UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS FACULTAD DE QUÍMICA-FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA

Identificación de nuevos compuestos lideres con actividad Antileishmaniásica a través de estudios "in silico"

Tesis para optar por el Título de Licenciada en Ciencias Farmacéuticas

Autora: Judith Louvina Sayers

Tutores: Lic. Naiví Flores Balmaseda
Dr. Yovani Marrero Ponce

Curso 2009-2010

After climbing a great hill, one only finds that there are many more hills to climb.

Nelson Mandela

Dedicatoria

A mi hijo con mucha dedicación y amor.

A mis padres por traerme al mundo y luego enseñarme a vivir.

Agradecimientos

Es un placer para mí expresar mis sinceros agradecimientos a todas aquellas personas de una forma u otra me ha ayudado a culminar exitosamente mis estudios y este trabajo.
Quisiera agradecer especialmente por todo el apoyo y el amor que me han brindado durante todo el transcurso de mi carrera.
A mis tutores Naiví y Yavani por su apoyo, ánimo y dirección durante el desarrollo de este trabajo.
Al Grupo de Diseño de Fármacos por su atención y toda la ayuda que me ha brindado para el desarrollo de esta tesis.
A mis compañeros de aula especialmente mis amigas que viven con migo por estar conmigo en los momentos buenos y malos durante estos cinco años de mi vida estudiantil.
A mi esposo y su familia que cuidan el hijo mio permitiendome terminar mis estudios.

A todos muchas gracias.

RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad zoonótica causada por diferentes especies de protozoos del género *Leishmania*. Sus manifestaciones clínicas van desde úlceras cutáneas, que cicatrizan espontáneamente, hasta formas fatales en las cuales se presenta inflamación severa del hígado y el bazo, pudiendo interesarse otros órganos como los riñones y la médula ósea. Se estima que el número de personas en riesgo de infección asciende a aproximadamente 350 millones y que al año aparecen cerca de 500 000 casos nuevos de Leishmaniasis visceral y 1,5 millones de la cutáneo mucosa. Su incidencia tiende a aumentar debido a factores de riesgo como son las infecciones por HIV, la malnutrición y las migraciones masivas. Actualmente no existe ningún método profiláctico eficaz y los tratamientos quimioterapéuticos no poseen la eficacia deseable. Los compuestos con actividad antileishmaniásica son objeto de estudio a nivel mundial, pero dada la diversidad de especies del género Leishmania, el ciclo de vida del parásito, y la variedad de manifestaciones clínicas que presenta la enfermedad se hace muy engorroso encontrar nuevos compuestos líderes efectivos. Es necesario el descubrimiento y la caracterización de nuevas entidades moleculares con actividad antileishmaniásica, minimizando al máximo los efectos adversos presentes en los fármacos ya existentes. Hasta el momento, no se han encontrado compuestos con la potencia, seguridad y selectividad deseadas por lo que las investigaciones en esta rama de la ciencia continúa siendo un reto para la industria farmacéutica, la cual desarrolla sus investigaciones fundamentalmente a través de los métodos tradicionales de "prueba-error".

En este trabajo partiendo del desarrollo de una extensa data de compuestos, recopilados de la literatura y de bases de datos internacionales, se desarrolla un modelo QSAR predictivo de actividad antileishmaniásica basado en descriptores moleculares (0D, 1D y 2D) del DRAGON. Con el fin de conformar las series de entrenamiento y predicción les fue aplicado un analisis de cluster del tipo *k*-MCA (de sus siglas en inglés, *k-Means Cluster Analysis* o Análisis de Conglomerados en *k*-Medias), empleando la distancia euclidiana como medida de disimilitud y agente disgregante/aglomerante. Se aplicó el Análisis Discriminante Lineal como técnica estadística para la obtención de las funciones de clasificación a través de su implementación en el paquete de procesamiento estadístico STATISTICA 8.0 donde también se comprobaron los 5 supuestos paramétricos. Se realizó finalmente el cribado virtual de una base de datos internacional (Spectrum) para la selección de nuevos cabezas de serie en el diseño racional de fármacos. La data de 2145 compuestos, fue dividida aleatoriamente en dos subgrupos, uno conteniendo 366 compuestos activos (antileishmaniásicos) y 991 compuestos inactivos como serie de entrenamiento (1357

compuestos) y el otro conteniendo 171 compuesto activos y 617 inactivos como serie de predicción (788 compuestos). Tras el cribado virtual fueron identificados por la función discriminante 316 compuestos como posibles antileishmaniásicos, entre estos, se pueden encontrar conocidos fármacos con otras propiedades farmacológicas y varios productos naturales con diversos usos.

Contenido

INTRODUCCIÓN 1

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 1

1. LEISHMANIASIS. 1

1.1 Concepto y características generales. 1

1.2 Historia 1

1.3 Clasificación. 2

1.4 Formas de Leishmania. 4

1.5 Ciclo biológico de la Leishmania. 4

1.6 Epidemiología. 7

1.7 Fisiopatología e inmunología 7

1.7.1 Leishmaniasis en inmunodeficiencia 10

1.8 Tipos de leishmaniasis 11

1.8.1 Leishmaniasis cutánea 11

1.8.2 Leishmaniasis muco cutánea 13

1.8.3 Leishmaniasis visceral 14

1.8.4. Otras variantes clínicas de la enfermedad han sido observadas con menor frecuencia, entre ellas encontramos; 15

1.9 Diagnóstico de la leishmaniasis. 17

1.10 Tratamiento 23

1.10.1 Estado actual del tratamiento farmacológico de la leishmaniasis 23

1.10 Compuestos de origen natural probados contra la leishmaniasis. 35

1.11 Nuevos enfoques y tendencias en el estudio de la leishmaniasis y su tratamiento 36

1.12 Resistencia 40

1.13 LOS ESTUDIOS QSPR/QSAR Y LOS MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS. 42

1.13.1Los Estudios QSPR/QSAR como Filosofías *Racionales* en la Modelación y Predicción Molecular 42

1.13.2 Análisis Exploratorio de Datos 45

1.13.3 Métodos quimiométricos en estudios QSAR 45

1.14 Diseño experimental 46

1.15 Análisis de Conglomerados (CA, de sus siglas en inglés, Cluster Analysis) 46

1.16 Métodos de Clasificación 47

1.17 Índices topológicos y topográficos 49

1.18 Criterios de selección de variables. 50

1.19 Selección del número óptimo de predictores. Principio de la Parsimonia. 50

1.20 Regulaciones de los métodos QSAR 50

1.21 Métodos de cribado virtual basados en ligandos 52

2. MATERIALES Y MÉTODOS 55

2.1 GESTIÓN DE LA DATA 55

2.2 PARAMETRIZACION DE LA ESTRUCTURA QUIMICA 56

2.3 ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS 56

2.4 CRIBADO VIRTUAL Y SUS VENTAJAS EN EL PROCESO DE SELECCIÓN DE NUEVOS CABEZAS DE SERIE EN EL DISEÑO RACIONAL DE FÁRMACOS. 58

3. RESULTADOS Y DISCUSION 59

3.1 GESTIÓN DE LA DATA Y DISEÑO DE LA SE Y SP EMPLEANDO EL AC 59

3.2 OBTENCIÓN Y VALIDACIÓN DEL MODELO DE CLASIFICACIÓN QSAR-ADL 62

3.3 COMPARACIÓN CON OTROS ENFOQUES TEÓRICOS REPORTADOS EN LA LITERATURA 63

3.4 COMENTARIOS FINALES: EL 'SCREENING' VIRTUAL COMO UNA PROMISORIA ALTERNATIVA PARA LA SELECCIÓN Y EL DISEÑO RACIONAL DE FÁRMACOS ANTI-LEISHMANIA 65

Conclusiones 119

Recomendaciones 120

Glosario

3D-RMN	Resonancia magnética nuclear tridimensional
5-FC	5-fluorocitosina
A	átomo
AC	Análisis de Conglomerados (Análisis de Cluster)
ADL	Análisis Discriminante Lineal
ADME	Absorción, distribución, metabolismo y excreción
ADQ	Análisis Discriminante Cuadrático
ANN	Las Redes Neuronales Artificiales
ARN	Acido Ribonucleíco
ARNr.	Acido Ribonucleíco ribosomal
BCG	Bacillus Calmette-Guérin Bacillus Calmatte-Guérin
C	Coeficiente de correlación de Matthews
CAMD-BIR	Grupo de Diseño Molecular Asistido por Computadora e Investigaciones Bioinformáticas
CBC	Complete blood count cutánea
CBM	Centro Biofísica Médica
CD	Células dendríticas
CD4+	Cluster differnciation
CMV	Citomegalovirus
CTM	Métodos de Árboles de Clasificación
CV	Cribado Virtual
D^2	Distancia de Mahalanobis
DA	Dominio de aplicación
DMs/IMs	Descriptores o Índices Moleculares
DMs-0D	Descriptores Constitucionales

DMs-1D	Descriptores Unidimensionales
DMs-2D	Descriptores Bidimensionales
DT	Decision Trees
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FD l	Función Discriminante
FML	Ligando de fucosa manosa
GCV	Ganciclovir
GFI	Glicosil-fosfatidil-inositol
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de la serie granulocítica y macrofágica
gp63	Glicoproteína 63
HTS	Tamizaje de alta resolución
i.v.	Intravenosa
IC50	Concentración Inhibitoria 50
IFA	Ingredientes Farmacéuticos Activos
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN- γ	Interferón gama
IgG	Inmunoglobulina G
IL-1	Interleucina1
IL-10	Interleucina10
IL-12	Interleucina 12
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
ISCIII	Instituto de salud Carlos III
ITs:	Indices Topológicos

k-MCA	De sus siglas en inglés, k-Means Cluster Analysis o Análisis de Conglomerados en k-Medias
KNN	K-ésimos Vecinos más Cercanos
LCA	Leishmaniasis cutánea atípica
LPG	Lipofosfoglicano
LTA	Leishmaniasis tegumentaria americana
LV	Leishmania visceral
MCL	Leishmaniasis cutánea multifocal
MDR	Resistencia a múltiples drogas
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MW	Peso molecular
NK	Natural killer
NMC	Los Clasificadores Medios más Cercanos
Nx	Conteo de átomos-tipo
OECD	De las siglas en ingles acrónimas en ingles de Organization for Economic Cooperation and Development
OLAP	De las siglas en ingles acrónimas en inglés, OnLine Analytical Processing
OMS---	Organización Mundial de la Salud
PC	Peptidasas cisteína
PCA	Análisis de Componentes Principales
PCR	Polymerase Chain Reaction ó "Reacción en cadena de la Polimerasa
PFC	Función Potencial
QSAR	De las Siglas en ingles de Quantitative Structure Activity Relationships
QSPR	De las Siglas en ingles de Quantitative Structure Property Relationships
Q_{total}	Exactitud
RDA	Análisis Discriminante Regularizado
RDA	Análisis Discriminante Regularizado

REACH	De las siglas en ingles de Registration, Evaluation, Authorization of Chemicals
RFP	Razón de Falsos Positivos
RLM:	Regresión Lineal Múltiple
SE	Series de Entrenamiento
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SP	Series de Predicción
Th1	De las siglas en ingles T helper cells 1
Th2	De las siglas en ingles T helper cells 2
THTT	Tetrahidro tiadiazin-thiona
UTA	Leishmaniasis Cutane Andiana
VIH	Virus de la Immunodeficiencia Humana
WNMC	Los Clasificadores Medios más Cercanos Ponderados
WT	De las siglas en ingles Wild type
λ	lambda de Wilks

INTRODUCCIÓN

La **leishmaniasis** es una enfermedad zoonótica causada por diferentes especies de protozoos del género *Leishmania*. Sus manifestaciones clínicas van desde úlceras cutáneas, que cicatrizan espontáneamente, hasta formas fatales en las cuales se presenta inflamación severa del hígado y el bazo, pudiendo interesarse otros órganos como los riñones y la médula ósea. Por su naturaleza zoonótica, afecta tanto a perros como humanos, existiendo además otros reservorios animales silvestres (portadores) como zarigüeyas, coatíes y osos hormigueros(1).

La infección *de Leishmania* da lugar a una variedad de manifestaciones clínicas clásicas etiquetadas como leishmaniasis visceral, cutánea y mucocutánea siendo la quimioterapia el procedimiento terapéutico generalmente empleado contra ellas. Sin embargo existe una alta frecuencia de efectos citotóxicos inherentes a la mayoría de los fármacos antileishmaniásicos, evidenciándose además una incidencia creciente de resistencia a ellos. La consecuencia final es la necesidad del desarrollo de nuevos fármacos con i).-alto índice terapéutico, ii).-posibilidad de producción a bajo costo, iii).-baja inducción de resistencia, iv) que exploten nuevas dianas; v).-idealmente, con actividad adicional sobre otros parásitos, aparte de *Leishmania(2)*.

La leishmaniasis es endémica de 88 países. Se estima que el número de personas en riesgo de infección asciende a aproximadamente 350 millones y que al año aparecen cerca de 500 000 casos nuevos de Leishmaniasis visceral y 1,5 millones de la cutáneo mucosa(1).

Para interferir con el desarrollo normal de los parásitos intracelulares, un fármaco debe alcanzar el compartimiento donde vive; su muerte entonces, ocurre directamente o a través de varios mecanismos accionados por el fármaco activo en la célula huésped. El complejo ciclo vital *de la Leishmania* y la naturaleza intracelular de algunas de sus etapas de desarrollo hacen tal tarea más difícil. Los antimoniales, que son los medicamentos más frecuentemente empleados contra la leishmaniasis, han estado en uso desde los años 20 y tienen una ventana terapéutica estrecha debido a su toxicidad. De hecho, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha precisado que la incidencia del leishmaniasis ha aumentado desde los años 80, y que ha ganado una posición relevante en el mundo entre las causas de muerte por enfermedades infecciosas. Esto puede ser debido por lo menos en parte a los hechos siguientes: a) el incremento del numero de parásitos que causan leishmaniasis visceral unido al riesgo de la co-infección con el VIH, b) la inducción de fármaco-resistencia por empleo de dosis sub-óptimas, y c) la carencia de la respuesta *de*

Leishmania a varios fármacos ocurre conjuntamente con el aumento de la frecuencia de aparición de esta enfermedad(3).
Por todo lo anteriormente mencionado es necesario el descubrimiento y caracterización de nuevas entidades moleculares con actividad antileishmaniásica, minimizando al máximo los efectos adversos presentes en los fármacos ya existentes. Hasta el momento, no se han encontrado compuestos con la potencia, seguridad y selectividad deseadas por lo que las investigaciones en esta rama de la ciencia continúan siendo un reto para la industria farmacéutica, la cual desarrolla sus investigaciones fundamentalmente a través de los métodos tradicionales de "prueba-error".

El enfoque de diseño/descubrimiento de fármacos asistido por computadoras ofrece una alternativa más económica y rápida en el campo de la síntesis y evaluación de compuestos con determinada actividad farmacológica (4). Estos métodos llamados "*in silico*" engloban todas las técnicas asistidas por ordenadores usadas en el diseño/descubrimiento y optimización de compuestos con propiedades deseadas(5) y ha jugado un rol fundamental en el desarrollo de un número de fármacos que actualmente se encuentran en el mercado (6). Los procedimientos '*in silico'* evitan los altos costos de los procesos de síntesis y bioensayos y se realizan solamente después de la exploración de los conceptos iniciales con modelos de Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad/Propiedad [conocidos internacionalmente por su siglas en inglés QSAR/QSPR (Quantitative Structure Activity/Property Relationships)](4).

Actualmente la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas realiza investigaciones dirigidas al desarrollo de nuevos principios activos para la industria farmacéutica en las ramas de la medicina veterinaria, humana y la sanidad vegetal. Dentro de ella, el Grupo de Diseño Molecular Asistido por Computadora e Investigaciones Bioinformáticas (CAMD-BIR Unit, por sus siglas en inglés) ha presentado resultados relevantes en este campo empleando métodos computacionales cuya aplicación en estudios QSAR ha permitido el desarrollo de nuevos métodos grafo-teóricos para el diseño molecular de compuestos orgánicos potencialmente bioactivos (7).

Los compuestos con actividad antileishmaniásica son objeto de estudio a nivel mundial, pero dada la diversidad de especies del género Leishmania, el ciclo de vida del parásito, y la variedad de manifestaciones clínicas que presenta la enfermedad se hace muy engorroso encontrar nuevos

compuestos líderes efectivos . Teniendo en cuenta lo antes expuesto nos plantamos el siguiente problema científico:

Problema científico:

En la identificación/selección de nuevos compuestos líderes con actividad antileishmaniásica, con vistas al desarrollo de nuevos medicamentos, los métodos tradicionales de prueba y error presentan altos costos y baja efectividad.

Hipótesis:

Es posible la identificación/selección de nuevos compuestos líderes con actividad antileishmaniásica, a un menor costo y alta efectividad, a través del empleo de métodos QSAR.

Objetivo General:

Realizar estudios *"in silico"* capaces de identificar nuevos compuestos líderes con actividad antileishmaniásica.

Objetivos específicos:

- Realizar una extensa búsqueda bibliográfica que nos permita conocer a fondo las peculiaridades de la leishmaniasis, y las características de los tratamientos y estudios actuales.
- Confeccionar a partir de la literatura una base de datos de compuestos a los que se les ha evaluado experimentalmente su actividad antileishmaniásica para de esta forma acceder al análisis y modelación confiable de la data.
- Obtener modelos QSAR, utilizando descriptores moleculares y análisis discriminante lineal, que permitan predecir la actividad antileishmaniásica
- Identificar nuevos compuestos con actividad antileishmaniásica a través del cribado virtual de compuestos orgánicos y fármacos con otros usos terapéuticos.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. LEISHMANIASIS.

1.1 Concepto y características generales.

La leishmaniasis es una enfermedad zoonótica causada por 21 a 30 especies de protozoos del género *Leishmania (L)*. Sus manifestaciones clínicas van desde úlceras cutáneas, que cicatrizan espontáneamente, hasta formas fatales en las cuales se presenta inflamación severa del hígado, el bazo, trastornos renales y afectaciones de la médula ósea.(1)(8). Afecta tanto a perros como humanos. Sin embargo, animales silvestres como zarigüeyas, coatíes, osos hormigueros, ratas, zorros, lobos entre otros, son portadores asintomáticos del parásito, por lo que son considerados como animales reservorios. (1)(9). El agente se transmite a través de la picadura de hembras de los mosquitos chupadores de sangre pertenecientes a los géneros *flebótomos* del viejo mundo y *Lutzomyia* del nuevo mundo, de la familia Psychodidae.(1)

Existen dos tipos epidemiológicos de leishmaniasis: la forma antroponótica, entre persona enferma, flebótomo que actúa de vector y persona sana; y la forma zoonótica, entre un animal enfermo (reservorio), el flebótomo (vector) y la persona sana. La especie L. mayor tiene como reservorios roedores del entorno doméstico, que pueden dar proporciones epidémicas a la enfermedad en el ser humano, si la infección se propaga entre ellos, así como también, la forma antroponótica de la leishmaniasis visceral en la India(10). Existe un riesgo real para los viajeros, en especial si se visitan zonas rurales áridas del norte de África y el sudoeste de Asia, donde son frecuentes las epidemias por L. major(10).

1.2 Historia

A finales del siglo XIX se identifica la leishmaniasis americana en el botón de Oriente (Bravo, 1852, y Cerqueira, 1885). En la India, Cunningham (1885), fue el primero en observar el microorganismo en casos de kala-azar. Firth, en 1891, confirmó este descubrimiento. Tamayo (1908) parece haber sido el primero en identificar lesiones características de UTA, denominación de la leishmaniasis cutánea andina en las cerámicas del Perú preinca. En 1900 y 1903, Leishman y Donovan descubren, con coloración de Giemsa, un parásito ovalado en macrófagos de pacientes con leishmaniasis visceral. Wright (1903) describe el primer caso de infección por Leishmania trópica; Roger (1904) cultiva una *Leishmania* a partir del bazo de un paciente con leishmaniasis visceral; En 1905, Presat sugiere que los flebótomos serían los transmisores del

botón de Oriente; y en 1908 Nicolle cultivó *L. infantum y L. trópica* en el medio NNN (Nicolle Novy MacNeal) y, posteriormente, en el medio semisólido para leptospiras de Noguchi, mientras en 1909Nicolle y Moncuex inician inoculaciones experimentales en monos, perros, ratas, pericotes y zorros. Lindenberg (1909) encontró leishmanias en úlceras de pacientes en Sao Paulo (Brasil). Nicolle y Sergent sugieren que el perro es el reservorio de este parásito(11).

Gaspar Vianna (1910) sugiere que la terapia con antimoniales es efectiva para el tratamiento de la leishmaniasis en el Brasil. En 1911 Splendore diagnostica la forma mucosa de la enfermedad y obtiene cultivos positivos a partir de lesiones mucosas. Vianna, en 1911, propone el nombre de *Leishmania brasiliensis* para denominar al agente que produce la leishmaniasis tegumentaria americana, diferenciándola así de la *L. tropica*. Pedroso, en Brasil (1913), reporta por primera vez un perro infectado por leishmania. Montenegro, en 1924, demuestra la hipersensibilidad a la inyección intradérmica de una suspensión de leishmanias(11).

En el Perú, Escomel, en 1911, fue el primero que halló leishmanias en un caso de espundia y, en 1913, la Comisión de la Universidad de Harvard concluye que la UTA es una leishmaniasis de variedad cutánea y la espundia, una de tipo mucocutáneo mientras Herrer y Battistine producen la primera infección experimental en perros. En 1940, Geiman publica los hallazgos de *Leishmania brasiliensis* en pacientes peruanos que presentaban UTA y la inoculación en un perro reproduce la típica lesión. Walton y col., en 1977, caracterizan como Leishmania brasiliensis spp. a una cepa aislada de un paciente procedente de la región este del Perú que presentaba espundia. Lumbreras y Guerra (1985) escriben que la *L. brasiliensis* y la *L. brasiliensis guyanensis* son los agentes que causan la espundia. Llanos Cuentas y col. (1986) reportan la identificación de *Leishmania brasiliensis brasiliensis* en pacientes con espundia. Lucas y col., en 1994, aíslan en el Perú la *Leishmania (viannia) lainsoni*. Otros investigadores peruanos que han contribuido en el estudio de la leishmaniasis han sido Palma, Monge, Arce, Rebagliati, Escomel, Almenara, Pesce y Weiss. En la actualidad, diversos investigadores peruanos están caracterizando las áreas endémicas de leishmaniasis(11).

1.3 Clasificación.

La Leishmania se clasifica de la siguiente forma: (12)

A) Phylum: PROTOZOO

B) Subphylum: SARCOMASTIGOSPHORA

1. Clase: FLAGELADOS
   1.1. Orden: PROTOMONADINA
   1.2. Familia: TRYPANOSOMATIDAE

1.3. Género: LEISHMANIA

1.4. Especies: se conocen más de 20 entre las que se encuentran:

Leishmania aethiopica
Leishmania amazonensis
Leishmania arabica
Leishmania archibaldi
Leishmania aristedes
Leishmania braziliensis
Leishmania chagasi
Leishmania colombiensis
Leishmania deanei
Leishmania donovani
Leishmania enriettii
Leishmania equatorensis
Leishmania forattinii
Leishmania garnhami
Leishmania gerbili
Leishmania guyanensis
Leishmania herreri
Leishmania hertigi
Leishmania infantum
Leishmania killicki
Leishmania lainsoni
Leishmania major
Leishmania mexicana
Leishmania naiffi
Leishmania panamensis
Leishmania peruviana
Leishmania pifanoi
Leishmania shawi
Leishmania turanica
Leishmania tropica
Leishmania venezuelensis (1)

1.4 Formas de Leishmania.

El ciclo biológico de las leishmanias comprende esencialmente el paso alternativo de un hospedador vertebrado a otro invertebrado, y viceversa, con dos formas morfológicas principales, la intracelular o amastigota en las células del sistema fagocítico mononuclear del hospedador vertebrado y la forma extracelular o promastigota en el tracto intestinal de los flebótomos.

La forma amastigota, inmóvil, se presenta al microscopio óptico tras tinción con colorantes habituales, como un cuerpo oval, de una longitud y anchura que oscilan, respectivamente, entre 3-5 µm y 1,5-2,5 µm. En su citoplasma, se observa un núcleo voluminoso y esferoidal, generalmente excéntrico, y un kinetonúcleo próximo al núcleo de aspecto bacilar o bastoniforme(9). Son exclusivamente intracelulares (macrófagos) pero pueden encontrarse en el intersticio en los casos en los que el parásito se replica hasta producir la ruptura de la célula huésped. (1)

La forma promastigota, fusiforme, extracelular y móvil, presenta un tamaño superior. Su talla varía entre los 10-30 µm de largo y los 1,5-3 µm de ancho. Si bien en el examen en fresco sólo puede observarse un largo flagelo libre en su región anterior, su tinción permite observar además la presencia de un núcleo oval central y un kinetonúcleo bastoniforme claramente pre nuclear. En 1979 se demostró que el parásito presenta en el tubo digestivo del vector otro estadio flagelado, distinto al promastigota, al que se denominó paramastigota debido a la situación lateral del kinetoplasto respecto al núcleo(9). Anexo 4 (7)

1.5 Ciclo biológico de la Leishmania.

Todas las leishmanias presentan un ciclo de vida similar y es importante conocer cada una de las etapas para poder entender y aplicar ciertas medidas de control. La Leishmania es heterogénea y completa su ciclo biológico usando dos huéspedes. Se pueden producir diferentes ciclos (Figura 1): Uno, principalmente silvestre, en el que la Leishmania circula entre los reservorios naturales, y mantiene el ciclo con la participación de los vectores propios de la zona endémica. En un segundo ciclo, los vectores infectados pueden atacar al hombre y a los animales domésticos o peri domésticos. Se puede producir un tercer ciclo, en el que el propio enfermo con leishmaniasis constituye un reservorio(11).

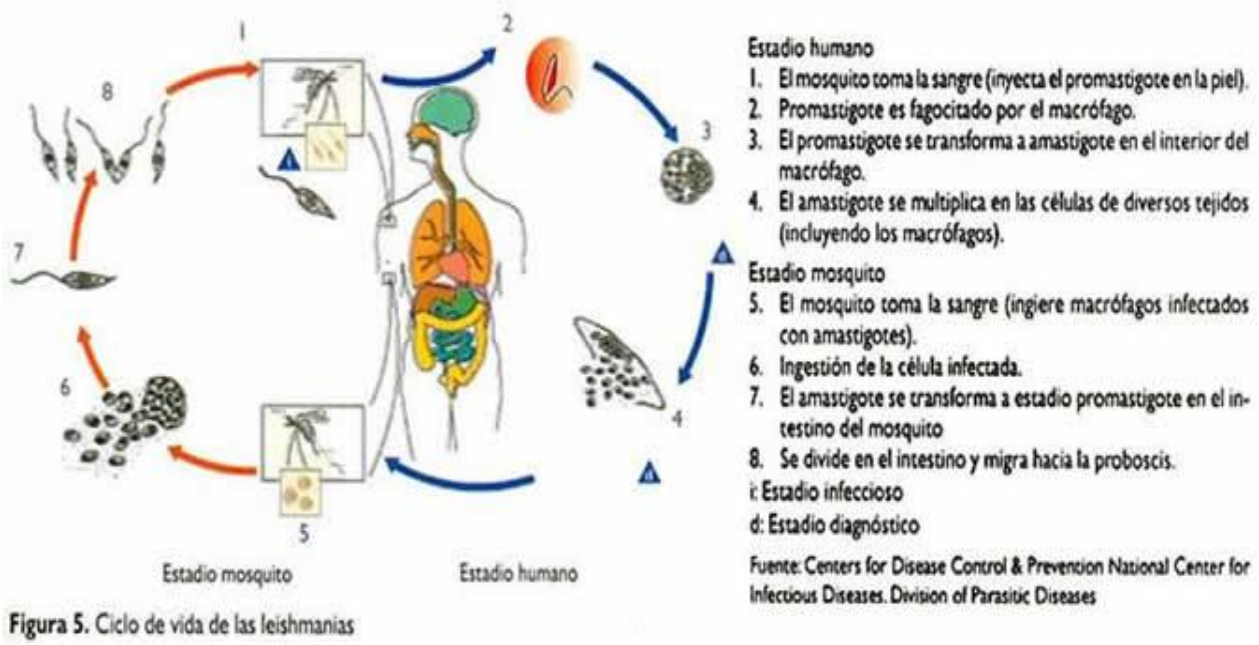


Figura 1 Ciclo biológico de la Leishmania

Figura 2 Vector (*flebótomo) mosca de la arena o sandfly*

El ciclo comienza cuando el vector (figura 2) toma sangre de un vertebrado infectado, para alimentarse, e ingiere macrófagos infectados con amastigotes presentes dentro de la piel. La transformación del amastigote a promastigote ocurre dentro de las siguientes 24 a 48 horas. Los promastigotes se multiplican activamente por división binaria longitudinal. Algunos quedan libres desde el inicio en el lumen intestinal; otros se adhieren a la pared por hemidesmosomas. La localización del parásito en el intestino varía de acuerdo a cada especie del vector y de *Leishmania*. Después de la replicación en el intestino, los promastigotes migran al esófago y la faringe. En el tubo digestivo de la hembra del vector los promastigotes son estructuras piriformes o fusiformes que presentan la extremidad posterior más delgada que la anterior, su cuerpo es flexible y se mueve por la acción de un flagelo libre situado en la parte posterior que es casi de igual tamaño que el cuerpo; el núcleo se localiza en el centro de la célula y el kinetoplasto, entre el

núcleo y la extremidad anterior somática; el rizonema parte del kinetoplasto y se continúa con el flagelo libre(11).

Cuando el vector infectado pica a un huésped le inocula entre 10 y 100 promastigotes presentes en la proboscis y que penetran en la dermis. La saliva del mosquito tiene un rol en el establecimiento de la infección, debido a que reduce la producción del óxido nitroso por los macrófagos activados. En los vectores excesivamente infectados, la proboscis está congestionada, lo que hace difícil alimentarse, por lo que el mosquito realiza múltiples picaduras e inoculaciones. Los promastigotes no migran activamente hacia los macrófagos, permanecen en el espacio intercelular y activan el complemento por una vía alternativa, que inicia la acumulación de neutrófilos y macrófagos. Aunque muchos promastigotes son destruidos por los leucocitos polimorfonucleares, unos pocos se transforman en amastigotes en las células del sistema retículoendotelial, en un periodo de 3 a 4 horas en promedio, permanecen en estadio estacionario por 36 horas aproximadamente y, luego, comienzan a reproducirse(11).

La adhesión entre el parásito y los macrófagos es una etapa fundamental para la invasión de las células del huésped. Sobre la superficie de la Leishmania han sido identificados numerosos receptores, entre los más importantes la glicoproteína 63 (gp63) y el lipofosfoglicano (LPG), que son usados por los parásitos para adherirse a los macrófagos. Las especies de Leishmania han desarrollado varios mecanismos para resistir la actividad digestiva y antimicrobiana de las células fagocíticas. Los amastigotes son más resistentes que los promastigotes a los mecanismos antimicrobianos inducidos por citoquinas dependientes del oxígeno, lo que refleja una adaptación al crecimiento intracelular(11).

El amastigote tiene forma ovalada o redondeada, carece de flagelos y de membrana ondulante y, por tanto, es inmóvil. En los preparados teñidos con Wright y Giemsa se observa una membrana citoplasmática, que le sirve de sostén y envoltura; un citoplasma azul claro y, ocasionalmente, un cariosoma central o excéntrico. En el citoplasma está incluido el núcleo de color rojo púrpura, de localización excéntrica, dirigido un poco hacia la extremidad posterior. El kinetoplasto, que se tiñe intensamente de rojo y que se ubica cerca y delante del núcleo, es una estructura mitocondrial especializada que contiene una cantidad sustancial del ADN extranuclear, contiene el corpúsculo parabasal y un blefaroplasto puntiforme. El axonema o rizonema es un filamento que parte del kinetoplasto y se dirige a la membrana celular(11).

Los amastigotes se multiplican por fisión binaria dentro de vacuolas parasitóforas de los macrófagos. Primero, inician la división del kinetoplasto, uno de los fragmentos conserva el rizonema, mientras que el otro forma su propia estructura flagelar. Luego, sigue la división del

núcleo por mitosis y concluye con la del citoplasma, en sentido antero posterior. La cantidad de amastigotes puede llegar hasta 200, lo que ocasiona la distensión y ruptura del macrófago. Los amastigotes libres entran en nuevas células del sistema fagocitario mononuclear, donde se multiplican de nuevo. El ciclo se reanuda cuando el flebótomo pica a un huésped para alimentarse de su sangre(11).

1.6 Epidemiología.

La leishmaniasis es endémica de 88 países. Se estima que el número de personas en riesgo de infección asciende a aproximadamente 350 millones y que al año aparecen cerca de 500 000 casos nuevos de Leishmaniasis visceral y 1,5 millones de la cutáneo mucosa(8). Sin embargo, los datos oficiales de que se dispone subestiman la realidad de la afección humana por estos protozoos flagelados debido a varios factores limitantes: a) la distribución de las zonas de transmisión en áreas endémicas es frecuentemente discontinua, b) numerosos casos no son diagnosticados o no se declaran, c) la mayoría de los datos oficiales se obtienen exclusivamente a partir de la detección pasiva de los casos, d) el número de personas infectadas, pero asintomáticos, es mucho mayor que el número de casos manifiestos de leishmaniasis visceral y, por último, la leishmaniasis es de declaración obligatoria en tan sólo 40 de los 88 países endémicos(13).

La mayoría de los países afectados se encuentran en las regiones tropical y subtropical, que abarcan desde zonas de abundantes lluvias en las selvas de América Central y Sudamérica, hasta zonas desérticas en el Asia Oriental. Más del 90 % de los casos mundiales de Leishmania visceral se encuentran en India, Bangladesh, Nepal, Sudán, y Brasil(13).

Ver anexos #1 (4), 2(5) ,3(6)*

Su distribución geográfica está limitada por la de los flebótomos, la susceptibilidad de éstos a los climas fríos, su tendencia a ingerir sangre del hombre o únicamente de los animales y su capacidad de soportar el desarrollo interno de las especies de *Leishmania(13)*.

En España los casos de leishmaniasis declarados son fundamentalmente viscerales, la mayoría de ellos en enfermos infectados por el VIH. De los 1440 casos declarados de co-infección VIH-*Leishmania* entre 1990 y 1998 en la región mediterránea, 835 han sido en este país. Siendo el agente responsable la *Leishmania infantum* o *chagasi(13)*.

1.7 Fisiopatología e inmunología

La inmunidad en la leishmaniasis depende de la forma clínica y la respuesta del huésped. Se ha descrito un espectro de fenotipos que se correlacionan con la intensidad de la respuesta inmune.

La inmunidad mediada por células tiene una influencia dominante en la determinación de la enfermedad(11).

Tanto el parásito como el huésped intervienen en el desarrollo de la infección causada por la *Leishmania*. La *Leishmania* posee una serie de estrategias complejas para atacar, infectar y sobrevivir dentro de los macrófagos. El huésped falla para controlar la enfermedad debido a la habilidad que tienen algunas cepas de resistir a la acción microbicida de los macrófagos activados y a la caída de la respuesta inmuno protectora del huésped. En el humano hay fenotipos sensibles y resistentes. Las lesiones que curan espontáneamente están asociadas con una respuesta positiva de las células T antígeno específicas; las formas viscerales y cutáneas difusas, con una respuesta débil o ausente, y la forma muco cutánea, con una híper respuesta de las células T(11).

Los promastigotes cuando son inoculados, para escapar de la respuesta inmune inespecífica del huésped, penetran en los macrófagos. Los promastigotes no migran hacia los macrófagos, sino que permanecen en el espacio intercelular y activan el complemento por la vía alterna, e inician la acumulación de neutrófilos y macrófagos(11).

La adhesión entre el parásito y los macrófagos es fundamental para la invasión de las células del huésped. La proteína sérica C3 del complemento se deposita en la superficie del protozoario y reconoce ciertos receptores de membrana del macrófago. Se han identificado otros receptores sobre la superficie de la *Leishmania*, como la glicoproteína 63 (gp63) y el lipofosfoglicano (LPG), que son usados por los parásitos para adherirse a los macrófagos. Una vez que los promastigotes se fijan al macrófago son englobados en una vacuola parasitófora, que se une a los lisosomas y contienen enzimas proteolíticas que pueden matar y digerir las leishmanias(11).

Sin embargo, las *Leishmanias* se diferencian y se transforman en amastigotes que resisten a la agresión y se multiplican dentro de estas vacuolas hasta que los macrófagos infectados ya no pueden contener más *Leishmanias* y las células mueren y liberan amastigotes que van a infectar otras células. Las *Leishmanias* destruidas por los macrófagos liberan antígenos que son expresados en la membrana de los macrófagos y presentados a los linfocitos T CD4+ leishmania específicos. La actividad leishmanicida es debida al aumento de la capacidad de los macrófagos de producir oxígeno tóxico y radicales de nitrógeno en respuesta al interferón gama (IFN- γ)(11).

Los análisis del perfil de citoquinas sugieren que el sistema inmune del huésped tiene un rol inmunorregulatorio en la expresión de la enfermedad. Así, en la leishmaniasis cutánea localizada, las principales citoquinas producidas son la IL-2 e IFN- γ, y en la mucocutánea y la cutánea difusa, la IL-4 e IL-10. Esto se correlaciona con los estudios en modelos murinos en los cuales la producción de IL-2 e IFN-γ (Th1) interviene en la curación de la enfermedad, mientras que las IL-4,

IL-5 e IL-10 (Th2) están asociados con la progresión y diseminación de la enfermedad. Así dos subpoblaciones de células T helper en el sistema inmune murino son críticos en la inducción de la resistencia o la susceptibilidad a la infección(11).

La importancia de la piel como sitio inmunorregulatorio en las tres formas clásicas de leishmaniasis y la vía de señal epidermal es crucial en la determinación de la respuesta inmune relacionada al tipo de citoquinas generado contra los parásitos de leishmania(11).

La resolución de la infección y la protección contra la reinfección en humanos y ratones están reguladas por la expansión de las células T helper CD4+ *Leishmania* específicas tipo Th1 que producen IFN-γ. El IFN-γ activa a los macrófagos para la destrucción intracelular de los amastigotes. La IL-12 tendría un importante rol en promover el desarrollo de la respuesta Th1 protectora. En modelos de ratones, las células CD8+ leishmania específica secretan IFN-γ, que contribuye a la resolución de la infección por *L. donovani(11)*.

En estudios de modelos en ratas se ha demostrado que durante las infecciones sistémicas progresivas hay expansión de células T CD4+ del tipo Th2 que secretan IL-4, pero no IFN-γ o IL-2 en respuesta a antígenos leishmaniásicos. La IL-4 suprime el desarrollo de la respuesta Th1 y la activación de los macrófagos por el IFN-γ. En pacientes con leishmaniasis visceral, la IL-10, más que la IL-4, es responsable de la supresión de la respuesta Th1. Las células CD8+ *Leishmania* específicas han sido implicadas en la estimulación de la secreción de IL-10 por las células mononucleares de la sangre periférica. La naturaleza crónica de la leishmaniasis cutánea parece ser debida a la respuesta Th2 dominante en el sitio de infección de la piel(11).

El mayor mecanismo de defensa inmune que tiene el huésped frente a la *Leishmania* es la activación de los macrófagos por el IFN-γ derivado de las células T CD4+. La ausencia de IFN-γ es responsable del desarrollo de la leishmaniasis visceral y la leishmaniasis cutánea difusa. En la leishmaniasis cutánea americana, los linfocitos T producen IFN-γ, en respuesta a antígenos de las *Leishmanias*, y activan el macrófago para destruir a las *Leishmanias*. Es posible que el desarrollo de la enfermedad dependa de la desregulación transitoria de la respuesta de las células T durante la fase inicial de la infección(11).

Se ha descubierto en recientes estudios la importancia de las interacciones entre los microorganismos y las células dendríticas (CD) y el rol central de estas células en la iniciación y regulación de la respuesta inmune antimicrobial. Las CD inmaduras en la piel captan el antígeno y lo procesan para su presentación a través de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Posteriormente, las CD migran por los nódulos linfáticos transportando el antígeno procesado a las áreas de las células T, diferenciándose en CD maduras con

capacidad para estimular las células T en reposo, que da lugar a la producción de citoquinas, como IL-1, IL-6 o IL-12, las que modulan el desarrollo del tipo de respuesta de células T. En la leishmaniasis, los protozoarios son fagocitados por macrófagos, CD, neutrófilos y fibroblastos. Solo las CD migran por los nódulos linfáticos y transportan el antígeno desde la piel infectada hacia las áreas de las células T y son capaces de proporcionar la principal señal para la iniciación de la respuesta primaria de las células T *Leishmania* específica. Además, las CD retienen los antígenos del parásito de una forma inmunogénica por periodos prolongados, debido al aumento de la estabilidad de complejos péptidos del MHC de clase II, y así permitir la estimulación sostenida de las células T parásito específicas, que mantiene la inmunidad protectora frente a las *Leishmanias*. Estos hallazgos sugieren que la interacción de la *Leishmania* con las CD es enfocada como iniciadores y reguladores de la respuesta inmune específica. Se ha determinado que la IL-12 en un estadio temprano de la infección es crucial para la determinación de la inmunidad innata, la actividad de las células natural killer (NK) para producir IFN-γ y la respuesta adaptativa del huésped vía inducción selectiva de la diferenciación de las células Th1. Este hallazgo es la clave de las CD como reguladores de la inmunidad anti infectiva y para la elaboración de estrategias para la obtención de vacunas(11).

1.7.1 Leishmaniasis en inmunodeficiencia

La leishmaniasis visceral y mucocutánea no es frecuente en países no endémicos en el Viejo Mundo; sin embargo, con la progresión de la epidemia por VIH y otras inmunodeficiencias se está incrementando, coexistiendo con otras infecciones infrecuentes como la cisticercosis. En VIH positivos existe una gran afinidad por infecciones protozoarias oportunistas, así se aprecian casos autóctonos ligados al SIDA. La inmunodepresión es aprovechada por la leishmania, así las manifestaciones clínicas tienden a coincidir con los periodos de máxima depresión.

Se manifiesta clínicamente de forma atípica, severa con diseminación de la forma cutánea mucosa o progresión a la forma visceral y afecta a órganos inusuales.

Las localizaciones más frecuentes de lesiones en la cavidad oral son el paladar duro o blando concomitantemente con lesiones en la mucosa gingival, labio y amígdala16-19. En la mayoría de los casos son lesiones infiltrativas, ulceradas, polipoideas o exofíticas, parecidas a una tumoración. La presencia de otras enfermedades oportunistas (Sarcoma de Kaposi más infección por CMV) con leishmaniasis oral está documentada. Esto es particularmente importante porque existen enfermedades neoplásicas que inicialmente afectan la cavidad oral en asociación con micosis profundas (criptococosis, histoplasmosis), infecciones por CMV, micobacterias y herpes

virus. Por ser muy frecuente las lesiones orales en estos pacientes, debe ser considerada como un criterio diagnóstico de SIDA, y ante lesiones orales causadas por la leishmaniasis en zonas no endémicas descartar coinfección con VIH.

No siempre existe hepatoesplenomegalia y en el 50% no existe fiebre.

El diagnóstico es difícil, pues la serología es negativa en el 50% de los casos, incluso en fases tardías. La biopsia no suele hacerse positiva, salvo secundariamente, encontrándose entonces en gran cantidad en numerosos tejidos, incluso en la médula ósea. La evolución es subaguda y el tratamiento suele ser poco eficaz, produciéndose sistemáticamente recidivas al Glucantime, por lo que se asocian varios fármacos(14).

1.8 Tipos de leishmaniasis

Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad son variables y están relacionadas a la cepa de *Leishmania* infectante, el medio ambiente y a la respuesta inmune del hospedero. Se describen tres formas clínicas:

1) Leishmaniasis cutánea;
2) leishmaniasis muco cutánea y
3) Leishmaniasis visceral

1.8.1 Leishmaniasis cutánea

La aparición de las lesiones cutáneas algunas veces se encuentra asociada con la picadura del insecto vector en sujetos que viven en áreas endémicas, penetran y permanecen en el nicho ecológico por breves días y, luego, presentan la enfermedad. En promedio, se puede hablar de un periodo de incubación entre 2 y 3 semanas (de 2 semanas a 2 meses o más). Después aparece una pequeña lesión inicial frecuentemente visible, pero no siempre, que tiene asiento en las partes descubiertas, principalmente en la cara y en las piernas. El aspecto típico de la lesión inicial es un leve enrojecimiento circunscrito, frecuentemente pruriginoso, seguido, a los pocos días, por una leve infiltración papulosa de unos 3 mm de diámetro y con mucha frecuencia con una o dos diminutas vesículas; puede dar lugar a una diminuta excoriación por el rascado, que se transforma en una exulceración y posible punto de partida de un proceso ulcerativo. Pero, algunas veces, la lesión regresiona espontáneamente y origina una fase de silencio sintomático algo prolongado. Un trauma local puede activar una infección latente(11).

Se ha observado como signo precoz en los casos de leishmaniasis cutánea la aparición de nódulos linfáticos, en la región correspondiente. El inicio de los signos linfáticos puede aparecer antes, al mismo tiempo o después de la ulceración, y, en casos muy raros, puede ser el único

signo de infección de leishmaniasis. Más raros, son diminutos cordones linfáticos infiltrados, perceptibles a la palpación, entre la lesión primaria y el ganglio infartado. Esto puede considerarse como un 'complejo primario' que la mayoría de veces pasa desapercibido por su escasa intensidad, o sea una verdadera, pero diminuta, úlcera primaria acompañada por la infiltración linfática regional correspondiente. Algunas veces se ha observado una lesión modular de tipo subdérmico, sin lesión cutánea visible como punto de partida de un infarto ganglionar manifiesto. Esto indica que el complejo ganglionar es la regla en la enfermedad, aunque no siempre pueda ser evidenciable(11).

Después de varios días, la lesión inicial se ulcera espontáneamente y se cubre de un exudado amarillento y adherente, que dará lugar a la costra. Debajo de la costra, la lesión se extiende en superficie y profundidad. Pueden aparecer lesiones satélites que al unirse a la inicial, originan una úlcera grande. La úlcera característica de la leishmaniasis es redondeada, indolora, con bordes bien definidos levantados y cortados en forma de sacabocado e indurada que recuerda la imagen de un cráter. Cuando se desprende la costra se observa un fondo granulomatoso, limpio, con exudado seroso no purulento, sin tendencia al sangrado, de color rojizo, a veces amarillento cuando hay depósito de fibrina. No hay signos inflamatorios, como edema o calor local. Si hay una infección bacteriana la úlcera se torna dolorosa, exudativa y purulenta. Normalmente la piel alrededor de la lesión presenta aspecto y coloración normales(11). Ver Anexo 5, figura 4

La localización de la úlcera es más frecuente en las partes expuestas del cuerpo, especialmente las extremidades y cara. En los primeros meses de evolución, la úlcera tiende a crecer hasta un tamaño máximo que está en función de la respuesta inmune del huésped y de la especie de Leishmania infectante. Pasan varios meses antes que la úlcera alcance varios centímetros de diámetro. Con frecuencia son afectados los ganglios linfáticos y se producen linfangitis y linfadenitis regionales. Las lesiones se estabilizan y a medida que empieza a prevalecer la respuesta inmune del huésped, la enfermedad tiende a evolucionar a la curación espontánea, en un periodo de seis meses a tres años. Solo un escaso porcentaje tiene recidivas cutáneas o complicaciones mucosas de aparición más o menos tardía(11).

Las especies de *Leishmania* infectante y la respuesta inmune del huésped determinan las características clínicas y la cronicidad de las lesiones. Las lesiones causadas *por L. (L) mexicana* tienden a ser pequeñas y menos crónicas que las causadas por L. (V) braziliensis. La *L. (V) peruviana* presenta principalmente formas papulofoliculares y nodulares dérmicas; en la leishmaniasis causada por *L. (V) braziliensis* predomina la forma ulcerosa franca. La leishmaniasis causada por *L. (V) guyanensis* origina úlceras múltiples, que sin tratamiento pueden extenderse

por la cadena linfática de forma similar a la esporotricosis; en un porcentaje bajo muestra tendencia a la forma muco cutánea. La *L. (V) panamensis* produce lesiones ulcerosas que no tienden a la curación espontánea y afectación linfática en forma de rosario. La leishmaniasis producida por *la L. (L) amazonensis* rara vez produce enfermedad en el hombre y tiende a producir leishmaniasis cutánea difusa resistente a la curación. La *L. (V) lainsoni* produce principalmente lesiones cutáneas(11).

Se ha descrito diversas formas clínicas de lesiones no ulceradas de leishmaniasis, como la papulosa, impetiginoide (Figura 5), verrucosa, nodular (Figura 6), vegetante y mixtas. Ver anexo 5 figuras 5 y 6.

1.8.2 Leishmaniasis muco cutánea

Las manifestaciones clínicas de la forma muco cutánea se presentan muchos meses o años después haber cicatrizado la forma cutánea; ocasionalmente aparecen cuando todavía existen las manifestaciones en la piel. Frecuentemente el enfermo ya no se encuentra en la zona donde contrajo la enfermedad. Tejada, (1973) en Cusco y Madre de Dios(Perú), encontró que el 48,8% de las manifestaciones mucosas se inició uno a dos años después de iniciada la enfermedad cutánea; el 24%, a los dos años, y 20%, entre los 3 y 5 años. Pessoa y col., en Brasil, (1973) afirman que el 70% de las lesiones surge en los primeros 5 años después de la aparición de la lesión cutánea. Se describe aparición de lesiones mucosas entre los 20 y 30 años después de la resolución de la lesión primaria. En un tercio de los casos, las manifestaciones mucosas son primarias, sin antecedente de lesión cutánea. Posiblemente la infección primaria ha sido inaparente o se ha manifestado como una lesión mínima que pasó desapercibida para el paciente(11).

Ver Anexo 5 Figura 7y 8.

Las lesiones mucosas se inician principalmente a nivel del tabique nasal cartilaginoso (septum cartilaginoso) y, raramente, en el piso de la nariz. Pero, pueden comenzar en otras partes de las vías aéreas superiores. Al inicio solo se aprecia una discreta secreción de moco, como si el enfermo tuviera una rinitis o un resfriado. Luego, se produce la inflamación de la mucosa, que se vuelve eritematosa, edematosa y dolorosa; la lesión se profundiza y produce una pericondritis. Hay hipertrofia vascular y de los orificios pilosebáceos, que produce abundante seborrea. Cuando las lesiones están avanzadas, se presenta exudación y ulceración de la mucosa. Luego, se compromete el cartílago y se produce la perforación del tabique, que si destruye parcial o totalmente el tabique determinará la caída de la punta de la nariz. El eritema, edema y la

infiltración producen aumento del volumen de la punta de la nariz y el ala, que puede sobrepasar el surco nasogeniano. A esta nariz grande de la leishmaniasis se la conoce con el nombre de 'nariz de tapir'. La perforación del tabique nasal y el achatamiento de la nariz sin ulceración son propias de la leishmaniasis mucocutánea (espundia) y no son observadas en la leishmaniasis cutánea andina, en la que, de preferencia, las alas de la nariz son carcomidas(11).

Los pacientes con compromiso nasal presentan, como sintomatología, catarro nasal, ardor, prurito y respiración forzada. Al examen, se aprecia la mucosa nasal congestionada, una costra hemorrágica o una úlcera granulomatosa infiltrada. Si hay infección sobreagregada, la secreción es purulenta. Si la enfermedad progresa y se profundiza, el proceso se extiende del vestíbulo al labio superior, paladar, pilares, úvula y la garganta. El labio superior suele ulcerarse y destruirse poco a poco y compromete parte de la nariz. Las lesiones del paladar son más frecuentemente proliferativas que destructivas; la úvula suele hipertrofiarse, ulcerarse o destruirse; pero, las lesiones linguales son muy raras. Cuando se afecta la garganta, la voz es ronca y hay dificultad para respirar y deglutir los alimentos. También se puede hallar compromiso gingival e interdentario. Las lesiones de la hipofaringe, laringe y tráquea se caracterizan por un compromiso de los repliegues ariteepiglóticos y aritenoides, que dan lesiones hipertrofiantes que producen disfonía, afonía y asfixia. La epiglotis también puede estar comprometida y las cuerdas vocales infiltradas. Si no hay tratamiento, la enfermedad puede llevar a la muerte(11).

La leishmaniasis mucocutánea, en los primeros años de su evolución, no afecta el estado general del paciente, el que puede realiza su labor normalmente. Sin embargo, cuando las lesiones mucosas están muy avanzadas y comprometen la mucosa de la boca y la laringe, la respiración y la alimentación, el estado general del enfermo se altera(11).

1.8.3 Leishmaniasis visceral

La leishmaniasis visceral es una enfermedad parasitaria sistémica que compromete la vida, causada por el complejo *L. donovani* y transmitida por mosquitos flebótominos. La enfermedad es endémica en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo. El complejo Leishmania donovani incluye a la *L. donovani* en el subcontinente Indio, Asia y África; a la *L. infantum*, en el mediterráneo y *L. chagasi,* en Sudamérica. En el Oriente medio se han encontrado cepas de *L. trópica* que causan enfermedad visceral. La leishmaniasis visceral ocurre esporádicamente en áreas endémicas rurales, pero epidemias en gran escala se han asociado al hambre, migraciones en masa y alteraciones ecológicas, las que han propiciado interacciones entre los reservorios, mosquitos y seres humanos.

Después de la picadura del vector, existe un periodo de incubación que varía de 4 a 10 meses. En muy pocos casos se encuentran lesiones en la puerta de entrada, ya que la mayoría de las veces pasa desapercibida y tiene una evolución crónica. La progresión a leishmaniasis visceral típica usualmente ocurre entre los 3 y 8 meses después de la infección; aunque se han reportado casos tempranos de aproximadamente dos semanas. Sin embargo, después de la infección la mayoría de los casos permanecen asintomáticos o presentan síntomas leves que, eventualmente, se resuelven en forma espontánea(11).

Las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis visceral típica están asociadas con fiebre, que casi siempre es progresiva y elevada, remitente o intermitente, durar semanas y se alterna con periodos afebriles. Posteriormente, la fiebre se torna persistente y ondulante. Existe progresivo deterioro del huésped, palidez y hepatoesplenomegalia. En la fase crónica, la esplenomegalia es muy marcada y puede llegar hasta la fosa iliaca derecha, con abultamiento considerable del abdomen. Existe una linfadenopatía generalizada, en especial de los ganglios mesentéricos, epistaxis, hemorragia gingival, edema y ascitis. La piel se encuentra hiperpigmentada. A menudo la leishmaniasis visceral es fatal, sobre todo si no se efectúa tratamiento adecuado(11).

Los hallazgos de laboratorio incluyen anemia normocítica normocrómica, neutropenia, trombocitopenia, hipoalbuminemia y elevación de las transaminasas.

Desde el punto de vista inmunológico, se ha establecido que la leishmaniasis visceral está asociada con anergia celular, tal como lo indican las pruebas cutáneas negativas a antígenos de leishmania. La inducción del factor de transformación del crecimiento-beta y la IL-10 con propiedades inactivantes de los macrófagos puede ser la clave de esto. El control de la leishmaniasis visceral depende de la magnitud de la respuesta Th1 y de las citoquinas liberadas tempranamente en el curso de la infección. Datos recientes indican que la susceptibilidad a la leishmaniasis está determinada genéticamente(11).

1.8.4. Otras variantes clínicas de la enfermedad han sido observadas con menor frecuencia, entre ellas encontramos;

1.8.4.1 La leishmaniasis cutánea multifocal

Las diferentes expresiones clínicas y la evolución de la leishmaniasis dependen del subtipo del parásito y del estado inmunológico del huésped. La *L. infantum* se manifiesta con un rasgo clínico atípico más frecuente que las otras especies. Se ha sugerido que existe relación entre la clínica de la enfermedad y el polimorfismo genético. *L. infatum* es endémico de la cuenca del Mediterráneo, Este medio, China y Asia Central. Se han descrito lesiones múltiples relacionadas *con L. mexicana, L. braziliensis, L. tropica y L. major,* causando estas dos últimas fundamentalmente

formas dermatotrópicas de la enfermedad. En dichos casos la enfermedad se disemina desde la lesión primaria a través de los vasos linfáticos produciendo nódulos subcutáneos o adenopatías regionales que recuerdan la esporotricosis linfocutánea. Las lesiones multifocales son descritas ocasionalmente en pacientes con VIH adictos a las drogas debido a la presencia de múltiples sitios de inyección hechos con agujas infectadas(15).

La leishmaniasis cutánea multifocal (MCL) es extremadamente rara en el sur de Europa y afecta pacientes con inmunidad comprometida. Paradisi y colaboradores (2005) reportan un caso de MCL en un paciente afectado por diabetes mellitus que presentaba tres grandes úlceras en las piernas con una distribución no-linear y meses después la aparición de una lesión con pústulas eritematosas en la cara. El diagnóstico de leishmaniasis causada por *L. infantum* fue corroborado por análisis PCR. Las lesiones, grandes y difusas no respondieron anteriormente a tratamientos locales, sistémicos, o i.v. parenteral y se trataron con anfotericina B liposómica, la cual mejoró los síntomas clínicos. El diagnóstico diferencial de úlceras múltiples debe incluir diferentes enfermedades de la piel como la CBC cutánea, úlceras bacterianas, úlceras traumáticas, etc (15).

1.8.4.2 Leishmaniasis atípica

En los últimos tiempos, se ha descrito una forma de leishmaniasis cutánea atípica (LCA) con lesiones más circunscritas y no ulceradas, por largos períodos de tiempo, cuya cepa etiológica es la *Leishmania chagasis*, que puede evolucionar a la forma visceral de la enfermedad en estados de inmunodepresión tales como embarazo, otras infecciones, etc. Esta nueva forma clínica de la enfermedad ha sido reportada en países centroamericanos como Honduras Costa Rica y Nicaragua(16).

Se ha informado que la resistencia del hospedero al parásito en la leishmaniasis está asociada con el desarrollo de la respuesta inmunológica celular específica mediada por los linfocitos CD4, la cual es regulada a través de un estado supresor que se evidencia en una respuesta moderada a los antígenos de *Leishmania* y a la presencia de mecanismos supresores en la enfermedad, en lo cual influye grandemente un cambio del en la respuesta linfocitaria del patrón Th1 (con predominio de la liberación de interferón gamma e interleucina 2) al Th2 (con predominio de la liberación de las interleucinas 4 y 10)(16).

En estudios histopatológicos se ha comprobado la presencia de infiltración de linfocitos T en las lesiones cutáneas o granulomas, lo cual puede disminuir las células CD4 circulantes en sangre periférica; la mayoría de estos enfermos presenta un estado nutricional deficiente que favorece una insuficiente respuesta inmune celular así como susceptibilidad a la infección parasitaria. Los mecanismos secundarios de inmunosupresión inespecífica pueden favorecer o coadyuvar en su

conjunto el estado de inmunodepresión que se observa en esta enfermedad infecciosa crónica(16).

En la LCA las lesiones mucocutáneas más pequeñas y no ulceradas podrían explicarse por una respuesta inmune celular específica más conservada y un estado supresor menos severo en el curso de ésta, lo cual no ha sido referido en la literatura(16).

1.8.4.3 Leishmaniasis cutánea difusa

Descrita por primera vez en Venezuela por Convit y Lapenta. (17) Se caracteriza por una falta de respuesta mediada por células y la producción de anticuerpos no protectores, clínicamente por aparición de pápulas, placas o nódulos eritematosos, las lesiones no tienden a ulcerarse a menos que sufran traumatismos. .

Las deficiencias en citocinas y señales accesorias en la epidermis, afectan las células presentadoras de antígeno e inducen una anergia parásito específico, lo que impide la formación de un granuloma capaz de resolver la enfermedad y las citocinas de las lesiones contribuyen a la persistencia del parásito(17).

La leishmaniasis cutánea difusa puede ser una manifestación clínica común cuando la leishmaniasis y el SIDA co-ocurren. Su tratamiento es difícil y debe incluir un fármaco antiparasitario, así como profilaxis y terapia anti-retroviral. Amastigotes de Leishmania no son Gomory-positivas y se diferencian del histoplasma por morfología, cultivo, inmunohistoquímica, la respuesta de anticuerpos específicos y PCR. En la co-infección leishmaniasis- SIDA se benefician ambos gérmenes(18).

1.9 Diagnóstico de la leishmaniasis.

La *Leishmania* no puede ser diagnosticada solamente mediante la observación de los signos clínicos por las siguientes razones:

Los pacientes examinados podrían estar aparentemente sanos y estar incubando la leishmaniasis permaneciendo asintomáticos(19).

Cuando los signos clínicos están presentes no son específicos y pueden enmascarar otras enfermedades(19).

Se han descrito formas atípicas de leishmaniasis. Algunos casos presentan dermatitis localizada, colitis crónica y otros desórdenes, lo que complica el diagnóstico clínico aún más(19).

Test de laboratorio

El diagnóstico definitivo de la leishmaniasis es difícil. Los signos clínicos son variables como hemos descrito anteriormente, la histopatología es similar a otras enfermedades inmunomediadas y no existe un test diagnóstico 100% específico disponible. En el diagnóstico final se deben tener en cuenta varios métodos diagnósticos diferentes(19).

Los métodos diagnósticos usados para la leishmaniosis son:

1. Parasitológico: examen microscópico y cultivo.
2. Serológico: detección de anticuerpos.
3. Molecular: amplificación del ADN del parásito(19).

Diagnóstico diferencial

Es importante realizar un diagnóstico diferencial cuidadoso con otras entidades que pueden producir lesiones semejantes. Se debe considerar el medio geográfico donde se encuentra trabajando el paciente y cuales son las patologías más frecuentes en esa zona, que podrían confundirnos con leishmaniasis(11).

Leishmaniasis cutánea: infecciones de piel ocasionadas por bacterias piógenas, úlceras por vasculopatía, lepra lepromatosa, tuberculosis, sífilis secundaria o terciaria, micosis superficiales, sarcoidosis y carcinomas de piel(11).

Leishmaniasis mucocutánea: infecciones de mucosas ocasionadas por paracoccidioidomicosis, histoplasmosis, tuberculosis nasal, sífilis terciaria, granuloma letal de la línea media, pian, hanseniasis y neoplasias(11).

Leishmaniasis visceral: infecciones infantiles como malaria crónica, linfomas, esprue tropical y leucemias. En Perú no ha sido reportada esta forma clínica, pero existen en países limítrofes como Brasil, Bolivia y Colombia(11). Ver anexo 5 figura 9

Método parasitológico

Consiste en la demostración de los amastigotes con tinción Giemsa en médula ósea o en aspirado de los nódulos linfáticos. El test es rápido y barato, tiene una alta especificidad pero poca sensibilidad.

Los promastigotes pueden ser detectados en cultivos de nódulos linfáticos y aspirado de la médula ósea. La sensibilidad del cultivo depende de:

- Tipo de medio usado (el medio agar-sangre bifásico es el más eficiente).
- El número de viales de cultivo usados (unas pocas gotas de aspirado distribuido entre varios viales nos da los mejores resultados).

- El número de muestras tomadas (los múltiples aspirados de varios nódulos infartados incrementan la sensibilidad).

Podemos usar el diagnóstico histopatológico si la *Leishmania* está presente(19).

En el diagnóstico parasitológico hay dos alternativas. La primera es demostrar que el paciente está albergando la *Leishmania*, mediante la visualización, en el frotis o en la histopatología, de amastigotes en tejidos infectados. La segunda opción es intentar el aislamiento directo de los promastigotes en cultivos in vitro de las lesiones sospechosas (10).

Otro método empleado es la inoculación de animales de laboratorio (hámsters dorados) y ratones isogénicos y no isogénicos, a partir de los que se puede aislar y caracterizar a la *Leishmania* a través de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), anticuerpos monoclonales y/o electroforesis de isoenzimas(11).

Investigación de amastigotes

- En las lesiones cutáneas

La úlcera es la más frecuente presentación clínica de la LTA. Independientemente de la especie de *Leishmania* causante, las lesiones, por lo general, se encuentran contaminadas por hongos, bacterias o mico bacterias. Por ello, se debe realizar una buena asepsia, previa a la toma de muestra. Cuando los parásitos circulantes en el área endémica pertenecen al subgénero Viannia, la eficiencia de visualización y aislamiento es menor en los frotis si se compara con las *Leishmania*s del subgénero *Leishmania*, debido a las densidades parasitarias de 18 a 52% y de 30 a 40%, respectivamente(11).

La positividad de la histopatología con hematoxilina-eosina está alrededor del 48% en el Perú [29]; sin embargo, existen reportes de que en Brasil solo se alcanza entre 18 y 28% en leishmaniasis cutánea. La técnica de inmunoperoxidasa indirecta (IMPI) es muy eficiente en la observación y localización del parásito, con 61% de positividad, y si la lesión tiene menos de 3 meses de evolución, puede alcanzar el 75%(11).

- En las lesiones mucosas

En relación con las formas mucosas únicas o múltiples, los procedimientos generalmente utilizados son la biopsia con ayuda de pinzas cortantes especiales (cutting biopsy punch) y los frotis de las biopsias. La *L. (V) brasiliensis* es difícil de diagnosticar en los granulomas mucosos. Llanos-Cuentas en Perú, reporta 48% de positividad en lesiones mucosas únicas y 72,7% en lesiones múltiples, mientras que Cuba, en Brasil, halla 27,4% en los frotis de las biopsias y 16% en la histopatología. Estos resultados son opuestos a los de Dimier-David, en Bolivia, que publicó una positividad de 17,7% para los frotis y 28,4%, para la histopatología. Marsden llama la atención que

es más fácil detectar los parásitos en lesiones mucosas múltiples, que en lesiones únicas de *L. (V) brasiliensis*, lo cual también fue reportado por Dimier-David(11).

Investigación de promastigotes

De las fases evolutivas de *Leishmania*, la forma promastigote es la más fácil de ser cultivada in vitro, en ella se hacen la mayoría de las investigaciones parasitológicas(11).

Ya en la década del 70, era opinión generalizada que los parásitos pertenecientes al hoy, subgénero *Viannia* (complejo *brasiliensis*), eran difíciles de cultivar. Este hecho era completamente opuesto a la facilidad con que se cultivaban las *Leishmanias* del subgénero *Leishmania* (complejo mexicana) en cualquier medio agar sangre. Hoy sabemos que no existe un único medio de cultivo artificial capaz de reunir características tales que consiga cumplir los objetivos enunciados. Por tanto, es recomendable que cada área endémica de LTA, ensaye primero algunos medios conocidos por su sensibilidad. Esto permitirá una mayor eficiencia futura en el aislamiento de los parásitos que circulan en el foco de transmisión. Los medios de cultivo empleados pueden ser monofásicos (Eagle, MEM, 19TC, el medio RPMI 1640 y el Schneider), o bifásicos (Agar sangre-NNN, Agar sangre USAMRU, medio de Senekjie)(11).

Métodos de cultivo

Aislamiento primario de las lesiones cutáneas

La sensibilidad del método está directamente relacionada con la correcta selección que hagamos del medio más apropiado y con la habilidad del investigador para escoger el lugar de la lesión que sea la de mayor actividad parasitaria (la que sólo surge después de años de experiencia y práctica). Para la recolección de la muestra para el cultivo, podemos usar la técnica de aspiración de las lesiones por el procedimiento descrito por Hendricks o a través de una biopsia punch y posterior triturado en una solución de suero fisiológico y antibióticos. Es importante señalar que la excesiva presencia de sangre en las muestras colectadas es perjudicial para el desarrollo del parásito. Según Evans, la sangre contiene proteínas séricas altamente inhibitorias para el crecimiento de los promastigotes de Leishmania(11).

Aislamiento primario de las lesiones mucosas.

Es bastante difícil aislar *Leishmania* de los granulomas mucosos, en medios de cultivo, tanto por la contaminación de bacterias y hongos ambientales como del huésped. Por ello los cultivos deben contener antifúngicos (5-fluorocitosina) y antibióticos (gentamicina y estreptomicina) a 4°C durante 24 horas. Esto se realiza previo a la inoculación de los tubos de cultivo. Sin embargo, la eficacia es poco significativa. El mejor hallazgo lo reporta Cuba en Brasil con 30%, mientras que Dimier-

David, en Bolivia, consiguió 23% de positividad en medio NNN complementado con Schneider y antibióticos(11).

Uso de la inoculación en hámsters en el diagnóstico de LTA

Con el empleo de este método, Cuba reporta 60% de positividad en animales inoculados con la suspensión de la biopsia triturada, y de solo aproximadamente 35%, cuando proceden a aspirar con aguja y jeringa las lesiones e inmediatamente inoculan los animales. En Perú, Llanos-Cuentas reporta 69,9% de positividad. Para comprobar el parasitismo del hámster inoculado no basta hacer un simple frotis del lugar clínicamente positivo, es necesario cultivar, ello porque el frotis apenas demostrará 25% de animales con amastigotes(11).

En la leishmaniasis, tanto cutánea como mucosa, el éxito en el aislamiento es inversamente proporcional al tiempo de duración de la enfermedad. Se debe admitir que no existe una técnica de aislamiento que reúna todas las características necesarias a fin de diagnosticar parasitológicamente el 100% de los pacientes con LTA. La opinión generalizada es que el máximo rendimiento se consigue con la combinación de 2 ó 3 de ellas. Si a esto se asocian la prueba de Montenegro y la serología por Elisa, el diagnóstico de laboratorio de LTA puede llegar al 90,0%(11).

Método serológico o inmunológico

Los test serológicos son una herramienta importante para el diagnóstico debido a que clínicamente se desarrollan altos niveles de anticuerpos circulantes (19).

Test serológicos usados: (19)

- Test de fijación del complemento
- Test de hemoaglutinación indirecta
- Test de aglutinación en látex
- Test de aglutinación directa
- Contador inmunoelectroforesis
- Inmunofluorescencia indirecta
- Ensayo inmunosorbente de la unión-enzima ó ELISA
- Inmunoensayo oro coloidal
- Western blot

Estas técnicas se diferencian en el tipo de antígeno de *Leishmania* utilizado y en su facilidad de uso, algunos son sencillos de usar mientras que otros requieren un buen equipamiento de laboratorio.

En general IFAT (considerado el "gold standard"), ELISA, test de aglutinación directa y Western blot dan los resultados más satisfactorios(19).

Se basan en la detección de la enfermedad a través de la respuesta inmune celular (intradermorreacción de Montenegro o leishmanina) y/o respuesta inmune humoral a través de anticuerpos específicos desarrollados como consecuencia de la enfermedad (Elisa/DOT Elisa, inmunofluorescencia indirecta (IFI) (10).

Intradermorreacción de Montenegro

Es una reacción de hipersensibilidad tardía que evalúa la inmunidad mediada por células. Consiste en la aplicación de un antígeno extracto soluble preparado a partir de promastigotes procedentes de cultivo. Se aplica intradérmicamente en la cara anterior del antebrazo izquierdo del paciente y se hace la lectura a las 48 a 72 horas. Se considera positiva si es mayor de 10 mm. La prueba aparece positiva 1 a 3 meses después de haber adquirido la infección y permanece positiva de por vida en pacientes con LCL y LCM, y es negativa en los pacientes con LCD, forma visceral y en inmunosuprimidos. Tiene un 96% de positividad en los tres primeros años de iniciada la enfermedad(11).

Inmunofluorescencia indirecta (IFI) y pruebas enzimáticas Elisa

Estas pruebas detectan anticuerpos antileishmania circulantes en el suero del paciente a títulos bajos. En las lesiones ulceradas por L. (V) brasiliensis la sensibilidad a la IFI está en torno del 70% dentro del primer año de iniciada la enfermedad. Algunos pacientes son persistentemente negativos(11).

Las lesiones múltiples, tanto cutáneas como mucosas, están asociadas a títulos más altos. De otro lado, las lesiones mucosas presentan títulos más altos que las lesiones cutáneas y muestran títulos elevados persistentemente (11).

Después del tratamiento y la cura clínica en ambas formas de la enfermedad, los títulos caen o desaparecen completamente. Un tercio de los pacientes permanecen seropositivos después de los 30 años de enfermedad (11).

La primera muestra debe recolectarse en el primer contacto con el paciente, la segunda al mes, la tercera a los 3 meses, otra a los 6 y la última al año de la cicatrización de la lesión(11).

Métodos moleculares

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) ó "Reacción en cadena de la Polimerasa". Esta técnica es muy útil para el diagnóstico de la leishmaniasis, el seguimiento de los pacientes durante y después del tratamiento y la identificación de la especie de *Leishmania* (19) y se está usando

rutinariamente para confirmar el diagnóstico de leishmaniasis. La identificación puede ser hecha de una biopsia sin requerir necesariamente un cultivo. Los resultados comparativos entre la PCR y los métodos de detección parasitológicos muestran una mejor sensibilidad del primero para fines de diagnóstico (10).

La detección del ADN de la Leishmania es posible en la médula ósea y los aspirados de los nódulos linfáticos al igual que en sangre (la sensibilidad podría ser menor con muestras de sangre). La sensibilidad y especificidad de este método es alta. La sensibilidad es tan alta que los parásitos pueden ser detectados en pacientes que han estado clínicamente sanos en varios años. Para la realización de estas pruebas es necesario tanto un buen equipamiento de laboratorio como el empleo de técnicas avanzadas(19).

Xenodiagnóstico

Se ha utilizado para detectar la leishmaniasis visceral en los pacientes inmunodeprimidos. Esta técnica consiste en dejar que flebótomos procedentes de una colonia de laboratorio piquen e ingieran sangre de un posible paciente para, al cabo de unos días, proceder a su disección y observar la posible presencia de *Leishmanias* en su tubo digestivo. Si bien esta técnica tiene una elevada sensibilidad, presenta el inconveniente de precisar de colonias de laboratorio de especies de flebótomos susceptibles a la especie de *Leishmania* que se encuentra en la zona geográfica, colonias que son de difícil establecimiento y mantenimiento, por lo que es una técnica aplicable únicamente en centros de referencia capacitados(13).

1.10 Tratamiento

1.10.1 Estado actual del tratamiento farmacológico de la leishmaniasis

Ciertas formas de leishmaniasis cutánea no necesitan tratamiento al ser autolimitadas; sin embargo, la leishmaniasis visceral (sintomática o no) y la mucocutánea sí lo precisan. Los fármacos de elección clásicamente han sido los antimoniales pentavalentes y la pentamidina. La aparición de resistencia y/o mala respuesta de *Leishmania sp*. a estos compuestos y la necesidad de un tratamiento con menos efectos adversos ha animado a trabajar en la búsqueda de nuevos fármacos antileishmaniásicos. Por otro lado, la mayor frecuencia de leishmaniasis visceral en pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), generalmente con pobre respuesta al tratamiento convencional y frecuentes recidivas, ha estimulado el uso de alternativas al tratamiento convencional (20).

- Antimoniales pentavalentes

En 1912 se trató en Brasil el primer caso de leishmaniasis cutánea con un antiemético antimonial trivalente. A partir de 1920 se dispuso de antimoniales pentavalentes y desde 1945 del estibogluconato sódico. Los dos antimoniales pentavalentes con que contamos en la actualidad son el estibogluconato sódico o gluconato de antimonio sódico, que se emplea sobre todo en los países de habla inglesa, y el antimoniato de meglumina en los países de habla hispana y francesa. Ambos fármacos sólo disponibles por vía parenteral(20).

Los antimoniales inhiben la glucólisis y la oxidación de los ácidos grasos, e inducen la disminución de la biosíntesis energética del amastigote, aunque el mecanismo antiparasitario no se conoce con profundidad. Las condiciones farmacocinéticas y de utilización del estibogluconato por parte de los amastigotes a partir del estibogluconato sódico y antimoniato de meglumina son similares. Después de la administración de 10 mg de estibogluconato/kg intramuscular, ambos fármacos alcanzan una concentración sanguínea de 10 µg de estibogluconato/ml y presentan una fase de excreción rápida (vida media de 2 horas) y otra lenta (vida media de 76 horas) (20).

Los efectos adversos de los antimoniales, como dolor abdominal, náuseas, vómitos, malestar general, cefalea, debilidad, mialgias, artralgias, fiebre o exantema, no son despreciables (14). Con dosis acumuladas elevadas se observan frecuentemente alteraciones electrocardiográficas: aplanamiento o inversión de la onda T, prolongación del segmento QT o elevación del ST. Un segmento QT corregido superior a 0,5 segundos o un ST elevado obligan a interrumpir el tratamiento (15), con lo que desaparecen estos cambios electrocardiográficos. También durante el tratamiento puede aparecer elevación de las enzimas hepatocelulares y pancreáticas, con o sin pancreatitis; por consiguiente, la miocarditis, la hepatitis y la pancreatitis contraindican de forma relativa el uso de antimoniales (21).

En la leishmaniasis visceral, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendaba emplear 20 mg de estibogluconato/kg/día, con una dosis máxima de 850 mg durante 20 días o hasta 2 semanas después de la eliminación del parásito. En la actualidad no se aconseja limitar la dosis máxima, ya que la respuesta es superior a mayores dosis y duración del tratamiento, si bien los efectos adversos también son discretamente superiores(20).

La respuesta al tratamiento varía según la especie de *Leishmania* (por ejemplo, *L. aethiopica* generalmente es resistente a los antimoniales), el estado inmunitario del paciente, la forma clínica y la evolución de la enfermedad. En el tratamiento de la leishmaniasis cutánea se deben emplear 20 mg de estibogluconato/día durante 20 días. En caso de pobre respuesta puede prolongarse el tratamiento. En las lesiones poco extensas ciertos autores proponen la administración de antimoniales intralesionales. En la leishmaniasis mucocutánea y en la visceral

se recomienda la misma dosis que en la cutánea durante 28 días. Los pacientes que no responden a un primer ciclo de tratamiento pueden recibir un segundo(20).

Para Thakur y colaboradores, el tratamiento de la leishmaniasis visceral con antimoniales en India debería prolongarse durante 40 días. En la leishmaniasis cutánea tras kala-azar el tratamiento con antimoniales debe mantenerse durante 4 meses. Aunque no hay ensayos clínicos amplios que comparen la eficacia clínica del estibogluconato sódico con la del antimoniato de meglumina, algunos expertos opinan que este último es más eficaz y tiene más efectos adversos que el estibogluconato sódico(20).

Modo de acción: Los antimoniales pentavalentes inoculados en el paciente para poder ejercer su acción tienen que convertirse en trivalentes en el interior de los macrófagos; estos antimoniales trivalentes reaccionan con los grupos sulfhidrilos del parásito, dando como resultado la inhibición de la glucólisis y la oxidación de ácidos grasos, con lo que se reduce la formación de energía (ATP)(22).

El fracaso del tratamiento de las leishmaniasis visceral y mucocutánea y algunas formas de leishmaniasis cutánea es un problema en algunas áreas endémicas como India, Kenia o Brasil. Puede deberse a reinfección, anomalías inmunológicas o fisiológicas del huésped o a la resistencia del parásito a los antimoniales. El fracaso clínico y/o microbiológico en los pacientes VIH positivos con leishmaniasis visceral tratados con antimoniales oscila entre el 25% y el 60%, y los que responden pueden recidivar. Esta peor respuesta al tratamiento de los pacientes VIH positivos puede deberse a una menor producción de linfocinas, como interferón-gamma e interleucina-1, y/o menor capacidad microbicida de los monocitos que permite una mayor viabilidad de los amastigotes en el macrófago. En algunos casos el tratamiento falla como consecuencia de la resistencia de *L. donovani* a los antimoniales(20).

Con el paso de los años, la resistencia a los antimoniales probablemente será más frecuente como consecuencia del uso extensivo e inadecuado de los antimoniales en animales domésticos (reservorio en la cuenca mediterránea), y en India por el mal uso de estos fármacos en el hombre, único reservorio conocido en esta área geográfica(20).

- **Miltefosina**

La miltefosina es un compuesto antimonial descubierto en el Instituto Max Planck de Gottingen por los profesores Hans Eibl y Clemens Unger, y desarrollado como medicina humana por Aeterna Zentaris en colaboración con la OMS(23).

Su actividad frente a *Leishmania* fue descrita por primera vez *in vitro* e *in vivo* en 1987, y su actividad oral en modelos de leishmaniasis visceral en roedores se documentó en 1992. Los

primeros informes de ensayos clínicos para el tratamiento de la leishmaniasis visceral en la India aparecieron en 1998. Miltefosina (ImpavidoR) fue registrada para el tratamiento de la leishmaniasis visceral humana en la India en marzo de 2002, y en Alemania en 2004. La miltefosina representa el primer agente oral eficaz registrado contra la leishmaniasis. Virbac, en colaboración con Aeterna Zentaris, ha desarrollado una formulación específica para uso veterinario en Europa: MilteforanR(23).

Múltiples ensayos indican que la miltefosina ejerce su efecto frente a *Leishmania sp.* dirigiéndose a las vías metabólicas fosfolipídicas del parásito (efectos directos en el metabolismo de fosfatidilinositol). La miltefosina es ligeramente lipofílica e hidrofóbica, y por ello capaz de penetrar membranas celulares y causar un rápido intenso metabolismo de de los compuestos éter-fosfolípidos en especies de *Leishmania(24-25)*. La miltefosina interrumpe las vías de señalización celular y la síntesis de la membrana celular del parásito(26) a través de los siguientes métodos:

• Inhibe la biosíntesis de fijadores GFI (glicosil-fosfatidil-inositol) – un complejo que fija moléculas superficiales claves para la supervivencia intracelular de los amastigotes de *Leishmania(27-28)*.

• Perturba la transducción de la señal actuando sobre la fosfolipasa C y la protein-kinasa C(29) especificas de la *Leishmania* – enzimas que desempeñan un papel crítico en la regulación y el control del crecimiento y la diferenciación celular del parásito.

• Inhibe la biosíntesis de la fosfatidilcolina – una molécula clave en la bicapa lipídica de la membrana celular de *Leishmania*.

A causa de estos efectos en las vías mitogénicas del parásito, miltefosina finalmente induce una muerte celular similar a la apoptosis(30). También se cree que puede activar ciertas funciones inmunes(28, 31).

- **Pentamidina**

La pentamidina es una diamidina con acción frente a ciertas especies de *Leishmania*, *Pneumocystis carinii* y *Trypanosoma brucei gambiense*. Aunque el mecanismo de acción no está bien definido, parece que interfiere con el metabolismo nuclear por inhibición de la síntesis de poliamina, ADN, ARN, fosfolípidos y proteínas del kinetoplasto en el protozoo(2, 20). La pentamidina se une a los tejidos y se excreta de forma prolongada en el tiempo, lo que permite su administración en días alternos. Este fármaco está disponible sólo por vía parenteral y con frecuencia produce efectos adversos (aproximadamente un 50% de los casos) como taquicardia, hipotensión, náuseas, vómitos, mareos, exantema, enrojecimiento facial y sabor metálico. En el 6% a 9% de los pacientes produce hipoglucemia como resultado de la destrucción de las células del páncreas, y excepcionalmente hiperglucemia y diabetes mellitus. Para prevenir la

hipoglucemia, la pentamidina de uso intravenoso debe diluirse en suero glucósido e infundirse lentamente. El deterioro de la función renal aparece hasta en un 25% de los pacientes tratados. Otros efectos adversos, como leucocitopenia, trombocitopenia, elevación de aminotransferasas, fiebre, hipocalcemia, confusión, alucinaciones y arritmias ventriculares, son menos frecuentes. La administración intramuscular con frecuencia produce dolor, inflamación y abscesos estériles(20).

En la leishmaniasis visceral, con la administración de 4 mg/kg/48 horas de pentamidina durante 15-20 días se consigue una tasa de curaciones en torno al 80%; a bajas dosis y durante menos días (2 mg/kg/48 horas durante 14 días) se ha empleado con éxito (tasa de curación 95%) en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea y de la mucocutánea en Sudamérica. Según estos resultados, la pentamidina continúa siendo una valiosa alternativa en las distintas formas clínicas de leishmaniasis(20).

- **Pirazolopirimidinas**

El alopurinol, principal pirazolopirimidina, inhibe in vitro e in vivo a *Leishmania sp.* y *Trypanosoma cruzi.* El metabolismo de las purinas en el kinetoplasto de estos protozoos difiere sustancialmente del humano. El alopurinol se transforma en nucleósidos tóxicos que bloquean la síntesis proteica y rompe el RNA en estos protozoos.

Este fármaco es bien tolerado, aunque en ocasiones puede desencadenar eosinofilia, erupción cutánea tenue o reacciones de hipersensibilidad como síndrome de Stevens-Johnson, necrólisis epidérmica tóxica o hepatotoxicidad. La principal limitación del alopurinol en el hombre es su rápido metabolismo por la enzima xantino-oxidasa, por lo que se necesitan grandes concentraciones de alopurinol para interferir el crecimiento de *Leishmania sp*. En la actualidad se trabaja en otros derivados de las pirazolopirimidinas con lenta metabolización, como el ribonucleósido de alopurinol(20).

In vitro, el alopurinol y los antimoniales presentan actividad sinérgica frente a *Leishmania sp.* En la leishmaniasis visceral, la asociación de alopurinol (20 mg/kg/día) y estibogluconato sódico se ha mostrado eficaz en pacientes que no respondían a ellos por separado. En pacientes con SIDA, la administración de antimoniato de meglumina con alopurinol (20 mg/kg/día en tres dosis) permitió la curación clínica y microbiológica en 4 de los 5 pacientes tratados durante 4 semanas y en 1 de los 6 que recibieron tratamiento durante 3 semanas. Otros autores han obtenido buenos resultados con esta asociación en pacientes VIH positivos, pero la combinación no previene las recidivas en estos enfermos(20).

Recientemente, Martínez y Marr han observado, en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea por *L. panamensis*, una mayor eficacia del alopurinol solo (20 mg/kg/día durante 15 días; curación

80%) o asociado a antimoniato de meglumina (74%) en comparación con solo antimoniato de meglumina (36%). Herwaldt y colaboradores cuestionan estos resultados(20).

Se ha comunicado un caso de leishmaniasis cutánea por *L. tropica* tratado con éxito con una dosis baja de alopurinol (300 mg/día). Y en un estudio realizado en Irak (51), el tratamiento con alopurinol (20 mg/kg/día durante 30 días) y antimoniato de meglumina (70 mg/kg/día durante 15 días) fue eficaz en 24 de 25 pacientes (96%) con leishmaniasis cutánea recidivante(20).

- **Anfotericina B**

La anfotericina B es un potente antifúngico eficaz en la leishmaniasis. Su mecanismo de acción antileishmaniásico se desconoce, pero probablemente interfiere en la integridad de la membrana del protozoo. En los hongos, se une al ergosterol de la membrana formando poros por donde se pierden potasio, electrólitos y pequeñas moléculas, provocando la muerte del microorganismo. El modo de acción antileishmaniásico puede ser similar(20). La mayor afinidad de la anfotericina B hacia el ergosterol, un esterol encontrado en las membranas de los hongos es la clave de su acción antifúngica. Sin embargo, como el fármaco se une también al colesterol (esterol preferente de las membranas de las células humanas) la anfotericina B presenta algunos efectos tóxicos, en particular a nivel renal. (13)

La administración de desoxicolato de anfotericina B (la presentación convencional) con frecuencia comporta deterioro de la función renal, hipopotasemia, acidosis tubular renal, anemia, náuseas, vómitos y una reacción durante la perfusión consistente en fiebre, escalofríos y taquicardia. Estos últimos síntomas pueden prevenirse o aminorarse si se administra previamente hidrocortisona, paracetamol y/o antihistamínico (17).

La anfotericina B se había usado raramente en la leishmaniasis, si bien actualmente se emplea como alternativa a la pentamidina o a los antimoniales en el tratamiento de la leishmaniasis visceral. La administración de 1 mg/kg de anfotericina B al día o en días alternos hasta alcanzar la dosis total de 20 mg/kg ha permitido la curación de todos los casos de leishmaniasis visceral tratados por Thakur y colaboradores en India. Asimismo, Mishra y colaboradores emplearon 0,5 mg/kg de anfotericina B en días alternos durante 28 días (dosis máxima de 8 mg/kg) en pacientes que no habían respondido a antimoniales y lograron una curación inicial del 100% y definitiva del 98%. En los pacientes con infección por VIH y leishmaniasis visceral, el tratamiento con 0,7 mg/kg/día durante 28 días ha mostrado una tasa de respuesta al tratamiento similar a la obtenida con antimoniales (17).

El inconveniente de la anfotericina B es su costo, casi el doble que el de los antimoniales y sus efectos adversos. Para reducir su toxicidad se ha empleado, con buena tolerancia, diluida en

emulsión lipídica parenteral (Intralipid® al 10%). Thakur administró anfotericina B en Intralipid® 10% y en suero glucosado al 5% a 22 pacientes con leishmaniasis visceral, y observó que la anfotericina B en Intralipid® 10% presentaba la misma eficacia clínica y menor toxicidad, pero con costes superiores a la anfotericina B en suero glucosado al 5% (17).

Existen tres formulaciones de este fármaco en componentes lipídicos que pretenden mejorar el índice terapéutico de la presentación convencional: anfotericina B con dispersor coloidal, en complejo lipídico y liposomal. Esta última es la más utilizada en general y en la leishmaniasis en particular (17).

En la presentación liposomal, los liposomas unilamelares están formados por lecitina de soja hidrogenada, colesterol, diestearoilfosfatidil glicerol y anfotericina B en una proporción molar 2:1:0,8:0,4 y tienen un tamaño inferior a 100 nm. Esta formulación, por su tamaño y naturaleza lipídica, permite una mejor penetración de la molécula activa dentro del macrófago (donde residen los amastigotes) (32-33). En modelos animales, el 20% a 40% de la dosis administrada de anfotericina B liposomal penetra en el hígado y el bazo y permanece en éstos durante unas dos semanas, lo que permite administrarla en dosis intermitentes(20).

La forma liposomal se ha mostrado activa en experimentación animal y en casos aislados de leishmaniasis visceral que no respondían a los antimoniales. En la actualidad se dispone de varios estudios sobre el tratamiento con anfotericina B liposomal a distintas dosis y pautas en la leishmaniasis visceral, tanto en pacientes inmunocompetentes como inmunodeprimidos (con o sin infección por VIH), con buenos resultados. La dosis ideal probablemente dependa de la cantidad de parásito que infecta el sistema reticuloendotelial. Para Davidson y colaboradores, la dosis total de anfotericina B liposomal aconsejable sería de 20 mg/kg en 5 o más dosis de 3-4 mg/kg repartidas en 10 o más días (días 1, 2, 3, 4, 5 y 10). En los pacientes VIH positivos con leishmaniasis visceral, la administración de anfotericina B liposomal a dosis de 1,38 a 1,85 mg/kg/día durante 21 días o 4 mg/kg/día en los días 1, 2, 3, 4, 5, 10, 17, 24, 31 y 38 curó la infección en todos los casos, pero con una tasa de recidivas del 73% (8 de 11) y 60% (6 de 10 pacientes), respectivamente. Para prevenir las frecuentes recidivas, Lazanas y colaboradores recomiendan la profilaxis secundaria con 100 mg de la forma liposomal dos veces al mes. En general, el tratamiento con la presentación liposomal es bien tolerado; los pacientes pueden presentar mínimos síntomas, como cefalea, dolor abdominal, náuseas o erupción maculopapular y discreta elevación del nitrógeno ureico en aquellos con insuficiencia renal previa(20).

El principal obstáculo del tratamiento con anfotericina B liposomal es el costo que constituye un factor realmente importante en los países subdesarrollados. Para un paciente de 30 kg, el

tratamiento cuesta entre 25.000 y 312.000 pesetas según el preparado comercial y el esquema terapéutico empleado. El costo de la ocupación hospitalaria (aproximadamente 29.000 pesetas), varía entre 5 y 15 días o incluso más(20).

La presentación encapsulada en una estructura lipídica formada por partículas con forma de disco de sulfato de colesterol y anfotericina B (proporción molar 1:1) con un tamaño de 115 x 180; 4 nm es 15 veces más eficaz en la leishmaniasis experimental que la forma de presentación clásica. En dos estudios realizados en sujetos con leishmaniasis visceral en Brasil se produjo la curación en 19 de los 20 pacientes tratados con 2 mg/kg/día durante 7 y 10 días (dosis total 14 mg/kg y 20 mg/kg, respectivamente) y en 9 de los 10 pacientes tratados con 2 mg/ kg/día durante 5 días (dosis total 10 mg/kg). En los primeros días los pacientes presentaban frecuentemente fiebre y escalofríos, que mejoraban con la administración de diclofenaco(20).

La anfotericina B complejo lipídico se ha empleado en pacientes peruanos con leishmaniasis mucocutánea y ha presentado escasos efectos tóxicos, pero ha resultado menos eficaz que la forma convencional. Faltan estudios amplios que evalúen la relación entre eficacia y toxicidad de los diferentes preparados de este fármaco en las distintas formas de leishmaniasis(20).

In vitro, la anfotericina B es activa contra muchos hongos patógenos. Algunos protozoos sensibles son *Leishmania braziliensis*, *L donovani*, *L. mexicana*, y *Naegleria fowleri.* Ocasionalmente, la Acanthamoeba castellanii y A. polyphaga son susceptibles a la anfotericina B. La mayoría de las cepas son inhibidas a concentraciones de 0,03-1,00 mg/ml. Este fármaco tiene una baja o nula actividad contra bacterias y virus(34).

- **Imidazoles**

El ketoconazol es uno de los fármacos de elección en infecciones candidiásicas con unas duraciones del tratamiento muy variables: desde cinco días en una candidiasis vaginal hasta un año en las onicomicosis candidiásicas. También se puede utilizar en infecciones por histoplasmas y blastomicetos, y en algunos casos de coccidiomicosis y paracoccidiomicosis(20) .

Usado tópicamente presenta utilidad frente a algunos dermatofitos como *Trichophyton spp.*, *Epidermophyton spp.*, *Microsporum spp.* y frente a levaduras como la *Malassezia spp.* (*Pityrosporum spp.*). Esto lo hace eficaz ante la pitiriasis versicolor, la dermatitis seborreica y algunas tiñas. A altas dosis produce una supresión androgénica rápida, por lo que se emplea también como tratamiento de alguna de las complicaciones del cáncer de próstata diseminado(20).

El ketoconazol y el itraconazol son eficaces in vitro frente a *Leishmania sp.* Los imidazoles inhiben la desmetilación del lanosterol a ergosterol de la membrana del parásito interfiriendo su

biosíntesis. La dosis eficaz 50 del ketoconazol para los promastigotes oscila entre 1 y 2,5 µg/ml, y 5 a 10 veces más para los amastigotes intracelulares. Se necesitan altas dosis de este fármaco para alcanzar unas concentraciones aceptables frente a los amastigotes, ya que una dosis de 600 mg de ketoconazol alcanza un pico de 13,2 µg/ml. El ketoconazol a dosis altas eleva las enzimas hepatocelulares y la testosterona produce ginecomastia, dolor abdominal, exantema y disminución de la libido(20).

Diversos estudios han evaluado la utilidad del ketoconazol a altas dosis (600 mg/día) en la leishmaniasis cutánea. La eficacia depende de la especie que provoca la enfermedad. La infección causada por *L. braziliensis* y *L. panamensis* generalmente responde mal al ketoconazol, no así la infección por *L. mexicana*. Cuatro casos de leishmaniasis cutánea tras kala-azar tratados con 800 mg/día de ketoconazol respondieron entre los 6 y 9 meses, pero cursaron con marcados efectos adversos. En India, Wali y colaboradores trataron a 5 pacientes que padecían leishmaniasis visceral con ketoconazol (600 mg/día) durante 4 meses, de los que 4 curaron. También se ha informado de un paciente con leishmaniasis visceral que curó con la combinación de ketoconazol y alopurinol(20).

El itraconazol en dosis de 400 mg/día se ha empleado en el tratamiento de la leishmaniasis visceral con resultados contradictorios. En Kuwait se empleó entre 4 y 8 semanas con buenos resultados y en Colombia durante 4 semanas con malos resultados. Asociado a alopurinol no es eficaz en el tratamiento de la leishmaniasis visceral en pacientes VIH positivos, aunque es bien tolerado(20).

- **Interferón**

La producción de linfocinas como interleucina 2 e interferón gamma (IFN-γ) por parte de las células T está disminuida durante la infección por *Leishmania sp*. El IFN- γ mejora la capacidad de los macrófagos de reducir la carga parasitaria. In vitro actúa sinérgicamente con los antimoniales, y por ello se emplean generalmente asociados (88-90). En estudios con limitado número de pacientes, el tratamiento con IFN- γ (10^7 U/mg) 100 µg/m^2 en días alternos durante 10 y 30 días unido a antimoniales reduce la eliminación de parásito en sujetos con leishmaniasis cutánea (88) y visceral (89, 90), respectivamente. La administración conjunta no mejora la tasa de curación, pero permite reducir a la mitad la duración del tratamiento(20).

Sundar y Murray trataron a 9 pacientes con leishmaniasis sólo con IFN-γ (10^7 U/mg) 100 µg/ml en días alternos durante 20 días; en 5 se observó una disminución en el número de parásitos en el aspirado esplénico. Estos resultados refuerzan la tesis de que en caso de utilizar IFN-γ se asocien antimoniales(20).

Los inconvenientes del tratamiento con IFN-γ son su elevado coste y sus efectos adversos: fiebre y síntomas pseudogripales como escalofríos, fatiga, malestar general y cefalea y leucocitopenia. La primera desventaja es insalvable y los efectos indeseables se alivian con paracetamol y mejoran durante el tratamiento(20).

- **Aminoglucósidos**

Varios aminoglucósidos presentan actividad in vitro frente a *Leishmania sp*. , pero con eficacia clínica sólo la paromomicina o aminosidina. El sulfato de paromomicina es un antibiótico oligosacárido indicado en medicina humana y veterinaria para el tratamiento de infecciones intestinales causadas por amebas (*Entamoeba hystolitica)* y criptosporidiosis. En veterinaria se emplea para tratar la tuberculosis causada por organismos resistentes a los fármacos de primera línea. Es un medicamento huérfano que se indica también, desde 2005, para el tratamiento de la leishmaniasis visceral, su acción se debe a que es capaz de alterar el RNA mensajero del protozoo al inhibir la síntesis de proteínas uniéndose a la subunidad 16s(2, 20, 35).

Este fármaco no se absorbe por vía oral, por lo que debe administrarse por vía parenteral; se excreta por el riñón sin metabolizar e induce nefrotoxicidad y ototoxicidad, al igual que otros aminoglucósidos (17).

In vitro, la paromomicina y los antimoniales muestran efecto sinérgico frente a *Leishmania sp.* En el tratamiento de la leishmaniasis visceral se han utilizado diferentes combinaciones y tratamientos con buenos resultados. En Kenia se han empleado 15 mg/kg/día con 20 mg/kg/día de antimoniales durante 14 días, obteniendo la curación del 100% de los tratados (98); en Sudán, con la misma dosis de la combinación durante 15-17 días, la curación fue del 95%, y en India respondieron clínicamente el 88% de los tratados con 12 mg/kg/día de paromomicina más antimoniales (dosis estándar) durante 20 días. En estos estudios no se describen efectos adversos significativos, si bien no evaluaron adecuadamente la ototoxicidad, y presentan la posibilidad de usar la misma combinación para reducir la duración y toxicidad de los antimoniales (17).

La eficacia de la paromomicina parenteral sola en la leishmaniasis cutánea es menor que la de los antimoniales (100). La combinación de paromomicina (14 mg/kg/día) con estibogluconato sódico (100 mg/kg/día) fue eficaz en un pequeño número de pacientes con leishmaniasis cutánea difusa causada por *L. aethiopica*. La aplicación de paromomicina al 15% más clorhidrato de metilbencetonio al 5% y 12% durante 10-20 días en lesiones cutáneas causadas por *L. major* en Israel y de paromomicina en urea al 10% durante 15 días en la leishmaniasis cutánea en Túnez han presentado una tasa de respuestas completas cercana al 75%. En Colombia, la combinación

de paromomicina al 5% tópica durante 10 días (2 veces/día) con antimoniales (20 mg/kg/día) permitió la curación del 90% de los casos de leishmaniasis cutánea tratados (17).

- **Metronidazol**

El metronidazol es un derivado nitroimidazólico, sintético, que fue introducido en la terapéutica en el año 1959 para el tratamiento de infecciones producidas por *Trichomonas vaginalis*. Sin embargo, recién una década más tarde fue reconocida su actividad frente a gérmenes anaerobios. El tinidazol es otro nitroimidazol con igual espectro y mecanismo de acción, con la ventaja de tener una vida media mayor(36).

1.10.2 Otros tratamientos

El factor estimulante de colonias de la serie granulocítica y macrofágica (GM-CSF) moviliza los monocitos en sangre periférica, activa los macrófagos y reduce la granulocitopenia. Estos tres mecanismos intervienen en la defensa natural de la leishmaniasis visceral. En un limitado número de pacientes con leishmaniasis visceral causadas por *L. chagasi* se ha administrado GM-CSF (0,5 µg/kg) o placebo combinado con antimoniales. Los pacientes tratados con GM-CSF más antimoniales presentaron menor número de infecciones bacterianas y virales secundarias, con igual tasa de curación que los tratados con placebo (17).

La 8-aminoquinolina oral (WR6026), un derivado de la primaquina, es un fármaco con actividad frente a *L. donovani* en experimentación animal. En el hombre se ha mostrado eficaz en el tratamiento de la leishmaniasis visceral con mínima toxicidad (molestias gastrointestinales, cefalea y metahemoglobinemia). La dosis con mejor relación eficacia/toxicidad no se conoce, si bien parece que debería ser superior a 1 mg/kg/día durante 4 semanas (17).

Las sales de oro parenterales (20 mg/48 horas hasta completar 250 mg) se han usado en India para el tratamiento de la leishmaniasis visceral refractaria a antimoniales con buenos resultados (17).

Durante años se han empleado numerosos tratamientos sistémicos con resultados no homogéneos, como el palmoato de cicloguanil, el mebendazol, el metronidazol, el levamisol, la dapsona, la trimetoprima-sulfametoxazol, la furazolidona, el nifurtimox, inmunización con BCG o las combinaciones de isoniazida más rifampicina y monomicina más metiluracilo. En la leishmaniasis cutánea se han utilizado por vía tópica, además de la paromomicina y los antimoniales, otros compuestos como el aceturato de diminazeno, el ketoconazol, el miconazol o la clorpromazina, y por vía intralesional la triamcinolona, la bleomicina, el IFN-ð, la emetina o la dihidroemetina, con resultados variables, sin olvidar la importancia de medidas no farmacológicas como la exéresis quirúrgica, el láser o la criocirugía y el calor local (17).

1.10.4 Fármacos de uso tópico.

Existen fármacos que se emplean directamente para lograr acción local en las lesiones no complicadas de la leishmaniasis cutánea o difusa. El método tradicional consiste en inocular dentro de la lesión, antimoniales pentavalentes suministrando de manera intermitente por un periodo de dos a tres semanas. En general se administra un solo ciclo en el tratamiento del 75 % de los casos. El empleo de este tratamiento es más complicado en caso de lesiones múltiples o cuando las lesiones se manifiestan en sitios como el paladar o los labios por ser muy difícil el acceso dificultando seguir un ciclo completo de tratamiento. Estas interrupciones pueden provocar resistencia al fármaco en uso. Con el objetivo de desarrollar preparados que sean lo más eficaces posible se han estudiado formulaciones de uso tópico que contienen fármacos con diferentes grados de difusión a los tejidos. Algunas formulaciones que tienen como principio activo a la paromomicina son objeto de estudios clínicos controlados. Las lesiones causadas por L. mayor son tratadas por un espacio de 10 días utilizando un ungüento de parafina que contiene 15 % de paromomicina y 12 % de cloruro de metilbenzetonio. Las lesiones mejoran con mayor rapidez que aquellas que no son tratadas(37). Una formulación similar que emplea paromomicina y urea al 10% no demostró resultados satisfactorios al tratar en un estudio controlado casos de leishmaniasis cutánea producida por L. mayor(38-39).

Inmunomoduladores en la terapia de leishmaniasis.

El tratamiento de la Leishmaniasis es un tema por resolver. En la actualidad, y desde mediados del siglo pasado se usan drogas que requieren administración parenteral y prolongados tratamientos, presentando además, una serie de reacciones adversas que dificultan su utilización (cardiotoxicidad con electrocardiogramas anormales, pancreatitis, etc.). Existen principios activos de origen vegetal y sintéticos con actividad leishmanicida prometedora y baja toxicidad, (péptidos, moléculas orgánicas de síntesis etc), pero hasta ahora por si solos, no son capaces eliminar totalmente al parásito. Por otro lado, se sabe que la modulación del sistema inmune hacia una respuesta celular de tipo TH1 favorece la muerte de estos protozoos. Así mismo, la estimulación de óxido nítrico ayuda a la muerte del protozoo(40).

El empleo de principios activos de probada actividad leishmanicida en conjunción con proteínas de *Leishmania sp.* que han demostrado inducir respuesta inmunológica tipo Th1 en la forma recombinante podría eliminar al parásito provocando la cura del huésped(40).

En conclusiones puede decirse que los antimoniales continúan siendo el tratamiento de elección en la mayoría de las formas clínicas de leishmaniasis. Con los años es probable que la resistencia a ellos sea más frecuente, en nuestro medio por el uso cada vez más extendido de dosis subóptimas en animales domésticos y en India por el mal uso del fármaco en el hombre. De aquí se deriva la importancia de conocer las alternativas a este grupo de fármacos, como la pentamidina, con frecuentes efectos adversos, y la amfotericina B convencional o liposomal, que muestra una buena penetración en los macrófagos. Los imidazoles son poco eficaces en la leishmaniasis visceral y con actividad variable en las leishmaniasis cutánea y mucocutánea. El alopurinol puede emplearse asociado a los antimoniales en caso de pobre respuesta a los mismos. El IFN- γ asociado a los antimoniales reduce el número de días de tratamiento, pero tiene como importante inconveniente su elevado coste. La duración del tratamiento con antimoniales también puede reducirse si se asocia paromomicina parenteral (17).

1.10 Compuestos de origen natural probados contra la leishmaniasis.

En Brasil fueron evaluadas las actividades antileishmaniásicas y antifúngicas de 24 extractos de metanol obtenidos a partir de 20 plantas diferentes, todas utilizadas en el tratamiento de infecciones y trastornos inflamatorios en medicina tradicional. Se evaluaron contra los promastigotes de *L. amazonensis, L. chagasi* y dos hongos *Candida albicans y Cryptococcus neoformans. Resultaron* los más activos contra la *L. amazonensis* (IC50 de 4µg/ml) los extractos *Vernonia polyanthes* y los de *Ocimum gratissimum* mostraron la mayor actividad contra la *L. chagasi* (IC50 de 71µg/ml)(41).

La cebolla tiene un rol medicinal importante en la dieta desde hace muchos años y su actividad antileishmaniásica usada en forma de extracto acuoso ha sido investigada en diferentes cepas de *Leishmania(42)*.

Dos γ-pirones aislados de semillas de Podolepsis hieracioides (Asteraceae) fueron probadas in vitro para estudiar su actividad antileishmaniásica contra los promastigotes de *L. donovani, L. major, L. infantum* y *L. enriettii* (IC50=/3.76-/5.43 mg/ml), y contra los amastigotes de la *L. donovani* dentro de macrófagos RAW 264.7 (IC50=/8.29-/8.59 mg/ml). La toxicidad general de los γ-pirones fue investigada en paralelo contra tres líneas celulares de mamíferos (RAW 264.7, SKMel, y KB; IC50=/11.5-/25.0 mg/ml)(43).

Investigadores brasileños evaluaron extractos etanólico y alcalóidico de 9 plantas diferentes productoras del alcaloide isoquinolina in vitro, para determinar su actividad antiparasitaria contra *L. chagasi y T. cruzi*. Los promastigotes de L. chagasi fueron susceptibles sólo a los extractos totales alcalóidicos de *A. crassiflora* (EC50 valorada ¼ 24.89 mg/ml), *A. coriacea* (EC50 valorada ¼ 41.60 mg/ml), *C. ovalifolia* (EC50 valorada ¼ 63.88 mg/ml) y *G. australis* (EC50 valorada ¼ 37.88 mg/ml). Aparte del extracto total de los alcaloides tres de los extractos presentaron actividad cuando se probaron contra amastigotes. Los más efectivos fueron A. crassiflora y C. ovalifolia cuales redujeron el número de macrófagos infectados a 25 mg/ml por 86.1% y 89.8%, respectivamente(44).

A tres concentraciones diferentes (1, 10 and 50 mg/ml) el extracto hidroalcohólico liofilizado de las raíces de Pfaffia glomerata fue analizado in vitro contra cepas de *Trypanosoma cruzi (Y)* y *Leishmania braziliensis.* Se observó que el extracto hidroalcohólico tenía una actividad leve contra la *Leishmania braziliensis* pero era inactivo contra *T. cruzi(45)*.

De las islas Greciana de Creta fueron extraídas diferentes partes de 65 especies de plantas y obtenidos 249 extractos investigados in vitro para medir su actividad antiprotozoaria. Se determinó su actividad contra promastigotes de la cepa sensible a cloroquina (D6) y cepas resistentes del tipo (WT) de *Plasmodium falciparun* y *Leishmania donovani*. Los extractos diclorometánicos de Eryngium ternatum, Origanum y metanólico de *Eryngium amorginum* mostraron actividad significativa contra la *Leishmania donovani* (IC50<10 µg /mL). Ningún de los extractos fue citotóxico(46).

1.11 Nuevos enfoques y tendencias en el estudio de la leishmaniasis y su tratamiento.

En el mundo y fundamentalmente en los países subdesarrollados donde las enfermedades infecciosas siguen siendo una razón importante de la preocupación la leishmaniasis se ha convertido en un problema serio. Esto es principalmente debido a una frecuencia de aumento de la droga-resistencia en *Leishmania* y un riesgo realzado de la co-infección con VIH que se asocia generalmente a una expresión creciente de las glicoproteínas P específicas implicadas en transporte de membrana. La resistencia también está asociada a los cambios en procesos fisiológicos tales como infecciosidad del parásito, incorporación de metabolitos, conjugación y tráfico de xenobióticos, metabolismo intracelular, interacción del anfitrión - parásito, forma de la célula del parásito y la diferenciación del promastigote - amastigote. Además, estos

acontecimientos pueden cambiar de una manera coordinada. Una comprensión de estos acontecimientos fisiológicos puede ser provechosa para diseñar acercamientos quimioterapéuticos a los múltiples blancos celulares, identificar estrategias para evitar *la fármaco -resistencia* de Leishmania y tratar leishmaniasis exitosamente(3).

El costo de los medicamentos empleados para el tratamiento de la *Leishmania* es muy elevado y su eficacia no es lo suficientemente buena si consideramos que en muchos casos ocurre una reaparición de los síntomas tras determinado periodo de tiempo y empeoramiento de la situación clínica del paciente que puede conllevar incluso a la muerte.

Los avances terapéuticos en el tratamiento de la *Leishmania* han sido significativos en los últimos años. Esto incluye a) nuevas dosis y combinaciones de fármacos tradicionales, derivados de estudios clínicos controlados y de las experiencias de algunos casos individuales. B) nuevas formulaciones, que incrementan la biodisponibilidad y disminuyen la toxicidad de dichos fármacos c) nuevas moléculas empleadas para otras patologías y revelan eficacia contra la leishmania (37).

En el mundo se realizan esfuerzos para encontrar vacunas efectivas para la prevención de la enfermedad:

“En España –afirma el Prof. Fresno Escudero, del CBM–, hay una especie autóctona de *Leishmania* que afecta a los perros, *Leishmania infantum.* De hecho, se calcula que cerca del 5% de estos animales están infectados en España. Por ello, el grupo de parasitología molecular del CBM trabaja en estos momentos en una vacuna veterinaria que ya se encuentra en sus últimas fases de investigación.” Para conseguir una vacuna contra la leishmaniasis, los investigadores de este centro intentan comprender la estructura génica de la *Leishmania*, un proyecto que cuenta con la colaboración del ILN de Granada, el Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Tenerife, el CISET y el ISCIII de Madrid. El objetivo de este proyecto se centra en la identificación de genes y proteínas que estén relacionados con procesos de virulencia y, de esta forma, conocer su papel funcional. Para ello, ya se han establecido los protocolos para la extracción, la identificación y la organización de 4.000 clones (plásmidos recombinantes) que contendrán fragmentos entre 1 y 2 kb de DNA genómico de *L. infantum*, necesarios para su utilización en la construcción de macroarrays proyectados. Se prevé que la obtención de estos plásmidos recombinantes se finalice en 3 meses. Otra parte de este proyecto se desarrolla en el ISCIII de Madrid en colaboración con los nodos de Granada, Tenerife y el CBM. En este centro se

determina la capacidad inmunogénica de diferentes proteínas recombinantes de *L. infantum* aisladas y purificadas por los distintos grupos involucrados en el estudio. Para determinar la presencia de epítopos B en estas proteínas se realizan ensayos de ELISA con sueros de perros sanos e infectados de forma natural o experimental(47).

Experimentación con animales

Coordinados desde el CNMTrop y con la intervención de los centros de Tenerife y Granada, se realiza un proyecto en busca de moléculas protectoras contra leishmaniasis canina. Tras realizar los primeros ensayos de titulación con todas las proteínas, ya se han completado los ensayos de ELISA con las proteínas NDPK, HSP70, GRP94, HSP83, KMP-11, PSA, PFR-2, cinesina, L14 y L25. En dichos ensayos se han utilizado 95 sueros caninos distribuidos en diferentes grupos clínicos y epidemiológicos. Los resultados han mostrado un reconocimiento de las proteínas por parte de los sueros de perros sintomáticos y asintomáticos, sin que sea posible establecer diferencias significativas entre ambos grupos. Para determinar la presencia de epítopos T en estas proteínas recombinantes se han llevado a cabo ensayos de linfoproliferación *in vitro* con linfocitos procedentes de perros de raza Beagle infectados experimentalmente. En los casos en los que se inducía la proliferación de los linfocitos se analizó también el perfil de citocinas que se expresaban. Se han estandarizado los ensayos de infección *in vitro* en cultivos primarios de macrófagos caninos, lo que permite llevar a cabo la última parte del proyecto mediante infecciones de macrófagos caninos en presencia de las proteínas. Con la participación del Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales de Tenerife y el ILN de Granada se desarrolla un estudio sobre la determinación de la capacidad inmunológica y protectora frente a la infección murina por leishmaniasis de antígenos específicos del parásito y proteínas quiméricas. Esta investigación tiene la singularidad de que utiliza vacunas quiméricas que contienen 5 antígenos diferentes del parásito(47)

La vacuna-FML usada contra la leishmaniasis visceral murina y canina, está constituida por el ligando de fucosa manosa (FML) antígeno de la saponina Riedel de Haen. Induce un 92-95% de protección específica sobre la leishmaniasis visceral en Brasil y es la única inmunoterapia para perros cuando está formulada con una concentración mayor de la saponina. La vacuna profiláctica fue licenciada recientemente con el nombre de Leishmune® y mostró un 97% de protección en 550 perros expuestos en regiones altamente epidémicas.

Oliveira-Freitas y colaboradores en el 2006 vacunaron ratones de la cepa Balb/c con 150 µg del antígeno FML de Leishmania donovani y 100 µg de cada fracción obtuvieron, fue infectado con

108 amastigotes de *Leishmania chagasi*. Los resultados confirman en el extracto saponina de Reidel de Haen la presencia de deacylsaponin normonoterpeno-derivados los cuales no son tóxicos y son capaces de inducir una repuesta específica y fuerte a la vacuna contra la Leishmaniasis visceral(48).

Hernández S. y colaboradores en el 2006, evaluaron el rol de la IL-12 durante una infección *L. amazonensis* y después vacunaron con Leishvacin® (causando la muerte de *los* promastigotes de *L. amazonensis*) aunque el rol de esta citoquina en la inmunidad inducida por la vacuna con este preparación en modelos experimentales o en humanos no está aún elucidado(49).

Para evaluar el rol de IL-12 en la inmunidad inducida por una vacuna contra una infección *de L. amazonensis*, fueron vacunados ratones (IL-12p40-/- WT) en las bases de sus colas y posteriormente infectados con *L. amazonensis* en las patas. Sorprendentemente, los ratones vacunados desarrollaron menos lesiones y poseían menos parásitos en las patas que el grupo control (no vacunado). Las células linfáticas y esplénicas de los ratones vacunados no produjeron altas niveles de IFN en repuesta al estímulo in vitro con el antígeno. Por lo tanto, la protección parcial contra la infección por *L. amazonensis* puede ser obtenida en ausencia de IL-12 funcional y la repuesta típica de TH1(49).

Poot y colaboradores (2006) estudiaron la potencialidad de las cisteína peptidasas (PC) como candidatos vacunales. Utilizaron L. infantum PC CPA y CPB recombinante para vacunar perros. Para inducir una respuesta adecuada frente a los antígenos, recombinante de IL-12 caninos se agregó como un adyuvante solo o en combinación Quil A. Después de la vacunación, los perros se infectaron por vía intravenosa con promastigotes de L. infantum cepa CPM. En ambos grupos vacunados (PC con IL-12 o PC con IL-12 y A Quil) se detectaron anticuerpos CP-específicos después de la vacunación, lo que indica que hubo una reacción a la vacuna. Sin embargo, en todos los perros se encontraron parásitos y desarrollaron cierto grado de leishmaniasis clínica(50).

En el 2005 Davoudi y colaboradores con el objetivo de obtener un resultado más seguro emplearon una cepa de Leishmania major doblemente sensible a drogas derivada del empleo de adelantos en la tecnología de manipulación genética con una mayor sensibilidad al ganciclovir

(GCV), y a la 5-fluorocitosina (5-FC). Los estudios in vitro mostraron que los promastigotes fueron eliminados por cualquiera de los fármacos solos, o con ambos medicamentos actuado de forma sinérgica. En los estudios de infección in vivo las lesiones de crecimiento progresivo en ratones Balb / c, se curaron por completo a las 2 semanas de tratamiento con cualquiera de los fármacos solos o en combinación. Los animales tratados no mostraron signos de recurrencia de la infección durante al menos 4 meses, cuando los experimentos se dieron por concluidos(51).

1.12 Resistencia

Un mecanismo para reducir la acumulación intracelular de meltifosine y por consiguiente la resistencia de la *Leishmania,* puede ser la sobre-expresión de transportadores ABC que se comportan como transportadores de miltefosina(52).

Los transportadores ABC (ATP-binding cassette) están constituidos por una familia de proteínas de membranas de gran peso molecular que median los movimientos de moléculas a través de las membranas en un proceso dependiente de ATP, específicamente la P-glicoproteína MBR1 (sub-familia de ABCB) puede exportar un rango enorme de drogas hidrófobas de las células, disminuyendo sus concentraciones intercelulares e impidiendo sus acciones citotóxicas, conformando una resistencia fenotípica multidroga(53). Una línea *de L tropica* que sobreexpresa la producción de glicoproteína P-MDR1 mostro una resistencia cruzada significativa a miltefosina y edelfosine (54). Parece razonable que la glicoproteína P es responsable directa de la resistencia fenotípica, porque: (i) la resistencia fenotípica fue dependiente de la sobreexpresión de la glicoproteína P, (ii) el fenotipo resistente a la miltefosina puede ser dominado por inhibidores específicos de la glicoproteína P, (iii) la miltefosina y la edelfosina son capaces de modular la resistencia mediada de la glicoproteína P a ala daunomicina en la línea MDR(52).

Estudios recientes han demostrado que pentamidina se acumula en la mitocondria y aumenta la eficacia de la cadena respiratoria mitocondrial del complejo inhibidor II(55). Los parásitos de Leishmania que presentan mutaciones que los hacen resistentes a la pentamidina no se acumulan en la mitocondria y expulsan hacia afuera de la célula la fracción citosólica de este fármaco(56). El transportador ABC PRP1 es uno de los posibles involucrados en la bomba que expulsa a la pentamidina y causa resistencia(57). El verapamilo por ejemplo, es un bloqueador de los canales de calcio que puede revertir algunas formas de resistencia multidroga en células

del cáncer mamario y ha mostrado ser capaz de reducir tanto el reflujo de pentamidina como la resistencia mediada por el PRP1(56-57).

Singh y Lee, (1999) plantean que las estrategias metabólicas utilizadas por la *Leishmania* fármaco - resistente es diferente a la descrita para las células mamíferos resistentes. La absorción lenta de la glucosa con la disminución de las actividades enzimáticas fue descrita en relación a los cambios de crecimiento y la ausencia de la modulación de la producción de ATP producida por las *Leishmanias* fármaco -resistentes(58).

Según Machuca et al (2006) la disminución de la sensibilidad de los parásitos resistentes a los antimetabolitos puede causar un gasto y constituir mecanismos generales que aumenten la fármaco- resistencia en los parásitos(59).

Ramos JM y Segovia M plantean que respecto al comportamiento de *Leishmania sp*. frente a los antimoniales se sabe que (17):

1) El parásito adquiere resistencia tanto in vitro como in vivo ante la presencia del fármaco.
2) In vitro la resistencia es estable.
3) In vitro la virulencia del parásito no varía bajo la presión de los antimoniales.
4) No hay diferencias de sensibilidad entre diferentes clones obtenidos a partir de un aislamiento clínico de un paciente sin tratamiento.
5) In vitro la sensibilidad de los aislamientos de Leishmania muestra una correlación del 89% y el 86% con la evolución clínica tras el tratamiento con estibogluconato sódico y antimoniato de meglumina, respectivamente.
6) El tratamiento incompleto con estibogluconato sódico puede hacer surgir cepas de Leishmania sp resistentes.
7) Existen cepas parcialmente resistentes en la naturaleza, y algunas especies son inherentemente menos sensibles a estos fármacos que otras.
8) El acumuló de estibogluconato sódico en los parásitos sensibles es 2 a 5 veces mayor que en los resistentes (17).

Las diferentes especies de de Leishmania son la causa de un amplio espectro de enfermedades que van desde una infección cutánea limitada a ciertas áreas de la piel hasta una infección visceral virulenta y regularmente fatal. En Leishmania se ha detectado también la MDR (resistencia a múltiples drogas) y la sobreexpresión de una proteína similar a la Pgp (P-

glicoproteína). Sin embargo, algunas especies del parásito presentan características distintas a las descritas en la MDR de mamíferos. Dos clases de genes que codifican para Pgp han sido aislados de Leishmania. La primera esta representada por los genes ltpgpA y lmpgpa aislados de L. tarentolae y L. mayor, respectivamente(60).

1.13 LOS ESTUDIOS QSPR/QSAR Y LOS MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS.

1.13.1Los Estudios QSPR/QSAR como Filosofías *Racionales* en la Modelación y Predicción Molecular

Constituyendo enfoques cuantitativos cuya finalidad es encontrar relaciones entre la estructura molecular y las propiedades/actividades moleculares medidas o calculadas, los estudios QSPR/QSAR, de sus siglas en inglés, Quantitative Structure-Property Relationships/Quantitative Structure-Activity Relationships o en español, Relaciones Cuantitativas Estructura-Propiedad/Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad son herramientas de gran valor(61).

Estos estudios datan desde el 1868 y desde entonces se han aplicado a la modelación de disímiles propiedades moleculares de naturaleza física, química y biológica(61).

Los Descriptores o Índices Moleculares (DMs o IMs) definidos como el resultado final de un procedimiento lógico-matemático el cual transforma la información química, codificada dentro de una representación simbólica de una molécula, en un número (o conjunto de estos) útil (útiles) o en el resultado de alguno de los experimentos ya estandarizados, juegan un papel fundamental(61).

Estos números pueden brindar una visión más amplia en la interpretación de las propiedades moleculares y/o son capaces de tomar parte en un modelo para la predicción de propiedades moleculares interesantes(61).

Los DMs pueden ser clasificados de acuerdo a la naturaleza en su definición y la complejidad de los rasgos moleculares estructurales que codifican, de forma general según las dimensiones que abarcan en:

• DMs-0D (o Descriptores Constitucionales) se obtienen directamente de la fórmula molecular y son independientes de cualquier conocimiento sobre la estructura molecular, e.g. número de átomos (A), el peso molecular (MW), conteo de átomos-tipo (Nx) o cualquier función de las propiedades atómicas.

• DMs-1D (Descriptores Unidimensionales) que están basados en la representación unidimensional de la molécula (o representación que consiste en una lista de fragmentos estructurales de la molécula), aunque no requieren del conocimiento completo de la estructura molecular, por ejemplo descriptores de búsqueda y análisis subestructural, como los Descriptores de Conteo de Fragmentos.

• DMs-2D (o Descriptores Bidimensionales, Invariantes de Grafos) que son índices basados en la representación bidimensional o topológica de la molécula, o sea, que consideran la conectividad de los átomos (vértices) en la molécula (pseudografo) en términos de la presencia y naturaleza de los enlaces químicos (aristas), por ejemplo Perfiles Moleculares, Índices de Información Topológica

• DMs-3D (o Descriptores Tridimensionales) que constituyen índices basados no solo en la naturaleza y conectividad de los átomos, sino también en la configuración espacial de la molécula, por ejemplo Descriptores WHIM, MoRSE-3D, Índices de Similaridad, Descriptores de Superficie/Volumen, Químico-Quánticos.

• DMs-4D (o Descriptores Tetradimensionales) que son descriptores basados no solo en la configuración espacial de la molécula, sino también en los campos escalares de interacción que se originan como consecuencia de la distribución electrónica en dicha entidad química, por ejemplo Valores de la Energía de Interacción(61).

Descriptores del software DRAGON.

El DRAGON es un software muy sofisticado para el cálculo de descriptores moleculares. Entre ellos, descriptores constitucionales, topológicos, de autocorrelación, geométricos así como descriptores 3DMoRSE, RDF, WHIM, GETAWAY, grupos funcionales, fragmentos centrados en átomos, son calculados. Los descriptores moleculares pueden ser calculados solamente para las

moléculas que contienen los siguientes átomos: C, H, O, N, S, P, F, Cl, Br, I, B, Si, Ni, Fe, Co, Al, Cu, Zn, Sr, Gd.

En este software podemos encontrar más de 1000 descriptores moleculares en familias 0D, 1D, 2D así como 3D. La naturaleza y magnitud de los descriptores incluidos en este software computacional lo convierten en una poderosa herramienta de la química computacional propiciando la generación de sistemas con una amplia aplicación en la investigación experimental, tanto para la interpretación de los resultados obtenidos y la planificación de futuros, así como para deducir información no asequible experimentalmente. Figura 3

Figura 3. Lista de descriptores moleculares incluidos en el software DRAGON

Los principios de la metodología QSAR pueden describirse mediante los siguientes pasos comunes: (61)

1) Formulación del problema, en la cual se determina el objeto de análisis y el nivel de información requerido;
2) Parametrización cuantitativa de la estructura molecular de los compuestos químicos orgánicos/secuencia de biopolímeros;
3) Medición de la propiedad de interés (efectos biológicos u otros);
4) Elección del tipo de modelo QSAR que se va a desarrollar;
5) Selección de los compuestos (diseño estadístico de la serie);
6) Análisis matemático de los datos y validación interna y externa de los modelos obtenidos;
7) Interpretación de los resultados y aplicación de los modelos desarrollados al diseño/descubrimiento de un nuevo compuesto líder, desarrollando procedimientos de cribado virtual. Sin embargo, el desarrollo de cualquier estudio QSPR/QSAR, es un ciclo iterativo(61).

1.13.2 Análisis Exploratorio de Datos

El Análisis Exploratorio de Datos es una colección de técnicas que examinan la estructura del conjunto de datos antes de calcular algún modelo estadístico. Su propósito es obtener información acerca de la distribución de los datos, de la presencia de outliers y conglomerados, y revelar relaciones y correlaciones a priori entre los objetos y/o variables. Además del uso clásico de estadísticas descriptivas y de gráficos, la exploración de datos se apoya hoy en técnicas de Descubrimiento de Conocimiento, entre ellas los Cubos OLAP (del inglés, OnLine Analytical Processing) y en las de reducción de datos, tanto por técnicas de clustering como por técnicas de selección y transformación de rasgos(61).

1.13.3 Métodos quimiométricos en estudios QSAR

La quimiometría es una disciplina que colecciona instrumentos matemáticos y estadísticos para tratar con datos químicos complejos.
Las estrategias de caracterización principales son: los enfoques multivariados al problema en cuestión, la búsqueda de información relevante, la validación de los modelos para derivar objetos matemáticos con alto poder predictivo, la comparación de los resultados obtenidos usando

diferentes métodos, y la definición y uso de índices capaces de medir la calidad de la información extraída y los modelos obtenidos.

La quimiometría es el instrumento más útil en estudios QSAR y QSPR, en los cuales proporciona una batería de métodos disímiles y por tanto una base firme para el análisis de datos y el modelado en general. Además, un aspecto relevante de la filosofía quimiométrica es la atención que esta pone al poder predictiva de los modelos (estimado usando técnicas de validación*),* a la complejidad de los modelos*,* y, a la continua búsqueda de parámetros adecuados para evaluar la calidad de los mismos, tales como los parámetros de clasificación y parámetros de regresión(62-64).

1.14 Diseño experimental

Los procedimientos estadísticos para planear un experimento, es decir coleccionar datos apropiados que, después del análisis por métodos estadísticos, causan conclusiones válidas es a lo que se le conoce como diseño experimental.

El diseño incluye la selección de unidades experimentales, así como la especificación de las condiciones de estas unidades, (es decir la especificación de factores cuyo efecto será estudiado en el resultado del experimento), la especificación del nivel de los factores implicados y la combinación de tales factores, la selección de respuesta para ser medida, y la opción del modelo estadístico para ajustarlos.

Los diseños experimentales más conocidos son los Diseños Factoriales Completos, los Diseños Factoriales Fraccionados, los Diseños estratificados, los Diseños Compuestos, los Diseños Optimales y los Diseños de Mezclas(63).

1.15 Análisis de Conglomerados (CA, de sus siglas en inglés, Cluster Analysis)

Además de las técnicas de aprendizaje supervisado, se utilizan técnicas de aprendizaje no supervisado, en la cual se conforman “clases” a partir de variables predictivas conocidas sin que haya un conocimiento previo (maestro o supervisor) sobre la clase a que pertenece cada instancia, a veces, ni siquiera, sobre el número de clases a considerar. Se trata de “agrupar” o mas bien “separar en grupos”, a instancias similares entre sí y diferentes de otros grupos. Las técnicas estadísticas clásicas fueron denominadas técnicas de detección de “agrupamientos” o de “conglomerados”, en inglés, cluster. Estos métodos representan un caso especial del análisis exploratorio de datos, enfocados a agrupar objetos similares en el mismo conglomerado y objetos

menos similares en conglomerados diferentes(65-66) .El Análisis de Conglomerados esta basado en la evaluación de la similitud/disimilitud de todos los pares de objetos del conjunto de datos.
Esta información se reúne en la matriz de similitud o en la matriz de distancia de datos. Los métodos estadísticos de análisis de conglomerados incrementan indefinidamente su variedad por dos factores: las infinitas posibles formas de considerar las “distancias” o “similitud” entre casos y las formas de “aglomerar”. Las distintas variantes de distancias son objeto de muchas investigaciones actuales. Los métodos de aglomerar más populares son los Métodos Aglomerantes Jerárquicos (ej. de Unión Promedia, de Unión Completa, de Unión Simple, de Unión Promedia Ponderada, etc.), los cuales son más ampliamente usados que los Métodos Divisivos Jerárquicos. Otros métodos populares son los Métodos no-Jerárquicos, tales como el Método de las K-Medias y el Método de Jarvis-Patrick. Las técnicas de Análisis Factorial, en particular el Análisis de Componentes Principales (PCA) y el Análisis de Componentes Principales Categóricos, son métodos “traspuestos” al análisis de clusters. En lugar de unir casos en clusters ellos unen variables en “factores”, “dimensiones”, “constructos”, “variables latentes” o “componentes principales”, de manera que se reduce el número de variables a considerar a la vez, sustituyéndolas por estas nuevas variables, no directamente observables, pero que expresan las dimensiones principales de la muestra y mantienen la mayor parte de la varianza de la misma (67).

1.16 Métodos de Clasificación

Se utilizan para la asignación de objetos a una de varias clases basado en una regla de clasificación. Son métodos de aprendizaje supervisado, pues se “aprende” a partir de una serie de casos con variables predictivas y función “objetivo” o variable dependiente también conocida (esta serie de entrenamiento es el “maestro o supervisor”). Tal es el caso también del clásico método de regresión; solo que en los problemas de clasificación la función objetivo o variable dependiente es discreta (nominal u ordinal), es una clase.

El objetivo de tales técnicas es calcular una regla de clasificación (y, posiblemente, límites de clases, o probabilidades de pertenencia a una clase), basados en los objetos de la serie de entrenamiento y aplicar esta regla para asignar una de estas clases, a objetos de clases previamente desconocidas.

Los Métodos de Clasificación son apropiados para modelar varias respuestas QSAR, como por ejemplo: compuestos activos/no-activos, compuestos de toxicidad baja/mediana/alta, compuestos mutagénicos/no-mutagénicos, etc (62).

Los Métodos de Clasificación de origen estadístico más populares son: Análisis Discriminante Lineal o LDA, de sus siglas en inglés, Linear Discriminant Análisis; Análisis Discriminante Cuadrático o QDA, de sus siglas en inglés, Quadratic Discriminant Analysis; Análisis Discriminante Regularizado o RDA, de sus siglas en inglés, Regularized Discriminant Analysis; K-ésimos Vecinos más Cercanos o KNN, de sus siglas en inglés, Kth Nearest Neighbours; Métodos de Árboles de Clasificación o CTM, de sus siglas en inglés, Classification Tree Methods (también conocidos en la literatura como DT, acrónimo de Decision Trees); Regression Decision Treespotentes árboles de decisión cuyas hojas finales no definen una clase para un segmento de la población, sino una ecuación de regresión, por ejemplo logística para clasificar a los elementos de ese segmento, los Clasificadores de Función Potencial o PFC, de sus siglas en inglés, Potencial Function Clasifiers; los Clasificadores Medios más Cercanos o NMC, de sus siglas en inglés, Nearest Mean Classifiers y los Clasificadores Medios más Cercanos Ponderados o WNMC, de sus siglas en inglés, Weighted Nearest Mean Classifiers(68).

Se pueden encontrar además varios métodos de clasificación o de análisis supervisado dentro de la Inteligencia Artificial, en particular las redes neuronales, con muchas posibilidades de aplicación en nuestro campo por su capacidad de tratar problemas con niveles mucho más libres de las variables predictivas y cuya función objetivo representa combinaciones esencialmente no lineales de ellas difíciles de representar por una ecuación de regresión, por complicado que se plantee el modelo no lineal de la misma.

Las Redes Neuronales Artificiales (ANN, de sus siglas en inglés, Artificial Neural Networks) representan un conjunto de métodos matemático-computacionales, modelos y algoritmos diseñados para imitar los métodos de adquisición del conocimiento y procesamiento de la información del cerebro humano. Las ANNs son especialmente apropiadas para tratar con relaciones y tendencias no-lineales y se han propuesto para enfrentar una gran variedad de problemas tales como: la exploración de datos, reconocimiento de patrones, modelación de respuestas continuas y categorizadas, problemas de respuesta múltiple, etc. (68)

Se plantea que no es posible lograr con un único clasificador la respuesta óptima y se plantea entonces la necesidad de “multiclasificadores” que combinen de alguna manera, las respuestas de varios clasificadoresLa calidad de los modelos de clasificación se evalúa por los parámetros de clasificación, para ambos, para propósitos de ajuste y predicción (36). Existe toda una teoría, y técnicas concretas para el análisis y la comparación de diferentes modelos de clasificación ante problemas específicos. En nuestro caso desarrollamos como clasificador el Análisis Discriminate Lineal (ADL)(68).

1.17 Índices topológicos y topográficos

La topología es aquella parte del álgebra que estudia las posiciones e interconexiones entre los elementos de un conjunto. Esta rama de la ciencia, aplicada a la estructura química ha dado origen a una disciplina llamada “Topología Molecular” que analiza precisamente las posiciones y las interconexiones entre los átomos de una molécula dada. De esta forma se lograría caracterizar estructuralmente los compuestos. Para definir dichos índices se representan por puntos los átomos de la molécula (excluyendo a los de hidrógeno) y por rayas o segmentos los enlaces. De tal manera se obtiene el grafo de la molécula o grafo químico como comúnmente se conoce (69).

Con posterioridad se construye la matriz topológica cuyos elementos toman el valor de uno o cero en dependencia de si el átomo “i” está enlazado o no al átomo “j”. Así se genera una matriz cuadrada de “n” filas por “n” columnas, siendo “n” el número de número de vértices del grafo o lo que es lo mismo el número de átomos(69).

El resultado del cálculo genera un valor numérico que representa o describe la estructura química de la molécula, por lo que este tipo de descriptores tienen una gran utilidad en los estudios QSAR(69).

De esta forma se pueden generar matrices de adyacencia y matrices de distancias entre vértices. Las matrices de adyacencia describen la unión o no entre átomos y la de distancias el número de átomos existentes entre un átomo “X” y otro no enlazado a él. Sirva como ejemplo ilustrativo de la construcción de estas matrices la molécula de isopentano(69).

1.18 Criterios de selección de variables.

Existen diversos criterios de selección de variables, los principales son los siguientes:

a) todas las variables se entran simultáneamente siempre que *satisfagan el criterio de tolerancia*

b) se selecciona la variable que *minimice la lambda de Wilks*

c) se selecciona la variable que *maximice la D2 de Mahalanobis entre los grupos más próximos*

d) se selecciona la variable que *maximice la menor F entre pares de grupos*

e) se selecciona la *variable que minimice la suma de la variación no explicada entre grupos(68).*

1.19 Selección del número óptimo de predictores. Principio de la Parsimonia.

La exactitud de un modelo de clasificación aumenta en la medida en que se añaden variables a la ecuación; pero a partir de cierto punto el incremento de esta para cada nueva variable que se añade, es insignificante. Un buen modelo no debe presentar ni demasiadas variables, ni debe olvidar las que sean verdaderamente relevantes. Es decir, debe cumplir el principio de la p*arsimonia*, según el cual un fenómeno debe ser descrito con el número mínimo de elementos posibles.

Diversos procedimientos se han propuesto para seleccionar el número óptimo de variables a incluir en la ecuación, como por ejemplo la 'forward selection', 'backward elimination' y stepwise selection'. Este último método es el más utilizado (es una combinación de los dos anteriores) y sigue un proceso de selección de variables paso a paso(68).

1.20 Regulaciones de los métodos QSAR

Las políticas recientes para el desarrollo de nuevos compuestos químicos, están poniendo un desafío enorme en los QSAR, y ha surgido la necesidad de desarrollar una guía internacional para la aceptación de las buenas prácticas en la modelación QSAR, con el animo de promover la disponibilidad de QSARs validos para su uso regulatorio en toxicología, y mas recientemente en la identificación de actividades biológicas (62). En noviembre del 2004, los países miembros de la OECD (siglas acrónimas en ingles de Organization for Economic Cooperation and Development) adoptaron cinco principios para la validación de modelos QSAR para principios regulatorios, los cuales son conocidos actualmente como los Principios de la OECD para la Validación de los QSAR. De acuerdo con estos principios, y en aras de facilitar su consideración para principios regulatorios, un modelo QSAR debería ser asociado con la siguiente información:

1. Un punto de medición definido.

2. Un algoritmo no ambiguo.
3. Un dominio de aplicación definido.
4. Medidas apropiadas de bondad de ajuste, robustez y predictibilidad.
5. Una interpretación mecanística, si es posible(69).

El aspecto 3 de estos principios de la OECD, el dominio de aplicación (DA), es de una importancia considerable en las tres fases del ciclo de vida de un QSAR (desarrollo, validación y aplicación). Este concepto debe ser aplicado durante el desarrollo del modelo para asegurar que el dominio es definido lo más ampliamente posible para un nivel deseado de predictibilidad. En general un modelo debe ser generalmente construido con una gran aplicabilidad, sacrificando en alguna medida el nivel de predictibilidad, (modelos globales) o en otro caso, modelos con poca aplicabilidad y una gran predictibilidad (modelos locales), estos últimos por ejemplo, para clases especificas de compuestos químicos. Un problema crucial de cualquier estudio QSAR es la identificación del dominio de aplicación (DA) de un modelo de clasificación o de regresión. Pues, en efecto solo son validas las predicciones para aquellos compuestos que estén dentro del dominio de aplicación. El DA es aquella región teórica en el espacio químico, definido por los descriptores del modelos y la respuesta modelada, y por todo esto a su vez por la naturaleza de los compuestos de la serie de entrenamiento, representado en cada modelo por descriptores moleculares específicos. Se puede decir por lo tanto, que el DA de un modelo QSAR en “el rango dentro del cual es tolerada una nueva molécula. El dominio de aplicación de un modelo QSAR es la respuesta y el espacio químico estructural en el cual el modelo realiza predicciones con una fiabilidad dada, por ejemplo, un compuesto registrado en REACH (Registration, Evaluation, Authorization of Chemicals) que se encuentre dentro del DA del modelo. Por lo que no se puede pretender extrapolar el uso de los modelos QSAR para aquellos tipos de compuestos que están fuera del dominio de aplicación(68).

Actualmente, existen varios enfoques para evaluar el DA de los modelos QSAR. (Para la RLM (Regresión Lineal Múltiple), es usado el *leverage* (h), una medida basada en distancias. A través del enfoque del *leverage* (66) es posible verificar si un nuevo compuesto esta dentro del dominio de aplicación del modelo, el valor de h (66) de un compuesto mide la influencia de este en el modelo. Los valores de *leverage* pueden ser calculados para los compuestos de la SE y nuevos compuestos. En el primer caso, son útiles para encontrar aquellos compuestos que influencian los

parámetros del modelo, y que lo convierten en un modelo inestable. En el segundo caso, son útiles para chequear el dominio de aplicación del modelo (63).

El *leverage* crítico es el valor de corte realizado para el modelo en una base de datos. Valores por encima de este *leverage* crítico son considerados no fiables. Solo las estructuras químicas predichas que pertenezcan al dominio de aplicación deben ser propuestas.

1.21 Métodos de cribado virtual basados en ligandos

La identificación de nuevos compuestos con una actividad farmacológica determinada es uno de los pasos críticos en el proceso de descubrimiento de fármacos.

Estos nuevos compuestos se consideran como cabeza de serie si al menos un grupo de estas moléculas están estructuralmente relacionadas alrededor de un mismo núcleo base y la mayoría de ellas presenta la actividad bajo estudio. Una vez identificado este compuesto cabeza de serie comienza el proceso de optimización del líder, cuyo objetivo es mejorar su eficacia terapéutica: incremento de su potencia frente a una diana terapéutica (receptor), selectividad frente a dianas relacionadas, y la elucidación de sus propiedades absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) y de su toxicidad y efectos secundarios(68).

El tamizaje de alta resolución (HTS por sus siglas en ingles), es una de las principales fuentes de obtención de nuevos compuestos líderes. El HTS requiere una quimioteca de cientos de miles de compuestos y un método de ensayo de actividad. Además, la introducción de la química combinatoria ha permitido que el tamaño de estas quimiotecas se incremente al orden de millones de compuestos(68).

Sin embargo, la realidad es que a pesar del uso de estas técnicas a gran escala, la tasa de descubrimiento de cabezas de series ha decaído, y pocos son los fármacos procedentes directamente de los resultados de HTS. Típicamente, 1 de cada 10,000 HTS activos alcanza este nivel y únicamente 1 de cada 10 de estos candidatos supera las pruebas clínicas convirtiéndose en fármaco. Por ello, en años recientes las técnicas de cribado virtual han ganado en popularidad como una tecnología dinámica y lucrativa para probar nuevos compuestos tipo fármacos o de los llamados hits, los cuales son considerados en la literatura como aquellos compuestos con valores de actividad por debajo de 10 μM. Una efectiva interfaz entre los enfoques experimentales y

computacionales es de gran importancia pues puede servir para guiar los procesos de síntesis y cribado de compuestos de una manera mas racional (68).

El uso de técnicas de cribado virtual en bases de datos de la industria farmacéutica para la búsqueda de nuevos compuestos líderes se ha incrementado en los últimos años y, aunque sigue siendo menos usado que HTS durante el proceso de descubrimiento de compuestos líder, se afirma que llegará a reemplazarlo eventualmente. Entre los métodos disponibles, la búsqueda por similitud es uno de los métodos más baratos y ampliamente usados para seleccionar conjuntos de compuestos con potenciales actividades a partir de grandes bases de datos. Este método se basa en el principio de similitud, uno de los principios mas importantes en el diseño racional de fármacos, el cual postula que los compuestos estructuralmente similares, deben tener las mismas propiedades fisicoquímicas, y biológicas, y por ende, pudieran tener efectos similares en los experimentos in vivo (68).

Las técnicas de cribado virtual pueden ser clasificadas según su modelado particular de reconocimiento molecular y el tipo de algoritmo usado en la base de datos investigada. Cuando disponemos de la estructura tridimensional del receptor (diana terapéutica), bien obtenida por métodos experimentales (cristalografía de rayos X o RMN tridimensional) o a través de la construcción de modelos moleculares, podemos abordar el diseño de fármacos sobre la base de esa estructura y definimos así a los llamados métodos directos (basados en la estructura). Si no disponemos de las estructuras, aún podemos utilizar éstas técnicas si obtenemos modelos por homología de suficiente confianza. En caso contrario, el diseño racional de fármacos se puede conseguir mediante métodos indirectos (basados en ligandos), que se basan en el análisis y comparación de propiedades moleculares y datos de afinidad por el receptor para moléculas conocidas, sin tener en cuenta la estructura de dicho receptor (68).

A menudo se combinan ambas aproximaciones, la basada en la estructura y la basada en ligandos, de manera que se intentan superar las limitaciones particulares de cada uno de estos métodos; no sólo a través de la comparación/complementación de los resultados obtenidos por cada uno de ellos, sino también incorporando la información procedente de uno en la metodología del otro. Existen reportes de varios ejemplos del uso de estas metodologías y la combinación entre varias de ellas en la búsqueda de nuevos compuestos líderes por cribado virtual. La principal restricción de los métodos de cribado Virtual (CV) es que, como se ha comentado, necesitan algún

tipo de información previa acerca de los factores responsables de la actividad del fármaco. Sin embargo, cada vez se dispone de un mayor número de compuestos activos frente a familias de proteínas, se determinan secuencias de genes ligadas a determinadas proteínas y se incrementa el número de estructuras de proteínas resueltas experimentalmente, por rayos-X o por resonancia magnética nuclear tridimensional (3D-RMN)(68).

Además, desde un punto de vista teórico, se sigue avanzando en la comprensión de las interacciones proteína-ligando, aunque todavía los métodos no se encuentran lo suficientemente desarrollados(68).

Básicamente, el problema reside en la implementación de modelos físicos válidos para analizar en un tiempo asequible cientos de miles de posibles compuestos(68).

En el presente trabajo utilizamos un método de cribado virtual basado en ligandos, a partir de compuestos nunca reportados con actividad antileishmaniasica para probar la capacidad predictiva de nuestro sistema multiclasificador basado en modelos QSAR. Esto constituye una herramienta novedosa, pues anteriormente nunca ha sido aplicado a la predicción de series de compuestos en la búsqueda de actividad contra la enzima tirosinasa a partir de un cribado virtual de una base de datos de moléculas. La combinación posterior de estos resultados, junto con la aplicación de otros métodos de acoplamiento molecular, alineamiento y técnicas de similitud/diversidad molecular, puede incrementar la eficiencia de este proceso, el primer paso en el desarrollo de nuevos ingredientes farmacéuticos activos (IFA)(68).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se discute la *estrategia computacional* de los ensayos *in silico*, particularizando en la metodología de trabajo, cómo se realizó seleccionar las Series de Entrenamiento (SE) y de Predicción (SP), así como la obtención de los modelos y su significación con una validación externa. Finalmente, se describe la base de datos internacional que se empleó en el cribado virtual con el propósito de identificar computacionalmente nuevos compuestos líderes anti-*Leishmania.*

2.1 GESTIÓN DE LA DATA

Todos los compuestos incluídos en el presente estudio, al igual que su perfil biológico, fueron recopilados de la literatura internacional y de las bases de datos Martin Negwer Handbook (70) y Merk Index (71) así como de los reportados en un BioAssay del PubChem consistente en un screening primario de la actividad antileishmaniásica(72), quedando finalmente 2145 compuestos evaluados experimentalmente para determinar su actividad antileishmaniásica. Estos datos fueron reportados en 365 artículos científicos de investigación sobre evaluación farmacológica de nuevos compuestos y varios *screening* antiparasitarios en el período de 1983-2008. En el anexo 8 se listan los nombres, la potencia antiparasitaria (con su clasificación) y las referencias bibliográficas de todos los compuestos usados en este estudio y en el anexo9 se muestra la estructura química de cada uno de ellos. Esta data cuenta como antes se mencionaba con 2145 compuestos estructuralmente diversos, de los cuales 537 son activos y 1608 inactivos, respectivamente.

El parámetro empleado para clasificar a los compuestos en activos o inactivos fue la IC_{50}; considerándose como activos aquellos compuestos que tras ser evaluados experimentalmente en promastigotes presentaron un valor de IC_{50} menor o igual que 1 µmol o en amastigotes valores de IC_{50} entre 1-10 µmol. Los compuestos provenientes del PubChem (72) fueron considerados activos en el screening primario contra promastigotes de *L. major* si poseían un valor de IC_{50} menor o igual a 1 uM, e inactivos si no cumplían dicho requisito. Aquellos compuestos que aparecieron en más de dos artículos se analizaron estimándose en muchos casos su valor de actividad “promedio” o tomando los valores obtenidos en aquellos experimentos cuya metodología era más precisa.

La data posee un alto grado de variabilidad estructural la cual incluye análogos de purinas, diamidinas aromáticas, péptidos, fluoroquinolonas, arilquinuclidinas, quinolinas, flavonas, dicationes aromáticos, saponinas, benzodiazepinas, chalconas, pirimidinas sustituidas, imidazo-

compuestos, pyronas, derivados de la THTT (tetrahidro tiadiazin-thiona), porfirinas catiónicas, derivados de quinazolina, diterpenos, taninos, entre otros.

Estrategias Computacionales.

Como regla general un modelo QSAR intenta establecer una correlación matemática entre la estructura de un grupo de compuestos químicos y su actividad biológica, generalmente por medio del uso de un análisis de regresión o discriminante con el empleo de DMs. La. Figura 2.1 muestra la estrategia general para el desarrollo de estudios QSAR.

Todos los cálculos se efectuaron en un ordenador (PC) Centrino Centrino Duo Core 1.66 GHz. El *Programa* DRAGON 5.5 Professional (73) se usó para el cálculo de los DMs (0-2)D (un conjunto de más de 2000 DMs). Los datos se almacenaron en matrices de datos, utilizando el programa Microsoft Excel; donde las filas representaron a los compuestos químicos (casos) y las columnas a los DMs (variables). El análisis estadístico se efectuó con el paquete de procesamiento estadístico *STATISTICA* 8.0 para Windows (74).

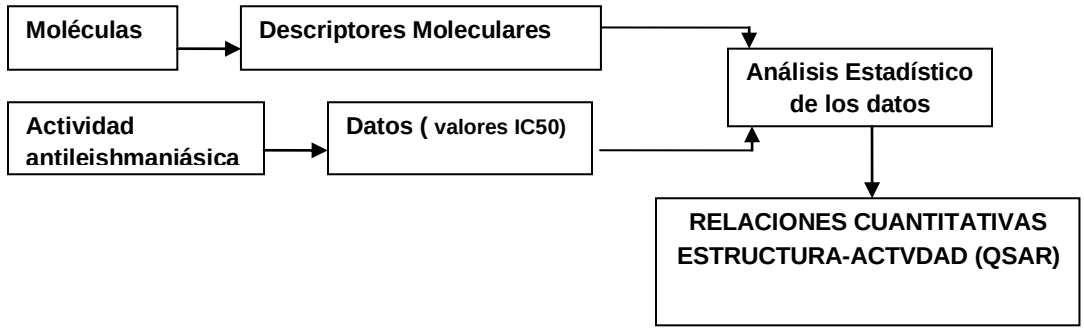


Figura 2.1 Esquema general para la obtención de un modelo QSAR.

2.2 PARAMETRIZACION DE LA ESTRUCTURA QUIMICA

Todas las estructuras (2145 compuestos en total) fueron representadas usando el módulo Chemdraw Ultra del software ChemOffice 2005 ver. 9.0 (75). Las estructuras son exportadas como fichero .mol del tipo MDL. Los ficheros obtenidos se llevaron al programa DRAGON donde se calcularon las diferentes familias de descriptores moleculares que están implementadas en el mismo (73). Algunas de estos DMs y su clasificación en familias son presentadas en el ANEXO 3.

2.3 ANALISIS ESTADISTICO DE LOS DATOS

En el presente trabajo, se emplearon dos técnicas de reconocimiento de patrones: AC y ACP. Ambos tuvieron un fin diferente, el cual describimos a continuación.

Construcción de las Series de Entrenamiento (SE) y Predicción (SP) utilizando análisis de conglomerados (*k*-MCA).

Con el fin de conformar las SE y SP, les fue aplicado un AC del tipo *k*-MCA (de sus siglas en inglés, *k-Means Cluster Analysis* o Análisis de Conglomerados en *k*-Medias), con la distancia euclidiana como medida de disimilitud y agente disgregante/aglomerante (76-77), los cuales se distribuyeron, por separado, en varios conglomerados garantizando una buena representatividad química en cada caso (SE y SP). Los compuestos incluidos en la SP nunca se usaron en el desarrollo de los modelos cuantitativos. La SE que do conformada por el 63,2 % del total de los compuestos y la SP por el 36.8 %.

Obtención y significación de los modelos con ADL.

Los modelos QSAR se obtuvieron mediante ADL (78-79), según su implementación en el paquete de procesamiento estadístico STATISTICA 8.0 (74) (en donde también se comprobaron los 5 supuestos paramétricos). Siempre se utilizó, por defecto, como mínimo aceptable de *tolerancia* el valor de 0.01. Como estrategia de selección de variables en STATISTICA se utilizó la técnica Forward Stepwise ó Pasos Hacia Delante.

La ley de parsimonia (lex parsimoniae) ó el Rasurador de Ockham: *"Numquam ponenda est pluralitas sine necessitate"* o *"La pluralidad nunca se debe postular sin necesidad (de ello)"*, se tomó en cuenta a la hora de seleccionar el modelo (80). En este caso, se seleccionó el modelo con la significación estadística más alta y con la menor cantidad de parámetros, a_i, posible.

La calidad estadística del modelo se determinó empleando como estadístico determinante el análisis de la lambda de Wilks (λ), que permite evaluar la hipótesis de que dos o más grupos provienen de poblaciones con las mismas medias para un conjunto de variables(81). La λ de Wilks toma valores en el rango de 0 (discriminación perfecta) a 1(no discrimina). También se calculó el cuadrado de la distancia de Mahalanobis (D^2) como criterio para determinar la existencia de dos poblaciones, la razón de Fisher ($F_{exp} > F_{tab}$, $\alpha = 0.05$) y el número de variables en cada ecuación. Otro factor que tuvimos en consideración para evaluar la habilidad (poder discriminante) de la Función Discriminante (FD) obtenida, fueron los *porcientos de buena clasificación* en cada uno de los grupos y del modelo en general en la serie de entrenamiento (SE)(81), mientras que la clasificación de los casos es desarrollada por medio de la *probabilidad de clasificación posterior*. Usando la D^2 para la clasificación, se pueden obtener probabilidades. La probabilidad de que un caso pertenezca a un grupo particular es básicamente 'proporcional' a la D^2 del caso al centroide del grupo. En resumen, la *probabilidad posterior* es la probabilidad, basada en el conocimiento de los valores de otras variables, que el respectivo caso pertenece a un grupo en particular.

Los resultados de las probabilidades de clasificación para cada compuesto son dados utilizando el siguiente parámetro: Δ*P*% = [*P*(actv)-*P*(inactv)]*x*100, donde *P*(actv) es la probabilidad conque la ecuación clasifica un compuesto como activo. Contrariamente, *P*(inactv) es la probabilidad con que el modelo clasifica un compuesto como inactivo.

Para acceder al *poder predictivo* del modelo QSAR-ADL obtenido, se desarrollaron procedimientos de *validación externa* (81) (82-84). La calidad del modelo también fue evaluada chequeando los principales parámetros estadísticos propuestos en la literatura para los modelos de clasificación: coeficiente de correlación de Matthews (*C*), exactitud (Q_{total}), sensibilidad, especificidad y la proporción de falsos activos(85).

2.4 CRIBADO VIRTUAL Y SUS VENTAJAS EN EL PROCESO DE SELECCIÓN DE NUEVOS CABEZAS DE SERIE EN EL DISEÑO RACIONAL DE FÁRMACOS.

El cribado o "*screening*" virtual ha emergido como una interesante alternativa para la evaluación masiva de compuestos químicos (86) consolidándose en el desarrollo de esta rama de las ciencias químico-teóricas. Este proceso consiste en utilizar los modelos obtenidos en el "*screening*" de grandes bases de datos con el propósito de encontrar un conjunto reducido de compuestos predichos con la actividad biológica deseada racionalizando de esta manera grandes cantidades de recursos y tiempo de trabajo.

En este estudio se realiza una búsqueda de nuevos compuestos líderes empleando el tamizaje virtual de una base de datos (Spectrum) tomada de la Colección Spectrum (The Spectrum Collection) que contiene 2000 moléculas biológicamente activas y compuestos diversamente estructurales a partir de librerías de drogas conocidas, compuestos bioactivos experimentales así como productos puros y naturales, utilizando las funciones obtenidas (87) realizando los cálculos correspondientes con el uso de Programa DRAGON Professional versión 5.5 -2007 y STATISTICA 8.0.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

En este capítulo presentamos los resultados de la generación de los modelos a partir de la construcción de una nueva base de datos. Esta data fue analizada usando el análisis de cluster (AC), el cual permitió dividir la data de forma *racional* en serie de entrenamiento (SE) y serie de predicción (SP). Seguidamente, se presenta la modelación de la actividad y la validación externa del mejor modelo obtenido al igual que la comparación con otros resultados reportados en la literatura. Finalmente, los modelos son empleados en el cribado virtual de bases de datos con el propósito de identificar nuevos compuestos líderes, los cuales son sometidos a análisis.

3.1 GESTIÓN DE LA DATA Y DISEÑO DE LA SE Y SP EMPLEANDO EL AC

Teniendo en cuenta que el aspecto más crítico en la construcción de un modelo es la diversidad molecular de los compuestos incluidos en la SE (también conocida como serie de aprendizaje), se seleccionó de la literatura (periodo de 1983-2008) un grupo de 2145 compuestos orgánicos que presentaron tanta variabilidad estructural como fue posible.

En el anexo 8 se listan los nombres, la actividad biológica y las referencias de todos los compuestos usados en este estudio y en el anexo 9 se muestra la estructura química de cada uno de ellos.

Cada molécula fue parametrizada usando todos los DMs implementados en el programa DRAGON 5.5 Professional(88) (un conjunto de más de 2000 0-2D DMs). El análisis estadístico se efectuó con el paquete de procesamiento estadístico *STATISTICA* 8.0 para Windows(89). Después de la estandarización de todas las variables de la data, el AC fue utilizado para evaluar la data y descartar en primer lugar compuestos repetidos. En segundo lugar, este análisis se desarrolló con el propósito de identificar sustancias que tuvieran un comportamiento *outlier* y finalmente para dividir de forma aleatoria y *racional* la data en SE y SP.

Inicialmente se seleccionaron las mejores 50 variables (se listaron según significación estadística) y se emplearon el AC de tipo árbol jerárquico [*Joining* o *Tree Clustering* el cual emplea el algoritmo del *k*-vecino más cercano, o por sus siglas en ingles *k*-NNCA (*k*-Nearest Neighbor Cluster Analysis)] para la identificación de compuestos repetidos a través del esquema de amalgamación (también conocido como camborano)(90-91). Además, este AC inicial nos permitió identificar la estructuración de la data y cuantos grupos existían aproximadamente, cuestión medular para poder desarrollar un AC de tipo *k*-medias en donde hay que prefijar el número de *clúster*. Mediante

el análisis del esquema de amalgamación no se identificaron los compuestos con características atípicas u *outlier* los cuales tienen una influencia muy negativa en la modelación con ADL.

Posteriormente, se efectuó un análisis de Cluster *k*-medias el cual permitió analizar la existencia de *outliers* (análisis complementario al AC de árbol); pero también la significación de las variables incluidas, cuestión que no es posible en el primer AC. Después de varios pasos iterativos, AC árbol y AC *k*-medias, se fue reduciendo en cada caso el número de variables de acuerdo a su significación estadística(90-91). Este procedimiento se aplicó con todas las familias de DMs calculados por separados y juntos (por categoría), y en cada caso se desarrolló la misma metología de trabajo. A partir de este momento ejemplificaremos los estudios realizados en AC con una categoría de DMs del DRAGON (los índices topológicos), resaltando que de igual forma se realizó este estudio con todas las demás categorías y familias de índices moleculares, y que el resultado final fue una *fusión* de todos los experimentos.

El primer AC realizado (árbol jerárquico o cluster *k*-NNCA) permitió visualizar la distribución en diferentes grupos de los compuestos. El dendrograma obtenido con esta serie permite hacer un análisis de los compuestos diferentes estructuralmente de la data y además se puede observar la diversidad estructural de la data lo cual garantiza una gran representatividad de grupos químicos tanto en la SP como en la SE.

Como el AC de AC *k*-medias (*k*-MCA) facilita la tarea de agrupar los compuestos en diferentes clúster para seleccionar subsistemas químicos y realizar una división adecuada de la data en SE y SP se realizó un análisis de varianza teniendo en cuenta los resultados de los dendrogramas, y se paso posteriormente a particionar la serie de compuestos en 20 conglomerados, utilizando este último AC (*k*-MCA). Para ello se tomo en consideración que las variables empleadas tuvieran la menor variabilidad dentro de los grupos y la mayor variabilidad entre los grupos, dado por el estadístico F de Fisher, en este caso. Posteriormente, se seleccionaron los compuestos de la SE y SP, tomando de forma aleatoria compuestos de cada uno de los conglomerados. Del total de 2145 compuestos, 1357 fueron escogidos de forma aleatoria dentro de cada conglomerado para formar la SE. La gran variabilidad estructural de esta SE seleccionada posibilita un dominio de aplicación (DA) global (o al menos amplio) de los modelos obtenidos a partir de ella. (Figura 1)

Los 788 compuestos (25-35% total y en cada uno de los 20 conglomerados) restantes fueron usados como conjunto de prueba para la validación externa de los modelos. Estos 788 compuestos no fueron nunca usados para el desarrollo de los modelos de ADL.

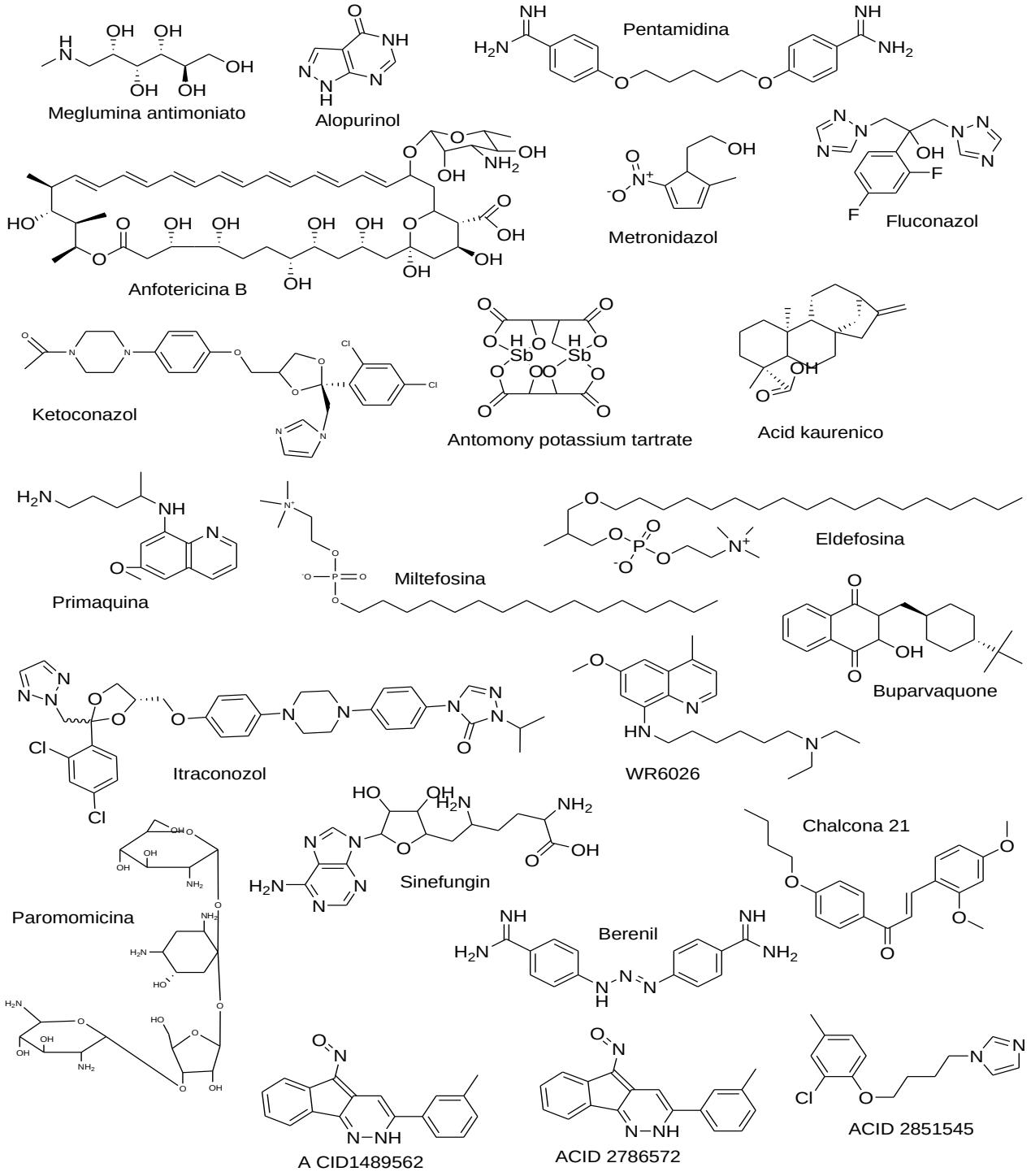


Figura 3.1. Muestra diversa de los compuestos activos incluidos en el estudio.

3.2 OBTENCIÓN Y VALIDACIÓN DEL MODELO DE CLASIFICACIÓN QSAR-ADL

En esta sección se describirán los resultados más importantes obtenidos en la modelación de la actividad empleando ADL y todas las familias de DMs implementados en el programa DRAGON(88).

La aplicabilidad y la representatividad del presente método dependen de forma crítica de la selección de los compuestos que son utilizados como SE para construir el modelo de clasificación. El aspecto más crítico en la construcción de la SE es garantizar la gran diversidad molecular de la data. Con el propósito de asegurar esta diversidad molecular se ha seleccionado una data compuesta por una gran cantidad de entidades moleculares, todos evaluados experimentalmente. La data de compuestos activos e inactivos fue seleccionada considerando toda la representatividad de los diferentes núcleos estructurales (cabeza de series o compuestos líderes) y los diferentes mecanismos de acción. En la Figura 3.1 se muestra un resumen de varios de los subsistemas moleculares incluidos en el presente estudio.

Con el ánimo de modelar la actividad anti-Leishmania, se desarrollo la modelación usando el ADL y los índices 0-2D del DRAGON como técnica estadística y como descriptores moleculares, respectivamente. La mejor función de clasificación obtenida con el proceder 'forward y backward stepwise' es dada a continuación junto con sus parámetros estadísticos:

$$\begin{aligned} Class = {} & 0.238\,nO + 0.909\,nR10 - 0.998\,MAXDP + 19.884\,PW3 - 20.354\,X0Av \\ & + 43.954\,X3Av - 3.7619\,MATS2m + 2.038\,MATS6e - 0.668\,GATS8p + 95.431\,JGI4 \\ & - 1.263\,nCONN + 0.0067\,ALOGP2 - 1.057\,B02[O\text{-}O] - 1.538\,B04[O\text{-}S] + 1.67 \end{aligned} \quad (3.1)$$

$N = 1357 \quad \lambda = 0.60 \quad D^2 = 3.32 \quad F = 62.7 \quad Rcan = 0.63 \quad \chi^2 = 678.45 \quad p<0.0001$

donde, N es el número de compuestos, λ es el estadístico de Wilks, D^2 es el cuadrado de la distancia de Mahalanobis y F es el estadístico de Fischer.

Tabla 3.1. Resultados de la Clasificación de los Compuestos Incluidos en las Series de Entrenamiento y de Predicción Obtenida por la ecuación 3.1.

Serie	Exactitud 'Q_{Total}' (%)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	"Hit" de Falsos Positivos (%)
SE	82.76	63.98	82.51	17.15
SP	76.40	47.27	76.02	23.50

La data de 2145 compuestos, fue dividida aleatoreamente en dos subgrupos, uno conteniendo 366 compuestos activos (antileishmaniásicos) y 991 compuestos inactivos como serie de entrenamiento (1357 compuestos) y el otro conteniendo 171 compuestos activos y 617 inactivos como serie de predicción (788 compuestos).

En la Tabla 3.1 se sumarizan los resultados de la clasificación obtenidos en el ajuste del modelo utilizando (85). El modelo obtenido (Q = 82.76%) describe de una forma adecuada la actividad, evidenciándose un adecuado porcentaje de falsos activos (ver Tabla 3.1). Los falsos activos son compuestos inactivos son clasificados como activos por los modelos y los falsos inactivos son los compuestos activos clasificados como inactivos.

Una de las aplicaciones más importantes de un modelo QSAR es su uso en la predicción de la actividad de nuevas entidades químicas, que incluso no tienen que poseer existencia física aún. En este sentido, uno de los criterios para la aceptación o no de un modelo QSAR como los que se han desarrollado en este trabajo, están basados en los estadísticos de la serie de predicción externa (92). En esta serie la Ec. **3.1** clasificó correctamente el 76.02% y el 76.50% de los compuestos como activos e inactivos, respectivamente, para un porcentaje de buena clasificación global de 76.40%. Como puede observarse, en esta serie el modelo ajustado describió adecuadamente la actividad biológica de estos compuestos.

En la Tabla 3.1 se muestran los resultados de la clasificación obtenidos en la serie de validación externa (exactitud, sensibilidad, especificidad, etc.) y en el ANEXO 9 se muestran las clasificaciones de los compuestos presentes en la series de entrenamiento y de predicción.

3.3 COMPARACIÓN CON OTROS ENFOQUES TEÓRICOS REPORTADOS EN LA LITERATURA

Dos enfoques teóricos han sido reportados en la literatura internacional para la predicción '*in silico*' de la actividad anti-leishmania de NEQ(93-94), uno de ellos desarrollados por nuestro propio

grupo de investigación. En estas investigaciones varios descriptores moleculares y el ADL han sido usados para acceder a la discriminación de la actividad.

Tabla 3.2. **Comparación entre los modelos desarrollados para la descripción de la actividad leishmanicida.**

Rasgos de los modelos objeto de comparación[a]	***Modelos de clasificación***		
	Eq. 3.1	Eq. I	Eq. II
N total	2145	168	60
N antileishmania	537	77	12
Wilks'λ	0.60	0.32	0,389
F	62.7	49.6	8,97
D^2	3.32	8.49	c
Variables en el modelo	14	5	7
Serie de Entrenamiento			
N total	1357	121	50
N antileishmania	366	60	12
Exactitud 'Q_{Total}'	82.76	93.39	90
Familias de compuestos líderes[b]	Amplio Rango	Rango reducido	Rango reducido
Serie de predicción			
N total	788	121	10
N antileishmania	171	17	0

Exactitud 'Q_{Total}'	76.40	89.36	90
Familias de compuestos líderes[b]	Amplio Rango	Rango reducido	Rango reducido

[a]Ecuación **3.1** es reportada en este trabajo, modelos I y II fueron reportadas por Roldos, V.; Nakayama, H. y col., (Eur. J. Med. Chem. 43 (2008) 1797) y García-Doménech, R.; Domingo-Puig, C. y col. (An. R. Acad. Nac. Farm, 2008, 74, no3). [b]Solo las familias de compuestos con gran representatividad fueron tenidas en cuenta para el análisis.

[c] Se menciona en en artículo pero no se refiere su valor.

En la Tabla 3.2 se muestran los principales resultados obtenidos con estos enfoques computacionales y los archivados por el modelo desarrollado en este trabajo. Como se puede observar, el modelo reportado en esta tesis es superior en los principales objetos de comparación, tales como: 1) número de compuestos totales y anti-leishmania, al igual que representatividad estructural y de modo de acción en las SE y SP, 2) parámetros de clasificación (tales como exactitud, sensibilidad, especificidad, etc) y 3) parámetros estadísticos (λ, D^2 y F-Fischer, entre otros). Es importante destacar, que nuestro modelo es el primero que emplea sustancias "realmente" inactivas, pues los demás reportes emplean como inactivas a moléculas que no tienen reportada la actividad leishmanicida, lo cual facilita la predicción pero también disminuye la sensibilidad de detección de falsos activos pues no emplean un punto o valor de corte de actividad (potencia) y los compuestos activos también se incluyen como tal sin ser exhaustivos en el análisis de si realmente tienen o no una adecuada potencia.

3.4 COMENTARIOS FINALES: EL 'SCREENING' VIRTUAL COMO UNA PROMISORIA ALTERNATIVA PARA LA SELECCIÓN Y EL DISEÑO RACIONAL DE FÁRMACOS ANTI-LEISHMANIA.

El 'screening' virtual ha emergido como una interesante alternativa para la evaluación masiva de compuestos químicos (86). Este proceso consiste en utilizar los modelos obtenidos en el 'screening' de grandes bases de datos en virtud de encontrar un conjunto reducido de compuestos predichos con la actividad biológica deseada.

Utilizando la función obtenida, se desarrolló una búsqueda virtual de nuevos fármacos antileishmaniásicos. En este sentido, podemos plantear que existen 2 enfoques diferentes para encontrar un nuevo compuesto leishmanicida mediante cribado virtual: 1) diseño de nuevos

compuestos para ser sintetizados en un laboratorio químico y posteriormente evaluados experimentalmente o 2) encontrar compuestos conocidos, con otras actividades o usos (fundamentalmente fármacos que son usados en clínica), en bases de datos químicas y probar su actividad antileishmaniásica experimentalmente. Ambos enfoques son importantes y muy utilizados en la práctica farmacéutica, el primero permite el diseño de nuevos cabezas de serie (compuestos líderes) con la actividad deseada, pero ellos necesitan ser primeramente sintetizados, evaluados farmacológicamente y finalmente tienen que pasar a través de rigurosos 'test' toxicológicos y farmacodinámicos. Sin embargo, los compuestos seleccionados con el segundo enfoque ya tienen métodos de síntesis bien establecidos y en muchos casos su comportamiento toxicológico y farmacodinámico es bien conocido, sobre todo para el caso de compuestos comercializados como fármacos. Por esta razón hemos seleccionado el segundo método de búsqueda para encontrar nuevos compuestos antileishmaniásicos.

Se desarrollo una exhaustiva búsqueda en bases de datos internacionales, y los resultados aún están en proceso. En este manuscrito solo mostraremos, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos en el tamizaje virtual de la colección ***Spectrum*** (87), de la cual se puede obtener cualquiera de los 2000 compuestos que incluye para una sucesiva evaluación experimental.

En la Tabla 3.3 se muestran los nombres y diversos datos de los compuestos seleccionados por los modelos como candidatos promisorios. Como puede ser observado, solo un reducido grupo de 316 fueron identificados por la función discriminante como posibles compuesto anti-leishmania. Entre estos, se pueden encontrar conocidos fármacos con otras propiedades farmacológicas y varios productos naturales con diversos usos.

Estos resultados son unos de los más importantes criterios de validación del modelo desarrollado en este trabajo, pues estos son capaces de detectar una serie de compuestos como activos a partir de miles de compuestos incluidos en las bases de datos.

Tabla 3.3. Resultados del tamizaje virtual de la ***Spectrum collection*** usando la ecuación 3.1.

no.	ID	MOL NAME	MolWt	cas#	Bioactivty	Source	References
1	00211175	metacetamol	151.17	621-42-1	analgesic	synthetic	
2	00211307	gentisic acid	154.12	490-79-9	analgesic, antiinflammatory	widely distributed in higher plants and Penicillium spp	
3	00211473	1,4,5,8-tetrahydroxy-2,6-dimethylanthroquinone	300.27	19079-10-8		Phoma terrestris and Curvularia lunata	Arch Pharm 294: 521 (1961); Aust J Chem 21: 783 (1968)
4	00211539	arabitol(d)	152.15	488-82-4		Lecanora sordida & other lichen & fungi	
5	00211950	cosmosiin	432.39	578-74-5	antiviral (HIV)	Cosmos bipinnatus, Zinnia elegans	Phytochemistry 19: 985 (1980)
6	00212140	veratric acid	182.18	93-07-2		Verbascum thapsus, Sabadilla officinalis, Stephania abyssinica	J Org Chem 10:527 (1945); Helv Chim Acta 59:949 (1976)
7	00212	chlorquinaldol	228.0	72-80-0	antiinfectant,	synthetic	

	151		8		antifungal		
8	00231084	umbelliferone	162.15	93-35-6	antifungal, phytoalexin	Angelica, Artemisia, Coronilla, Ferula and Ruta spp	Chem Pharm Bull 19:640 (1971); Phytochemistry 14:1083 (1975)
9	00240422	2-acetylpyrrole	109.13	1072-83-9	hepatoprotectant, organoleptic	Valeriana officinalis, Camellia thea, Paeonia moutan, Lycium chinense ,Streptomyces A-5071	Agric Biol Chem 47:2397, 2925 (1983); 48:2847 (1984); 55:2117 (1991)
10	00240642	methylnorlichexanthone	272.26			various lichens	
11	00240673	robustic acid	380.40	5307-59-5		Derris robusta	J Chem Soc 1969:365
12	00240826	purpurogallin-4-carboxylic acid	264.19		antioxidant	semisynthetic	
13	00240914	pseudo-anisatin	298.34	31090-37-6	GABA antagonist	Illicium anisatum	J Am Chem Soc 74: 3211 (1952)

14	00240958	4'-methoxyflavone	252.27	4143-74-2		Sapindus saponaria.	
15	00270051	methyl deoxycholate	406.61	3245-38-3		rabbit bile & feces	Helv Chim Acta 25:797 (1942); J Biol Chem 238: 3846 (1963)
16	00290030	cearoin	244.25	52811-37-7		Dalbergia spp	Phytochemistry 14: 1452, 2287 (1975)
17	00300001	orsellinic acid	168.15	480-64-8		common lichen constituent	
18	00300003	solidagenone	316.44	23534-56-7		Solidago canadensis L.; mp 133-134 C	Tetrahedron 25, 2233 (1969)
19	00300007	euparin	216.24	532-48-9		Eupatorium macculatum	J Chem Soc 1939: 925
20	00300012	isopimpinellin	246.22	482-27-9		Hercaleum maximum; mp 150-153 C dimorphic (142-145 C)	J Chem Soc 1945: 540
21	00300013	pimpinellin	246.22	131-12-4	GABA receptor antagonist, phototoxin	Heracleum maximum root; mp 118-119 C	Monatsh 59: 161 (1932); J Org Chem 35: 2294 (1970)

22	00300021	gibberellic acid	346.38	77-06-5		Gibberella fujikuroi	J Chem Soc 1954: 1066
23	00300032	isobergaptene	216.20	482-48-4		Heracleum and other Umbelliferaceae; mp 223-224 C	Ber 70: 1253 (1937)
24	00300038	juglone	174.16	481-39-0	antineoplastic, antifungal	leaves and nuts of Juglans spp., Carya spp and Pterocarya spp.	
25	00300048	kobusone	222.33	24173-71-5		Cyperus rotundus, Sindora sumatrana	J Chem Soc 1957: 2988; Chem Pharm Bull 17: 1390 (1969); 42: 138 (1994); Helv Chim Acta 66: 1843 (1983)
26	00300050	abienol	290.49	17990-16-8		Abies spp	J Chem Soc (C) 1964: 5822
27	00300055	cadin-4-en-10-ol	222.37			Chamaecyparis spp and Juniperus spp.	Tet Lett 1968: 1913
28	00300056	larixol	306.49			Larix sibiricia	Tet Letters 1965: 3523; 1967: 219
29	00300	epi(13)torulosol	306.4	3650-		Cryptomeria japonica and Larix	J Org Chem 29: 1554

	058		9	30-4		sibirica	(1964); Phytochemistry 13:471 (1974)
30	00300061	eupatoriochromene	218.25	19013-03-7	antifungal	Eupatorium rugosum	Acta Chem Scand 23:3605 (1969); J Org Chem 44:1429 (1979); Biotechnol Biochem 60:664 (1996)
31	00300062	metameconine	194.19			Accacia crombei	
32	00300101	epoxy (1,11)humulene	220.36			Humulus lupulus	J Chem Soc 1928: 785; 1929: 359.
33	00300110	3-nor-3-oxopanasinsan-6-ol	222.33			derivative Panax ginseng	Chem Pharm Bull 35: 1975 (1987)
34	00300117	isokobusone	222.33	24173-72-6		Cyperus rotundus, Sindora sumatrana	Chem Pharm Bull 17:1390

							(1969); 42:138 (1994)
35	00300147	usnic acid	344.32	125-46-2	antibacterial	Usnea, Cladonia and other lichen spp	J Chem Soc, 1953, 603; Antibiotics I (Verlag), 1967, p 611
36	00300531	melezitose	504.45			honey & plant exudates	J Org Chem 11: 610 (1946)
37	00300539	arbutin	272.26	497-76-7		Berginia crassifolia; also in Pyrus and Vaccinium spp.	Pharmazie 15: 650 (1960)
38	00300540	hymecromone methyl ether	190.20	2555-28-4		Dalbergia volubilis, Eupatorium pauciflorum	Indian J Chem 15:94, 492 (1977)
39	00300542	santonin	246.31	481-06-1		Artemisia spp.	J Chem Soc 1930: 1110
40	00300545	chrysophanol	254.24	481-74-3		Cassia and Rumex spp	Phytochemistry 11: 2122 (1972)
41	00300546	bergapten	216.20	484-20-8	antipsoriatic, antiinflammatory	widespread in Umbelliferae	Ber 67: 59 (1934); Chem Pharm Bull

							38: 2498 (1990)
42	00300554	phloretin	274.28	60-82-2		Prunus spp	Ann Rev Biochem 20: 4955 (1951)
43	00300556	chrysarobin	240.26	491-58-7		Andira araroba (glacial AcOH)	J Am Chem Soc 53: 4114 (1931)
44	00300558	gedunol	484.59			Meliaceae spp	
45	00300564	menthone	154.25	14073-97-3		pennyroyal and peppermint oils	J Org Chem 25: 1434 (1960)
46	00300566	chrysanthemyl alcohol	154.25	5617-92-5		reduction product of pyrrethrin constituent	
47	00300604	phloracetophenone	168.15	480-66-0		Prunus domesticus	JACS 54:2452 (1932); J Chem Soc 1953:1241; Phytochemistry 16:614 (1977)
48	00300607	rutoside (rutin)	610.53	153-18-4	vascular protectant	Ruta graveolens, widespread in plants	

49	00307031	cholesteryl acetate	428.70	604-35-3		animal tissue; derivative	
50	00307043	dehydro (11,12)ursolic acid lactone	454.70			Eucalyptus spp.	
51	00310001	aconitic acid	174.11	585-84-2		Aconitum and Achillea spp	Ind Eng Chem 33: 637 (1941)
52	00310002	adonitol	152.15	488-81-3		Adonis spp	Pharm Acta Helv 23: 153 (1948); JACS 104: 1109 (1982); J Chem Soc 1983: 1553
53	00310008	djenkolic acid	254.33	498-59-9		djenkol bean (Pithecolobium lobatum)	J Biol Chem 168: 373 (1947)
54	00310009	epiandrosterone	290.45			in normal human urine	J Am Chem Soc 75: 2275 (9153)
55	00310010	helenine	232.33	546-43-0	anthelmintic, antibacterial, antineoplastic	Inula spp	J Am Chem Soc 79: 5721 (1957); 88: 3408 (1966); J Org Chem

							29: 3727 (1964)
56	00310012	hesperetin	302.29	520-33-2		aglycone of hesperidin (00310011)	J Chem Soc 1956: 632
57	00310018	quinic acid	192.17	77-95-2		Cinchona spp	Ber 65: 1009 (1932)
58	00310023	hypoxanthine	136.11	68-94-0		widely distributed in the plant and animal kingdom	
59	00310028	quassin	388.46	76-78-8	insecticide, antiamoebic	Quassia amara, Picrasma excelsa and Ailanthus glandulosa	JACS 60:1146 (1938); 72:375 (1950); Tetrahedron 15:100 (1961); 18:1433 (1962)
60	00310031	rhamnetin	316.27	90-19-7		Rhamnus cathartica	J Chem Soc 105: 2354 (1914)
61	00310041	visnagin	230.22	82-57-5		Ammi visnaga	Tetrahedron 3: 230 (1958)
62	00310	thymoquinone	164.2			Callitris, Monarda spp, Juniperus	Planta Med 11: 465

	299		1			cedrus, Nigella sativa	(1963)
63	00390001	apiole	222.24	523-80-8	antipyretic, diuretic, insecticide	Petroselimum spp, Anethum graveolens	Phytochemistry 15: 1773 (1976); Pharmazie 34: 426 (1979)
64	00400011	punctaporonin b	252.36	93697-36-0		Poronia punctata	J Chem Soc 1988: 823
65	00501000	d,l-threo-3-hydroxyaspartic acid	149.10		L-aspartate beta-carboxylase inhibitor	Streptomyces spp, Arthrinium phaeospermum, Dactylosporangium aurantiacum	
66	01400131	haematommic acid	196.16	479-25-4		Alectoria spp, Haematomma spp and Lethariella spp	J Org Chem 42: 2526 (1977); Helv Chim Acta 72: 1061 (1989)
67	01400156	isopeonol	166.18	493-33-4		Paeonia spp	
68	01400164	2-hydroxy-3,4-dimethoxybenzoic acid	198.18		prostaglandin synthetase inhibitor	Dalbergia odorifera	
69	01400208	coumarin	146.15	91-64-5	antineoplastic, antiinflammatory, antihyperglycaemic	Coumarouna odorata, tonka beans, lavender oil	Prog Chem Org Nat Prod 9: 225

							(1952)
70	01400666	methoxyvone	266.30		anabolic	synthetic	
71	01401401	methyl robustone	378.39			Derris spp	J Indian Chem Soc 18: 471 (9179)
72	01500101	acetaminophen	151.17	103-90-2	analgesic, antipyretic	synthetic	
73	01500108	allopurinol	136.11	315-30-0	antihyperuricemia, antigout, antiurolithic	synthetic	
74	01500127	anthralin	226.23	480-22-8, 1143-38-0	antipsoriatic	synthetic	
75	01500180	chlorothiazide	295.72	58-94-6	diuretic, antihypertensive	synthetic	
76	01500182	chloroxylenol	156.61	88-04-0	antibacterial, topical and urinary antiseptic	synthetic	
77	01500184	chlorpromazine	318.87	50-53-3	antiemetic, antipsychotic	synthetic	
78	01500188	chlorzoxazone	169.57	95-25-0	muscle relaxant (skeletal)	synthetic	
79	01500	cinoxacin	262.2	28657-	antibacterial	synthetic	

	190		2	80-9			
80	01500202	cloxyquin	179.61	130-16-5	antibacterial, antifungal	synthetic	
81	01500208	cotinine	176.22	5695-98-7, 486-56-6 [cotinine]	antidepressant	Nicotiana tabacum	JACS 79: 149 (1957)
82	01500211	cyclizine	266.39	82-92-8	H1 antihistamine	synthetic	
83	01500217	cytarabine	243.22	147-94-4	antineoplastic, antiviral, antimetabolite	synthetic	
84	01500220	danazol	337.47	17230-88-5	anterior pituitary suppressant	synthetic	
85	01500222	dapsone	248.31	80-08-0	antibacterial, leprostatic, dermatitis herpetiformis suppressant	synthetic	
86	01500223	daunorubicin	527.53	20830-81-3	antineoplastic	Streptomyces peucetius; FI-6339, NDC-0082-4155, RP-13057	
87	01500235	dibenzothiophene	184.26	132-65-0	keratolytic	synthetic	

88	01500239	dicumarol	336.30	66-76-2	anticoagulant	synthetic	
89	01500247	digoxin	780.96	20830-75-5	cardiac stimulant	Digitalis lanata or D. orientalis Lam., Scrophulariaceae	J.Chem.Soc. 1930: 508; 1954: 2012
90	01500294	cineole	154.25	470-82-6	anthelminthic, antiseptic, expectorant	eucalyptus and lavender oils	
91	01500296	eugenol	164.21	97-53-0	analgesic (topical), antiseptic, antifungal	common in plant essential oils	
92	01500305	fluorouracil	130.08	51-21-8	antineoplastic, pyrimidine antimetabolite	synthetic	
93	01500309	furazolidone	225.16	67-45-8	antibacterial	NF-180; synthetic	
94	01500310	furosemide	330.75	54-31-9	diuretic, antihypertensive	synthetic	
95	01500311	fusidic acid	516.72	6990-06-3	antibacterial	Fusidium spp	Tetrahedron 21: 3505 (1965)
96	01500313	gemfibrozil	250.34	25812-30-0	antihyperlipoproteinemic	synthetic	
97	01500335	hydrochlorothiazide	297.74	58-93-5	diuretic	semisynthetic	

98	01500341	hydroflumethiazide	331.29	135-09-1	antihypertensive, diuretic	synthetic
99	01500353	iodoquinol	396.96	83-73-8	antiamebic	synthetic
100	01500365	levonordefrin	183.21	829-74-3, 18829-78-2 [replaced]	vasoconstrictor	synthetic
101	01500387	mercaptopurine	152.18	6112-76-1, 50-44-2 [anhydrous]	antineoplastic, purine antimetabolite	synthetic
102	01500400	methoxsalen	216.20	298-81-7	antipsoriatic, pigmentation agent	synthetic
103	01500412	metronidazole	171.16	443-48-1, 69198-10-3 [metronidazole hydrochloride]	antiprotozoal	synthetic
104	01500	nitromide	211.1	121-81-	antibacterial,	synthetic

	435		4	3	coccidiostat	
105	01500441	norgestrel	312.46	6533-00-2	progestogen	synthetic
106	01500490	piperazine	86.14	110-85-0, 144-29-6 [anhydrous], 41372-10-5 [piperazine citrate]	anthelmintic	synthetic
107	01500518	pyrazinamide	123.12	98-96-4	antibacterial, tuberculostatic	synthetic
108	01500520	pyrimethamine	248.72	58-14-0	antimalarial	synthetic
109	01500526	reserpine	608.69	50-55-5	antihypertensive	Rauwolfia serpentina
110	01500539	spironolactone	416.58	52-01-7	diuretic	synthetic
111	01500546	sulfadiazine	250.28	68-35-9	antibacterial	synthetic
112	01500	theophylline	180.1	5967-84-0, 58-55-	bronchodilator	Camelia, thea, Paullinia cupana

	568		7	9 [anhydrous]		
113	01500570	thiabendazole	201.25	148-79-8	anthelmintic	synthetic
114	01500579	tobramycin	467.52	32986-56-4	antibacterial, inhibits protein synthesis	Streptomyces spp
115	01500583	tolnaftate	307.42	2398-96-1	antifungal	synthetic; SCH-10144
116	01500589	triamterene	253.27	396-01-0	diuretic	semisynthetic
117	01500595	trimethoprim	290.32	738-70-5	antibacterial	synthetic
118	01500609	vidarabine	267.25	24356-66-9, 5536-17-4 [anhydrous]	antiviral	synthetic
119	01500623	broxyquinoline	302.95	521-74-4	antiinfectant, disinfectant	synthetic
120	01500626	dichlorophene	269.13	97-23-4	anthelmintic	synthetic
121	01500	flopropione	182.1	2295-	antispasmodic	synthetic

	629		8	58-1			
122	01500656	ajmaline	326.44	4360-17-7	antiarrhythmic (Class Ia): inhibits glucose uptake by mitochondria, & PAF blocker	Rauwolfia spp., Melodinus balansae, Tonduzia longifolia	J Chem Soc 1954: 1242; Angew Chem., 68: 13 (1956)
123	01500657	hydroquinidine	326.44	1435-55-8	antiarrhythmic, antimalarial	Cinchona bark	
124	01500672	quercetin	302.24	117-39-5	capillary protectant, antioxidant. antineoplastic, anti-HIV; LD50(mouse) 159 mg/kg po	Solanaceae, Rhamnaceae, Passifloraceae, Umbelliferae genera	Chem Ber 103:3674 (1970); Experientia 28:380 (1972); Phytochemistry 12:1787 (1973); IARC Monog 31:213 Suppl 7:71 (1983); Antiviral Res 12:99 (1989)
125	01500676	ouabain	584.67	11018-89-6, 630-60-4 [anhydro	antiarrhythmic, cardiotonic, hypertensive, Na/K ATPase inhibitor	Acokanthera and Strophanthus spp	Ann Rev Biochem 15: 155 (1946); Helv Chim Acta 42:

				us]			1418 (1959); 45: 1244 (1962); 50: 2299 (1967)
126	01500677	albuterol (+/-)	239.32	18559-94-9	bronchodilator, tocolytic	synthetic	
127	01500685	clozapine	326.83	5786-21-0	antipsychotic	synthetic	
128	01500711	albizziine	147.13	585-23-9	glutamase inhibitor	Mimosaceae	Experientia 15: 253 (1959); Coll Czech Chem Comm 24: 3719 (1959); Acta Chem Scand 14: 961 (1960); 18: 2412 (1964); Biochem Biophys Res Comm 59: 789 (1974)
129	01500715	acetylglucosamine	221.21		antiarthritic	synthetic	
130	01500	7,2'-dihydroxyflavone	254.2	77298-	antihaemorrhagic	Primula spp	

	719		4	66-9			
131	01500729	4-methylesculetin	192.17			analog of esculetin	
132	01500746	naringenin	272.26	480-41-1	antiulcer, gibberellin antagonist	widely distributed in plants	
133	01500752	quercitrin	448.39	522-12-3	antihemmorrhagic	widespread in plants	
134	01500754	xanthurenic acid	205.17	59-00-7	caspase activator, guanylyl cyclase stimulant	pathological metabolite of tryptophan and kynurenine	Mol Microbiol 42:553 (2001); BMC Physiology 1:7 (2001)
135	01500759	quinalizarin	272.22	81-61-8	antiviral, HIV-1 integrase inhibitor	synthetic	PNAS 93:9742 (1996); J Biol Chem 276:46946 (2001); Current Med Chem 10:1795 (2003)
136	01500760	hecogenin	430.63	467-55-0	antiinflammatory	Agave and Yucca spp	Planta Med 63:199 (1997)

137	01500765	naringin	580.55	10236-47-2	antihaemorrhagic, antiinflammatory	Citrus spp	JACS 61: 175 (1939); Tetrahedron 19: 773 (1963)
138	01500804	althiazide	383.90	5588-16-9	diuretic	synthetic	
139	01500817	carminic acid	508.40	1260-17-9		Dactylopius coccus (cochineal)	
140	01500819	bergenin	328.28	477-90-7		Bergenia spp.	J Chem Soc 1958: 2231
141	01500824	chelidonine (+)	353.38	476-32-4	antineoplastic, smooth muscle relaxant, hypotensive, CNS depressant	Chelidonium majus, Linn. (celandine)	Can J Res (B) 20:53 (1942); Coll Czech Chem Comm 22:279 (1957); 30:3697 (1965); 39:3352 (1974); Tetrahedron Letters 1979:495
142	01500	canavanine	176.1	543-38-	NO synthase inhibitor	Canavalia ensiformis	Phytochemistry 6: 863

	833		8	4			(1967); Eur J Pharmacol 269: 269; 271: 87 (1994)
143	01500839	cinchonidine	294.40	485-71-2	antimalarial	Cinchona spp	
144	01500842	caryophyllene [t(-)]	190.33	87-44-5		clove, cinnamon and many other oils	
145	01500860	s-isocorydine (+)	341.41	475-67-2	sedative, cholinergic	Dicentra canadensis, Artabotyris suaveoleus and Cordyalis species	J Org Chem 19:1774 (1954); Aust J Chem 20: 1277 (1967)
146	01500864	harmaline	214.27	304-21-2	CNS stimulant, antiparkinsonian agent	Peganium harmala	Ber 63: 120 (1930)
147	01500866	harmane	182.23	486-84-0	intercalating agent, sedative	Arariba rubra.	J Am Chem Soc 76: 2792 (1954)
148	01500867	harmine	212.25	442-51-3	antiparkinsonian, CNS stimulant	Peganium harmala	Phytochemistry 7: 503 (1968)
149	01500898	emodin	270.24	518-82-1	antibacterial, antineoplastic, cathartic, tyrosine	Cascara, Rheum and Rhammnus species	Oncogene 17: 913 (1998);

					kinase inhibitor		Planta Med 65: 9 (1999); Clin Cancer Res 5: 343 (1999)
150	01500901	aesculin	340.29	531-75-9	antiinflammatory	Aesculus hippocastanum, Fraxinus spp	Naturwiss 29: 650 (1941); Phytochemistry 11: 657 (1972)
151	01500903	etoposide	588.57	33419-42-0	antineoplastic	semisynthetic	
152	01500939	noreleagnine	172.23			Elaenus spp	J.Gen.Chem .USSR: 16: 139 (1946); 20: 1927 (1951)
153	01500992	flumequine	261.26	42835-25-6	antibacterial	synthetic	
154	01500998	ethoxyquin	217.31		antioxidant	synthetic	
155	01501125	3-aminopropanesulphonic acid	139.17	3687-18-1	antibacterial; GABA agonist	synthetic	Br J Pharmacol 59:373 (1977);

							Neuropharmacology 17:13 (1978)
156	01501130	fampridine	94.12	504-24-5	K channel blocker; multiple sclerosis therapy	synthetic	J Pharmacol Exp Ther 275: 864 (1995)
157	01501147	sulfamonomethoxine	280.31	1220-83-3	antibacterial	synthetic	
158	01501175	flurandrenolide	436.53	1524-88-5	antiinflammatory	semisynthetic	
159	01501187	flunisolide	434.51	77326-96-6, 3385-03-3	antiinflammatory	semisynthetic	
160	01501197	primuletin	238.25	491-78-1		Primula spp	Helv Chim Acta 24:297 (1941)
161	01501200	xylazine	220.34	23076-35-9, 7361-61-7 [xylazine]	analgesic	synthetic	
162	01502	salicin	286.2	138-52-	analgesic, antipyretic	Salix spp	

	255		8	3			
163	01502012	fosfosal	218.10	6064-83-1	analgesic, antiinflammatory	synthetic	
164	01504178	tetrahydropalmatine	355.44	3520-14-7	analgesic, hypnotic, papaverine-like	Corydalis spp	Ber 56: 875 (1923); J Org Chem 33: 2785 (1968)
165	01503322	thiram	240.43	137-26-8	antifungal	synthetic	
166	01503324	thiotepa	189.22	52-24-4	antineoplastic, alkylating agent	synthetic	
167	01503325	thiodiglycol	122.19	111-48-8	antineoplastic, alkylating agent	synthetic	
168	01503631	3,5-dinitrocatechol (or-486)	200.11		catechol O-methyltransferase inhibitor	synthetic	
169	01503636	n-methyl-d-aspartic acid (nmda)	147.13	6384-92-5	NMDA agonist	synthetic	
170	01503705	anethole	148.21	4180-23-8	expectorant, gastric stimulant, insecticide	anise, fennel and other plant oils	
171	01503801	naproxol	216.28	26159-36-4	antinflammatory, analgesic, antipyretic	synthetic	

172	01503804	colforsin	410.51	66575-29-9	adenylate cyclase activator, antiglaucoma, hypotensive, vasodilator	Coleus forskohlii; HL-362; L-75-1362B	J Biol Chem 258:2960 (1983); J Med Chem 26:436, 486 (1983); TIPS 10:442 (1989)
173	01503815	cevadine	591.75	62-59-9	antihypertensive	Veratrum alba; contains 20% veratridine	
174	01503904	patulin	154.12	149-29-1	antibacterial	Aspergillus clavatus, Penicillium patulum	J Chem Soc 1944: 415
175	01503919	clopamide	345.85	636-54-4	diuretic	synthetic	
176	01503934	perphenazine	403.98	58-39-9	antipsychotic	synthetic	
177	01503938	ribavirin	244.21	36791-04-5	antiviral	synthetic	
178	01503986	cafestol acetate	358.48	81760-48-7		coffee bean oil	Chem Ber 96: 2489 (1963); Tetrahedron 20: 1339 (1964)
179	01503	caffeic acid	180.1	331-39-		widespread in plants	

	987		6	5			
180	01503990	conessine	356.60	5913-82-6, 546-06-5 [conessine]		Holarrhena spp	
181	01504002	baicalein	270.24	491-67-8	antiviral (HIV)	Scutellaria baicalensis	Gazz Chim acta 49 (II): 47 (1919); Acta Phytochim 1: 109 (1923); Phytochemistry 10: 3298 (1971)
182	01504003	centaurein	522.47	35595-03-0		Centaurea jacea	
183	01504005	triptophenolide	312.41	74285-86-2		Tripterygium wilfordii	Chin Chem Lett 5:217 (1994)
184	01504019	gossypol	518.57	303-45-7	antispermatogenic, antineoplastic, antiHIV	Gossypium spp	J Am Chem Soc 60: 2193 (1938)
185	01504020	evoxine	347.37	522-11-2		Evodia xanthoxyloides	Aust J Sci Res, Ser A

							5:401 (1952); Planta Med 42:400 (1981)
186	01504022	salsolidine	207.27	493-48-1	antihypertensive	Salsola Richteri	Bull Soc Chim France 4L1265 (1937); Phytochemistry 12:193 (1973); 13:1628 (1974); J Nat Prod 39:175,197 (1976); 45:277 (1982)
187	01504024	lagochilin	356.51	23554-81-6		Lagochilus inebrians	Chem Commun 1974:249
188	01504025	salsoline	193.25	89-31-6	antihypertensive, antihistamine	Salsola richteri	Phytochemistry 12:193 (1973); J Med Chem 33:147 (1990)

189	01504027	cytisine	190.25	485-35-8	antiinflammatory, respiratory stimulant	Thermopsis lanceolata	J Chem Soc 1932: 2778; Martindale 28th Ed, 1700 (1982)
190	01504053	fucostanol	416.74	83-45-4		Calendula officinalis	J Am Chem Soc 60: 2431 (1938)
191	01504056	epicoprosterol	388.68	516-92-7		mammalian excretions	
192	01504066	loganin	390.39	18524-94-2		Strychnos nux-vomica, Menyanthes trifoliata	J Chem Soc 1961:1407
193	01504068	diosmetin	300.27	520-34-3		Valeriana, Digitalis spp	J Indian Chem Soc 31: 565 (1954)
194	01504071	loganic acid	376.36	22255-40-9		Swertia caroliniensis, Dipsacus asperoides	J Chem Soc 1961:1407
195	01504074	embelin	294.39		anthelmintic, oral contraceptive	Embelia spp.	Helv Chim Acta 31: 2237 (1948); Indian J Physiol Pharmacol 21: 31 (1977)

196	01504075	rhoifolin	578.53	17306-46-6		Chorisia, Citrus and Rhus spp	Experientia 20: 562 (1964); Chem Ber 102: 2083 (1969)
197	01504081	betulinic acid	442.69	472-15-1	antineoplastic	Betula spp.	Acta Chem Scand 19: 1661 (1965); Nature Medicine 1: 1046 (1995)
198	01504084	dihydrorobinetin	304.26			Robinia pseudoacacia	Ann 587: 207 (1954)
199	01504115	hieracin	302.24	1621-84-7		Ginkgo biloba, Hieracium pilosella and Isoetes spp	Chem Pharm Bull 32:4935 (1984)
200	01504116	formestane	300.44	566-48-3	antineoplastic, aromatase inhibitor	synthetic; CGP-32349	Steroids 65: 171 (2000)
201	01504120	carnosic acid	332.44	3650-09-7		Salvia spp, Rosmarinus officinalis	
202	01504123	10-hydroxycamptothecin	364.36	19685-09-7	antineoplastic	Camptotheca acuminata	J Med Chem 29:1553 (1986); J Nat Prod 53:186

							(1990)
203	01504124	linamarin	247.25	554-35-8		Linum usitatissimum, Manihot utilissimus	Phytochemistry 4: 127 (1965)
204	01504130	3,7-dihydroxyflavone	254.24	492-00-2		Platymiscium praecox	Phytochemistry 11: 3515 (1972)
205	01504140	butoconazole	411.78	64872-77-1, 64872-76-0 [butoconazole]	antifungal	synthetic; RS-35887	
206	01504143	artenimol	284.36	81496-81-3	antimalarial, antiinflammatory	semisynthetic; dihydroartemisinin	Med Res Rev 7: 29 (1987); Am J Trop Med Hyg 61:187 (199); Trends Pharmacol Sci 20:199 (1999)
207	01504153	norcantharidin	168.15		antineoplastic, protein phosphatase inhibitor	synthetic	Biochem Biophys Res Comm 276:

							278 (2000)
208	01504158	lomatin	246.27			Lomatium nuttallii, Nardostachys jatamansi	Tetrahedron 20: 2605 (1964); 21: 3591 (1965)
209	01504159	selinidin	328.37	19427-82-8		Selinium vaginatum	
210	01504160	pteryxin	386.41	13161-75-6	muscle relaxant	Pteryxia spp, Amni ursina	J Pharm Sci 51:149 (1962)
211	01504162	marmesin	246.27	13849-08-6		Aegle marmelos, Amni majus	
212	01504163	marmesin acetate	288.30			Amyris elemifera	
213	01504164	felamidin	350.37	17559-85-2		Ferulago meoides	
214	01504168	peucedanin	258.28	133-26-6		Peucedanum spp	Indian J Chem 2: 464 (1964)
215	01504180	asarinin (-)	354.36	13079-95-3	antibacterial (tuberculostatic)	Asarum & Xanthoxylum spp	Aust J Chem 1: 384 (1954); 26: 687 (1973)

216	01504181	pristimerin	464.65	1258-84-0	antineoplastic, antiinflammatory	Celastrus and Maytenus spp	
217	01504182	3-methylxanthine	166.14	1076-22-8	phosphodiesterase inhibitor	synthetic	Clin Exp Pharmacol Physiol 18: 163 (1991)
218	01504183	trifluridine	296.20	70-00-8	antiviral (opthalmic)	synthetic	
219	01504200	isoliquiritigenin	256.26	961-29-5	aldose reductase inhibitor, antineoplastic, antiinflammatory	widespread in Fabaceae	J Chem Soc 1953: 2183; Eur J Biochem 212: 87 (1992)
220	01504205	deltaline	451.56	6836-11-9	antiarrhythmic	Delphinium spp	J Am Chem Soc 80: 497 (1958); J Org Chem 46: 3284 (1981)
221	01504206	bovinocidin (3-nitropropionic acid)	119.08	504-88-1	antineoplastic	Aspergillus, Streptomyces spp & other microorganisms	Nature 164: 575 (1949)
222	01504207	pristimerol	466.67			derivative of pristimerin	
223	01504	atovaquone	366.8	95233-	antipneumocystic,	synthetic	

	210		5	18-4	antimalarial		
224	01504216	zoxazolamine	168.58	61-80-3	muscle relaxant, antirrheumatic	synthetic	
225	01504232	2,3-dihydroxy-6,7-dichloroquinoxaline	231.04		NMDA receptor antagonist (gly)	synthetic	J Neurochem 54: 699 (1990)
226	01504237	hydroquinone	110.11	123-31-9	antioxidant	synthetic	
227	01504260	levofloxacin	361.38	138199-71-0	antibacterial	synthetic	
228	01505002	lappaconitine	584.72	32854-75-4	analgesic, antiarrhythmic	Aconitum spp and Delphinium cashmirianum	Tet Lett 1964:2711; Can J Chem 45:969 (1967); J Nat Prod 42:615 (1979); Planta Medica 64:22 (1998); Mol Pharm 59:183 (2001)
229	01505	l-deoxyalliin	161.2	21593-	antineoplastic	Allium spp	J Cancer

	005		2	77-1			Res 50:5084 (1990)
230	01505012	exemestane	296.41	107868-30-4	antineoplastic, aromatase inhibitor	synthetic; PNU-155971, FCE-24304	J Steroid Biochem 30:391 (1988)
231	01505014	diallyl trisulfide	178.34	2050-87-5	antineoplastic	Allium spp	Carcinogenesis 9:131 (1988); Nutr Cancer 29:152 (1997); Arch Biochem Biphys 340:279 (1997)
232	01505015	3h-1,2-dithiole-3-thione	134.24		antioxidant, antineoplastic	synthetic; D3T	Free Rad Biomed 28:944 (2000)
233	01505030	demethylnobiletin	388.38	2174-59-6		Citrus, Sideritis, Heteropappus and Thymus spp; Mentha piperita, Amaracus pampanini	Tetrahedron 8:64 (1960); Phytochemistry 11:2283 (1972); 24:1027 (1985)

234	01505031	gardenin b	358.35	2798-20-1		Gardenia lucida; Brickellia, Citrus and Mentha spp	Tetrahedron 21:1441, 3741 (1965); Chem Pharm Bull 28:708, 717 (1980); Phytochemistry 23:2972 (1984)
235	01505032	artemether	298.38	71963-77-4	antimalarial	semisynthetic	
236	01505033	artemotil	312.41	75887-54-6	antimalarial	semisynthetic; arteether	J Med Chem 31:645 (1988); Antimicrob Agents Chemother 1994:1854; Trends Pharmacol Sci 20:199 (1999)
237	01505037	3-bromo-4-methyl-3,4-hexamethylene-3,4-dihydrodiazete-1.2-dioxide	235.08		guanyl cyclase activator, NO donor, vasodilator	synthetic; DD2	

238	01505080	salvinorin a	432.47	83729-01-5	k-opiod receptor agonist, psychotropic	Salvia divinorum	J Chem Soc 1982:2505; J Org Chem 49:4716 (1984); Chem Lett 1990:2015
239	01505105	3-bromo-7-nitroindazole	242.03	74209-34-0	NO synthetase inhibitor	synthetic	Eur J Pharmacol 310:115 (1996); TIPS 18:204 (1997)
240	01505108	l-buthionine sulfoximine	222.31	83730-53-4	inhibitor of gamma-glutamylcysteine synthetase	synthetic	J Biol Chem 254:7558 (1979); 257:13704 (1982); Bone Marrow Transplant 30:135 (2002)
241	01505114	clioquinol	305.50	130-26-7	antiseptic, antiamebic	synthetic	
242	01505127	gossypin	480.39	652-78-8		Gossypium spp, Hibiscus spp	Proc Indian Acad Sci Sect A, 24:352, 375

							(1946); 25:397 (1947)
243	01505129	plumbagin	188.18	481-42-5	antibacterial, antifungal, tuberculostatic; antifeedant (African army worms)	Aristea, Diospyros & Plumbago spp; Dyerophyton, Drosera, Dioncophyllum, Nepenthe, Sisyrinchium and Sparaxis tricolor	JACS 58:572 (1936); Indian J Chem 6:681 (1968); Fitoterapia 1990:387
244	01505133	sumaresinolic acid	472.71	559-64-8		Styrax benzoin, Enkianthus campanulatus, Orthopterygium huancuy	Helv Chim Acta 38:1304 (1955)
245	01505134	mangiferin	422.35	4773-96-0	MAO inhibitor, immunostimulant	Mangifera indica, Iris & Salacia spp, Aphloia, Athyrium, Anemarrhena, Belamcanda chinensis, Hedysarum ussuriense	J Chem Soc (C) 1966:1685; Phytochemistry 6:741, 1597 (1967); Tetrahedron 23:1363 (1967); Pharm Res 3:307 (1986); Naturwissen

							schaften 59:651 (1972)
246	01505137	bergaptol	202.17	486-60-2		Citrus spp	Ber 45:3705 (1912); 67:59 (1934); Helv Chim Acta 3:541 (1920); 4:718 (1921)
247	01505140	2',4-dihydroxy-3,4',6'-trimethoxychalcone	330.34	112572-59-5		Viscum album (glucoside)	Annalen 550:146 (1942); Planta 95:133 (1970); Phytochemistry 13:1561 (1974)
248	01505145	eriodyctol	288.26	552-58-9	expectorant	common flavan in numerous plant families	J Chem Soc 91:895 (1907); 97:2054 (1910)
249	01505151	harpagoside	480.47	19210-12-9		Melittis melissophyllum, Harpagophytum procumbens	J Chem Soc Perkin 1 1979:2473;

							Phytochemistry 40:1569 (1995)
250	01505153	2',3-dihydroxy-4,4',6'-trimethoxychalcone	330.34	38186-71-9		Merrillia caloxylon	Annalen 550:146 (1942); Planta 95:133 (1970); Phytochemistry 13:1561 (1974)
251	01505166	alendronate sodium	249.10	121268-17-5	bone resorption inhibitor, farnesyldiphosphate synthetase inhibitor, antimetastatic	synthesis	Nature 223:211 (1969); Cancer Res 62:2708 (2002); Mol Pharmacol 62:1255 (2002)
252	01505167	acadesine	258.24		glucose uptake stimulant; AMPK activator	synthetic	Eur J Biochem 229:558 (1995)Biochem J 338:783 (1999); J Mol

							Neurosci 17:45 (2001)
253	01505177	rubescensin a	364.44	28957-04-2	antibacterial, antineoplastic, insect growth inhibitor	Isodon trichocarpus, I japonicus, Rabdosia spp	Chem Pharm Bull 18:871 (1970); 20:1752 (1972); 24:2118 (1976); 29:3208 (1981); 37:1472 (1989); Agric Biol Chem 38:1261 (1974); Planta Med 54:414 (1988)
254	01505186	culmorin	238.37	18374-83-9		Fusarium spp	Chem Commun 1967:30; JACS 91:3400 (1969)

255	01505187	quetiapine	383.52	111974-69-7	antipsychotic: 5HT antagonist, dopamine antagonist, H1-antihistamine, alpha adrenergic blocker	synthetic; ICI-204636, ZD-5077, ZM-204639	
256	01505190	l(+/-)-alliin	177.22	556-27-4(-)	antibacterial, antioxidant	Allium species	Helv Chim Acta 34:481 (1951); Phytochemistry 15:521 (1976)
257	01505230	cilostazol	369.47	73963-72-1	phosphodiesterase inhibitor	synthetic	
258	01505249	apramycin	539.59	37321-09-8	antibacterial; LD50(iv) 280mg/kg(mouse)	Streptomyces tenebrarius, Saccharomyces porispora hiltus	J Org Chem 41: 2087 (1976); 43: 1430 (1978); Eur J Biochem 99: 623 (1979); Antimicrobial Agents Chemother 14: 69 (1978)
259	01505256	silibinin	482.45	22888-70-6	hepatoprotective agent, antioxidant	Silybum marianum	Arzneim-Forsch 20: 1248 (1970);

							Chem Ber 108: 790, 1482 (1975); Fitoterapia 6: 3 (1995)
260	01505263	alfluzocin	389.46	81403-80-7	alpha(1)-adrenergic blocker	synthetic; SL-77499	
261	01505268	nobiletin	402.40	478-01-3		Citrus spp	J Chem Soc 1938: 1004; Phytochemistry 14: 309 (1975)
262	01505269	tangeritin	372.38	481-53-8		Citrus spp, Fortunella japonica	Chem Ind 1957: 47; Phytochemistry 14: 309 (1975)
263	01505293	diallyl sulfide	114.21	592-88-1	anitbacterial, antifungal, antineoplastic, antihypercholesterolaemic, hepatoprotectant	Allium spp, Wasabia japonica	Arch Biochem Biophys 107:137 (1964); JACS 104:312 (1982); Cancer Lett 64:39 (1992);

							118:61 (1997);J Nutrition 131:1041S (2001)
264	01505304	secnidazole	185.18	3366-95-8	antiameobic, antitrichomonas	synthetic	Drugs 51:621 (1996)
265	01505315	6-aminonicotinamide	137.14	329-89-5	antineoplastic, apoptosis inducer	synthetic	Biochem Pharmacol 50:1943 (1995); Cancer Chemother Pharmacol 40:376 (1997)
266	01505316	prothionamide	180.27	14222-60-7	antibacterial	synthetic	Chemotherapy 26:276 (1980)
267	01505319	clopidol	192.05	2971-90-6	coccidiostat, antiplatelet	synthetic	Clin Appl Thromb Hemost 8:169 (2002)
268	01505322	cepharanthine	606.73	481-49-2	antineoplastic, hepatoprotectant,	Stephania spp	Biochem Pharmacol 46:1887

					radiopropective		(1993); Antimicrob Agents Chemother 43:492 (1999)
269	01505346	ketanserin tartrate	395.44	83846-83-7, 74050-98-9(base)	5HT2/5HT1C seritonin antagonist	synthetic; R41468	J Pharmacol Exp Therap 218:217 (1981); Drug Dev Res 6:263 (1985)
270	01505354	fipronil	437.15	120068-37-3	GABA Cl channel agonist, antiparasitic	synthetic; RM-1601, MB-46030	
271	01505362	hygromycin b	527.53	31282-04-9	antibacterial, anthelmintic; LD50 ip (rat) 63mg/Kg	Streptomyces hygroscopicus	JACS 80:2714 (1958); J Org Chem 27:2793 (1962); Anal Biochem 1963:303;Tetrahedron 35:1207 (1979)
272	01505381	sinensetin	372.38	2306-27-6		Citrus spp	

273	01505429	flucytosine	129.09	2022-85-7	antifungal	synthetic; RO-2-9915	
274	01505465	triclosan	289.55	3380-34-5	antiinfective	synthetic; CH-3565	
275	01505481	beta-mangostin	424.50	20931-37-7		Garcinia mangostana	JACS 80:1691 (1958); Aust J Chem 23:2539 (1970); Tetrahedron 27:3919 (1971); Phytochemistry 12:232 (1973)
276	01505661	nifuraldezone	226.15	3270-71-1	antibacterial	synthetic; NF-84, NSC-3184	
277	01505673	troglitazone	441.55	97322-87-7	antidiabetic	synthetic; CS-045, CI-991, GR-92132X	
278	01505684	rolitetracycline	527.58	751-97-3	antibacterial	semisynthetic; SQ-15659	
279	01505696	lamotrigine	256.10	84057-84-1	anticonvulsant	synthetic; BW-430C	
280	01505	peoniflorin	482.4	23180-	antiinflammatory, antispasmodic,	Peonia spp	Tetrahedron 25:1825

	810		9	57-6	antihypertensive, antidiuretic		(1969)
281	01505812	cryptotanshinone	296.37	35825-57-1	inhibits angiogenesis	Salvia miltiorrhiza, Rosmarinus officinalis	Chem Pharm Bull 10:112 (1962); Planta Med 24:190 (1973); Exp Mol Med 37:133(2005);
282	01505825	dihydrotanshinone i	278.31			Salvia miltiorrhiza	Acta Chim Sin36:199 (1978); J Org Chem 55:3537 (1990)
283	01600561	liquiritigenin dimethyl ether	284.31	95753-46-1		Holocarpha obconica	Phytochemistry 11:3515 (1972); 15:226 (1976); 26:2128 (1987)
284	01600587	tubaic acid	220.23	25277-45-6		Derris eliptica; also degradation product of rotenone.	

285	01601021	paeonol	166.18	552-41-0	antibacterial	Paeonia montan, Xanthorrhoea spp	
286	01800018	limonin	470.52	1180-71-8		Citrus, Evodia, Dictamnus and Luvunga spp	JACS 62:1307 (1940); J Chem Soc 1961:255; Citrus Sci Technol 1:355 (1977)
287	01800031	ursolic acid	456.72	77-52-1	diuretic, antineoplastic, antiulcer	Rhododendron spp, Epigaea asiatica, surface wax of fruits	Phytochemistry 10:3279 (1971)
288	01800055	zeorin	444.75	22570-53-2		various lichens (eg Anaptychia spp) and Iris missouriensis roots	Bull Soc Chim 1963:1702; Phytochemistry 13:2871 (1974); 15:1996 (1976)
289	01800123	echinocystic acid	472.71	510-30-5		Echinocystis spp	J Am Chem Soc 77: 3579 (1955); 79: 3525 (1957)

290	01800166	kojic acid	142.11	501-30-4	chelator, antibacterial, skin whitening agent	Aspergillus spp	
291	01800170	frequentin	252.31	29119-03-7	antifungal	Penicillium frequentans	Nature 167:357 (1951); J Chem Soc 1959:1662
292	01502223	resveratrol	228.25	501-36-0	antifungal, antibacterial	Veratrum grandiflorum, Pinus sibirica, Vitis vinifera, Arachis hypogaea	Aust J Chem 24:2427 (1971); Tet Lett 1972:2965; Phytochemistry 13:633 (1974); 15:1791, 2006 (1976); 32:1083 (1993)
293	01502243	rhapontin	420.42	155-58-8	antifungal, antioxidant	Rheum spp and Eucalyptus sideroxylon	
294	00200046	griseofulvin	352.77	126-07-8	antifungal, inhibits mitosis in metaphase	Penicillium griseofulvum	J Chem Soc 1952: 3949
295	00201604	pyrromycin	585.61	668-17-7	antibacterial	Streptomyces spp	Tet Letters 1959: 17; Chem Ber 92: 1904

							(1959)
296	00201606	rutilantinone	428.40	21288-61-9	coccidiostat	Streptomyces species	Chem Ber 92: 1880 (1959); 100: 2561 (1967)
297	00201664	celastrol	450.62	34157-83-0	antineoplastic, antiinflamatory, NO synthesis inhibitor, chaperone stimulant	Celastrus scandens & Tripterygium wilfordii	J Chem Soc 1963: 2884; 1972: 330; J Org Chem 30: 1729 (1965)
298	00202130	perseitol	212.20	527-06-0		Persia spp.	J Am Chem Soc 61: 339 (1939); Carbohydr Res 150: 35 (1986)
299	00202178	epiafzelechin (2r,3r)(-)	274.28	24808-04-6		Larix sibirica, Actinidia chinensis, Juniperus communis, Cassia javanica	J Chem Soc 1955: 2948; Aust. J. Chem 13: 390 (1960); Phytochemistry 11: 2333 (1972)
300	00203	beta-toxicarol	410.4	82-11-1		Derris species & isomeration of	J Chem Soc 1938:

	010		3			alpha-toxicarol	513,734; 1939: 812
301	00205113	epigallocatechin	306.27	970-74-1		green tea	
302	00210186	citrinin	250.25	518-75-2	antibacterial	Penicillium citrinum	J Chem Soc 1963: 3777
303	00210201	dihydromundulone	438.53			borohydride reduction of mundulone	
304	00210205	cianidanol	290.28	154-23-4	hepatoprotectant	tea and cocoa constituent; (+) catechin	
305	00210206	epicatechin	290.28	490-46-0	antioxidant	tea and cocoa constituent	J Chem Soc 1969: 1824; Acta Cryst C 40: 2068 (1984)
306	00210369	gallic acid	170.12	149-91-7	antineoplastic, astringent, antibacterial	insect galls	J Chem Soc 1961:1854; Agric Biol Chem 30:617 (1966); Phytochemistry 10:894 (1971); 11:1911 (1972);

							Cancer Res 39:844 (1979); J Med Chem 22:589 (1979)
307	00210454	robustone	364.36			Derris robusta, Millettia thonningii	Tetrahedron 28: 5063 (1972); Phytochemistry 22: 1001 (1983)
308	00210505	purpurogallin	220.18	569-77-7	xanthine oxidase inhibitor, antioxidant	gall of Dryophanta divisa	J Chem Soc 1949: 3271; Biotechnol Biochem 61: 890 (1997)
309	00210515	pyrogallin	204.18		antiinfectant	synthetic	
310	00210658	dehydrovariabilin	282.30			Dalbergia variabilis	Phytochemistry 17: 1417 (1978)
311	00210752	eudesmic acid	212.20	118-41-2		eucalyptus oil	
312	00210800	chlorogenic acid	354.32	327-97-9	antioxidant, free radical scavenger	occurence in many plants	Phytochemistry 15: 703

							(1976); Biochem J 361: 57 (2002)
313	00210850	alizarin	240.22	72-48-0	antimutagen	Rubia tinctorum	Carcinogenesis 6:237 (1985)
314	00210866	khellin	260.25	82-02-0	vasodilator	Amni visnaga Lam., Umbelliferae	Ber 71: 106 (1938)
315	00210874	herniarin	176.17	551-59-9		Herniaria spp.	
316	00210924	methyl everninate	196.20	520-43-4		lichens and lichen acids	Ber 56: 2556 (1923); JACS 88: 2053 (1966); Tetrahedron 24: 2707 (1968); J Chem Soc 1984: 1035,1043

Este es un resultado preliminar y la actividad de los compuestos seleccionados como leishmanicidas tienen que ser corroborados experimentalmente.

Conclusiones

- Se realizó una extensa búsqueda bibliográfica que nos permitió conocer a fondo las peculiaridades de la leishmaniasis, y las características de los tratamientos y estudios actuales**.**
- Se confecciono por primera vez una base de datos de compuestos a los que se les ha evaluado experimentalmente su actividad antileishmaniásica que comprendió de 2145 compuestos de los cuales 537 activos y 1608 inactivos.
- Se obtuvo un modelo QSAR, utilizando descriptores moleculares y análisis discriminante lineal, que permitió predecir la actividad antileishmaniásica a través del cribado virtual.
- Se Identificaron 316 nuevos compuestos con posible actividad antileishmaniásica a través del cribado virtual de una base de datos Internacional (Spectrum).

Recomendaciones

- ✓ Debe realzarse el cribado virtual de otras bases de datos, con el fin de obtener otros compuestos que tiene actividad antileishmaniásica.
- ✓ Realizar estudios in vitro e in vivo para evaluar la actividad antileishmaniásica de los compuestos activos identificados por el modelo obtenido

7. Referencias Bibliográficas

1. Leishmaniasis. De Wikipedia, la enciclopedia libre]. Available from: http://es.wikipedia.org/wiki/Leishmaniasis.
2. ; Available from: . http://www.ricet.es/es/4/programa-leishmaniosis.html.

3. Ponte-Sucre A. Consecuencias fisiológicas de la resistencia de la droga en Leishmania y de su importancia para la quimioterapia. Biología y enfermedad 2003.
4. Hann M, Green R, . ChemBiol. Curr Opin 1999.
5. Waterdeemd VD, Carter RE, Grassy G, Kubinyi H, Martin YC, Tute M, et al. Annu Rep Med Chem. 1999;33.
6. F O. Med Chem. 2000;7(141).
7. Estrada E. Spectral moments of the edge adjacency matrix in molecular graphs, 1
Definition and applications to the prediction of physical properties of alkanes J Chem Inf Comput Sci 1996;36(4):844-49.
8. Herwaldt BL. Leishmaniasis.
9. Gállego M, Riera C. Barcelona; Available from: workforce.cup.edu/buckelew/ Leishmania%20life%...
10. Leishmaniasis Available from: http://www.galeon.com/salud_y_viajes/Enfermedades/Leishmaniasis.htm.
11. Chuquisengo R. Available from: http://www.monografias.com/trabajos62/leishmaniasis/leishmaniasis.shtml.
12. monografias. Available from: http://www.alipso.com/monografias/leishmania/.
13. Montserrat Gállego, Riera C. Control de calidad SEIMC. LAS LEISHMANIOSIS HUMANAS: Leishmaniosis autóctona por Leishmania infantum.
14. Elena Sánchez, Legaza Carlos, Murga Montserrat, Pérez Pérez, Melendez B. Leishmaniasis visceral con manifestaciones en lengua. ORL-DIPS 2003;30(4):213-7.
15. A. Paradisi*, R. Capizzi, A. Zampetti, I. Proietti, C. De Simone, C. Feliciani, et al. Atypical multifocal cutaneous leishmaniasis in an immunocompetent patient treated by liposomal amphotericin B Journal of Infection 2005;51:261–4.
16. Dra. Consuelo Macías Abraham, Téc. Ninoska Robles, Lic. Xiomara Palacios, Ing. Consuelo Vega, Mairena DAG, Santovenia DJMB. Respuesta inmune celular en enfermos con Leishmaniasis cutánea atípica. Available from: http://bvs.sld.cu/revistas/hih/vol15_1_99/hih03199.htm.
17. N. Aranzazu, O. Zerpa, Crespo L. LEISHMANIASIS CUTANEO DIFUSA.
18. Leishmania cutanea difusa. Available from:
79. http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=84342603.
19. Diagnóstico de la leishmaniosis. Available from: http://www.scalibor.es/leishmaniosis/diagnostico.asp.
20. Ramos JM, Segovia M. Estado actual del tratamiento farmacológico de la leishmaniasis. Available from: http://www.seq.es/seq/html/revista_seq/0197/rev1.html.
21. Lorenzo Velázquez, al. e. Farmacología y su proyección a la clínica.: 966.
22. Manual practico de tratamiento de la leishmaniasis. Available from: http://www.ops.org.bo/textocompleto/nleis30991.pdf.
23. Klenner T , Beckers T, Nooter K, H H. Influence of hexadecylphosphocholine (Miltefosine) on cytokine synthesis and biologicalresponses,. 2nd ed. New York1996.
24. Achterberg V, G G. Cytotoxicity of ester and ether lysophospholipids on Leishmania donovani promastigotes. Molecular and Biochemical Parasitology. 1987;23:117-22.
25. Achterberg V, G. G. Metabolism of ether lysophospholipids in Leishmania donovani promastigotes. Molecular and Biochemical Parasitology,. 1987 26:277-87.

26. Page S. Small Animal Clinical Pharmacology2002.
27. . Lira R CL, Santa Rita RM, Urbina JA. . Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite Trypanosoma cruzi: potentiation of in vitro activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. Journal of Antimicrobial Chemotherapy,. 2001;47:537-46.
28. Lux H, Hart DT, Parker PJ, T. K. Ether-lipid metabolism, GPI anchor biosynthesis, and signal transduction are putative targets for anti-leishmanial alkyl phospholipids analogues. Advances in Experimental and Medical Biology. 1996;416:201-11.
29. Lux H, Heise N, Klenner T, Hart D. Opperdoes FR. Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of etherlipid analogues in Leishmania. Molecular and Biochemical Parasitology. 2000;111:1-14.
30. . Verma NK DC. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of Leishmania donovani. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2004;48(8):3010-5.
31. Murray HW D-ES. Visceral leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (Miltefosine) in mice deficient in T cells and activated macrophage microbicidal mechanism. . Journal of Infectious Diseases. 2000;181:795-9.
32. Baneth G SS. Chemotherapy of canine leishmaniasis. . Veterinary Parasitology. 2002;106:315-24.
33. M G, al e. Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (GlucantimeR) of Leishmania infantum isolated from dogs after several courses of drug treatment. . Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 1992;86(6):613-20.
.
34. Mecanismo de accion.
35. Paromicina. Available from: . http://es.wikipedia.org/wiki/Paromomicina.
36. Falagas M.E., S.L. G. Clindamicina y metronidazol. Clin Med NA. 1995;4:823-44.
37. GRADONI L, Ist. A, Sanità S. Recenti sviluppi nella terapia delle leishmaniosi. 2001;37(no.2):255-63.
38. Asilian A, Jalayer T, Whitworth JAG, Ghasemi RL, Nilforooshzadeh M, A OP. A randomized, placebo-controlled trial of a two-week regimen of aminosidine (paromomycin) ointment for treatment of cutaneous leishmaniasis in Iran. J Trop Med Hyg 1995;53:648-51.
39. Ben Salah A, Zakraoui H, Zaatour A, Ftaiti A, Zaafouri B, A G, et al. Ben Salah A, Zakraoui H, Zaatour A, Ftaiti A, Zaafouri B, Garraoui A, Olliaro PL, Dellagi K, Ben Ismail R. Am J Trop Med Hyg 1995;53:162-6.
40. al LCe. Int J Derm. 1980;19:405.
41. Fernanda G. Braga , Maria L´ucia M. Bouzada , Rodrigo L. Fabri , Magnum de O. Matos , Francis O. Moreira , Elita Scio , et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. Journal of Ethnopharmacology 2007.
42. Danish Saleheena, S. Atif Alib, Yasinzai MM. Antileishmanial activity of aqueous onion extract in vitro. . Fitoterapia. 2004;75:9–13
43. Oliver Kayser, Albrecht F. Kiderlen , Croft SL. Antileishmanial activity of two g-pyrones from Podolepsis hieracioides (Asteraceae). Acta Tropica 2003;86:105-7
44. A.G. Tempone, S.E. Treiger Borborema, Jr. HFdA, NCdAG, A´. Yogi CSC, D. Bachiega, et al. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. Phytomedicine 382–390 12:382–90

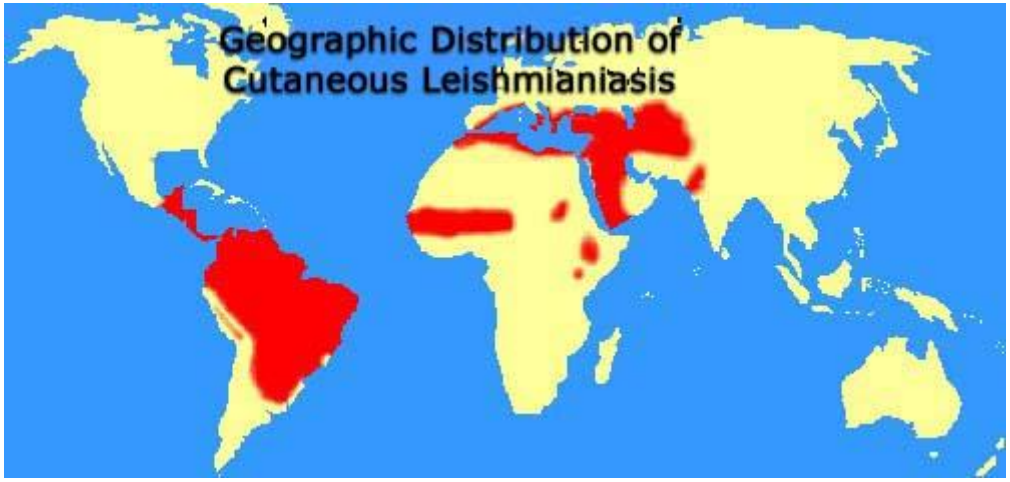
45. A.G. Neto, A.A. da Silva Filho, J.M.L.C. Costa, A.H.C Vinholis, G.H.B. Souza, W.R. Cunha, et al. Evaluation of the trypanocidal and leishmanicidal in vitro activity of the crude hydroalcoholic extract of Pfaffia glomerata (Amarathanceae) roots. Phytomedicine. 2004;11:662–5
46. Fokialakis N, Kalpoutzakis E, Tekwani BL, Khan SI, Kobaisy M, Skaltsounis AL, et al. Evaluation of the antimalarial and antileishmanial activity of plants from the Greek island of Crete. J Nat Med 2007;61:38–45.
47. REDES DE INVESTIGACIÓN EN MEDICAMENTOS. Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales (RICET) 2 Junio 2005
48. E. Oliveira-Freitas, C.P. Casas, G.P. Borja-Cabrera, F.N. Santos, D. Nico, L.O.P. Souza, et al. Acylated and deacylated saponins of Quillaja saponaria mixture as adjuvants for the FML-vaccine against visceral leishmaniasis. Vaccine. 2006;24:3909–20.
49. Mayra Xiomara Hernández S., Thales Augusto Barçante, Luciano Vilela, Wagner Luiz Tafuri, Luís Carlos Crocco Afonso, Vieira. LQ. Vaccine-induced protection against Leishmania amazonensis is obtained in the absence of IL-12/23p40 Immunology Letters 2006;105:38–47
50. J. Poot, K. Spreeuwenberg , S.J. Sanderson , V.E.C.J. Schijns , J.C. Mottram , G.H. Coombsd, et al. Vaccination with a preparation based on recombinant cysteine peptidases and canine IL-12 does not protect dogs from infection with Leishmania infantum. Vaccine. 2006; 24 2460–8.
51. Noushin Davoudi, Celia A. Tate, Corinna Warburton, Angus Murray, Fereidoun Mahboudi, McMaster WR. Development of a recombinant Leishmania major strain sensitive to ganciclovir and 5-fluorocytosine for use as a live vaccine challenge in clinical trials. Vaccine. 2005;23:1170–7
52. F. Javier P´erez-Victoria MıPSa-Cn, Karin Seifert , Simon L. Croft , Shyam Sundar SC, Francisco Gamarro. Mechanisms of experimental resistance of Leishmania to miltefosine:
Implications for clinical use. Drug Resistance Updates 2006;9:26-39.
53. F. Javier Pérez-Victoria, María P. Sánchez-Cañete, Karin Seifert, Simon L. Croft, Shyam Sundar, Santiago Castanys , et al. Mechanisms of experimental resistance of Leishmania to miltefosine: Implications for clinical use. . Drug Resistance Updates. 2006;9:26–39.
54. Pérez-Victoria JM, Pérez-Victoria FJ, Parodi-Talice A, Jiménez IA, Ravelo AG, Castanys S, et al. Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant Leishmania tropica and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45:2468–74.
55. Mehta A, C. S. Apoptotic death in Leishmania donovani promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. . Biol Chem ;:11798–813. 2003:11798–813.
56. Basselin M, Lawrence F, M. R-G. Pentamidine uptake in Leishmania donovani and Leishmania amazonensis, promastigotes and amastigotes. Biochem J 1996.:315:631–4.
57. Coelho AC, Beverley SM, PC C. Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in Leishmania major. Biochem Parasitol 2003:130:83–90.
58. Singh AK, L, S.T., . Status of respiration and ATP content in arsenite resistant Leishmania mexicana amazonensis. . Microbial Pathogenesiss 1999;26:171–4.
59. Claudia Machuca AR, Marymar Herrera, Sonia Silva, Alicia Ponte-Sucre. Leishmania amazonensis: Metabolic adaptations induced by resistance to an ABC transporter blocker. Experimental Parasitology 2006;114:1-9.
60. Resistencia a multiples drogas

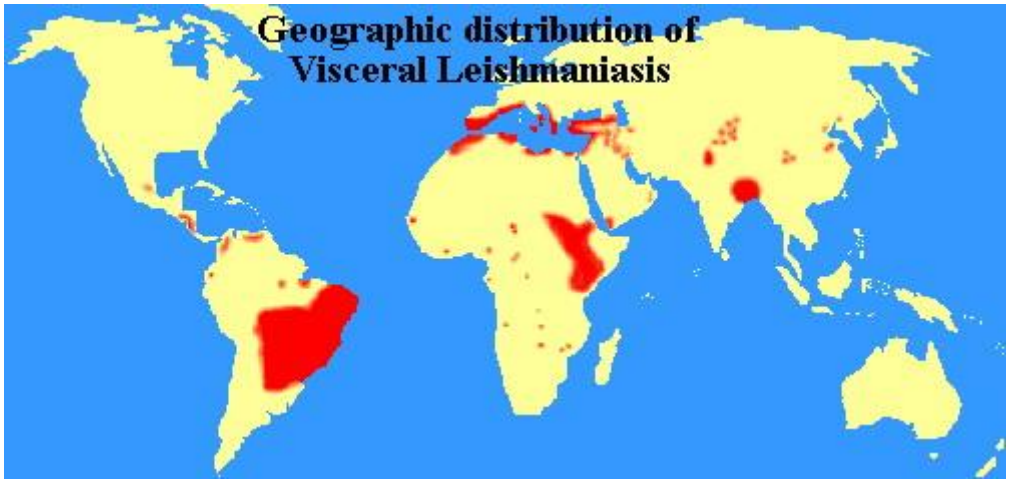
Un mecanismo de evasión celular ante los tratamientos quimioterapéuticos. Available from: http://www.uam.mx/difusion/revista/nov2003/delgadillo.pdf.
61. Thu HLT. "Descubrimiento de Nuevos Inhibidores de la Enzima Tirosinasa Integrando Métodos Teóricos y Experimentales" [Título de Licenciada en Ciencias Farmacéuticas]. St. Clara, Villa Clara: Universidad Central "Marta Abreu"de las Villas, Santa Clara 2009.
62. JA. CG. Parametrización de la estructura química empleando formas lineales:
Aplicaciones al Diseño Molecular Asistido por Ordenador [En opción al grado científico de Doctor en
Ciencias Farmacéuticas]. . Santa Clara, Cuba UCLV: Marta Abreu de las Villas2007.
63. Todeschini R, V. C. Handbook of Molecular Descriptors. . Federal Republic of Germany2000.
64. Escalona JC, Carrasco R, JA. P. Introducción al diseño de Fármacos: Pueblo y educación.
65. Massart DL, Kaufman DL. The Interpretation of Analytical Chemical Data by the Use of Cluster Analysis. New York (NY): Wiley; 1983.
66. Willett P. Similarity and Clustering in Chemical Information Systems. Letchworth (UK):: Research Studies Press,; 1987.
67. Ultsch A. Emergence in Self-Organizing Feature Maps. Bielefeld, Germany2007.
68. Cortés OdT. Identificación "in silico" y corroboración "in vitro" de nuevos compuestos con actividad analgésica. St. Clara, Villa Clara, Cuba: Universidad Central "Martha Abreu" de Las Villas.; 2009.
69. J.C. Escalona, R. Carrasco, Padrón JA. Introducción al diseño de Fármacos
70. Negwer M. Organic-Chemicl Drugs and their Synonyms. 6 ed.
71. The Merk index. Twelft ed: Chapman & Hall 1996.
72. AID:1258 Leishmania major promastigote HTS - primary screen repeat 1 uM.
.
73. DRAGON v, 5.5. In: srl. T, editor.: http://www.talete.mi.it; 2007.
74. StatSoft I, STATISTICA, vs, 8.0.
75. ChemOffice software v, 9.0.: www.cambridgesoft.com; 2005.
76. McFarland JW, Gans, D. J., van de Waterbeemd, H. Chemometric Methods in Molecular Design. Weinheim, Germany: VCH; 1995.
77. Xu J, Hagler, A. Molecules. 2002:566.
78. Johnson RA, Wichern, D.W. Applied Multivariate Statistical Analysis. Prentice-Hall, editor. New Jersey1988.
79. Gujarati DN. Econometría. Segunda ed. Varela EF, editor. La Habana2005.
80. Hoffmann R, Minkin, V.I., Carpenter, B.K. HYLE-International Journal for Philosophy of Chemistry. 1997;3:3.
81. van de Waterbeemd H. Discriminant Analysis for Activity Prediction. Manhnhold R, Krogsgaard-Larsen L, Timmerman H, editors. Weinhiem1995.
82. Wold S, Eriksson, L. Statistical Validation of QSAR Results. Chemometrics Methods in Molecular design. Weinheim (Germany): van de Waterbeemd, H., VCH; 1995. p. 309-18.
83. Lindgren F, Hansen, B., Karcher, W., Sjostrom, M., Eriksson, L. Model Validation by Permutation Tests: Applications to Variable Selection. J Chemomr. 2005;10:521-32.

84. Eriksson L, Jaworska, J., Worth, A., Cronin, M., McDowell, R., Gramatica, P. Methods for Reliability and Uncertainty Assessment and for Applicability Evaluations of Classification- and Regression-Based QSARs. Environmental Health Perspectives. August 2003
85. Baldi P, Brunak S, Chauvin Y, Andersen CA, Nielsen H. Assessing the Accuracy of Prediction Algorithms for Classification: an Overview. Bioinformatics. 2000;16:412–24.
86. Drie JHV, Lajiness MS. Approaches to Virtual Library Design. Drug Disc Today. 1998;3: 274-83.
87. The Spectrum Collection. Ann Rev Med. 2005;56:321.
88. DRAGON. 5.5 ed2007.
89. Wold S, Eriksson L. Statistical Validation of QSAR Results. van de Waterbeemd H, VCH, editor. Weinheim (Germany1995.
90. McFarland JW, Gans DJ, H. vdW. Chemometric Methods in Molecular Design. Weinheim, Germany: VCH; 1995.
91. Xu J H. A. Molecules. . 2002:566.
92. Van Waterbeemd H. Methods and Principles in Medicinal Chemistry. Chemometric Methods in Molecular design. Manhnhold R, Krogsgaard-Larsen L, Timmerman H, editors. Weinhiem: VCH; 1995.
93. Virginia Roldos, Hector Nakayama, Miriam Rolo´n, Alina Montero-Torres, Fernando Trucco, Susana Torres, et al. Activity of a hydroxybibenzyl bryophyte constituent against Leishmania spp. and Trypanosoma cruzi: In silico, in vitro and in vivo activity studies. Eur J Med Chem. 2008;43:1797-807.
94. R. García-Doménech, C. Domingo-Puig, M. A. Esteve-Martínez, J. Schmitt, J. Vera-Martínez, A. L. Chimendi, et al. Aplicación de la Topología Molecular en la búsqueda de nuevos agentes activos frente a Leishmania. . An R Acad Nac Farm. 2008;74.

Anexos

1. La distribucion geografica (4)

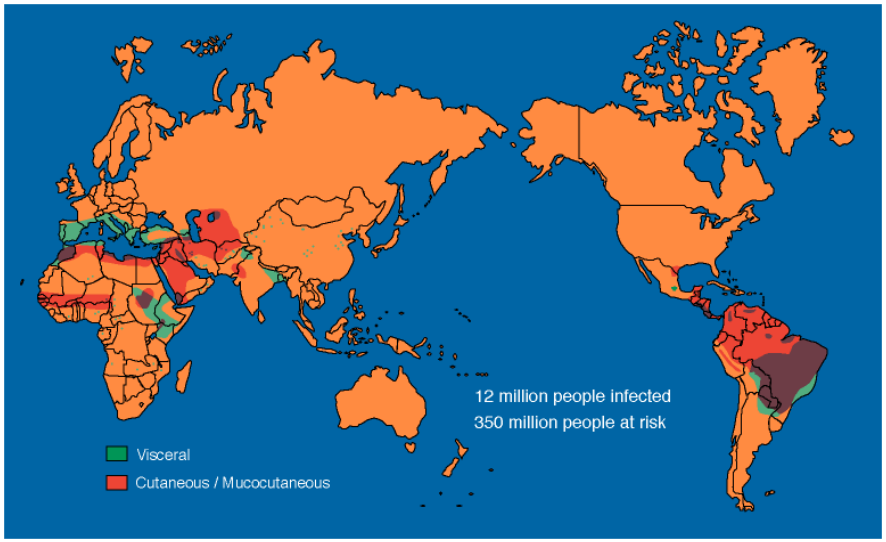




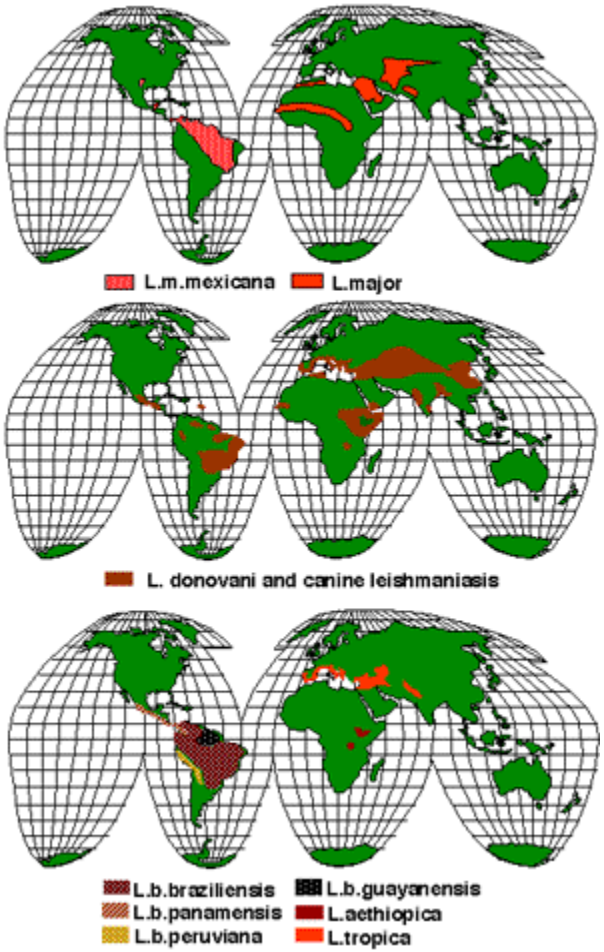
Distribuicion geográfica da Leishmaniose visceral

(Nordeste da China, Índia, região do Meio-Leste, Sudeste da Europa -Bacia do Mediterrâneo-, Nordeste e Leste Central da África, e América Central e do Sul - especialmente Brasil e Honduras)

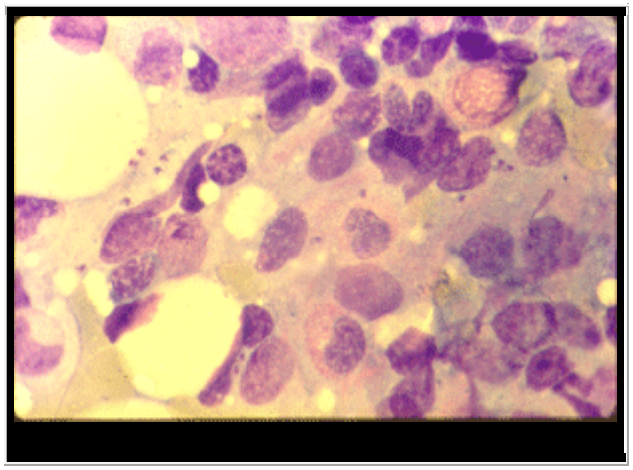
Anexo2


12 million people infected
350 million people at risk
Visceral
Cutaneous / Mucocutaneous

Anexo 3 Distribución mundial de algunas especies de Leishmania. Buscar en internet la fuente



Anexo 4



. **Amastigotes de *L. infantum* en una extensión de médula ósea**

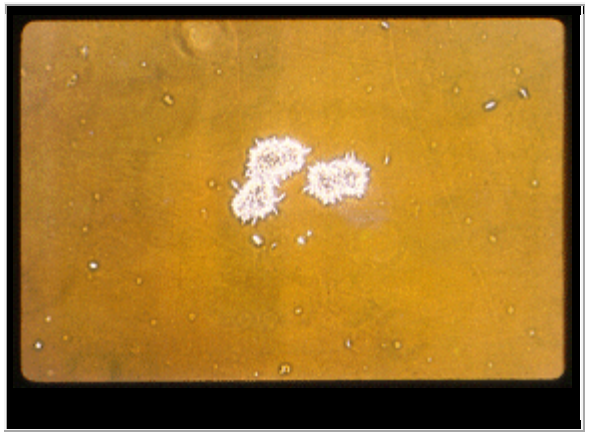


Figura 2. Promastigotes de *L. infantum* (rosetas en medio de Schneider).

Anexo 5

Figura 10. Ulcera característica de la leishmaniasis.

Figura 4.

Figura 11. Forma impetiginoide de leishmaniasis cutánea

Figura 5.

Leishmaniasis cutánea nodular, en dorso de mano.

Figura 6.

Figura 7.

Figura 8.

Anexo 6

Leishmania a nivel microscópico

Figura 9.

Anexo 7. Muestra aleatoria de DMs que forman parte del programa DRAGON.

Símbolo	Significado	Familia del descriptor
nS	number of Sulfur atoms	constitutional descriptors
nF	number of Fluorine atoms	constitutional descriptors
nR06	number of 6-membered rings	constitutional descriptors
nR07	number of 7-membered rings	constitutional descriptors
Lop	Lopping centric index	topological descriptors
MATS7e	Moran autocorrelation - lag 7 / weighted by atomic Sanderson electronegativities	2D autocorrelations
GATS6p	Geary autocorrelation - lag 6 / weighted by atomic polarizabilities	2D autocorrelations
BELp3	lowest eigenvalue n. 3 of Burden matrix / weighted by atomic polarizabilities	Burden eigenvalues
BELe2	lowest eigenvalue n. 2 of Burden matrix / weighted by atomic Sanderson electronegativities	Burden eigenvalues
G(S..Cl)	sum of geometrical distances between S..Cl	geometrical descriptors
RDF150u	Radial Distribution Function - 15.0 / unweighted	RDF descriptors
RDF065p	Radial Distribution Function - 6.5 / weighted by atomic polarizabilities	RDF descriptors
Mor13e	3D-MoRSE - signal 13 / weighted by atomic	3D-MoRSE descriptors

	Sanderson electronegativities	
Mor02p	3D-MoRSE - signal 02 / weighted by atomic polarizabilities	3D-MoRSE descriptors
R6m+	R maximal autocorrelation of lag 6 / weighted by atomic masses	GETAWAY descriptors
R5p+	R maximal autocorrelation of lag 5 / weighted by atomic polarizabilities	GETAWAY descriptors
nArOH	number of aromatic hydroxyls	functional group counts
nSO3OH	number of sulfuric (thio-/dithio-) acids	functional group counts
C-005	CH3X	atom-centred fragments
H-053	H attached to C0(sp3) with 2X attached to next C	atom-centred fragments
N-074	R#N / R=N-	atom-centred fragments