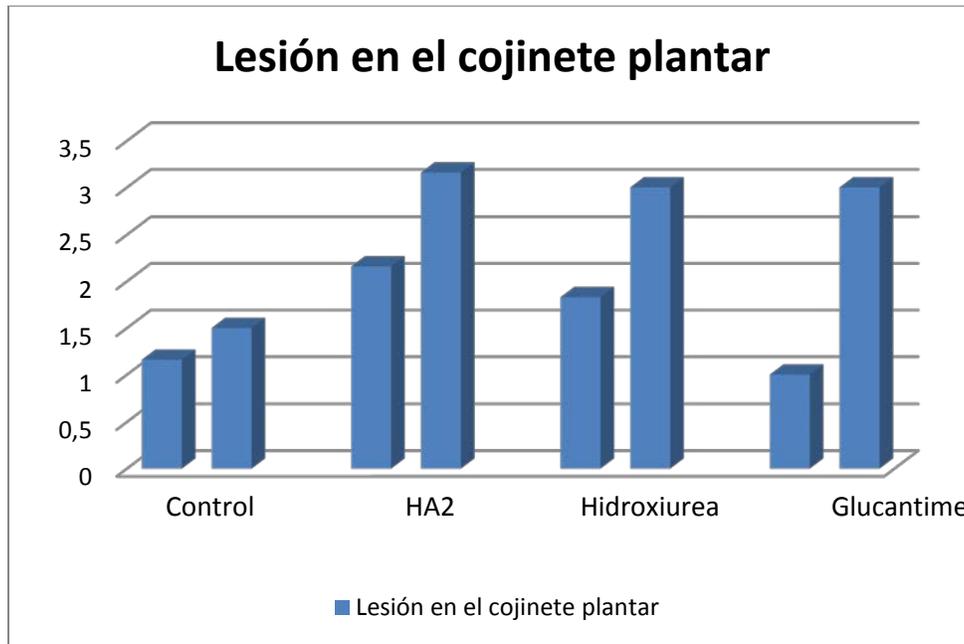
Gráfica II

**Experimento 2** Efecto del compuesto HA2, Hidroxiurea y Glucantime sobre las lesiones de leishmaniasis cutánea diseminada experimental



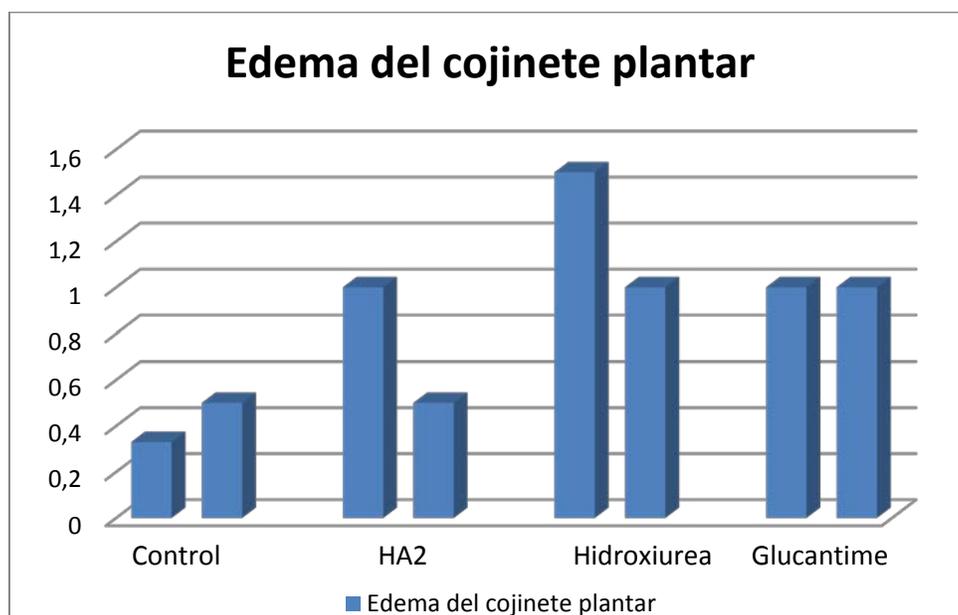
Gráfica III

**Experimento 2** Efecto de Hidroxiurea, Glucantime y el compuesto HA2 contra el grupo control



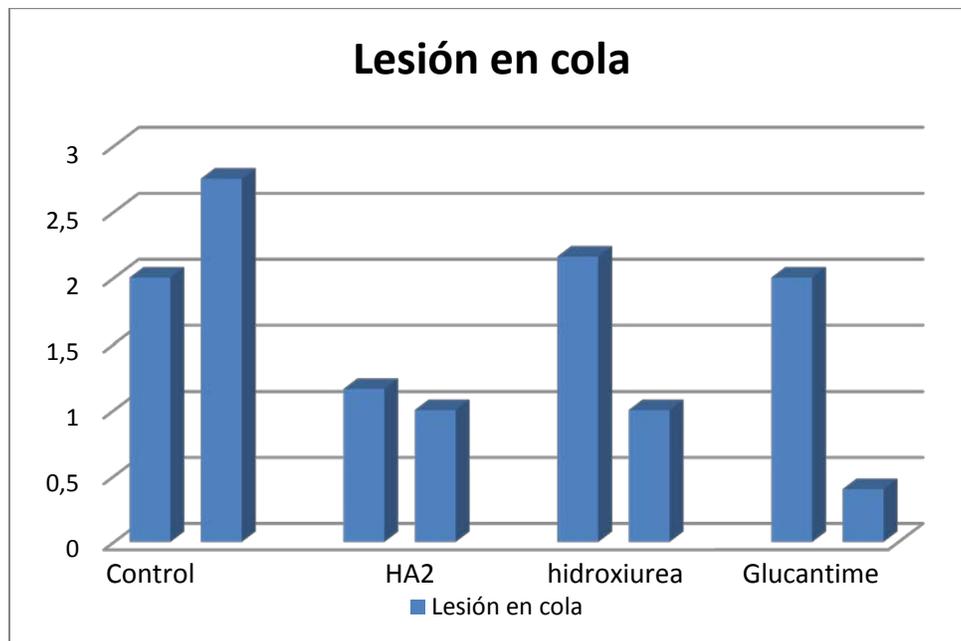
Gráfica IV

**Experimento 2** Efecto de Hidroxiurea, Glucantime y el compuesto HA2 sobre la lesión en el sitio de inoculación de la leishmania



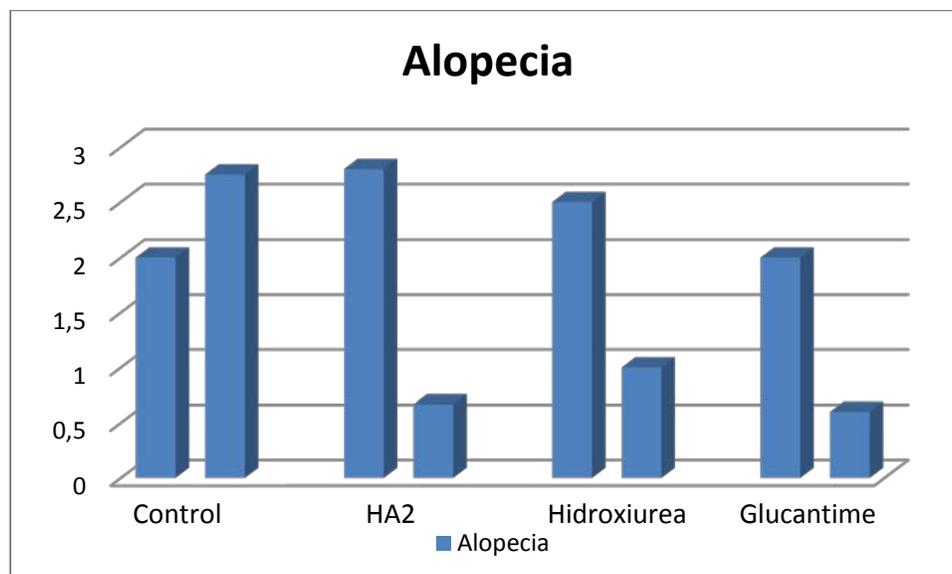
Gráfica V

**Experimento 2** Efecto de Hidroxiurea, Glucantime y el compuesto HA2 sobre las lesiones en cola del ratón BALB/c comparadas contra el grupo control



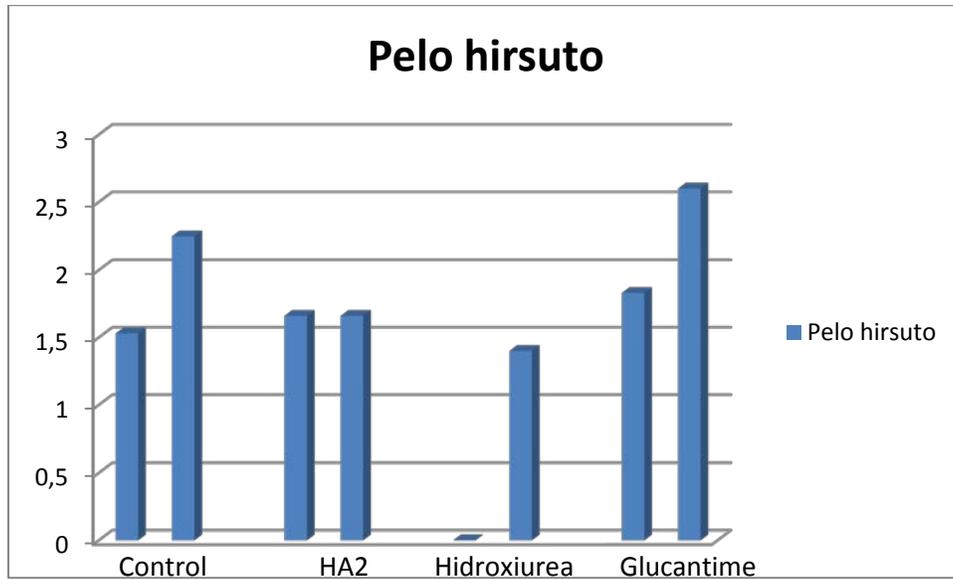
Gráfica VI

**Experimento 2** Efecto de Hidroxiurea, Glucantime y el compuesto de prueba HA2 sobre el grupo control



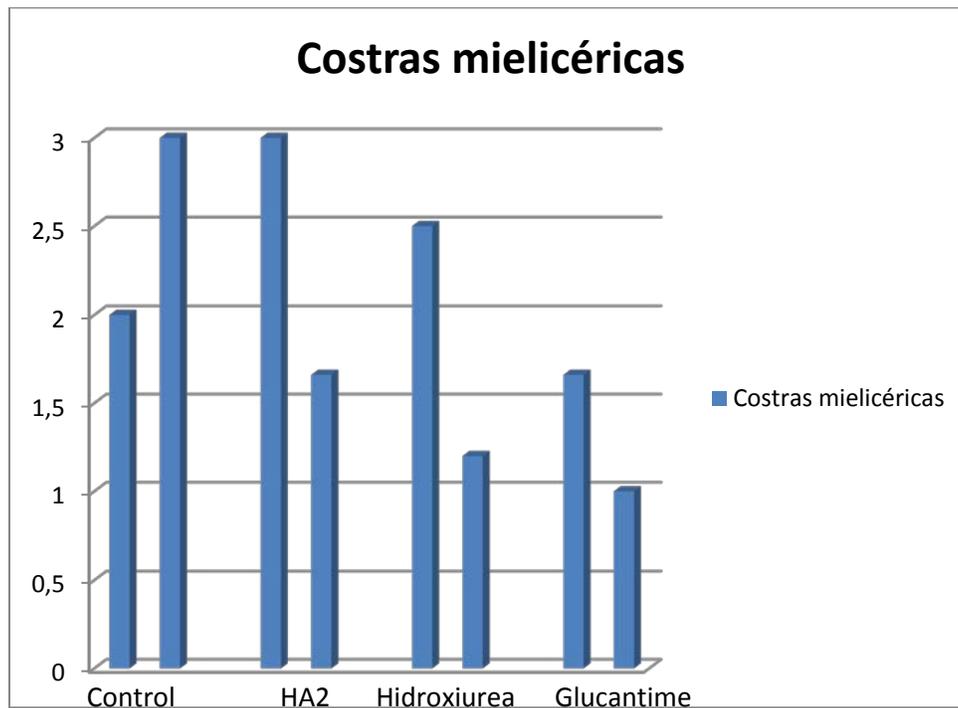
Gráfica VII

**Experimento 2** Efecto de Hidroxiurea, Glucantime y el compuesto HA2 comparadas con el grupo control



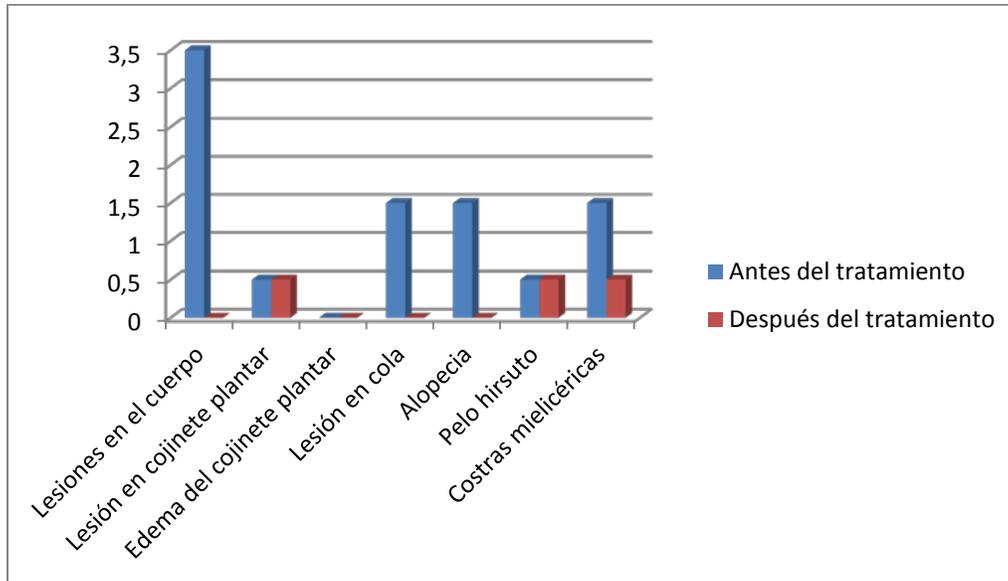
Gráfica VIII

**Experimento 2** Efecto de Hidroxiurea, Glucantime y el compuesto HA2 contra el grupo control



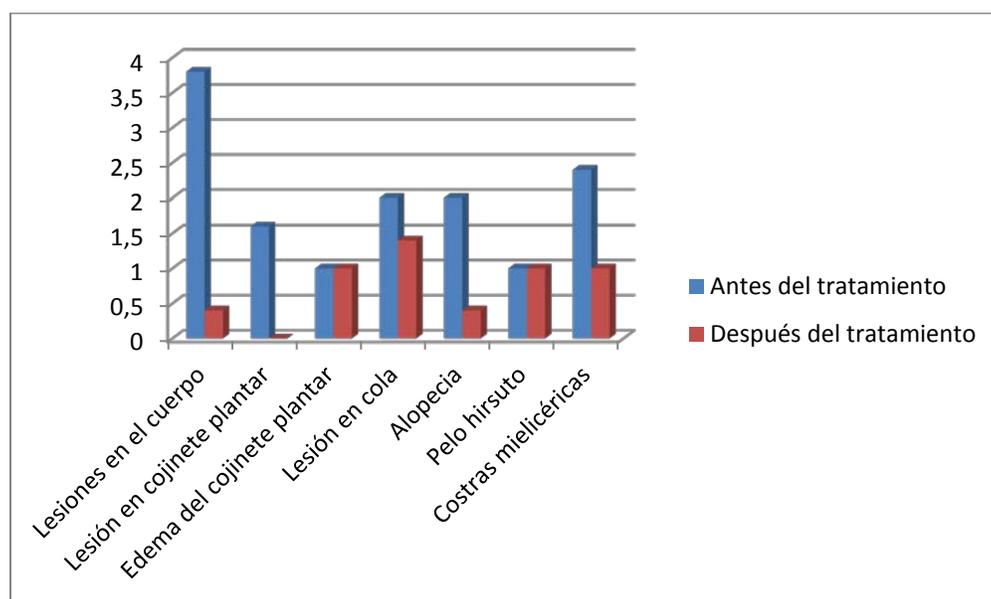
Gráfica IX

**Experimento 3** Efecto en las lesiones de leishmania en ratones BALB/c hembras con la administración del compuesto HA2



Gráfica X

**Experimento 4** Efecto del compuesto HA2 oral y tópico sobre las lesiones de leishmaniasis cutánea diseminada en el ratón BALB/c



## Experimento 1

## Tratamiento con el compuesto HA2



Control



1er día de tratamiento



3er día de tratamiento



14 días después del tratamiento

Ratones tratados con el compuesto de estudio HA2 a los 0, 3, 6 y 7 meses después.

Se observa en el ratón control la lesión en la pata izquierda (edema del cojinete plantar y enrojecimiento), como disminuye la lesión después de 24 horas de la administración del tratamiento, y como a los 14 días después, la pata se muestra curada.

## Compuesto HA2 en agua por tres días: 0, 3, 6 y 7 meses después



Inicio de tratamiento



Tres meses después



Seis meses después



Siete meses después

Se muestra la disminución de pelo y el edema de la pata izquierda, así como las costras mielocéricas y lo pequeño del ratón, y la diferencia a los siete meses después que su pelo se ve completo y brillante como si nunca se le hubiese caído y el ratón ha ganado peso.

## Experimento 2

Ratones tratados con el compuesto de prueba HA2, Hidroxiurea y Glucantime

### Tratamiento por dos semanas



Control



Compuesto HA2



Hidroxiurea



Glucantime

Se observa como los ratones del grupo control tienen escaso pelo, al igual que los tratados con Hidroxiurea y Glucantime y como los tratados con el compuesto HA2 presentan un pelo uniforme y sano.