

ACTIVIDAD *IN VITRO* DE LA MEZCLA DE ALCALOIDES DE *Ervatamia coronaria* (Jacq) Staff. APOCYNACEAE SOBRE *Leishmania braziliensis*

AMANDA MORENO RODRÍGUEZ

**TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
para optar al título de**

Biólogo

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
CARRERA DE BIOLOGÍA
Bogotá, D.C.
Junio 23 de 2005**

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

ACTIVIDAD *IN VITRO* DE LA MEZCLA DE ALCALOIDES DE *Ervatamia coronaria* (Jacq) Staff. APOCYNACEAE SOBRE *Leishmania braziliensis*

AMANDA MORENO RODRÍGUEZ

APROBADO

Felio J. Bello García, M.Sc
Director

Jorge Robles Camargo, Ph. D.
Codirector

Ligia I. Moncada Alvarez M.Sc
Jurado

Julio A. Pedrozo M.Sc
Jurado

ACTIVIDAD *IN VITRO* DE LA MEZCLA DE ALCALOIDES DE *Ervatamia coronaria* (Jacq) Staff. APOCYNACEAE SOBRE *Leishmania braziliensis*

AMANDA MORENO RODRIGUEZ

APROBADO

Angela Umaña Muñoz, Ph.D
Decano Académico

Cecilia Espíndola, M.Sc
Directora de Carrera

FORMATO DE DESCRIPCION DEL TRABAJO DE GRADO

AUTOR O AUTORES

Apellidos	Nombres
Moreno Rodríguez Bello García Robles Camargo	Amanda Felio Jesús Jorge

DIRECTOR (ES)

Apellidos	Nombres
Bello García Robles Camargo	Felio Jesús Jorge

TRABAJO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE: Biólogo

TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: Actividad *in vitro* de la mezcla de alcaloides de *Ervatamia coronaria* (Jacq) Staff. Apocynaceae sobre *Leishmania braziliensis*

FACULTAD: Ciencias Básicas

PROGRAMA: Carrera Especialización Maestría Doctorado

NOMBRE DEL PROGRAMA: Biología

CIUDAD: BOGOTA AÑO DE PRESENTACIÓN DEL TRABAJO: 2005

NÚMERO DE PÁGINAS: 134

TIPO DE ILUSTRACIONES:

Mapas

Tablas

Gráficos y diagramas

Fotografías

DESCRIPTORES O PALABRAS CLAVES. Alcaloides, Apocynaceae, *Leishmania braziliensis*, citotoxicidad

RESUMEN DEL CONTENIDO

Las leishmaniasis cutánea y mucocutánea son causadas, entre otras especies, por *Leishmania braziliensis* y la forma cutánea es la más común en Colombia. Se estudió la actividad de la mezcla de alcaloides de *Ervatamia coronaria* Apocynaceae contra *L. braziliensis* en 6 concentraciones diferentes (1, 10, 20, 25, 50 y 100 µg/mL). Se trataron macrófagos de ratón de la línea J774, infectados con promastigotes de *L. braziliensis*, con la mezcla de alcaloides 1 hora post-infección y diariamente por 3 días sin cambio de medio. La evaluación sobre promastigotes se hizo únicamente en un tiempo con las mismas concentraciones. Los ensayos de citotoxicidad se

efectuaron sobre los macrófagos con azul tripán. Todos los cultivos se hicieron por triplicado y los grupos control no fueron sometidos a mezcla de alcaloides. Se obtuvo que el compuesto adicionado ejerce actividad dosis/dependiente sobre ambas formas del parásito, sin embargo, las concentraciones más altas (50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), adicionados durante 3 días, mostraron los mayores índices de infección, probablemente debido a la disminución en el número de macrófagos, sobre los cuales no se observó efecto tóxico del tratamiento durante 24 horas $\text{DL}_{50}/24\text{h} = 233.52$. Los resultados del presente estudio revelaron una nueva actividad farmacológica de alcaloides de la especie *Ervatamia coronaria* sobre ambas formas del ciclo biológico de *Leishmania braziliensis*, con IC_{50} para amastigotes de 2.6 y 12.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sin mostrar toxicidad sobre la célula huésped.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas que colaboraron con el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Felio Bello, director del Laboratorio de Entomología, Biología Celular y Genética de la Universidad de la Salle por permitirme trabajar allí, la confianza en el proyecto y el aporte en éste.

Al Dr. Jorge Robles, miembro de GIFUJ, por su dedicación, tiempo, apoyo, y seguridad.

A las personas vinculadas al Laboratorio de Fitoquímica de la Universidad Javeriana, profesor Oscar Rodríguez, Profesor Rubén Torrenegra, tesistas de la Universidad Distrital, por la colaboración, la generosidad y por hacer más ameno el largo tiempo de las extracciones.

A mis compañeros del Laboratorio de Entomología, Biología Celular y Genética de la Universidad de la Salle: Jesús Escovar, William Serrano, Alfonso Medina, Edna Galeano, Don Gilberto Torres, por las enseñanzas dadas y sobre todo su amistad.

A Víctor Manuel Acero por la entrega, los consejos, enseñanzas y ser el asesor del trabajo.

A Cristina Zapata por el ánimo, entrega y dedicación

A Paola Mejía, de Columbia University, por los importantes aportes bibliográficos

A Carlos Andrés Gómez por su colaboración en la adquisición de material

A Milciades Ibáñez, profesor de la Universidad del Rosario por la asesoría estadística

A Carlos Espinel, del Laboratorio de Control Biológico de CORPOICA, por su ayuda en la obtención de los índices de letalidad

A Alberto Mejía, director del Jardín Botánico del Quindío y a todos los trabajadores de la Institución por permitirme coleccionar el material, y su gran interés por el trabajo.

A Sara Robledo, Coordinadora de Ensayos Biológicos del PECET, por la colaboración y la solución de las diversas dudas.

A Diana Muñoz, estudiante de maestría vinculada a Ensayos Biológicos del PECET, por su valiosa ayuda, tiempo y entrega en la obtención de la IC_{50}

A Gabriel Pacual, del Departamento de Ciencias Fisiológicas de la Universidad Javeriana por la detallada lectura y sus importantes observaciones.

A Marta Stella Ayala, de Parasitología del INS, por su generosidad en tiempo, conocimiento y disposición

A Alejandro Salah, de SUNY, por su eficiente ayuda en la traducción

A Alvaro Castillo por las correcciones en redacción.

A Lourdes Gómez por comprender mis dos pasiones y no reprochar las ausencias.

A Carolina Muñoz por la ayuda y compañía constante.

A mis hermanos, Carlos y David por estar pendientes siempre del proceso, y por toda la información actualizada

A mi papá, Carlos Moreno, por la paciencia, comprensión, los contactos y el gran conocimiento que siempre me acompaña.

A mi mamá, Elsa Amanda de Moreno porque, a pesar de todo, sigue creyendo

A todos los amigos que se interesaron, aportaron y sobretodo me dieron impulso en el momento oportuno...

Junio de 2005

TABLA DE CONTENIDOS

INDICE DE TABLAS	11
INDICE DE FIGURAS	11
1. INTRODUCCION	14
2. MARCO TEÓRICO	16
2.1 <i>Leishmania</i> y leishmaniosis	16
2.2 Epidemiología	22
2.3 Tratamiento Actual y Resistencia	25
2.3.1 Antimonios pentavalentes:	25
2.3.2 Pentamidinas	26
2.3.3 Amphotericina B	27
2.3.4 Paromomicina	27
2.3.5 Citoquinas	28
2.3.6 Los agentes orales	28
2.3.7 Avances actuales	29
2.3.8 Métodos tradicionales	29
2.3.9 La resistencia.....	30
2.4 Inmunología	30
2.5 Extractos vegetales y actividad leishmanicida	32
2.5.1 Metabolitos secundarios en general	32
2.5.2 Alcaloides.....	34
2.6 Apocynaceae y <i>Ervatamia coronaria</i>	36
3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	41
4. OBJETIVOS	42
4.1 Objetivo general.....	42
4.2 Objetivos específicos	43
5. MATERIALES Y MÉTODOS	43
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
7.1 Resultados	51
7.2 Discusión de resultados.....	63
Obtención de mezcla de alcaloides	63
Actividad leishmanicida.....	64
Citotoxicidad.....	77
7. CONCLUSIONES	81
8. RECOMENDACIONES	83
9. REFERENCIAS	84
10. ANEXOS	109

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Indice de supervivencia en ambos protocolos temporales de adición de alcaloides en 6 concentraciones.....	59
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del ciclo dimórfico del parásito del género <i>Leishmania</i>	17
Figura 2. Clasificación taxonómica el parásito del género <i>Leishmania</i>	19
Figura 3. Lesiones en pacientes con LC.....	21
Figura 4. Lesiones en pacientes con LMC.....	22
Figura 5. Mapa de distribución de leishmaniosis cutánea en Colombia, 2003.....	23
Figura 6. Estructura química de la ibogaína.....	37
Figura 7. Estructura química de algunos alcaloides de <i>Ervatamia coronaria</i>	39
Figura 8. Mapa de localización del Municipio de Calarcá, Quindío.....	44
Figura 9. Método para la obtención de la mezcla de alcaloides de <i>E.coronaria</i>	46
Figura 10. Macrófagos J774.....	47
Figura 11. Cámara de flujo laminar con materiales necesarios para infección...	49
Figura 12. Cromatogramas obtenidos con revelación con sulfato cérico.....	52
Figura 13. Macrófagos J774 infectados con <i>L. braziliensis</i> con adición de mezcla de alcaloides de <i>E.coronaria</i> 3 días post-infección.....	53
Figura 14. Macrófagos J774 infectados con <i>L. braziliensis</i> con adición de mezcla de alcaloides de <i>E.coronaria</i> 1 hora post-infección.....	54
Figura 15. Macrófagos J774 infectados con <i>L. braziliensis</i> grupo control.....	55
Figura 16. Proporción de la infección de <i>L. braziliensis</i> en macrófagos J774 bajo ambos protocolos temporales y las 6 concentraciones de alcaloides.....	56
Figura 17. Macrófagos J774 infectados con <i>L. braziliensis</i> con adición de mezcla de alcaloides de <i>E.coronaria</i> 3 días post-infección.....	57
Figura 18. Comparación del promedio de amastigotes por célula en 6 concentraciones de mezcla de alcaloides de <i>E.coronaria</i> bajo ambos protocolos temporales.....	58
Figura 19. Supervivencia de <i>L. braziliensis</i> en forma amastigota en ambos protocolos temporales de adición de alcaloides de <i>E. coronaria</i>	60
Figura 20. Supervivencia de <i>L. braziliensis</i> en forma promastigota en ambos protocolos temporales de adición de alcaloides de <i>E. coronaria</i>	61
Figura 21. Supervivencia de macrófagos J774 bajo diferentes concentraciones de mezcla de alcaloides de <i>E. coronaria</i>	62
Figura 22. Macrófagos J774 sin adición de mezcla de alcaloides de <i>E. coronaria</i> .62	
Figura 23. Diferencia en el número de células macrofágicas J774 tratadas con 50 µg/mL de mezcla de alcaloides de <i>E. coronaria</i>	71

ACTIVIDAD *IN VITRO* DE LA MEZCLA DE ALCALOIDES DE *Ervatamia coronaria* (Jacq) Staff. APOCYNACEAE SOBRE *Leishmania braziliensis*

RESUMEN

La leishmaniosis es considerada como una importante causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, especialmente en países tropicales. Las formas cutánea y mucocutánea son causadas, entre otras especies, por *Leishmania braziliensis* y la forma cutánea es la más común en Colombia. En la búsqueda de compuestos leishmanicidas de origen natural, se estudió la actividad de la mezcla de alcaloides de *Ervatamia coronaria* Apocynaceae contra *L. braziliensis* en 6 concentraciones diferentes (1, 10, 20, 25, 50 y 100 µg/mL). Se trataron macrófagos de ratón de la línea J774, infectados con promastigotes de *L. braziliensis*, con la mezcla de alcaloides 1 hora post-infección y diariamente por 3 días sin cambio de medio. La evaluación sobre promastigotes se hizo únicamente en un tiempo con las mismas concentraciones. Los ensayos de citotoxicidad se efectuaron sobre los macrófagos con azul tripán. Todos los cultivos se hicieron por triplicado y los grupos control no fueron sometidos a mezcla de alcaloides. Se obtuvo que el compuesto adicionado ejerce actividad dosis/dependiente sobre ambas formas del parásito, sin embargo, las concentraciones más altas (50 y 100 µg/mL), adicionados durante 3 días, mostraron los mayores índices de infección, probablemente debido a la disminución en el número de macrófagos, sobre los cuales no se observó efecto tóxico del tratamiento durante 24 horas $DL_{50}/24h = 233.52$. Los resultados del presente estudio revelaron una nueva actividad farmacológica de alcaloides de la especie *Ervatamia coronaria* sobre ambas formas del ciclo biológico de *Leishmania braziliensis*, con IC_{50} para amastigotes de 2.6 y 12.4 µg/mL, sin mostrar toxicidad sobre la célula huésped.

ABSTRACT

Disease caused by *Leishmania* sp. is the cause of considerable mortality and morbidity throughout the world, especially in the tropics. Cutaneous and

mucocutaneous manifestations are caused by *Leishmania braziliensis*, and cutaneous is the most common form in Colombia. In the search for antileishmanial compounds from natural sources, the alkaloid's mixt from *Ervatamia coronaria* Apocynaceae against *L. braziliensis* has been studied at six different concentrations (1, 10, 20, 25, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Macrophages J774 infected with *L. braziliensis* were treated with alkaloids one hour, and once a day, for three days after parasitic infection preserving the same culture medium. Promastigotes were incubated at presence of same six concentrations of alkaloids, which were added only once to the cultures. Cytotoxicity with trypan blue was undertaken in macrophages J774 by using the same concentrations. Three different cultures samples were carried out. As a control we used medium alone. Alkaloid's mixt showed a dose/dependent activity on parasite in both models, but by increasing concentrations from 50 to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for three days, we saw a high index of infection, probably caused by cellular death. We didn't see any toxic effect on macrophages J774 at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $\text{DL}_{50}/24\text{h} = 233.52 \mu\text{g}/\text{mL}$. These results revealed a novel pharmacological activity of alkaloids from *E. coronaria* against both forms of *L. braziliensis* $\text{IC}_{50} = 2.6$ and $12.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ against amastigotes, without toxicity on host cells.

1. INTRODUCCION

La leishmaniosis es un grupo de enfermedades cuyos agentes etiológicos son protozoos del género *Leishmania* y constituye una causa importante de morbilidad y mortalidad en varios países tropicales y subtropicales. El hospedero vertebrado es infectado por el promastigote mediante la picadura del flebótomo vector, perteneciente al género *Lutzomyia*. Los promastigotes se transforman rápidamente en amastigotes no flagelados dentro de los fagocitos mononucleares del hospedero vertebrado donde se dividen por fisión binaria, destruyen la célula y, de esta forma, quedan libres para infectar otras células. Estos parásitos causan las enfermedades agrupadas en: cutánea, mucocutánea y visceral. En Colombia la leishmaniosis cutánea (LC) es la patología más común, representando aproximadamente el 90% de infecciones sintomáticas. La mayoría de las especies de *Leishmania* aisladas de las lesiones de LC corresponden a *Leishmania (Viannia) panamensis* y *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

El actual interés sobre estas enfermedades radica en la importancia médica que presentan problema de salud pública, debido a que existe un considerable incremento anual en el número de casos. La situación de Colombia es aún más delicada ya que las enfermedades están asociadas con personas involucradas en problemas de orden público. Por otro lado, la incidencia de casos se ha encontrado también asociada con el virus de inmunodeficiencia adquirida en humanos. La importancia en el aspecto inmunológico y molecular de la interacción parásito/hospedero ha estimulado los estudios sobre la enfermedad.

El tratamiento básico consiste en la administración de stilbogluconato de sodio (Pentostam), Glucantime o pentamidina. Sin embargo, existen fallas y limitaciones en el tratamiento, especialmente en las formas de leishmaniosis visceral, mucosa y cutánea difusa. Actualmente el fracaso del tratamiento se relaciona con la resistencia del parásito y la toxicidad que presenta la droga. Por otro lado, se trata de

medicamentos de difícil acceso por parte de las comunidades rurales que, además, presentan deficiencias nutricionales en la mayoría de casos.

Existe gran número de especies vegetales que han sido usadas durante siglos con fines medicinales y que lo son, hoy por hoy, en la medicina popular. Las condiciones del trópico hacen que esta región presente una alta diversidad de flora que conforma un material potencial, poco explorado científicamente; práctico y eficiente en el manejo de problemas epidemiológicos de diferentes orígenes, además de contribuir al conocimiento fitofarmacológico a través del uso de los recursos naturales y de brindar un respaldo científico del uso tradicional de las plantas por las comunidades humanas.

Las plantas proveen una gran diversidad química y de bioactividad, que ha permitido el desarrollo de fármacos y, de hecho, la mayoría de drogas usadas clínicamente para el tratamiento de agentes infecciosos son derivadas de productos naturales. Dentro de los metabolitos secundarios vegetales más conocidos química y farmacéuticamente, y usados en el campo medicinal, están los alcaloides. Estos compuestos cíclicos nitrogenados han sido aislados de varias especies de la familia Apocynaceae, de diferentes partes de la planta: semillas, corteza, hojas y tallos, principalmente. La mayoría de especies de esta familia han sido usadas contra el reumatismo, resfriados y enfermedades de la piel, incluyendo infecciones. Se conocen 180 géneros y más de 1.600 especies cuya química presenta compuestos tipo terpenoides, lignanos, glicósidos y alcaloides, más específicamente alcaloides tipo indólico y bisindólicos que han despertado interés como anticancerígenos (vinblastina), antivirales y citotóxicos (lanchnarina) e hipertensivos (yohimbina).

Partiendo de las implicaciones concernientes a enfermedades tropicales endémicas como lo son la leishmaniosis y de las limitaciones y desventajas del actual tratamiento para combatirlas, se hace necesario evaluar otras fuentes para manejar y tratar estas enfermedades. De esta manera, los recursos naturales florísticos y el aporte de la medicina tradicional y popular ofrecen un valioso recurso para

determinar científicamente la aplicabilidad de los mismos en la solución a problemas puntuales de salud pública.

Considerando a los miembros de la familia Apocynaceae como elementos importantes en la medicina tradicional de varias comunidades de Latinoamérica, se reconocen a aquellos como agentes potenciales para el tratamiento de varias parasitemias. El objetivo de este trabajo es determinar si la mezcla de alcaloides de la especie *Ervatamia coronaria* (Jacq) Staff., conocida vulgarmente como “lechoso”, “sanango” y “buquecito”, tiene o no actividad leishmanicida, tanto para las formas intracelulares (amastigotes) como extracelulares (promastigotes) de *Leishmania braziliensis* en condiciones *in vitro*.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Leishmania* y leishmaniosis

Los protozoos son los organismos patógenos más comunes en el mundo, reconocidos por ser causantes de enfermedades tropicales tanto en animales como en humanos. Amebiasis, toxoplasmosis, malaria, leishmaniosis son enfermedades causadas por parásitos protozoarios que afectan alrededor del 25% de la población mundial. Después de la malaria, la leishmaniosis es probablemente, la segunda enfermedad más importante producida por protozoarios (Grimaldi & Tesh, 1993), y junto con la enfermedad de Chagas y la tripanosomiosis africana se ubican en el grupo de las 6 enfermedades tropicales más importantes para la Organización Mundial de la Salud (Borst y Ouellette 1995). Conocida también como leishmaniasis, se considera que el nombre correcto de la enfermedad es leishmaniosis en razón a que, de acuerdo con lo recomendado por la Federación Mundial de Parasitología, las enfermedades parasitarias deben terminar en *osis* (Anónimo1 2003). Se define como un complejo de enfermedades causadas por varias especies de parásitos del género *Leishmania* que son capaces de producir varios tipos de manifestaciones clínicas, de acuerdo con la capacidad del parásito de proliferar en tejidos profundos a temperatura de 37°C o cerca de la superficie, con una temperatura menor, de 25°C (Lennete 1987). Las

formas clínicas son: visceral (LV), cutánea (LC), y mucocutánea (LMC). Existen dos tipos de manifestaciones clínicas cutáneas que se presentan con poca frecuencia: una forma localizada (LCL) y una forma que se denomina cutánea difusa (LCD).

La distribución de las más de 20 especies y subespecies de *Leishmania* y las enfermedades que producen están determinadas por la capacidad y eficacia de sus vectores. En el viejo mundo la leishmaniosis se distribuye alrededor del Mar Mediterráneo, Este y Oeste de África, al igual que en Afganistán, India, China y en muchas regiones de Rusia y Asia. En el nuevo mundo la enfermedad se presenta desde la parte sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina y Paraguay. Está ampliamente distribuida en el neotrópico, especialmente en áreas boscosas tropicales con alta precipitación pluvial (1.000 a 2.000 cm/año), entre los 800 y 1.600 metros sobre el nivel del mar. La temperatura ideal para su desarrollo fluctúa entre 18 y 30°C. Hasta el momento todos los vectores conocidos son flebótomos, insectos dípteros hematófagos, pertenecientes a la subfamilia Phlebotominae, de la familia Psychochidae. En Suramérica el género predominante es *Lutzomyia*, mientras que en el viejo mundo se trata de *Phlebotomus* (Sacks & Kamhawi 2001). En Colombia se encuentran cerca de 129 especies de *Lutzomyia* que se conocen con el nombre vulgar de “manta”, “palomilla” o “mosquito de arena” y el vector reconocido dentro del territorio nacional para el parásito *L. braziliensis* es la especie *Lutzomyia spinicrassa* (Young *et al.* 1987). Los reservorios del parásito incluyen animales domésticos, como el perro *Canis familiaris* y silvestres como el perezoso *Choloepus* spp. y *Bradypus* spp., la zarigüeya *Didelphis marsupialis* en zonas rurales y periurbanas (Travi *et al.* 2001). Para Colombia los principales reservorios registrados lo conforman *Canis familiaris*, *Bradypus griseus*, *Choloepus hoffmani*, *Heteromys dermarestianus*, *Melanomys caliginosus*, *Sylvilagus braziliensis*, *Didelphis marsupiales* y *Micoureus demerarae*. Los reservorios para *L. braziliensis* en los países andinos incluyen *Canis familiaris*, *Cerdocyon thous*, *Conepatus chinga rex*, *Equus asinus*, *Oryzomys concolor*, *Zygodontomys microtynus* y *Rattus rattus* (Davies *et al.* 2000).

Leishmania es un protozoo patogénico del orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae. Las especies, han sido diferenciadas genética, inmunológica y bioquímicamente en diferentes complejos. En Colombia existen 8 de ellas (Zuluaga y Robledo 2004). Las especies de este género presentan un ciclo de vida dimórfico (Figura 1) en el que existe un periodo de vida extracelular llamado promastigote que se multiplica en el tracto alimenticio del mosquito vector, con 15- 25 μm de longitud por 2-3 μm de ancho, y se caracteriza por presentar un flagelo en la parte anterior. Dentro del hospedero mamífero, los promastigotes inoculados por el vector invaden las células del sistema de células fagocíticas mononucleares (monocitos/macrófagos) presentes en el sitio de la infección al igual que las células reclutadas durante la respuesta inflamatoria o que son fagocitados por ellas. Una vez intracelulares, los promastigotes se transforman en amastigotes para así sobrevivir y multiplicarse dentro del fagolisosoma de su célula hospedera. Esta forma amastigota tiene un flagelo rudimentario, presenta forma ovalada o redondeada, con un diámetro 1.5-5 μm y reside y se multiplica en vacuolas fagolisosómicas de sus macrófagos hospederos. Así destruye la célula y se liberan las formas infectivas para invadir más células y continuar el ciclo.

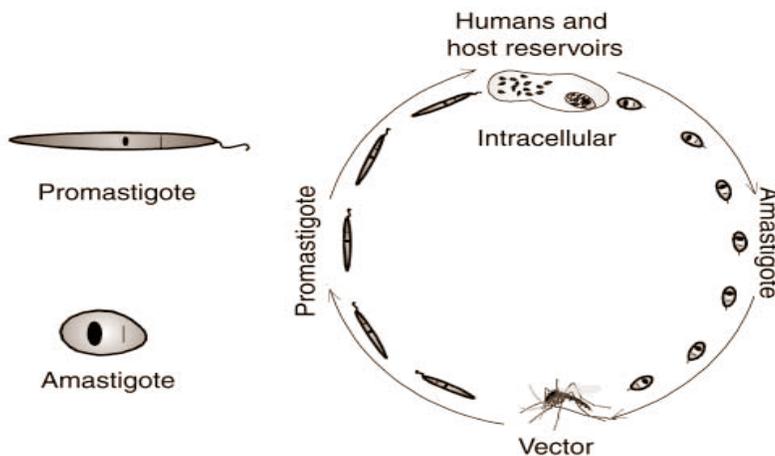


Figura 1. Esquema del ciclo dimórfico del parásito del género *Leishmania*. Tomado de Chan-Bacab y Peña-Rodríguez (2001).

Dentro del género *Leishmania* se agrupan 2 subgéneros: *Leishmania* cuyas especies se desarrollan en el intestino medio y anterior de los flebótomos, y el subgénero *Viannia* que agrupa los organismos cuyo ciclo dentro del vector se desarrolla en el intestino posterior, a la altura del triángulo pilórico (Figura 2). Los procesos llevados a cabo por el parásito, en el tracto digestivo del vector, incluyen cambios morfológicos y genéticos que desencadenan la transformación de promastigotes no infectivos o poco infectivos (prococíclicos) en promastigotes infectivos (metacíclicos) en el insecto vector, lo que les permite vivir en el ambiente del hospedero. Este proceso es lo que se conoce como metaciclogénesis, lo cual también se ha demostrado que ocurre en cultivos axénicos en varias especies de *Leishmania* (Muskus y Marín 2002).

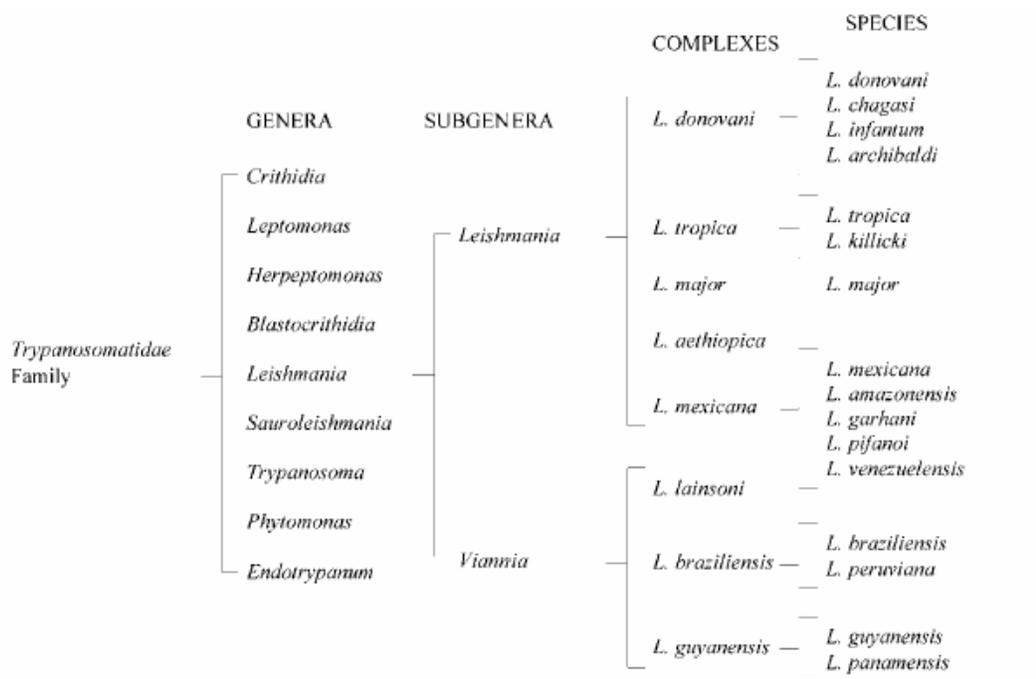


Figura 2. Clasificación taxonómica de parásitos del género *Leishmania*. Tomado de Chan-Bacab y Peña-Rodríguez (2001).

Las formas amastigotes del parásito son tomadas por la hembra del insecto cuando se alimenta de la sangre del hospedero vertebrado. En 24 horas los amastigotes se transforman en promastigotes y se multiplican rápidamente. La sangre infectada llega

primero a la parte anterior del intestino medio del insecto, donde se almacena en la matriz peritrófica. Después de 3 días esta matriz se desintegra y los promastigotes migran al intestino posterior en el caso de parásitos peripilóricos, o en el intestino anterior y medio en los parásitos suprapilóricos, donde se lleva a cabo la multiplicación y diferenciación. Después de 7 días los parásitos se desplazan hacia la parte anterior, y se adhieren entre el esófago y la laringe mediante hemidesmosomas flagelares. La unión y liberación de parásitos parece estar controlada por azúcares específicos de este estadio parasitario, que interactúa con el epitelio del tracto digestivo del vector (Pimienta *et al.* 1992). La transmisión de los parásitos al siguiente hospedero mamífero ocurre cuando el vector toma sangre, al parecer por regurgitación (Schlein *et al.* 1992).

La especie *Leishmania braziliensis* es el agente patógeno para las formas cutánea y mucocutánea. El trauma que se produce en el hospedero vertebrado, en la forma cutánea, por la picadura del insecto vector infectado con el parásito, induce una respuesta inflamatoria que involucra la migración de diferentes células, principalmente macrófagos y linfocitos, hacia el sitio del trauma a fin de reparar el tejido dañado e iniciar el proceso de cicatrización. Allí se forma una mancha roja que aumenta de tamaño y se va abriendo, formando una úlcera, que puede ser pequeña (<0.25 cm) o muy grande (> 30 cm). Clásicamente la lesión es de bordes elevados y de centro papuloso y húmedo, aunque puede manifestarse en formas irregulares (Arias *et al.* 1996). Estas manchas se presentan generalmente en la cara, tronco, brazos y piernas (Figura 3). Aunque ésta es la sintomatología general, los casos pueden presentar diversas intensidades y así resultar más o menos graves. La especie *L. braziliensis* causa lesiones cutáneas que tienden a ser más severas y de más larga duración que las causadas por otras especies de *Leishmania*. La diseminación linfática y el compromiso ganglionar son frecuentes, siendo la curación espontánea muy rara. El compromiso mucoso cuando se presenta es una complicación muy grave que puede dejar secuelas del orden estético y funcional (Orozco 1993). No sólo los factores del parásito influyen en la respuesta; la susceptibilidad del hospedero está

determinada por la edad, factores genéticos y el nivel nutricional. La variabilidad en los síntomas puede estar también sujeta a componentes químicos de la saliva del vector, que además de ser vasodilatores afectan la función del macrófago en el sitio de la inoculación, por ejemplo, en la síntesis de óxido nítrico (Davies *et al.* 2000).



Figura 3. Lesiones en pacientes con leishmaniasis cutánea. Tomado de Sheng *et al.* 2005

La forma mucocutánea de la enfermedad, LMC, llamada también espundia es una secuela de la LC en el Nuevo Mundo y resulta de una extensión directa o hematogena, o de una metástasis linfática a nivel nasal o nasal-mucoso. Las manifestaciones incluyen síntomas crónicos nasales, especialmente en el septo anterior, originando lo que se conoce como “nariz de tapir”, hasta avanzar a la destrucción extensiva naso-orofaríngea (Figura 4). Infecciones bacterianas y fúngicas están comúnmente asociadas y pueden llevar a la muerte por infección del tracto respiratorio. Los síntomas naso-orofaríngeos pueden aparecer con las primeras lesiones o décadas después (Sheng *et al.* 2005). En el 50% de los casos las lesiones mucosas se desarrollan dentro de los dos años siguientes a la lesión cutánea primaria, pero puede ocurrir hasta 30 años más tarde y en unos pocos pacientes puede presentarse compromiso mucoso, mientras la lesión cutánea primaria esté aún activa (Orozco 1993).



Figura 4. Lesiones en pacientes con leishmaniasis mucocutánea

Recientemente la Organización Mundial de la Salud ha informado de epidemias al este de África, India y minoritariamente en Suramérica, especialmente en Brasil y un brote epidémico en personas con VIH (Tempone *et al.* 2003). Desde mediados de la década de los 80's, se ha registrado un dramático incremento en el número de infecciones leishmaniósicas en pacientes humanos con VIH, debido a la extensión de la epidemia viral hacia las áreas endémicas de leishmaniosis en el mundo. Tremblay *et al.* (1996) en un estudio sobre la relación de estas dos enfermedades, concluyeron que ya que tanto *Leishmania* como HIV pueden invadir y multiplicarse dentro de los macrófagos, es posible que la interacción entre ambos organismos pueda exacerbar el proceso de la infección con *Leishmania*; así, la coinfección puede afectar en estos pacientes la patogénesis de ambas enfermedades.

2.2 Epidemiología

La leishmaniosis ha sido considerada como una infección tropical que constituye una de las 6 enfermedades más importantes del mundo para la Organización Mundial de la Salud/Investigación de enfermedades tropicales. Se registra en aproximadamente 88 países, con un cálculo de 12 millones de personas infectadas y 350 millones en riesgo de contraerla; se estima que anualmente se generan 2-3 millones de casos nuevos, de los cuales de 1 a 1.5 corresponden a la forma cutánea (Sigivila 2004). El interés por esta enfermedad infecciosa radica en el aumento de casos en los últimos años, en la incidencia sobre pacientes con VIH (Wolday *et al.* 1999) y las posteriores complicaciones que generan por los procesos moleculares de la interacción hospedero-parásito y por la restringida eficiencia en los tratamientos, debido en parte a la resistencia que ha desarrollado el parásito (Grogl *et al.* 1992).

Entre 1996 y 1998 los casos de leishmaniosis notificados en los países del Pacto Andino fueron de 14.082, de los cuales para Colombia correspondían 6.155, con un alto porcentaje para la forma visceral, respecto de los otros países (Davies *et al.*

2000). Aunque los complejos de *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *L. (Leishmania) mexicana* son responsables de la mayoría de los casos en los países latinoamericanos, el primero es indudablemente el más prevalente (López *et al.*, 1993). Del total de casos, el 49% corresponde a enfermedad causada por la especie *L. braziliensis* que es la más ampliamente distribuida en el continente. En Colombia, se trata de una enfermedad endémica de casi todo el territorio, excepto en San Andrés Islas y se presenta en zonas rurales y semiurbanas que presentan las condiciones ecoepidemiológicas favorables (bosques tropicales primarios, con abundancia de reservorios y vectores; en bosques secundarios, con selva húmeda tropical, y en bosques secos tropicales). Recientemente se han descrito procesos de urbanización de la enfermedad (Agudelo *et al.* 2002). Hasta la semana epidemiológica 53 del año 2003 se registraron 9.615 casos de leishmaniosis en Colombia; la mayoría de los casos (98%) que se presentaron eran del tipo cutáneo con 9533 casos, 1% para la forma visceral y el 1% restante para la leishmaniosis mucocutánea con 70 casos. En ese mismo informe 117 municipios, que quedaron clasificados en un nivel de muy alto riesgo (Tasa de incidencia > 1.54), aportaron el 79% de los casos. Al finalizar el año, se registraron oficialmente 12.433 casos. El PECET, Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Antioquia, advirtió que la incidencia de la leishmaniosis en Colombia es mayor, en razón a que por cada caso que es informado, diez no llegan a los registros oficiales. Según informes del Ejército Nacional, durante el 2004 se presentaron 3.163 casos de leishmaniosis cutánea en las Unidades Militares, aumentando el índice en un 391% si se compara con los 808 casos registrados en el 2003. En abril de 2005, estudiantes de la Universidad Industrial denunciaron la presencia en el Magdalena Medio de 150 casos de leishmaniosis, de los cuales 105 eran en niños. El tratamiento por parte de estas personas consistía en ácido de batería y formol (Molano 2005).

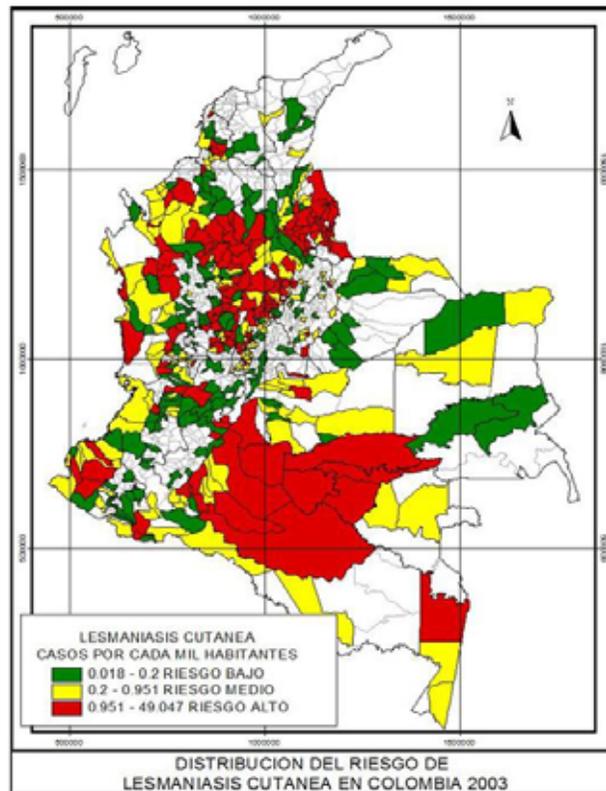


Figura 5. Mapa de distribución de leishmaniosis cutánea en Colombia, año 2003. Sigivila, 2004.

El crecimiento económico, incluyendo el aumento en la urbanización, deforestación, y el desarrollo de nuevas ciudades, migración de áreas rurales a urbanas, es responsable del esparcimiento del vector como un reservorio importante de *Leishmania* (Sundar 2002). En Colombia los aspectos condicionantes de la complicada situación de la enfermedad involucran la colonización de áreas semiforestales, el movimiento de tropas insurgentes y militares, la explotación extensiva de recursos naturales, la inestabilidad social, las creencias y prácticas sobre la enfermedad y el acceso inoportuno al tratamiento adecuado. De acuerdo con la Ley 100 de seguridad social, este conjunto de enfermedades se encuentra dentro de las patologías prioritarias que se deben atender por el Plan Básico Obligatorio de Salud (Ministerio de Salud 1994).

2.3 Tratamiento Actual y Resistencia

La enfermedad, en cualquiera de sus presentaciones clínicas, es tratada con drogas químicas. La quimioterapia usada se basa principalmente en compuestos tóxicos como metales pesados, particularmente antimonios. Cuando este tratamiento no es efectivo, se usan otros medicamentos como pentamidinas y amphotericina B. Todos estos tratamientos requieren administración por inyección con supervisión u hospitalización debido a la severidad de los posibles efectos secundarios (Berman 1988). Vélez Bernal, director del PECET, precisó que el único medicamento para tratar la enfermedad que se utiliza hasta ahora en Colombia es el n-metilglucamina, conocido comercialmente como Glucantime, contraindicado en individuos con problemas hepáticos, cardíacos y embarazo, entre otros, lo cual limita su uso y lleva a que muchos pacientes abandonen el tratamiento (Anónimo1 2003). Entre los compuestos usados se encuentran:

2.3.1 Antimonios pentavalentes: fueron usados desde 1912, poco después del reconocimiento en 1904 de las especies de *Leishmania* que causaban la leishmaniosis (Berman 1988). En 1947 el antimonio pentavalente stibogluconato de sodio (Pentostam ®, Welcome Foundation, London ®) fue el primero reconocido como clínicamente efectivo. Sin embargo, los antimonios stibogluconato y megluminas (Glucantime®, Rhône Poulenc, Paris®) son aún usados como primera opción para todas las formas de leishmaniosis.

Su mecanismo de acción se basa en la interferencia con el proceso bioenergético de los amastigotes. Los productos de los antimonios se unen e inhiben proteínas del parásito, generalmente actúan sobre enzimas en la glicólisis y en la oxidación de ácidos grasos, lo que resulta en una reducción importante en la producción de ATP y GTP (Berman 1988). La dosis diaria utilizada es de 20mg/Kg por 20-28 días, ya que estudios mostraron que en el caso de Colombia sólo 36-40% de pacientes controlaban eficazmente la enfermedad bajo esta misma concentración pero durante 15 días (Davies *et al.* 2000). En el caso de leishmaniosis mucocutánea se ha visto una frecuente

resistencia a la droga, incluso en terapias de 28 días, sin embargo no se recomienda alargar el tratamiento por el peligro de la toxicidad. Además, las recaídas bajo este tratamiento contra *L. braziliensis* son bastante altas (Zeballos *et al.* 1999). Entre los efectos secundarios de los antimonios, específicamente el Pentostam®, se encuentran mialgias, artralgias, síntomas abdominales y dolores de cabeza, que son notificados entre la 2-3 semana de tratamiento. Otros efectos reportados incluyen evidencias de la disminución de compuestos de la sangre (RBCs, WBCs y plaquetas) (Sáenz *et al.* 1991) y neuropatías periféricas reversibles (Brummitt *et al.* 1996). La dosis diaria con una duración del tratamiento rutinario resulta en pancreatitis química, pancreatitis sintomática y dolores músculo-esqueléticos; también puede ocurrir citopenia. Además representan un tratamiento largo y de costos relativamente altos (Webster 1991).

2.3.2 Pentamidinas, un derivado aromático de la diamidina, son usadas generalmente para la leishmaniosis visceral debido al problema frecuente de la resistencia a Sb. La dosis usada es de 4mg/Kg 3 veces a la semana durante un tiempo prolongado, de hasta 9 semanas. El efecto contra el parásito es efectivo inicialmente, sin embargo existe un porcentaje importante, que oscila entre 20 a 30%, de pacientes que recaen. Dentro de los efectos nocivos se incluyen mialgias, dolores puntuales y dolor de cabeza. Con menor frecuencia ocurre sensación de quemaduras e hipotensión aún con dosis mínimas y en tratamientos de corto tiempo en leishmaniosis cutánea. Debido a su alta toxicidad las pentamidinas solo son usadas cuando los tratamientos con antimonios no ejercen efecto alguno (Berman 1997). Aunque su modo de acción no se ha establecido aun, se conoce que este compuesto se une a nivel del material genético del parásito (Chan- Bacab y Peña-Rodríguez 2001), e inhiben la síntesis de poliaminas o interfieren con el DNA del kinetoplasto (Khaw y Panosian 1995).

- 2.3.3 Amphotericina B. Es un agente polieno antimicótico, cuyo compuesto principal es el ergosterol, principal esteroide de membrana en las especies de *Leishmania* por lo que el mecanismo de acción se basa en aumentar la permeabilidad de la membrana. Constituye el principal agente de quimioterapia contra la leishmaniosis, especialmente para la forma visceral y en pacientes clínicamente resistentes al Pentostam y a las pentamidinas. Inicialmente no era ampliamente usada debido a las contraindicaciones que presenta: fiebre, dolor de huesos y raramente problemas cardíacos; así como disminución de los niveles de potasio y de las funciones renales (Thakur *et al.* 1993). Se han desarrollado formas menos tóxicas en las cuales el deoxicolato ha sido reemplazado por otros lípidos; estas formulaciones se conocen como amphotericina B liposomales (Hashim *et al.* 1995), las cuales son bien tomadas por el sistema reticuloendotelial, donde residen los parásitos, y pobremente tomado por el riñón, el principal órgano afectado por los compuestos tóxicos (Hiemenz & Walsh 1996). De otro lado, se ha descrito que no presentan efecto alguno sobre la forma cutánea en ratones inmunocompetentes (Panocian *et al.* 1984). Estas formulaciones incluyen AmBisome®, Amphocil® y Abelcet® que han sido evaluadas *in vivo* e *in vitro* (Yardley & Croft 2000).
- 2.3.4 Paromomicina (Aminosidina). Es un aminoglicósido con licencia europea. La dosis diaria recomendada es de 15mg/Kg durante 10 días. Ha sido usada como monoterapia para la leishmaniosis visceral, ya que para la forma cutánea es menos exitosa, incluso con dosis altas, un estudio en Colombia (Soto *et al.* 1994 en Berman 1997) reveló que únicamente el 50% de pacientes se curaban de la enfermedad con dosis de 22.5 mg/Kg durante 14 días. De otra parte, se han registrado cifras de efectividad de hasta 84% con formulaciones tópicas de esta droga en el tratamiento de leishmaniosis cutánea en Sudamérica

(Arévalo *et al.* 2001). Como se trata de un aminoglicósido, tiene el potencial para la toxicidad renal y toxicidad del octavo nervio craneal.

- 2.3.5 Citoquinas. En 1990 se reportó por primera vez el uso del interferon- γ humano recombinante que ha mostrado eficacia en combinación con otras drogas, como antimonios, sin embargo, la eliminación de parásitos sólo ha sido parcial. Dependiendo de la sustancia concomitante, los efectos secundarios pueden incluir fiebre, fatiga, mialgias, dolor de cabeza y rara vez leucopenia (Sundar *et al* 2002).
- 2.3.6 Los agentes orales, usados principalmente para la leishmaniosis cutánea, son un atractivo tratamiento ya que son menos tóxicos que otras sustancias, pero su efectividad es igualmente menor. Entre los más usados se encuentran los imidazoles, como el ketoconazole y los triazoles como el itraconazole, que inhiben la biosíntesis del ergosterol. En Colombia, Vélez *et al.* (1997a) realizaron un estudio en el cual no obtuvieron diferencias significativas entre el uso de allopurinol (20mg/Kg durante 28 días) y el placebo en pacientes con *Leishmania panamensis*. Tampoco el Allopurinol, como monoterapia, resultó eficiente contra esta especie (Vélez *et al.* 1997b) Por otro lado, el 95% de pacientes tratados con itraconazole, un triazol, mostraron tasas de efectividad aún más bajas que los mismos controles sin tratamiento (Soto *et al.* 1993). De otro lado, en Bolivia, un estudio de tratamiento combinado de allopurinol con Glucantime para la forma mucocutánea mostró ser más efectivo que de forma independiente, aunque la seguridad y tolerancia es mucho menor comparada con Glucantime solo (Zeballos *et al.* 1999). En la forma cutánea por *L. major* el fluconazol ha mostrado eficacia después de 6 semanas de tratamiento (Berman 2003). Estos compuestos interfieren con la demetilación de esteroides del parásito (Khaw y Panosian 1995).

- 2.3.7 Avances actuales. Recientemente se ha empezado a estudiar el efecto *in vivo* e *in vitro* de compuestos moleculares que inhiban bioquímicamente la viabilidad del parásito. Entre ellos se encuentran las xanthonas con afinidad a heme, grupo prostético para involucrar proteínas en el metabolismo y en el transporte de electrones. Sin embargo se trata de estudios puntuales que aunque muestren significativa superioridad frente a las drogas tradicionales (Xu Kelly *et al.* 2003) su costo representa un limitante para el uso global de personas afectadas, que son principalmente personas de escasos recursos. Se han reportado actividades de estos compuestos contra *Leishmania amazonensis* y *Trypanosoma cruzi* (Eckeli *et al.* 2003).
- 2.3.8 Métodos tradicionales para tratar la enfermedad. Debido a la restricción de productos farmacéuticos efectivos, la mayoría de personas de las regiones endémicas de la enfermedad recurren a sistemas de medicina tradicional para aliviar los síntomas. Estudios en zonas rurales del Ecuador revelan que el 90% de las personas entrevistadas tienen o han tenido la forma cutánea de leishmaniasis, de las cuales el 22.5% han recibido tratamiento con drogas comerciales. Dentro de los otros tratamientos se encuentran la cauterización con sulfatos de cobre, fuentes ácidas o calor local (Chan-Bacab & Peña 2001; Weigel y Armijos 2001). Estas prácticas son efectivas, ya que los amastigotes son termosensibles, sin embargo los efectos secundarios son evidentes. Por otro lado, está el uso de plantas nativas para tratar la leishmaniosis, que en zonas rurales cerca del 80% del tratamiento es de este tipo. Para las infecciones cutáneas suelen usarse preparaciones tópicas del extracto, sustancias vegetales cáusticas como el látex de *Ficus* sp., o de Euphorbiaceas, como *Ura crepitans*. Mientras que para las formas sistémicas es común la administración oral de los extractos vegetales (Iwu *et al.* 1994). De los primeros trabajos *in vitro* que revelaron actividad leishmanicida de plantas usadas por comunidades están los ensayos con *Bocconia pearcei* y *Bocconia integrifolia*, de la familia Papaveraceae; posteriormente se estudiaron

Rutaceas (*Galipea longiflora*), *Ampelocera edentulata*, de la familia Ulmaceae y varias especies de Euphorbiaceae (Fournet *et al.* 1995b).

2.3.9 La resistencia es formalmente definida por la Organización Mundial de la Salud OMS como “el desarrollo de una capacidad en la cadena de algunos organismos, a tolerar dosis de un tóxico que puede proveer letalidad a la mayoría de individuos en una población normal de las mismas especies” (Ferrari 1996); y se trata de un proceso evidente en algunas especies de *Leishmania* y que, consecuentemente, crean una barrera en el tratamiento de la enfermedad. Este hecho, infortunadamente ha llegado a ser muy común en áreas endémicas, presentándose en 5-70% de los pacientes. En algunos casos, esto se atribuye a re-infecciones o deficiencias inmunológicas, fisiológicas o farmacocinéticas del hospedero. Sin embargo, existen fuertes indicios de que se trata, al menos en parte, a la resistencia a la droga y a que el efecto leishmanicida de la droga es órgano-dependiente (Grogl *et al.* 1992). Los estudios experimentales sugieren para la forma cutánea una resistencia mediada por el interferón γ , citoquina asociada a células CD4 tipo Th-1 (Davies *et al.* 2003). Genéticamente la resistencia se asocia al gen *ltmdr1* de *L. tropica*, que codifica para el dominio NBD2, que se une al C-terminal del nucleótido de la glicoproteína P, de modo que la unión de la droga con el dominio citosólico genera la resistencia (Pérez *et al.* 1999).

2.4 Inmunología

La mayoría de estudios sobre la respuesta inmunológica a la infección con *Leishmania* han sido realizados con modelos animales, que al igual que los humanos presentan una respuesta celular, no humoral; y una activación de células T, especialmente CD4+, importante en la activación de respuestas mediadas por TH1 y TH2. Los factores determinantes en la respuesta inmune han sido identificados, entre ellos se encuentran: la respuesta inicial de las citoquinas, el tamaño del inóculo

infectivo, la saliva del vector y las células asesinas naturales (natural killer cells). Mientras la presencia del interferón (IFN) γ y la interleuquina (IL)12 en fases tempranas de la infección activan la vía de respuesta TH1, el factor transformador de crecimiento (TGF) β y la IL10 suprimen el desarrollo de células TH1, pero estimulan la respuesta TH2, lo que permite el crecimiento y desarrollo de los parásitos.

También se ha establecido la importancia de las células CD8+, las cuales activan la secreción de IFN γ y la activación de macrófagos. Datos epidemiológicos soportan la dicotomía TH1/TH2 de los modelos de laboratorio. Se ha observado que pacientes con la forma cutánea presentan una respuesta TH1 proliferativa, y una respuesta hipersensible tipo retrasada DTH positiva. DTH baja ha sido identificada en casos de recurrencia de la enfermedad y recaídas, en comparación con re-infecciones e infecciones sub-clínicas. Lo que demuestra la predominancia de la respuesta tipo TH2 en casos de infección crónica. Sin embargo, el perfil de citoquinas varía con el tiempo a través de la infección (Ribeiro-de-Jesus *et al.*, 1998).

Por otro lado un tema de interés ha sido evaluar y analizar la forma en que el parásito sobrevive a la respuesta inmune del hospedero y a las condiciones adversas en este ambiente. Las estrategias desarrolladas por parte de éste incluyen presentación de antígenos, generación de óxido nítrico y radicales de oxígeno y producción de citoquinas (Cunningham 2002). Esto es el resultado, por lo general, de interacción entre las moléculas de la superficie del parásito, particularmente gp63, una metaloproteasa que presenta actividad proteolítica a pH ácido, degradando enzimas lisosomales, y LPG, lipofosfoglicano, un glicolípido muy abundante. También se han asociado con este proceso receptores de membrana de los macrófagos que no han sido claramente identificados, pero que causan distorsión en la cascada de señales intracelulares específicas, como el caso de JAK/STAT, isoforma de proteinquinasa C (PKC) dependiente de Calcio (Olivier *et al.* 2005).

El LPG ha sido muy estudiado, demostrando que confiere en la forma promastigote la habilidad para inhibir la biogénesis del fagolisosoma, lo que se relaciona con la acumulación perifagosomal de F-actina, la cual puede formar una barrera física que

previene al parásito de protegerse en el fagosoma de la acción de lisosomas. De otra parte, al igual que muchos otros patógenos, *Leishmania* secuestra el citoesqueleto de la célula hospedera durante el proceso infectivo (Lodge y Descoteaux 2005).

2.5 Extractos vegetales y actividad leishmanicida

2.5.1 Metabolitos secundarios en general

Una gran cantidad de compuestos químicos de las plantas ha sido usada en el campo farmacéutico durante años. La evaluación científica de los compuestos vegetales usados tradicionalmente para tratar dolencias y enfermedades ha generado productos farmacológicos efectivos, especialmente contra parásitos. De hecho, la mayoría de drogas usadas clínicamente para el tratamiento de agentes infecciosos son derivados de productos naturales. Los agentes antimaláricos como la quinina, cloroquina y artemisinina; y la emetina, agente anti-amebiano, son claros ejemplos (Kirby, 1996). El primer compuesto con actividad contra la malaria fue la quinina, aislado originalmente de la corteza de *Cinchona succirubra*. Entre las familias vegetales más estudiadas actualmente por su actividad contra parásitos protozoarios, particularmente trypanosomatidos están Rutaceae, Meliaceae (Pepe *et al.* 2004), Annonaceae, Asteraceae, Cyperaceae, Solanaceae (Saxena *et al.* 2003) y Piperaceae (Monzote *et al.* 2004).

En cuanto a leishmaniosis, varios compuestos derivados de plantas han sido descritos por su actividad contra los parásitos desde mediados de los 80's. Los primeros estudios dirigidos a la determinación de bioactividad de un metabolito secundario contra especies de *Leishmania* fueron realizados con la forma promastigote del parásito ya que es de fácil mantenimiento bajo condiciones *in vitro*. Sin embargo, este estado del ciclo biológico no corresponde a la forma parasitaria en el hospedero vertebrado, por lo que ha sido necesario el estudio complementario con las formas amastigotes intracelulares presentes dentro de los macrófagos.

Para esta enfermedad, más de 30 especies de varias familias taxonómicas han mostrado compuestos con significativa actividad contra *Leishmania*. Entre los quimiotipos promisorios se encuentran las benzilisoquinolinas, alcaloides, iridoideas, quinonas y glicósidos esteroideos.

La influencia fitoquímica sobre este parásito se ha observado aún sin necesidad de células mamíferas. Se ha observado en flebótomos que sin haber tomado sangre y de hábito herbívoro específico, como *Phlebotomus papatasi*, en su intestino medio han muerto parásitos de la especie *L. major*, fenómeno que se atribuye a los compuestos vegetales presentes (Carvalho y Ferreira, 2001).

Algunos de los metabolitos secundarios que han mostrado este tipo de actividad incluyen las chalconas de las familias Piperaceae (Torres-Santos, 1999) y Fabaceae (Zhai *et al.* 1995), las cuales también presentan actividad antimalárica y molecularmente afectan la ultraestructura y función mitocondrial del parásito *Leishmania major* y *Leishmania donovani* (Zhai *et al.* 1999). Los lignanos, en cuanto a actividad contra el parásito *Leishmania*, han sido estudiados de especies del género *Virola* (Barata *et al.* 2000), terpenos en *Maesa balansae* (Myrsinaceae) (Maes *et al.* 2004), con frutos de *Licania tomentosa* se estudió el triterpeno ácido oleanólico sobre *Leishmania major* LV39 (Delorenzi *et al.* 2003) y en las Verbenáceas de varios géneros de *Premna* (Habtemariam 2003); y terpenoides en *Polyalthia macropoda* (Richomme *et al.* 1991), en la familia Annonaceae se ha demostrado la bioactividad de acetogeninas (Arango *et al.* 2002; Waechter *et al.* 1998; Raynaud *et al.* 2004) y de isoquinolinas, al igual que en el género *Berberis* de la familia Berberidaceae (Ghosh *et al.* 1985) y en la Rutacea *Galipea longiflora*, de la cual se demostró la actividad antiparasitaria de 2-quinolinas en el grupo sustituyente (Fournet *et al.* 1995a; Frank *et al.* 2004) y algunos ya fueron patentados: Chimaninas A, B, C y D US4209519/15/04/93 (Giménez 2004).

Quinonas principalmente de la familia Bignoniaceae (Sauvain *et al.* 1993); glicósidos iridoides de Scrofulariaceae (*Picrohiza kurroa*) (Puri *et al.* 1992) y Verbenaceae, especie *Nyctantes arbortristis* (Fournet *et al.* 1993). La quinona 1-acetilbenzoisocromaquinona ha mostrado actividad significativa contra amastigotes y promastigotes de *Leishmania donovani*, amastigotes de *Trypanosoma cruzi* y tripomastigotes de *T. brucei brucei* con valores IC₅₀ de 2.32, 1.98, 6.60 y 0.65 µM, respectivamente (Del Rayo *et al.* 2004). En cuanto a las saponinas, se han estudiado las de los géneros *Hedera* (Ridoux *et al.* 2001), *Dracaena* (Okunji *et al.* 1996; Iwu *et al.* 1992) y *Yucca* (Plock *et al.* 2001).

Saponinas como hederina han mostrado actividad significativa contra *L. infantum* (Delmas *et al.* 2000). Del extracto acuoso también se ha demostrado actividad antileishmanicida. Ejemplos de ello son los trabajos de Saleheen *et al.* (2004) y de Da Silva *et al.* (1995), con *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae) y cebolla *Allium cepa*, respectivamente.

Con las familias Piperaceae y Solanaceae se realizó un trabajo con extractos de diferentes polaridades, encontrando que la solanácea *Aureliana angustifolia*, *Piper mallacophyllum* y *Peperomia scandens* (Piperaceae) inhiben en más del 90% ambas formas del parásito *Leishmania amazonensis* en una concentración de 100 mg/mL y que la polaridad de los solventes es directamente proporcional con la actividad leishmanicida (Pacienza-Lima *et al.* 2003). El extracto crudo en diclorometano de *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) mostró actividad y citotoxicidad sobre promastigotes de *Leishmania amazonensis* con IC₅₀ de 1.5-2 mg/mL (Toledo *et al.* 2003).

2.5.2 Alcaloides

Los alcaloides son uno de los productos naturales más usados en la producción de drogas humanas. A pesar de que pueden ser seriamente tóxicos para el hospedero, existe gran interés de estas sustancias como antiparasitarias (Kayser *et al.* 2003). De hecho inhiben el crecimiento de cultivos de las cadenas sensibles y resistente a

cloroquina de *Plasmodium falciparum* (Saxena *et al.* 2003; Paulo *et al.* 2000). Dentro de las anonáceas, la especie *Guatteria lehmannii* ha sido estudiada en cuanto a su actividad antimalárica en cepas de *Plasmodium falciparum* FCB-2 por medio del aislamiento de tres alcaloides aporfínicos, Nornuciferina 1, Lysicamina 2 y Norneolitsina 3 que mostraron efectividad a 43 mg/100 mL (Sáez *et al.* 1997).

Se han aislado varios alcaloides con actividad leishmanicida. Dentro de los alcaloides-quinolinas, los trabajos de Fournet *et al.* (1993) mostraron efectividad comparable a la de Glucantime sobre *Leishmania amazonensis* y en ensayos *in vivo* con ratones, la alta concentración de estos compuestos no causó toxicidad, incluso a dosis de 100 mg/Kg/día durante 14 días. Waechter *et al.* (1999) en su trabajo con anonáceas aislaron alcaloides aporfínicos y estudiaron su actividad contra los parásitos *Leishmania major* y *L. donovani* (IC₁₀₀ = 3.12 µg/mL). La berberina ha sido aislada de familias como Annonaceae, Menispermaceae y Berberidaceae, es un alcaloide isoquinilínico que presenta gran eficacia contra el parásito. Se ha usado tradicionalmente durante muchas décadas, y clínicamente ha sido utilizada por más de 50 años para el tratamiento de la leishmaniosis. A concentraciones de 10 µg ml⁻¹ este compuesto elimina eficazmente a *Leishmania major* dentro de los macrófagos peritoneales de ratones (Webster 1991); bajo condiciones *in vitro* e *in vivo* muestra igual eficacia que la droga estándar Glucantime contra la forma cutánea, aunque para la forma visceral resultó ser mucho más limitada (Vennerstrom *et al.* 1990).

Los alcaloides benzilisoquinolínicos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y han sido aislados de plantas usadas en medicina tradicional para combatir enfermedades por parásitos. En estudios de 14 tipos de este compuesto, 4 mostraron significativa actividad contra promastigotes de *L. amazonensis*, *L. panamensis* y *L. donovani*. Daphnandrina (Phillipson *et al.* 2002), aislada de *Albortisia papuana* (Menispermaceae); obaberina (Weigel *et al.* 1994) de la anonácea *Pseudoxandra sclerocarpa*; gyrocarpina (Phillipson *et al.* 1995) producida por *Gyrocarpus*

americanus (Hernandiaceae) y la tetradina, metabolito aislado de *Limaciopsis loangensis*, perteneciente también a la familia Menispermaceae (Sauvain *et al.* 1993).

Psychotria klugii es una especie de la familia Rubiaceae con alto contenido de alcaloides benzoquinolizidínicos que ha mostrado actividad *in vitro* contra varios parásitos, entre ellos *Leishmania donovani*. El alcaloide cefaelina mostró efectividad contra este parásito a IC₅₀ 0.03 mg/mL, 20 y 5 veces mayor comparada con la actividad de la pentamicina y la Amphotericina B, respectivamente (Muhammad *et al.* 2003).

El alcaloide tetradina también ha mostrado efectividad bajo la misma concentración de las anteriores, y su actividad *in vivo* a 100 mg/Kg⁻¹ día⁻¹ en ratones BALB/C ha mostrado similares resultados a los obtenidos con Glucantime® (Sauvain *et al.* 1993). De la especie *Cephaelis dichroea* se aislaron los alcaloides indólicos strictosidina, lactam strictosidina y vallesiacotamina, de los cuales se demostró actividad contra amastigotes y promastigotes de *Leishmania donovani* (Del rayo *et al.* 2004).

2.6 Apocynaceae y *Ervatamia coronaria*.

Dentro de todas las familias botánicas, los miembros de la familia Apocynaceae han sido usados durante años por la medicina popular. En el campo de la fitoquímica han sido aislados muchos de sus componentes como heterósidos cardiotónicos de tipo cardenólido (tevetina), terpenos cuyo principio activo es la ouabaina que se emplea como herramienta para la investigación farmacológica siendo los alcaloides uno de los principales constituyentes dentro de la amplia diversidad de metabolitos secundarios. Algunos de ellos han sido desde hace décadas aislados y usados como drogas, como la vinblastina, la vincristina y la reserpina (Neuss 1970).

Esta familia está compuesta por cerca de 180 géneros y más de 1600 especies. El género ha sido reconocido por sus propiedades precursoras para síntesis de drogas y actividad biológica (Alldrich *et al.* 1986). En su composición química presenta

compuestos de tipo terpenoides, lignanos, glicósidos y alcaloides, de éstos últimos, específicamente del tipo indólico y bisindólico (Márquez 1999). Los alcaloides indólicos tienen el grupo indol, que proviene de la ruta del triptófano y se encuentra dentro del esqueleto de la ibogamina (Figura 6).

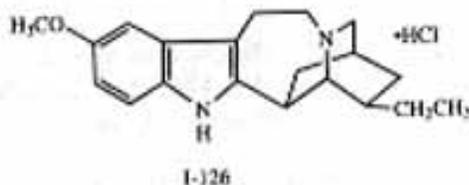


Figura 6. Estructura química de la ibogaina. Tomado de RBI (1999).

Las plantas de esta familia han sido usadas contra reumatismo, resfriados e infecciones de la piel. De la semilla de *Tabernaemontana coronaria* syn. *Ervatamia coronaria* se han aislado alcaloides como conoflorina, tabersonina, voacangina y coronaridina (Márquez 1999). El estudio de Beek *et al.* (1984) mostró que especies del género *Tabernaemontana* presentan actividad biológica contra virus, amebas, hongos y 18 de las 19 especies estudiadas afectaron la supervivencia de bacterias Gram +, ensayando con el extracto etanólico.

Esta familia botánica es conocida por presentar alcaloides iboga, cuyas estructuras dependen totalmente de su interrelación con la ibogaina (Taylor 1965). Algunos de los alcaloides monómeros de esta familia se encuentran catarantina y ajmalicina; y de los binarios lo más destacados son vincristina y vinblastina, ambos constituidos por la unión de vindolina a otra molécula de estructura indólica (Alvarez 2003). La especie *Aspidosperma quebracho-blanco* ha sido ampliamente estudiada, de la cual su principal compuesto alcaloide es la Yohimbina, que es un poderoso simatolítico inverso a la adrenalina, el cual excita los centros respiratorios, la dosis media usada es de 4 g. Se ha reportado usos en Bolivia de esta especie contra la malaria (Killeen *et al.*, 1993; DeFilipps *et al.* 2004). De las plantas del género *Rauvolfia*, se usa

principalmente su raíz, de donde se extraen los principios activos. Su alcaloide, la reserpina es derivado de la yohimbina; su efecto puede ser hipotensor y tranquilizador (Daniel 1988). De las especies pertenecientes al género *Tabernaemontana* se han aislado los alcaloides tabernaemontana ($C_{20}H_{26}O_3N_2$) y coronarina ($C_{44}H_{56}O_6N_4$), y el látex es usado para quitar verrugas, y las hojas en cataplasma para resolver tumores, curar llagas y para el reumatismo. En algunas especies (*T. grandiflora*) las personas se pintan con el látex para curar infecciones de la piel (García Barriga 1975). De la especie *Peschiera affinis* los compuestos epiheyneanina, affinisina, vobasina, olivacina, voacangina, voacristine, iboxygaine and 19-hidroxi-ibogamine fueron aislados, posteriormente se evidenciaron en otros géneros como *Tabernamontana* y *Voacanga*. De *Tabernaemontana* se han estudiado diferentes órganos y estructuras químicamente. De las hojas se han aislado los compuestos lupeyl acetate triterpenoide, los alcaloides voacangina, 19- epivoacristina, vobasina y 19R- hidroxiconofaringina (Cabezas & Ciccio-alberti 1986), de las ramas se han aislado alcaloides indólicos (voacangina, conofaringina, 19-epivoacristina, vobasina) y el bisindólico epivoacorina (Ciccio-alberti *et al.* 1985).

Recientemente de la especie *Tabernaemontana divaricata*, uno de los sinónimos de *Ervatamia coronaria* se aislaron 6 nuevos alcaloides indólico aparte de los 36 ya reportados: *viz.*, (3*S*)-3-cyanocoronaridine, (3*S*)-3-cyanoisovoacangine, conolobine A, conolobine B, conolidine y (3*R*/3*S*)-3-ethoxyvoacangine provenientes de la corteza de la planta (Toh *et al.* 2004).

De la especie *Tabernaemontana catharinensis* se estudió su fracción alcaloidea obtenida de la corteza, obteniéndose actividad frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* meticolino resistentes, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus epidermidis* y *Acinetobacter iwoffii* (Guida *et al.* 2003). Pereira *et al.* (1998) mostraron actividad de esta especie contra *Trypanosoma cruzi*. De *Peschiera buchtieni* se han aislado más de 40 alcaloides indólicos, resaltando que en

Cochabamba, Chapare (Bolivia) la leishmaniosis cutánea es curada con esta especie por los indígenas (Deharo *et al.* 1992)

De la familia Apocynaceae, la especie *Peschiera australis* presenta alcaloides indólicos con actividad contra *Leishmania amazonensis* (Delorenzi *et al.* 2001). Este mismo autor (2002) demostró la actividad del alcaloide coronaridina sintético y su análogo racémico metoxilado, 18-metoxicoronaridina contra el mismo parásito en condiciones *in vitro*. Contra la misma especie de parásito se estudió la apocinácea *Tabernaemontana catharinensis* de la cual se trabajó con su extracto etanólico (Soares *et al.* 2003); y recientemente, el extracto de alcaloides de *Aspidosperma ramiflorum* mostró efectividad contra las formas promastigotes y amastigotes de *Leishmania braziliensis* (Piloto *et al.* 2004). De este mismo género, *Aspidosperma*, en Brasil se reconoce como medicamento antimalárico.

Ervatamia coronaria es una planta originaria de la India, aunque es frecuente su cultivo en países del neotrópico, especialmente en Colombia y Brasil. Está ampliamente distribuída en países tropicales como planta ornamental en jardines, se conoce como “clavel de la India”, “Jazmín uva” y en Colombia en la zona de colecta como “buquecito” o “sanango”, éste último utilizado también en zonas selváticas, al igual que “lechoso” y “cajón del amo”. Tiene múltiples usos medicinales, como antihelmíntico, anestésico dental, emoliente y febrífugo. El látex de sus hojas y raíces se preparan como remedios herbales. Sus flores molidas se usan para combatir las infecciones de los ojos.

La descripción de Linnaeus en la *Flora Zeylanica* (1747) y en *Species Plantarum* (1753) la refiere como *Tabernaemontana*, mientras que el nombre vernacular en la *Flora Zeylanica* es *Wrightia antidysenterica* (L.) R.Br. Stapf (1902) (Van Beek *et al.* 1984). De esta especie se ha aislado el alcaloide bisindólico 19,20-dihydroervahanina A, al igual que los alcaloides coronaridina, heyneanina, voacristina, voacamina, descarbomethoxyvoacamina y cinco ácidos fenólicos: vanílico, gentisico, syringico, 4-hydroxybenzoico y ácido salicílico, los cuales mostraron efecto anti-inflamatorio y analgésico *in vivo* sobre ratones (Henriques *et al.*

1996). En el estudio de Kam *et al.* (2003) se aislaron 23 alcaloides, dentro de los cuales estaban taberhanina, voafinina, *N*-methylvoafinina, voafinidina, voalenina y el nuevo alcaloide bisindólico, conophyllinina en adición a los ya conocidos conophyllina y conofolina (Figura 7). De esta especie es característica la proteasa cisteínica, ervatamina la cual ha sido purificada del látex (Chakrabarti *et al.* 1999; Nallamsetty *et al.* 2003).

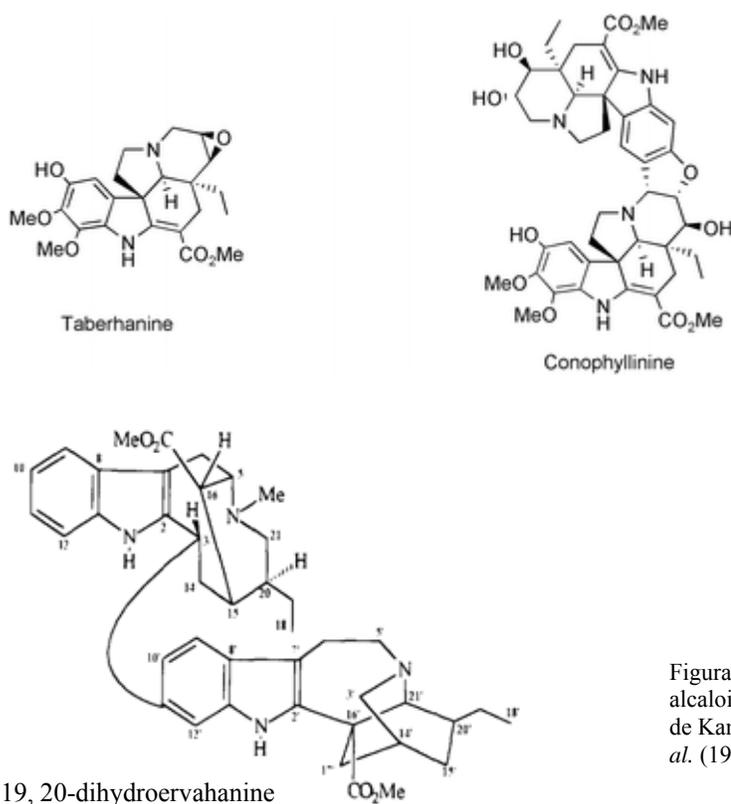


Figura 7. Estructura de algunos alcaloides de *E. coronaria*. Tomado de Kam *et al.* 2003 y Henriques *et al.* (1996)

El extracto etanólico de esta especie fue estudiado en ratones por medio de metodología hipocrática, con la cual se observó acción sedante, decrecimiento de tono muscular esquelético y de la respiración. El efecto anestésico se observó en todos los órganos, excepto en las flores, la mayor actividad farmacológica se obtuvo de los tallos y las raíces (Taesotikul *et al.* 1989).

Esta especie es aprovechada por los Tukunas de Colombia para la curación de las diarreas y el tratamiento de los dolores de estómago, usando la decocción de las

hojas. Los reumatismos se tratan mediante la administración oral de cocimientos de esta misma planta y se considera ventajosa la mezcla de este cocimiento con aguardiente, de lo que resulta un gran macerado medicinal (Glenboski, 1983; Anónimo2 2003).

Partiendo de la eficacia observada en algunas especies vegetales sobre parásitos protozoarios *in vitro* e *in vivo*, puntualmente de la familia Apocynaceae y de sus compuestos alcaloides, la especie *Ervatamia coronaria* (Jacq Staff.) genera interés en el estudio de la actividad de estos compuestos sobre el parásito causante de la leishmaniosis cutánea y mucocutánea *Leishmania braziliensis* en condiciones *in vitro*.

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Debido a la alta incidencia de la leishmaniosis y el endemismo que presenta en el país, además del limitado éxito de los tratamientos, especialmente en las formas visceral, mucosa y cutánea difusa y, considerando que los trabajos en vacunas aun no han arrojado resultados contundentes (Handman 1997), que las drogas usadas son muy poco prácticas, con alto grado de toxicidad o muy costosas para ser empleadas en profilaxis, es clara la necesidad del desarrollo de alternativas eficaces y seguras en el tratamiento de esta enfermedad. Los componentes existentes en los recursos naturales y, en especial la diversidad química de las plantas, ofrecen una herramienta potencial para el uso de los mismos ante problemas de salud pública, anteponiendo el conocimiento etnobotánico y tradicional que poseen. La investigación y el estudio de productos naturales provee la posibilidad de descubrir nuevas moléculas con alta efectividad y selectividad contra un agente patológico, y las cuales pueden ser optimizadas por medio de su síntesis parcial o total.

De acuerdo a lo anterior surge el interrogante; Tienen, los alcaloides aislados de la planta *Ervatamia coronaria* (Apocynaceae), conocida como “lechoso” o “cajón del amo”, actividad leishmanicida en condiciones *in vitro*?

La inexistencia de una droga eficaz para el tratamiento de la leishmaniosis ha renovado el interés por la re-evaluación de métodos tradicionales como fuente para el desarrollo de un agente leishmanicida con una mayor eficacia y menor toxicidad frente a esta enfermedad considerada una de las más importantes patologías tropicales a nivel mundial y que constituye un problema de salud pública en Colombia y otros países latinoamericanos. Es clara la necesidad de drogas con nuevas estructuras y modos de acción, y recientemente se ha mostrado actividad antiprotozoaria por parte de especies vegetales. Los compuestos puros pueden ser obtenidos fácilmente, es posible modificarlos estructuralmente para producir drogas potencialmente más activas, eficaces y seguras. Cerca del 25% de las drogas a nivel mundial provienen de plantas, y de las 252 drogas consideradas como básicas y esenciales por la Organización Mundial de la salud (OMS), el 11% son exclusivamente de origen botánico y un número significativo de las restantes han sido obtenidas de precursores naturales (Rates 2001).

Las especies de la familia Apocynaceae han sido estudiadas debido a la gran cantidad de compuestos de tipo alcaloide que contienen, tanto en sus partes vegetativas como reproductivas. En algunos géneros la actividad de estos metabolitos secundarios contra parásitos causantes de leishmaniosis ha sido determinada. Sin embargo, la especie *Ervatamia coronaria* no se ha estudiado bajo este criterio; lo que enmarca un vacío en el conocimiento sobre un recurso natural con un gran potencial fitofarmacológico, dirigido al manejo y control de una enfermedad como la leishmaniosis cuyos tratamientos no han evidenciado éxito ni eficacia significativa.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la actividad *in vitro* de la mezcla de alcaloides aislados de *Ervatamia coronaria* (Apocynaceae) sobre *Leishmania (V) braziliensis*

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar la mezcla ácida y básica de alcaloides de la parte aérea (corteza y hojas) de la especie *Ervatamia coronaria* (Apocynaceae) para los ensayos *in vitro*.
- Establecer la acción de la mezcla de alcaloides aislada de *Ervatamia coronaria*, en 6 concentraciones diferentes, sobre las formas promastigotes del parásito *Leishmania (V) braziliensis* bajo condiciones *in vitro*.
- Determinar la actividad *in vitro* de la mezcla de alcaloides aislados de *Ervatamia coronaria* (Apocynaceae) sobre las formas amastigotas de *Leishmania (V) braziliensis*

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de la mezcla de alcaloides

El material colectado, correspondiente a la parte aérea (hojas y tallos) de *Ervatamia coronaria* (Jaq) Staff. Apocynaceae se obtuvo de un espécimen adulto y maduro (ANEXO 1), con infrutescencia e inflorescencia (ANEXO 2), ubicado en el Jardín Botánico del Quindío, Colombia en las coordenadas específicas N 4°30'35.5" W 75°39'07.3" en noviembre de 2004.

El Jardín Botánico del Quindío se encuentra en el perímetro urbano del Municipio de Calarcá en la zona céntrica del departamento del Quindío a una altura de 1490 m.s.n.m. (Figura 8). Pertenece a la zona de vida de Bosque muy húmedo pre-montano (bmh-PM) con una precipitación total anual de 2162.41 mm y media mensual de 180.20 mm. La temperatura media anual es de 20.5°C y oscila entre 19.6°C (noviembre) y 21°C (agosto) y la humedad relativa anual promedio corresponde a 78.09%.

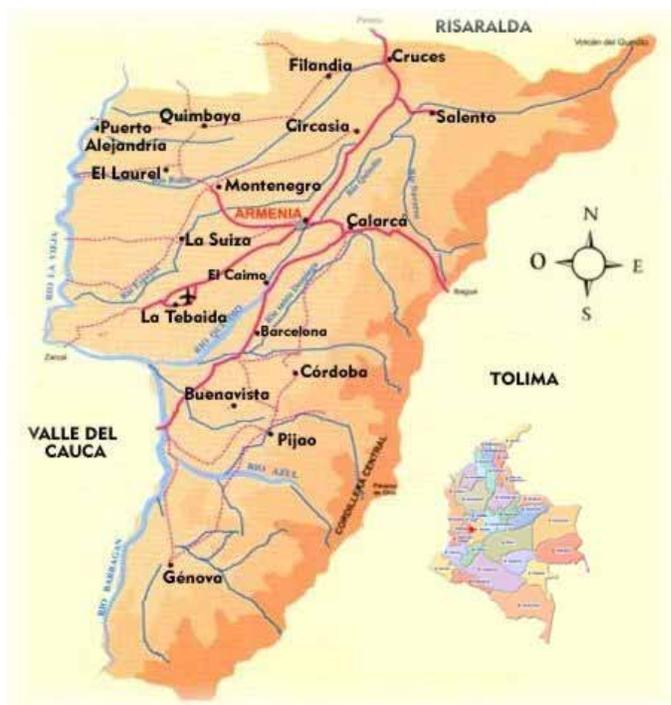


Figura 8. Mapa de localización del Municipio de Calarcá, Quindío.

La determinación estuvo a cargo del Herbario Nacional Colombiano y el exicado fue depositado con el número COL505069 del mismo herbario.

El material fue transportado desde el sitio de colecta al laboratorio de fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana en bolsa de polipropileno. Se mantuvo a la sombra durante quince días para su secado y luego se pulverizó en un molino industrial, marca Salvato con una lámina de tamaño mediano, obteniendo 364 g en peso seco. Se hizo la extracción con etanol destilado 95% por maceración durante ocho días con agitación diaria (Anexo 3). Después de la filtración, el producto se concentró en el rotavapor para extraer el disolvente (Anexo 4) cuyo peso seco correspondió a 22.9352 g, el cual se acidificó en 500 mL de ácido acético 10% v/v y se mantuvo a 5°C durante 15 horas. Después de la filtración de este material (Anexo 5), la solución se extrajo con diclorometano destilado en 12 alícuotas de 20 mL para obtener el extracto ácido, cuyo pH fue de 2.0 y se llevó a su mínimo volumen en el

rotavapor, obteniendo un líquido de color verde oscuro y fuerte olor a ácido acético de 1.5055 gramos (Anexo 6).

La solución ácida se basificó con NaOH 40% hasta un pH de 10, a la que se le realizó una re-extracción con diclorometano con 10 alícuotas de 20 mL. Tanto el extracto básico como la solución básica permanecieron durante 2 días a temperatura ambiente y bajo oscuridad para volverse a extraer con diclorometano y llevar a mínimo volumen en el rotavapor, cuyo peso seco final fue de 0.9 g. Pruebas dragendorff se aplicaron al extracto ácido, solución básica y extracto básico obteniendo positivo, negativo y fuertemente positivo, respectivamente (Anexo 7). Con lo cual se escogió el extracto básico para hacer los ensayos biológicos con *Leishmania braziliensis*.

Finalmente se hizo cromatografía en capa delgada CCD con fase estacionaria de sílica gel F254 y fase móvil diclorometano: metanol en proporción 9:1 y acetato de etilo en un volumen de 20 mL. Se reveló con U.V. cercano, 200-380 nm y se observó el corrido de sustancias de alta polaridad en colores correspondientes a compuestos de tipo alcaloide: blanco en U.V. (Anexo 8) y rosados y violetas en la CCD, la cual fue revelada con sulfato cérico (Anexo 9). La mezcla obtenida fue mantenida a -20°C hasta su uso en los ensayos celulares. El procedimiento fitoquímico para la obtención de la mezcla de alcaloides de la planta se presenta en la figura 9.

Mantenimiento de cultivos celulares y parásitos

Leishmania braziliensis

La cepa de *Leishmania braziliensis* HOM/BR752903 suministrada por el CIF, Centro Internacional de Física, de la Universidad Nacional se mantuvo en medio bifásico compuesto por medio axénico NNN modificado con Schneider's (Anexo 10) y enriquecido con suero fetal bovino SFB inactivado al 10% a 26°C. Se utilizaron parásitos de cepas descongeladas, con número de pases reducido y pasados, anteriormente, por macrófagos J774.

Secado del material



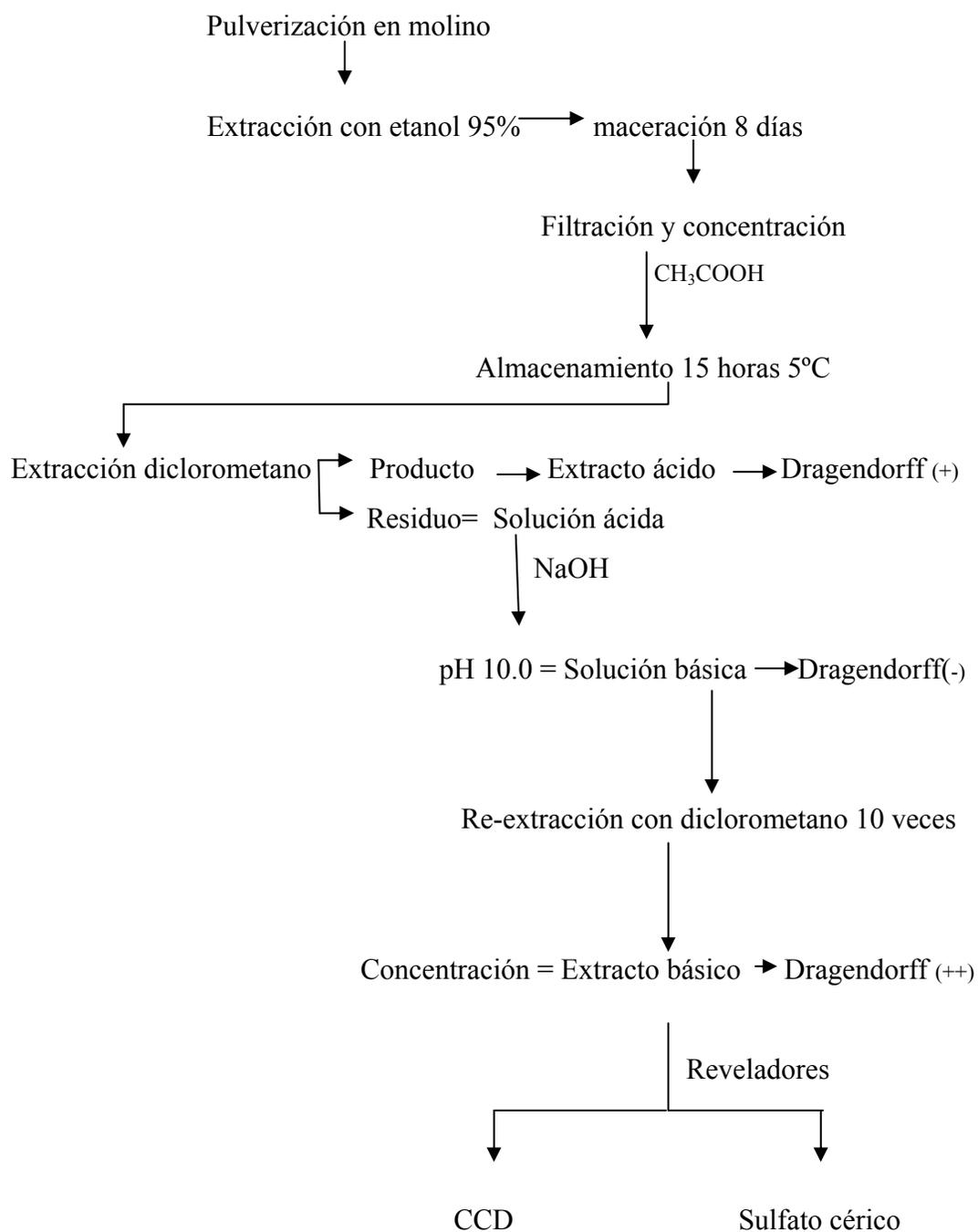


Figura 9. Metodología para la obtención de la mezcla de alcaloides de *E. coronaria*

Macrófagos

Los macrófagos J774, línea originalmente derivada de sarcoma del retículo celular de ratones hembras BALB/c/NIH, establecida por Ralph *et al.* (1975), cuya morfología se asemeja a la de linfocitos y presentan actividad macrofágica (Figura 10), se mantuvieron en medio RPMI 1640 con SFB al 5% (Anexo 11). El pase de estas células se hizo por remoción mecánica mediante policías de goma y adición de medio fresco.

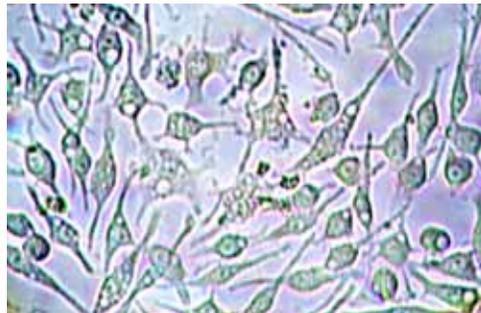


Figura 10. Macrófagos J774 200X

Actividad anti-promastigote

Los promastigotes de *L. braziliensis* fueron sembrados en caja de 24 pozos con medio Schneider enriquecido con SFB 5%, en una concentración de $3,4 \times 10^6$ parásitos por pozo, en presencia de diferentes concentraciones del extracto de alcaloides, el cual se adicionó a los cultivos una sola vez. Las concentraciones usadas fueron: 1.0, 10.0, 20.0, 25.0, 50.0, 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ solubilizadas en dimetilsulfóxido DMSO 41.5%. Las soluciones stock preparadas para los ensayos se pasaron a través de filtro Millipore de 0.22 μm . Al cabo de tres días de incubación a 26°C, se tomó una alícuota de 50 μL de los parásitos en suspensión y se mezcló con la misma cantidad de azul tripán 0.4% p/v (dilución en PBS) dejando 1 minuto para la absorción del colorante por parte de los parásitos no viables (Souza *et al.* 2002). Posteriormente se realizó el conteo en la cámara de Neubauer. El experimento se realizó por triplicado, tomando como control los pozos sin adición de alcaloides. El resultado es expresado como el porcentaje de supervivencia en comparación a los controles.

Actividad anti-amastigote

La monocapa obtenida de macrófagos J774 mantenidos en medio RPMI con SFB 5% se removió mecánicamente mediante policía de goma y se llevó a tubos de centrifuga estériles de 50 mL completando el volumen con solución salina 0.9%, se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos para concentrar las células, las cuales se sembraron en cajas con 24 pozos. Para la infección se hizo un repique de parásitos, tomando una alícuota de 1 mL del tubo de 25 cm² original y adicionando 1 mL de medio Scheneider's fresco. En los días cuatro al siete después del repique, se infectaron los macrófagos debido a que los parásitos se encuentran en su estado infectivo, reconocido por el alargamiento de los promastigotes y la distancia entre el núcleo y cinetoplasto.

Previamente a la siembra de macrófagos, en cada pozo se colocó una laminilla estéril de 12 mm de diámetro Fischer brand microscope cover glass como soporte para la formación de la monocapa. Los macrófagos adheridos fueron infectados con promastigotes de *L. braziliensis* previamente centrifugados en solución salina 0.9% a 2500 rpm durante 10 minutos (Anexo 12). La relación parásito/macrófago fue de 6:1, con una concentración de 10⁶ parásitos/mL. Posteriormente las células infectadas se llevaron a incubación a 37°C durante 4 días colocando sello de parafilm alrededor de la caja para evitar la evaporación del medio de cultivo.

La adición de concentraciones de la mezcla de alcaloides se llevaron a cabo en dos 2 tiempos, según Delorenzi *et al.* (2001):

- A) Una hora después de la infección, y B) la adición de los compuestos una vez al día por 3 días post-infección, sin cambio de medio.

Todo fue realizado en cámara de flujo laminar en el Laboratorio de Entomología, Biología Celular y Genética de la Universidad de la Salle (Figura 11). El control correspondió a los cultivos sin adición de la mezcla de alcaloides, únicamente con las respectivas concentraciones de DMSO. Las concentraciones usadas de ésta fueron las mismas que las utilizadas para evaluar la actividad anti-promastigote.



Figura 11. Cámara de flujo laminar con los materiales necesarios para la adición de alcaloides a macrófagos infectados con parásitos de *L. braziliensis*

El día 4 post-infección, las laminillas fueron extraídas de cada pozo y las células se fijaron con metanol puro y colorearon con Giemsa 10%, se lavaron con agua destilada y se dejaron secar (Anexo 13). A las 24 horas se pegaron las laminillas sobre láminas, previamente limpiadas y desengrasadas, con Entellan. Después de 2 días se llevó a cabo la lectura de láminas en el fotomicroscopio Olympus BX60 en objetivo de inmersión para realizar el conteo de células. El número de amastigotes fue determinado haciendo el conteo de al menos, 300 células (Delorenzi *et al.* 2001) en cultivos por triplicado. Los resultados son expresados como el porcentaje de infección, proporción de infección y porcentaje de supervivencia en comparación con los controles. El porcentaje de infección, y su correspondiente proporción fueron obtenidos con el número de células infectadas/células totales por campo observado. El índice de supervivencia se calculó multiplicando el porcentaje de macrófagos infectados por el número de amastigotes por macrófago infectado.

Los medios de cultivo fueron desechados e inactivados de acuerdo con los protocolos de seguridad y desecho de material biológico y a la ley 430 de 1998 por la cual se dictan normas prohibitivas en materia ambiental, referentes a los desechos peligrosos y se dictan otras disposiciones.

Prueba de viabilidad en macrófagos. Test de exclusión con azul tripán

La monocapa de macrófagos J774 se removió mecánicamente mediante policía de goma y se llevó a tubos de centrifuga estériles de 50 mL completando el volumen con solución salina 0.9%, se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos con el fin de concentrar las células. Se sembraron en cada pozo de 24 pozos 100 μ L de células con medio RPMI (800 μ L), en una concentración de 8×10^4 células/pozo, para realizar la evaluación de viabilidad en los macrófagos sin adición de alcaloides, y con concentraciones de 1, 10, 25, 50 y 100 μ g/mL, en triplicado, los cuales se añadieron 24 horas después de la siembra, tiempo en el cual se llevó a incubación a 37°C para lograr la adherencia de las células a cada pozo. A las 48 horas post-siembra se removió el medio de cultivo y se hizo un lavado con solución salina. Se adicionaron 50 μ L de medio fresco y la misma cantidad de azul tripán 0.4% p/v (dilución en PBS), se llevó a incubación durante 10 minutos a 37°C para posteriormente realizar el conteo de células viables bajo microscopio invertido en objetivo de 20X (Anexo 14). El colorante entra en las células con daños en la membrana, por lo tanto se tiñen aquellas que se consideran no viables.

Se determinó la dosis letal media (DL_{50}) mediante modelo de análisis Probit, y se consideró como un efecto citotóxico marcado cuando se afecta la viabilidad celular por encima de un 10 % .

Variables

En el presente estudio la variable dependiente corresponde al índice que muestra el comportamiento de cada una de las formas del parásito: proporción de la infección e índice de supervivencia para la forma amastigote y porcentaje de supervivencia para la forma promastigote. La variable independiente atañe cada uno de los tratamientos, siendo sus niveles las concentraciones individuales de mezcla de alcaloides evaluadas y la ausencia de ésta: 0, 10, 20, 25, 50 y 100 μ g/mL.

Análisis estadístico

La digitación se hizo en bases de datos construidas en Excel versión 2003; la depuración y el procesamiento de la información en el programa StatGraphics Plus versión 2.0 y en el SPSS versión 12.0.

Para establecer si existen diferencias entre los 6 concentraciones de la mezcla de alcaloides de *Ervatamia coronaria* sobre la forma intracelular (amastigote) y forma extracelular (promastigote) de *Leishmania braziliensis* se evaluó previamente la normalidad de las distribuciones mediante las prueba de Kolomogorov – Smirnov a un nivel de significancia del 1%, donde se rechazó la hipótesis normalidad con un valor de $p > 0.01$ y la homogeneidad de las varianzas con la prueba de Levene, debido a no cumplir con estos supuestos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) no-paramétrica de Kruskall – Wallis (K-W) y posteriormente donde se encontraron diferencias significativas, se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de K-W controlando el nivel de significancia del 5% para las comparaciones entre los grupos, tanto para las proporciones de infección (Anexo 15) como para índices de supervivencia del parásito bajo las formas amastigotas (Anexo 16).

Las mismas pruebas fueron aplicadas sobre los datos de supervivencia del parásito en la forma promastigota (Anexo 17) y viabilidad de las células en el ensayo de citotoxicidad sobre macrófagos (Anexo 18), cuyos resultados tampoco mostraron ser normales.

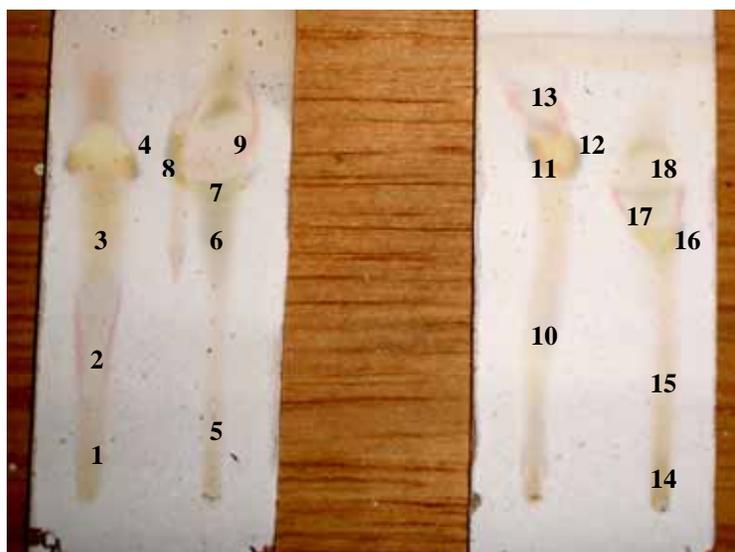
También se calculó la dosis letal media LD₅₀ con los valores obtenidos del ensayo de citotoxicidad (Anexo 19), y la concentración media inhibitoria IC₅₀ de la actividad leishmanicida mediante modelo de análisis Probit (Anexo 20).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Resultados

Obtención de mezcla de alcaloides

La extracción de los alcaloides de *Ervatamia coronaria* se realizó de acuerdo con el protocolo de maceración con etanol 95%. Se obtuvo un total de 0.6278 g de extracto básico y 1.5055 g del extracto ácido. La obtención de la mezcla de alcaloides tuvo un rendimiento de 0.6%: 2.13 g a partir de 364 g de material pulverizado. Aunque la mayor cantidad de material se obtuvo del extracto ácido, la prueba Dragendorff (Anexo 7) y la cromatografía en capa delgada CCD (Anexos 8 y 9) aplicadas a la solución básica, al extracto ácido y al extracto básico fueron determinantes para elegir este último como el material para realizar las pruebas *in vitro* con *L. braziliensis*, debido a la cantidad de alcaloides presentes. La figura 12 muestra los cromatogramas obtenidos con la solución básica y sus respectivos Rf's.



a

b

Figura 12. Cromatogramas obtenidos con revelado de sulfato cérico. **a:** diclorometano: metanol 9:1.

b: acetato de etilo	1 amarillo Rf:0.09	10 amarillo Rf: 0.34
	2 rosado Rf: 0.32	11 amarillo-marrón Rf: 0.74
	3 amarillo Rf: 0.54	12 azul Rf: 0.71
	4 azul Rf: 0.63	13 rosado Rf: 0.487
	5 amarillo Rf: 0.23	14 marrón Rf: 0.08
	6 marrón Rf: 0.54	15 amarillo Rf: 0.37
	7verde Rf: 0.57	16 azul Rf: 0.57
	8 azul Rf: 0.67	17 rosado Rf: 0.63
	9: rosado Rf: 0.74	18: amarillo Rf: 0.74

Las siguientes 6 concentraciones de mezcla de alcaloides fueron las usadas en los ensayos con *L. braziliensis*:

- | | |
|-------------------------------|--------------------------------|
| 1) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 4) 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
| 2) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 5) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
| 3) 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 6) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |

La monocapa de macrófagos J774 se observó diariamente bajo microscopio invertido, evidenciando que en las concentraciones mayores de alcaloides (50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) la morfología de los macrófagos fue más pequeña y redondeada en comparación con los macrófagos del tratamiento con menor concentración (Figura 13). Por tal motivo se realizó posteriormente una prueba de viabilidad, la prueba de tinción vital con azul tripano, cuyos resultados se presentan y discuten más adelante.

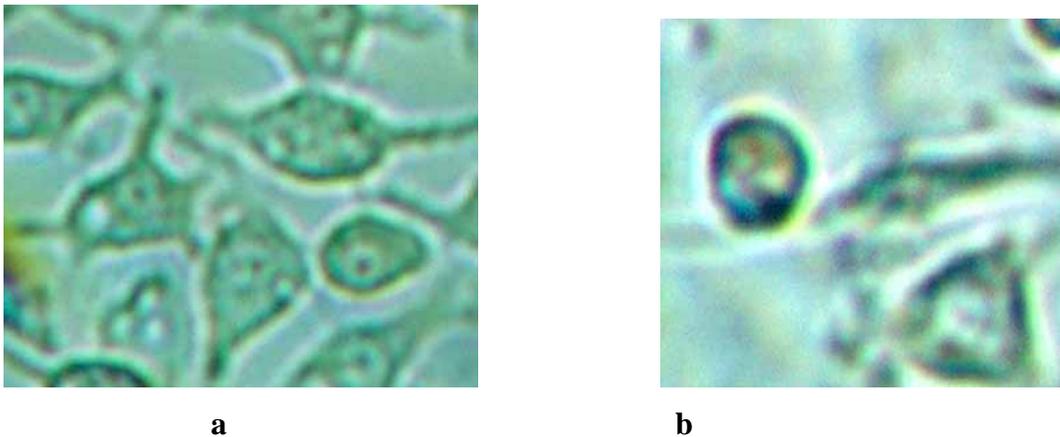


Figura 13. Macrófagos J774 al tercer día post-infección con adición de alcaloides diaria. 200X en microscopio invertido. **a.** Con concentración 2 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de alcaloides **b.** Con concentración 6 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de alcaloides

De otra parte, en cuanto al protocolo de adición de alcaloides una vez al día, durante 3 días, se observó una disminución notable de células, especialmente en la concentración más alta: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En resumen, fue evidente el cambio poblacional y morfológico de los macrófagos J774 con altas concentraciones de alcaloides antes de extraer las laminillas para fijar y colorear.

Comportamiento de la Infección en macrófagos J774. Actividad anti-amastigote

Los dos protocolos temporales de adición de alcaloides: 1 hora de infección y diariamente por 3 días, mostraron diferencias en cuanto a los índices de supervivencia del parásito e infección celular.

Con respecto al protocolo de adición de compuestos alcaloides una hora después de la infección, los resultados fueron consecuentes con las hipótesis planteadas.

Los resultados mostraron una relación inversa entre la concentración de alcaloides y el porcentaje de infección. Las mayores concentraciones indujeron menores índices de infección y viceversa, excepto en la concentración 1 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en la que se observó el menor índice de proporción. A partir de la concentración 2 correspondiente a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, cuyo valor fue el más alto de proporción de la infección, la relación inversa dosis-dependiente fue evidente. Figura 14.

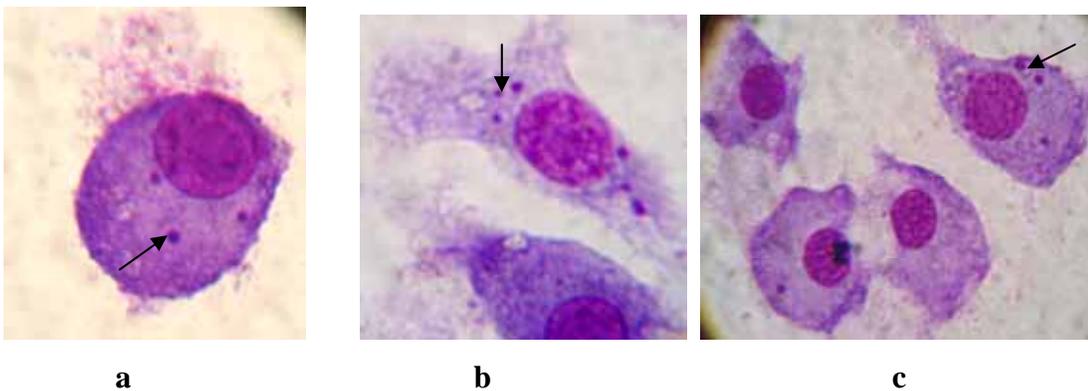


Figura 14. Macrófagos J774 infectados con *L. braziliensis* bajo diferentes concentraciones de alcaloides de *Ervatamia coronaria* 1 hora post-infección. **a.** Concentración 1 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) **b.** Concentración 2 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) **c.** Grupo control (sin alcaloides). 1000X

Estadísticamente se observó una diferencia significativa en la proporción de la infección entre el grupo control y cada uno de los tratamientos (K-W $p < 0.05$), con el mayor valor para el grupo control, que correspondió a 0.30. La figura 15 señala la cantidad de amastigotes por célula en este grupo sin tratamiento.

Al aplicar la prueba de comparaciones múltiples de K-W ($p < 0.05$) se obtuvo que entre las concentraciones 1, 3 y 4 no existieron diferencias significativas al igual que entre la comparación de las concentraciones 2 y 3. El resto de comparaciones entre tratamientos si presentaron diferencias estadísticamente significativas, indicando que entre las concentraciones más altas y las menores existe una diferencia en la actividad leishmanicida. Estos mismos resultados se obtuvieron en el grupo de las concentraciones altas.

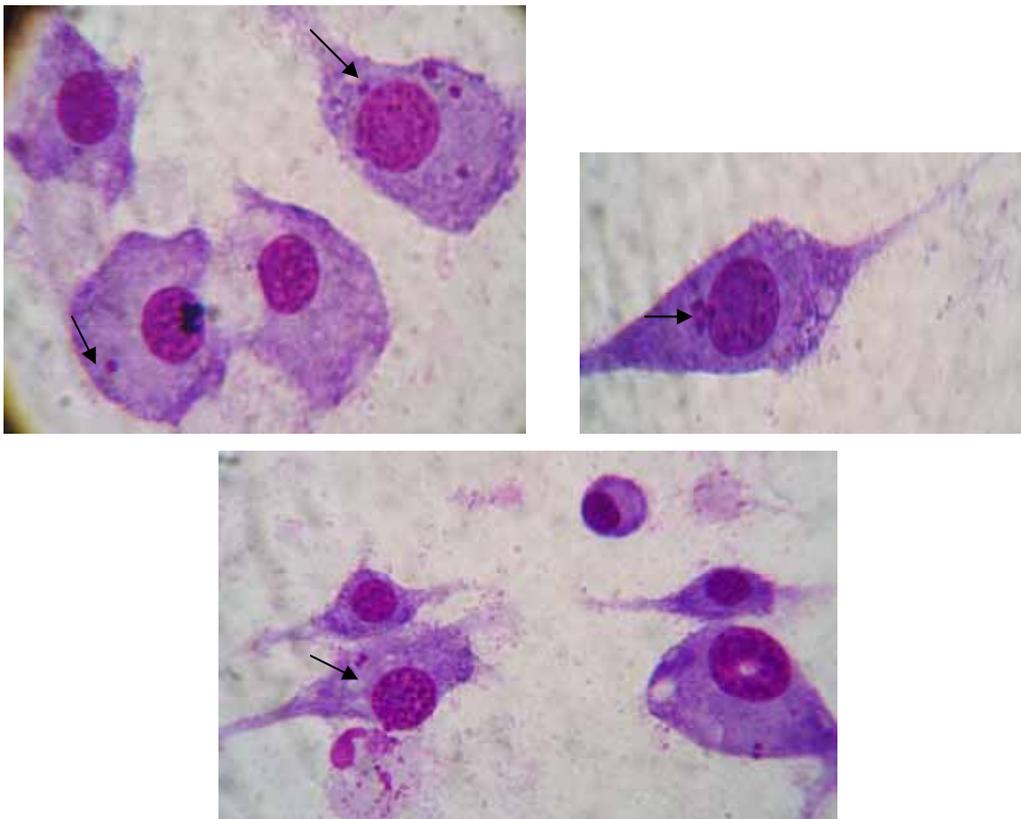


Figura 15. Macrófagos J774 infectados con parásitos de *L. braziliensis*. Grupo control, sin adición de alcaloides. 1000X

En cuanto a la proporción de infección en células tratadas con alcaloides diariamente por 3 días los valores obtenidos fueron similares en todas las concentraciones, excepto en la concentración 4 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), que presentó el valor más bajo, correspondiente a 0.09. En este protocolo, contradictoriamente, el valor más alto de infección se obtuvo con la mayor concentración de alcaloides (Figura 16). Existió

también una diferencia estadísticamente significativa (K-W $p < 0.05$) de cada uno de los tratamientos con el grupo control, al igual que en la prueba de adición de alcaloides 1 hora post-infección.

Al hacer las comparaciones entre los tratamientos se obtuvo que entre las concentraciones 1, 2 y 3 no existieron diferencias significativas, mientras que la concentración 4 (25 $\mu\text{g/mL}$) presentó diferencias con el resto de grupos, con el valor promedio más bajo de proporción de la infección igual a 0.09. En el caso de las concentraciones más altas: 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$, no mostraron diferencias al ser comparadas con las menores concentraciones (1 y 10 $\mu\text{g/mL}$) ya que éstas 4 concentraciones presentaron los valores más altos. Es decir, entre las concentraciones menores no hay diferencias, ni al ser comparadas éstas con las más altas.

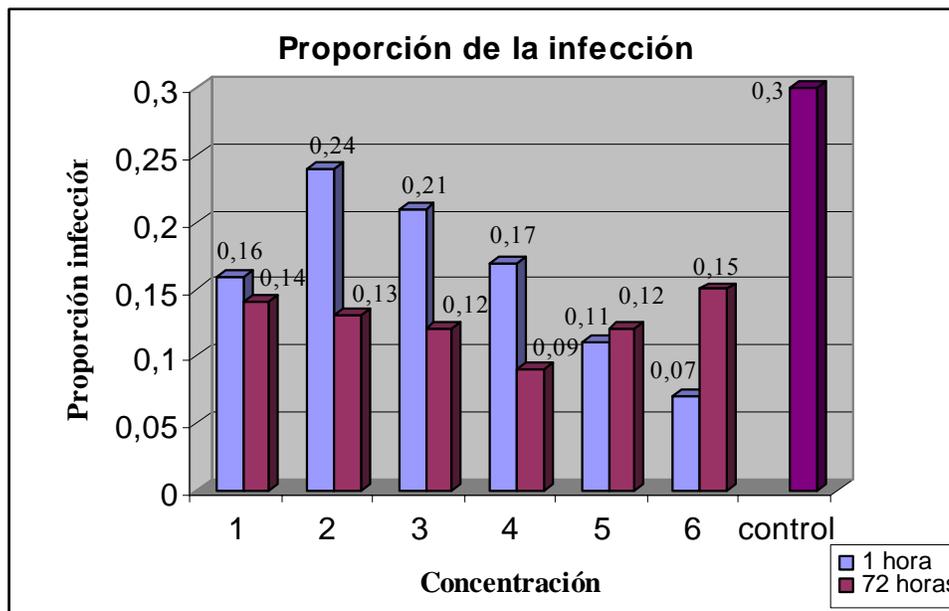


Figura 16. Proporción de Infección de *L. braziliensis* en macrófagos J774 bajo 2 protocolos temporales y 6 concentraciones (1, 10, 20, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$)

En las mayores concentraciones adicionadas a los cultivos, 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de la misma manera que lo observado en el microscopio invertido antes de la fijación y coloración, se distinguió claramente la diferencia en la morfología de los macrófagos y sobre todo la disminución en el número de células (Figura 17).

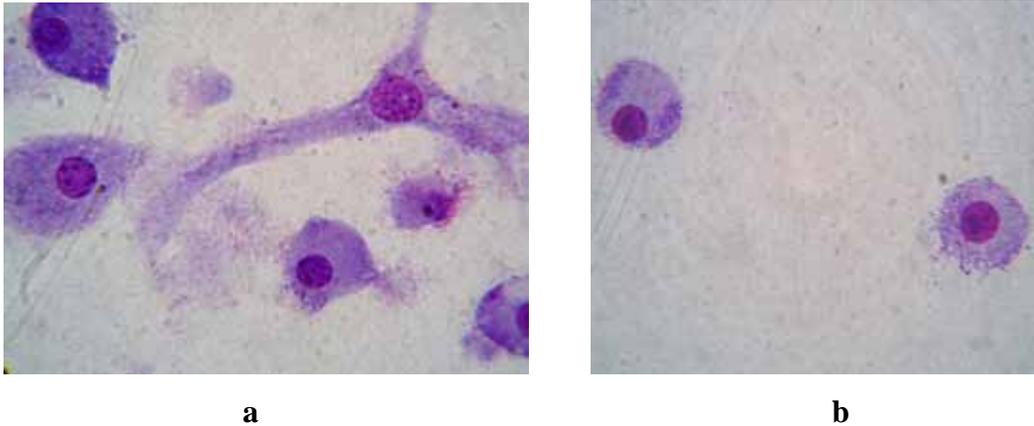


Figura 17. Macrófagos J774 infectados con *L. braziliensis* bajo diferentes concentraciones de alcaloides de *Ervatamia coronaria* durante 3 días **a**. Concentración 2 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) **b**. Concentración 6 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 1000X

En los valores del número promedio de amastigotes por célula se observó una relación inversa frente a la concentración para la mayoría de tratamientos, especialmente al adicionar alcaloides durante 3 días (Figura 18). Sin embargo, la concentración 4 (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de alcaloides adicionados 1 hora post-infección mostró un comportamiento diferente. Su valor fue el mismo que el obtenido en las concentraciones 1 y 2, y mayor comparado con el valor de la concentración 3.

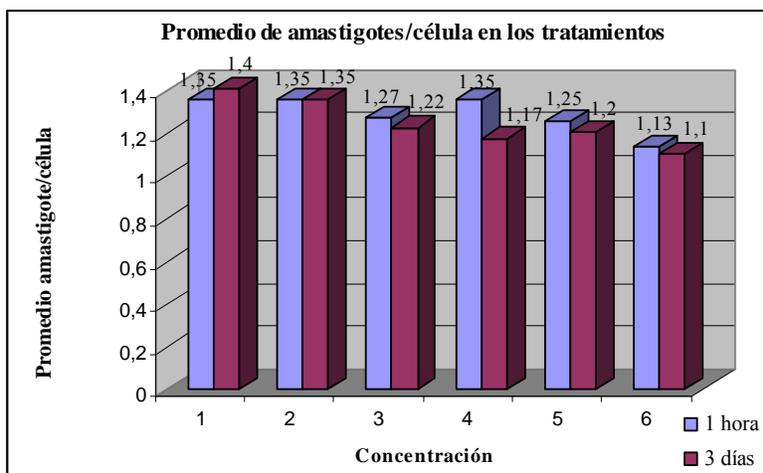


Figura 18. Comparación del promedio de amastigotes por célula en las concentraciones evaluadas bajo los dos protocolos temporales.

Los índices de supervivencia, obtenidos con la multiplicación del porcentaje de infección por el número de amastigotes por macrófago infectado, fueron muy similares a los obtenidos con las proporciones de infección bajo ambos protocolos temporales. Una relación inversa dosis/dependiente, excepto con la concentración 2 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se observó en la adición de alcaloides 1 hora después de la infección, de igual manera al resultado obtenido con la proporción de infección.

El comportamiento de la supervivencia del parásito tratado diariamente por 3 días con la mezcla de alcaloides, en cambio, si mostró varias diferencias importantes comparado con la proporción de la infección. En el índice de supervivencia no se hallaron diferencias entre las concentraciones 3 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 6 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ni tampoco 5 (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 6 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), contrario a lo sucedido con los índices de proporción de infección. De otra parte, el índice de supervivencia mostró diferencias estadísticamente significativas en tratamientos que no mostraban este mismo comportamiento en las proporciones; es el caso de las concentraciones 1 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y, 10 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esto indica que entre las concentraciones más bajas existen diferencias en la supervivencia de *Leishmania*, a diferencia de las más altas, y al comparar mayores y menores se observaron diferencias entre las concentraciones

de 1 y 50 $\mu\text{g/mL}$ (a diferencia de la proporción), pero no entre 1 y 100 $\mu\text{g/mL}$. De esta manera, el índice de supervivencia refleja el mismo resultado que la proporción de la infección para las concentraciones 3, 4 y 5, correspondientes a 20, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, que corresponden a los menores valores; mientras que en el análisis de supervivencia el mayor valor lo presenta la concentración 1 (1 $\mu\text{g/mL}$), seguido de 2 (10 $\mu\text{g/mL}$) y 6 (100 $\mu\text{g/mL}$), entre los cuales no se obtuvieron diferencias significativas (Tabla 1).

Es necesario señalar que este análisis también mostró una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y cada uno de los tratamientos mediante una prueba de Kruskal-wallis 95% de nivel de confianza.

Tabla 1. Índices de supervivencia en ambos protocolos temporales de adición de alcaloides con 6 concentraciones

Tratamiento	1 hora post-infección	Diariamente por 3 días
1 $\mu\text{g/mL}$	21.54	20.26
10 $\mu\text{g/mL}$	32.4	17
20 $\mu\text{g/mL}$	26.75	14.87
25 $\mu\text{g/mL}$	22.93	10.68
50 $\mu\text{g/mL}$	13.81	14.15
100 $\mu\text{g/mL}$	8.80	16.38
Control	45.3	

La IC_{50} que se obtuvo mediante análisis Probit fue de 2.6 $\mu\text{g/mL}$ para el tratamiento 1 hora post-infección, y de 12.4 $\mu\text{g/mL}$ en la adición de mezcla de alcaloides durante 3 días.

Al comparar los dos protocolos temporales evaluados (1 hora y diariamente durante 3 días post-infección) de adición de alcaloides se observó, en general, que la

supervivencia del parásito disminuye de acuerdo al aumento en la concentración, excepto en las mayores concentraciones de la adición de compuestos durante 3 días. Sin embargo, la diferencia entre ambos protocolos es evidente, ya que la adición diaria por 3 días mostró valores menores de supervivencia del parásito. Un 47.2% y 44.4% de supervivencia del amastigote se obtuvieron en la menor concentración, 1 µg/mL, al adicionar los alcaloides 1 hora post- infección y durante 3 días, respectivamente. A la mayor concentración, 100 µg/mL, fue de 19.3 y 36% en los mismos protocolos (Figura 19).

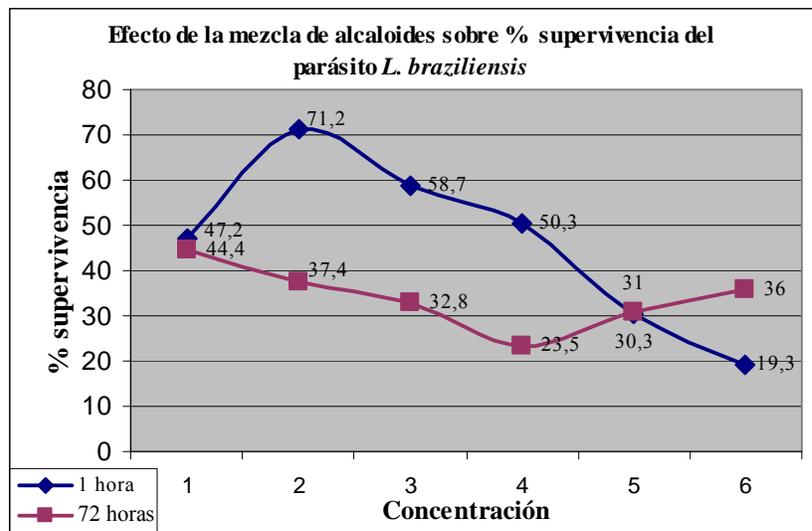


Figura 19. Supervivencia (%) de *L. braziliensis* en forma amastigota en los dos tiempos de adición de alcaloides de *E. coronaria*

Actividad anti-promastigote

Los resultados de esta prueba mostraron una clara relación entre la concentración y el porcentaje de supervivencia del parásito, de modo que los parásitos sometidos a la concentración más baja de mezcla de alcaloides (1 µg/mL) presentaron un porcentaje de supervivencia cercano al 100% en contraste con la concentración más alta evaluada (100 µg/mL) cuyo porcentaje fue de cero (Figura 20). Existe un efecto dosis-dependiente de los alcaloides sobre el parásito y una actividad leishmanicida de los mismos.

Mediante la prueba de comparaciones Kruskal-Wallis ($p < 0.05$) se concluyó que no existe diferencia significativa entre el grupo control y la concentración 1, contrario al resto de concentraciones evaluadas.

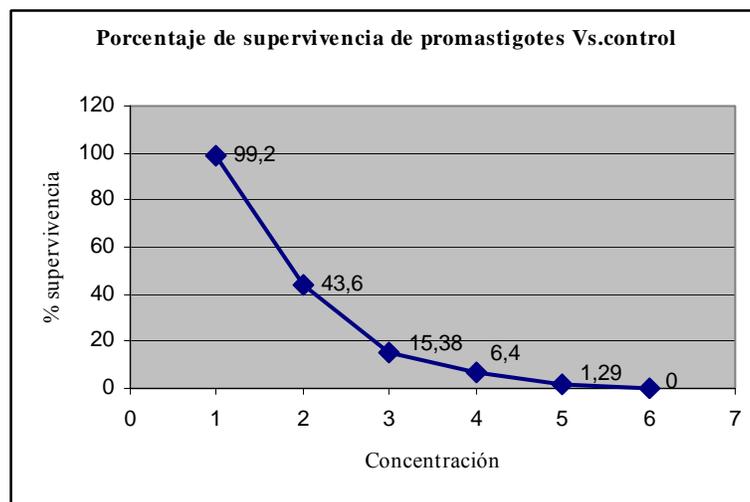


Figura 20. Supervivencia de la forma promastigota de *L. braziliensis* en las diferentes concentraciones de mezcla de alcaloides de *E. coronaria*

Ensayo de citotoxicidad en macrófagos J774

En los macrófagos J774, al igual que lo obtenido con las formas promastigotes del parásito, el porcentaje de supervivencia evidenció una relación inversa dosis-dependiente. Todos los porcentajes de supervivencia correspondieron a valores altos, aún para las más altas concentraciones (50 y 100 $\mu\text{g/mL}$) para las cuales la viabilidad de los macrófagos sometidos a estos tratamientos fue del 61 y 54%, respectivamente.

Al comparar estadísticamente los tratamientos, existieron diferencias significativas entre el tratamiento control y las 2 concentraciones más altas (50 y 100 $\mu\text{g/mL}$). La concentración 1 (1 $\mu\text{g/mL}$) presentó diferencias con las demás concentraciones, excepto con la 2 (10 $\mu\text{g/mL}$), mientras que entre las concentraciones 20, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ no se observaron diferencias. En resumen, las 2 concentraciones más bajas mostraron ser sustancialmente diferentes del resto.

Considerando como un efecto citotóxico marcado, la disminución en la viabilidad celular por encima de un 10 %, el ensayo de viabilidad mostró que la mezcla de alcaloides no es tóxica para macrófagos J774 (figura 21), fenómeno que se corroboró con la obtención de DL₅₀/24h obtenida mediante Probit, cuyo valor fue de 233.52 µg/mL (Anexo 19).

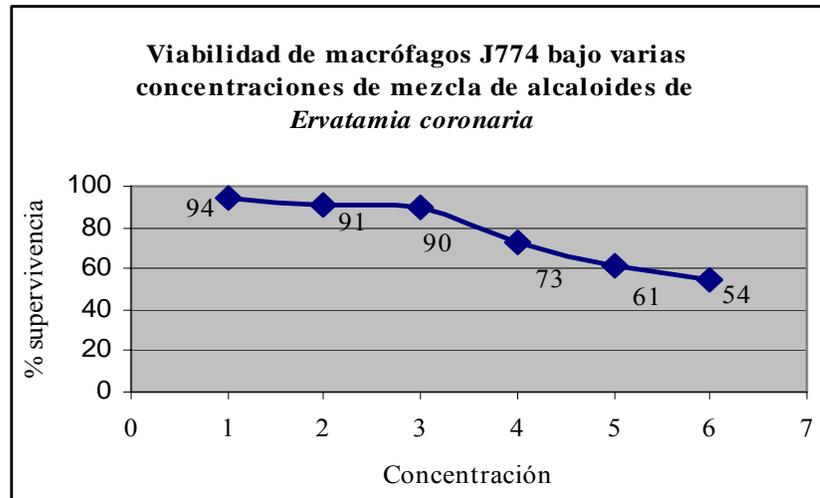


Figura 21. Supervivencia (%) de macrófagos J774 bajo las diferentes concentraciones de mezcla de alcaloides de *E. coronaria*.

En las figuras 22a y 22b se muestra la cantidad de células teñidas con el colorante (no viables) correspondiente a los macrófagos J774 tratados con 100 µg/mL en comparación con el grupo control, que presentó una viabilidad de cerca del 100%.

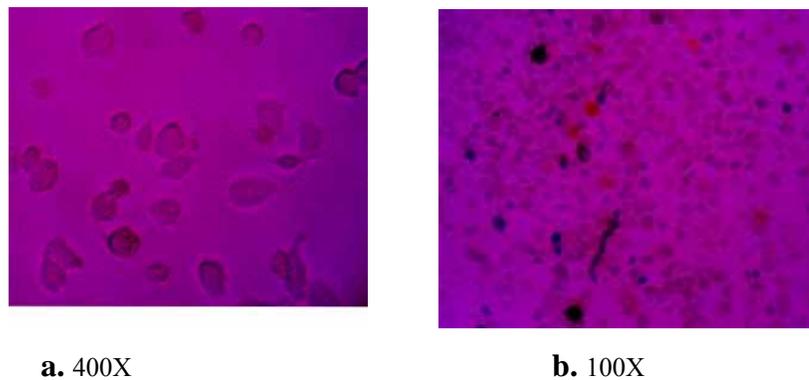


Figura 22. Macrófagos J774 sin (a) y con 100 µg/mL de mezcla de alcaloides de *Ervatamia coronaria* (b) bajo ensayo de viabilidad celular con azul tripán.

7.2 Discusión de resultados

Obtención de mezcla de alcaloides

En trabajos similares, y con muestras botánicas aún menores en peso fresco y seco a la del presente estudio, se ha obtenido mayor cantidad de extracto de alcaloides (Piloto *et al.* 2004, Ferreira *et al.* 2002; Sáez *et al.* 1997) lo cual puede explicarse en el hecho de que este metabolito secundario se encuentra, en esta especie, acumulado mayoritariamente en los tallos y corteza y en el presente trabajo se obtuvo principalmente de hojas. Por otra parte, comparando la metodología de los otros autores con la aquí empleada, la eficiencia en la extracción se ve influenciada por la utilización de procedimientos que evitan la pérdida del material, como la filtración al vacío.

Por medio de luz U.V. y CCD se observaron los cromatogramas correspondientes a compuestos de alta polaridad y de colores referentes a compuestos tipo alcaloides (Anexos 8-9 y Figura 12), que se reportan en cromatografías de alcaloides, y al igual que el presente estudio utilizan como revelador agentes cromogénicos, como el sulfato cérico, que incrementa la exactitud de la identificación (Domínguez 1973). Cromatogramas similares han sido obtenidos en trabajos de aislamiento de alcaloides indólicos de *Tabernaemontana coronaria*, con tonos rosados y violetas en el revelado de CCD con sulfato cérico (Márquez 1999), y Rf's similares a los obtenidos en el presente estudio: 0.08-0.74 (Domínguez 1973).

La familia botánica a la cual pertenece la especie *Ervatamia coronaria* se caracteriza por presentar gran cantidad de alcaloides tipo indólico derivados del triptófano y la triptamina. Los alcaloides de esta planta han sido ya descritos y aislados durante años. Gorman *et al.* (1960) fueron los primeros en aislar y caracterizar la coronaridina, uno de los principales alcaloides indólicos en esta especie, del cual se ha descrito una importante actividad leishmanicida contra *L. amazonensis* (Delorenzi *et al.* 2001; Delorenzi *et al.* 2002). Dentro de la fitoquímica de esta especie se encuentran otros tipos de alcaloides: Heyneanina, voacristina, voacamina, descarbometoxivoacamina,

19,20 dihidroervahanina (Henriques *et al.* 1995) y, recientemente (3*S*)-3-cyanocoronaridina, (3*S*)-3-cyanoisovoacangina, conolobina A, conolobina B, conolidina y (3*R*/3*S*)-3-ethoxyvoacangina (Kam *et al.* 2003), los cuales la mayoría, probablemente, se encuentran en la mezcla obtenida para este trabajo. De la fracción alcaloidea del tronco de esta especie se ha evaluado su actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (Guida *et al.* 2003).

Actividad leishmanicida

En este trabajo se describe por primera vez la actividad leishmanicida de la mezcla de alcaloides de *Ervatamia coronaria* sobre las dos formas del parásito *L. braziliensis*.

Aunque no se han reportado estudios sobre el efecto de los alcaloides de esta planta sobre esta especie de parásito, otras si han sido evaluadas, incluso de la misma familia, Apocynaceae. Estudios fitofarmacológicos con plantas medicinales, particularmente con alcaloides sobre varias especies de *Leishmania* han mostrado tener actividad contra el parásito en una concentración de 100 µg/mL, dentro de las cuales se incluyen *L. braziliensis*, *L. donovani* y *L. amazonensis*. En la mayoría de estos estudios se ha trabajado con fracciones puntuales de algún disolvente (cloroformo, etanol, metanol, diclorometano, fracción acuosa) o alcaloides específicos ya aislados, mientras que en el presente estudio se trabajó con la mezcla completa de alcaloides obtenidos. Dentro de los alcaloides que han sido aislados a partir de esta especie están la coronaridina y la gabunina, que se han evaluado *in vivo* o *in vitro* contra parásitos de *Leishmania*. De la coronaridina, Delorenzi *et al.* (2001) demostraron una actividad antipromastigote significativa, del 97% en una concentración de 12 µg/mL contra *L. amazonensis*. La gabunina también mostró un efecto inhibitor frente a promastigotes y amastigotes de *L. amazonensis* y *L. braziliensis* (Muñoz *et al.* 1994) bajo condiciones *in vitro*, de 75% bajo la misma concentración, sin embargo *in vivo* este metabolito no mostró ninguna actividad.

De otro lado, el extracto de alcaloides de tallo de *Zanthoxylum chiloperone* sobre *L. braziliensis* mostró una inhibición del crecimiento del parásito a 100µg/mL (Ferreira *et al.* 2002).

Con especies de la misma familia, Apocyanaceae, la inhibición de supervivencia del parásito en forma amastigota ha mostrado también dependencia de la concentración; de este modo, extracto de *Himatanthus sucuuba* inhibió la supervivencia en 45.5% a 10 µg/mL, mientras que a 100 µg/mL fue de 76% (Freire de Lima *et al.* 2000). Comparando estos porcentajes con el presente estudio se observa que la mezcla de *Ervatamia coronaria* presentó mejor eficacia, con inhibición de 67.6% a 10 µg/mL 1 hora post-infección y de 83% en el tratamiento durante 3 días en la misma concentración.

Estas diferencias en la eficacia de los alcaloides han sido frecuentes, aún sobre el mismo parásito. Por ejemplo, la criptolepina obtenida de *Cryptolepis sanguinolenta* mostró efectos variables sobre *Plasmodium vinckei petteri*: desde moderados (34-46%) (Kirby *et al.* 1995) hasta altamente eficaces (80%) en el control del parásito (Grellier *et al.* 1996). Las razones para este tipo de diferencias aún no se conocen y es evidente la necesidad de resolver este vacío. Sin embargo se atribuye a que probablemente, existe una sensibilidad innata del parásito ante estos compuestos.

Aunque no se conoce el mecanismo de acción leishmanicida de este tipo de alcaloides indólicos (Staerk *et al.* 2000), es claro que está relacionado con su estructura química y en especial, con la longitud del grupo de sustitución, es decir, el número de átomos de carbono sobre el grupo basal (como el quinoleico). Por ejemplo, las quinolinas más activas son aquellas con una ramificación de 3 átomos de carbono y un enlace insaturado tipo alquenil (Guillaume 2004). Es muy probable que la estructura de otros tipos de alcaloides indólicos no estudiados, como el caso de los presentes en *Ervatamia coronaria*, influya de manera notable en la actividad de los parásitos. Sin

embargo, hasta el momento no se ha analizado de forma concreta la relación entre la estructura de estos compuestos y su actividad antiparasitaria.

Recientemente han surgido inferencias a partir del análisis de la estructura de los alcaloides y su actividad leishmanicida. Del Rayo *et al.* (2002) han establecido que el estado de oxidación y la naturaleza de sustitución de los átomos del nitrógeno son aspectos importantes para la actividad leishmanicida y que determinan la bioactividad del alcaloide. Así, por ejemplo, la trigilletimina, que tiene un N-2'aromático posee mayor actividad comparado con la isotrilobina, cuyo correspondiente anillo D-saturado con un análogo N-2' metilado. La cuaternización de uno o más átomos de nitrógeno ocasiona la pérdida de actividad leishmanicida. La suma de un grupo fenólico hidroxilo puede aumentar la actividad, al igual que diferencias en la estequiometría. Staerk *et al.* (2000) sugieren que la estructura relativamente planar tetracíclica confiere actividad antiparasitaria. Los alcaloides de la especie *Ervatamia coronaria* son de tipo indólico y bisindólico, los cuales carecen de cuaternización en su nitrógeno del grupo indólico y presentan la estructura relativamente planar debido a los dobles enlaces presentes. Por otro lado, Keawpradub *et al.* (1999) afirman que los alcaloides bisindólicos son mucho más potentes contra parásitos de *Leishmania* que los alcaloides indólicos monoméricos, lo que corrobora la mayor actividad leishmanicida del nitrógeno no cuaternizado, al presentarse dos veces en el caso de los alcaloides bisindólicos, como la 19,20-dihydroervahanina y la conofilina (Figura 7).

Además de las diferencias en cuanto a eficacia de un compuesto en particular, es interesante resaltar que éstas existen también al comparar evaluaciones de un extracto o mezcla de alcaloides y un compuesto aislado. En general, se observa una actividad leishmanicida mayor en el extracto que en el compuesto particular. En el trabajo de Delorenzi *et al.* (2001) se obtuvo para la forma promastigota, una inhibición de la supervivencia del parásito del 97% con la adición de 12.5 µg/mL de coronaridina, mientras que la fracción de cloroformo a la misma concentración

inhibió el 65% del crecimiento. De otra parte, se observó en la forma amastigota inhibición del 82 y 98% con 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la fracción de cloroformo, respectivamente, contra 40% por parte de la coronaridina. Sin embargo, al ser comparados los valores IC_{50} de ambos compuestos, la fracción de cloroformo es de 4 a 5 veces más eficiente sobre los parásitos tratados 1 vez o 3 veces. Estas diferencias pueden ser explicadas gracias a que en la fracción de cloroformo existen otros compuestos, que seguramente presentan un efecto sinérgico; mientras que la coronaridina, aunque logre controlar el parásito, evidentemente no es el único elemento en el extracto que juega un papel en este proceso. En este trabajo se muestra claramente este aspecto, debido a que el tratamiento evaluado correspondió a la mezcla de alcaloides de la planta, la cual presenta diversos tipos de alcaloides y componentes. En la forma promastigota, a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se inhibió la supervivencia del parásito en un 84.6% y en la forma amastigota la inhibición fue del 73.3% y 85.1% al adicionar la mezcla de alcaloides 1 hora post-infección y diariamente por 3 días, respectivamente.

Los índices de infección y supervivencia muestran una relación inversa dosis-dependiente entre concentración y comportamiento del parásito, de manera que aumenta el porcentaje y proporción de infección, en el caso de amastigotes, y disminuye el de porcentaje de supervivencia de las formas promastigotes. El número de amastigotes totales en las concentraciones evaluadas refleja claramente la tendencia, ya que al aumentar la concentración de la mezcla de alcaloides, el número de amastigotes es cada vez menor. Los casos en que se rompe esta tendencia son los correspondientes a la forma amastigote, bajo la concentración 2 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de la adición de alcaloides 1 hora post-infección, y las concentraciones más altas, 5 y 6, (50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de adición diaria durante 3 días.

En el caso de la concentración 2 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), que mostró una proporción de infección de 0.24 frente a 0.16 de la concentración 1 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) -estadísticamente diferentes KW $p < 0.05$ - el elevado valor de infección puede explicarse en la amplia variabilidad

que mostraron los datos tomados, como lo registra el box-plot del anexo 15. De modo que los valores extremos aumentaron el índice de proporción de la infección y así mismo el de supervivencia; estos datos marcaron una diferencia con los correspondientes a la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cuyo valor de proporción de infección y supervivencia del parásito fueron mucho menores comparados con los respectivos para 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esto explica la ruptura de la tendencia en la respuesta dosis dependiente de la infección ante la mezcla de alcaloides en la menor concentración.

Los valores de concentración media inhibitoria IC_{50} indican la actividad de la sustancia sobre el parásito. El resultado de este estudio, para el tratamiento 1 hora post-infección fue de 2.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y de 12.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en la adición de mezcla de alcaloides durante 3 días. Comparando estos valores con los obtenidos por otros autores se observa que, generalmente, alcaloides aislados presentan una mayor actividad frente a la mezcla completa.

Del Rayo *et al.* (2002) obtuvieron un valor de IC_{50} correspondiente a 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre promastigotes de *L. donovani*, y el alcaloide fangchinolina mostró una actividad más eficiente con un valor de 0.39 μM , siendo más potente que la droga comercial Pentamidina, cuyo valor corresponde a 0.4 μM . En cuanto a alcaloides indólicos, que son el tipo de alcaloides de *Ervatamia coronaria*, han mostrado valores sobre *L. major* desde 23.8 μM en el caso de α -yohimbina, hasta 0.57 μM de ajmalicina (Staerk *et al.* 2000).

En el caso de los alcaloides indólicos villalstonina y macrocarpamina se observó una actividad importante frente a *Plasmodium falciparum*, con valores de IC_{50} de 0.27 y 0.36 μM , respectivamente (Keawpradub *et al.* 1999). Waechter *et al.* (1999) evaluaron alcaloides de *Unonopsis buchtienni* sobre *L. major* y *L. donovani* con IC_{100} de 3.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y Muhammad *et al.* (2003) obtuvieron IC_{50} para el alcaloide cephaelina y emetina (de *Psychotria klugii*) con un valor de 0.03 μM sobre *L.*

donovani, aunque la emetina fue 12 veces más tóxico que la cephaelina sobre la línea celular VERO. Alcaloides del género *Guatteria* han mostrado valores entre 0.03-1.0 μM de IC_{50} contra *L. panamensis* y *L. mexicana* (Montenegro *et al.* 2003).

A pesar del reporte de actividad leishmanicida de otros alcaloides a bajas dosis, es interesante resaltar la similitud de nuestros resultados con los de otros autores. Kam *et al.* (1999) evaluaron la actividad de 15 alcaloides de *Kopsia griffithii* sobre *L. donovani*, de los cuales sólo 3 mostraron ser efectivos: harmane, pleiocarpina y buchtienina, con IC_{50} de 6.25 a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Aunque esta especie pertenece a la familia Apocynaceae, la mayoría de alcaloides son de tipo corinanteina y eurbano, no indólicos. Delorenzi *et al.* (2001) obtuvieron de la fracción de cloroformo sobre *L. amazonensis*, en tratamiento 1 hora post-infección, un valor de 2.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$; el mismo valor obtenido en este trabajo, a partir de una planta de la misma familia de *E. coronaria* (*Peschiera australis*), que presenta el mismo tipo de alcaloides. Aunque su tratamiento durante 3 días mostró un valor menor (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), la explicación probablemente sea la misma que para el alto índice de infección bajo las mayores concentraciones en nuestro experimento, es decir, debido a disminución en el número de células.

Por otra parte, es interesante señalar la IC_{50} de drogas y compuestos utilizados en el tratamiento de la enfermedad, que han sido evaluados en macrófagos de ratón BALB/c sobre *L. infantum*. Para el caso de Stiboglucanato y Allopurinol es de 5.6 y 8.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente, que son valores más altos a los obtenidos en el presente estudio bajo 1 hora de tratamiento. En el caso de Pentamidinas, Ketoconazol y trifluralin corresponden a valores por encima de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Marshall *et al.* 1994), que son mayores a lo obtenido en los dos protocolos temporales del presente trabajo.

La Amphotericina B y Pentostam, los fármacos más comúnmente usados, presentan IC_{50} de 0.028-0.29 y 0.130-0.260 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Kayser *et al.* 2003), respectivamente. Sin embargo, hay que tener en cuenta el grado de toxicidad que presentan.

El alcaloide 8-aminoquinoline, WR242511, mostró una importante inhibición sobre el crecimiento de *L. mexicana* con IC_{50} de 2.5 μ M. Los autores Liu y Nolan (1996) estudiaron el modo de acción de este compuesto sobre el material genético del parásito, sugiriendo un mecanismo mediante inhibición de síntesis de DNA, inicialmente, lo que conlleva a bajas tasas de síntesis de RNA y así mismo la de proteínas. Otro efecto fue la inhibición de síntesis de ácidos grasos, que se observó después de 2 horas de exposición al compuesto. Mecanismos similares pueden estar ocurriendo bajo la mezcla de alcaloides de *Ervatamia coronaria* sobre el parásito *Leishmania braziliensis*.

Los datos obtenidos del promedio de número de amastigotes versus concentración mostraron que hay una relación inversa entre las dos variables, aunque hay algunos tratamientos en los que se rompe esta tendencia, y no son los mismos casos de la proporción de infección o del índice de supervivencia. La concentración 3 (20 μ g/mL) de la adición de alcaloides después 1 hora de infección muestra el menor valor de este protocolo, y el correspondiente a la concentración 2 (10 μ g/mL) es el mismo que para la mayoría de concentraciones: 1, 2 y 4, correspondientes a 1, 10 y 25 μ g/mL, lo que resulta contradictorio si se tiene en cuenta que bajo este tratamiento se obtuvo el mayor índice de supervivencia del parásito y la mayor proporción de infección. Sin embargo, se debe resaltar que debido a que no se tienen en cuenta el total de células infectadas no es posible comparar los valores y es por esta razón que se obtienen discrepancias. A pesar de ello, y de que en los trabajos similares al presente no se tenga en cuenta este dato, es válido su análisis ya que refleja que el número de amastigotes por célula está siendo también afectado por el tratamiento aplicado, en este caso disminuye el valor de acuerdo con una mayor concentración de mezcla de alcaloides.

Lo referente a las altas proporciones de infección que se mantuvieron en las mayores concentraciones evaluadas durante 3 días, pueden ser explicadas con base en la población celular que es esencial en el cálculo de los índices de porcentaje y

proporción de la infección. Se sugiere que estas concentraciones afectan directamente al macrófago y a su ciclo de división celular, por lo que se presentó un número más reducido de células, de las cuales algunas presentaron infección y los índices de infección se vieron aumentados con respecto a las demás concentraciones. En el caso de este mismo tratamiento, 1 hora post-infección, el número celular no se vio igualmente afectado puesto que se adicionó el compuesto sólo una vez, de manera que las células no se encontraban igualmente afectadas en comparación con la adición de la altas concentraciones durante 3 días (Figura 23).

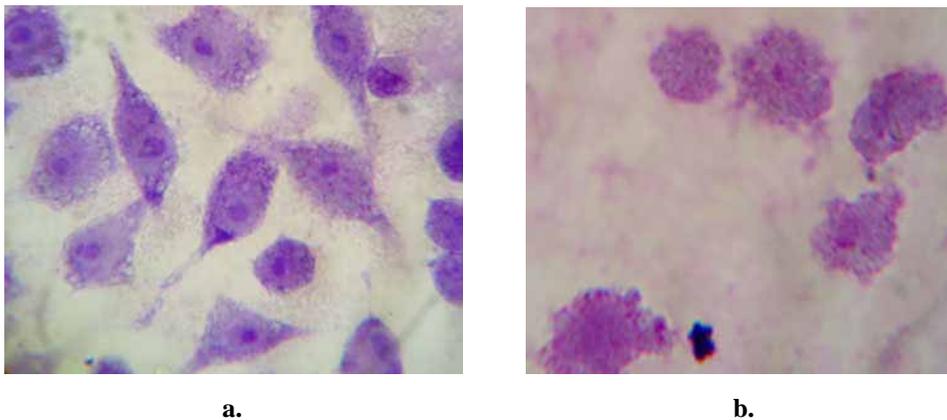


Figura 23. Diferencia en el número de células macrofágicas J774 tratadas con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de mezcla de alcaloides de *E. coronaria* **a.** 1 hora post-infección **b.** diariamente por 3 días. 1000X

El número promedio de amastigotes por célula reflejó una tendencia similar a la de los índices de infección en ambos tiempos de la adición de la mezcla de alcaloides. La relación inversa entre concentración y número de amastigotes por célula es evidente en el tratamiento de adición diaria por 3 días. Sin embargo, la concentración correspondiente a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ adicionada 1 hora post-infección mostró un valor elevado comparada con la concentración 3 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y es el mismo que las concentraciones 1 y 2 (1 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La diferencia de esta estimación con las mostradas por las pruebas estadísticas, radica en que éstas últimas fueron obtenidas a partir de las proporciones de infección, que involucra tanto los amastigotes como el número total de células en el campo observado. Así, entre esta concentración, la 1 y la 3 no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto a infección,

mientras que con la concentración 2 si las hay, debido probablemente a la gran variabilidad en los datos de ésta última, que incluyen datos extremos como se mencionó anteriormente.

En el ensayo con promastigotes, se obtuvo una importante inhibición sobre el parásito, de 84.6% a 20 µg/mL y a 100 µg/mL del 100%. Estadísticamente no existió diferencia entre el tratamiento con 1 µg/mL de alcaloides y el control, por lo tanto, bajo esta concentración no existe actividad leishmanicida, la cual si se presenta a partir de la concentración de 10 µg/mL que a pesar de ser baja, en comparación con otros trabajos en los cuales se reporta actividad leishmanicida es significativamente mayor. El extracto de alcaloides de *Unonopsis buchtienii* (Annonaceae) presenta actividad *in vitro* contra promastigotes de *L. braziliensis*, *L. donovani* y *L. amazonensis* a una concentración de 25 µg/mL, aunque otros autores reportan actividad a concentraciones menores. Staerk *et al.* (2000) muestran actividad de alcaloides bisindólicos de *Corynanthe pachyceras* a 3 µM, Del Rayo *et al.* (2002) trabajaron con varios alcaloides bisbenzylisoquinólicos de *Triclisia patens* sobre *L. donovani*, de los cuales más de 14 mostraron actividad contra el parásito en concentraciones menores a 10 µM.

La mayoría de trabajos con alcaloides muestran una importante actividad contra parásitos en forma promastigote del género *Leishmania*. Uno de los más recientes, y pioneros en esto es el realizado por Fournet *et al.* (1988), en el que mostraron la actividad de 14 alcaloides isoquinolínicos extraídos de las familias Annonaceae, Menispermaceae, Berberidaceae y Hernandiaceae.

Los porcentajes de inhibición del parásito *L. braziliensis* en la forma promastigote son parecidos con la actividad de algunos alcaloides aislados, aunque otros muestren menor actividad. Se observaron similitudes con la dafnandrina, obaberina, berbamina, entre otros, cuyos porcentajes de inhibición a 50 µg/mL fueron muy cercanos al 100% (Fournet *et al.* 1988). En el caso del presente trabajo la inhibición fue evidente

y significativa ya que se trató de la mezcla de alcaloides, y no de la evaluación de éstos de manera aislada, donde un alcaloide en particular puede presentar mayor o menor actividad que otro. En el caso de la fracción de cloroformo de la Apocinácea, *Peschiera australis*, evaluada por Delorenzi *et al.* (2002), a 25 µg/mL se inhibió totalmente el crecimiento de *L. amazonensis* en la forma promastigote y en el presente trabajo, bajo la misma concentración, la inhibición fue de 93.6%. Sin embargo, en la forma amastigota estos autores obtuvieron a 20 µg/mL inhibición del 98%, mientras que el mayor valor en el presente estudio fue de 73.3%, correspondiente a la adición de alcaloides 1 hora post-infección. Valores de control del parásito a concentraciones muy bajas se han reportado recientemente (González *et al.* 2005), en la evaluación de derivados de alcaloides sobre promastigotes de *L. infantum*, cuyo tratamiento a 5 µg/mL reduce en un 80% la capacidad de infección del parásito.

Alcaloides de origen invertebrado, como los provenientes de esponjas marinas, ejercen de igual manera un efecto antiproliferativo dosis-dependiente sobre promastigotes de la especie *L. mexicana*, con una inhiición del 50% en dosis de 10 µg/mL. En este mismo estudio se analizaron cambios morfológicos en los parásitos, obteniendo incremento en el volumen celular asociado con daños en el contenido celular y la destrucción de organelos, así como separación de la membrana y el flagelo y vacuolización progresiva, aún en la concentración más baja, que corresponde a 4 µg/mL (Marchán *et al.* 2000). De otro lado, la berberina, alcaloide ampliamente estudiado, inhibe la incorporación de adenina, uracilo y timidina a los ácidos nucleicos, y de leucina a las proteínas de los amastigotes de *L. donovani*, mientras que sobre los promastigotes se ha encontrado que sólo interactúan con el ADN (Ghosh *et al.* 1985). Lo anterior muestra que los compuestos tipo alcaloide ejercen un efecto inhibitorio sobre los parásitos, asociados a profundos cambios ultraestructurales, o bien sobre la biosíntesis de macromoléculas, fenómenos que probablemente se producen también con la mezcla de alcaloides de *Ervatamia coronaria* sobre *L. braziliensis*.

Al comparar la supervivencia en la forma promastigota y amastigota se observa que los valores más extremos se presentan para la forma promastigota. En las concentraciones bajas se obtuvo un porcentaje muy alto de supervivencia (99%), mientras que en la mayor concentración fue del 0%. No se observó diferencia significativa en la supervivencia de los promastigotes al adicionar 1 $\mu\text{g/mL}$ de mezcla de alcaloides con el grupo control, pero sí en la supervivencia de las formas amastigotas, es decir, esta mínima concentración afecta la forma intracelular pero no la extracelular. Las diferencias en los resultados para las formas promastigotas y amastigotas se deben a que en estos dos estadios existen diferentes características bioquímicas y moleculares, que conllevan a una diferencia en la sensibilidad del parásito frente a los alcaloides. El efecto de diterpenos, por ejemplo, es mucho más pronunciado sobre los amastigotes (Habtemariam 2003). En general, se ha sugerido que los promastigotes son menos sensibles a las drogas en comparación con amastigotes (Fumarola *et al.* 2004), el Pentostam, por ejemplo, es efectivo contra la forma amastigota pero no contra la promastigota.

Los resultados de este trabajo muestran mayor eficacia en la actividad leishmanicida en comparación con otras metodologías similares. Muñoz *et al.* (1994) obtuvieron del extracto de alcaloides del tallo de *Peschiera van heurtii*, Apocynaceae, una inhibición del 50% sobre el crecimiento de *L. braziliensis* a 50 $\mu\text{g/mL}$ y del 25% sobre *L. amazonensis* bajo la misma concentración, y los resultados obtenidos en el presente estudio muestran inhibición del 70% a 50 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, los autores mencionados evidenciaron una viabilidad del 100% de los macrófagos tratados con los alcaloides aislados en un amplio rango de concentraciones, aún de 100 $\mu\text{g/mL}$ en el caso de conodurina.

Semejante al resultado aquí expuesto, Weniger *et al.* (2001) evidenciaron a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ del extracto de metanol de *Tabernaemontana oblicua* inhibición de la supervivencia de *L. braziliensis* en la forma promastigota del 100%.

La concentración relativamente baja requerida para producir efecto leishmanicida, aun después de 1 hora de infección, sugiere que el mecanismo de acción de los alcaloides tiene como blanco primario la membrana plasmática del parásito (Marchán *et al.* 2000). Plock *et al.* (2001) realizaron un estudio piloto con cerca de 50 extractos vegetales contra promastigotes de *L. mexicana amazonensis*, de éstos, 18 mostraron al menos 50% de inhibición sobre el parásito a 100 µg/mL y los datos revelaron que la membrana de éste se ve gravemente afectada, siendo el blanco de los compuestos.

Aunque el grupo control, cultivos sin la adición de mezcla de alcaloides, tuvo valores significativamente más altos que los tratamientos en cuanto a infección al ser comparados los índices con otros trabajos, éste valor no representa la capacidad macrofágica de esta línea celular. Se reportan porcentajes muy elevados de infección en J774, aún del 100% después de 3 días de infección (Chang 1980).

Existen estudios (Courret *et al.* 2002) en los cuales se ha determinado que el proceso de diferenciación de la forma promastigote a la forma amastigote empieza horas después de la fagocitosis y toma al menos cinco días en completarse. En el presente trabajo se fijaron las células después de 3 días de tratamiento, lo que puede explicar en parte, índices de infección más bajos en el control al compararse con los altos valores obtenidos por otros autores.

De otro lado, un aspecto indispensable en la invasión es el estado infectivo del promastigote, como consecuencia del proceso de metaciclogénesis el cual comprende cambios bioquímicos y antigénicos (Rivas y López, 1993). Este proceso se da tanto al interior del flebótomo, coincidiendo con la migración de promastigotes del tubo digestivo a la probóscide, como en cultivos *in vitro*, cuando se alcanza la fase de crecimiento estacionaria, después de la fase de crecimiento logarítmico. No obstante, la capacidad de lograr un estado metacíclico disminuye después de mantener durante un tiempo prolongados cultivos en medio axénico (Sacks y Perkin, 1984, Sacks y Kamhawai, 2001). Trabajos realizados en el mismo grupo de investigación (Acero y

Galeano 2005, Muñoz 2005) y con la misma línea celular, mostraron valores similares en el porcentaje de infección a los obtenidos en el presente estudio, que oscilan entre 30 y 37%.

El sustrato de la evaluación anti-amastigote es un aspecto relevante en los resultados obtenidos. Para el estudio *in vitro* de sustancias antiparasitarias contra amastigotes de *Leishmania* han sido usados un amplio rango de células mamíferas, que incluyen fibroblastos (Mattock y Peters 1975), macrófagos transformados de roedores, macrófagos primarios de ratón asilados de peritoneo (Neal y Croft 1984), macrófagos humanos derivados de monocitos (Berman 1988), células monocitarias THP-1 de leucemia humana. Mayoritariamente se han usado líneas de macrófagos ya establecidas, como el caso de J774, por lo que el punto de referencia es general para los trabajos y esta variable queda saneada. El modelo BALB/c ha sido empleado en varias investigaciones (Maes *et al.* 2004, Delorenzi *et al.* 2001 y 2002, Ferrereira *et al.* 2002, Fournet *et al.* 1994, Xu Kelly *et al.* 2003, entre otros). Por lo tanto se considera como un sustrato válido para este tipo de estudios bajo condiciones *in vitro*, aunque se reconoce la importancia de analizar si existen o no diferencias en los resultados según el tipo de sustrato.

La atmósfera de CO₂ en concentración de 5% se usa en la mayoría de trabajos debido a que actúa como un sistema buffer del pH del medio, factor trascendental en el ciclo del parásito. Sin embargo, en el presente trabajo no fue usada debido a que estudios realizados previamente (Acero y Galeano 2005) mostraron que estadísticamente no hay diferencia entre la presencia o la ausencia de este componente en los procesos de infección con el parásito *L. braziliensis* en macrófagos J774, como sobre otros sustratos (línea celular Lulo, proveniente de células de *Lutzmya longipalpis*). Por otro lado, Zilberstein y Shapira 1994 afirman que la combinación de bajo pH y alta temperatura induce la transformación de promastigote a amastigote en parásitos del género *Leishmania*. Así, la ausencia de CO₂ favorece la acidez del medio y por lo tanto favorece así mismo la multiplicación de parásitos.

Otro aspecto interesante que se ha estudiado es la influencia del suero fetal bovino en los resultados. Jernigan *et al.* (1996) y Croft *et al.* (1992) han mostrado que el porcentaje de supervivencia de promastigotes de *L. chagasi* con tratamiento de atovaquona (formulación oral) influye de manera significativa con la adición de este compuesto en una concentración del 10%. El experimento realizado en ausencia de SFB reduce la viabilidad de los parásitos en más del 90% bajo una concentración de atovaquona de 3.13 µg/mL. El mismo experimento realizado en presencia de SFB 10% reduce igualmente la viabilidad en una concentración de 25 µg/mL de atovaquona. Debido a que en este trabajo se utilizó el SFB en combinación con el medio de cultivo, sería importante evaluar este mismo experimento sin la adición de este compuesto, o en una concentración más baja, para conocer si se reduce la eficacia de la actividad de la mezcla de alcaloides de *E. coronaria* sobre *L. braziliensis*.

Citotoxicidad

Los porcentajes de viabilidad sobre macrófagos en las diferentes concentraciones muestran valores altos hasta la concentración 4 (25 µg/mL), cuyo valor es de 73%. Freire de Lima *et al.* (2000), en una concentración de 20 µg/mL de extracto de *Himatanthus sucuuba* no observaron ningún efecto citotóxico, con un porcentaje de supervivencia de 85%, que en el presente estudio, bajo la misma concentración, fue del 90%.

Se consideró en el presente trabajo un efecto citotóxico importante en términos de viabilidad, si ésta se hallaba por debajo del 10%. El menor valor de supervivencia correspondió a 55% que pertenece a la más alta concentración 6 (100 µg/mL), y la $DL_{50}/24h$ fue de 233.52 µg/mL. Este valor es menor, en términos de citotoxicidad, que el correspondiente a la droga comercial Glucantime, cuyo DL_{50} es de 100-400 µg/mL (Arango *et al.* 2002), específicamente Cardona *et al.* (2004) obtuvieron para este fármaco un valor de 416.4 µg/mL. En comparación con el valor de Pentamidine,

1.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Tadesse *et al.* 1993), la mezcla de alcaloides de *E. coronaria* ejerce efectos citotóxicos mucho menores en los macrófagos.

Soares *et al.* (2003) evaluaron la citotoxicidad del extracto obtenido a partir de la especie *Tabernaemontana catharinensis*, del cual se cuantificaron mediante cromatografía de gas los alcaloides coronaridina y voacristina, presentes en *E. coronaria*, demostrando que no presentan efectos tóxicos en macrófagos murinos de ratón. De otro lado, alcaloides indólicos de *Corynanthe pachyceras* no mostraron citotoxicidad significativa sobre *L. major*, por lo que se sugiere que su actividad leishmanicida no se debe a un mecanismo relacionado con un efecto antiproliferativo (Staerk *et al.* 2000). Marshall *et al.* (1994) evaluaron cerca de 24 alcaloides bisbezyloquinolínicos, de los cuales ninguno mostró citotoxicidad significativa contra la línea celular KB, originada de carcinoma naso-faríngeo. El alcaloide más citotóxico, berbamina, con IC_{50} de 17.8 μM fue casi 2000 veces menos potente que la droga control Glucantime.

Similar resultado al aquí expuesto, se obtuvo del extracto de metanol de *Tabernaemontana oblicua* (Weniger *et al.* 2001), perteneciente también a la familia Apocynaceae, en el ensayo de citotoxicidad con un valor de LD_{50} sobre la línea U-937, células promonocíticas humanas, de 231.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

A nivel del sistema nervioso, el análisis de la coronadirina y su compuesto relacionado, ibogaina, sugieren que éstos parecen interactuar con receptores opioides, especialmente κ -opioides y bloquear los canales iónicos nicotínicos y ácido N-metil-D-asparticos (Popik *et al.*, 1995;). La ibogaina no posee el segmento carbometoxi de la coronaridina lo que provoca efectos adversos como alucinaciones y temblores; la coronaridina presenta efectos menos potentes, aunque no totalmente abolidos, según la concentración suministrada. Delorenzi *et al.* (2002) sintetizaron un análogo de la coronaridina mediante una metoxilación del carbono 18, el 18-MCOR, el cual presenta actividad leishmanicida más efectiva que su análogo natural y con menos

efectos tóxicos. El alcaloide bisindólico voacamina ha mostrado toxicidad en líneas celulares tumorales a 10 µg/mL (Meschini *et al.* 2001), al igual que la cryptolepina y neocryptolepina, derivados indoquinolínicos cuya acción se ejerce sobre el DNA, interfiriendo con la actividad catalítica de la topoisomerasa II e inducen la liberación de citocromo c de la mitocondria (Dasonneville *et al.* 2000). Humeniuk *et al.* (2003) demostraron que la toxicidad de estos alcaloides depende de los metilos sustituyentes. De modo que se puede concluir que la estructura química de los alcaloides, presentes en la muestra evaluada, determina tanto su actividad leishmanicida como el efecto tóxico que originan en la célula huésped.

In vivo se ha evaluado la toxicidad del extracto acuoso (200 mg/Kg) y alcohólico (150 mg/Kg) de *Ervatamia coronaria* mostrando poca diferencia entre el grupo control y el tratamiento (Henriques *et al.* 1996). Voacristina, el alcaloide más abundante en esta especie presenta efecto citotóxico y citostático dosis-dependiente en cepas de *Saccaromyces cerevisiae* (Melo *et al.* 1986). Este efecto se da esencialmente sobre el crecimiento y división celular, dejando la célula en la fase G2 del ciclo. Este hecho puede explicar la disminución en el número de macrófagos bajo las más altas concentraciones trabajadas, que en el caso del tratamiento de adición de alcaloides diariamente durante 3 días hizo que el índice de infección presentara valores más altos en comparación a las demás concentraciones.

Waechter *et al.* 1999 mostraron que la citotoxicidad de los extractos es mucho mayor a la de los alcaloides aislados. Por ejemplo, el extracto de metanol del que se aislaron la mayoría de alcaloides tiene IC₅₀ de 126 µg/mL, mientras que los alcaloides *O*-metilmoscatolina, lysicamina y liriodenina presentan valores de 7, 8 y 1 µg/mL, respectivamente, concentraciones menores necesarias para causar toxicidad. Delorenzi *et al.* (2001) obtuvieron 40% de supervivencia en macrófagos tratados con 10 µg/mL de coronaridina, y 70% con 20 µg/mL del mismo compuesto. En este trabajo, la mezcla de alcaloides de *E. coronaria* mostró supervivencia de 90 y 91% en

las mismas dos concentraciones evaluadas por Delorenzi *et al.*, datos que contradicen los resultados de Waechter *et al.*

Los cambios morfológicos vistos en los macrófagos bajo las más elevadas concentraciones de alcaloides se relacionan con los datos obtenidos en el ensayo de citotoxicidad. En otros estudios se han analizado los cambios morfológicos de macrófagos tratados con diferentes concentraciones de alcaloides indólicos y bisindólicos. Delorenzi *et al.* (2001) evaluaron la morfología de macrófagos con la fracción de cloroformo de *Peschiera australis*, que contienen alcaloides indólicos. Macrófagos sin infectar tratados con 20 µg/mL durante 24 horas no mostraron diferencias con el grupo control, con núcleo definido, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondrias con sus membranas claramente definidas. Mientras que aquellos tratados con la misma concentración de coronaridina la mitocondria se ve aumentada de tamaño, llena de un material amorfo, aunque comparada con la mitocondria del parásito bajo el mismo tratamiento se encuentra bien conservada. Parece que el primer organelo afectado es la mitocondria, bajo la fracción de cloroformo al igual que bajo el alcaloide aislado. Sin embargo, aún después de 3 días de tratamiento de 20 µg/mL la célula presenta una mitocondria relativamente normal y funcional. Toledo *et al.* (2003) de manera similar observaron cambios morfológicos en promastigotes de *L. major* bajo extracto de hojas de la planta *Tithonia diversifolia*, mostrando además su citotoxicidad con IC₅₀ de 1.5-2 mg/mL.

Los alcaloides de la corteza de *Peschiera cymosa*, Apocynaceae, que son también del tipo indólico y bisindólico presentan toxicidad sobre *Salmonella typhimurium* en concentraciones de 100-1000 µg/mL, sin embargo no confieren mutagenicidad (Rodríguez, 1990). Con el alcaloide aislado de la misma especie, conoflorina, Márquez (1999) obtuvo que se trata del alcaloide más abundante en la planta y además es mutagénico sobre *S. typhimurium* y tóxico a 30 ppm; mientras que la tabersonina resulta tóxica a mayor concentración (50 ppm) y no es mutagénica. De la

especie *Tabernaemontana cymosa* se aislaron 17 alcaloides indólicos con actividad anti-fúngica y sin efecto citotóxico (Achenbach *et al.* 1997).

Alcaloides indólicos de especies de Apocináceas han sido evaluados, particularmente la coronaridina, mostrando no tener efecto citotóxico sobre macrófagos J774 mediante test de azul tripán, con un resultado de 90% de supervivencia celular a 20 µg/mL (Delorenzi *et al.* 2000), resultado particularmente similar al del presente estudio. Estos autores demostraron que estos alcaloides indólicos no inducen actividad oxidativa ni producción de óxido nítrico.

Los resultados de este trabajo muestran que la mezcla de alcaloides de *Ervatamia coronaria* tiene un efecto leishmanicida importante para ambas formas del parásito de *L. braziliensis* sin causar toxicidad sobre la célula huésped. Esto conforma, a mediano y largo plazo, una opción viable para el tratamiento y prevención de la enfermedad. La actividad anti-amastigote ejercida por estos compuestos enmarcan un complejo de sustancias útiles para tratar la enfermedad, disminuyendo los índices de infección en las células macrofágicas; mientras que la actividad anti-promastigote puede situarse en un contexto preventivo a la infección, interrumpiendo el proceso mediante el control de esta forma dentro del vector. Una propuesta interesante sería implantar esta especie como cerca viva en áreas endémicas de la enfermedad de manera tal que, el vector al alimentarse de esta planta consuma los compuestos con actividad leishmanicida y así disminuir las tasas de infección dentro de la población.

7. CONCLUSIONES

En la parte aérea de la planta *Ervatamia coronaria* se encuentran presentes metabolitos secundarios de tipo alcaloide que presentan actividad contra el parásito *Leishmania braziliensis* bajo condiciones *in vitro*.

Al adicionar los compuestos alcaloides de *Ervatamia coronaria* 1 hora post-infección en macrófagos infectados con *L. braziliensis*, las concentraciones más elevadas (50 y 100 µg/mL) mostraron un efecto más potente que el resto de concentraciones evaluadas, aún siendo éstas últimas significativamente diferentes al grupo control.

La mezcla de alcaloides adicionada diariamente durante 3 días mostró igualmente una tendencia dosis-dependiente en el control del parásito. Sin embargo, a altas concentraciones disminuyó el número de células y por lo tanto los índices de infección se vieron afectados, de modo que aumentaron sus valores y estadísticamente no mostraron diferencias con las concentraciones más bajas, cuyos índices de infección fueron altos.

Los resultados de este trabajo brindan una nueva perspectiva en el desarrollo de drogas contra la leishmaniosis debido a que la mezcla de alcaloides obtenida a partir de la parte aérea de *Ervatamia coronaria* Apocynaceae a concentración de 10 µg/mL, mostró un efecto leishmanicida importante inhibiendo la supervivencia de las formas promastigotes del parásito *Leishmania braziliensis*.

La actividad antiparasitaria, para las formas amastigotas de *Leishmania braziliensis*, representada en IC₅₀ fue de 2.6 y 12.4 µg/mL para los tratamientos de adición de alcaloides 1 hora post-infección y diariamente durante 3 días, respectivamente.

La mezcla de alcaloides de la especie *Ervatamia coronaria* no genera un efecto tóxico sobre macrófagos J774, aún en concentración de 100 µg/mL, bajo tratamiento por 24 horas, presentando índice de DL₅₀/24h de 233.52 µg/mL.

Los resultados de este trabajo brindan una herramienta potencial para el tratamiento de las leishmaniosis para las formas cutánea y mucocutánea. La actividad obtenida de ésta mezcla de alcaloides contra las formas promastigotas podrían ejercer un papel en la prevención de la enfermedad, conformando a este tipo de metabolitos secundarios

potenciales agentes de profilaxis y tratamiento de las enfermedades causadas por el parásito *Leishmania braziliensis*.

8. RECOMENDACIONES

Se sugiere evaluar la mezcla de alcaloides con fracciones puntuales de otros disolventes. Así mismo, aislar y caracterizar los alcaloides contenidos en la mezcla especialmente los correspondientes al tipo bisindólico que reportan mayor actividad contra el parásito.

Sería interesante evaluar la viabilidad celular 3 días después de su cultivo con cada tratamiento, al igual que la reversabilidad del efecto del compuesto.

El cambio en morfología de los macrófagos y su disminución poblacional al llevarse a cabo la adición de alcaloides durante 3 días conlleva a suponer que en este lapso de tiempo los índices de citotoxicidad pueden ser más altos, por lo que se recomienda estimar sus índices en macrófagos tratados con la mezcla por más de 24 horas, así como el análisis de la morfología por medio de morfometría electrónica.

Se recomienda evaluar la actividad leishmanicida de esta mezcla de alcaloides en presencia de diferentes concentraciones de SFB y otros parámetros ambientales y físico-químicos de los cultivos celulares.

Ensayos *in vivo* proyecta este estudio como una herramienta útil y aplicable a largo plazo. De igual manera, lograr conocer los mecanismos moleculares implicados en la inhibición de la infección por parte de los alcaloides, supone un avance y una opción importante en la síntesis de sustancias farmacológicas y así mismo en el tratamiento de la enfermedad.

9. REFERENCIAS

- ACERO, V. M., GALEANO, E. C. 2005. Infección de cultivos celulares derivados de *Lutzomia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) con el parásito *Leishmania chagasi*. Médico Veterinario. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de la Salle. Bogotá, Colombia. 144 pp.
- ACHENBACH, H., BENIRSHKE, M., TORRENEGRA, R. 1997. Alkaloids and other compounds from seeds of *Tabernaemontana cymosa*. *Phytochemistry* 45 (2): 325-335.
- AGUDELO, L. A., URIBE, J., SIERRA, D., RUIZ, F., VELEZ, I. D. 2002. Presence of cutaneous leishmaniasis vectors surrounding the city of Medellín, Colombia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97:641-642.
- ALLDRICH, A. J., FLYNN, J., ROWLAND, I. R. 1986. Effects of plant derived alkaloids on the activity of mutagens. *Mutation research* 163: 225-232.
- ALVAREZ, de S.M. 2003. Alcaloides derivados del triptófano. Apuntes de Farmacognosia. Universidad de Sevilla, España. www.personal.us.es/aldesoto/derivados%20triptofano.pdf
- ANONIMO1. 2003. Vacuna contra la leishmaniosis, pendiente de verificación. 60 (6). Octubre. Colombia. http://www.medilegis.com/BancoConocimiento/A/AM60_CyM_vacuna/AM60_CyM_vacuna.asp

ANONIMO2. 2003. Plantas promisorias provenientes de la amazonía. http://www.Anónimo2.org.pe/Publicaciones/2003/Junio/Amazon%C3%ADa_biod_om_des/libros/28/28000007.htm#I1

ARANGO, G.J., SCOTT, J., ROBLEDO, S.M., JARAMILLO, L.M., VELEZ, I.D., MUÑOZ, D.L. 2002. Actividad leishmanicida de annonacina aislada de *Annona muricata*. Memorias VII Congreso Nacional de Fitoquímica. Bogotá, Colombia. PUJ. Pp. 115.

AREVALO, L., WARD, B., MILLER, R., MENG, T. C., NAJAR, E., ALVAREZ, F. 2001. Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. *Clinical Infectious Diseases* 33:1847-51.

ARIAS, J., BELTRAN, F., DESJEUX, P., WALTON, B. 1996. Epidemiología y control de la leishmaniasis en las Américas, por país o territorio. Organización Panamericana de la Salud. Cuaderno técnico 44:1-45.

BARATA, L., SANTOS, L., FERRI, P.H., PHILLIPSON, J.D., PAINE, A. CROFT, S.L. 2000. Anti-leishmanial activity of neolignan from *Virola* species and synthetic analogues. *Phytochemistry* 55: 589-595.

BEEK, T.; DEELDER, A.M.; VERPOORTE, R. & SVENDSEN, A.B. 1984. Antimicrobial, antiamoebic and antiviral screening of some *Tabernaemontana* species. *Planta medica*. 50(2): 180-5.

BERMAN, J.D. 1988. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Review of Infectious Diseases*. 10: 560-586.

BERMAN, J.D. 1997. Human Leishmaniosis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clinical Infectious Diseases* 24: 684-703.

BERMAN, J. D. 2003. Current treatment approaches to leishmaniasis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 16: 397-401.

BORST, P., OUELLETTE, M. 1995. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annual Review of Microbiology* 49:427-460

BRUMMITT, C.F., PORTER, J.A.H., HERWALDT, B.L. 1996. Reversible peripheral neuropathy associated with sodium stibogluconate therapy for American cutaneous leishmaniosis. . *Clinical Infectious Diseases* 22: 878-879.

CABEZAS, J.A.; CICCIO-ALBERTI, J.F. 1986. Estudio químico de las hojas de *Tabernaemontana arborea* Rose. *Ingeniería y Ciencia Química* 10 (3-4): 54-55.

CARDONA, W., QUIÑONES, W., ECHEVERRI, F. 2004. Leishmanicidal activity of Passiflorin A and derivatives. *Molecules* 9:666-672.

CARVALHO, F., FERREIRA, E. 2001. Leishmaniasis phytotherapy: nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia* 72: 599-618.

CHAKRABARTI, C., BISWAS, S., KUNDU, S., SUNDD, M., JAGANNADHAM, M. V., DATTAGUPTA, J. K. 1999. Crystallization and preliminary X-ray analysis of ervatamin B and C, two thiol proteases from *Ervatamia coronaria* *Acta Crystallographica D*55: 1074-1075.

CHAN-BACAB, M. J., PEÑA-RODRIGUEZ, L. M. 2001. Plant natural products

with leishmanicidal activity. *Natural Products Reports* 18: 674-688.

CHANG, K. P. 1980. Human cutaneous *Leishmania* in a mouse macrophage line: propagation and isolation of intracellular parasites. *Science* 209:1240-1242.

CICCIO-ALBERTI, J.F.; CASTRO, V.H.; URBINA, A. 1985. Alcaloides indólicos de las ramitas de *Tabernaemontana arborea* Rose. *Ingeniería y Ciencia Química* 9 (4): 133-135.

COURRET, N., FREHEL, C., GOUHIER., POUCHELET, M., PRINA, E., ROUX, P., Y ANTOINE, J.C. 2002. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *Journal of Cell Science*. 115: 2303-2316.

CROFT, S. L., HOGG, J., GUTTERIDGE, W. E., HUDSON, A. T., RANDALL, W. 1992. The activity of hydroxynaphthoquinones against *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents and chemotherapy* 30: 827-832.

CUNNINGHAM, A. C. 2002. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology*. 72 (2):132-141.

DANIEL, H. 1988. *Planta medicinales: un resumen de farmacognosia*. 2ª edición. Tercer Mundo editores. Colombia. Pp. 62, 76.

Da SILVA, S.A.G., COSTA, S.S., MENDONÇA, S.C.F., SILVA, E.M., MORAES, V.L.G., ROSSI-BERGMANN, B. 1995. Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. *Acta Tropica* 60: 201-210.

DASSONNEVILLE, L., LANSIAUX, A., WATTELET, A., WATTEZ, N., MAHIEU, C., Van MIERT, S., PIETERS, L., BAILLY, C. 2000. Cytotoxicity and

cell cycle effects of the plant alkaloids cryptolepine and neocryptolepine: relation to drug-induced apoptosis. *European Journal of Pharmacology* 409(1): 9-18

DAVIES, C.R., REITHINGER, R., CAMPBELL-LENDRUM, D., FELICIANGELI, D. BORGES, R., RODRIGUEZ, N. 2000. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cadernos de Saude publica*, Rio de Janeiro 16 (4) : 925-950.

DAVIES, C., KAYE, P., CROFT, S., SUNDAR, S. 2003. Leishmaniasis: new approaches for disease control. *British Medical Journal* 326: 377-382.

DEHARO, E., MORETTI, C., MUÑOZ, V., SAUVAIN, M., RUIZ, E. 1992. Aspects de la recherche en chimiothérapie antiparasitaire en Bolivie. IBBA-ORSTOM. S.T.P. *Pharma Pratiques* 2 (3): 189-192.

DELMAS, F.; Di GIORGIO, C.; ELIAS, R.; GASQUET, M.; AZAS, N.; MSHVIBLADZE, V.; DEKANOSIDZE, G.; KEMERTELIDZE, E. & TIMON, P. 2000. Antileishmanial activity of three saponins isolated from ivy, alpha-hederin, beta-hederin and hederacolchiside A1, as compared to their action on mammalian cells cultured *in vitro*. *Planta Medica*. 66(4):343-7.

DELORENZI, J.C., FREIRE-de-LIMA, L., GATTASS, C.R., KUEHNE, M. E., REZENDE, C. M., PINTO, A., SARAIVA, E. M. B. 2000. Antileishmanial effect of synthetic indole alkaloids and its role on macrophage modulation. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 95 Supl. 2: 180.

DELORENZI, J.C., ATTIAS, M., GATTASS, C., ANDRADE, M., REZENDE, C., Da CUNHA, A., HENRIQUES, A., BOU-HABIB, D., SARAIVA, E. 2001. Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrobial Agents and chemotherapy* 45(5): 1349-1354.

DELORENZI, J.C., FREIRE-de-LIMA, L., GATTASS, C.R., De ANDRADE, D., HE, L., KUEHNE, M., SARAIVA, E.M.V. 2002. *In vitro* activities of iboga alkaloid congeners Coronaridina and 18-methoxycoronaridina against *Leishmania amazonensis*. Antimicrobial Agents and chemotherapy 46 (7): 2111-2115.

DELORENZI, J.C., COSTA, D., CASTILHO, R.O., KAPLAN, M.A., GATTASS, C. R. 2003. Activity of oleanolic acid against *Leishmania (L) major in vitro*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 45 (suppl. 13): 109

DeFILIPPS, R., MAINA, S. y CREPIN, J. 2004. Medicinal Plants of the Guiana (Guyana, Surinam and French Guiana). Department of Botany, National museum of Natural History. Smithsonian Institute. Washington D.C. U.S.A.
www.mnh.si.edu/biodiversity/bdg/medicinal/MedPlantsGui2.pdf

Del RAYO, M., PHILLIPSON, J. D., CROFT, S., ROCK, P., MARSHALL, S., SCHIFF, P. L. 2002. *In vitro* activity of *Triclisia patens* and some Bisbenzylisoquinoline alkaloids against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma brucei brucei*. Phytotherapy Research 16:432-436.

Del RAYO, M., PHILLIPSON, J.D., CROFT, S. L., YARDLEY, V., SOLIS, P.N. 2004. *In vitro* antiprotozoal and cytotoxic activities of some alkaloids, quinones, flavooids and coumarins. Planta medica 70:70-72.

DOMINGUEZ, X. A. 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica. Limusa. México. 211-228 pp.

ECKELI, I.W., MACHADO, D.S.B., SIMON, R.F., PERSUHN, D.C., PINHEIRO, T.R., YUNES, R.A., CALIXTO, J.B., STEINDEL, M., GRISARD, E.C., SANTOS, A.R.S., EGER-MANGRICH, I. 2003. Preliminary analysis of the trypanocidal and

leishmanicidal properties of xanthenes derivatives. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 45 (suppl. 13): 110.

FERRARI, J. 1996. Insecticide resistance. *In*: BEATY, B.J., MARQUARDT, W.C. *The Biology of disease vectors*. University Press of Colorado. Chapter 30. USA.

FERREIRA, M. E., ROJAS De ARIAS, A., TORRES De ORTIZ, S., INCHAUSTI, A., NAKAYAMA, H., THOUVENEL, C., HOCQUEMILLER, R., FOURNET, A. 2002. Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. *Journal of ethnopharmacology* 80: 199-202.

FOURNET, A., MUÑOZ, V., MANJON, A. M., ANGELO, A., HOCQUEMILLER, R., CORTES, D., CAVE, A., BRUNETON, J. 1988. Activité antiparasitaire d'alcaloïdes bisbenzylisoquinoléiques : activité *in vitro* sur des promastigotes de trois souches de *Leishmania*. *Journal of ethnopharmacology* 24 : 327-335.

FOURNET, A., MUÑOZ, V., ROBLOT, F., HOCQUEMILLER, R., CAVE, A., GANTIER, J.CH. 1993. Antiprotozoal Activity of Dehydrozalizanin C, a Sesquiterpene Lactone Isolated from *Munnozia maronii* (Asteraceae). *Phytotherapy Research* 7:111-115.

FOURNET, A., ANGELO BARRIOS, A., MUÑOZ, V., HOCQUEMILLER, R., ROBLOT, F., CAVE, A. 1994. Antileishmanial activity of a tetralone isolated from *Ampelocera edentulata*, a Bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis. *Planta medica* 60:8-12.

FOURNET, A., BARRIOS, A. A., MUÑOZ, V. 1994. Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology* 41: 19-37.

FOURNET, A., ANGELO, A., MUÑOZ, V., HOCQUEMILLER, R., CAVE, A., BRUNETON, J. 1995a. 2-Substituted quinoline alkaloids as potencial antileishmanial drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 37(4): 859-863.

FOURNET, A., HOCQUEMILLER, R., GANTIER, J. C. 1995b. Combattre la leishmaniose. *La Recherche* 26 (275) : 424-429.

FRANK, X., FOURNET, A., PRINA, E., MAHIEUX, R., HOCQUEMILLER, R., FIGADERE, B. 2004. Biological evaluation of substituted quinolines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 14:3635-3638.

FREIRE-de-LIMA, L., DELORENZI, J. C., OKADA, L. Y. H., SARAIVA, E. M. B. 2000. Potential leishmanicide activity of *Himatanthus sucuuba* (Apocyanaceae). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 95 Supl. 2: 312.

FUMAROLA, L., SPINELLI, R., BRANDONISIO, O. 2004. *In vitro* assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. *Research in microbiology* 155: 224-230.

GARCIA BARRIGA, H. 1975. Flora medicinal de Colombia. *Botánica Médica*. Tomo II. Imprenta Nacional. Bogotá, Colombia. Pp. 447-455.

GHOSH, A.K., BAKSHIT, M.M., GOSH, D.K. 1985. *Leishmania donovani*: amastigote inhibition and mode of action of berberine. *Experimental parasitology* 60: 404-413.

GIMENEZ, A. 2004. Experiencias del IIFB-UMSA en el estudio de productos naturales bioactivos: estudios clínicos Evanta Vs. Leishmaniosis, Phoro Virtual Latin Pharama 2004. www.latinpharma.net/expo2004/documentos/gimenez_e.pdf

GLENBOSKI, L. 1983. Ethnobotany of the Tukuna Indians, Amazonas, Colombia. Universidad Nacional de Colombia.

GONZALEZ, P., MARIN, C., RODRIGUEZ-GONZALEZ, I., HITOS, A. B., ROSALES, M. J., REINA, M., DIAZ, J. G., GONZALEZ-COLOMA, A., SANCHEZ-MORENO, M. 2005. *In vitro* activity of C20-diterpenoid alkaloid derivatives in promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania infantum*. International Journal of Antimicrobial Agents 25(2):136-41.

GORMAN, M., NEUSS, N., CONE, J., DEYRUP, J. A. 1960. Alkaloids from Apocynaceae III. Alkaloids of *Tabernaemontana* and *Ervatamia*. The structure of coronaridine, a new alkaloid related to ibogamine. Journal of American Chemistry Society 82: 1142-1145.

GRELLIER, J. C., FOURNET, A., MUÑOS, H. M., HOCQUEMILLER, R. 1996. The effect of some 2-substituted quinolines isolates from *Galipea longiflora* on *Plasmodium vinckei petteri* infect mice. Planta medica 62: 285-286.

GRIMALDI, G., TESH, R.B. 1993. Leishmaniosis in the New World: current concepts and implications for future research. Clinical Microbiology Review 3:320-350.

GROGL, M., THOMASON, T. N., FRANKE, E.D. 1992. Drug resistance in leishmaniosis: its complication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 47(1): 117-126.

GUIDA, A., De BATISTA, D., BARGARDI, S. 2003. The antibacterial activity of alkaloids obtained from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC. Ars pharmaceutica 44 (2): 167-173.

GUILLOUME, M. 2004. Des nouvelles molécules particulièrement actives contre les leishmanies. Institute de Recherche pour le Développement IRD. <http://www.ird.fr/fr/actualites/fiches/2004/fiche216.htm>

HABTEMARIAM, S. 2003. *In vitro* antileishmanial effects of antibacterial diterpenes from two Ethiopian *Premna* species: *P. schimperii* and *P. oligotricha*. BMC Pharmacology 3: 6-12.

HANDMAN, E. 1997. *Leishmania* vaccines: old and new. Parasitology Today 13: 236-8.

HASHIM, F.A., KHALIL, E.A.G., ISMAIL, A., EI HASSAN, A.M. 1995. Apparently successful treatment of two cases of post kala-azar dermal leishmaniosis with liposomal amphotericin B. Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 89 (4): 440.

HENRIQUES, A.T., MELO, A.A., MORENO, P.R.H., ENE, L.L., HENRIQUES, J.A.P., SCHAPOVAL, E.E.S. 1996. *Ervatamia coronaria*: chemical constituents and some pharmacological activities. Journal of ethnopharmacology 50 (1):19-25.

HIEMENZ, J.W., WALSH, T.J. 1996. Lipid formulations of amphotericin B: recent progress and future directions. Clinical Infectious Diseases 22 (Supl. 2): S133-S144.

HUMENIUK, R., KACZMAREK, L., PECZYNSKA-CZOCH, W., MARCINKOWSKA, E. 2003. Cytotoxicity and cell cycle effects of novel indolo[2,3-b]quinoline derivatives. Oncology Research 13(5): 269-77.

IWU, M.M., JACKSON, J.E., TALLY, J.D. KLAYMAN, J.D. 1992. Evaluation of plant extracts for antileishmanial activity using a mechanism-based radiorespirometric microtechnique (RAM). *Planta Medica* 58:436-441.

IWU, M. M., JACKSON, J. E., SCHUSTER, B. G. 1994. Medicinal plants in the fight against Leishmaniasis. *Parasitology today* 10 (2): 65-68.

JERNIGAN, J., PEARSON, R., PETRI, W., ROGERS, M. 1996. *In vitro* activity of atovaquone against *Leishmania chagasi* promastigotes. *Antimicrobial Agents and chemotherapy* 40 (4): 1064.

KAYSER, O., KIDERLEN, A. F., CROFT, S. L. 2003. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitology research* 90:S55-S62.

KAM, T.S., SIM, K. M., KOYANO, T., KOMIYAMA, K. 1999. Leishmanicidal alkaloids from *Kopsia griffithii*. *Phytochemistry* 50: 75-79.

KAM, T.S., PANG, H. S., LIM, T. M. 2003. Biologically active indole and bisindole alkaloids from *Tabernaemontana divaricata*. *Organic and Biomolecular Chemistry* 1 (8): 1292 – 1297.

KEAWPRADUB, N., KIRBY, G. C., STEELE, J. C. P., HOUGHTON, P. J. 1999. Antiplasmodial activity of extracts and alkaloids of three *Alstonia* species from Thailand. *Planta medica* 65: 690-694.

KHAW, M., PANOSIAN, C. 1995. Human antiprotozoal therapy: past, present and future. *Clinical Microbiology Reviews* 8 (3): 427-439.

KILLEEN, T.J.E., GARCÍA, S. G., BECK (eds.). 1993. *Guía de árboles de Bolivia*. Missouri Botanical Garden. 958pp.

KIRBY, G.C., PAINE, A., WARHUST, D. C., NOAMESE, B. K., PHILLIPSON, J. D. 1995. *In vitro* and *in vivo* antimalarial activity of cryptolepine, a plant-derivate indolquinoline. *Phytotherapy research* 9:359-363.

KIRBY, G.C. 1996. Medicinal plants and the control of protozoal disease, with particular reference to malaria. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 90: 605-609

LIU, L., NOLAN, L. 1996. Antileishmanial mode of action of derivatives of the quinoline alkaloid (quinine) from the bark of *Cinchona ledgeriana*. *Acta horticulturae* 426:221-226. 1996

LODGE, R., DESCOTEAUX, A. 2005. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clinical Immunology* 114(3):256-65.

LÓPEZ, M., INGA, R., CANGALAYA, M., ECHEVARRIA, J., LLANOS-CUENTAS, A., ORREGO, C., AREVALO, J. 1993. Diagnosis of *Leishmania* using the Polymerase Chain Reaction: a simplified procedure for field work. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 49(3): 348-56.

MAES,L., VANDEN,D., GERMONPREZ, N., QUIRIJNEN, COS, P., De KIMPE, N., Van PUYVELDE, L. 2004. *In vitro* and *in vivo* activities of a triterpenoid saponin extract (PX-6518) from the plant *Maesa balansae* against Visceral Leishmania Species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(1): 130-136.

MAES, L., VANDEN, D., GERMONPREZ, N., QUIRIJNEN, L., COS, P., De KIMPE, N., Van PUYVELDE, L. 2004. *In vitro* and *in vivo* activities of a triterpenoid saponin extract (PX-6518) from the plant *Maesa balansae* against

Visceral *Leishmania* species. Antimicrobial Agents and chemotherapy 48 (1):130-136.

MARCHAN, E., ARRIECHE, D., HENRIQUEZ, W., CRESCENTE, O. 2000. Efecto *in vitro* de una sustancia alcaloidea aislada de *Amphimedon virides* (Porifera) sobre promastigotes de *Leishmania mexicana*. Revista de Biología Tropical 48 Supl. 1:31-38.

MARSHALL, S., RUSSELL, P., WRIGHT, C., ANDERSON, M., PHILLIPSON, D., KIRBY, G., WARHUST, D., SVHIFF, P. 1994. *In vitro* antiplasmodial, antiamoebic and cytotoxic activities of a series of bisbenzylisoquinoline alkaloids. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 38(1): 96-103.

MARQUEZ, R. 1999. Alcaloides en la semilla de *Tabernaemontana coronaria* (Apocynaceae) y evaluación de la actividad mutagénica. Trabajo de grado Postgrado en Biología con énfasis en fitoquímica. Pontificia Universidad Javeriana.

MATTOCK, N. M., PETERS, W. 1975. The experimental chemotherapy of leishmaniasis. Technique for the study of drug action in tissue culture. Annals of tropical medical parasitology 69: 359-371.

MELO, A. A., QUEROL, C. B., HENRIQUES, A. T., HENRIQUES, J. A P. 1986. Cytostatic, cytotoxic and mutagenic effects of voacristine, an indole alkaloid in wild-type and repair deficient yeast. Mutation Research 171: 17-24.

MESCHINI, S., MARRA, M., CALCABRINI, A., FEDERICI, E., GALEFFI, C., ARANCIA, G. 2003. Voacamine, a bisindolic alkaloid from *Peschiera fuchsiaefolia*, enhances the cytotoxic effect of doxorubicin on multidrug-resistant tumor cells. International Journal of Oncology 23: 1505-1513.

MINISTERIO DE SALUD. 1994. Leishmaniasis. Plan Nacional de Control. Santafé de Bogotá, D.C Trazo Ltda.

MOLANO, A. 2005. Perversa estrategia. Agencia Prensa Rural. Abril 9. <http://www.prensarural.org/molano20050409.htm>

MONTENEGRO, H. GUTIÉRREZ, M., ROMERO, L. I., ORTEGA-BARRÍA, E., CAPSON, T. L., CUBILLA, L. 2003. Aporphine alkaloids from *Gutteria* spp. with leishmanicidal activity. *Planta medica* 69: 677-679.

MONZOTE, L., SARRIEGO, I., MONTALVO, A .M., GARRIDO, N., SCULL, R., ABREU, J. 2004. Actividades antiprotozoarias de aceites esenciales extraídos de plantas cubanas. *Revista cubana de Medicina Tropical* 56(3): 230-233.

MUHAMMAD, I., CHUCK, D., SHABANA, I. K., TEKWANI, B., BEDIR, E., TAKAMATSU, S., FERREIRA, D., WALKER, L.A. 2003. Antiparasitic alkaloids from *Psychotria klugii*. *Journal of Natural Products* 66: 962-967.

MUÑOZ, V., MORETTI, C., SAUVAIN, M., CARON, C., PORZEL, A., MASSIOT, G., RICHARD, B., Le MEN-OLIVER, L. 1994. Isolation of bis-indole alkaloids with antileishmanial and antibacterial activities from *Peschiera van heurkii* (syn. *Tabernaemontana van heurkii*). *Planta medica* 60 (5):455-459.

MUÑOZ, C. 2005. Análisis de la susceptibilidad de una línea celular de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) a la infección con *Leishmania (L) chagasi* y *Leishmania (V) braziliensis*. Biólogo. Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Biología. Pontificia Universidad Javeriana. 104 pp.

MUSKUS, C. E., MARIN VILLA, M. 2002. Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*. *Biomedica* 22: 167-77.

NALLAMSETTY S, KUNDU S, JAGANNADHAM MV. 2003. Purification and biochemical characterization of a highly active cysteine protease ervatamin A from the latex of *Ervatamia coronaria*. Journal of Protein Chemistry. 22(1): 1-13.

NEAL, R. A., CROFT, S. L. 1984. An *in vitro* system for determining the activity of compounds against the intracellular amastigote form of *Leishmania donovani*. Journal of antimicrobial chemotherapy 14: 463-475.

NEUSS, N. 1970. Indole alkaloids. In: REINHOLD, V.N. Pelletier Ed. Chemistry of alkaloids. New York, USA. Pp. 213 –266.

OKUNJI,C., IWU, M.M., JACKSON, J. E., TALLY, J.D. 1996. Biological activity of saponins from two *Dracaena* species. Advances in Experimental Medicine and Biology 404: 415-428.

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

OROZCO, B. 1993. Formas clínicas de la leishmaniosis. En: Memorias seminario Taller Nacional, leishmaniasis: manejo clínico, epidemiológico y del vector. Medellín, Colombia. Ministerio de Salud, Red Nacional de Laboratorios. Servicio Seccional de Salud de Antioquia: 18-22.

PACIENZA-LIMA, W., SOUZA, E.V., LAFETA, R.C.A., VELOZO, L.S., KAPLAN, M.A.C., SAMPAIO-SANTOS, M.I., TORRES-SANTOS, E.C. 2003. Piperaceae and Solanaceae species against *Leishmania (L) amazonensis*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. 45 (suppl. 13): 109.

PANOCIAN, C., BRAZA, M., SZOKA, F., WYLER, D. 1984. Treatment of experimental cutaneous leishmaniasis with liposome-intercalated Amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 25 (5): 655-656.

PAULO, A.; GOMEZ, E.T.; STEELE, J. WARHUST, D.C. & HOUGHTON, J. 2000. Antiplasmodial activity of *Cryptolepis sanguinolenta* alkaloids from leaves and roots. *Planta Medica*. 66(1): 30-4.

PEPE, A.R., VIERIA, P.C., BATISTA, J., DAS GRAÇAS, M.F., De ALBURQUEQUE. 2004. Trypanocidal activity of Meliaceae and Rutaceae extracts. *Memorias do Instituto Oswaldo Cuz, Rio de Janeiro*. 99 (2): 227-231.

PEREIRA, P.S., DIAS, D.A., FRANÇA, S.C., SAMPAIO, S.V., TOLDO, M.P.A., ALBUQUERQUE, S. 1998 Trypanocidal activity from *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. *Acta Horticulturae* 501:165-170.

PEREZ, J. M., CHIQUERO, M. J., CONSEIL, G., DAYAN, G., Di PIETRO, A., BARRON, D., CASTANYS, S., GAMARRO, F. 1999. Correlation between the affinity of flavonoids binding to the cytosolic site of *Leishmania tropica* multidrug transporter and their efficiency to revert parasite resistance to Daunomycin. *Biochemistry* 38: 1736-1743.

PHILLIPSON, J. D., WRIGHT, C. W., KIRBY, G. C., WARHURST, D. C. 1995. Phytochemistry of some plants used in traditional medicine for the treatment of protozoal diseases. In: HOSTETTMANN, K., MARSTON, A., MAILLARD, M., HAMBURGER, M. (Eds.), *Phytochemistry of Plants used in Traditional Medicine*. Clarendon Press, Oxford. Pp. 95–135.

PHILLIPSON, J.D., Del RAYO, M., CROFT, L., ROCK, P., MARSHALL, S., SHIFF, P.L. 2002. In vitro activity of *Triclisia patens* and some bisbenzylisoquinoline alkaloids against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma brucei brucei*. Journal of Phytotherapy Research 16(5): 432- 436.

PILOTO, I.C., CAMPANA, M., MACHADO, G.M., LEON, L.L., GOBBY, L., BISSOLI, L.H. 2004. Anti-leishmanial activity of alkaloid extract from *Aspidosperma ramiflorum*. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 99(3): 325- 327.

PIMIENTA, P.; TURCO, S.J.; McCONVILLE, M. J.; LAWYER, P.; PERKINS, P. & SACKS, D. 1992. Stage specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sand fly midgut. Science. 256: 1812-15.

PLOCK, A., SOKOLOWSKA, W., PRESBER, W. 2001. Application of flow cytometry and microscopical methods to characterize the effect of herbal drugs on *Leishmania* Spp. Experimental parasitology 97(3):141-53.

POPIK, P., LAYER, R . T., FOSSOM, L. H., BENVENISTE, M., GATER-DOUGLASS, B., WITKIN, J. M., LIEW, F. Y. 1995. NMDA antagonist properties of the putative antiaddictive drug, ibogaine. Journal of Pharmacology and experimental therapeutics 275: 753-760.

PURI, A., SAXENA, R.P. SUMATI, G.P.Y., KULSHRESHTHA, D. K., SAXENA, K.C.,DHAWAN, B.N. 1992. Immunostimulant activity of Picroliv, the iridoid glycoside fraction of *Picrorhiza kurroa*, and its protective action against *Leishmania donovani* infection in hamsters. Planta Medica 58: 528-532.

RALPH, P., PRICHARD, J., COHN, M. 1975. Reticulum cell sarcoma: an effector cell in antibody-dependent cell-mediated immunity. Journal of Immunology 2: 898-905.

RATES, S. M. K. 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon* 39: 603-613.

RAYNAUD, S., FOURNEAU, C., LAURENS, A., BORIES, C., HOCQUEMILLER, R., LOISEAU, M. 2004. *In vitro* antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. *Biomedicine and pharmacotherapy* 58 (6-7): 388-392 .

RBI, Signaling innovations. Catalog. Sigma-Aldrich. U.S.A. 443 p.

RIBEIRO-DE-JESUS, A., ALMEIDA, R. P., LESSA, H., BACELLAR, O., CARVALHO, E. M. 1998. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 31:143-148.

RICHOMME, P., GODET, M.C., FOUSSARD, F., TOUPET, L., SEVENET. T., BRUNETON, J. 1991. A novel leishmanicidal labdane from *Polyalthia macropoda*. *Planta Medica* 57(6):552-4.

RIDOUX, O., Di GIORGIO, F., DELMAS, R., ELIAS, R., MSHVILDADZE, V., DEKANOSIDZE, G., KEMERTELIDZE, E., BALANNSARD, G., TIMON, P. 2001. *In vitro* antileishmanial activity of three saponins isolated from ivy, alpha-hederin, beta-hederin and hederacolchiside a(1), in association with pentamidine and amphotericin B. *Phytotherapy Research* 15: 298-301.

RIVAS-LÓPEZ, L., LÓPEZ-LÓPEZ, M. C. 1993. *Parasitología Molecular*. Consejo superior de Investigaciones científicas. Madrid. pp. 430

RODRIGUEZ, S. P. 1990. Determinación de la posible actividad mutagénica de sustancias obtenidas de *Peschiera cymosa*. *Bacterióloga*. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 178 p.

- SACKS, D. L., PERKIN, P. V. 1984. Identification of infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*. 223: 1417-9.
- SACKS, D., KAMHAWI, S. 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniosis. *Annual Review of Microbiology* 55: 453-483.
- SÁENZ, R.E., De RODRIGUEZ, C.G., JOHNSON, C.M., BERMAN, J.D. 1991. Efficacy and toxicity of pentostam against Panamanian mucosal leishmaniosis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 44: 394-398.
- SAEZ, A., BLAIR, S., SAEZ, J. 1997. Aporfinoïdes en corteza de *Guatteria lehmannii* y evaluación de su actividad antimalárica *in vitro*. *Revista colombiana de química* 26(1):43-50.
- SALEHEEN, D., ATIF, S., MASOOM, M., 2004. Antileishmanial activity of aqueous onion extract *in vitro*. *Fitoterapia* 75: -13.
- SAUVAIN, M., DEDET, J., KUNESCH, N., POISSON, J., GANTIER, J., GAYRAL, P., KUNESCH, G. 1993. *In vitro* and *in vivo* Leishmanicidal Activities of Natural and Synthetic Quinoids. *Phytotherapy Research* 7: 167-171.
- SAXENA, S., PANT, N., JAIN, D.C., BHAKUNI, R. S. 2003. Antimalarial agents from plant sources. *Current science* 85(9): 1314-1329.
- SCHLEIN, Y., JACOBSON, R.L., MESSER, G. 1992. *Leishmania* : infections damage the feeding mechanism of the sand fly vector and implement parasite transmission by bite. *Process of Natural. Academie of Sciences of USA*. 89: 9944-8.

SHENG, T., KEMP, C., KOVARIK, C. 2005. Infectious Diseases En: Infectious Diseases of Refugees & Immigrants & Bioterrorism. Elsevier Science.
http://www3.baylor.edu/%7ECharles_Kemp/Infectious_Disease.htm

SIGIVILA Sistema de Vigilancia en salud Pública. 2004. Instituto Nacional de Salud, subdirección de vigilancia y control en salud pública. Ministerio de protección social, Dirección general de salud pública. Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica número 10. Marzo 7-13 de 2004.

SOARES, D.C., PEREIRA, C.G., MEIRELES, M.A., SARAIVA, E.M.B. 2003. Anti-*Leishmania (L.) amazonensis* activity of supercritical CO₂⁺ ethanol extracts from *Tabernaemontana catharinensis*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 45 (suppl. 13): 110.

SOTO, J., GROGL, M., BERMAN, J. 1993. Evaluation of pentamidine for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Colombia. Clinical Infectious Diseases 16: 417-425.

SOTO, J., GROGL, M., BERMAN, J., OLLIARO, P. 1994. Limited efficacy of injectable aminosidine for single-agent therapy for Colombian Cutaneous leishmaniasis. Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 88:695- 698.

SOUZA, E. M., QUEIROZ, A. B. R., ASSIS, O., GAZINELLI, G., CORREA-OLIVEIRA, R., ALVES, T. M. A., ZANI, C. L. 2002. Screening and fractionation of plants extract with antiproliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 97 (8):1207-1212.

STAERK, D., LEMMICH, E., CHRISTENSEN, J., KHARAZMI, A., OLSEN, C. E., JEROSZEWSKI, J. 2000. Leishmanicidal, antiplasmodial and cytotoxic activity of indole alkaloids from *Corynanthe pachyceras*. *Planta medica* 66:531-536.

SUNDAR, S. 2002. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 9(5): 951-958.

TADESSE, A., GEBRE-HIWOT, A., ASRES, K., DJOTE, M., FROMMEL, D. 1993. The *in vitro* activity of *Vernonia amygdalina* on *Leishmania aethiopica*. *Ethiopian Medical Journal* 31(3):183-189.

TAESOTIKUL, T., PANTHONG, A., KANJANAPOTHI, D., VERPOORTE, R., SCHEFFER, J. J. 1989. Hippocratic screening of ethanolic extracts from two *Tabernaemontana* species. *Journal of Ethnopharmacology* 27 (1-2): 99-106.

TAYLOR, W.I. 1965. Ibogaine: Chemistry and Physiology. *In: The alkaloids* Vol. 8. Chapter 9. Academic Press. New York, U.S.A. 203 – 227.

TEMPONE, A.G., MARTINEZ, F., MELO, A. C., BARATA DA SILVEIRA, M.A., BRANDT, C.A., DE ANDRADE JR. H.F. 2003. Synthesis of novel quinoline derivatives with a potential antileishmanial activity. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 45 (suppl. 13): 111.

THAKUR, C.P., SINHA, G.P., PANDEY, A.K., BARAT, D., SINHA, P.K. 1993. Amphotericin B in resistant kala-azar in Bihar. *National Medical Journal of India* 6: 57-60.

TOH, S.K., PANG, H. S., CHOO, M., KOMIYAMA, K. 2004. Biologically Active Ibogan and Vallesamine Derivatives from *Tabernaemontana divaricata*. *Chemistry and Biodiversity* 1 (4): 646-656.

TOLEDO, J.S., AMBROSIO, S.R., CERRI, D., Da COSTA, F.B., CRUZ, A.K. 2003. Anti-leishmanicidal activity from *Tithonia diversifolia* leaves extract. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 45 (suppl. 13): 110

TORRES-SANTOS, E.C., LIMA, D., KAPLAN, M.A., MEIRELLES, M.N., ROSSI-BERGMANN, B. 1999. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 43(5): 1234-1241.

TRAVI, B.L., TABARES, C.J., CADENA, H., FERRO, C., OSORIO, Y. 2001. Canine Visceral Leishmaniosis in Colombia: Relationship between clinical and Parasitologic status and Infectivity for Sand Flies. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 64: (3-4) 119-124.

TREMBLAY, M., OLIVIER, R., BERNIER. 1996. *Leishmania* and the pathogenesis of HIV infection. Parasitology Today 7: 257- 261.

VAN BEEK, T. A., VERPOORTE, R., SVENDSEN, A. BAERHEIM, LEEUWENBERG, A. J.M., BISSET, N. G. 1984. *Tabernaemontana* L. (Apocynaceae): A review of its taxonomy, phytochemistry, ethnobotany and pharmacology. Journal of Ethnopharmacology 10 (1): 1-156

VELEZ, I., AGUDELO, S., HENDRICKZ, E. 1997a. Lack of efficacy of allopurinol for Colombian cutaneous leishmaniosis: a randomized controlled trial. Annals of Internal Medicine 126: 232-6.

VELEZ, I., AGUDELO, S., HENDRICKZ, E., PUERTA, J., GROGL, M., MODABBER, F., BERMAN, J. 1997b. Inefficacy of Allopurinol as monotherapy for colombian cutaneous leishmaniasis. Annals of Internal Medicine 126 (3):232-236.

VENNERSTROM, J. L., LOVELACE, J. K., WAITS, V. B., HANSON, W. L., KLAYMAN, D. L. 1990. Berberine derivatives as antileishmanial drugs. *Antimicrobial agents chemotherapy* 34: 918-921.

WAECHTER, A.I., YALUF, G., INCHAUSTI, A., ROJAS, A., HOCQUEMILLER, R., CAVÉ, A., FOURNET, A. 1998. Leishmanicidal and Trypanocidal activities of Acetogenins isolated from *Annona glauca*. *Phytotherapy Research* 12 (8): 541 – 544.

WAECHTER, A.I., BORIES, C., HOCQUEMILLER, R., CAVÉ, A., MUÑOZ, V., FOURNET, A. 1999. Antiprotozoal activity of aporphine alkaloids isolated from *Unonopsis buchtienii* (Annonaceae). *Phytotherapy Research* 12(2): 175 – 177

WEBSTER, L.D. 1991. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Ed. A Godman, Médica Panamericana. México. PP. 982-987.

WEIGEL, M. M.; ARMIJOS, R. X.; RACINES, R. J.; ZURITA, C.; IZURIETA, R.; HERRERA, E. & HINOJSA, E., 1994. Cutaneous leishmaniasis in subtropical Ecuador: Popular perceptions, knowledge, and treatment. *Bulletin of the Panamerican Health Organization* 28:142-155.

WEIGEL, M. M.; ARMIJOS, R. X. 2001. The traditional and conventional medical treatment of cutaneous leishmaniasis in rural Ecuador. *Bulletin of the Panamerican Health Organization* 10(6): 395-404.

WENIGER, B., ROBLEDO, S., ARANGO, G. J., DEHARO, E., ARAGON, R., MUÑOZ, V., CALLAPA, J., LOBSTEIN, A., ANTON, R. 2001. Antiprotozoal activities of Colombian Plants. *Journal of Ethnopharmacology* 78: 193-200.

WOLDAY, D., BERHE, N., AKUFFO, H., BRITTON, S. 1999. *Leishmania*-HIV interaction: immunopathogenic mechanism. *Parasitology Today* 15: 182-187.

XU KELLY, J., IGNATUSHCHENKO, M.V., BOUWER, H.G., PEYTON, D.H., HINRICHS, D.J., WINTER, R.W., RISCOE, M. 2003. Antileishmanial drug development: exploitation of parasite heme dependency. *Molecular and Biochemical Parasitology* 126: 43-49.

YARDLEY, V., CROFT, S. 2000. A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Antimicrobial Agents* 13:243-248.

YOUNG, D. G., LAWYER, P. G. 1987. New World vectors of the leishmaniasis. In: Harris KF, (ed), *Current topics in vector research*. Vol. 4. New York: springer-Verlag.

ZEBALLOS, L., VALDA, L., ROLLADO, F. 1999. Estudio de la Eficacia del Glucantime solo y en combinación con el Allopurinol en el tratamiento de la Leishmaniasis Mucocutánea. *Revista del Instituto Médico Sucre* 64 (114): 12

ZHAI, L., BLOM, J., CHEN, M., CHRISTENSEN, S.B., KHARAZMI, A. 1995. The antileishmanial agent licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39:2742-2748.

ZHAI, L., CHEN, M., BLOM, J., THEANDER, T., BROGGER, S., KHARAZMI, A. 1999. The antileishmanial activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 43: 793-803.

ZILBERSTEIN, D., SHAPIRE, M. 1994. The role of pH and temperature on development of *Leishmania* parasites. *Annual review of Microbiology* 48: 449-470.

ZULUAGA, M., ROBLEDO, S. M. 2004. Las células de Langerhans en la inmunidad a leishmaniasis. *Biomedica* 24:302-317.

10. ANEXOS

Anexo 1. Arbol de *Ervatamia coronaria* (Jaq) Staff. Apocynaceae. Jardín Botánico del Quindío. Colombia



Anexo 2. Flor y fruto de *E. coronaria*



Anexo 3. Maceración en etanol del material vegetal



Anexo 4. Concentración del extracto en rotavapor



Anexo 5. Filtración



Anexo 6. Extracto ácido



Anexo 7. Pruebas Dragendorff



a. Extracto ácido



b. Solución básica



c. Extracto básico

Anexo 8. Revelación de CCD con U.V.



fase móvil diclorometano: metanol 9:1



fase móvil acetato de etilo

Anexo 9. Revelación de CCD con sulfato cérico



fase móvil diclorometano: metanol 9:1

fase móvil acetato de etilo

Anexo 10. Medio NNN modificado con Schneider's



a. Composición Medio NNN

Componente	g/100 mL
Agar nutritivo	1.80
NaCl	0.60
Glucosa	0.60
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	0.006
KH ₂ PO ₄	0.006
Infusión de cerebro corazón (BHI)	2.12
Agua destilada estéril	100 ml

b. Composición Medio Shneider

Componente	g/L
NaPO ₄	0.7
NaHCO ₃	0.4
MgSO ₄	1.80221
KCl	1.6
NaCl	2.1
CaCl ₂	0.6
K ₂ PO ₄	0.45
Extracto de Levadura	2.0
L-Arginina	0.6
Beta -Alanina	0.5
L-Cisteina 2HCl	0.026732
L-Glutamina	1.8
Glicina	0.25
L-Histidina	0.4
L-Isoleucina	0.15
L-Leucina	0.15
L-Metionina	0.15
L- Prolina	1.7
L- Serina	0.25
DL-Valina	0.3
L- Treonina	0.35
L-Triptófano	0.1
L-Tirosina 2Na 2H ₂ O	0.720199
D-Glucosa	2.0
D-Trehalosa	2.0
Ácido Glutámico	0.8
Ácido -L -Aspártico	0.4
Ácido -L-Malico	0.6
Ácido α Cetoglutárico	0.35
Ácido Succínico	0.06
Ácido Fumárico	0.06
L-Lisina	1.65

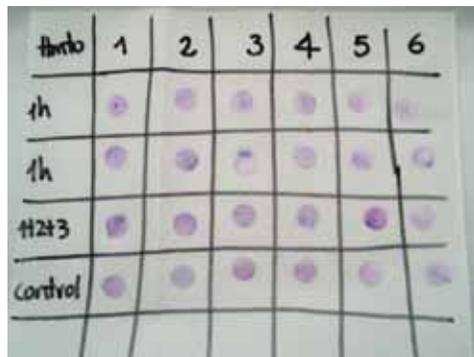
Anexo 11. Composición del Medio RPMI

Componente	g/L
NaPO4	0.8
MgSO4	0.04884
KCl	0.4
NaCl	6.0
FeNO3 4H2O	0.1
L-Arginina	0.2
L-Cistina 2HCL	0.0652
L-Ácido Glutámico	0.02
L- Glutamina	0.3
Glicina	0.01
L-Histidina	0.015
Hidroxi-L-Prolina	0.02
L-isoleucina	0.05
L-Leucina	0.05
L-Lisina HCl	0.04
L-Meteonina	0.015
L-Fenilalanina	0.015
L-Prolina	0.02
L-Serina	0.03
DL-Valina	0.02
L-Treonina	0.02
L-Triptófano	00.005
L-Tirosina 2Na 2H2O	0.02883
D-Glucosa	2.0
D-Biotina	0.0002
L-Asparagina	0.05
Ácido p-aminobenzoico	0.001
Ácido L-Aspartico	0.02
Ácido D-Pantótenico	0.00025
Ácido Fólico	0.001
Cloruro de Colina	0.003
Piridoxina HCl	0.001
Riboflavina	0.0002
Myo-inositol	0.035
Tiamina HCl	0.001
Vitamina B12	0.000005
Glutatione reducido	0.001
HEPES	5.958
Rojo Fenol Na	0.0053

Anexo 12. Caja de 24 pozos con macrófagos J774 adheridos a laminillas e infectados con *L. braziliensis*



Anexo 13. Laminillas coloreadas con Giemsa 10%



Anexo 14. Prueba de viabilidad con azul tripán sobre macrófagos J774



PBS Preparación para 1 litro

NaCl 8g

KCl 0.2g

Na₂HPO₄ 1.44g

KH₂PO₄ 0.24g

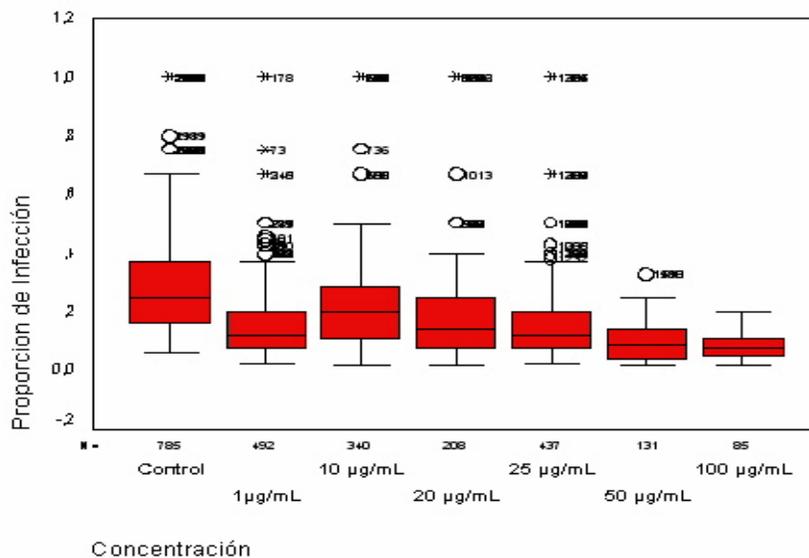
Se completa volumen con agua destilada des-ionizada a 1000 mL, se ajusta pH a 7.4 y se esteriliza.

ANEXO 15. Estadística aplicada a la proporción de infección en cada uno de los tratamientos con SPSS 12.0

a. Adición de compuestos después de 1 hora de infección

Ttmo.	Promed.	Desv. Est.	Error est.	Intervalo para la media 95% confianza		Mín.	Máx.
				Límit.inferior	Límit.superior		
Control	0,30	0,19	6,67E-03	0,29	0,31	0,06	1
1 µg/mL	0,16	0,11	4,99E-03	0,15	0,17	0,03	1
10µg/mL	0,24	0,19	1,05E-02	0,22	0,26	0,02	1
20µg/mL	0,21	0,22	1,53E-02	0,18	0,24	0,02	1
25µg/mL	0,17	0,15	7,02E-03	0,16	0,18	0,02	1
50µg/mL	0,11	0,08	6,84E-03	9,3-02	0,12	0,02	0,33
100µg/mL	0,07	0,04	4,43E-03	6,88E-02	8,66E-02	0,019	0,2
Total	0,21	0,18	3,56E-03	0,21	0,22	0,019	1

Estadística descriptiva para datos de proporción de la infección



Box-plot de la proporción de infección en el grupo control y en los tratamientos de adición de mezcla de alcaloides 1 hora post-infección

Tests of Normality				
	Concentración	Statistic	df	Sig.
Proporcion de Infección	0	,173	785	,000
	1	,157	492	,000
	2	,200	340	,000
	3	,232	208	,000
	4	,188	437	,000
	5	,135	131	,000
	6	,130	85	,001

Test de normalidad Kolmogorov-Smirnov p <0.01

Ranks			
	Concentración	N	Mean Rank
Proporcion de Infección	0	785	1674,13
	1	492	1013,70
	2	340	1340,44
	3	208	1092,24
	4	437	1026,75
	5	131	678,01
	6	85	448,32
	Total	2478	

Test Statistics(a,b)	
	Proporcion de Infección
Chi-Square	579,315
df	6
Asymp. Sig.	,000
a Kruskal Wallis Test	
b Grouping Variable: Concentración	

Test de Kruskal-Wallis p <0.05

Test of Homogeneity of Variances			
Proporcion de Infección			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
30,028	6	2471	,000

Test Levene para homogeneidad de varianzas p <0.05

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: Proporción de Infección						
Tamhane						
(I) Concent.	(J) Concent.	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0	1	,14136678451302(*)	9,4433729152016E-03	,000	,11608381013273	,16664975889331
	2	6,3306637835120E-02(*)	1,0662303626347E-02	,000	2,5338471107414E-02	,10127480456283
	3	9,2631903858820E-02(*)	1,2807288706817E-02	,000	4,1496673677628E-02	,14376713404001
	4	,12949008459722(*)	9,8018742680088E-03	,000	,10007114710973	,15890902208471
	5	,19286310695743(*)	1,5499808478861E-02	,000	,16373881831099	,22198739560386
	6	,22247488473332(*)	1,8752725924494E-02	,000	,19811377057532	,24683599889132
1	0	,14136678451302(*)	9,4433729152016E-03	,000	,16664975889331	,11608381013273
	2	7,80601466779006E-02(*)	1,1582137714932E-02	,000	,11360151513091	4,25187782248916E-02
	3	4,87348806542013E-02	1,3582630063688E-02	,057	9,81154372661209E-02	6,4567595771842E-04
	4	1,18766999157980E-02	1,0795273715524E-02	,979	3,80698134409607E-02	1,4316413609365E-02
	5	5,1496322444405E-02(*)	1,6146369818278E-02	,000	2,5602138655205E-02	7,7390506233606E-02
	6	8,1108100220297E-02(*)	1,9290565700010E-02	,000	6,0741953794827E-02	,10147424664577
2	0	6,33066378351202E-02(*)	1,0662303626347E-02	,000	,10127480456283	2,53384711074137E-02
	1	7,8060146677901E-02(*)	1,1582137714932E-02	,000	4,2518778224892E-02	,11360151513091
	3	2,9325266023699E-02	1,4456668566854E-02	,925	2,74546047713658E-02	8,6105136818765E-02
	4	6,6183446762103E-02(*)	1,1876251984441E-02	,000	2,7619275885843E-02	,10474761763836
	5	,12955646912231(*)	1,6888241024851E-02	,000	9,1247639053233E-02	,16786529919138
	6	,15916824689820(*)	1,9915655942782E-02	,000	,12428977959957	,19404671419683
3	0	9,26319038588196E-02(*)	1,2807288706817E-02	,000	,14376713404001	4,14966736776280E-02

	1	4,8734880654201E-02	1,3582630063688E-02	,057	6,45675957718424E-04	9,8115437266121E-02
	2	2,93252660236994E-02	1,4456668566854E-02	,925	8,61051368187646E-02	2,7454604771366E-02
	4	3,6858180738403E-02	1,3834279402892E-02	,469	1,47130832922558E-02	8,8429444769062E-02
	5	,10023120309861(*)	1,8318149751348E-02	,000	4,8862751219572E-02	,15159965497764
	6	,12984298087450(*)	2,1141789825618E-02	,000	8,0938086287491E-02	,17874787546151
	4	0	,12949008459722(*)	9,8018742680088E-03	,000	,15890902208471
1		1,1876699915798E-02	1,0795273715524E-02	,979	1,43164136093647E-02	3,8069813440961E-02
2		6,61834467621026E-02(*)	1,1876251984441E-02	,000	,10474761763836	2,76192758858428E-02
3		3,68581807384033E-02	1,3834279402892E-02	,469	8,84294447690623E-02	1,4713083292256E-02
5		6,3373022360203E-02(*)	1,6358627859906E-02	,000	3,3468247577172E-02	9,3277797143234E-02
6		9,2984800136095E-02(*)	1,9468573963613E-02	,000	6,7681229744509E-02	,11828837052768
5	0	,19286310695743(*)	1,5499808478861E-02	,000	,22198739560386	,16373881831099
	1	5,14963224444054E-02(*)	1,6146369818278E-02	,000	7,73905062336055E-02	2,56021386552052E-02
	2	,12955646912231(*)	1,6888241024851E-02	,000	,16786529919138	9,12476390532332E-02
	3	,10023120309861(*)	1,8318149751348E-02	,000	,15159965497764	4,88627512195718E-02
	4	6,33730223602034E-02(*)	1,6358627859906E-02	,000	9,32777971432345E-02	3,34682475771723E-02
	6	2,9611777775892E-02(*)	2,2873405865594E-02	,007	4,6022443084864E-03	5,4621311243298E-02
6	0	,22247488473332(*)	1,8752725924494E-02	,000	,24683599889132	,19811377057532
	1	8,11081002202975E-02(*)	1,9290565700010E-02	,000	,10147424664577	6,07419537948269E-02
	2	,15916824689820(*)	1,9915655942782E-02	,000	,19404671419683	,12428977959957
	3	,12984298087450(*)	2,1141789825618E-02	,000	,17874787546151	8,0938086287491

						0E-02
4	9,29848001360955E-02(*)	1,9468573963613E-02	,000	,11828837052768	-	6,76812297445089E-02
5	2,96117777758921E-02(*)	2,2873405865594E-02	,007	5,46213112432978E-02	-	4,60224430848641E-03

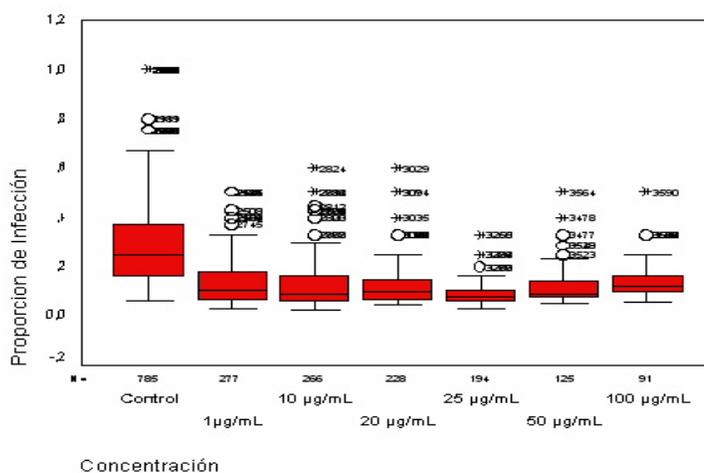
* The mean difference is significant at the .05 level.

Prueba de comparaciones múltiples Kruskal-Wallis. $p < 0.05$

b. Adición de compuestos diariamente durante 3 días

Ttmt.	Promed.	Desv. Est.	Error est.	Intervalo para la media 95% confianza		Mín.	Máx.
				Limit.inferior	Limit.superior		
Control	0,3	0,19	6,66E-03	0,29	0,31	0,06	1
1 µg/mL	0,14	0,10	6,24E-03	0,13	0,15	0,03	0,5
10µg/mL	0,13	9,64E-02	5,91E-03	0,11	0,14	0,02	0,6
20µg/mL	0,12	8,33E-02	5,51E-03	0,11	0,13	0,04	0,6
25µg/mL	9,2E-02	4,91E-02	3,53E-03	8,53E-02	9,91E-02	0,03	0,33
50µg/mL	0,12	6,78E-02	6,07E-03	0,11	0,13	0,05	0,5
100µg/mL	0,15	7,6E-02	7,98E-03	0,14	0,1	0,05	0,5
Total	0,195	0,16	3,63E-03	0,18	0,20	0,02	1

Estadística descriptiva de datos de proporción de la infección



Box-plot de la proporción de infección en el grupo control y en los tratamientos de adición de mezcla de alcaloides diariamente durante 3 días.

Tests of Normality				
	Concentración	Statistic	df	Sig.
Proporcion de Infección	Control	,173	785	,000
	1µg/mL	,173	277	,000
	10 µg/mL	,188	266	,000
	20 µg/mL	,179	228	,000
	25 µg/mL	,170	194	,000
	50 µg/mL	,199	125	,000
	100 µg/mL	,219	91	,000

Test de normalidad Kolmogorov-Smirnov p <0.01

Ranks			
	Concentración	N	Mean Rank
Proporcion de Infección	Control	785	1411,01
	1µg/mL	277	775,06
	10 µg/mL	266	682,45
	20 µg/mL	228	685,97
	25 µg/mL	194	509,26
	50 µg/mL	125	710,75
	100 µg/mL	91	941,27
	Total	1966	

Test Statistics(a,b)	
	Proporcion de Infección
Chi-Square	786,633
df	6
Asymp. Sig.	,000

Test de Kruskal-Wallis p <0.05

Test of Homogeneity of Variances			
Proporcion de Infección			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
66,560	6	1959	,000

Test Levene para homogeneidad de varianzas p <0.05

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: Proporción de Infección						
Tamhane						
		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
(I) Concentración	(J) Concentración				Lower Bound	Upper Bound
Control		,15881496104706(*)	9,4632966257500E-03	,000		
	10 µg/mL	,17458985476487(*)	9,6068413579845E-03			,20167132445908
	20 µg/mL	,17886570382800(*)	02		,15256511890447	,20516628875154
	25 µg/mL		02	,000	,18511141805806	,23095046301882
			1,3040245541343E-02	,000	,15408074680695	,20901940438246
		,14799937091772(*)	1,4995171470055E-02	,000	,11615641610726	
1µg/mL	Control	-,15881496104706(*)	9,4632966257500E-03	,000	-,18656641724604	-,13106350484808
	10 µg/mL	1,5774893717803E-02	1,1624495660022E-02	,767	1,03959549234227E-02	4,1945742359028E-02
	20 µg/mL	2,0050742780941E-02	1,2108582044012E-02	,293	5,31396564138589E-03	4,5415451203268E-02
	25 µg/mL	4,9215979491377E-02(*)	1,2677237067086E-02	,000	2,7361266407883E-02	7,1070692574870E-02
	50 µg/mL	2,2735114547643E-02	1,4590596363786E-02	,180	3,84114552426745E-03	4,9311374619553E-02
	100 µg/mL	1,08155901293470E-02	1,6361316141703E-02	,999	4,18932622859372E-02	2,0262082027243E-02
10 µg/mL	Control	-,17458985476487(*)	9,6068413579845E-03	,000	-,20167132445908	-,14750838507065
	1µg/mL	1,57748937178028E-02	1,1624495660022E-02	,767	4,19457423590284E-02	1,0395954923423E-02
	20 µg/mL	4,2758490631383E-03	1,2221095571475E-02	1,000	2,03551890855826E-02	2,8906887211859E-02
	25 µg/mL	3,3441085773574E-02(*)	1,2784747064594E-02	,000	1,2445951981415E-02	5,4436219565732E-02
	50 µg/mL	6.9602208298399E-	1.4684104334329E-	1.000	-	3.2841666228436E-

			03	02		1,89212245687566E-02	02
	100 µg/mL	2,65904838471498E-02	1,6444758549133E-02	,156	5,70851542536210E-02	3,9041865593213E-03	
20 µg/mL	Control	-,17886570382800(*)	1,0187259722034E-02	,000	-,20516628875154	-,15256511890447	
	1 µg/mL	2,00507427809411E-02	1,2108582044012E-02	,293	4,54154512032681E-02	5,3139656413859E-03	
	10 µg/mL	4,27584906313830E-03	1,2221095571475E-02	1,000	2,89068872118592E-02	2,0355189085583E-02	
	25 µg/mL	2,9165236710436E-02(*)	1,3226436302813E-02	,000	9,1858349815170E-03	4,9144638439354E-02	
	50 µg/mL	2,6843717667016E-03	1,5070228261979E-02	1,000	2,23869213528262E-02	2,7755664886229E-02	
	100 µg/mL	3,08663329102881E-02(*)	1,6790442028309E-02	,036	6,06865227550801E-02	1,04614306549623E-03	
25 µg/mL	Control	-,20803094053844(*)	1,0857018061269E-02	,000	-,23095046301882	-,18511141805806	
	1 µg/mL	4,92159794913768E-02(*)	1,2677237067086E-02	,000	7,10706925748702E-02	2,73612664078833E-02	
	10 µg/mL	3,34410857735739E-02(*)	1,2784747064594E-02	,000	5,44362195657324E-02	1,24459519814155E-02	
	20 µg/mL	2,91652367104356E-02(*)	1,3226436302813E-02	,000	4,91446384393543E-02	9,18583498151702E-03	
	50 µg/mL	2,64808649437341E-02(*)	1,5530819695261E-02	,004	4,80290656812857E-02	4,93266420618240E-03	
	100 µg/mL	6,00315696207238E-02(*)	1,7205043564157E-02	,000	8,70186663547913E-02	3,30444728866562E-02	
50 µg/mL	Control	-,18155007559471(*)	1,3040245541343E-02	,000	-,20901940438246	-,15408074680695	
	1 µg/mL	2,27351145476427E-02	1,4590596363786E-02	,180	4,93113746195529E-02	3,8411455242674E-03	
	10 µg/mL	6,96022082983988E-03	1,4684104334329E-02	1,000	3,28416662284364E-02	1,8921224568757E-02	
	20 µg/mL	2,68437176670158E-03	1,5070228261979E-02	1,000	2,77556648862293E-02	2,2386921352826E-02	
	25 µg/mL	2,6480864943734E-02(*)	1,5530819695261E-02	,004	4,9326642061824E-03	4,8029065681286E-02	
	100 µg/mL	3,35507046769897E-02(*)	1,8659761162468E-02	,021	6,43741304512176E-02	2,72727890276182E-03	

100 µg/mL	Control	-,14799937091772(*)	1,4995171470055E-02	,000	-,17984232572818	-,11615641610726
	1µg/mL	1,0815590129347E-02	1,6361316141703E-02	,999	2,02620820272432E-02	4,1893262285937E-02
	10 µg/mL	2,6590483847150E-02	1,6444758549133E-02	,156	3,90418655932128E-03	5,7085154253621E-02
	20 µg/mL	3,0866332910288E-02(*)	1,6790442028309E-02	,036	1,0461430654962E-03	6,0686522755080E-02
	25 µg/mL	6,0031569620724E-02(*)	1,7205043564157E-02	,000	3,3044472886656E-02	8,7018666354791E-02
	50 µg/mL	3,3550704676990E-02(*)	1,8659761162468E-02	,021	2,7272789027618E-03	6,4374130451218E-02
* The mean difference is significant at the .05 level.						

Prueba de comparaciones Kruskal-Wallis. $p < 0.05$

Anexo 16. Estadística aplicada al índice de supervivencia en cada uno de los tratamientos con SPSS 12.0

a. Adición de compuestos después de 1 hora de infección

Ttmtó.	Promed.	Desv. Est.	Error est.	Intervalo para la media 95% confianza		Mín.	Máx.
				Limit.inferior	Limit.superior		
Control	45.3	42	1.49	43.36	48.24	6.67	420
1 µg/mL	21.54	21.69	0.98	19.62	23.47	2.63	300
10µg/mL	32.4	32.9	1.78	28.89	35.91	2.72	300
20µg/mL	26.75	32.56	2.26	22.3	31.2	2	200
25µg/mL	22.93	23.15	1.11	20.75	25.1	2.63	200
50µg/mL	13.81	11.52	1.01	11.82	15.8	2.08	50
100µg/mL	8.80	5.42	0.59	7.63	9.97	1.92	25
Total	30.39	33.45	0.67	29.01	31.71	1.92	420

Estadística descriptiva de datos de supervivencia del parásito con cada uno de los tratamientos

Tests of Normality				
		Kolmogorov-Smirnov(a)		
	Concentración	Statistic	df	Sig.
Supervivencia	Control	,207	785	,000
	1 µg/mL	,202	492	,000
	10 µg/mL	,209	340	,000
	20 µg/mL	,257	208	,000
	25 µg/mL	,217	437	,000
	50 µg/mL	,164	131	,000
	100 µg/mL	,161	85	,000

a Lilliefors Significance Correction

Test de normalidad Kolmogorov-Smirnov p <0.01

Ranks			
	Concentración	N	Mean Rank
Supervivencia	Control	785	1658,70
	1 µg/mL	492	1038,37
	10 µg/mL	340	1319,04
	20 µg/mL	208	1068,90
	25 µg/mL	437	1048,52
	50 µg/mL	131	706,18
	100 µg/mL	85	435,39
	Total	2478	

Test Statistics(a,b)	
	Supervivencia
Chi-Square	536,745
df	6
Asymp. Sig.	,000
a Kruskal Wallis Test	
b Grouping Variable: Concentración	

Test de Kruskal-Wallis p <0.05

Test of Homogeneity of Variances			
Supervivencia			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
31,573	6	2471	,000

Test Levene para homogenidad de varianzas p <0.05

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: Supervivencia						
Tamhane						
(I) Concentración	(J) Concentración	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Control	1 µg/mL	23,7568997940831(*)	1,81229285359254	,000	18,32037195542573	29,19342763274047
	10 µg/mL	12,9000594320098(*)	2,04621980285850	,000	5,81359882376936	19,98652004025030
	20 µg/mL	18,5522703557636(*)	2,45786733253941	,000	10,28750845300227	26,81703225852500
	25 µg/mL	22,3752042996774(*)	1,88109342363567	,000	16,71381635995168	28,03659223940315
	50 µg/mL	31,4867665244385(*)	2,97459312372118	,000	25,99447415625214	36,97905889262487
	100 µg/mL	36,4967757253798(*)	3,59886573192830	,000	31,60083256698295	41,39271888377676
1 µg/mL	Control	-23,756899794083(*)	1,81229285359254	,000	29,19342763274047	-
	10 µg/mL	-10,856840362073(*)	2,22274663921254	,000	17,05357927957555	-4,66010144457098
	20 µg/mL	-5,20462943831946	2,60666433682681	,529	12,72725626300712	2,31799738636819
	25 µg/mL	-1,38169549440568	2,07173830610087	1,000	-5,87243480195650	3,10904381314513
	50 µg/mL	7,72986673035541(*)	3,09867574815592	,000	3,44883724458784	12,01089621612298
	100 µg/mL	12,7398759312967(*)	3,70208342652731	,000	9,26404868626182	16,21570317633170
10 µg/mL	Control	-12,900059432009(*)	2,04621980285850	,000	19,98652004025030	-5,81359882376936
	1 µg/mL	10,8568403620732(*)	2,22274663921254	,000	4,66010144457098	17,05357927957555
	20 µg/mL	5,65221092375380	2,77440246887730	,660	-3,11976538952201	14,42418723702962
	25 µg/mL	9,47514486766758(*)	2,27919058075305	,000	3,08157849427940	15,86871124105577
	50 µg/mL	18,5867070924286(*)	3,24104944217724	,000	12,34273769966586	24,83067648519149
	100 µg/mL	23,5967162933700(*)	3,82204549834194	,000	17,86515876810050	29,32827381863955
20 µg/mL	Control	-18,552270355763(*)	2,45786733253941	,000	26,81703225852500	10,28750845300227
	1 µg/mL	5,20462943831946	2,60666433682681	,529	-2,31799738636819	12,72725626300712
	10 µg/mL	-5,65221092375380	2,77440246887730	,660	14,42418723702962	3,11976538952201
	25 µg/mL	3,82293394391378	2,65495876543262	,946	-3,86093300377876	11,50680089160632
	50 µg/mL	12,9344961686748(*)	3,51546552100735	,000	5,37459524678111	20,49439709056863
	100 µg/mL	17,9445053696162(*)	4,05735481984877	,000	10,79645255924767	25,09255817998478
25 µg/mL	Control	-22,375204299677(*)	1,88109342363567	,000	28,03659223940315	16,71381635995168

	1µg/mL	1,38169549440568	2,07173830610087	1,000	-3,10904381314513	5,87243480195650
	10 µg/mL	-9,4751448676675(*)	2,27919058075305	,000	15,86871124105577	-3,08157849427940
	20 µg/mL	-3,82293394391378	2,65495876543262	,946	11,50680089160632	3,86093300377876
	50 µg/mL	9,11156222476109(*)	3,13941052961737	,000	4,54913727720339	13,67398717231879
	100 µg/mL	14,1215714257024(*)	3,73624527811424	,000	10,30162061753928	17,94152223386561
50 µg/mL	Control	-31,486766524438(*)	2,97459312372118	,000	36,97905889262487	25,99447415625214
	1µg/mL	-7,7298667303554(*)	3,09867574815592	,000	12,01089621612298	-3,44883724458784
	10 µg/mL	-18,586707092428(*)	3,24104944217724	,000	24,83067648519149	12,34273769966586
	20 µg/mL	-12,934496168674(*)	3,51546552100735	,000	20,49439709056863	-5,37459524678111
	25 µg/mL	-9,1115622247610(*)	3,13941052961737	,000	13,67398717231879	-4,54913727720339
	100 µg/mL	5,01000920094135(*)	4,38967203347527	,001	1,43040106246502	8,58961733941768
100 µg/mL	Control	-36,496775725379(*)	3,59886573192830	,000	41,39271888377676	31,60083256698295
	1µg/mL	-12,739875931296(*)	3,70208342652731	,000	16,21570317633170	-9,26404868626182
	10 µg/mL	-23,596716293370(*)	3,82204549834194	,000	29,32827381863955	17,86515876810050
	20 µg/mL	17,94450536961622(*)	4,05735481984877	,000	25,09255817998478	10,79645255924767
	25 µg/mL	14,12157142570244(*)	3,73624527811424	,000	17,94152223386561	10,30162061753928
	50 µg/mL	-5,01000920094135(*)	4,38967203347527	,001	-8,58961733941768	-1,43040106246502

* The mean difference is significant at the .05 level.

Prueba de comparaciones múltiples Kruskal-Wallis. $p < 0.05$

b. Adición de compuestos diariamente durante 3 días

Ttmt.	Promed.	Desv. Est.	Error est.	Intervalo para la media 95% confianza		Mín.	Máx.
				Limit.inferiorf	Limit.superior		
Control	45.3	42	1.5	42.36	48.24	6.67	420
1 µg/mL	20.26	19.53	1.17	17.95	22.57	3.12	150
10µg/mL	17	16.46	1.01	15.03	19.01	2.38	160
20µg/mL	14.87	12.62	0.84	13.23	16.52	4.76	80
25µg/mL	10.68	6.4	0.46	9.77	11.58	5.57	41.67
50µg/mL	14.15	9	0.8	12.56	15.75	5.26	50
100µg/mL	16.38	7.87	0.82	14.74	18.02	5.55	50
Total	27.68	32.2	0.73	26.26	29.11	2.36	420

Estadística descriptiva de datos de supervivencia del parásito con cada uno de los tratamientos

Tests of Normality				
		Kolmogorov-Smirnov(a)		
	Concentración	Statistic	df	Sig.
Supervivencia	Control	,207	785	,000
	1 µg/mL	,190	277	,000
	10 µg/mL	,197	266	,000
	20 µg/mL	,213	228	,000
	25 µg/mL	,176	194	,000
	50 µg/mL	,197	125	,000
	100 µg/mL	,187	91	,000

a Lilliefors Significance Correction

Test de normalidad Kolmogorov-Smirnov p <0.01

Test of Homogeneity of Variances Supervivencia			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
57,550	6	1959	,000

Test Levene para homogenidad de varianzas p <0.05

Multiple Comparisons Dependent Variable: Supervivencia Tamhane						
(I) Concentración	(J) Concentración	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Control	1 µg/mL	25,04262256030051(*)	2,00993167886561	,000	19,25715414639041	30,82809097421061
	10 µg/mL	28,28228957528377(*)	2,04041947989969	,000	22,79092707070652	33,77365207986103
	20 µg/mL	30,42732019906596(*)	2,16369589223625	,000	25,21120677559429	35,64343362253764
	25 µg/mL	34,62375054061190(*)	2,30594743062178	,000	29,85731541699673	39,39018566422706
	50 µg/mL	31,14846006147340(*)	2,76964821565597	,000	25,97432536680616	36,32259475614065
	100 µg/mL	28,91952307248606(*)	3,18485950082925	,000	23,71429852978942	34,12474761518269
1 µg/mL	Control	25,04262256030051(*)	2,00993167886561	,000	30,82809097421061	19,25715414639041
	10 µg/mL	3,23966701498326	2,46895379083212	,545	-1,47392369192803	7,95325772189455
	20 µg/mL	5,38469763876545(*)	2,57177002886927	,004	,99431628296535	9,77507899456555
	25 µg/mL	9,58112798031139(*)	2,69254799773400	,000	5,73373771324231	13,42851824738046
	50 µg/mL	6,10583750117289(*)	3,09893084882456	,000	1,76406318997237	10,44761181237341

	100 µg/mL	3,87690051218555	3,47501815928097	,141	-,50306086955692	8,25686189392802
10 µg/mL	Control	28,28228957528377(*)	2,04041947989969	,000	33,77365207986103	22,79092707070652
	1µg/mL	-3,23966701498326	2,46895379083212	,545	-7,95325772189455	1,47392369192800
	20 µg/mL	2,14503062378219	2,59566703982557	,896	-1,84797183687980	6,13803308444418
	25 µg/mL	6,34146096532813(*)	2,71538229727381	,000	2,95658494381221	9,72633698684404
	50 µg/mL	2,86617048618963	3,11879122514526	,438	-1,07411612372004	6,80645709609931
	100 µg/mL	,63723349720228	3,49274068713655	1,000	-3,34615700482726	4,62062399923183
	20 µg/mL	Control	30,42732019906596(*)	2,16369589223625	,000	35,64343362253764
1µg/mL		-5,38469763876545(*)	2,57177002886927	,004	-9,77507899456555	-,99431628296535
10 µg/mL		-2,14503062378219	2,59566703982557	,896	-6,13803308444418	1,84797183687980
25 µg/mL		4,19643034154594(*)	2,80919370647058	,000	1,28325580242757	7,10960488066430
50 µg/mL		,72113986240744	3,20080098821670	1,000	-2,82543605444844	4,26771577926332
100 µg/mL		-1,50779712657990	3,56616120887784	,991	-5,10373664217594	2,08814238901614
25 µg/mL		Control	34,62375054061190(*)	2,30594743062178	,000	39,39018566422706
	1µg/mL	-9,58112798031139(*)	2,69254799773400	,000	13,42851824738046	-5,73373771324231
	10 µg/mL	-6,34146096532813(*)	2,71538229727381	,000	-9,72633698684404	-2,95658494381221
	20 µg/mL	-4,19643034154594(*)	2,80919370647058	,000	-7,10960488066430	-1,28325580242757
	50 µg/mL	-3,47529047913850(*)	3,29862707878295	,005	-6,32218905238021	-,62839190589678
	100 µg/mL	-5,70422746812584(*)	3,65421939768485	,000	-8,61790746633118	-2,79054746992050
	50 µg/mL	Control	31,14846006147340(*)	2,76964821565597	,000	36,32259475614065
1µg/mL		-6,10583750117289(*)	3,09893084882456	,000	10,44761181237341	-1,76406318997237
10 µg/mL		-2,86617048618963	3,11879122514526	,438	-6,80645709609931	1,07411612372004
20 µg/mL		-,72113986240744	3,20080098821670	1,000	-4,26771577926332	2,82543605444844
25 µg/mL		3,47529047913850(*)	3,29862707878295	,005	,62839190589678	6,32218905238021
100 µg/mL		-2,22893698898735	3,96319026695808	,693	-5,76827336436308	1,31039938638839
100 µg/mL		Control	28,91952307248606(*)	3,18485950082925	,000	34,12474761518269
	1µg/mL	-3,87690051218555	3,47501815928097	,141	-8,25686189392802	,50306086955692
	10 µg/mL	-,63723349720228	3,49274068713655	1,000	-4,62062399923183	3,34615700482726
	20 µg/mL	1,50779712657990	3,56616120887784	,991	-2,08814238901614	5,10373664217594
	25 µg/mL	5,70422746812584(*)	3,65421939768485	,000	2,79054746992050	8,61790746633118
	50 µg/mL	2,22893698898735	3,96319026695808	,693	-1,31039938638839	5,76827336436308

* The mean difference is significant at the .05 level.

Prueba de comparaciones múltiples Kruskal-Wallis. $p < 0.05$

Anexo 17. Estadística aplicada al porcentaje de supervivencia del parásito en la forma promastigota, en cada uno de los tratamientos con SPSS 12.0

Tests of Normality(b)				
		Kolmogorov-Smirnov(a)		
	VAR00006	Statistic	df	Sig.
VAR00005	,00	,253	3	,
	1,00	,385	3	,
	2,00	,181	3	,
	3,00	,253	3	,
	4,00	,385	3	,
	5,00	,385	3	,
a Lilliefors Significance Correction				

Test de normalidad Kolmogorov-Smirnov p <0.01

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
VAR00005	,242	21	,002	,800	21	,010(**)
** This is an upper bound of the true significance.						
a Lilliefors Significance Correction						

Test Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk p <0.01

Ranks			
	VAR00006	N	Mean Rank
VAR00005	,00	3	18,67
	1,00	3	18,33
	2,00	3	14,00
	3,00	3	11,00
	4,00	3	8,00
	5,00	3	4,50
	6,00	3	2,50
	Total		21

Test Statistics(a,b)	
VAR00005	
Chi-Square	19,258
df	6
Asymp. Sig.	,004
Exact Sig.	,000
Point Probability	,000
a Kruskal Wallis Test	
b Grouping Variable: VAR00006	

Test de Kruskal-Wallis $p < 0.05$

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: VAR00005						
Tamhane						
		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
(I) VAR00006	(J) VAR00006				Lower Bound	Upper Bound
,00	1,00	,3333	4,2164	1,000	-76,3455	77,0122
	2,00	29,3333	4,2164	,323	-22,5907	81,2574
	3,00	43,3333	4,2164	,236	-52,4764	139,1431
	4,00	48,6667	4,2164	,202	-51,5798	148,9131
	5,00	51,3333	4,2164	,194	-53,8404	156,5070
	6,00	52,0000	4,2164	,194	-54,9369	158,9369
1,00	,00	-,3333	4,2164	1,000	-77,0122	76,3455
	2,00	29,0000	4,2164	,423	-51,9973	109,9973
	3,00	43,0000(*)	4,2164	,004	25,3216	60,6784
	4,00	48,3333(*)	4,2164	,006	27,2768	69,3898
	5,00	51,0000(*)	4,2164	,015	22,1164	79,8836
	6,00	51,6667(*)	4,2164	,022	17,9847	85,3486
2,00	,00	-29,3333	4,2164	,323	-81,2574	22,5907
	1,00	-29,0000	4,2164	,423	-109,9973	51,9973
	3,00	14,0000	4,2164	,935	-86,0766	114,0766
	4,00	19,3333	4,2164	,782	-85,0786	123,7453
	5,00	22,0000	4,2164	,705	-87,1926	131,1926
	6,00	22,6667	4,2164	,688	-88,2284	133,5617
3,00	,00	-43,3333	4,2164	,236	-139,1431	52,4764
	1,00	-43,0000(*)	4,2164	,004	-60,6784	-25,3216
	2,00	-14,0000	4,2164	,935	-114,0766	86,0766
	4,00	5,3333	4,2164	,193	-2,7569	13,4236

	5,00	8,0000	4,2164	,121	-3,5347	19,5347
	6,00	8,6667	4,2164	,194	-9,1562	26,4895
4,00	,00	-48,6667	4,2164	,202	-148,9131	51,5798
	1,00	-48,3333(*)	4,2164	,006	-69,3898	-27,2768
	2,00	-19,3333	4,2164	,782	-123,7453	85,0786
	3,00	-5,3333	4,2164	,193	-13,4236	2,7569
	5,00	2,6667	4,2164	,562	-4,6515	9,9849
	6,00	3,3333	4,2164	,554	-10,1395	16,8061
5,00	,00	-51,3333	4,2164	,194	-156,5070	53,8404
	1,00	-51,0000(*)	4,2164	,015	-79,8836	-22,1164
	2,00	-22,0000	4,2164	,705	-131,1926	87,1926
	3,00	-8,0000	4,2164	,121	-19,5347	3,5347
	4,00	-2,6667	4,2164	,562	-9,9849	4,6515
	6,00	,6667	4,2164	,986	-6,0697	7,4031
6,00	,00	-52,0000	4,2164	,194	-158,9369	54,9369
	1,00	-51,6667(*)	4,2164	,022	-85,3486	-17,9847
	2,00	-22,6667	4,2164	,688	-133,5617	88,2284
	3,00	-8,6667	4,2164	,194	-26,4895	9,1562
	4,00	-3,3333	4,2164	,554	-16,8061	10,1395
	5,00	-,6667	4,2164	,986	-7,4031	6,0697

* The mean difference is significant at the .05 level.

Prueba de comparaciones múltiples Kruskal-Wallis. $p < 0.05$

Anexo 18. Estadística aplicada a valores de viabilidad en ensayo de citotoxicidad en macrófagos J774, en cada uno de los tratamientos con SPSS 12.0

Tests of Normality						
	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
VAR00001	,233	29	,000	,881	29	,010(**)

** This is an upper bound of the true significance.

Test Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk $p < 0.01$

Test of Homogeneity of Variances			
VAR00001			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1,977	6	22	,113

Test Levene para homogeneidad de varianzas $p < 0.05$

Test Statistics(a,b,c)	
	VAR00001
Chi-Square	23,188
df	6
Asymp. Sig.	,001
a Kruskal Wallis Test	
b Grouping Variable: VAR00004	
c Some or all exact significances cannot be computed because there is insufficient memory.	

Test de Kruskal-Wallis p <0.05

Multiple Comparisons						
Dependent Variable: VAR00001						
Tamhane						
		Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
(I) VAR00004	(J) VAR00004				Lower Bound	Upper Bound
,00	1,00	-7,1500	9,6108	1,000	-72,1938	57,8938
	2,00	9,3500	9,6108	1,000	-55,2915	73,9915
	3,00	62,3500	9,6108	,092	-10,9269	135,6269
	4,00	64,8500	9,6108	,063	-3,5313	133,2313
	5,00	77,3500(*)	9,6108	,030	8,4320	146,2680
	6,00	69,3500	9,6108	,054	-1,1832	139,8832
1,00	,00	7,1500	9,6108	1,000	-57,8938	72,1938
	2,00	16,5000	10,1306	,984	-37,6840	70,6840
	3,00	69,5000(*)	10,1306	,038	5,5754	133,4246
	4,00	72,0000(*)	10,1306	,016	17,5111	126,4889
	5,00	84,5000(*)	10,1306	,009	29,2070	139,7930
	6,00	76,5000(*)	10,1306	,018	18,4381	134,5619
2,00	,00	-9,3500	9,6108	1,000	-73,9915	55,2915
	1,00	-16,5000	10,1306	,984	-70,6840	37,6840
	3,00	53,0000	10,1306	,074	-6,7094	112,7094
	4,00	55,5000(*)	10,1306	,035	4,6427	106,3573
	5,00	68,0000(*)	10,1306	,016	16,4422	119,5578
	6,00	60,0000(*)	10,1306	,034	5,9267	114,0733
3,00	,00	-62,3500	9,6108	,092	-135,6269	10,9269
	1,00	-69,5000(*)	10,1306	,038	-133,4246	-5,5754
	2,00	-53,0000	10,1306	,074	-112,7094	6,7094

	4,00	2,5000	10,1306	1,000	-23,9439	28,9439
	5,00	15,0000	10,1306	,334	-9,8974	39,8974
	6,00	7,0000	10,1306	,947	-13,9234	27,9234
4,00	,00	-64,8500	9,6108	,063	-133,2313	3,5313
	1,00	-72,0000(*)	10,1306	,016	-126,4889	-17,5111
	2,00	-55,5000(*)	10,1306	,035	-106,3573	-4,6427
	3,00	-2,5000	10,1306	1,000	-28,9439	23,9439
	5,00	12,5000	10,1306	,736	-14,7834	39,7834
	6,00	4,5000	10,1306	1,000	-21,5594	30,5594
5,00	,00	-77,3500(*)	9,6108	,030	-146,2680	-8,4320
	1,00	-84,5000(*)	10,1306	,009	-139,7930	-29,2070
	2,00	-68,0000(*)	10,1306	,016	-119,5578	-16,4422
	3,00	-15,0000	10,1306	,334	-39,8974	9,8974
	4,00	-12,5000	10,1306	,736	-39,7834	14,7834
	6,00	-8,0000	10,1306	,972	-33,0282	17,0282
6,00	,00	-69,3500	9,6108	,054	-139,8832	1,1832
	1,00	-76,5000(*)	10,1306	,018	-134,5619	-18,4381
	2,00	-60,0000(*)	10,1306	,034	-114,0733	-5,9267
	3,00	-7,0000	10,1306	,947	-27,9234	13,9234
	4,00	-4,5000	10,1306	1,000	-30,5594	21,5594
	5,00	8,0000	10,1306	,972	-17,0282	33,0282
* The mean difference is significant at the .05 level.						

Prueba de comparaciones múltiples Kruskal-Wallis. $p < 0.05$

Anexo 19. DL₅₀ para los datos obtenidos en el ensayo de citotoxicidad con azul tripán sobre macrófagos J774, mediante Probit.

Maximum log-likelihood -151.07847

	parameter	standard error	t ratio
concentr	-1.8360564	.18214755	-10.080050
SLOPE	.77525324	.13422944	5.7755828

Variance-Covariance matrix

	concentr	SLOPE
concentr	.3317773E-01	-.2186786E-01
SLOPE	-.2186786E-01	.1801754E-01

Chi-squared goodness of fit test

preparation	subjects	responses	expected	deviation	probability	
concentr	117.	7.	3.881	3.119	.033175	
	100.	8.	14.439	-6.439	.144390	
		47.	5.	9.588	-4.588	.203997
	45.	12.	10.167	1.833	.225936	
	32.	12.	9.661	2.339	.301907	
	40.	19.	15.504	3.496	.387611	

chi-square 11.230 degrees of freedom 4 heterogeneity 2.8076
 We will use only the probabilities for which g is less than 0.5

Effective Doses

	dose	limits	0.90	0.95	0.99
LD10 concentr	5.19106	lower	.51939		
		upper	12.51555		
LD50 concentr	233.52	lower	67.972		
		upper	21623.		
LD90 concentr	10505.	lower	809.45		
		upper	.41054E+09		

Anexo 20. IC₅₀ para los datos obtenidos en el ensayo de actividad anti-amastigote, mediante análisis Probit.

1 HORA POST-INFECCION

Concentración	Repeticiones			X	% Muertos
	1	2			
Control	127	123		125,0	0,00
1	57	66		61,5	50,80
10	55	16		35,5	71,60
20	58	89		73,5	41,20
25	73	77		75,0	40,00
50	45	48		46,5	62,80
100	21	11		16,0	87,20
IC50:	2,3	2,97		2,6	

3 DIAS POST-INFECCION

Concentración	Repeticiones			X	% Muertos
	1	2	3		
Control	127	205	123	125,0	0,00
1	97	32	31	31,5	74,80
10	70	31	50	40,5	67,60
20	68	25	29	27,0	78,40
25	39	30	22	26,0	79,20
50	33	44	33	33,0	73,60
100	37	38	41	37,5	70,00
IC50:	12,4	NC	NC		

