

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”

Departamento de Parasitología

Instituto de Farmacia y Alimentos

**Potencial terapéutico del aceite esencial de
Chenopodium ambrosioides y algunos de sus
componentes frente a *Leishmania*.**

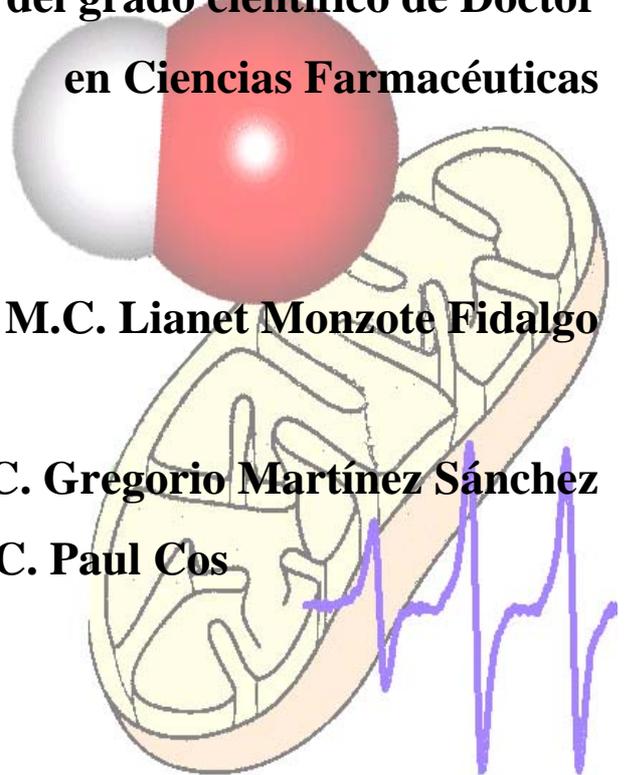
**Tesis presentada en opción del grado científico de Doctor
en Ciencias Farmacéuticas**

Autora: M.C. Lianet Monzote Fidalgo

**Tutor: Dr.C. Gregorio Martínez Sánchez
Dr. C. Paul Cos**

La Habana

2010



Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

Departamento de Parasitología

Instituto de Farmacia y Alimentos

**Potencial terapéutico del aceite esencial de
Chenopodium ambrosioides y algunos de
sus componentes frente a *Leishmania*.**

**Tesis presentada en opción del grado científico de Doctor en
Ciencias Farmacéuticas**

Autora: M.C. Lianet Monzote Fidalgo

Tutor: Dr.C. Gregorio Martínez Sánchez

Dr.C. Paul Cos

La Habana

2010

Dedicatoria

*A Linet,
mi chiquitica linda*

Agradecimientos

Quiero ofrecer mi más profundo agradecimiento

A mis tutores el Dr. Gregorio Martínez y el Dr. Paul Cos, por depositar en mí su confianza y brindarme su ayuda, conocimiento y paciencia.

A Yaxsier mi esposo por ser mi mayor ayudante en todos los aspectos de la vida.

A mi jefa Ana Margarita y compañeras de grupo Ivón y Lisset por apoyarme día a día.

A Marley y Yenisey por dejarme contar con su preciada amistad.

A todos los compañeros del Departamento de Parasitología del IPK, quienes me han brindado de una forma u otra su ayuda indispensable.

A mis padres, a quienes les debo todo, cuanto soy y he logrado.

A mi abuela, por enseñarme a lograr lo que desee.

La autora

Síntesis

SÍNTESIS

La leishmaniosis es una enfermedad causada por parásitos protozoos del género *Leishmania*, clasificada por la Organización Mundial de la Salud como una de las infecciones tropicales más importantes. Los fármacos disponibles son tóxicos, costosos y la resistencia parasitaria ha emergido. En las áreas endémicas la población depende fundamentalmente de la medicina natural para el tratamiento de la leishmaniosis. En este trabajo, se evaluó la actividad del aceite esencial extraído de *Chenopodium ambrosioides* y sus componentes mayoritarios frente a *L. amazonensis*. El ascaridol demostró la mayor actividad frente al parásito; sin embargo el aceite esencial presentó mayor especificidad (citotoxicidad 15 veces mayor). El aceite esencial controló el desarrollo de la infección al administrarlo por vía oral e intralesional en ratones infectados. Se observó una actividad antiprotozoaria específica del aceite esencial y no causó efecto sobre bacterias, hongos y virus. Por otra parte, se demostró la formación de un radical libre del aceite esencial y el ascaridol. Los productos inhibieron el Complejo III de la cadena respiratoria y se pudo observar interacciones del aceite esencial con el ADN del parásito. El aceite esencial mostró un efecto sinérgico con la pentamidina. Este estudio demostró las potencialidades del aceite esencial de *C. ambrosioides* para el desarrollo de un nuevo agente antileishmanial.

Abreviaturas

ABREVIATURAS

A

ADN: Ácidos desoxirribonucleicos

AE: Aceite esencial

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: Adenosil trifosfato

B

BCG: Bacilo de *Calmette y Guerin*

BSA: Suero de albúmina bovina

C

C: Citocina

CD4+: Células T CD4+

CD8+: Células T citotóxicas

CI₅₀: Concentración Inhibitoria Media

CIF: Concentración Inhibitoria Fraccional

CMH-II: Complejo Mayor de Histocompatibilidad Tipo II

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

COX: Ciclooxigenasa

D

DDT: Diclorodifeniltricloroetano

DE₅₀: Dosis Efectiva Media

DMPO: 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMT: Dosis Máxima Tolerada

F

Fe²⁺: Hierro divalente

G

G: Guanina

H

h: horas

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

I

IFN- γ : Interferón gamma

IL: Interleucina

IPK: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", Ciudad de la Habana Cuba

IS: Índice de Selectividad

L

LC: Leishmaniosis cutánea
LCD: Leishmaniosis cutánea difusa
LCR: Leishmaniosis cutánea recidivante
LMC: Leishmaniosis mucocutánea
LPKA: Leishmaniosis post-kala-azar
LV: Leishmaniosis visceral

M

min: minutos
MRC-5: Línea celular humana aislada de fibroblastos de pulmón
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

N

NAD: Dinucleótido adenina nicotinamida
NNN: Medio de Novy, Nicolle y McNeal
NO•: Óxido nítrico

O

OECD: Organización Económica para la Cooperación y Desarrollo
OMS: Organización Mundial de la Salud
O-O: Enlace interno oxígeno-oxígeno

P

PVP: Polivinilpirrolidona.

R

R-C•: Radical centrado en el Carbono
RCP: Reacción en Cadena de la Polimerasa
RPMI 1640: Medio Roswell Park Memorial Institute 1640
RPN: Resonancia Paramagnética Nuclear

S

Sb^{III}: Antimonio trivalente
Sb^V: Antimonio pentavalente
SFB: Suero Fetal Bovino
SPM: Subpartículas mitocondriales
SSFE: Solución Salina Fisiológica Estéril

T

TAO: Toxicidad Aguda Oral

Th1: Células T cooperadoras tipo 1

Th2: Células T cooperadoras tipo 2

TSA: Medio Triptona-Soya-Agar.

TYI-S-33: Medio de Diamond

V

Vero: Línea celular aislada de células epiteliales de riñón del mono verde africano
(*Cercopithecus aethiops*).

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

Índice

ÍNDICE

	Acápites	Páginas
I. Introducción		1
Hipótesis		4
Objetivo general		4
Objetivos específicos		4
Novedad científica		5
Importancia teórica		5
Importancia práctica		5
II. Revisión Bibliográfica		7
II.1. Historia		8
II.2. Agente etiológico		8
II.2.1. Taxonomía		8
II.2.2. Características generales del parásito		9
II.3. Epidemiología		10
II.3.1. Distribución geográfica		10
II.3.2. Frecuencia		10
II.3.3. Transmisión de la infección		11
II.3.4. Características generales del vector		11
II.3.5. Ciclo de biológico del parásito		11
II.3.6. Reservorios		12
II.4. Manifestaciones clínicas de la leishmaniosis		13
II.4.1. Leishmaniosis cutánea		13
II.4.2. Leishmaniosis mucocutánea		14
II.4.3. Leishmaniosis visceral		15
II.5. Inmunología		16
II.6. Diagnóstico		17
II.7. Control		18
II.8. Tratamiento		19
II.8.1. Tratamiento convencional		19
II.8.2. Otros fármacos utilizados en la clínica		23
II.8.3. Terapia combinada		24

II.8.4. Desarrollo de nuevos fármacos	24
II.8.5. <i>Chenopodium ambrosioides</i>	25
III. Materiales y Métodos	28
III.1. Determinación de la actividad <i>in vitro</i> del aceite esencial extraído de <i>C. ambrosioides</i> y sus componentes mayoritarios frente a <i>L. amazonensis</i> .	29
III.1.1. Determinación de la Concentración Inhibitoria Media frente a promastigotes	30
III.1.2. Evaluación de la actividad antileishmanial frente a amastigotes intracelulares	31
III.1.3. Determinación de la Concentración Inhibitoria Media sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c	32
III.1.4. Comparación de la actividad antileishmanial y la citotoxicidad del aceite esencial de <i>C. ambrosioides</i> con los fármacos convencionales	33
III.2. Evaluación del efecto del aceite esencial extraído de <i>C. ambrosioides</i> frente a la leishmaniosis cutánea experimental en ratones BALB/c, causada por <i>L. amazonensis</i> .	33
III.2.1. Determinación de la Dosis Máxima Tolerada del aceite esencial de <i>C. ambrosioides</i> en ratones BALB/c por vía intraperitoneal	34
III.2.2. Evaluación de la actividad antileishmanial del aceite esencial de <i>C. ambrosioides</i> frente a la leishmaniosis cutánea experimental en ratones BALB/c, causada por <i>L. amazonensis</i>	34
III.2.3. Evaluación de la actividad antileishmanial del aceite esencial de <i>C. ambrosioides</i> al ser administrado por diferentes vías, frente a la leishmaniosis cutánea experimental en ratones BALB/c, causada por <i>L. amazonensis</i>	35
III.3. Evidencias experimentales sobre el posible mecanismo de acción del aceite esencial extraído de <i>C. ambrosioides</i> .	37
III.3.1. Análisis de la actividad del aceite de <i>C. ambrosioides</i> frente a diferentes microorganismos y líneas celulares	37
III.3.2. Identificación de la formación de radicales libres del aceite de <i>C. ambrosioides</i> y sus componentes mayoritarios por Resonancia Paramagnética Nuclear	39
III.3.2. Determinación de la actividad del aceite esencial de <i>C. ambrosioides</i> y sus componentes sobre los Complejos de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria.	39
III.3.3. Estudio de la interacción del aceite esencial de	40

<i>C. ambrosioides</i> con el ADN extraído de <i>L. amazonensis</i>	
III.3.4. Estudio <i>in vitro</i> de las interacciones entre el aceite esencial de <i>C. ambrosioides</i> y los fármacos convencionales	41
III.4. Análisis estadístico	42
IV. Resultados	43
IV.1. Determinación de la actividad <i>in vitro</i> del aceite esencial extraído de <i>C. ambrosioides</i> y sus componentes mayoritarios frente a <i>L. amazonensis</i>	44
IV.2. Evaluación del efecto del aceite esencial extraído de <i>C. ambrosioides</i> frente a la leishmaniosis cutánea experimental en ratones BALB/c, causada por <i>L. amazonensis</i>	45
IV.3. Evidencias experimentales sobre el posible mecanismo de acción del aceite esencial extraído de <i>C. ambrosioides</i> .	57
V. Discusión	63
V.1. Determinación de la actividad <i>in vitro</i> del aceite esencial extraído de <i>C. ambrosioides</i> y sus componentes mayoritarios frente a <i>L. amazonensis</i>	66
V.2. Evaluación del efecto del aceite esencial extraído de <i>C. ambrosioides</i> frente a la leishmaniosis cutánea experimental en ratones BALB/c, causada por <i>L. amazonensis</i> .	68
V.3. Evidencias experimentales sobre el posible mecanismo de acción del aceite esencial extraído de <i>C. ambrosioides</i> .	74
V.4. Consideraciones generales.	78
VI. Conclusiones y Recomendaciones	82
VI.1. Conclusiones	83
VI.2. Recomendaciones	84
Bibliografía	
Anexos	

I. Introducción

I. INTRODUCCIÓN

Leishmania es un género que agrupa a protozoos parásitos que se transmiten por la picada de flebótomos hembras. Presenta un ciclo de vida que alterna entre la forma promastigote, extracelular, encontrada en el insecto transmisor del parásito, y los amastigotes intracelulares, los cuales infectan los macrófagos del hospedero vertebrado y se replican en sus fagolisosomas (1).

Este parásito causa un conjunto de enfermedades denominadas leishmaniosis. Aproximadamente, de 1,5 a 2 millones de personas son infectadas anualmente y alrededor de 350 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad, la cual se considera endémica de 88 países tropicales y subtropicales. Adicionalmente, se ha observado un dramático incremento en el número de casos de leishmaniosis visceral en Sudán y la India; y en Europa en los pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (2). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha identificado la leishmaniosis como una de las enfermedades tropicales más importantes y uno de los principales problemas de salud pública en África, Asia y América Latina (3).

Se conocen 21 especies de *Leishmania* patógenas al hombre y a los animales que desarrollan principalmente tres formas de la enfermedad: leishmaniosis cutánea, leishmaniosis mucocutánea y leishmaniosis visceral. La cutánea se caracteriza por lesiones dérmicas que pueden llegar hasta úlceras; la mucocutánea por metástasis de las lesiones cutáneas causando deformidades fundamentalmente en la cavidad nasofaríngea; mientras que la visceral puede provocar hepato y esplenomegalia, depresión de la médula ósea, anemia, disminución del peso corporal y muerte en la mayoría de los casos no tratados (4).

El control de esta parasitosis mediante la vacunación aún no ha sido posible, principalmente por la variación genética entre las especies del parásito. El control del vector y del reservorio sólo es posible en ciertas situaciones de transmisión doméstica. En los países endémicos, la quimioterapia es la principal opción para contrarrestar la enfermedad (4, 5).

Alrededor de 25 compuestos se han utilizado para el tratamiento de la leishmaniosis, pero solo pocos han podido clasificarse como agente antileishmaniales para usarse en humanos (4). Los fármacos recomendados para el tratamiento de la leishmaniosis son los derivados orgánicos de antimonio pentavalente: estibogluconato de sodio (Pentostam®) y antimoniato de meglumina (Glucantime®). La anfotericina B y sus formulaciones lipídicas, la pentamidina y la aminosidina son usadas como terapia de segunda línea. Todos estos medicamentos necesitan ser administrados por vía parenteral, los tratamientos requieren largos períodos de tiempo, son tóxicas, costosas y la resistencia parasitaria ha aumentado como un agravante. Recientemente, se ha comenzado a usar la miltefosina, la cual ha demostrado una alta eficacia frente a la leishmaniosis visceral y se puede administrar por vía oral (6). Las limitaciones mencionadas de los fármacos disponibles contra esta parasitosis han provocado que se necesite, urgentemente, la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos de mayor eficacia, seguridad y accesibilidad para los pacientes (3, 5).

Actualmente, el 60 % de las personas que viven en áreas endémicas dependen de la medicina natural y tradicional para el tratamiento de la leishmaniosis, basado fundamentalmente en el uso de plantas medicinales. El Programa de Enfermedades Tropicales de la OMS ha considerado una prioridad la evaluación farmacológica de las plantas con el objetivo de desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de esta parasitosis (7). Una de las plantas conocida por sus efectos antiparasitarios es *Chenopodium ambrosioides*, de la cual se han realizado estudios etnobotánicos que revelan su uso para el tratamiento de la leishmaniosis cutánea por la población endémica de Brasil (8) y Perú (9).

Hipótesis

A partir de los antecedentes expuestos se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

Los efectos antiparasitarios de los terpenos, fenoles y epóxidos presentes en el aceite esencial de *C. ambrosioides* tienen lugar por mecanismos inespecíficos, lo que permite el desarrollo de nuevos fármacos con elevada eficacia para el tratamiento de la leishmaniosis.

Para dar cumplimiento a esta hipótesis se formulan los siguientes objetivos:

Objetivo general

Determinar las potencialidades del aceite esencial extraído de *C. ambrosioides* y sus principios activos como agentes terapéuticos frente a la leishmaniosis cutánea experimental, causada por *L. amazonensis*, como contribución a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas

Objetivos específicos

1. Caracterizar mediante modelos *in vitro* la actividad de *C. ambrosioides* y sus componentes mayoritarios frente a *L. amazonensis* en diferentes estudios de su ciclo vital y el índice de selectividad del aceite esencial.
2. Comparar mediante biomodelos (ratones BALB/c) los efectos del aceite esencial de *C. ambrosioides* frente a la leishmaniosis cutánea experimental causada por *L. amazonensis*.
3. Establecer comparaciones entre la eficacia terapéutica en un modelo de leishmaniosis cutánea, del aceite esencial de *C. ambrosioides* relacionadas a la vía de administración y a los fármacos convencionales.
4. Aportar evidencias experimentales que permitan esclarecer el o los posibles mecanismos de acción del aceite esencial de *C. ambrosioides* y su interacción con fármacos convencionales.

Novedad científica

Se demuestra por primera vez, desde el punto de vista científico, la actividad antileishmanial del aceite esencial íntegro de *C. ambrosioides* y sus componentes mayoritarios en modelos *in vitro* e *in vivo*. Adicionalmente, se brindan datos de interés sobre los posibles mecanismos de acción directos del aceite esencial y sus componentes para ejercer su efecto en el parásito.

Importancia teórica

La tesis tiene valor metodológico para la evaluación de compuestos naturales ya que traza una estrategia de trabajo para la evaluación de productos naturales frente a *Leishmania* a través de diferentes biomodelos y ensayos.

Se aportan, además, conocimientos básicos para continuar los estudios del aceite esencial de *C. ambrosioides* como fármaco potencial contra *Leishmania*. Estos estudios pudieran formar parte del expediente de registro sanitario de nuevas formulaciones antiprotozoarias.

Importancia práctica

El aporte práctico de esta tesis es que avala científicamente la posibilidad de explorar la utilidad del aceite esencial de *C. ambrosioides* para el desarrollo de un medicamento para la leishmaniosis, sobre todo en áreas donde existe una baja asequibilidad y accesibilidad a los fármacos convencionales.

La información que aporta puede ser utilizada en cursos de pregrado y postgrado de Medicina Natural y Tradicional.

Los resultados de este trabajo forman parte de 11 publicaciones científicas (tres nacionales y ocho internacionales) (Anexo 1) y otros 16 artículos relacionadas con la temática (Anexo 2). Han sido presentados en 29 eventos nacionales e internacionales (Anexo 3) lo cual eleva el prestigio de las investigaciones científicas que se realizan en Cuba en este campo.

Las diferentes fases del trabajo han formado parte de dos tesis: para optar por el título de Licenciado en Biología de la Universidad de la Habana y optar por el título de Master en Parasitología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK). Se han recibido dos resultados relevantes del IPK y un premio en el Forum de Ciencia y Técnica a nivel municipal.

El presente trabajo fue realizado en las instalaciones del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”. Adicionalmente, se contó con la colaboración del Dr.C. Lars Gille de la Unidad de Farmacología y Toxicología Molecular de la Universidad de Ciencias Veterinarias de Viena, Austria.

II. Antecedentes

II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

II.1. Historia

Leishmania fue observada por primera vez por David D. Cuningham en 1885 y posteriormente, por Peter Borovsky en 1898. En 1903, de forma independiente, William Leishman y Charles Donovan describieron las características del parásito, y James Wright los clasificó en el orden Protozoa y el género *Leishmania* (10). Posteriormente, se han realizado muchos estudios sobre el parásito y las enfermedades que ocasiona, a las cuales se les denominó leishmaniosis. En los últimos años se ha observado un incremento en las investigaciones básicas sobre la biología, genoma del parásito, su relación con los hospederos, así como la expresión de la infección. Actualmente, la leishmaniosis ha sido clasificada por la OMS como una de las seis enfermedades tropicales más importantes, por lo que los estudios en todos los campos de esta parasitosis continúan siendo de vital importancia con el objetivo de poder incidir sobre la morbilidad y la mortalidad causada por la leishmaniosis.

II.2. Agente etiológico

II.2.1. Taxonomía

Reino Protista.

Phylum Protozoa.

Clase Zoomastigophorea.

Orden Kinetoplastida.

Familia *Trypanosomatidae*.

Género *Leishmania*.

Existen más de 20 especies de *Leishmania*, de las cuales 17 son conocidas como patógenas al hombre y a los animales (3). Las especies de *Leishmania* presentan características morfológicas similares que las hacen indistinguibles. Sin embargo, entre ellas existen considerables diferencias bioquímicas y moleculares, lo que conlleva entre otros factores a que causen un amplio espectro de manifestaciones clínicas en diferentes zonas geográficas.

En la combinación de todos estos factores se ha basado la taxonomía de *Leishmania*; dividiéndose en dos subgrupos (Tabla 1), los cuales a su vez están formados por complejos y estos por subespecies (2, 12).

Tabla 1. Clasificación de las especies de *Leishmania* patógenas al hombre.

Género	Subgénero	Complejos	Especies
<i>Leishmania</i>	<i>Leishmania</i>	<i>donovani</i>	<i>donovani</i>
		<i>infantum</i>	<i>infantum</i>
			<i>chagasi</i>
		<i>tropica</i>	<i>tropica</i>
		<i>major</i>	<i>major</i>
		<i>aethiopica</i>	<i>aethiopica</i>
		<i>mexicana</i>	<i>mexicana</i>
			<i>pifanoi</i>
			<i>venezuelensis</i>
			<i>amazonensis</i>
			<i>garnhami</i>
	<i>Vianna</i>	<i>braziliensis</i>	<i>braziliensis</i>
			<i>peruviana</i>
			<i>equatorensis</i>
		<i>guyanensis</i>	<i>guyanensis</i>
			<i>panamensis</i>
		<i>lainsoni</i>	<i>lainsoni</i>

II.2.2. Características generales del parásito

Leishmania es un eucariota diploide que presenta dos estadios de vida en su ciclo biológico. Los promastigotes (Figure 1A) son la forma infectiva extracelular presente en el hospedero invertebrado que se caracterizan por ser células alargadas y fusiformes que miden de 14 μm a 20 μm de largo por 1,5 μm a 4 μm de ancho, con un flagelo anterior de 20 μm de largo que le confiere movilidad. Presentan un paquete flagelar, núcleo, mitocondria y cinetoplasto. El amastigote (Figure 1B) es la forma infectante intracelular, presente en el huésped vertebrado, la cual es inmóvil y se presenta como un cuerpo oval o esférico y mide entre 6 μm a 7 μm por 4 μm a 6 μm . Posee un núcleo central relativamente grande, un cinetoplasto, mitocondria, un paquete flagelar y lisosoma (10).

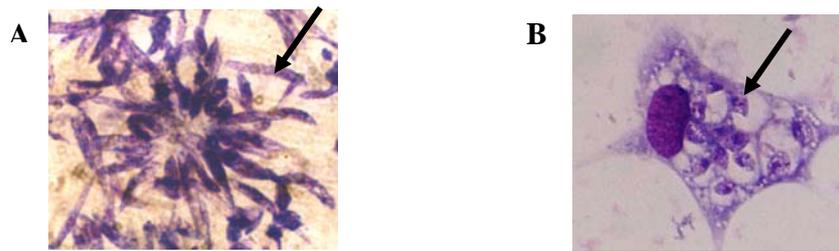


Figura 1. Estadios de *Leishmania* en cultivos *in vitro* teñidos por Giemsa. A: Promastigotes; B: Amastigotes parasitando un macrófago.

II.3. Epidemiología

II.3.1. Distribución geográfica

La leishmaniosis es una infección endémica de las áreas tropicales y subtropicales de todos los continentes excepto Australia y la Antártica. Se ha reportado en 88 países de los cuales 16 son desarrollados y 72 subdesarrollados (12, 13). El 90 % de los casos con leishmaniosis cutánea se reportan en Afganistán, Arabia Saudita, Algeria, Irán, Irak, Siria, Sudán y Brasil; mientras que el 90 % de los casos de la forma visceral se presentan en Sudán, India, Bangladesh, Nepal y Brasil (14).

II.3.2. Frecuencia

Se estima que existen aproximadamente 14 millones de enfermos de leishmaniosis y más de 368 millones de personas se encuentran en riesgo de infección. Se reportan 2 millones de casos por año, de los cuales 1 500 000 son de la forma cutánea y 500 000 de la forma visceral (13). Estos valores de frecuencia e incidencia son subestimados, debido a que se notifican los casos de leishmaniosis sólo en 40 países, de los 88 donde existe esta parasitosis (15). Por otra parte, es probable una tendencia al aumento de casos debido a los cambios en zonas rurales como la deforestación, urbanización y migración de personas y comunidades (12, 16).

II.3.3. Transmisión de la infección

La infección primaria de *Leishmania* se produce por la inoculación de promastigotes durante la picada de un flebótomo hembra infectado. Se han reportado, esporádicamente, casos de transmisión congénita, sexual, por transfusión de sangre, hemodiálisis, trasplante de órganos, accidental en el laboratorio o por contacto directo lesión – lesión (10, 17).

II.3.4. Características generales del vector

Los flebótomos de la familia Psychodidae, clase Insecta, orden Diptera y Phylum Arthropoda, son los vectores potenciales de *Leishmania*. Se han descrito 600 especies de flebótomos, de las cuales el 10 %, aproximadamente 30 especies, de los géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo (Europa, Asia y África) y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo (América) son capaces de transmitir el parásito. Generalmente, los hábitos alimenticios de los vectores son nocturnos y la picadura es dolorosa en el hospedero vertebrado (18).

Los flebótomos son insectos pequeños, con un cuerpo lleno de cerdas y con alas en posición erecta. Presentan una gran diversidad de hábitat, desde los desiertos o zonas semiáridas en el Viejo Mundo hasta las zonas húmedas de las selvas tropicales del Nuevo Mundo. Se refugian entre la hojarasca, los huecos en los árboles, en las madrigueras de los roedores o intradomiciliariamente (18).

II.3.5. Ciclo biológico del parásito

El ciclo biológico de *Leishmania* alterna entre dos estadios de vida (promastigotes y amastigotes) y dos hospederos (vertebrado e invertebrado) (Figura 2). Los amastigotes se desarrollan en el hospedero vertebrado y son tomados por el flebótomo hembra durante la alimentación sanguínea. En el intestino del insecto los amastigotes se transforman a promastigotes después de 24 h a 48 h, momento donde empieza la multiplicación de los promastigotes por división binaria; que van desde formas procíclicas no infectivas, hasta formas metacíclicas altamente infectivas al cabo de 6 días a 9 días, momento que coincide con una segunda alimentación sanguínea del insecto vector (4, 10).

Cuando el insecto vuelve a picar, introduce los promastigotes metacíclicos, los cuales son rápidamente reconocidos por el sistema reticuloendotelial, principalmente por los macrófagos. Alrededor del parásito se forma una vacuola parasitófora y los promastigotes sufren cambios morfológicos y bioquímicos hasta diferenciarse en la forma amastigote en 2-5 días (4, 10). El éxito en el desarrollo del parásito radica en su capacidad de interferir sobre los mecanismos de activación de los macrófagos, sobrevive y se multiplica en el ambiente hostil hasta causar la lisis de la célula hospedera (10, 19, 20). De 50 a 200 amastigotes pueden ser liberados, los cuales vuelven a infectar otros macrófagos (4, 10).

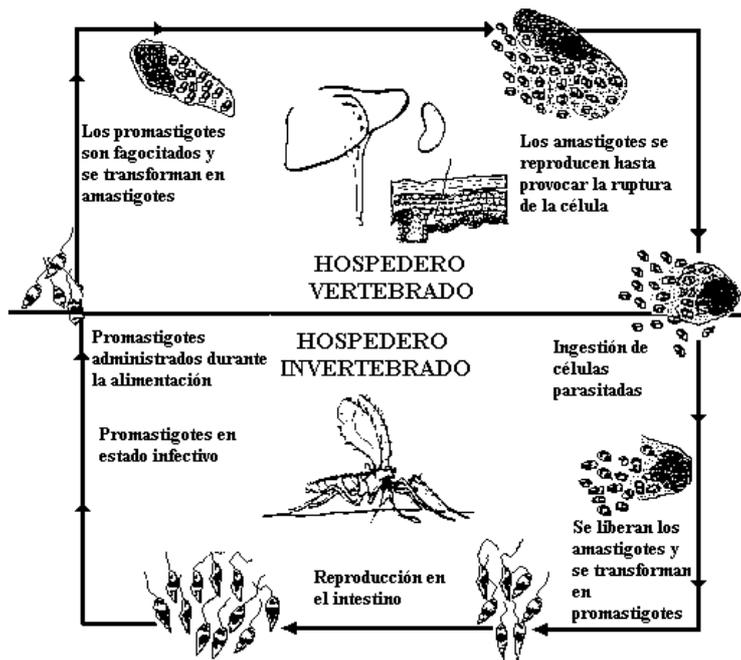


Figura 2. Ciclo biológico de *Leishmania*.

II.3.6. Reservorios

Se considera reservorio de una enfermedad a aquellos animales que garantizan la existencia del agente etiológico y por lo tanto, facilitan su transmisión. La leishmaniosis es una zoonosis mantenida por más de 100 especies de animales. Entre los reservorios domésticos juegan un papel fundamental los perros, y entre los salvajes podemos encontrar roedores, chacales, perezosos, lobos y monos (21).

II.4. Manifestaciones clínicas de la leishmaniosis

Leishmania causa un amplio espectro de manifestaciones clínicas en dependencia de los factores de virulencia de la especie involucrada y la respuesta inmune del hospedero (20, 22). La leishmaniosis ha sido clasificada en tres formas principales de la enfermedad: leishmaniosis cutánea (LC), leishmaniosis mucocutánea (LMC) y leishmaniosis visceral (LV).

II.4.1. Leishmaniosis cutánea

La LC (Figura 3) es la forma más simple y de mayor morbilidad. Es causada por 13 especies de *Leishmania*, pertenecientes a los complejos *L. mexicana* y *L. braziliensis* en América y el complejo *L. tropica* en el Viejo Mundo (15, 19).

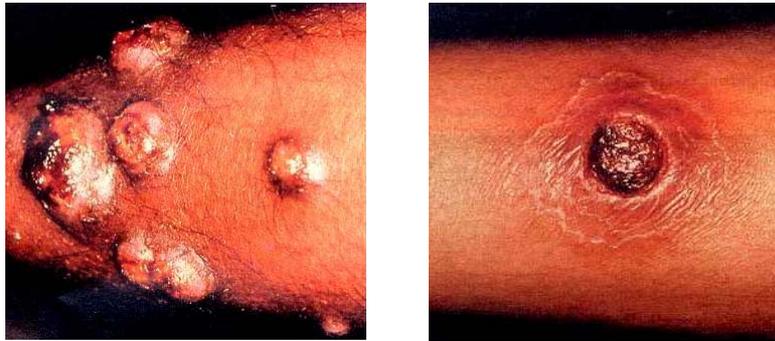


Figura 3. Leishmaniosis cutánea (Tomado de El-Hassan, Zijlstra EE. Leishmaniasis in Sudan. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001;95:1-76).

Los flebótomos inoculan en la dermis los promastigotes de *Leishmania* y tras un período de 1 semana hasta 2 meses, aparece una pequeña lesión nodular hiperémica en el sitio de inoculación, la cual se desarrolla y progresa a una lesión ulcerativa redondeada e indolora que se caracteriza por tener una depresión central de fondo granuloso y limpio que exuda líquido no purulento. Los bordes de la úlcera son bien definidos, elevados, hiperémicos e indurados; donde se presenta la mayor carga parasitaria (1, 20). Las lesiones pueden ser únicas o múltiples y aparecen fundamentalmente en la cara y extremidades, aunque puede haber metástasis a otros sitios. En algunos casos, los parásitos invaden los cordones linfáticos, produce linfangitis y lesiones a distancia (20, 23).

Las lesiones iniciales de la piel pueden sanar espontáneamente cuando hay buena respuesta inmunológica del hospedero; pero en la mayoría de los casos las úlceras presentan una evolución crónica de meses hasta años, dejando cicatrices granulomatosas, verrugosas o vegetantes. Pueden ocurrir deformaciones o mutilaciones si la lesión se encuentra en el pabellón auricular. Con frecuencia las úlceras producen dolor y pus, debido a la infección con otros patógenos oportunistas (1, 23).

Existen dos complicaciones de la LC a las que se les ha denominado: Leishmaniosis cutánea difusa (LCD) y Leishmaniosis cutánea recidivante (LCR). La LCD es causada por

L. amazonensis en el Sur de América y por *L. aethiopica* en África. Esta se caracteriza por ser una forma crónica y progresiva que se manifiesta por lesiones diseminadas a nivel dérmico, no ulcerativas, en forma de nódulos o placas con un alto número de amastigotes. Las lesiones pueden persistir por décadas y es muy resistente al tratamiento (24). La LCR es causada fundamentalmente por *L. tropica* en Irán, Irak y sus áreas vecinas. Su manifestación típica es una lesión única papular, no ulcerativa, que se desarrolla en los bordes de la lesión original como pequeños satélites o en el centro del área cicatrizada y persiste por muchos años (20, 24).

II.4.2. Leishmaniosis mucocutánea

La LMC (Figura 4), comúnmente conocida por “espundia”, se presenta en el Sur de América y es causada principalmente por *L. braziliensis* y con menor frecuencia por *L. guyanensis* y *L. panamensis* (24). La enfermedad comienza con una lesión cutánea típica en el sitio de inoculación por el vector y entre el 5-20 % de los pacientes pueden presentar metástasis en las mucosas, las cuales pueden aparecer hasta 20 años después de curada la lesión original (10, 11). El área más afectada es la cavidad nasofaríngea, con perforaciones del septum nasal y destrucción de la orofaringe, la faringe y la tráquea, así como de las zonas cutáneas comprometidas. En raras ocasiones, también se ven afectadas otras mucosas como son la labial, la conjuntiva o la genital (1, 25).

Esta forma se desarrolla hasta provocar graves e irreversibles deformidades o mutilaciones, e incluso trastornos emocionales y orgánicos. La enfermedad mucosal no cura espontáneamente y es muy resistente al tratamiento. La muerte ocurre en la mayoría de los casos por asfixia a causa del bloqueo de la tráquea, inanición, infecciones respiratorias o desnutrición (25).



Figura 4. Leishmaniosis mucocutánea (Tomado de El-Hassan, Zijlstra EE. Leishmaniasis in Sudan. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001;95:1-76).

II.4.3. Leishmaniosis visceral

La LV (Figura 5) es la forma que causa mayor mortalidad, conocida mundialmente por su nombre hindú “kala-azar”. Esta patología es causada por los representantes del complejo donovani: *L. donovani* en India, China y África; *L. infantum* en la región del Mediterráneo, África Oriental y Sudeste de Asia; mientras que *L. chagasi* se presenta en América (21).

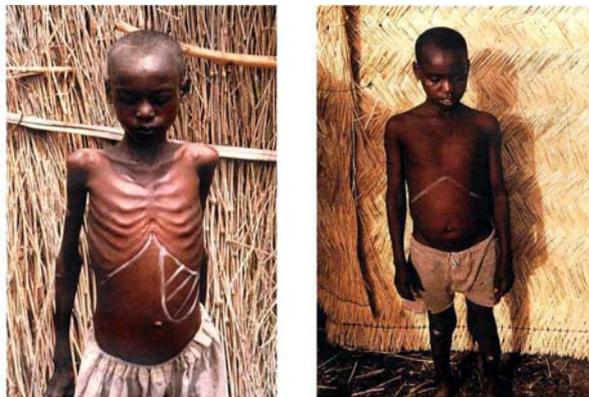


Figura 5. Leishmaniosis visceral (Tomado de El-Hassan, Zijlstra EE. Leishmaniasis in Sudan. Trans R Soc Trop Med Hyg 2001;95:1-76).

Estas especies de *Leishmania* una vez transformadas en amastigotes en la dermis, tienen la capacidad de diseminarse por vía linfática desde la piel hasta la médula ósea, bazo, hígado y ganglios linfáticos. La infección puede presentarse de manera asintomática o subclínica

en muchos casos, o puede tener un curso agudo, subagudo o crónico. Los síntomas de la LV clásica son fiebre, escalofríos durante varias semanas o con irregularidades, severa caquexia, hepatomegalia, pancitopenia, hiperganmaglobulinemia e hipoalbuminemia. Se presentan otros síntomas como: pérdida de peso, trombocitopenia, anorexia, dolor abdominal, diarreas, vómitos, náuseas y fatiga (17, 21). El 90% de los casos, si no son tratados, mueren tras 1-2 años de infectados, debido a complicaciones orgánicas o a causa de patógenos oportunistas (17). El diagnóstico oportuno y un tratamiento eficaz disminuye la mortalidad en un 5 %, pero las recaídas son muy frecuentes (25).

Después del tratamiento de la LV, tras una cura aparente, puede desarrollar la enfermedad conocida como: Leishmaniosis post-kala-azar (LPKA); donde se encuentran parásitos locales a nivel de la dermis que persisten por largos períodos de tiempo y provocan una respuesta inmune que puede causar otras complicaciones. Esta forma se presenta como nódulos que se distribuyen por todo el cuerpo constituyendo un reservorio potencial de la leishmaniosis visceral (20).

II.5. Inmunología

Uno de los aspectos fundamentales que distingue a la leishmaniosis, es el comportamiento de la respuesta inmune del hospedero al contraer la infección. La inmunidad antileishmanial es mediada por la inmunidad innata (macrófagos y neutrófilos) y por la adquirida (Células dendríticas, linfocitos T y B) (26).

La resistencia a la enfermedad está dada por la activación de subpoblaciones de linfocitos Th1 CD4⁺; células que secretan interleucina (IL) 12 e interferón gamma (IFN- γ), los cuales participan en la activación de los macrófagos. Otros mecanismos pueden estar involucrados en la eliminación del parásito, como es la actividad citotóxica de los linfocitos CD8⁺ (27). En cambio, la susceptibilidad está relacionada con el desarrollo de una respuesta Th2, la cual disminuye la generación de una respuesta Th1 protectora. En este caso la producción de citocinas como la IL-4, IL-5 e IL-10 regulan negativamente la activación de macrófagos y la disminución de la producción de IFN- γ ; lo que conlleva a la progresión de la infección. En algunos estudios se ha demostrado que en macrófagos infectados con *Leishmania* no existe una relación proporcional entre los niveles expresados de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (CMH-II) y el nivel de infección del macrófago. Esto

provoca que la célula infectada no presente el antígeno a las células CD4+ o que esta presentación no sea eficiente para generar una respuesta Th1 (17, 26).

La interacción de las células del sistema inmune y las citocinas involucradas demuestran la complejidad de la infección causada por *Leishmania*. Adicionalmente, la mayoría de los datos experimentales acerca del desarrollo de una respuesta inmune y la patogenia de la enfermedad han sido colectados de modelos animales, por lo que el entendimiento del papel de algunas células del sistema inmune y el desarrollo del amplio espectro de manifestaciones clínicas aún se encuentra en estudio (26).

II.6. Diagnóstico

El diagnóstico rutinario de la leishmaniosis consiste en la demostración de *Leishmania*. Los amastigotes pueden ser identificados en muestras fijadas con metanol y teñidas con Giemsa o en inclusión, corte de tejidos en parafina y teñidos con hematoxilina – eosina. El cultivo es otra opción para identificar los promastigotes, donde la muestra puede ser inoculada en medio de Novy, Nicolle y McNeal (NNN), Schneider, RPMI 1640 hasta 15 días. El uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) es otro método directo que tiene alta sensibilidad y especificidad con respecto a la demostración del parásito. Este método, combinado con otras tecnologías, permite además conocer la especie de parásito involucrada que incide positivamente en la decisión del tratamiento a implantar por el facultativo y tomar las medidas epidemiológicas adecuadas (28). En caso de la LC, las muestras deben ser tomadas de los bordes arrollados alrededor de las úlceras o de los nódulos linfáticos; mientras que en la LV la muestra se toma de la médula ósea, el hígado o el bazo (17).

El diagnóstico parasitológico de la leishmaniosis se complementa con el diagnóstico inmunológico. Una de las técnicas más utilizadas es la Intradermorreacción de Montenegro, la cual es una prueba intradérmica de hipersensibilidad retardada utilizando el antígeno de Montenegro (mezcla de parásitos inactivados o muertos). Este método de diagnóstico es complementario ya que no da un criterio definitivo en cuanto a la existencia de la enfermedad, por lo que se usa principalmente en estudios epidemiológicos. Algunas pruebas serológicas se han desarrollado como son: el ensayo de inmunofluorescencia indirecta, el método de aglutinación directa, el ensayo inmunoenzimático sobre fase sólida,

el radio-inmunoensayo o las tiras reactivas. Estos métodos son específicos y sensibles y pueden ser utilizados usualmente si se cuenta con el equipamiento requerido. El diagnóstico inmunológico tiene mayor importancia en la LV de la enfermedad, la cual se caracteriza por presentar altos títulos de anticuerpos específicos y no específicos circulantes (25).

II.7. Control

El control de la leishmaniosis se ha convertido en un serio problema. Como es una infección zoonótica transmitida por vectores se dificulta la interrupción de su ciclo biológico. Otros factores han provocado el aumento de la infección como son las deficiencias sanitarias, inadecuada enseñanza de aspectos de salud, migración de poblaciones y el control inadecuado de vectores y reservorios de infección (25, 28).

La educación comunitaria es una de las principales medidas para el control de la leishmaniosis. Las acciones recomendadas para la vigilancia epidemiológica incluyen el desarrollo de campañas educativas con el objetivo de dar a conocer los factores de riesgo, los vectores y los reservorios en las áreas endémicas, así como la importancia del diagnóstico precoz, el reconocimiento temprano de los síntomas, signos de la enfermedad y un tratamiento completo con prescripción médica (1, 18, 21).

El mejor método de interrumpir cualquier enfermedad transmitida por vectores es disminuir el contacto entre hombre-vector. El control del vector sólo es posible en algunas situaciones de transmisión doméstica o peridoméstica y está encaminado prácticamente hacia los vectores adultos. Se pueden utilizar insecticidas tales como el diclorodifeniltricloroetano (DDT), el malation, el propóxur o la deltametrina, los cuales son aplicados en los contornos de la vivienda. También pueden emplearse repelentes en la piel o mosquiteros impregnados (18, 29).

La leishmaniosis puede ser zoonótica, de ahí que los reservorios jueguen un papel fundamental para el control de la enfermedad. Los reservorios salvajes son muy difíciles de controlar ya que habitan en extensas zonas boscosas. En el caso de los domésticos se sugieren medidas como: la eliminación física, medida que no es aceptada por la población en muchas regiones, roseado de insecticidas en la piel o el uso de collares impregnados (30).

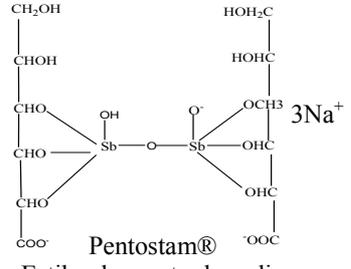
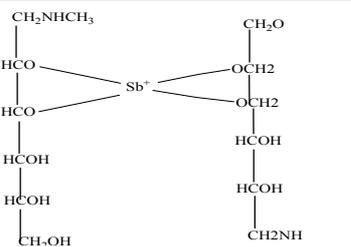
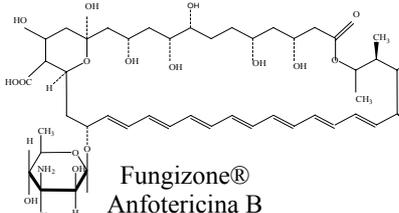
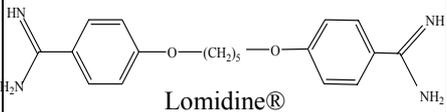
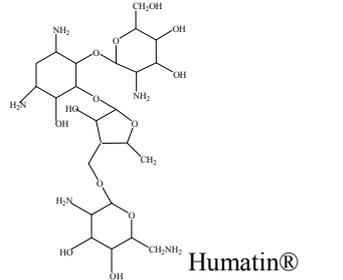
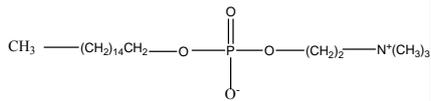
La vacunación es considerada la mejor opción para desarrollar una estrategia de control efectiva contra la leishmaniosis. Numerosas preparaciones vacunales han sido evaluadas; pero aún no se dispone de una vacuna eficaz contra *Leishmania* debido a las variaciones antigénicas que presenta este parásito (25, 28). La primera generación de vacunas que se evaluó consistió en preparados de diferentes especies de *Leishmania* (*L. tropica*, *L. major* y *L. amazonensis*) usando como adyuvante el bacilo de *Calmette* y *Guerin* (BCG). Posteriormente, se desarrollaron preparados a partir de antígenos crudos o purificados de *Leishmania* y vacunas de ácidos desoxirribonucleicos (ADN) (28). A pesar de las numerosas investigaciones aún no se encuentran vacunas comercialmente disponibles y las de mayor éxito no protegen frente a diferentes especies causantes de la enfermedad (28, 31).

II.8. Tratamiento

II.8.1. Tratamiento convencional

Actualmente, la quimioterapia es uno de los métodos de control disponible para combatir esta parasitosis. Sin embargo, debido a la complejidad de esta enfermedad en cuanto a su epidemiología no existe un tratamiento convencional que sea 100 % eficaz y seguro para tratar todas las formas de la leishmaniosis. Actualmente, la quimioterapia de esta parasitosis se limita a un pequeño número de fármacos disponibles (32). Los medicamentos de primera línea contra la leishmaniosis son los derivados de antimonio pentavalente y como segunda línea se emplean la anfotericina B, la pentamidina, la aminosidina y la miltefosina (Tabla 2). Sin embargo, estos fármacos no satisfacen las necesidades actuales ya sea por su limitada eficacia, que provocan altos niveles de toxicidad, son muy costosos o se ha desarrollado resistencia por el parásito. Por estos motivos, se necesita el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas (11).

Tabla 2. Fármacos convencionales utilizados para el tratamiento de la leishmaniosis.

Fármaco	Estructura Química Nombre Comercial - Químico	Tratamiento	Observaciones
Derivados de antimonio pentavalente	 <p>Pentostam® Estibogluconato de sodio</p>	20 mg/kg/día Intravenoso o intramuscular 20 días a 30 días	Tóxico No es efectivo para todas las especies Tratamiento prolongado Resistencia parasitaria
	 <p>Glucantime® Antimoniato de meglumina</p>		
Macrólido poliénico	 <p>Fungizone® Anfotericina B</p>	1 mg/kg/día Intravenoso 30 días en días alternos	Muy tóxico
Diaminas aromáticas	 <p>Lomidine® Isotiocianato de pentamidina</p>	4 mg/kg/semana Intravenoso 25 semanas	Muy tóxico Resistencia
Aminoglicósido	 <p>Humatin® Sulfato de Paramomicina</p>	15 mg/kg/día Intramuscular 21 días	Sinergismo con los antimonios
Alquilfosfolípido	 <p>Miltex® Miltefosina (Hexadecilfosfocolina)</p>	100 mg/día Oral 28 días	Eficaz frente a la LV Teratógena

Los derivados de antimonio pentavalente (Sb^{V}) son los fármacos de elección para el tratamiento de todos los tipos de leishmaniosis desde 1935. El mecanismo de acción preciso de los antimoniales no ha sido completamente elucidado y su acción antileishmanial probablemente depende de la transformación del Sb^{V} a antimonio trivalente (Sb^{III}), debido a que los amastigotes son susceptibles solamente al Sb^{III} (33). No obstante, se ha reportado que el antimonio actúa sobre diferentes dianas en el parásito que inhiben la ruta bioenergética de *Leishmania*, específicamente sobre la glucólisis, la beta-oxidación de los ácidos grasos y la inhibición de la fosforilación (34). Recientemente, se demostró que el antimonio es capaz de alterar el potencial redox por inhibición de la enzima trypanotione reductasa (35). Actualmente, algunas desventajas de los antimonios han conllevado a una disminución en el uso de los mismos. La primera razón es que presentan una eficacia variable frente a algunas especies y es totalmente ineficiente para tratar la LMC causada por *L. braziliensis*. Por otra parte, la aparición de la resistencia parasitaria se ha incrementado con rapidez (3). Una nueva generación de genéricos del pentostam ha sido producida con el objetivo de disminuir su costo; sin embargo, debe tenerse cuidado con los nuevos productores de antimonios debido a que se ha reportado que provocan una cardiotoxicidad que puede ser fatal (36). La inyección del medicamento por vía intralesional es una alternativa que se ha evaluado, pero presenta la desventaja que cada lesión debe ser inyectada individualmente y no previene la potencialidad de la infección de poder diseminarse (4).

La anfotericina B se aisló por primera vez en 1956 de la bacteria actinomiceta: *Streptomyces nodusus*, proveniente del Río Orinoco de Venezuela. Este fármaco es un antifúngico por excelencia y desde la década de 1960 fueron demostradas sus propiedades terapéuticas contra *Leishmania* y constituye el fármaco de elección en pacientes que muestran resistencia a los antimoniales (4). La actividad antileishmanial de la anfotericina B se debe a su selectividad por los 24-esteroles sustituidos, llamados ergosterol *vis-a-vis* colesterol. Su unión provoca la aparición de poros en la membrana donde se pierden iones y algunas biomoléculas de importancia conllevando a la lisis celular y muerte del parásito (4, 37). Debido a esta misma propiedad causa efectos adversos severos debido a que también puede unirse al ergosterol presente en las células del huésped mamífero. Actualmente, se han producido formulaciones lipídicas con el objetivo de disminuir los eventos tóxicos de

la anfotericina B. En estas formulaciones, la solución glucosada es reemplazada por soluciones lipídicas que aumentan la afinidad de la anfotericina B por los tejidos susceptibles y conlleva a una reducción de su toxicidad y aumento de su eficacia, facilitando su preferencia por las células del sistema reticuloendotelial, las cuales son la diana del parásito. Tres formulaciones lipídicas están comercialmente disponibles: anfotericina B liposomal (AmBisome®), el complejo lipídico de anfotericina B (Abelcet®) y una dispersión coloidal de anfotericina B (Amphocil®). El uso de estas formulaciones ha sido considerado como uno de los mejores avances en el tratamiento de la leishmaniosis en las últimas décadas. De estas formulaciones, el AmBisome ha sido el más estudiado y ha demostrado su eficacia en pacientes con LC y LV, especialmente en áreas de resistencia a los antimoniales (5).

La pentamidina fue originalmente utilizada en el tratamiento de la Trypanosomiosis Africana o mal del sueño y desde 1939 se demostró su actividad frente a infecciones por *Leishmania* (4, 5, 37). La pentamidina actúa sobre el genoma del parásito mediante el bloqueo de la replicación y la transcripción, fundamentalmente a nivel mitocondrial. Las poliaminas sustituyen los sitios de unión de los ácidos nucleicos, preferentemente con el ADN presente en el cinetoplasto (5). El uso de la pentamidina ha disminuido debido a su menor eficacia comparada con otros medicamentos y la toxicidad que provoca; aunque constituye una opción en pacientes resistente a los antimoniales (14).

La aminosidina es producida por *Streptomyces riomusus* var. *Paromomycinus*, el cual fue aislado en 1956. La actividad antileishmanial de la aminosidina fue demostrada desde la década de 1960. El mecanismo de acción de la aminosidina frente a *Leishmania* aún requiere ser completamente elucidado. Algunas evidencias experimentales demuestran que inhibe la síntesis de proteínas ya que se une con la subunidad 30S ribosomal e interfiere con la iniciación por el ácido ribonucleico (ARN) mensajero. Por otra parte, se ha observado que promueve la asociación de la subunidad ribosomal con ARN mitocondrial, provocando una baja concentración de Mg^{2+} que provoca la disfunción en el sistema respiratorio parasitario. Tres formulaciones de la aminosidina en crema han sido utilizadas para la LC: aminosidina al 15 % con cloruro de metilbenzetonio al 12 %, aminosidina al 15 % con urea al 10 % y aminosidina con gentamicina al 0,5 %. Estas formulaciones han mostrado variable eficacia respecto a la especie de *Leishmania* involucrada (16).

La miltefosina fue sintetizada en la década del 1960 y utilizada por sus propiedades inmunomoduladoras. En 1987, Croft y colaboradores reportaron su actividad antileishmanial *in vitro* frente a *L. donovani* (6). El mecanismo de acción antileishmanial ha sido extrapolado de su efecto sobre células de mamíferos. La miltefosina modula los receptores de la superficie celular, el metabolismo inositol, la activación de la fosfolipasa y la proteína kinasa C y otras vías metabólicas que culminan en la apoptosis (38). La miltefosina constituye el primer fármaco que puede ser administrado por vía oral y se considera uno de los avances en la terapia contra *Leishmania*. Sin embargo; recientes estudios han demostrado la insensibilidad de algunas especies como son: *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. mexicana* (39). Estos resultados conllevan a que en América la miltefosina no constituya la mejor alternativa de tratamiento (23). Por otra parte, en estudios con animales se evidenció que la miltefosina es teratogénica, por lo que está contraindicada en pacientes embarazadas (6, 14).

II.8.2. Otros fármacos utilizados en la clínica

Los imidazoles y triazoles son conocidos como agentes antifúngicos que son bien tolerados por vía oral. Este grupo de fármacos inhiben la enzima 14 α -dimetilasa de la biosíntesis del esterol, interfiriendo en la biosíntesis de la membrana del parásito. Entre este grupo de medicamentos se destacan el fluconazol (40), el ketoconazol (41), el itraconazol (42) y el posaconazol (43). Sin embargo, estos fármacos han mostrado distintos niveles de eficacia y no son activos frente a todas las formas de la enfermedad.

La actividad antileishmanial de las purinas análogas como el allopurinol ha sido evaluada en ensayos clínicos con pacientes con LC y LV. Este fármaco es usado como sustrato por varias enzimas de la vía metabólica de síntesis de las purinas y se incorpora selectivamente en el ADN del parásito. Los resultados de su eficacia son controversiales por lo que en muchos países se discontinuó su uso totalmente (44).

La sitamaquina es un fármaco análogo de la 8-aminoquinolina que se administra por vía oral, conocida por WR 6026. Esta nueva primaquina fue desarrollada originalmente para el tratamiento de la malaria. Estudios en animales han demostrado una buena eficacia frente a la LV. Sin embargo; en estudios clínicos no se ha observado una actividad relevante después de 28 días de tratamiento (45).

La cura de la infección por *Leishmania* es dependiente del desarrollo de una respuesta efectiva del sistema inmune, por lo que el tratamiento con medicamentos que estimulen el sistema inmune ha sido explorado. Esto fue demostrado por la combinación de IFN- γ y derivados de antimonio frente a la LV en la India y Kenya (46), la administración combinada de la anfotericina B con IL-12 o IL-10 (47). No obstante, el precio de los inmunomoduladores es exorbitantemente elevado para la población endémica de los países en vías de desarrollo. Recientemente, los inmunomoduladores sintéticos han mostrado su actividad frente a la leishmaniosis. Entre estos compuestos se destaca el tucaresol, el cual promueve una respuesta del tipo Th1 y la producción de IL-12 e IFN- γ (48). El iminoquimod, una imidazoquinolina, induce la producción de óxido nítrico en macrófagos infectados *in vitro* con *L. donovani* (49).

II.8.3. Terapia combinada

Durante la última década se ha observado un incremento en la ineficacia de algunos fármacos en áreas endémicas, por lo que la terapia combinada se ha convertido en una nueva estrategia para el tratamiento de la leishmaniosis. La combinación de fármacos puede aumentar su potencia, reducir sus efectos tóxicos y prevenir la aparición de resistencia. Ejemplo de ello podemos citar el uso extensivo de la aminosidina en Sudán en combinación con el pentostam para el tratamiento de la LV con una administración durante 17 días (50). Recientemente, se reportó la eficacia de la miltefosina por vía oral y la aminosidina por vía tópica al tratar animales infectados con *L. major* (51).

II.8.4. Desarrollo de nuevos fármacos

Desde la pasada década se ha observado un incremento en el desarrollo de fármacos contra *Leishmania*. Este ascenso ha sido favorecido por el aumento en el conocimiento sobre la biología, vías metabólicas y el genoma del parásito, la revolución en las técnicas químicas, los avances en las herramientas bioinformáticas y el apoyo de organizaciones y la industria (52).

El desarrollo de productos sintéticos se ha basado en la búsqueda virtual o *in silico* a partir de un grupo farmacóforo basado en dianas terapéuticas del parásito (52). Como ejemplo podemos citar los azasteroles que inhiben la 24-metiltransferasa, la cual ha mostrado

actividad frente a *L. donovani* y *L. amazonensis* (53). La edelfosina y la ilmofosina, nuevos derivados del alquil-lisofosfolípido, demostraron una alta actividad *in vitro* frente a *L. donovani* (54) y la nicotinamida, un inhibidor de la deacetilasa NAD-dependiente, que causa la inhibición de *L. infantum* (55). Los productos sintéticos han sido considerados exitosos debido al costo de producción, el tiempo de obtención, su novedad y fácil escalado en la industria (56).

Actualmente, el 60 % de las personas que viven en áreas endémicas dependen de la medicina natural y tradicional para el tratamiento de sus enfermedades, fundamentalmente por el uso de plantas medicinales (7, 57). Por estos motivos, el Programa de Enfermedades Tropicales de la OMS ha considerado como prioritario la evaluación farmacológica de las plantas (7), las cuales constituyen la fuente más explorada debido a su facilidad de obtención de la naturaleza, a la larga historia de su uso por el hombre y a que presentan una amplia diversidad de componentes bioactivos. Entre las plantas que han demostrado potencialidades frente a *Leishmania* podemos citar: *Peschiera australis* (58), *Maesa balansae* (59) y *Tanacetum parthenium* (60); así como compuestos aislados: chalconas, flavonoides, naftoquinonas, saponinas y monoterpenos (7, 57, 61). La actividad antileishmanial observada ha demostrado que las plantas medicinales constituyen una fuente promisoriosa de componentes químicos para el desarrollo de nuevos fármacos contra la leishmaniosis.

II.8.5. *Chenopodium ambrosioides*

El género *Chenopodium* consta de 120 especies, abundantes en las zonas tropicales y cálidas. En este género, *C. ambrosioides* (Figura 6) es la especie más importantes y su utilización es muy conocida en la medicina tradicional (9, 62). La especie es de origen americano y ahora crece en algunas zonas de Europa y África (63, 64).

C. ambrosioides es popularmente conocida como "apazote", "pazote", "paico" o "mastruz". Es una hierba anual o bianual, de hasta 1 m, con hojas centuplicadas, de bordes serrados. Presenta pequeñas flores con panículas terminales densas de glomérulos, cada una con cinco sépalos. El cáliz encierra las frutas y las semillas son de color negro y horizontal con menos de 0,8 mm de largo (63, 65).



Figura 6. *Chenopodium ambrosioides* en su habitat natural.

Comenzando el siglo XVIII, fue producido como un medicamento antihelmíntico y en el siglo XIX, el aceite esencial (AE) de *C. ambrosioides* se destilaba como un potente antihelmíntico con fines comerciales, siendo utilizado durante muchos años en el Reino Unido y los Estados Unidos de Norteamérica. Posteriormente, el uso del AE disminuyó, permaneciendo restringido a la población rural y endémica (66). La principal forma de utilización de esta planta por la población es como un extracto acuoso, como una decocción o infusión (65). En algunas zonas de España el *C. ambrosioides* es también consumido como una bebida social (té) en un ambiente relajado de conversación (63). Quilan y colaboradores informaron de la experiencia en una población indígena acerca del tratamiento a base de estas plantas para las lombrices intestinales, a través de una entrevista o conversación informal (62). En este estudio, el 100% de los informantes mencionaron *C. ambrosioides* como una de las principales plantas utilizadas, y la mayoría de las personas (73 %) la seleccionan en primera opción. Recientemente, Kvist y colaboradores reportaron el uso de esta planta por los nativos de la provincia de Loreto, Perú, para el tratamiento de la leishmaniosis cutánea y la malaria (9). En una zona costera del estado de Bahía, Brasil, uno de los principales productos naturales utilizados por la población rural es el *C. ambrosioides*. Los sujetos entrevistados (31%) mencionan esta planta para tratamiento de

las úlceras en la piel causada por *L. braziliensis* (8). Estos reportes etnofarmacológicos demuestran que la población endémica continua utilizando el *C. ambrosioides* como antiparasitario con aparente éxito, con especial referencia contra la leishmaniosis.

El principal uso reconocido de *C. ambrosioides* es como antihelmíntico, vermífugo, emenagogue y abortivo. Sin embargo, en la literatura existen reportes científicos acerca de su actividad contra bacterias: *Mycobacterium tuberculosis* (67), protozoos: *Plasmodium falciparum* (68), *Trypanosoma cruzi* (69), *Giardia lamblia* (70) y helmintos: *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichuria*, *Ancylostoma duodenale* (71). Otros efectos se han descrito como son la actividad antitumoral (72) y contra los insectos (73).

En la década del 60 fue abolida la distribución comercial del aceite debido a muertes derivadas del consumo del AE, probablemente debido a sobredosis en la mayoría de los casos (66). Los principales síntomas de la intoxicación con el AE de *C. ambrosioides* son gastroenteritis y alteraciones del sistema nervioso central (dolor de cabeza, pérdida de la visión, incoordinación) (65). MacDonald y colaboradores observaron que el ascaridol causó una reducción en las contracciones de los músculos gastrointestinales de ratas (66), mientras que Okuyama y colaboradores reportaron que produjo hipotermia y disminuyó la actividad locomotora a dosis de 100 mg/kg en ratones (74).

El principal componente de *C. ambrosioides* es el 1,4-peróxido de p-menta- 2-eno, Ascaridol, el cual puede constituir hasta el 85 %, mientras que otros pueden presentarse sólo como trazas. El análisis químico ha demostrado la presencia de carvacrol, pineno, fenantreno, terpineno, limoneno, cimeno, cariofileno, apiol, entre otros (75, 76, 77).

III. Materiales y Métodos

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos: Los reactivos y medios de cultivo utilizados en la realización de este estudio contaban con el certificado de calidad puro para análisis y, salvo en los que se especifique la procedencia, se obtuvieron de Sigma, St. Louis, Estados Unidos (Anexo 4).

Materiales biológicos: Las cepas de microorganismos y líneas celulares empleados en los experimentos fueron obtenidos de colecciones reconocidas (Anexo 5).

Animales: Los ejemplares utilizados fueron obtenidos de centros reconocidos de producción de animales de experimentación (Anexo 6), los cuales estaban acreditados con sus correspondientes certificados de calidad. Los animales se mantuvieron en condiciones convencionales y se trabajaron bajo las normas éticas para el uso de animales de experimentación (Anexo 6).

Productos en estudio: Plantas de *C. ambrosioides* fueron colectadas en el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana, Cuba. Un espécimen (No. 4639) se encuentra depositado en la estación Experimental de Plantas Medicinales “Dr. Juan Tomás Roig”, Cuba. El AE fue extraído por destilación de la parte aérea de la planta con vapor, usando un equipo Clevenger según las Normas Ramal 309 (78). Se caracterizó por Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masa como detector, por impacto electrónico a 70eV, utilizando una columna SPB (30 m x 25 mm x 0,25 μ m), la velocidad de flujo fue de 1,5 mL/minuto, la temperatura de la fuente y la interfase fue de 280°C, la temperatura inicial del horno fue de 50°C (10 minutos) y la programación de la temperatura fue de 5°C por minuto hasta alcanzar la temperatura final. El rendimiento en la extracción del AE a partir de *C. ambrosioides* fue del 1 % aproximadamente. El cromatograma obtenido por cromatografía gaseosa del AE mostró 68 picos (Anexo 7). El 97,6 % de los componentes fueron identificados (Anexo 7), siendo los principales compuestos: el carvacrol (62,4 %), el ascaridol (22,5 %) y el óxido de cariofileno (5,64 %). Para los estudios realizados se realizaron tres colectas diferentes de la planta, en el mismo lugar y época del año (Abril). El AE obtenido de los tres lotes presentaron similares características físico-químicas y biológicas (Anexo 8).

El ascaridol fue obtenido por síntesis química mediante la adición de oxígeno a una mezcla de 6,1 mmol α -terpineno y 5 mg rosa bengal disueltos en 80 mL de metanol (79). La identificación se realizó mediante Espectrofotometría Infrarroja y por Resonancia

Magnética Nuclear. El carvacrol y el óxido de cariofileno fueron obtenidos de la firma comercial Sigma Aldrich (Viena, Austria).

III.1. Determinación de la actividad *in vitro* del aceite esencial extraído de *C. ambrosioides* y sus componentes mayoritarios frente a *L. amazonensis*

III.1.1. Determinación de la Concentración Inhibitoria Media de los productos frente a promastigotes

A partir de un cultivo de promastigotes de *L. amazonensis* en fase de crecimiento logarítmico, se prepararon subcultivos en medio Schneider fresco a una concentración de 10^5 parásitos/mL. Se distribuyeron 199 μ L de la suspensión resultante de parásitos en las primeras cuatro filas de una placa de 96 pozos (Costar®, EUA) e igual volumen de medio Schneider sin parásito en las cuatro filas restantes. Los productos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO), del cual se transfirieron 200 μ L a una placa de 96 pozos para obtener un total de 11 diluciones seriadas 1:2. De cada dilución se aplicó 1 μ L a cada columna de la placa anteriormente preparada. Las placas se sellaron con Parafilm (American National Can, Greenwich, Inglaterra) y se incubaron a 26°C durante 72 horas. Posteriormente, se analizaron los promastigotes móviles en cada pozo de la placa en el microscopio invertido (Olympus, Japón) para eliminar posibles interferencias del producto y la medición de la actividad fosfatasa en el parásito y se adicionó a cada pozo 20 μ L de para-nitrofenilfosfato a una concentración de 20 mg/mL disuelto en la solución amortiguadora (1 M NaAc, 1 % Triton, pH=5,5) y se incubó a 37°C. Se realizó la lectura a las 3 h en un lector de ELISA EMS Reader MF Versión 2,4-0 (Pharmacia, LKB, USA) a una longitud de onda de 405 nm. Se calcularon las medias de las absorbancias de los pozos, con o sin parásitos, y las diferencias de estas medias constituyeron las absorbancias netas para cada dilución. Los valores de concentración contra absorbancia fueron ajustados al modelo de Emax sigmoidea, obteniendo directamente la Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀) a partir de las ecuaciones de regresión sigmoidea mediante la fórmula (80):

$$\hat{E} = \hat{E}_o - \frac{\hat{E}_{\max} \times C^n}{(CI_{50}^n + C^n)}$$

Donde:

\hat{E} : absorbancia neta de los pozos con promastigotes tratados de cada dilución.

\hat{E}_0 : absorbancia neta de los pozos con promastigotes controles.

\hat{E}_{max} : absorbancia neta de los pozos con promastigotes controles – Absorbancia neta de los pozos con promastigotes tratados donde los productos mostraron su máximo efecto.

Se realizaron tres réplicas y se promediaron las CI_{50} obtenidas para cada experimento por separado.

III.1.2. Determinación de la Concentración Inhibitoria Media de los productos frente a amastigotes intracelulares

Se sacrificaron ratones de la línea BALB/c mediante dislocación cervical y se extrajeron los macrófagos residentes en el peritoneo mediante lavados con RPMI suplementado con antibióticos (penicilina sódica 200 UI, estreptomina 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La suspensión celular ($1-3 \times 10^6$ células/mL) se distribuyó en placas de 24 pozos (Costar®, USA) incubándose a 37°C a una atmósfera del 5% de CO_2 . A las 2 h de incubación se eliminaron las células libres mediante tres lavados con solución salina fisiológica estéril (SSFE). A la monocapa de macrófagos peritoneales obtenida se le añadió 200 μL de medio RPMI suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y los antibióticos correspondientes.

Los macrófagos adheridos se infectaron con promastigotes estacionarios de *L. amazonensis* a razón de cuatro parásitos por macrófago y la placa se incubó bajo las mismas condiciones. A las 4 h de incubación los promastigotes libres fueron eliminados mediante tres lavados con SSFE. Posteriormente, se les adicionó 999 μL de medio RPMI suplementado con SFB, antibióticos y 1 μL de los productos diluidos en DMSO. Los cultivos fueron incubados nuevamente, durante 48 h, bajo las mismas condiciones (81).

Posteriormente, se eliminó el sobrenadante, la monocapa celular fue lavada con SSFE, fijada con metanol durante 10 min y teñida con Giemsa diluida en SSFE a un ratio de 1:4 (V:V) durante 15 min. Se determinó el número de amastigotes en 100 macrófagos en cultivos duplicados, por conteo en un microscopio (Olimpus, Japón) con magnificación $1000\times$ con aceite de inmersión. Se determinó, además, el porcentaje de macrófagos

infectados al analizar 100 macrófagos. Se calculó el porcentaje de reducción de la infección según la fórmula (58):

$$\text{Porcentaje de Reducción (\%RI) de la infección} = \frac{\text{Índice de Supervivencia de Tratados}}{\text{Índice de Supervivencia de los Controles}} \times 100$$

Donde:

$$\text{Índice de Supervivencia} = \frac{\% \text{ de Macrófagos Infectados}}{\text{Número de amastigotes/macrófago}}$$

La CI_{50} se calculó a partir de las curvas concentración–respuesta, ajustadas mediante regresión lineal. Se realizaron tres réplicas y se promediaron las CI_{50} obtenidas para cada experimento por separado.

III.1.3. Determinación de la CI_{50} de los productos sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c.

Se obtuvo la monocapa de macrófagos como se explicó en el acápite III.1.2. y se le añadieron 200 μL de medio RPMI suplementado con SFB y antibióticos (penicilina sódica 200 UI, estreptomycin 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Al primer pozo de cada fila se le agregó, además, 19 μL de medio RPMI completo y 1 μL de los productos disueltos en DMSO, a partir del cual se realizaron 11 diluciones seriadas 1:2. Se utilizó un control con macrófagos tratados con 1 μL de DMSO. A los 3 días de incubación a 37°C y 5% de CO_2 , se lavaron las células tres veces con SSFE y se les añadió 15 μL de una solución de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) preparada a razón de 5 mg/mL y se incubó la placa nuevamente. A las 4 h se eliminó el sobrenadante y la sal de tetrazolio precipitada se disolvió en 100 μL de DMSO. La absorbancia se midió en un lector de ELISA a 560 nm y a 630 nm como longitud de onda de referencia (82).

Se calcularon las absorbancias medias de cada concentración a cada longitud de onda, se restaron ($\hat{E}_{\lambda=570\text{nm}} - \hat{E}_{\lambda=630\text{nm}}$) y se graficaron las absorbancias resultantes contra las concentraciones evaluadas. Estas curvas de concentración–respuesta se ajustaron mediante el modelo de Emax sigmoidea y la CI_{50} se obtuvo directamente de la ecuación de regresión sigmoidea referida en el acápite III.1.1. (80). Se realizaron tres réplicas para cada producto y se promediaron las CI_{50} obtenidas para cada experimento por separado.

Los Índices de Selectividad (IS) para cada producto fueron calculados mediante la división de la CI_{50} para la célula hospedera entre la CI_{50} de los productos frente a amastigotes de *Leishmania* (60).

III.1.4. Comparación de la actividad antileishmanial y la citotoxicidad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* con los fármacos convencionales.

Para determinar la CI_{50} frente a promastigotes, amastigotes y macrófagos peritoneales de ratón BALB/c se llevó a cabo la misma metodología que se describió en los acápites III.1.1, III.1.2 y III.1.3., respectivamente. Los parásitos y macrófagos fueron tratados con diferentes concentraciones de glucantime (Rhône-Poulenc Rorer, Mexico), anfotericina B (Imefa, Ciudad de la Habana, Cuba) y pentamidina (Richet, Buenos Aires, Argentina).

III.2. Evaluación del efecto del aceite esencial extraído de *C. ambrosioides* frente a la leishmaniosis cutánea experimental en ratones BALB/c, causada por *L. amazonensis*.

En todos los experimentos se trabajaron con ratones adultos jóvenes de la línea BALB/c, de 6-10 semanas de edad y con un peso entre 18-22 g. Los animales se distribuyeron de forma aleatoria en grupos de 10 animales cada uno, se marcaron individualmente, se pesaron y se calculó el peso corporal promedio para determinar la concentración a que se debían preparar las soluciones.

III.2.1. Determinación de la Dosis Máxima Tolerada del aceite esencial de *C. ambrosioides* en ratones BALB/c por vía intraperitoneal.

Se determinó la Dosis Máxima Tolerada (DMT) del AE diluido en Miglyol 810N (Hüls Aktiengesellschaft, Alemania) por vía intraperitoneal al administrarse una dosis de 15, 30 y 60 mg/kg al día por 15 días. Los animales se mantuvieron en observación durante 4 semanas, registrándose las muertes cada 24 h y el peso corporal de forma individual cada 3 días. Se calculó el incremento de peso corporal de cada animal desde el inicio del ensayo hasta los diferentes tiempos a que fueron pesados. Finalmente, se seleccionó como la DMT aquella dosis del AE que no provocó muertes ni pérdidas de peso superiores al 10% (83).

III.2.2. Evaluación de la actividad antileishmanial del aceite esencial de *C. ambrosioides* frente a la leishmaniosis cutánea experimental en ratones BALB/c, causada por *L. amazonensis*.

En los cojinetes plantares derechos de los animales se inocularon 10^7 promastigotes metacíclicos de *L. amazonensis* (5 días de crecimiento) en 20 μ L de SSFE por vía subcutánea. Por vía intraperitoneal, se administró una dosis de 30 mg/kg del AE disuelto en Miglyol una vez al día durante 15 días en un volumen de 0,1 mL.

El tamaño de las lesiones se determinó cada 7 días desde el inicio del tratamiento hasta la semana 6 post-infección por la medición del cojinete plantar con un cutímetro digital con un error de 0,01 mm. Se calcularon las medias de los cojinetes infectados y no infectados y las diferencias de estas medias constituyeron el tamaño neto de la lesión en cada medición. Se determinó además la carga parasitaria mediante el método de microtitulación en placa (84). Tres animales de cada grupo fueron sacrificados 15 días después de finalizar el tratamiento por dislocación cervical y se tomaron muestras de la zona afectada. Las muestras fueron pesadas y homogeneizadas en una placa Petri que contenía 4 mL de medio Schneider y los antibióticos correspondientes. Posteriormente, se tomaron 15 μ L del homogenato y se adicionaron en la primera columna de una placa de 96 pozos que contenía 285 μ L de medio Schneider al 10 % de SFB. Bajo condiciones de esterilidad se realizaron 12 diluciones seriadas 1:4 en una placa de 96 pozos, que contenía 225 μ L de medio Schneider al 10 % de SFB y antibióticos. La placa se incubó a 26°C y a los 7 días se observó la presencia de promastigotes móviles en cada pozo utilizando un microscopio invertido. La carga parasitaria por gramo fue calculada mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Carga Parasitaria} = \frac{\text{Peso de la muestra (g)} \times 400}{\text{Título}}$$

Donde:

Título: última dilución en donde se observó al menos un promastigote móvil.

III.2.3. Evaluación de la actividad antileishmanial del aceite esencial de *C. ambrosioides* al ser administrado por diferentes vías, frente a la leishmaniosis cutánea experimental en ratones BALB/c, causada por *L. amazonensis*.

Para comparar la actividad antileishmanial al tratar los animales con el AE por diferentes vías se llevaron a cabo cuatro experimentos. En todos los experimentos se infectaron

ratones hembras de la línea BALB/c, en los cojinetes plantares de la extremidad posterior derecha, por vía subcutánea, con promastigotes estacionarios de *L. amazonensis* a razón de 5×10^6 parásitos/animal. A los 30 días se distribuyeron los animales de forma aleatoria en grupos de 10 animales cada uno. Se pesaron los ratones, se determinó el peso corporal promedio de cada grupo y se calculó la concentración a que se debían preparar las soluciones de los productos a administrar. Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo los siguientes protocolos (Tabla 3), realizando el tratamiento durante 15 días en todos los casos. Para la administración por vía intraperitoneal e intralesional se utilizó una aguja hipodérmica 26G; mientras que para la vía oral se administró el producto con una cánula intragástrica.

El desarrollo de las lesiones y la carga parasitaria de los animales de cada grupo se realizó como se explicó en el acápite III.2.2. Adicionalmente, se determinó la dosis efectiva media (DE_{50}) mediante un ajuste de regresión lineal en los estudios de actividad del AE a diferentes dosis por vía oral e intralesional.

Tabla 3: Protocolos de trabajo para la comparación de la actividad antileishmanial del aceite esencial extraído de *C. ambrosioides*.

Experimento	Protocolo de Tratamiento			
	Grupos	Producto	Dosis	Vía
Actividad del AE ^a al administrarlo por vías diferentes	Grupo 1	AE	30 mg/kg/día/0,1 mL	Intraperitoneal
	Grupo 2	AE	30 mg/kg/día/0,1 mL	Oral
	Grupo 3	AE	0,3 mL/día	Intralesional
	Grupo 4	Veh (Miglyol) ^b	0,1 mL/día	Intraperitoneal
	Grupo 5	Veh (Miglyol)	0,1 mL/día	Oral
	Grupo 6	Veh (Miglyol)	0,3 mL/día	Intralesional
	Grupo 7	No recibió tratamiento		
Actividad del AE al administrar diferentes dosis por vía oral	Grupo 1	AE	30 mg/kg/día/0,1 mL	Oral
	Grupo 2	AE	60 mg/kg/día/0,1 mL	Oral
	Grupo 3	AE	90 mg/kg/día/0,1 mL	Oral
	Grupo 4	AE	120 mg/kg/día/0,1 mL	Oral
	Grupo 5	AE	150 mg/kg/día/0,1 mL	Oral
	Grupo 6	Veh (Miglyol)	0,1 mL/día	Oral
	Grupo 7	No recibió tratamiento		
Actividad del AE al administrar diferentes dosis por vía intralesional	Grupo 1	AE	30 mg/kg/0,05 mL días alternos	Intralesional
	Grupo 2	AE	60 mg/kg/0,05 mL días alternos	Intralesional
	Grupo 3	AE	90 mg/kg/0,05 mL días alternos	Intralesional
	Grupo 4	AE	120 mg/kg/0,05 mL días alternos	Intralesional
	Grupo 5	AE	150 mg/kg/0,05 mL días alternos	Intralesional
	Grupo 6	Veh (PVP) ^c	0,05 mL/ días alternos	Intralesional
	Grupo 7	No recibió tratamiento		
Comparación de la actividad antileishmani al del AE con los fármacos de referencia	Grupo 1	AE	150 mg/kg/día	Oral
	Grupo 2	AE	150 mg/kg/días alternos	Intralesional
	Grupo 3	Glucantime	28 mg/kg/día	Intraperitoneal
	Grupo 4	Anfotericina B	1 mg/kg/día	Intraperitoneal
	Grupo 5	Pentamidina	4 mg/kg/día	Intraperitoneal
	Grupo 7	No recibió tratamiento		

^a: Aceite esencial de *C. ambrosioides*.

^b: Vehículo utilizado para administrar el aceite esencial, Miglyol.

^c: Vehículo utilizado para administrar el aceite esencial, Polivinilpirrolidona.

III.2.4. Estudio toxicológico preliminar

Con el objetivo de clasificar el daño que ocasiona el AE se determinó la Toxicidad Aguda Oral (TAO) siguiendo la guía 423 de la Organización Económica para la Cooperación y Desarrollo (OECD). El ensayo se llevó a cabo en ratas hembras de la línea Wistar a las que se le administraron dosis de 300 y 2000 mg/Kg en una sola dosis por vía oral utilizando una cánula intragátrica. Como vehículo se utilizó la PVP y se diluyó el producto en medio acuoso. Los animales se mantuvieron en observación durante 15 días, registrándose las muertes cada 24 h, el peso corporal de forma individual cada 7 días y se realizaron observaciones dos veces al día de los signos de toxicidad retardada. Se tomaron muestras de algunos órganos (pulmones, corazón, bazo, hígado, riñones y estómago) al finalizar el estudio para realizar estudios macroscópicos. Se calculó el incremento de peso corporal de cada animal desde el inicio del ensayo hasta los diferentes tiempos a que fueron pesados. Finalmente, se clasificó el AE según la OECD (85).

III.3. Evidencias experimentales sobre el posible mecanismo de acción del aceite esencial extraído de *C. ambrosioides*.

III.3.1. Análisis de la actividad del aceite esencial de *C. ambrosioides* frente a diferentes microorganismos y líneas celulares.

Se realizó la evaluación del AE frente a otros protozoos parásitos (*L. donovani*, *P. falciparum* y *Trichomonas vaginalis*), bacterias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*), hongos (*Candida albicans*), virus (*Herpes simplex* I y II) y células provenientes de mamíferos (líneas celulares: Vero y MRC-5).

Para determinar la CI_{50} frente a promastigotes de *L. donovani* se llevó a cabo la misma metodología que se describió en el acápite III.1.1. En el caso de la evaluación frente a amastigotes se siguió el mismo protocolo que en el acápite III.1.2.; aunque en este caso, los parásitos se añadieron en una proporción de 10 promastigotes por macrófago y se incubaron durante 24 h (34). Para el análisis frente a *P. falciparum* se utilizaron 199 μ L de un cultivo asincrónico de parásitos (1 % de parasitemia y 2% de hematocrito) en placas de 96 pozos. Se adicionó 1 μ L de diferentes concentraciones del AE y se incubaron los cultivos a 37°C, durante 48 h. La estimación del crecimiento se determinó mediante

conteos directos de extendidos de la suspensión, fijados con metanol y teñidos con Giemsa (86). Frente a *T. vaginalis* se utilizó una placa de 96 pozos donde a cada pozo se adicionaron 49 μL del medio de Diamond (TYI-S-33) suplementado con 10 % de SFB, 50 μL de una solución al 0,016 % de bromocresol y 1 μL de diferentes concentraciones del AE o DMSO. A todos los pozos se le agregaron 100 μL de una suspensión de parásitos a razón 50×10^3 parásitos/mL. Las placas fueron incubadas a 37°C bajo condiciones anaeróbicas durante 48 h. Finalmente, la absorbancia fue medida a 450 nm en un lector de ELISA (87).

La evaluación antibacteriana del AE se llevó a cabo frente a *E. coli*, *E. aureus* y *P. aeruginosa*; mientras que frente a levadura se utilizó *C. albicans*. Para determinar la actividad del AE frente a estos patógenos se utilizó el método de difusión en pozo con medio triptona-soya-agar (TSA). Los microorganismos fueron ajustados a 0,5 escala MacFarland. Se prepararon diluciones dobles desde 10 hasta 40 mg/mL. Los microorganismos ajustados fueron diluidos en el agar a razón de 1 mL de mo/100 mL de medio. El agar fue perforado y se añadió 50 μL de las diferentes diluciones del AE en cada pozo. Las placas fueron incubadas a 37°C. A las 24 h se leyó el halo de inhibición (88).

La actividad antiviral fue evaluada frente a *Herpes simplex* tipo I y II. En placas de 96 pozos se adicionaron las células Vero y 100 μL del AE a diferentes concentraciones. Las placas fueron incubadas a 37°C y 5% CO_2 durante 90 min y las células fueron infectadas con los virus a 100 TCID₅₀-pozo. Los cultivos fueron incubados nuevamente por 72 h bajo las mismas condiciones. Finalmente, el número de células fue cuantificado por un método colorimétrico usando una sal de tetrazolio, MTT (89).

El ensayo frente a todas las líneas celulares (Vero y MRC-5) se desarrolló bajo las mismas condiciones. En las cuatro primeras filas de una placa de 96 pozos se añadieron 100 μL de diferentes concentraciones del AE disuelto en medio de cultivo sobre la monocapa de células. Se incubaron por 72 h y se añadieron 20 μL de 5 mg/mL de MTT por pozo y se incubaron las placas durante 3 h a 37°C en atmósfera de CO_2 al 5%. Al cabo de este tiempo se eliminó el medio de los pozos y se añadieron 100 μL de DMSO. La absorbancia fue medida en un lector de ELISA a 560 nm y 630 nm (82).

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se determinó la CI_{50} mediante el modelo de Emax sigmoidea como se describió en el acápite III.1.1. Posteriormente, se

determinó el IS, mediante la división de la CI_{50} del AE frente a líneas celulares sobre la CI_{50} del AE frente a amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* (60).

III.3.2. Identificación de la formación de radicales libres del aceite esencial de *C. ambrosioides* y sus componentes mayoritarios por Resonancia Paramagnética Nuclear.

La generación de radical libre fue analizada mediante Resonancia Paramagnética Nuclear (RPN). Para este experimento el AE, el ascaridol, el carvacrol y el óxido de cariofileno fueron disueltos en ACN, de los cuales se agregaron 10 μ L en solución amortiguadora de fosfato (154 mM NaCl, 16 mM NaH_2PO_4 , 81 mM Na_2HPO_4 , pH=7,2) y 10 μ L de 40 mM de 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO), a una concentración final de 175 μ g/mL para el AE y 500 μ M para el resto de los compuestos. La reacción comenzó con la adición de 1 μ L de 2 mM $FeSO_4$. La solución fue transferida a una celda de cuarzo lisa de 0,9 x 5,5 cm e irradiada con una lámpara de Hg ultravioleta a alta presión en la cavidad del espectrómetro ER4118X-MD5 (Bruker, Rheinstetten, Alemania) con una frecuencia de la microseñal de 9,68 GHz, modulación de la frecuencia de 100 kHz, modulación de la amplitud de 1 G, constante de tiempo de 0,163 s y radio del registro de 71 G/min. Se realizaron 5 registros y se obtuvo el espectro promedio de los mismos. Los productos fueron analizados por separado. Cada muestra se repitió tres veces y los resultados fueron expresados como la media de la intensidad de la frecuencia calculados a través del programa ORIGIN para Windows (Versión 6.1, 2000).

III.3.3. Determinación de la actividad del aceite esencial de *C. ambrosioides* y sus componentes sobre los Complejos de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria.

Para la medición de la actividad del Complejo II se utilizaron subpartículas mitocondriales (SPM) aisladas de *Sacharomyces cerevisiae*, como modelo de microorganismo, y SPM de *Bos taurus* como modelo de mamífero. Las SPM fueron obtenidas según el método descrito por Nohl y colaboradores (90). La concentración de proteínas fue determinada mediante el método de Biuret usando BSA como estándar (91). La actividad enzimática fue determinada mediante el consumo de oxígeno de las SPM (0,2 mg/mL), en la celda de un

electrodo de oxígeno (Hansatech, Alemania). Las SPM se disolvieron en 1 mL de solución amortiguadora (300 mM Sacarosa, 1mM EDTA, 20 mM TRAP, pH=7,4) y se les añadió 20 μ L de 600 mM de succinato. Se utilizaron concentraciones saturantes de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ para estandarizar las concentraciones de oxígeno y se añadieron 10 μ L de 100 mM de KCN como control de inhibición.

La actividad del Complejo III (Complejo bc1) purificado de *S. cerevisiae* y *B. taurus* fue medida espectrofotométricamente en un equipo Shimadzu (Princeton Applied Research, Alemania). El Complejo III fue obtenido a partir de las SPM de *B. taurus* y de *S. cerevisiae* según el método descrito por Geier y colaboradores (92). En 1 mL de la solución amortiguadora (250 mM Sacarosa, 0,2 mM EDTA, 50 mM KH_2PO_4 , pH=7,2), se adicionó 10 μ L del complejo, 10 μ L de KCN, 10 μ L de NaN_3 y 20 μ L del *Citocromo c*. Posteriormente, se obtuvo el espectro en el tiempo al adicionar diferentes concentraciones de los productos y 75 μ M de dUQH₂. Se utilizó $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ como control de inhibición y la estigmatelina como control positivo (inhibidor del Complejo III) (93).

Para cada experimento se realizaron tres réplicas de cada concentración y se determinó la CI_{50} , mediante una curva de regresión lineal. Se determinó el IS para el Complejo III, mediante la división de la CI_{50} del AE frente al Complejo purificado de *B. taurus* sobre la CI_{50} del AE frente al Complejo purificado de *S. cerevisiae* (60).

III.3.4. Estudio de la interacción del aceite esencial de *C. ambrosioides* con el ADN extraído de *L. amazonensis*.

Para realizar los experimentos se extrajo el ADN de *L. amazonensis* mediante el método de fenol-cloroformo y se verificó la integridad y pureza del mismo (94). El AE fue diluido en DMSO a una concentración final de 3 mg/mL y se obtuvo el espectro de absorción a temperatura ambiente desde 220 nm a 420 nm, a intervalo de 2 nm / 2 seg en un espectrofotómetro (Pharmacia, LKB, EUA). Posteriormente, se adicionaron concentraciones entre 15 ng/mL y 90 ng/mL de y se repitieron las corridas espectrofotométricas. Cada espectro representa la media de tres experimentos realizados por separado. Se determinó la correlación entre la concentración de ADN y la absorbancia obtenida a 290 nm (95).

La viscosidad fue medida utilizando un viscosímetro Ostwald. El ADN fue previamente sonificado durante 30 min en períodos de 5 min. La concentración de ADN se mantuvo constante y se adicionaron concentraciones crecientes del AE desde 5 µg/mL hasta 5 mg/mL. El tiempo de caída fue medido con un cronómetro digital (95).

Para analizar si el AE causa la ruptura del ADN se realizó el estudio electroforético con el plásmido pUC119 a una concentración de 50 ng/mL. Se añadieron concentraciones crecientes del AE entre 3 µg/mL hasta 3 mg/mL y se incubó a 26°C durante 18 h. La reacción fue detenida por la adición de NaCl 1 M a una concentración final de 0,2 M. El plásmido fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % en solución amortiguadora tris-borato-EDTA (TBE 0.5X) (tris-borato 0,045 M, EDTA 0,001 M) con bromuro de etidio (0,5 mg/mL). La corrida electroforética fue a 150 Volts durante 30 minutos. La visualización se realizó mediante luz ultravioleta en un transiluminador (Macrovue 2011, LKB) (95).

III.3.5. Estudio *in vitro* de las interacciones entre el aceite esencial de *C. ambrosioides* y los fármacos convencionales.

Se determinó las posibles interacciones entre el AE y los fármacos convencionales. Se tuvo en cuenta la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la CI_{50} de cada fármaco por separada calculadas previamente. La CMI se tomó como la concentración máxima a utilizar, a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas 1:2, para un total de 11 diluciones de la combinación entre el AE y cada fármaco. La CI_{50} se determinó mediante una curva de regresión sigmoidea como se describió en el acápite III.1.1. A continuación, se calculó la variación en la CI_{50} de cada compuesto en la presencia del otro según el Índice de la Concentración Inhibitoria Fraccional (CIF), el cual es calculado por la siguiente fórmula:

$$\text{Índice CIF} = \frac{[A]}{CI_{50A}} + \frac{[B]}{CI_{50B}}$$

Donde:

CI_{50A} y CI_{50B} : Son las CI_{50} de cada compuesto solo.

[A] y [B]: Son las CI_{50} del AE y el otro compuesto cuando son utilizados en combinación.

El Índice CIF fue utilizado para clasificar la naturaleza de la interacción. Si el Índice CIF era menor o igual a 0,5 indicó sinergismo, si era mayor o igual a 4 indicó antagonismo. Cuando el valor del índice fue entre 0,5 y 4, indicó indiferencia (96).

III.4. Análisis estadístico

Todos los datos fueron almacenados en bases de datos en Excel y el análisis estadístico se inició con la prueba de *Outliers* para detectar valores aberrantes. Posteriormente, se comprobó la normalidad por el ensayo de *Kolmogorov-Smirnov*. Para determinar las diferencias entre los grupos experimentales utilizando los datos del tamaño de la lesión y la carga parasitaria se realizó un análisis de varianza de clasificación doble con mediciones repetidas, seguido de la prueba de comparación múltiple LDS o comparación planificada. Para todos los procedimientos se utilizó el programa STATISTICA para Windows, Versión 4.5, 1993. Los procedimientos específicos fueron descritos en cada acápite.

IV. Resultados

IV. RESULTADOS

Para determinar si el AE de *C. ambrosioides* y sus componentes mayoritarios puros presentaban actividad antileishmanial se realizó la evaluación *in vitro* frente a ambas formas del parásito (promastigotes y amastigotes). Paralelamente, se evaluó el efecto citotóxico sobre macrófagos peritoneales de ratón BALB/c para conocer la selectividad de los mismos.

IV.1. Determinación de la actividad *in vitro* del aceite esencial extraído de *C. ambrosioides* y sus componentes mayoritarios frente a *L. amazonensis*.

El AE y los componentes mayoritarios mostraron actividad frente a ambos estadios de *L. amazonensis* (Tabla 4). No existieron diferencias estadísticas ($P > 0,05$) entre la CI_{50} frente a promastigotes y amastigotes en ninguno de los productos evaluados. El AE mostró un IS superior al resto de los compuestos evaluados.

Tabla 4: Actividad del aceite esencial de *C. ambrosioides* y sus componentes mayoritarios frente a promastigotes y amastigotes de *L. amazonensis* y frente a macrófagos peritoneales de ratón BALB/c.

Producto	$CI_{50}^a \pm DE^b$ ($\mu\text{g/mL}$)			IS ^c
	Promastigotes	Amastigotes	Macrófagos	
Aceite de <i>Chenopodium</i>	$3,74 \pm 0,65$	$4,57 \pm 0,69$	$58,24 \pm 0,05$	13
Ascaridol	$0,09 \pm 0,01$	$0,34 \pm 0,05$	$1,10 \pm 0,04$	4
Carvacrol	$15,34 \pm 4,56$	$13,57 \pm 1,80$	$32,32 \pm 1,92$	2
Óxido de Cariofileno	$4,95 \pm 2,31$	$4,44 \pm 0,39$	$4,48 \pm 0,04$	1

^a: CI_{50} : Concentración del producto que causa el 50 % de mortalidad.

^b: DE: Desviación estándar.

^c: Índice de Selectividad: CI_{50} de macrófagos/ CI_{50} de amastigotes.

Nota: Los resultados son expresados como la media \pm desviación estándar de tres experimentos por separado y cada concentración de cada producto se evaluó por cuadruplicado.

Debido a que el AE mostró el mayor IS se comparó su actividad con la de los fármacos convencionales que actualmente se utilizan en la clínica. El AE mostró una mayor actividad

antileishmanial comparado con el glucantime (fármaco de primera línea) y mayor selectividad que la pentamidina. Sólo la anfotericina B fue más activa que el AE (Tabla 5).

Tabla 5: Actividad del aceite esencial de *C. ambrosioides* y los fármacos de referencia frente a promastigotes y amastigotes de *L. amazonensis* y frente a macrófagos peritoneales de ratón BALB/c.

Producto	CI ₅₀ ^a ± DE ^b (µg/mL)			IS ^c
	Promastigotes	Amastigotes	Macrófagos	
Aceite de <i>Chenopodium</i>	3,735 ± 0,6	4,567 ± 0,702	58,237 ± 0,050	13
Glucantime	> 1500	11,012 ± 3,422	> 1500	-
Anfotericina B	0,026 ± 0,003	0,034 ± 0,006	5,849 ± 0,485	172
Pentamidina	0,37 ± 0,01	1,287 ± 0,115	11,703 ± 1,682	9

^a: CI₅₀: Concentración del producto que causa el 50 % de mortalidad.

^b: DE: Desviación estándar.

^c: Índice de Selectividad: CI₅₀ de macrófagos/CI₅₀ de amastigotes.

Nota: Los resultados son expresados como la media ± desviación estándar de tres experimentos por separado y cada concentración de cada producto se evaluó por cuadruplicado.

El AE mostró actividad promisoriosa frente a *Leishmania* en los ensayos *in vitro*, por lo que se prosiguió a realizar la evaluación de su eficacia en modelos de leishmaniosis en animales de laboratorio.

IV.2. Evaluación del efecto del aceite esencial extraído de *C. ambrosioides* frente a la leishmaniosis cutánea experimental en ratones BALB/c, causada por *L. amazonensis*.

Para seleccionar la dosis del AE para evaluar su eficacia se aplicaron a los animales dosis de (15, 30 y 60) mg/kg por vía intraperitoneal durante 14 días a ratones BALB/c sanos. La aplicación por vía intraperitoneal de una dosis del AE de 60 mg/kg, produjo el 100 % de mortalidad en los animales de experimentación después de 12 administraciones del AE. Las dosis de 15 mg/kg y 30 mg/kg no produjeron muertes, ni signos de toxicidad retardada durante el experimento (30 días). En los animales que recibieron el vehículo (Miglyol) y en los controles no se observó letalidad ni signos de toxicidad.

En los animales tratados con una dosis de 60 mg/kg se observó una disminución máxima de peso corporal; mientras que en los tratados con 30 mg/kg la disminución de peso fue solo del 2 %, aproximadamente. En los animales tratados con el vehículo utilizado, la disminución fue del 4 %. Sin embargo, en los tratados con dosis de 15 mg/kg y en los que no recibieron tratamiento, no se observó disminución del peso corporal (Figura 7).

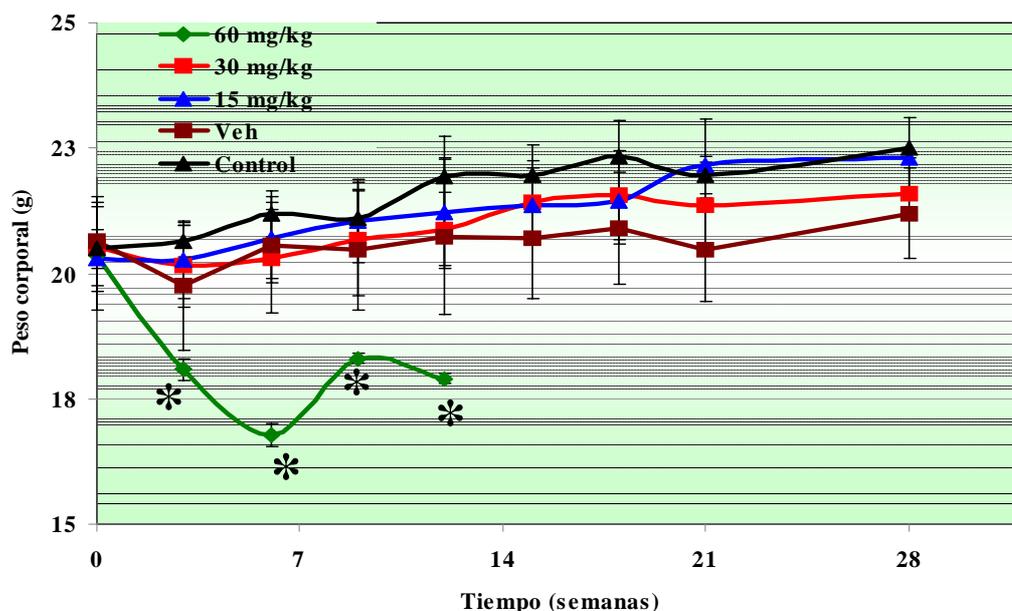


Figura 7: Variación de peso corporal de los ratones BALB/c tratados con el aceite esencial de *C. ambrosioides* por vía intraperitoneal durante 14 días.

Teniendo en cuenta que el AE no causó letalidad, ni signos de toxicidad retardada, ni pérdidas de peso superior al 10 %, se seleccionó como DMT una dosis de 30 mg/kg/día por vía intraperitoneal durante 14 días. Esta dosis fue utilizada para evaluar la eficacia del aceite esencial extraído de *C. ambrosioides* frente a un modelo de leishmaniosis cutánea experimental en ratones BALB/c, causada por *L. amazonensis*.

La Figura 8 muestra el desarrollo de las lesiones en los diferentes grupos de animales. En los ratones tratados durante 15 días con el AE, se observó una disminución del tamaño de la lesión de hasta 0,9 mm, lo que los diferenció desde el punto de vista estadístico del resto de los grupos ($P < 0,01$). Al finalizar el tratamiento, las lesiones en el citado grupo experimental, comenzaron a crecer a un ritmo mayor. Sin embargo, 15 días más tarde,

cuando finalizó el experimento, la talla de las lesiones seguía siendo menor con relación a los grupos restantes ($P < 0,05$). Los animales tratados con el vehículo (Miglyol), no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la talla de sus lesiones ($P > 0,05$) con respecto a los controles no tratados. En los animales que no recibieron ningún tratamiento se observó un crecimiento progresivo de las lesiones durante todo el experimento.

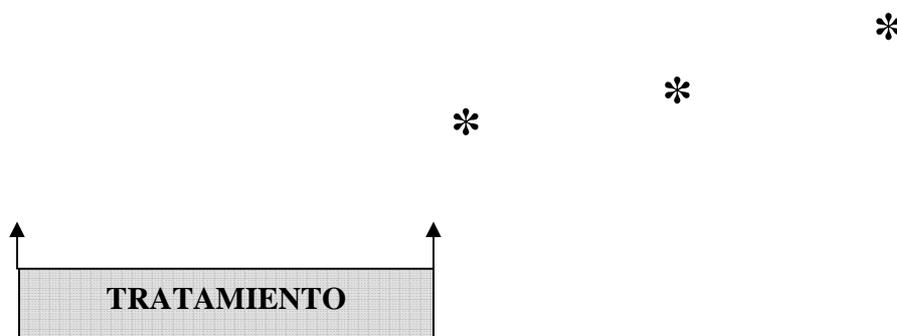


Figura 8: Evolución de las lesiones de los animales infectados con *L. amazonensis* y tratados con 30 mg/kg/día del aceite esencial de *C. ambrosioides*, por vía intraperitoneal durante 14 días (2 semanas). Los resultados son expresados como la media \pm desviación estándar. AE: aceite esencial de *C. ambrosioides*; Veh: Mygliol. *: Muestra diferencias estadísticas ($P < 0,05$) con respecto al vehículo (Mygliol) y controles (no tratados).

Los resultados anteriores fueron corroborados por la determinación de la carga parasitaria en el sitio de la lesión (Figura 9). En los animales tratados con el AE se cuantificó un número de parásitos por gramo, que difirió estadísticamente del resto de los grupos ($P < 0,05$).

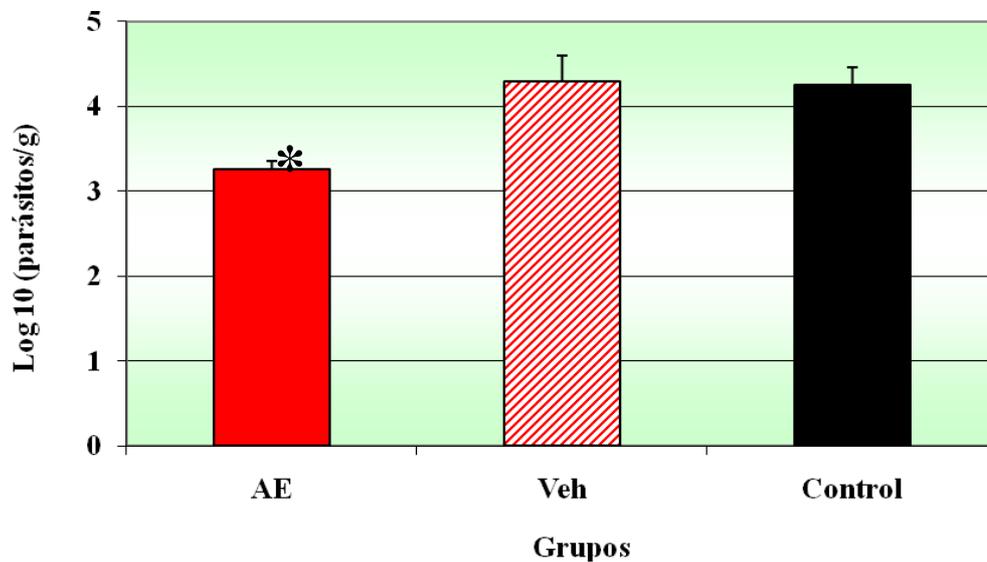


Figura 9: Carga parasitaria en las lesiones de los animales infectados con *L. amazonensis* y tratados con 30 mg/kg/día del aceite esencial de *C. ambrosioides*, por vía intraperitoneal durante 14 días (2 semanas). La carga parasitaria se determinó al finalizar el experimento (semana 6 post-infección) y los resultados son expresados como la media \pm desviación estándar. AE: aceite esencial de *C. ambrosioides*; Veh: Mygliol. *: Muestra diferencias estadísticas ($P < 0,05$) con respecto al vehículo (Mygliol) y controles (no tratados).

Posteriormente, se comparó el efecto del AE al ser administrado por vía intraperitoneal, oral o intralesional, con igual régimen de tratamiento. En la Figura 10 se muestra el desarrollo de las lesiones de los diferentes grupos en este estudio. En los animales tratados con el AE por vía intraperitoneal se observó un desarrollo de las lesiones estadísticamente inferior ($P < 0,05$) a los ratones tratados por vía oral con Mygliol o los que no recibieron tratamiento. Sin embargo, el tamaño de las lesiones no se diferenciaron desde el punto de vista estadístico ($P > 0,05$) con las de aquellos animales que habían sido tratados por vía oral con el AE. Los animales tratados por vía intralesional mostraron un crecimiento marcado de las lesiones, aunque estos se diferenciaron desde el punto de vista estadístico ($P < 0,05$) al compararlo con el grupo tratado con el vehículo por esta vía.

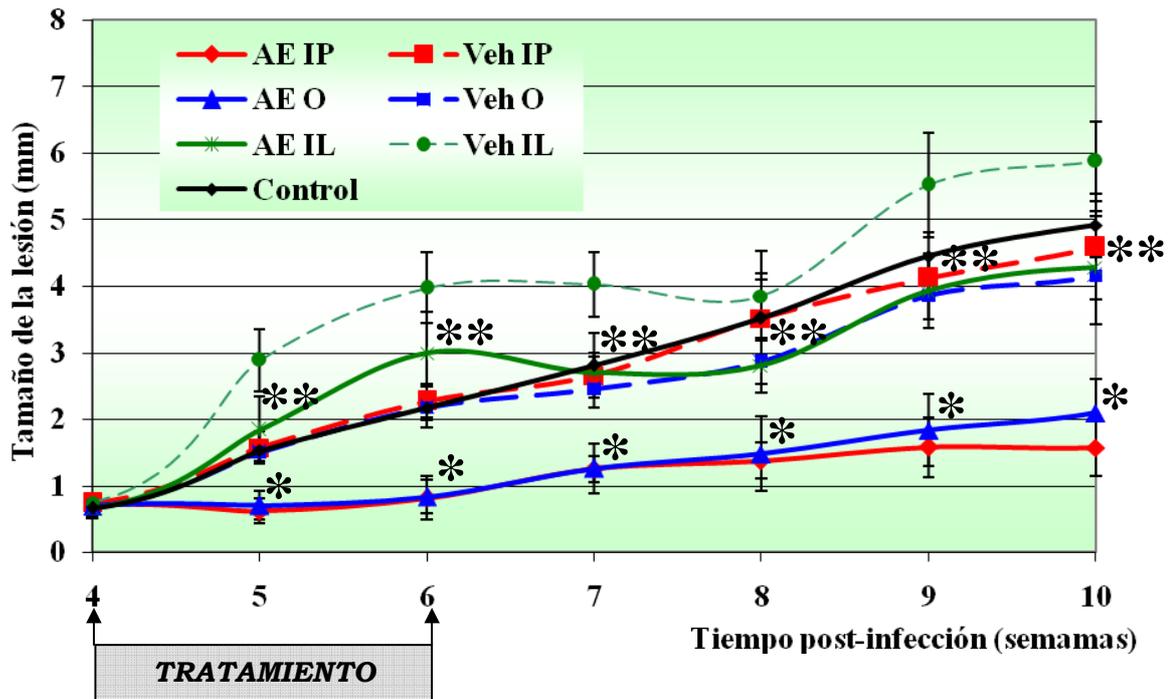


Figura 10: Evolución de las lesiones de los animales infectados con *L. amazonensis* y tratados con 30 mg/kg del aceite esencial de *C. ambrosioides*, por vía intraperitoneal, oral e intralesional durante 14 días (2 semanas). Los resultados son expresados como la media \pm desviación estándar. AE: aceite esencial de *C. ambrosioides*; Veh: Mygliol; IP: administración por vía intraperitoneal; O: administración por vía oral; IL: administración por vía intralesional. *: Muestra diferencias estadísticas ($P < 0,05$) de los grupos tratados con el aceite esencial de *C. ambrosioides* por vía intraperitoneal y oral con respecto al vehículo (Mygliol) y controles (no tratados). **: Muestra diferencias estadísticas ($P < 0,05$) de los grupos tratados con el aceite esencial de *C. ambrosioides* por vía intralesional con respecto al vehículo (Mygliol).

La Figura 11 muestra la carga parasitaria al finalizar el tratamiento (45 días post-infección). No se detectaron parásitos en las lesiones cutáneas de los animales tratados por vía intraperitoneal, oral e intralesional. Al terminar el experimento (10 semanas post-infección) se detectaron parásitos, pero la carga parasitaria difirió estadísticamente de los controles respectivos según la vía de administración ($P < 0,05$).

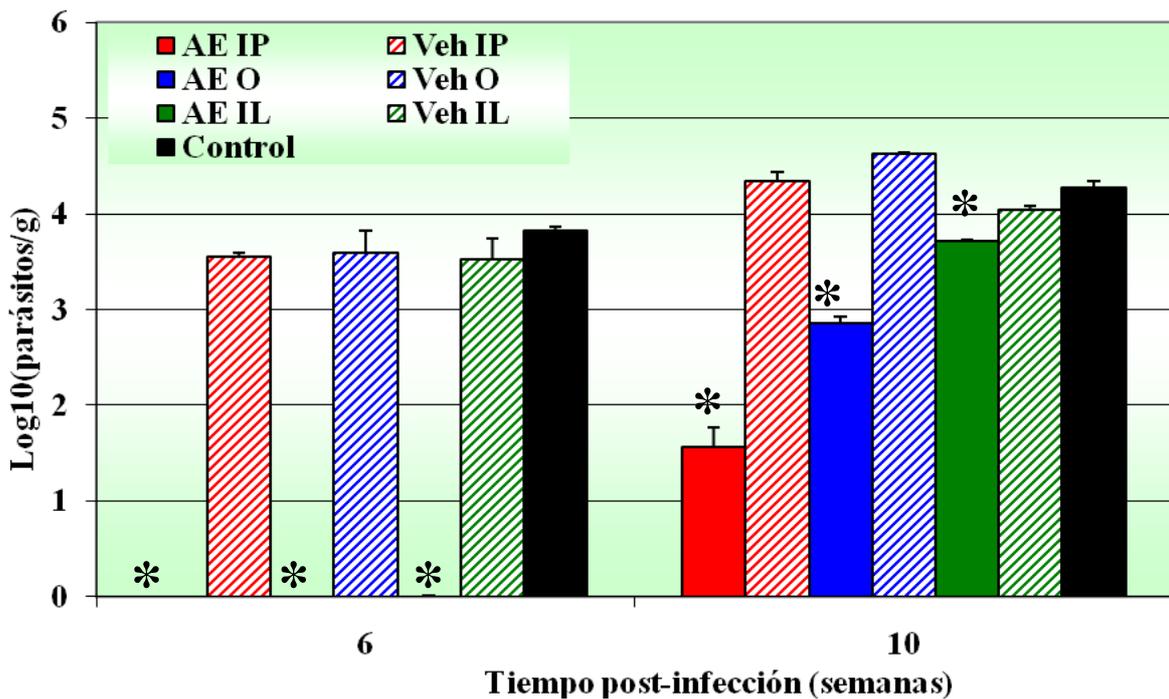


Figura 11: Carga parasitaria en las lesiones de los animales infectados con *L. amazonensis* y tratados con 30 mg/kg del aceite esencial de *C. ambrosioides*, por vía intraperitoneal, oral o intralesional durante 14 días (2 semanas). Los resultados son expresados como la media \pm desviación estándar. AE: aceite de *Chenopodium*; Veh: Miglyol; IP: administración por vía intraperitoneal; O: administración por vía oral; IL: administración por vía intralesional. *: Muestra diferencias estadísticas ($P < 0,05$) de los grupos tratados con el aceite esencial de *C. ambrosioides* por vía intraperitoneal, oral e intralesional con respecto al vehículo (Mygliol) y controles (no tratados).

Teniendo en cuenta la efectividad del AE por vía oral e intralesional se prosiguió a determinar la relación dosis-respuesta al tratar animales infectados con dosis de (30, 60, 90, 120 y 150) mg/kg.

La Figura 12 muestra el efecto del tratamiento a diferentes dosis del AE por vía oral, en ratones infectados experimentalmente. Diferencias significativas ($P < 0,05$) se observaron entre todos los grupos de animales tratados con el AE respecto al control y a los ratones tratados con el vehículo (Miglyol) con similar régimen de administración. La dosis más efectiva fue la de 150 mg/kg.

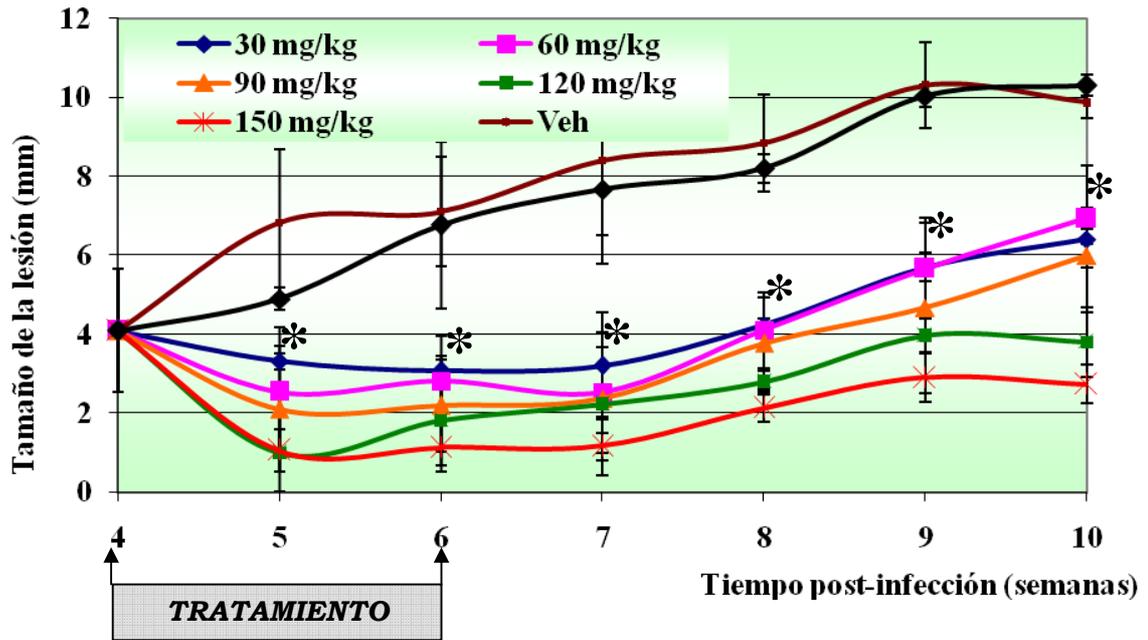


Figura 12: Evolución de las lesiones de los animales infectados con *L. amazonensis* y tratados con diferentes dosis del aceite esencial de *C. ambrosioides*, por vía oral durante 14 días (2 semanas). Los resultados son expresados como la media \pm desviación estándar. Veh: Miglyol. *: Muestra diferencias estadísticas ($P < 0,05$) de todos los grupos tratados con diferentes dosis del aceite esencial de *C. ambrosioides* por vía oral con respecto al vehículo (Miglyol) y controles (no tratados).

En las lesiones cutáneas de los animales tratados con el AE no se detectaron parásitos, a diferencia de los animales tratados con Miglyol y los controles en la semana 6. En la semana 10 la carga parasitaria de los ratones tratados difirió estadísticamente ($P < 0,05$) respecto al control (Figura 13).

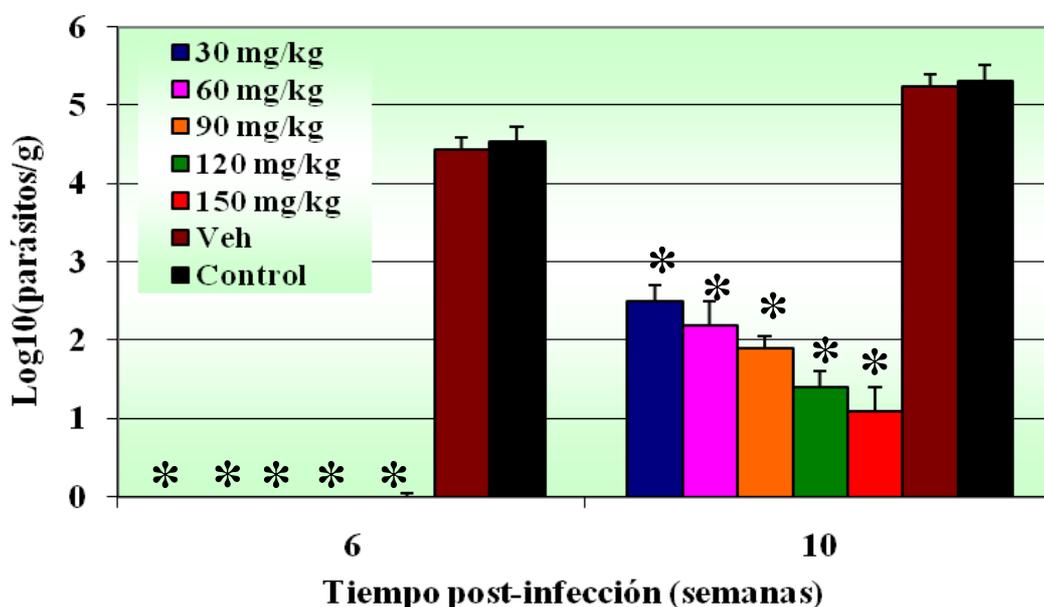


Figura 13: Carga parasitaria en las lesiones de los animales infectados con *L. amazonensis* y tratados con diferentes dosis del aceite esencial de *C. ambrosioides*, por vía oral durante 14 días (2 semanas). Los resultados son expresados como la media \pm desviación estándar. Veh: Miglyol. *: Muestra diferencias estadísticas ($P < 0,05$) de todos los grupos tratados con diferentes dosis del aceite esencial de *C. ambrosioides* por vía oral con respecto al vehículo (Miglyol) y controles (no tratados).

El análisis del tamaño de la lesión mostró una correlación lineal ($R > 0,8322$) en todas las semanas de evaluación con respecto a la dosis del AE. La DE_{50} fue de $51,4 \pm 2,19$ mg/kg, teniendo en cuenta el tamaño de la lesión desde la semana 5 hasta la semana 10 post-infección.

El tratamiento de ratones infectados con el AE de *C. ambrosioides* por vía intralesional, utilizando como vehículo el PVP, fue capaz de controlar el desarrollo de la infección. La Figura 14 muestra el efecto del tratamiento a diferentes dosis. En las semanas 5, 6 y 7 post-infección se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) de los grupos tratados con 120 mg/kg y 150 mg/kg con respecto al grupo control y tratados con el vehículo (PVP). A partir de la semana 8 post-infección se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre todos los grupos de animales tratados con respecto al control y a los ratones tratados con el vehículo (PVP) con similar régimen de administración.

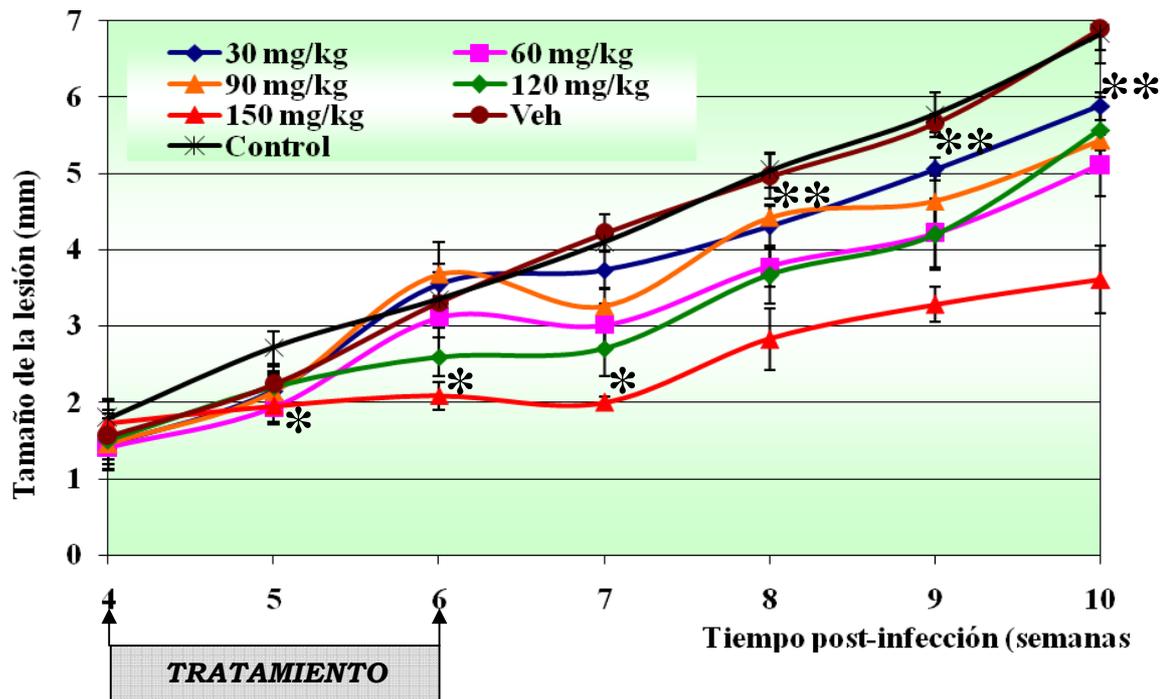


Figura 14: Evolución de las lesiones de los animales infectados con *L. amazonensis* y tratados con diferentes dosis del aceite esencial de *C. ambrosioides*, por vía intralesional durante 14 días (2 semanas). Los resultados son expresados como la media \pm desviación estándar. Veh: Polivinilpirrolidona. *: Muestra diferencias estadísticas ($P < 0,05$) de los grupos tratados con 120 mg/kg y 150 mg/kg del aceite esencial de *C. ambrosioides* por vía intralesional con respecto al vehículo (Polivinilpirrolidona) y controles (no tratados). **: Muestra diferencias estadísticas ($P < 0,05$) de todos los grupos tratados con el aceite esencial de *C. ambrosioides* por vía intralesional con respecto al vehículo (PVP) y controles (no tratados).

Al determinar la carga parasitaria en el sitio de infección en las semanas 6 y 10 post-infección todos los grupos mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al control y a los ratones tratados con el vehículo (PVP) con el mismo régimen de administración (Figura 15).

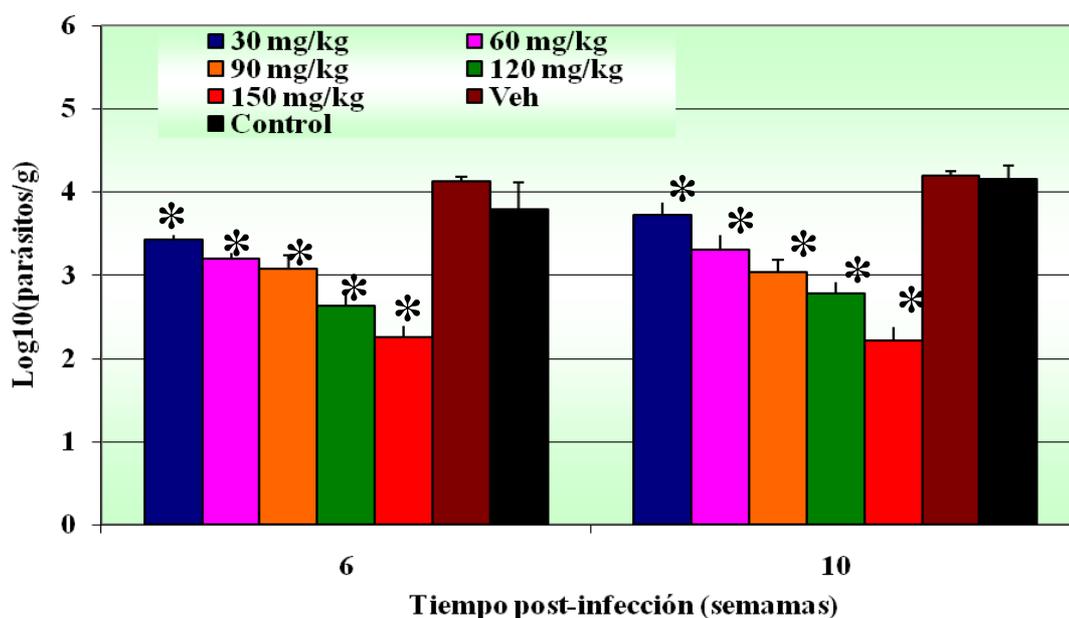


Figura 15: Carga parasitaria en las lesiones de los animales infectados con *L. amazonensis* y tratados con diferentes dosis del aceite esencial de *C. ambrosioides*, por vía intralesional durante 14 días (2 semanas). Los resultados son expresados como la media \pm desviación estándar. Veh: Polivinilpirrolidona. *: Muestra diferencias estadísticas ($P < 0,05$) de todos los grupos tratados con diferentes dosis del aceite esencial de *C. ambrosioides* por vía intralesional con respecto al vehículo (Polivinilpirrolidona) y controles (no tratados).

El análisis del tamaño de la lesión mostró una correlación lineal ($R > 0,9430$) en todas las semanas de evaluación. La DE_{50} fue de $162,5 \pm 7,7$ mg/kg, teniendo en cuenta el tamaño de la lesión desde la semana 8 hasta la 10 post-infección.

El tratamiento con el AE de los animales infectados por las vías de administración estudiadas (oral e intralesional) demostraron eficacia con respecto a los animales que no fueron tratados. Por estas razones, la actividad antileishmanial *in vivo* fue comparada con la causada por los fármacos convencionales que se utilizan en la clínica. El tamaño de la lesión en los animales infectados con *L. amazonensis* y tratados con el AE por vía oral fue significativamente menor ($P < 0,05$) que la mostrada por los animales tratados con los fármacos de referencia (Figura 16).

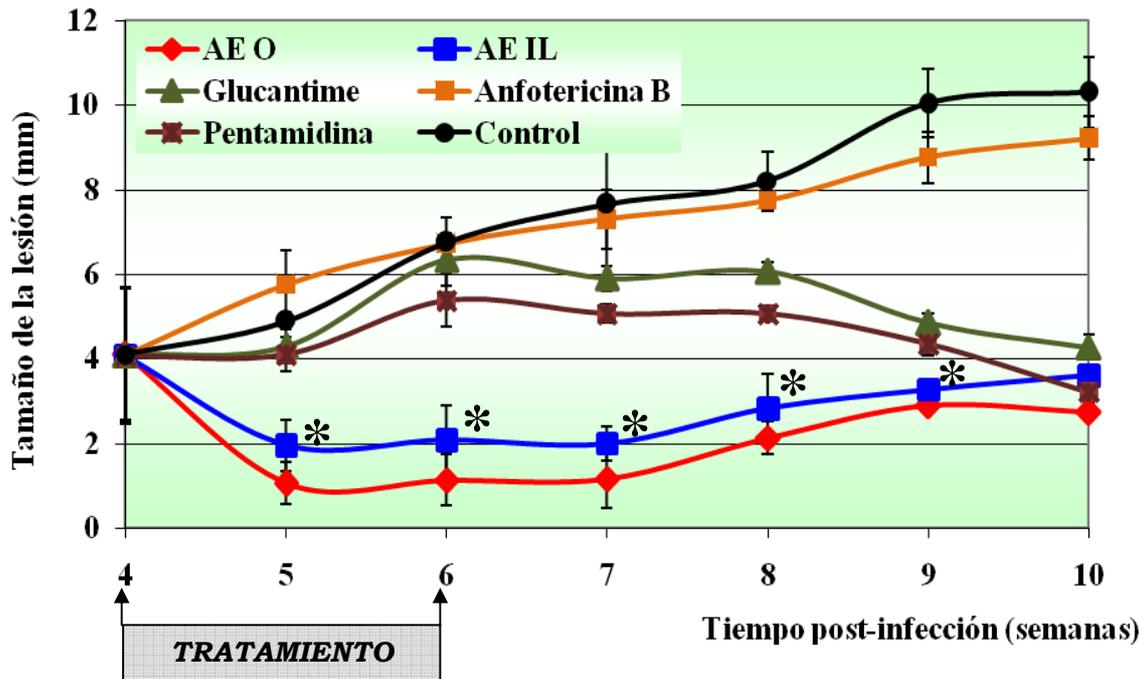


Figura 16: Evolución de las lesiones de los animales infectados con *L. amazonensis* y tratados con el aceite esencial de *C. ambrosioides* y los fármacos de referencia durante 14 días (2 semanas). Los resultados son expresados como la media \pm desviación estándar. AE: 150 mg/kg del aceite esencial de *C. ambrosioides*; O: administración por vía oral; IL: administración por vía intralesional. *: Muestra diferencias estadísticas ($P < 0,05$) de los grupos tratados con el aceite esencial de *C. ambrosioides* por vía oral e intralesional con respecto a los animales tratados con los fármacos convencionales (28 mg/kg/intraperitoneal de glucantime, 1 mg/kg/intraperitoneal de anfotericina B, 4 mg/kg/intraperitoneal de pentamidina).

El AE por vía intralesional mostró una actividad estadísticamente similar que los animales tratados con glucantime y pentamidina ($P > 0,05$). Los resultados fueron corroborados al determinar la carga parasitaria (Figura 17).

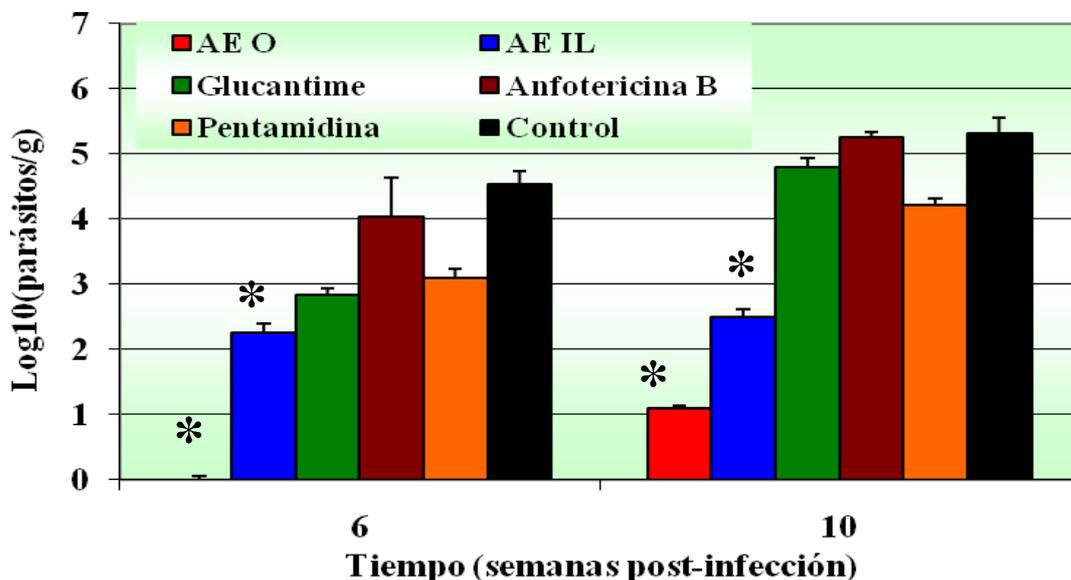


Figura 17: Carga parasitaria en las lesiones de los animales infectados con *L. amazonensis* y tratados el aceite esencial de *C. ambrosioides* y los fármacos de referencia. Los resultados son expresados como la media \pm desviación estándar. AE: aceite esencial de *C. ambrosioides*; O: administración por vía oral; IL: administración por vía intralesional. *: Muestra diferencias estadísticas ($P < 0,05$) de los grupos tratados con el aceite esencial de *C. ambrosioides* por vía oral e intralesional con respecto a los animales tratados con los fármacos convencionales (28 mg/kg/intraperitoneal de glucantime, 1 mg/kg/intraperitoneal de anfotericina B, 4 mg/kg/intraperitoneal de pentamidina).

Paralelamente, se determinó la TAO en ratas Wistar para clasificar el AE según los daños que ocasiona. La dosis de 2000 mg/kg provocó la muerte en el 100 % de los animales; mientras que al administrar 300 mg/kg no causó mortalidad, ni cambios en los signos clínicos de toxicidad retardada y se evidenció un aumento de peso (Figura 18), que no difirió estadísticamente ($P > 0,05$) de las ratas controles. Las muestras tomadas de los órganos seleccionados no presentaron afectaciones en desde el punto de vista macroscópico. El AE fue clasificado como dañino a los humanos al administrarlo por vía oral.

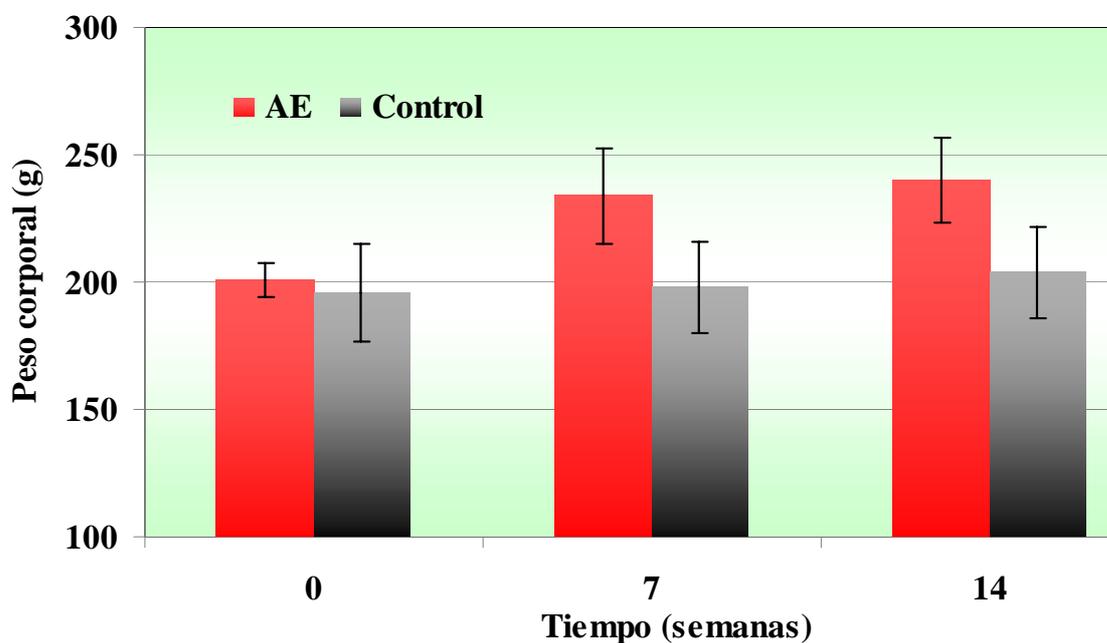


Figura 18: Variación de peso corporal de los animales tratados con el aceite esencial de *C. ambrosioides* por vía oral con una dosis de 300 mg/kg. AE: aceite esencial de *C. ambrosioides*. No existieron diferencias significativas en ninguna de las mediciones realizadas ($P > 0,05$).

IV.3. Evidencias experimentales sobre el posible mecanismo de acción del aceite esencial extraído de *C. ambrosioides*.

El AE solo mostró actividad inhibidora sobre los protozoos parásitos (Tabla 6); mientras que las especies de bacterias y hongos no fueron sensibles. Frente a las diferentes líneas celulares el AE demostró actividad (Tabla 7).

Tabla 6: Actividad del aceite esencial de *C. ambrosioides* frente a protozoos parásitos, bacterias, hongos y virus.

Reino	Especie	CI ₅₀ ^a ± DE ^b (µg/mL)
Protista	<i>L. donovani</i> (promastigotes)	4,5 ± 1,3
	<i>L. donovani</i> (amastigotes)	5,1 ± 0,8
	<i>T. vaginalis</i>	1,5 ± 0,2
	<i>P. falciparum</i>	< 1
Mónera	<i>S. aureus</i>	> 40
	<i>E. coli</i>	> 40
	<i>P. aeruginosa</i>	> 40
Fungi	<i>C. albicans</i>	> 40
Virus	<i>H. simplex</i> Tipo I	> 40
	<i>H. simplex</i> Tipo II	> 40

^a: CI₅₀: Concentración del producto que causa el 50 % de mortalidad.

^b: DE: Desviación estándar.

Nota: Los resultados son expresados como la media ± desviación estándar de tres experimentos por separado y cada concentración de cada producto se evaluó por cuadruplicado.

Tabla 7: Actividad del aceite esencial de *C. ambrosioides* frente a líneas celulares.

Línea Celular	CI ₅₀ ^a ± DE ^b (µg/mL)	IS ^c
MRC-5	90,6 ± 1,6	20
Vero	> 40	> 9

^a: CI₅₀: Concentración del producto que causa el 50 % de mortalidad.

^b: DE: Desviación estándar.

^c: Índice de Selectividad: CI₅₀ de macrófagos/CI₅₀ de amastigotes de *L. amazonensis* (4,6 µg/mL).

Nota: Los resultados son expresados como la media ± desviación estándar de tres experimentos por separado y cada concentración de cada producto se evaluó por cuadruplicado.

El espectro formado por el paso de la RPN del AE y sus componentes mayoritarios es mostrado en la Figura 19. Se observa claramente la formación de un centro radical en el carbono (R-C●) para el AE y el ascaridol. Sin embargo, el carvacrol y el óxido de cariofileno no mostraron ninguna señal. Además, la presencia del carvacrol con el ascaridol disminuyó la señal de la RPN; mientras que la presencia del óxido de cariofileno no causó ninguna variación.

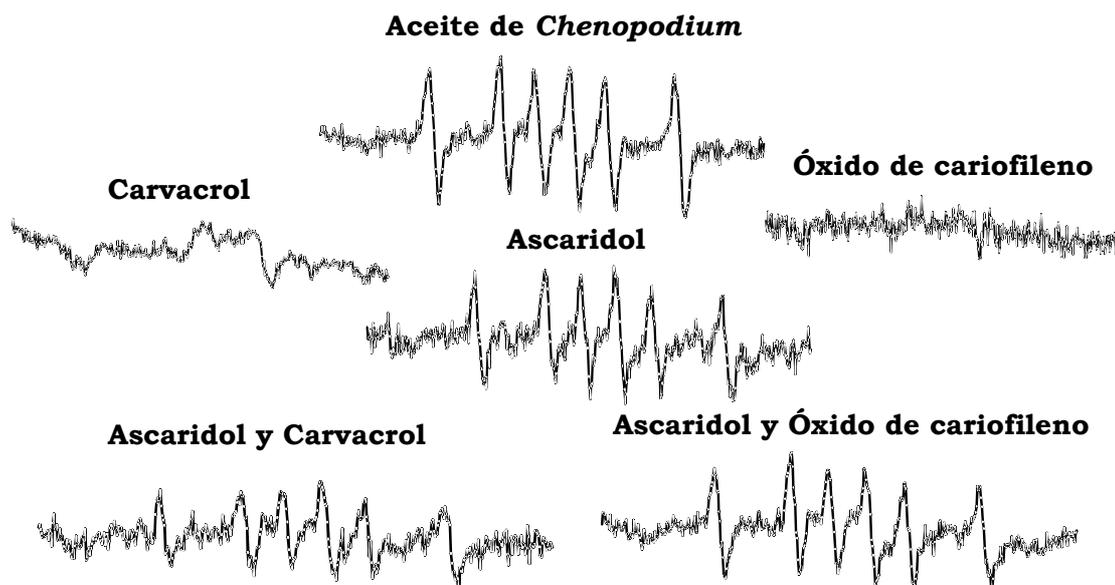


Figura 19: Espectro del aceite esencial extraído del *C. ambrosioides* y sus componentes mayoritarios mediante Resonancia Paramagnética Nuclear.

Posteriormente, se analizó la influencia del AE y sus componentes mayoritarios sobre la cadena transportadora de electrones, específicamente sobre los complejos II y III. El AE mostró una inhibición similar ($P > 0,05$) sobre el Complejo II en ambos sistemas evaluados, mostrando una CI_{50} de $124,2 \pm 0,4 \mu\text{g/mL}$ y $125,3 \pm 1,7 \mu\text{g/mL}$ sobre *S. cerevisiae* y *B. taurus*, respectivamente. El ascaridol, el carvacrol y el óxido de cariofileno no mostraron actividad sobre el complejo II en ninguno de los sistemas ($CI_{50} > 300 \mu\text{g/mL}$). Frente al Complejo III el óxido de cariofileno fue el que mostró una mayor actividad. Sin embargo, el AE fue el único que mostró una inhibición específica y superior estadísticamente ($P < 0,05$) sobre el complejo purificado de *S. cerevisiae* (Tabla 8); mientras que el ascaridol

y el carvacrol causaron mayor inhibición sobre el complejo purificado de *B. taurus*. El óxido de cariofileno mostró similar actividad sobre los dos complejos.

Tabla 8: Actividad del aceite esencial de *C. ambrosioides* y sus componentes mayoritarios sobre el consumo de oxígeno del Complejo bc1 purificado de *S. cerevisiae* y *B. taurus*.

Producto	CI ₅₀ ^a ± DE ^b (µg/mL)		IS ^c
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>B. taurus</i>	
Aceite de <i>Chenopodium</i>	69,2 ± 0,8*	116,4 ± 0,7*	2
Ascaridol	113,6 ± 1,0	64,1 ± 1,6	0
Carvacrol	141,4 ± 6,2	63,3 ± 0,6	0
Óxido de Cariofileno	39,4 ± 0,1	43,4 ± 0,06	1
Estigmatelina	0,5 ± 0,03	0,6 ± 0,05	1

^a: CI₅₀: Concentración del producto que causa el 50 % de mortalidad.

^b: DE: Desviación estándar.

^c: Índice de Selectividad: CI₅₀ frente al Complejo III de *B. taurus* /CI₅₀ frente al Complejo III de *S. cerevisiae*.

*: Muestra diferencias estadísticas ($P < 0,05$) en la concentración inhibitoria media del Complejo bc1 purificado de *S. cerevisiae* con respecto al Complejo bc1 purificado de *B. taurus* tratados con el aceite esencial de *C. ambrosioides*.

Nota: El Complejo III no tratado (control) de *S. cerevisiae* mostró un consumo de oxígeno de $2085,8 \pm 341,5$ nmol/min/mg de proteína y del *B. taurus* fue de $2004,4 \pm 117,7$ nmol/min/ mg de proteína.

La corrida espectrofotométrica del AE de *C. ambrosioides* mostró un pico de máxima absorbancia a los 290 nm, aproximadamente. La adición de concentraciones crecientes de ADN de *L. amazonensis*, causaron perturbaciones en el espectro del AE, observándose un efecto hipocrómico (Figura 20A). Se evidenció una correlación lineal ($R = 0,9478$) entre la concentración de ADN y el efecto observado (Figura 20B).

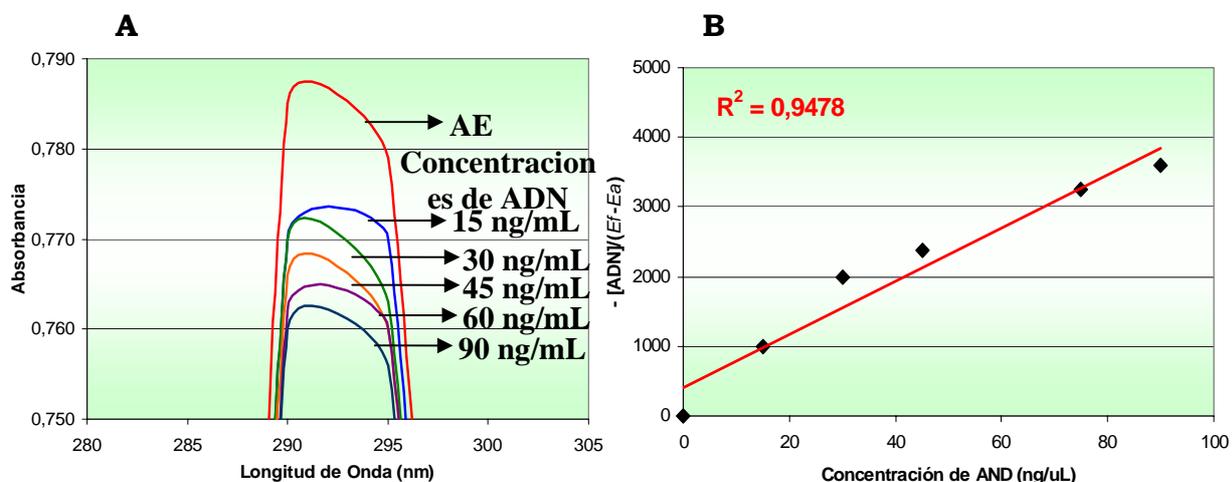


Figura 20: Efecto hipocrómico al añadir concentraciones crecientes de ADN de *L. amazonensis* a una concentración fija del aceite esencial de *C. ambrosioides*. A: Corrida espectrofotométrica (Los resultados son expresados como la media de cinco lecturas independientes, con un coeficiente de variación menor del 5 %); B: Correlación lineal. AE: Aceite esencial de *C. ambrosioides* (3 mg/mL).

No se observó efecto sobre la viscosidad del ADN; siendo similar ($P < 0,05$) en el ADN ($\eta = 0,75 \pm 0,03$ g/cm x seg), al compararlo con el ADN incubado con el AE ($\eta = 0,79 \pm 0,06$ g/cm x seg). Al analizar la conformación en la forma natural del plásmido, al ser tratados con concentraciones crecientes del AE, no se observó ningún efecto (Figura 21).

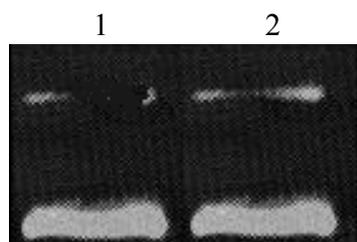


Figura 21: Electroforesis del plásmido pUC119. Línea 1: Control; Línea 2: Tratado con el aceite esencial de *C. ambrosioides* a una concentración de 3 mg/mL.

El efecto sobre el crecimiento *in vitro* de *L. amazonensis*, causado por las combinaciones entre el AE y los fármacos convencionales se muestra en la Tabla 9. Al analizar los experimentos llevados a cabo en promastigotes, se observó un efecto sinérgico al combinar el AE con la pentamidina. No se observó ningún efecto cuando los parásitos fueron tratados con el AE en combinación con el glucantime o la anfotericina B.

Tabla 9: Actividad sobre el crecimiento de *L. amazonensis* al tratarlos con el aceite esencial de *C. ambrosioides* combinado con los fármacos convencionales.

Aceite esencial de <i>C. ambrosioides</i> combinado con:	Índice CIF^a	Interacción^b
Glucantime	1,790	Indiferente
Anfotericina B	1,622	Indiferente
Pentamidina	0,453	Sinergismo

^a: Índice CIF^a; $[A]/CI_{50A} + [B]/CI_{50B}$, donde CI_{50A} y CI_{50B} son las CI_{50} de cada compuesto solo y [A] y [B] son las CI_{50} del aceite esencial y los fármacos convencionales cuando son usadas en combinación

^b: Interacción; Terminología para describir la naturaleza de la interacción entre el aceite esencial y los fármacos convencionales. Índice $CIF \leq 0,5$ indicó sinergismo, $0,5 \leq CIF \leq 4$ indicó indiferencia y $CIF \geq 4$ indicó antagonismo.

Nota: Los resultados son expresados como la media \pm desviación estándar de tres experimentos por separado y cada concentración de cada producto se evaluó por cuadruplicado.

V. Discusión

V. DISCUSIÓN

El uso de plantas medicinales constituye una fuente promisoría de componentes químicos para el desarrollo de nuevos fármacos contra la leishmaniosis. Existen diversas razones que justifican el interés de los países en vías de desarrollo en usar productos derivados de las plantas; especialmente debido a que los medicamentos convencionales son insatisfactorios, provocan serios efectos adversos y son muy costosos. Por otra parte, un alto porcentaje de la población afectada no tiene acceso a los medicamentos recomendados, por lo que necesitan la medicina natural y tradicional para aliviar los síntomas de las enfermedades que los azotan. Sin embargo, el hecho de que muchas de estas plantas sean utilizadas en la medicina tradicional no es garantía de su efectividad, por lo que la investigación científica es necesaria para evaluar su actividad y seguridad.

En un área costera del estado de Bahía, Brasil, una de las plantas más utilizadas por la población rural para el tratamiento de úlceras cutáneas causadas por *Leishmania*, es *C. ambrosioides* (8, 97). Recientemente, Kvist y colaboradores, también reportaron que un alto porcentaje de nativos de Loreto, Perú, utilizan esta planta para el tratamiento de esta parasitosis (9). En el 2008, Patrício y colaboradores, demostraron las potencialidades terapéuticas de un extracto hidroalcohólico de las hojas de *C. ambrosioides* frente a la leishmaniosis experimental en ratones BALB/c (98).

Aunque tradicionalmente la forma más común es la ingestión de infusiones acuosas de la planta, se ha demostrado que la decocción no presenta actividad frente a *L. major* (9) y no se encontró el ascaridol en estudios de caracterización química (65), el cual es considerado el principio activo antiparasitario de esta planta (99). Por estas razones, en este trabajo se prestó un especial interés al AE, el cual son líquidos aromáticos formados por compuestos naturales volátiles (100). Los AE se han utilizado desde épocas remotas en perfumes, por el olor agradable de su esencia y por sus propiedades protectoras contra infecciones e insectos (100, 101). En la bibliografía científica, existen pocos reportes sobre la evaluación antileishmanial de AE. No obstante, estos han sido considerados como buenos agentes antiparasitarios (101). El aceite de *C. ambrosioides* se obtuvo de manera industrial durante el siglo XIX por su potencia antihelmíntica y se comercializó bajo el nombre de "Aceite de Baltimore" (66).

Teniendo en cuenta los antecedentes encontrados, se evaluó la actividad del AE de *C. ambrosioides* frente a *L. amazonensis*, agente causal de la leishmaniosis cutánea. Esta especie del parásito presenta una especial importancia en América debido a que es una de las especies que mayor morbilidad causa y puede causar la leishmaniosis cutánea difusa, la cual es una forma anérgica de la infección que es muy resistente al tratamiento (102).

El AE de *C. ambrosioides* es un líquido ligeramente amarillo, de consistencia viscosa, olor penetrante y sabor ligeramente amargo (65). El AE es soluble en muchos solventes orgánicos y está formado por una mezcla compleja de compuestos, fundamentalmente terpenos y fenoles (75).

El componente mayoritario del AE de *C. ambrosioides* es el carvacrol, el cual es un compuesto aromático líquido que presenta un grupo fenólico (103). Este producto es uno de los más comunes encontrados en plantas aromáticas como son: *Origanum onites* (104), *Satureja montana* (105), *Thymbra spicata* (106) y *Thymus vulgaris* (107).

En segundo lugar, el análisis de la composición química del AE estudiado mostró que el ascaridol estaba presente en un 22,5 %, el cual es reconocido como el componente más importante de *C. ambrosioides*. El ascaridol fue aislado por primera vez en 1895 por un farmacéutico alemán residente en Brasil y desde 1925, Smillie y Pessoa, demostraron que la acción antihelmíntica de *C. ambrosioides* era debido a este compuesto (99, 108). El ascaridol es un componente orgánico natural, clasificado como un endoperóxido cíclico triterpénico que tiene un puente peróxido inusual en el grupo funcional con un enlace interno oxígeno-oxígeno (O-O), el cual es considerado como indispensable para la actividad antiparasitaria. Se ha reportado la presencia de este componente en plantas como son: *Artemisia molineri* (109), *Croton regelianus* (110) y *Peumus boldus* (111).

En tercer lugar fue identificado el óxido de cariofileno (5 %), el cual es un epóxido. Este compuesto ha sido identificado en otras plantas como son: *Ballota nigra* (112), *Bidens pilosa* (113), *Magnolia liliflora* (114) y *Senecio polyanthemoides* (115).

Un estudio realizado por Owolabi y colaboradores en el 2009 realizó la comparación de 18 reportes sobre la composición del aceite de *Chenopodium* de diferentes países, encontrando siete subtipos o clases (75). El subtipo más frecuente presenta ascaridol como componente mayoritario (41-91 %), el cual se ha reportado en el Norte de América (116), India (117), Madagascar (77), Australia (118) y España (119). No obstante, se han reportado estudios

donde el ascaridol se presenta en un porcentaje menor o solamente como una traza (120). El AE empleado en este trabajo, presentó un subtipo único, donde el carvacrol es el compuesto mayoritario y el ascaridol se encuentra en un 22 %. Existen reportes similares a éstos en plantas colectadas en Córdoba, Argentina, donde el ascaridol tenía entre un 16-20 % (121); en Tomsk, Rusia, donde se reportó en un 23,3 % (122) y en Nanking, China, en un 23,5 % (76).

Un estudio previo del AE de *C. ambrosioides* colectado en Cuba fue realizado por Pino y colaboradores en el 2003, donde el compuesto mayoritario fue el acetato de α -terpinilo; mientras que el ascaridol se encontró sólo en un 3% (123). Es conocido que la concentración en los AE puede variar según el área geográfica donde la planta fue cultivada, la época de colección de la planta, el órgano utilizado para la extracción y la metodología empleada (124). Según meta-análisis realizado sobre la composición química del AE de *C. ambrosioides* no se ha encontrado una correlación con la distribución geográfica (75, 108). Por otra parte, Torres y colaboradores reportaron que su concentración no varía en plantas colectadas de una misma área geográfica en diferentes estaciones del año: invierno (Febrero) y verano (Abril) (125).

Teniendo en cuenta el análisis químico realizado se prosiguió a evaluar la actividad antileishmanial del AE, así como de sus componentes mayoritarios: el ascaridol, el carvacrol y el óxido de cariofileno.

V.1. Determinación de la actividad *in vitro* del aceite esencial extraído de *C. ambrosioides* y sus componentes mayoritarios frente a *L. amazonensis*.

Todos los productos evaluados frente a promastigotes y amastigotes de *L. amazonensis* causaron una inhibición del crecimiento del parásito. Entre los compuestos puros evaluados, el ascaridol mostró un mayor efecto inhibitorio comparado con el carvacrol y el óxido de cariofileno, con una CI_{50} inferior a 1 $\mu\text{g/mL}$; siendo esta superior también a la actividad mostrada por el AE. Estos resultados corroboran la hipótesis que el ascaridol es el principal componente antiparasitario en el aceite de *Chenopodium*. Estudios previos han demostrado que el ascaridol fue efectivo frente a *Trypanosoma cruzi* (69) y a *Plasmodium falciparum* (68) con CI_{50} inferiores también a 1 $\mu\text{g/mL}$.

En la bibliografía científica existen pocos reportes de la evaluación de AE contra *Leishmania* y la mayoría han mostrado poca actividad. Ejemplo de ello podemos citar el aceite extraído de *Copaifera* spp., presentaron una CI_{50} entre 5,0 $\mu\text{g/mL}$ a 22 $\mu\text{g/mL}$ (126) y el AE de *Ocimum gratissimum* que mostró una CI_{50} de 135 $\mu\text{g/mL}$ (127), frente a esta misma especie de *Leishmania*. En los laboratorios de *Leishmania* del IPK, se han evaluado otros AE extraídos de *Artemisia abrotanum*, *Piper aduncun* y *Pinus caribea*. La CI_{50} de estos fue mayor de 50 $\mu\text{g/mL}$ frente a *L. amazonensis*.

Zheliakov y colaboradores reportaron la actividad antileishmanial del AE extraído de tres especies del género *Ocimum*: *O. basilicum*, *O. sanctus* y *O. tenuiflorum*. Estos aceites mostraron una CI_{50} entre 37 $\mu\text{g/mL}$ y 50 $\mu\text{g/mL}$ frente a promastigotes de *L. donovani* (128). En el 2000, Mikus y colaboradores reportaron la evaluación de AE comerciales de ajo (*Allium sativum*), pino (*Pinus* spp.) y anís (*Pimpinella anisum*), los que mostraron valores de CI_{50} de 58, 123 y 286 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, frente a *L. major* (129). El AE de *C. ambrosioides* ha mostrado mayor actividad, debido a que la CI_{50} fue de 3,7 $\mu\text{g/mL}$. Frente a amastigotes intracelulares en la bibliografía sólo se encontró que el AE extraído de *O. gratissimum* mostró una CI_{50} de 100 $\mu\text{g/mL}$ (127) y de *Cymbopogon citratus*, con una CI_{50} de 3,2 $\mu\text{g/mL}$ (130), actividad similar a la encontrada del AE estudiado.

Es interesante destacar, que la CI_{50} del aceite y sus productos, tanto frente a promastigotes como frente a amastigotes, resultaron similares. Esto pudiera indicar que el aceite y sus principios activos causan su actividad sobre una molécula u organelo que no es específico de estadio, debido a que se encuentra en ambas formas del parásito y parece tener similar importancia para el crecimiento y desarrollo del mismo.

Al evaluar la citotoxicidad de los productos se observó que el ascaridol mostró una selectividad de 4; mientras que el carvacrol y el óxido de cariofileno presentaron una actividad inespecífica con un IS de 2 y 1, respectivamente. Sin embargo, el AE mostró un IS de 13. Actualmente, la toxicidad de los productos es uno de los mayores impedimentos en el desarrollo de nuevos productos. Esta desventaja encontrada en muchos productos naturales es ilustrada por una saponina glicosilada, conocida por PX-7518, aislada de *Maesa balanzae*, la cual mostró una potente actividad frente a *L. donovani*, pero su desarrollo fue detenido debido a la toxicidad (59, 131). Es común que muchos productos naturales sean tóxicos, ya que las plantas son organismos que sintetizan compuestos que

constituyen un mecanismo de defensa biológico (131). Según Pink y colaboradores la relación entre la actividad antileishmanial y la toxicidad debe ser superior a 10. Por estas razones, continuamos los estudios con el AE (131), lo que se corresponde con la información etnobotánica, ya que se plantea que en el AE la actividad tóxica del ascaridol se equilibra con los otros componentes ("<http://es.wikipedia.org/wiki/Ascaridol>"). Resultados similares fueron encontrados por Santin y colaboradores, donde el AE extraído de *C. citratos* mostró mejor IS que su principio activo al evaluarlo solo (130).

Un importante punto de análisis en el desarrollo de nuevos fármacos es la comparación con los productos que se utilizan para el tratamiento de los pacientes. Al comparar la actividad del AE de *C. ambrosioides* con los fármacos actualmente utilizados en la clínica se observó que el AE fue más activo que el glucantime, medicamento de primera línea; mientras que la anfotericina B y la pentamidina fueron más activas que el AE. Sin embargo, estos agentes terapéuticos son considerados de segunda línea por la alta toxicidad que causan. Adicionalmente, hay que tener en cuenta que el AE es una mezcla compleja de productos, donde el principio activo puede estar en un porcentaje menor. Otros estudios encontrados en la literatura también reportan actividades superiores para el glucantime (CI₅₀ amastigotes = 22,9 µg/mL) (132) y el pentostam (CI₅₀ amastigotes = 16,6 µg/mL) (53) frente a esta especie de *Leishmania*.

V.2. Evaluación del efecto del aceite esencial extraído de *C. ambrosioides* frente a la leishmaniosis cutánea experimental en ratones BALB/c, causada por *L. amazonensis*.

Para evaluar el efecto *in vivo* del AE, se utilizó un modelo de leishmaniosis cutánea experimental en ratones BALB/c, causado por la misma especie de *Leishmania* y que ha sido estandarizado y utilizado en el Departamento de Parasitología del IPK con anterioridad (133) y por otros autores (98, 134).

El AE de *C. ambrosioides* es una sustancia oleosa, por tales motivos se usó como vehículo para su administración el vehículo Miglyol, que es un aceite neutro, incoloro, con sabor y olor característicos. Este aceite presenta un alto grado de pureza, y está libre de aditivos antioxidantes, solventes o residuos de catálisis. Por otra parte, presenta varias ventajas

frente a los aceites naturales como son su alta estabilidad contra la oxidación, buena absorción, baja irritabilidad y muy buenas características de solubilidad (135).

Previo a la evaluación del efecto antileishmanial *in vivo* del AE, se determinó la DMT, con el objetivo de poder finalizar los ensayos farmacológicos, sin que los animales muriesen a causa de la toxicidad provocada por el producto. Se seleccionó la vía intraperitoneal ya que a pesar de ser una vía que sólo se utiliza con fines experimentales, se caracteriza por ser una vía de rápida y alta absorción de los componentes hasta circulación sistémica y es fácil de utilizar por los especialistas. En los animales tratados con dosis de 15 mg/kg y 30 mg/kg, se evidenció una ligera disminución de peso, al igual que en los animales a los que se les administró el vehículo del aceite (Miglyol). Esto pudiera deberse al estrés a que son sometidos los animales con la manipulación y la inyección diaria. Antes de finalizar el tratamiento, los animales lograron recuperarse de la pérdida de peso y no hubo mortalidad. Al aplicar una dosis de 60 mg/kg se obtuvo una mortalidad del 100 % de los animales antes de finalizar el tratamiento. Según estos resultados, consideramos que la DMT del AE era de 30 mg/kg al ser administrado una vez al día, por vía intraperitoneal, durante 14 días.

En los animales tratados con el AE de *C. ambrosioides* se evidenció un efecto terapéutico durante todo el tiempo del tratamiento que provocó una disminución altamente significativa ($P < 0,01$) en el tamaño de las lesiones con relación al resto de los grupos. La efectividad del tratamiento fue confirmada por la reducción de la carga parasitaria en el sitio afectado, 14 días después de terminar el mismo.

Posteriormente, se comparó la actividad antileishmanial observada al administrar el AE por vía intraperitoneal, oral e intralesional. En este caso, se utilizó la misma dosis anteriormente utilizada con el objetivo de poder comparar la eficacia a la misma dosis administrando el AE por diferentes vías de administración. De las tres rutas utilizadas, la intraperitoneal resultó ser la más efectiva, aunque no se encontraron diferencias significativas cuando el AE fue administrado por vía oral; solo se evidenció un pequeño incremento en la lesión entre la semana 8-12 post-infección. La efectividad observada por vía oral demuestra que probablemente los componentes activos del AE fueron absorbidos a través del tracto intestinal y distribuidos hasta el sitio infectado.

Varios estudios sobre la efectividad de extractos de plantas, como son *Galipea longiflora* (134) y *Kalanchoe pinnata* (136), al administrarlos por vía oral han mostrado resultados promisorios frente a la leishmaniosis cutánea. Sin embargo, aún ninguno de estos productos ha sido validado como nuevo medicamento para el tratamiento de esta parasitosis.

La administración intralesional del AE solo mostró una modesta actividad, inferior al efecto observado por vía intraperitoneal u oral, aunque fue superior respecto al grupo tratado con el vehículo por la misma vía. Una posible explicación puede ser la incapacidad del tejido de absorber las cantidades administradas del vehículo oleoso, lo que pudiera traer como consecuencia un depósito subcutáneo en los cojinetes plantares y un aparente crecimiento de la lesión. Similares resultados fueron reportados en estudios de la actividad de la licochalcona A, una chalcona aislada de *Chinense pera*, frente a la leishmaniosis cutánea en animales infectados con *L major* (137). Teniendo en cuenta estas observaciones, se consideró apropiado determinar la relación dosis-efecto por vía oral y por vía intralesional utilizando otro vehículo.

Al administrar diferentes dosis del AE diluido en Miglyol por vía oral durante 15 días se observó una alta correlación lineal entre las dosis administradas y el efecto observado. En los experimentos, no se detectaron parásitos en los animales tratados con el AE. Una posible explicación pudiera deberse a la incapacidad de los amastigotes de transformarse en promastigotes *in vitro* posterior a la acción del AE de *C. ambrosioides*. Por otra parte, un pequeño número de parásitos pudieran estar presentes en la lesión, los cuales no fueron detectados por el método de microtitulación utilizado; aunque esta metodología si detectó una considerable carga parasitaria en los animales tratados con el vehículo y los que no recibieron ningún tratamiento. No obstante, se evidenció un incremento en el tamaño de la lesión en todos los grupos tratados después de finalizado el tratamiento, lo cual demuestra la persistencia de parásitos en la región infectada con la capacidad de reproducirse y desarrollar la enfermedad en los animales. El tratamiento por vía oral constituye una ventaja para el paciente, debido a que puede tomar el medicamento por sí mismo, no requiere hospitalización y el fármaco presenta una distribución sistémica (4).

Paralelamente, se evaluó la actividad del AE por vía intralesional utilizando un vehículo con características físico-químicas diferentes al Miglyol. Esta vía de administración presenta la ventaja de que puede aumentarse la dosis empleada, la eficacia y disminuir los efectos tóxicos del fármaco (4). Para la evaluación del AE por vía intralesional se utilizó como vehículo la PVP, la cual es un polímero no iónico de alto peso molecular que presenta características físico-químicas que permite la solubilidad de los principios activos en medio acuoso. Adicionalmente, es un producto inocuo, que ha sido utilizado como transportador en diversos estudios farmacológicos y mejora la estabilidad de compuestos con naturaleza proteica (138). El AE mostró una buena actividad antileishmanial a las dosis superiores (120 y 150 mg/kg). Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) en cuanto al tamaño de la lesión y la carga parasitaria entre los grupos tratados respecto al grupo del vehículo y el control, observándose una correlación lineal entre dosis-efecto.

El tratamiento local de las lesiones cutáneas producidas por *Leishmania* ha sido ampliamente evaluado, tanto con métodos físicos (calor, radiaciones) (4) como por agentes químicos, como por ejemplo la inyección intralesional de derivados de antimonio pentavalente (139). Algunos agentes naturales también han sido

evaluados por esta vía como es la licochalcona A extraída de *Chinese licorice* (137) y alcaloides de *Zanthoxylum chiloperone* (140). Esta vía de administración es efectiva, pero presenta la desventaja que en algunos casos la infección puede presentarse en múltiples sitios, lo cual demandaría la administración en cada una de las lesiones. Por otra parte, *Leishmania* no es una infección superficial; sino que puede además propagarse por vía linfática a otras zonas de la piel o a las mucosas (4).

Al comparar la efectividad del AE por vía oral e intralesional se observó similar eficacia en cuanto al tamaño de la lesión y a la carga parasitaria. Patrício y colaboradores, reportaron similares resultados al evaluar la actividad antileishmanial de un extracto hidroalcohólico de *C. ambrosioides*. No obstante, sugirieron la administración intralesional debido a que además de su actividad antiparasitaria directa sobre *Leishmania*, incrementa la producción de óxido nítrico (NO•) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por estimulación de los mecanismos microbicidas de los macrófagos (98).

El AE mostró una mayor efectividad que los fármacos de referencia, lo cual fue evidenciado por la disminución del tamaño de la lesión y la carga parasitaria. En primer lugar podemos aclarar que la cepa de *Leishmania* utilizada fue susceptible a los tres medicamentos de referencia en los ensayos *in vitro*, con valores de CI₅₀ similares a los reportados en la literatura para esta especie y los animales fueron tratados con las dosis recomendadas. No obstante, reportes sobre la baja efectividad del glucantime (141), la anfotericina B (43) y la pentamidina (142) han sido reportado por otros autores en animales experimentalmente infectados con *L. amazonensis*.

Para comparar el efecto del AE de *C. ambrosioides*, solo se incluyeron los fármacos de referencia que se utilizan como primera y segunda opción para el tratamiento de las infecciones causadas por el complejo *L. mexicana*, al cual pertenece *L. amazonensis*, en el Nuevo Mundo (1). Estos productos tienen la desventaja de que requieren una administración parenteral durante largos períodos de tratamiento (4). No se incluyeron otros compuestos que actualmente se utilizan para el tratamiento de la leishmaniosis (miltefosina, aminosidina, ketoconazol, itraconazol) debido a que la efectividad de estos medicamentos frente al complejo *L. mexicana* es discutida y no se ha confirmado (1).

Como puede apreciarse, resultados opuestos fueron obtenidos entre la comparación de la actividad del AE con los fármacos de referencia entre los ensayos *in vitro* e *in vivo*. En el sistema *in vitro* los componentes activos están directamente en contacto con el parásito, por lo que se obtiene una actividad directa de su acción. Por estos motivos era de esperar que los fármacos de referencia mostraran una mayor actividad ya que son compuestos con un alto grado de pureza química. Sin embargo, en los ensayos *in vivo*, se utilizan sistemas multicelulares de mayor complejidad, en este caso los ratones BALB/c, donde intervienen procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de los fármacos. Es posible

que los medicamentos de referencia lleguen en un bajo porcentaje al sitio de infección y por lo tanto, demuestren un menor efecto. Esto puede deberse a las características de biodisponibilidad y farmacocinéticas de los compuestos y no solo de su potencia antileishmanial, lo cual influye directamente sobre el efecto final de un medicamento contra la enfermedad. Ejemplo de ello fue demostrado por Al-Abdely y colaboradores, los cuales observaron resultados diferentes relacionados con la eficacia de la anfotericina B al tratar ratones BALB/c infectados en la oreja y en la cola con *L. amazonensis* (43).

Adicionalmente, en el caso de *Leishmania*, es importante tanto una acción antiparasitaria directa, como un aumento de la respuesta Th1 por parte del hospedero vertebrado. Los fármacos de referencia utilizados tienen una acción antileishmanial directa, pero pocos estudios han demostrado si tienen capacidad de modular positivamente la respuesta inmune. Aunque el mecanismo de acción del AE de *C. ambrosioides* no ha sido estudiado a profundidad, en los experimentos *in vitro*, se demostró que el aceite estudiado tiene una acción directa sobre el parásito, pero al estar formado por diversos compuestos ricos en grupos funcionalmente activos, pudiera ejercer acciones indirectas como potenciar la respuesta inmunológica que beneficia la recuperación del organismo infectado. Patrício y colaboradores sugirieron que la actividad antileishmanial del *C. ambrosioides* no sólo se debe a su acción directa sobre el parásito, sino que también influye sobre los mecanismos reguladores de la diseminación de *L. amazonensis* en ratones (98). Paralelamente, estudios *in vitro* han demostrado la estimulación de linfocitos, así como la activación de macrófagos, induciendo tanto la producción de óxido nítrico como de peróxido de hidrógeno (72) por esta planta.

En la infección por *Leishmania*, el incremento del tamaño de la lesión puede deberse además al movimiento de citocinas y efectores de la respuesta inmunológica que da lugar a eventos de inflamación en el lugar infectado. Recientemente, se demostró la posible actividad antiinflamatoria del carvacrol por inhibición de la ciclooxigenasa (COX), la cual es una enzima prostaglandina-endoperóxido sintasa que permite al organismo producir la prostaglandina a partir del ácido araquidónico. Se ha demostrado que la COX es inhibida por los antiinflamatorios no esteroideos, como la aspirina, y que el carvacrol fue capaz de inhibir ambas isoformas de la enzima COX-1 y COX-2 (143), lo cual pudiera también

influir sobre el control del crecimiento de la lesión ya que éste es el componente principal del AE.

En nuestro trabajo, no se evidenció la cura completa de los animales después del tratamiento. Sin embargo, mientras que los animales no tratados desarrollaron lesiones inexorables, los ratones tratados con el AE de *C. ambrosioides* tuvieron una disminución en el tamaño de la lesión y una carga parasitaria indetectable. El modelo de leishmaniosis cutánea en ratones BALB/c causada por *L. amazonensis* no es un modelo perfecto, debido a que esta línea de roedor es altamente susceptible a esta especie de *Leishmania* y desarrolla una enfermedad diseminada y fatal (134). Resultados similares han sido reportados con otros productos naturales, donde se ha observado un efecto antileishmanial, pero no la cura completa de los animales (134, 136).

En este trabajo, podemos mencionar que de manera preliminar se realizaron estudios de toxicidad aguda en esta fase de experimentación. Es válido mencionar que a una dosis de 300 mg/kg del AE de *C. ambrosioides* por vía oral no se observaron muertes, ni pérdidas de peso. La toxicidad de *C. ambrosioides* ha sido ampliamente difundida y aunque existen pocos estudios que definan la relación dosis/efecto/toxicidad, algunos reportes asocian la mortalidad causada por esta planta, posiblemente con sobredosis (119). Un estudio de toxicidad subcrónica realizado con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *C. ambrosioides* y administrado por vía oral durante 15 días demostró que el producto no causó muerte en los animales tratados, aunque se evidenciaron alteraciones puntuales en los animales tratados con las dosis más altas (500 mg/kg/15 días). Los autores concluyeron que a las dosis terapéutica no causaba daños por lo que sugieren que su consumo es seguro cuando se apliquen las dosis farmacológicas adecuadas (144).

En los estudios realizados sobre la leishmaniosis experimental el AE demostró su capacidad de controlar el desarrollo de la infección al ser administrado por vía oral e intralesional. Ambas vías de administración pudieran ser exploradas con el objetivo de estandarizar un tratamiento efectivo y seguro; pero que también prevenga al paciente de la aparición de metástasis en otras zonas diferentes al sitio de infección primaria.

V.3. Evidencias experimentales sobre el posible mecanismo de acción del aceite esencial extraído de *C. ambrosioides*.

En la literatura podemos encontrar algunos reportes descriptivos sobre los efectos farmacológicos de *C. ambrosioides* frente a diversos microorganismos. En este estudio, se evaluó el espectro de acción del AE frente a agentes causales de infecciones producidas por otros protozoos parásitos, bacterias, hongos y virus. Se evidenció una actividad específica del AE de *C. ambrosioides* frente a protozoos intracelulares (*P. falciparum*) y extracelulares (*T. vaginalis*), siendo inactivo frente a los demás microorganismos evaluados. Adicionalmente, presentó un efecto inhibitorio sobre líneas celulares aunque fue menor, comparada con su actividad antiprotozoaria. Esto pudiera indicar que la actividad de los componentes del aceite pudiera ser sobre moléculas o rutas metabólicas propias de células eucariotas. No obstante, existen diferencias entre organismos inferiores (protozoos) y organismos superiores (células de mamíferos) y por lo tanto causan un efecto diferente que podría explicar su mayor afinidad y actividad sobre los parásitos.

Actualmente, el mecanismo de acción a nivel molecular del AE de *C. ambrosioides* no ha sido estudiado a profundidad y la información sobre los posibles efectos de sus principales ingredientes es limitada. Se ha demostrado que las propiedades antiparasitarias de *C. ambrosioides* se deben al ascaridol, (99). Los endoperóxidos son compuestos que presentan un enlace O-O, el cual juega un papel fundamental en la actividad farmacológica de estos compuestos (145, 146). Generalmente, la administración de peróxidos orgánicos causa un alto daño por estrés oxidativo, desencadenando los procesos de peroxidación lipídica con una fuerte depresión de la función mitocondrial (147). Un importante ejemplo de la relevancia de los endoperóxidos, es la 1,2,4-trioxane, artemisina, la cual posee una potente actividad antimalárica. Evidencias experimentales han demostrado que la artemisina se asocia al hierro divalente (Fe^{2+}) produciendo un radical carbono, el cual desencadena la generación de las especies reactivas de oxígeno (147). Por otra parte, se ha observado que la artemisina y sus derivados interfieren con los componentes de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria parasitaria (148). Los stolonoxides, son también endoperóxidos, aislados de organismos marinos, que inhiben los Complejos II y III de la mitocondria (149).

El carvacrol es reconocido por sus propiedades antibacterianas. Estudios experimentales han demostrado su capacidad de distribuirse en las membranas provocando la permeabilización de las mismas, lo cual origina la pérdida del equilibrio iónico. Esta acción conlleva a que se observe una disminución en la concentración de proteínas y K^+ intracelular y también incrementa la hidrólisis del adenosil trifosfato (ATP) (150).

Por otro lado, el óxido de cariofileno es un epóxido, los cuales influyen sobre la contractilidad de células cardiacas (151) y presentan efecto fungicida (152). Otros epóxidos, como el óxido de estireno, causan daños a la mitocondria (153).

En la bibliografía consultada no se encontraron reportes acerca del estudio del mecanismo de acción del AE de *C. ambrosioides*. No obstante, estudios de microscopía electrónica con el AE extraído de *Croton cajucara* (154) y *Ocimum gratissimum* (127) han demostrado que estos provocan daños ultraestructurales en la mitocondria. En los protozoos la mitocondria ha sido considerada como un importante blanco terapéutico para el desarrollo de nuevos fármacos debido a: constituye un órgano esencial para la sobrevivencia del parásito, presenta características diferentes al comparar la mitocondria de protozoos con la de células de mamíferos, presenta diferentes moléculas y vías metabólicas que han sido consideradas blancos terapéuticos para el desarrollo de drogas antiparasitarias y sus potencialidades han sido demostradas en estudios experimentales y clínicos (155, 156). Basándonos en los antecedentes encontrados, se exploraron tres vías para explicar la actividad antileishmanial del AE de *C. ambrosioides* y sus principales componentes: la formación de radicales libres, la actividad sobre los complejos de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria y su interacción con macromoléculas importantes, como el ADN.

Mediante la RPN se demostró la generación de una especie radical centrada en el carbono en el AE y en el ascaridol. Este radical puede provocar la alquilación de diferentes biomoléculas importantes para la sobrevivencia del parásito (145). Evidencias experimentales reportadas, demuestran que en estos peróxidos ocurre la ruptura del enlace O-O por un mecanismo homolítico formando un radical peroxil. Sin embargo, la presencia de este radical es muy corta debido a su inestabilidad, y por lo tanto ocurre una re-estructuración en la molécula formándose un radical secundario carbono, el cual es más estable (157). La adición de carvacrol al ascaridol provocó una pequeña disminución en la señal obtenida, esto puede deberse a la capacidad de los fenoles de atrapar electrones libres

y de esta manera modular las cantidades de radicales producidas por el ascaridol. El óxido de cariofileno no influyó en la señal obtenida al adicionarlo en conjunto con el ascaridol.

Los radicales libres son moléculas altamente reactivas, por lo que la acción antiparasitaria del AE de *C. ambrosioides* podría deberse a la formación de un radical libre. Sin embargo, en los ensayos *in vitro* se evidenció que el carvacrol y el óxido de cariofileno también presentan actividad contra *Leishmania*, a pesar de su inespecificidad. Por estos motivos, el efecto del AE no sólo pudiera deberse a la formación de radicales libres, sino que también existen otros componentes activos que pudieran incidir sobre la viabilidad celular por otro mecanismo.

Los resultados demuestran que el AE y sus componentes actúan sobre la cadena transportadora de electrones de la mitocondria, con una notable actividad sobre el Complejo III. Sin embargo, sólo el AE causó una inhibición específica, comparado con los componentes puros. Estos resultados son similares a los estudios realizados en modelos celulares donde se encontró que el ascaridol, el carvacrol y el óxido de cariofileno presentaban una actividad inespecífica, inhibiendo el crecimiento tanto del parásito como la célula hospedera. Por otra parte, también corrobora que en la mezcla de componentes del AE se pudieran equilibrar los efectos tóxicos, como se explicó al analizar la actividad específica del AE frente a *Leishmania*.

La relación de actividad encontrada para el AE en el sistema celular fue de 13, mientras que para el Complejo III fue de 2. Estas diferencias entre el sistema celular y el molecular pueden deberse a tres razones. En primer lugar, *Leishmania* presenta solamente una mitocondria, por lo que no tiene opciones para sobrevivir cuando su viabilidad depende del funcionamiento de un solo organelo; mientras que los macrófagos presentan múltiples mitocondrias que pueden compensar la actividad de las dañadas. En los ensayos enzimáticos se utiliza una concentración similar del Complejo bc1 purificado. En segundo lugar, el AE pudiera causar otros daños sobre moléculas específicas del parásito, como el ADN o proteínas, debido a los radicales libres formados. En tercer lugar, es posible que la entrada y acumulación de los componentes activos del AE en el parásito sea favorecida debido a transportadores específicos, lo cual pudiera contribuir a una mayor actividad del aceite sobre *Leishmania*, como son los transportadores amino-purina P2 los cuales no están presentes en las células de los mamíferos (158).

Los resultados demostraron que el AE de *C. ambrosioides* interacciona con el ADN parasitario, lo cual pudiera influir negativamente en algunos procesos importantes como son la replicación y la transcripción. En la literatura ha sido reportada la acción antileishmanial de compuestos que actúan sobre el ADN, como son los complejos de platino y cobre (95, 159). En *Leishmania* el ADN se encuentra en un núcleo prominente, el cual está formado por 36 cromosomas con 9800 genes aproximadamente (160, 161) y una extensión mitocondrial llamado cinetoplasto (10). Ambas estructuras están implicados es el desarrollo biológico de *Leishmania* y en los diferentes procesos que logran la supervivencia del parásito en el huésped vertebrado. En los experimentos realizados sólo encontramos que el AE interacciona con el ADN, no encontrando evidencias de que se intercale entre las bases de los nucleótidos ni que cause la ruptura del ADN.

Teniendo en cuenta los componentes activos del AE, se ha reportado que los peróxidos provocan la oxidación sitio-específica de bases de guanina (G) y citocina (C) en el ADN, y subsecuentemente su disfunción biológica y en algunos casos llega a ocurrir la ruptura del ADN (162). Con los avances sobre el conocimiento del genoma de *L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis* se conoce que el ADN de *Leishmania* presenta un contenido mayoritario de bases G-C de aproximadamente el 60 % (163). Por otra parte, los epóxidos, como el óxido de cariofileno, dependiendo de su estabilidad son considerados intermediarios eletrofilicos, los cuales pueden unirse a proteínas y al ADN (152, 164).

En la bibliografía se ha reportado que los radicales libres ocasionan severos daños en los parásitos de *Leishmania* lo cual puede provocar la muerte del parásito. Castro y colaboradores reportaron que benzofuroxanos oxigenados interfirieron en la función de la mitocondria de *Leishmania* y aumentaron la producción de estrés oxidativo en el parásito debido a la formación de radicales libres (165). El cloruro de berberina, un alcaloide isocuaternario con excelente actividad frente a *L. donovani*, causó un incremento en la generación de intermediarios reactivos del oxígeno que provocó la muerte del parásito (166).

Con el objetivo de demostrar las evidencias moleculares se evaluó el efecto del AE al combinarlo con medicamentos conocidos que se usan actualmente en la clínica que actúan sobre la mitocondria y sobre otras vías metabólicas. Se pudo corroborar un efecto sinérgico al administrar el AE en conjunto con los fármacos que actúan sobre ese mismo mecanismo

de acción, en este caso la pentamidina. Estudios experimentales han demostrado que este fármaco se acumula en la mitocondria del parásito por un transporte favorecido y que inhibe los complejos de la cadena transportadora de electrones (167). Paralelamente, se ha observado su unión al ADN inhibiendo la replicación y la transcripción, fundamentalmente a nivel mitocondrial (5).

V.4. Consideraciones generales

Los resultados observados a nivel celular y molecular demuestran que los principales componentes del AE por separado, causan una mayor toxicidad inespecífica que el AE de *C. ambrosioides*. En los estudios *in vitro* e *in vivo* frente a *L. amazonensis* el AE íntegro mostró potencialidades para el desarrollo de un fármaco con actividad antileishmanial.

Por otra parte, el AE fue eficaz al administrarlo por vía oral e intralesional. La vía oral presenta la ventaja de ser una vía sistémica que pudiera contribuir al control de la progresión de la enfermedad por vías indirectas; mientras que la eficacia de la vía intralesional está en dependencia del vehículo utilizado para administrar el AE.

En los modelos *in vitro* el AE mostró una mejor actividad que la del glucantime (fármaco de primera línea), así como mejor selectividad que la pentamidina (fármaco de segunda línea). En los modelos *in vivo* la eficacia del AE fue comparada con la del glucantime y la pentamidina. Además, se observó un efecto sinérgico al combinarlo con la pentamidina, la cual es un fármaco droga utilizada en la clínica frente a la LCD causada por *L. amazonensis* y frente a los casos de LV que no responden al tratamiento con antimoniales (14).

Adicionalmente, se pudieron identificar algunas de las moléculas y vías metabólicas sobre las cuales actúa el AE para ejercer su efecto antileishmanial, lo cual constituye un primer aporte al entendimiento del mecanismo de acción farmacológico del AE. El aceite está formado por una mezcla de varios componentes, por lo que su acción pudiera deberse a su actividad sobre diferentes blancos terapéuticos en el parásito, así como sobre el microambiente donde se desarrolla la infección. La Figura 20 muestra los mecanismos estudiados en este trabajo, así como otros que pueden sugerirse a partir de estudios realizados por otros autores sobre efectos de los componentes presentes en el AE. Adicionalmente, la actividad antileishmanial observada puede ser producto de metabolitos

o intermediarios que se produzcan por la reacción de los diversos componentes presente en la mezcla, como es el caso del carvacrol que pudiera captar los radicales libres formados por el ascaridol. Otros estudios han revelado que el óxido de cariofileno puede ser metabolizado por las enzimas epóxido reductasas, reportadas en algunos microorganismo y en el hígado, a compuestos hidroxí-derivados, los cuales son altamente reactivos (159, 168).

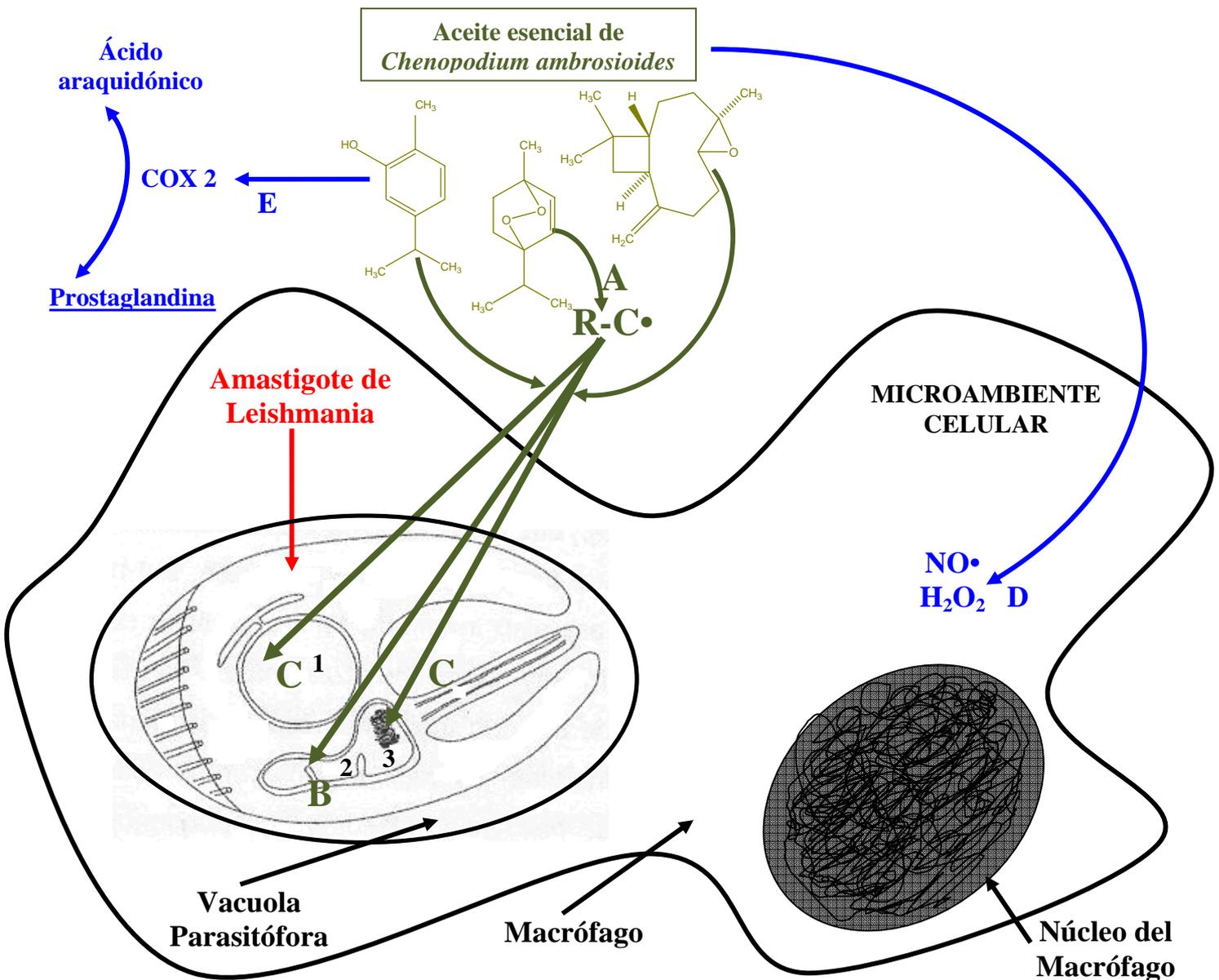


Figura 20: Esquema de los posibles mecanismos de acción del AE de *C. ambrosioides* demostrados en este trabajo (verde): A: Formación de un radical libre centrado en el carbono, B: Inhibición inespecífica del Complejo III de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, C: interacción con ADN parasitario (núcleo y cinetoplasto). Posibles mecanismos sugeridos a partir de estudios realizados por otros autores sobre efectos de los componentes presentes en el AE (azul): D: Potenciación de los mecanismos microbicidas del macrófago como son la producción de óxido nítrico (NO•) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), E: Acción antiinflamatoria por inhibición de la ciclooxigenasa 2 (COX 2). 1: Núcleo, 2: Mitocondria, 3: Cinetoplasto.

La actividad antileishmanial causada por el AE *in vitro* e *in vivo*, así como los estudios preliminares realizados sobre su actividad sobre otros protozoos y de toxicidad, se encuentran en concordancia con los criterios expuestos por Pink y colaboradores (130) para el desarrollo de fármacos antiparasitarios (Tabla 10).

Tabla 10: Relación de los principales resultados de la actividad antileishmanial del aceite esencial de *C. ambrosioides* acorde a los criterios estándar internacionales.

Criterios (Pink et al., 2005)	Resultados del aceite esencial de <i>C. ambrosioides</i> frente a la leishmaniosis cutánea causada por <i>L. amazonensis</i>
1. Activo <i>in vitro</i> con una $CI_{50} \leq 1 \mu\text{g/mL}$ (Productos puros)	1. CI_{50} de 3,7 $\mu\text{g/mL}$ frente a promastigotes y 4,7 $\mu\text{g/mL}$ frente a amastigotes ^a
2. Selectividad (10 veces más activo sobre el parásito)	2. El AE fue 13 veces aproximadamente más activo frente a <i>Leishmania</i>
3. Activo <i>in vivo</i> a dosis $\leq 100 \text{ mg/kg}$	3. Activo a 30 mg/kg por vía intraperitoneal
4. Activo <i>in vivo</i> por vía oral a dosis $\leq 100 \text{ mg/kg}$	4. El AE causó una DE_{50} de 51 mg/kg por vía oral
5. No causar signos de toxicidad a las dosis terapéuticas.	5. En los animales tratados no se observó muertes, ni pérdidas de peso superior al 10 %, ni signos de toxicidad retardada por vía oral o intralesional al administrar el AE durante 14 días

Los estudios toxicológicos, farmacocinéticos y de formulación podrían ser explorados y estudiados en más detalles para el desarrollo del AE de *C. ambrosioides* como un nuevo agente antileishmanial potencial para la población endémica que sufre los daños causados por esta parasitosis.

VI. Conclusiones y Recomendaciones

VI.1. CONCLUSIONES

1. Los modelos *in vitro* permitieron esclarecer que el ascaridol causó una mayor inhibición sobre promastigotes y amastigotes de *L. amazonensis* comparado con el aceite esencial íntegro y otros componentes aislados; mientras que el aceite esencial de *C. ambrosioides* mostró el mayor índice de selectividad comparado con sus componentes aislados.
2. El aceite esencial de *C. ambrosioides* administrado por vía oral e intralesional fue capaz de controlar el desarrollo de la infección por *L. amazonensis* en ratones BALB/c y su actividad fue superior a la demostrada por los fármacos convencionales. La efectividad del aceite esencial por vía intralesional fue dependiente del vehículo utilizado.
3. Se demostró que los posibles mecanismos de acción del aceite esencial de *C. ambrosioides* frente a *L. amazonensis* pueden estar relacionados con la oxidación directa (formación de radicales libres), inhibición no selectiva del Complejo III de la cadena respiratoria e interacción con el ADN del parásito *in vitro*.
4. El aceite esencial de *C. ambrosioides* mostró mayor selectividad tanto en los modelos celulares como moleculares, comparado con sus componentes por separado y se observó sinergismo al combinarlo con la pentamidina (fármaco convencional), lo que demuestra las potencialidades de este producto para el desarrollo de nuevos fármacos con actividad antileishmanial.

VI.2. RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios de toxicidad subcrónica y crónica del aceite esencial de *C. ambrosioides* al administrarlo por vía oral e intralesional.
2. Diseñar y evaluar nuevas formulaciones farmacéuticas para la administración del AE de *C. ambrosioides*.
3. Profundizar en el estudio de los mecanismos por los cuales el aceite esencial de *C. ambrosioides* ejerce su acción antileishmanial.
4. Evaluar la actividad del aceite esencial de *C. ambrosioides* frente a otros parásitos (protozoos y helmintos) de importancia médica.

*Referencias
Bibliográficas*

BIBLIOGRAFÍA

1. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saraiva NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005;366:1561-77.
2. Berman J. Recent developments in leishmaniasis: epidemiology, diagnosis and treatment. *Curr Infect Dis Report* 2005;7:33-8.
3. Croft SL, Coombs G. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 2003;19:502-8.
4. Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother* 2004;10:307-15.
5. Mishra J, Saxena A, Singh S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr Med Chem* 2007;14:1153-69.
6. Berman JD. Development of miltefosine for the leishmaniasis. *Mini-Rev Med Chem* 2006;6:145-51.
7. Chan MJ, Peña LM. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat Prod Rep* 2001;18:674-88.
8. Franca F, Lago EL, Marsden PD. Plant used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Vianna) braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1996;29:229-32.
9. Kvist LP, Christensen SB, Rasmussen HB, Mejia K, Gonzalez A. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. *J Ethnopharmacol* 2006;106:390-402.
10. Vannier-Santos MA, Martiny A, De Souza W. Cell Biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Curr Pharmaceutical Design* 2002;8:297-318.
11. Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr Pharmaceutical Design* 2002;8:319-42.
12. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Trop Med Hyg* 2001;95:239-43.
13. WHO. Control of leishmaniasis. Report by the secretariat. EB 118/4 11th May 2006.
14. Sundar S, Chatterjee M. Visceral leishmaniasis – current therapeutic modalities. *Indian J Med Res* 2006;123:345-52.

15. Garnier T, Croft SL. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. *Current Opin Invest Drugs* 2002;3:538-44.
16. Sundar S, Chakravarty J. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. *Expert Opin Invest Drugs* 2008;17:787-94.
17. El-Hassan AM, Zijlstra EE. Leishmaniasis in Sudan. *Roy S Trop Med Hyg* 2001;95:1-76.
18. Sharma U, Singh S. Insect vector of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* 2008;45:255-72.
19. Nylen S, Akuffo H. Tracing immunity to human leishmaniasis. *Future Microbiol* 2009;4:241-54.
20. Bailey MS, Lockwood DNJ. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol* 2007;25:203-11.
21. Guerin JP, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft S, Desjeux P, et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and proposed research and development agenda. *Lancet* 2002;2:494-501.
22. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004;27:305-18.
23. Ameen M. Cutaneous leishmaniasis: therapeutic strategies and future directions. *Expert Opin Pharmacother* 2007;8:2689-99.
24. Minodier P, Parola P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Med Inf Dis* 2007;5:150-8.
25. Taranto JN, Basualdo JA. Leishmaniasis. En: Basualdo JA, Coto CE, Torres RA, editores. *Microbiología Biomédica*. Buenos Aires: Atlante;1996.p.895-902.
26. Kedzierski L, Sakthianandeswaren A, Curtis JM, Andrews PC, Junk PC, Kedzierska K. Leishmaniasis: current treatment and prospect for new drugs and vaccines. *Curr Med Chem* 2009;16:599-614.
27. Mauel J. Vaccination against *Leishmania* infections. *Curr Drug Target* 2002;2:201-26.
28. Schallig HDFH, Oskam L. Molecular biological applications in the diagnosis and control of leishmaniasis and parasite identification. *Trop Med Int Health* 2002;7:641-51.

29. Coler RN, Skeiky YAW, Bernardis K, Greeson K, Carter D, Cornellison CD, et al. Immunization with a polyprotein vaccine consisting of the T-cell antigens thiol-specific antioxidant, *Leishmania major* stress-inducible protein 1, and *Leishmania* elongation initiation factor protects against leishmaniasis. *Infect Immun* 2002;70:4215-25.
30. Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ* 2003;326:377-82.
31. Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, López-Fuertes L, Timón M, Altet L, Solano-Gallego L, et al. Vaccination with plasmid DNA encoding KMPII, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. *Vaccine* 2007;25:7962-71.
32. Vermeersch M. Action mechanism and pharmacodynamics of the triterpene saponin PX-6518, a novel antileishmanial lead structure [Tesis para optar por el grado de Dr.C.]. Amberes: Universidad de Amberes; 2009.
33. Berman JD, Edwards N, King M, Grogl M. Biochemistry of pentostam resistant *Leishmania*. *Am J Trop Med Hyg* 1989;40:159-64.
34. Ephros M, Bitnum A, Shaked P, Waldman E, Zilberstein D. Stage-Specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:278-82.
35. Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 2004;279:39925-32.
36. Sundar S, Sinha PR, Agrawal NK, Srivastava R, Rainey PM, Berman JD, et al. A cluster of cases of severe cardiotoxicity among kala-azar patients treated with a high-osmolarity lot of sodium antimony gluconate. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:139-43.
37. Tracy JW, Webster LT. In: Hardman JG, Limbird LE, Ed. *The pharmacological basis of therapeutics*. New York, McGraw Hill. 2001; 1097-120.
38. Verma NK, Dey CS. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3010-5.

39. Yardley V, Croft SL, De Doncker S, Dujardin JC, Koirala S, Rijal S, et al. The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. *Am J Trop Med Hyg* 2005;73:272-5.
40. Alrajhi AA, Ibrahim EA, Devol EB, Khairat M, Faris RM, Maguire JH. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *N Engl J Med* 2002;346:891-5.
41. Saenz RE, Paz H, Berman JD. Efficacy of ketoconazole against *Leishmania braziliensis panamensis* cutaneous leishmaniasis. *Am J Med* 1990;89:47-55.
42. Nassiri-Kashani M, Firooz A, Khamesipour A, Mojtahed F, Nilforoushzadeh M, Hejazi H, et al. A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial of itraconazole in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2005;19:80-3.
43. Al-Abdely HM, Graybill JR, Loebenberg D, Melby PC. Efficacy of the triazole SCH56592 against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania donovani* in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2910-4.
44. Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides L, Polizopoulou Z, Billinis C, et al. A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniasis. *Vet Parasitol* 2001;98:247-61.
45. Dietze R, Carvalho SF, Valli LC, Berman J, Brewer T, Milhous W, et al. Phase 2 trial of WR6026, an orally administered 8-aminoquinoline, in the treatment of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65:685-9.
46. Badaro R, Falcoff E, Badaro FS, Carvalho EM, Pedral-Sampaio D, Barral A. Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. *N Engl J Med* 1990;322:16-21.
47. Murray HW, Brooks EB, Decchio JL, Hemzel FP. Immunoenhancement combined with amphotericin B as treatment for experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agent Chemother* 2003;47:2513-7.
48. Smith AC, Yardley V, Rhodes J, Croft SL. Activity of the novel immunomodulatory compound tucaresol against experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:1494-8.

49. Buates S, Matlashewski G. Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. *J Infect Dis* 1999;179:1485-94.
50. Melaku Y, Collin SM, Keus K, Gatluak F, Ritmeijer K, Davidson RN. Treatment of kala-azar in southern Sudan using a 17-day regimen of sodium stibogluconate combined with paromomycin: a retrospective comparison with 30-day sodium stibogluconate monotherapy. *Am J Trop Med Hyg* 2007;77:89-94.
51. Aguiar MG, Silva DL, Nunan FA, Nunan EA, Fernandes AP, Ferreira LA. Combined topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) major* leads to reduction in both lesion size and systemic parasite burdens. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:1234-40.
52. Liñares GE, Ravaschino EL, Rodriguez JB. Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases. *Curr Med Chem* 2006;13:335-60.
53. Magaraci F, Jimenez CJ, Rodrigues C, Rodrigues JC, Braga MV, Yardley V, et al. Azasterols as inhibitors of sterol 24-methyltransferase in *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*. *J Med Chem* 2003;46:4714-27.
54. Azzouz S, Maache M, Garcia RG, Osuna A. Leishmanicidal activity of edelfosine, miltefosine and ilmofosine. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;96:60-5.
55. Sereno D, Alegre AM, Silvestre R, Vergnes B, Ouaisi A. *In vitro* antileishmanial activity of nicotinamide. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:808-12.
56. Kingston DGI, Newman DJ. Natural products as drug leads: an old process or the new hope for drug discovery? *IDrug* 2005;8:990-2.
57. Fournet A, Muñoz V. Natural products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs. *Curr Top Med Chem* 2002;2:1215-37.
58. Delorenzi JC, Attias M, Gattass CR, Andrade M, Rezende C, da Cunha Pinto A. Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrob Agents Chemoter* 2001;45:1349-54.
59. Maes L, Vanden D, Germonprez N, Quirijnen L, Cos P, De Kimpe N, et al. *In vitro* and *in vivo* activities of a triterpenoid saponin extract (PX-6518) from the plant *Maesa balansae* against visceral *Leishmania* species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:130-6.

60. Shioji TT, Ueda-Nakamura T, Garcia DC, Prado BD, Morgado JÁ, de Souza W, et al. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:176-82.
61. Polonio T, Efferth T. Leishmaniasis: drug resistance and natural products (review). *Int J Mol Med* 2008;22:277-86.
62. Quinlan MB, Quinlan RJ, Nolan JM. Ethnophysiology and herbal treatments of intestinal worms in Dominica, West Indies. *J Ethnopharmacol* 2002;80:75-83.
63. Pardo M, Blanco E, Morales R. Plants known as té in Spain: An ethno-pharmacobotanical review. *J Ethnopharmacol* 2005;98:1-19.
64. Ahmed AA. Highly oxygenated monoterpenes from *Chenopodium ambrosioides*. *J Nat Prod* 2000;63:989-991.
65. Gadano AB, Gurni AA, Carballo MA. Argentine Fol. Medicine: Genotoxic effects of Chenopodiaceae family. *J Ethnopharmacol* 2006;103:246-51.
66. MacDonald D, VanCrey K, Harrison P, Rangachari PK, Rosenfeld J, Warren C, et al. Ascaridole-less infusions of *Chenopodium ambrosioides* contain a nematocide(s) that is(are) not toxic to mammalian smooth muscle. *J Ethnopharmacol* 2004;92:215-21.
67. Lall N, Meyer JJ. *In vitro* inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. *J Ethnopharmacol* 1999;66:347-54.
68. Pollack Y, Segal R, Golenser J. The effect of ascaridole on the *in vitro* development of *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Res* 1990;76:570-2.
69. Kiuchi F, Itano Y, Uchiyama N, Honda G, Tsubouchi A, Nakajima-Shimada J, et al. Monoterpene hidroperoxides with trypanocidal activity from *Chenopodium ambrosioides*. *J Nat Prod* 2002;65:509-12.
70. Guerra M, Torres D, Martínez L. Validación del uso tradicional de plantas medicinales cultivadas en Cuba. *Rev Cub Plant Med* 2001;2:48-51.
71. Giove NRA. Tradicional medicine in the treatment of enteroparasitosis. *Rev Gastroenterol Peru* 1996;16:197-202.
72. Nascimento F, Cruz G, Pereira PV, Maciel M, Silva L, Azevedo AP, et al. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* treatment. *Life Science* 2006;78:2650-3.

73. Morsy TA, Shoukry A, Mazyad SA, Makled KM. The effect of the volatile oils of *Chenopodium ambrosioides* and *Thymus vulgaris* against the larvae of *Lucilia sericata* (Meigen). J Egypt Soc Parasitol 1998;28:503-10.
74. Okuyama E, Umeyama K, Saito Y, Yamazaki M, Satake M. Ascaridole as a pharmacologically active principle of "Paico", a medicinal Peruvian plant. Chem Pharm Bull (Tokyo) 1993;41:1309-11.
75. Owolabi MS, Lajide L, Oladimeji MO, Setzer WN, Palazzo MC, Olowu RA, et al. Volatile constituents and antibacterial screening of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. growing in Nigeria. Nat Prod Commun 2009;4:989-92.
76. Huang X, Kong L. Study on chemical constituents of volatile oil from *Chenopodium ambrosioides* L. Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao 2002;33:256-7.
77. Cavalli JF, Tomi F, Bernardini AF, Casanova J. Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and ¹³C-NMR spectroscopy: Quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. Phytochem Anal 2004;15:275-9.
78. Norma Ramal. NRSP 309 "Medicamentos de origen vegetal. Droga cruda. Métodos de ensayos". Cuba, 1992.
79. Yen YP, Yeh MJ, Hsiao WF. Synthesis and nematocidal activity of ascaridole derivatives against *Meloidogyne incognita* and *Aphelenchoides besseyi*. J Pest Scie 2007;32:49-52.
80. Bodley AL, McGarry MW, Shapiro TA. Drug cytotoxicity assay for African Trypanosomes and *Leishmania* Species. J Infect Dis 1995;172:1157-9.
81. Torres-Santos EC, Moreira DL, Kaplan MA, Meirelles MN, Rossi-Bergmann B. Selective effect of 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. Antimicrob Agents Chemother 1999;43:1234-41.
82. Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH, Balls M. An improve MTT assay. J Immunol Methods 1993;157:203-7.
83. Croft SL, Neal RA, Thornton EA, Herrmann DBJ. Antileishmanial activity of the ether phospholipids ilmofosine. Trans R Trop Med Hyg 1993;87:217-9.

84. Buffet PA, Sulahian A, Garin YJF, Nassar N, Derouin F. Culture Microtitration a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2167-8.
85. Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD). Guidelines 423 for testing of chemical. Paris, 2001.
86. Schlichtherle M, M. Wahlgren, H. Perlmann, A. Scherf, *Methods in Malaria Research* (third ed.), Malaria Research and Reference Reagent Resource Center, Virginia (2000) pp. 8–10.
87. Loiseau PM, Bories C, Sanon A. A new photometric assay with bromocresol purple for testing *in vitro* antitrichomonal activity in aerobic environment. *Arzneim-Forsch* 1999;49:51-5.
88. Gottstein D, Gross D, Lehmann H. Mikrobiotest mit *Cladosporium cucumerinum* Ell. Et Arth zum Nachweis fungitoxischer Verbindungen auf Dünnschichtplatten. *Archiv Phytopathol Pflanzebschutz* 1982;20:111-6.
89. Al-Jabri AA, Wigg MD, Oxford JS. Inicial *in vitro* screening for their potencial antiviral activities. En: *Virological Methods Manual*. Mahy B. y O’Kangro H. eds., Acad. Press., N.Y. Ch. 1996;14:293-302.
90. Nohl H, Hegner D. Do mitochondria produce oxygen radicals *in vivo*? *Eur J Biochem* 1978;82:563-7.
91. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
92. Geier BM, Schagger H, Brandt U, Colson AM, von Jagow G. Point mutation in cytochrome b of yeast ubihydroquinone:cytochrome-c oxidoreductase causing myxothiazol resistance and facilitated dissociation of the iron-sulfur subunit. *Eur J Biochem* 1992;208:375-80.
93. Gille L, Stamberg W, Jager W, Reznicek G, Netscher T, Rosenau T. A new ubiquinone metabolite and its activity at the mitochondrial bc(1) complex. *Chem Res Toxicol* 2007;20:591-9.
94. Maniatis T, Frisch EF, Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harber Laboratory Press. Cold Spring Harber. New York: 1992.

95. Navarro M, Cisneros-Fajardo EJ, Fernandez-Mestre M, Arrieché D, Marchan E. Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against *Leishmania mexicana* of [Cu(dppz)₂]BF₄. J Inorg Biochem 2003;97:364-9.
96. Johnson MD, Macdougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:693-715.
97. Moreira RCR, Rebelo JMM, Gama MEA, Costa JML. Nível de conhecimento sobre leishmaniose tegumentar americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. Cad Saúde Pública 2002;18:187-95.
98. Patrício FJ, Costa GC, Pereira PV, Aragão-Filho WC, Sousa SM, Frazão JB, et al. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. J Ethnopharmacol 2008;115:313-9.
99. Smillie WC, Pessoa SB. A study for anthelmintic properties of the constituents of the oil of *Chenopodium*. J Pharmacol Exp Therapeutic 1924;24:359-70.
100. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. Int J Food Microbiol 2004;94:223-53.
101. Antony JP, Fyfe L, Smith H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? Trends Parasitol 2005;21:462-8.
102. Garcez LM, Goto H, Ramos PK, Briguido MC, Gomes PAF, Souza RA. *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-induced cutaneous leishmaniasis in the primate *Cebus apella*: a model for vaccine trials. Int J Parasitol 2002;32:1755-64.
103. Baser KHC. Biological and Pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. Curr Pharm Design 2008;14:3106-20.
104. Ozel MZ, Kaymaz H. Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*. Anal Bioanal Chem 2004;379:1127-33.
105. Baser KHC, Kirimer N. Essential oil of Lamiaceae plants of Turkey. Acta Hort 2006;723:163-71.
106. Unlü M, Vardar-Unlü G, Vural N, Dönmez E, Ozbaş ZY. Chemical composition, antibacterial and antifungal activity of the essential oil of *Thymbra spicata* L. from Turkey. Nat Prod Res 2009;23:572-9.

107. Iten F, Saller R, Abel G, Reichling J. Additive antimicrobial effects of the active components of the essential oil of *Thymus vulgaris* - chemotype carvacrol. *Planta Med* 2009;75:1231-6.
108. Dembitsky V, Shkrob I, Hanus LO. Ascaridole and related peroxides from the genus *Chenopodium*. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2008;152:209-15.
109. Masotti V, Juteau F, Bessièrè JM, Viano J. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *J Agric Food Chem*. 2003;51:7115-21.
110. Torres MC, Assunção JC, Santiago GM, Andrade-Neto M, Silveira ER, Costa-Lotufo LV, et al. Larvicidal and nematicidal activities of the leaf essential oil of *Croton regelianus*. *Chem Biodivers* 2008;5:2724-8.
111. Vogel H, Razmilic I, Muñoz M, Doll U, Martin JS. Studies of genetic variation of essential oil and alkaloid content in Boldo (*Peumus boldus*). *Planta Med* 1999;65:90-1.
112. Fraternalè D, Bucchini A, Giamperi L, Ricci D. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Ballota nigra* L. ssp foetida. *Nat Prod Commun* 2009;4:585-8.
113. Ogunbinu AO, Flamini G, Cioni PL, Adebayo MA, Ogunwande IA. Constituents of *Cajanus cajan* (L.) Millsp., *Moringa oleifera* Lam., *Heliotropium indicum* L. and *Bidens pilosa* L. from Nigeria. *Nat Prod Commun* 2009;4:573-8.
114. Bajpai VK, Rahman A, Dung NT, Huh MK, Kang SC. *In vitro* inhibition of food spoilage and foodborne pathogenic bacteria by essential oil and leaf extracts of *Magnolia liliflora* Desr. *J Food Sci* 2008;73:M314-20.
115. Oladipupo LA, Adebola OO. Chemical composition of the essential oils of the flowers, leaves and stems of two senecio polyanthemoides Sch. Bip. samples from South Africa. *Molecules* 2009;14:2077-86.
116. Kato S, Bowman DD, Brown DL. Efficacy of *Chenopodium ambrosioides* as antihelminthic for treatment of gastrointestinal nematodes in lambs. *J Herbs, Spices Med Plants* 2000;7:11-25.

117. Gupta D, Charles R, Mehta VK, Garg SN, Kumar S. Chemical examination of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L. from the southern hills of India. J Essential Oil Res 1976;14:93-4.
118. Betts TJ. Characterization of volatile oils constituents with relative long gas chromatographic retention times on two stationary phases. J Chromatography 1988;449:312-6.
119. De Pascual J, Bellido IS, Torres C, Pérez MA. Essential oil from *Chenopodium ambrosioides*. Riv Italiana EPPOS 1980;62:123-5.
120. Lawrence BM. Progress in essential oils. Perfumer Flavorist 1999;24:45-53.
121. Fester GA, Martinuzzi EA, Ricciardi AI. Volatile oils. V. Rev. Fac. Ing Quim (Santa Fe, Argentina) 1953;20:43-84.
122. Kazachkova TA, Karpenko IS. The volatile oil of *Chenopodium ambrosioides* cultivated in the city of Tomsk. Novye Lekarstv Rasteniya Sibiri, Ikh Lechebnye Preparaty Primenenie (Tomsk) 1953;4:147-7.
123. Pino JA, Marbot R, Real IM. Essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. from Cuba. J Essent Oil Res 2003;15:213-4.
124. Pisseri E, Bertoli A, Pistelli L. Essential oils in medicine: principles of therapy. Parasitologia 2008;50:89-91.
125. Torres AM, Ricciardi G, Agrelo AE, Ricciardi AIA, Bandoni AL. Examen del contenido en ascaridol del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* (paico). Argentina: Comunicaciones Científicas y tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste; 2003.
126. Tincusi BM, Jiménez IA, Bazzocchi IL, Moujir LM, Mamni ZA, Barroso JP, et al. Antimicrobial terpenoids from the oleoresin of the Peruvian medicinal plant *Copaifera paupera*. Planta Med 2002;68:808-12.
127. Ueda-Nakamura T, Mendonça-Filho RR, Morgado-Díaz JA, Korehisa P, Prado B, Aparício D, et al. Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. Parasitol Int 2006;55:99-105.
128. Zheliazkov VD, Cantrell CL, Tekwani B, Khan SI. Content, composition and bioactivity of the essential oils of three basil genotypes as a function of harvesting. J Agric Food Chem 2008;56:380-5.

129. Mikus J, Harkenthal M, Steverding D, Reichling J. *In vitro* effect of essential oils and isolated Mono- and sesquiterpenes on *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *Planta Med* 2000;66:366-8.
130. Santin MR, dos Santos AO, Nakamura CV, Prado B, Piloto IC, Ueda-Nakamura T. *In vitro* activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. *Parasitol Res* 2009;105:1489-96.
131. Pink R, Hudson A, Mouriés MA, Bendig M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature Rev Drug Discov* 2005;4:727-40.
132. Morais-Teixeira E, Carvalho AS, Costa JC, Duarte SL, Mendonça JS, Boechat N, et al. *In vitro* and *in vivo* activity of meglumine antimoniate produced at Farmanguinhos-Fiocruz, Brazil, against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L (L.) chagasi* and *L (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008;103:358-62.
133. Monzote L. Evaluación de la actividad terapéutica de dos nuevos principios activos frente a la leishmaniosis cutánea experimental [Tesis de Diploma]. Ciudad de la Habana: IPK; 1999.
134. Fournet A, Ferreira ME, Rojas de Arias A, Torres de Ortiz S, Fuentes S, Nakayama H. *In vivo* efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of New World cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2447-51.
135. Cabrera PMA. Biodistribución y farmacocinética del 14C-G1 en ratas Sprague Dawley (Administración Oral) [Tesis de Maestría en Farmacología Experimental]. Ciudad de la Habana: Universidad de la Habana; 1998.
136. Da Silva SAG, Costa SS, Mendonça SCF, Silva EM, Moraes VLG, Rossi-Bergmann B. Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. *Acta Trop* 1995;60:201-10.
137. Chen M, Brogger S, Theander TG, Kharazmi A. Antileishmanial activity of Licochalcone A in mice infected with *Leishmania major* and in hamsters infected with *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1339-44.
138. Zelikin AN, Such GK, Postma A, Caruso F. Poly(vinylpyrrolidone) for bioconjugation and surface ligand immobilization. *Biomacromol* 2007;8:2950-3.

139. Thakur CP, Narayan S, Ranjan A. Epidemiological, clinical and pharmacological study of antimony-resistant visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Indian J Med Res* 2004;120:166-72.
140. Ferreira ME, Rojas A, Torres S, Inchausti A, Nakayama H, Thouvenel C. Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. *J Ethnopharmacol* 2002;80:199-202.
141. Nakayama H, Loiseau PM, Bories C, Torres S, Schinini A, Serna E, et al. Efficacy of orally administered 2-substituted quinolines in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4950-6.
142. Alves LV, Temporal RM, Cysne-Finkelstein L, Leon LL. Efficacy of a diarylheptanoid derivative against *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003;98:553-5.
143. Landa P, Kokoska L, Pribylova M, Vanek T, Marsik P. *In vitro* anti-inflammatory activity of carvacrol: Inhibitory effect on COX-2 catalyzed prostaglandin E(2) biosynthesis. *Arch Pharm Res* 2009;32:75-8.
144. Pereira WS, Ribeiro BP, Souza AIP, Serra ICPB, Mattar N, Fortes TS, et al. Evaluation of the subchronic toxicity of oral treatment with *Chenopodium ambrosioides* in mice. *J Ethnopharmacol* 2010;127:602-5.
145. O'Neil PM, Posner GH. A medicinal chemistry perspective on artemisinin and related endoperoxides. *J Med Chem* 2004;47:2945-64.
146. Donkers RL, Workentin MS. Kinetics of dissociative electron transfer to ascaridole and dihydroascaridole-model bicyclic endoperoxides of biological relevance. *Chemistry* 2001;7:4012-20.
147. Staniek K, Rosenau T, Gregor W, Nohl H, Gille L. The protection of bioenergetic functions in mitochondria by new synthetic chromanols. *Biochem Pharmacol* 2005;70:1361-70.
148. Golenser J, Waknine JH, Krugliak M, Hunt NH, Grau GE. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. *Int J Parasitol* 2006;36:1427-41.
149. Fontana A, Cimino G, Gavagnin M, Gonzalez MC, Estornell E. Novel inhibitors of mitochondrial respiratory chain: endoperoxides from the marine tunicate *Stolonica socialis*. *J Med Chem* 2001;44:2362-5.

150. Ultee A, Smid EJ. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol* 2001;64:373-8.
151. Sensch O, Vierling W, Brandt W, Reiter M. Effects of inhibition of calcium and potassium currents in guinea-pig cardiac contraction: comparison of beta-caryophyllene oxide, eugenol, and nifedipine. *Br J Pharmacol* 2000;131:1089-96.
152. Yang D, Michel L, Chaumont JP, Millet-Clerc J. Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an *in vitro* experimental model of onychomycosis. *Mycopathologia* 1999;148:79-82.
153. Dare E, Tofighi R, Nutt L, Vettori MV, Emgard M, Mutti A, et al. Styrene 7,8-oxide induces mitochondrial damage and oxidative stress in neurons. *Toxicology* 2004;201:125-32.
154. do Socorro S, Mendonça-Filho RR, Bizzo HR, de Almeida I, Soares RM, Souto-Padrón T, et al. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1895-901.
155. Sen N, Majumder HK. Mitochondrion of protozoan parasite emerges as potent therapeutic target: Exciting drugs are on the horizon. *Curr Pharm Design* 2008;14:839-46.
156. Schneider A. Unique aspects of mitochondrial biogenesis in trypanosomatids. *Int J Parasitol* 2001;31:1403-15.
157. Witting PK, Travascio P, Sen D, Mauk AG. A DNA oligonucleotide-hemin complex cleaves t-butyl hydroperoxide through a homolytic mechanism. *Inorg Chem* 2001;40:5017-23.
158. De Koning HP. Uptake of pentamidine in *Trypanosoma brucei brucei* is mediated by three distinct transporters: implications for cross-resistance with arsenicals. *Mol Pharmacol* 2001;59:586-92.
159. Nguewa PA, Fuertes MA, Iborra S, Najajreh Y, Gibson D, Martínez E. Water soluble cationic *trans*-platinum complexes which induce programmed cell death in the protozoan parasite *Leishmania infantum*. *J Inorganic Biochem* 2005;99:727-36.
160. Myler PJ, Audleman L, Devos T, Hixson G, Kiser P, Lemley C, et al. *Leishmania major* friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:2902-6.

161. Ivens AC, Lewis SM, Bagherzadeh A, Zhang L, Chan HM, Smith DF. A physical map of the *Leishmania major* friedlin genome. *Genome Res* 1998;8:135-45.
162. Kawanishi S, Oikawa S, Murata M, Tsukitome H, Saito I. Site-specific oxidation at GG and GGG sequences in double-stranded DNA by benzoyl peroxide as a tumor promoter. *Biochem* 1999;38:16733-9.
163. Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genetic* 2007;39:839-47.
164. Choudhary MI, Siddiqui ZA, Nawaz SA, Atta UR. Microbial transformation and butyrylcholinesterase inhibitory activity of (-)-caryophyllene oxide and its derivatives. *J Nat Prod* 2006;69:1429-34.
165. Castro D, Boiani L, Benitez D, Hernández P, Merlino A, Gil C. Anti-trypanosomatid benzofuroxans and deoxygenated analogues: synthesis using polymer-supported triphenylphosphine, biological evaluation and mechanism of action studies. *Eur J Med Chem*. 2009;44:5055-65.
166. Saha P, Sen R, Hariharan C, Kumar D, Das P, Chatterjee M. Berberine chloride causes a caspase-independent, apoptotic-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Free Radic Res* 2009:1-10.
167. Mukherjee A, Padmanabhan PK, Sahani MH, Barrett MP, Madhubala R. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 2006;145:1-10.
168. Hirao Y, Kitamura S, Tatsumi K. Epoxide reductase activity of mammalian liver cytosols and aldehyde oxidase. *Carcinogenesis* 1994;15:739-43.

Anexos

ANEXO 1
PUBLICACIONES

1. **Monzote L**, Montalvo AM, Montano I, Scull R, Miranda M, Abreu J. Estudio del efecto de aceites esenciales de plantas cubanas sobre promastigotes de *Leishmania mexicana amazonensis*. Rev Cub Farm 2001;35(Supp):103-5.
2. **Monzote L**, Montalvo AM, Scull R, Miranda M, Abreu J. Efecto “in vitro” de aceites esenciales frente a *Leishmania* sp. Rev Latin Microb 2002;44(4):314.
3. **Monzote L**, Montalvo AM, Scull R, Miranda M, Abreu J. Actividad antileishmanial del aceite esencial extraído de *Chenopodium ambrosioides*. Rev Cub Farm 2004;38(Supl 1):644-8.
4. **Monzote L**, Sariego I, Montalvo AM, Garrido N, Scull R, Abreu J. Propiedades antiprotozoarias de aceites esenciales extraídos de plantas cubanas. Rev Cub Med Trop 2004;56(3):230-3.
5. **Monzote L**, Almannoni S, Montalvo AM, Scull R, Miranda M, Abreu J. Activity of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* grown in Cuba against *Leishmania amazonensis*. Chemotherapy 2006;52(3):130-6.
6. **Monzote L**, Montalvo AM, Scull R, Miranda M, Abreu J. Activity, toxicity and analysis of resistance of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* after intraperitoneal, oral and intralesional administration in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*: A preliminary study. Biomed Pharmacother 2007;61:148-153.
7. **Monzote L**, García M, Montalvo AM, Scull R, Miranda M, Abreu J. *In vitro* activity of an essential oil against *Leishmania donovani*. Phytother Res 2007;21(11):1055-8.
8. **Monzote L**, Montalvo AM, Scull R, Miranda M, Abreu J. Combined effect of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and antileishmanial drugs on promastigotes of *Leishmania amazonensis*. Rev Med Trop Sao Paulo 2007;49(3):257-9.
9. **Monzote L**. Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* as a promising antileishmanial agent. Nat Prod Commun 2007;2(12):1257-62.
10. **Monzote L**, García M, Montalvo AM, Linares R, Scull R. Effect of oral treatment with the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* against cutaneous leishmaniasis in

BALB/c mice, caused by *Leishmania amazonensis*. Res Complementary 2009;16(5):334-8.

11. **Monzote L**, Stamberg W, Staniek K, Gille L. Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. Toxicol Appl Pharmacol 2009;240(3):337-47.

ANEXO 2

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON EL TEMA

12. Montalvo AM, **Monzote L**, Fonte L, Díaz A, Fonseca L, Montano I. Inmunización con subgenoteca de *L. amazonensis* resulta protectora contra el reto en ratones BALB/c. *Rev Latin Microb* 2002;44(4):313.
13. Montalvo AM, Fonseca L, **Monzote L**, Díaz A, Fonte L. Aproximaciones cubanas al estudio de las leishmaniosis. *Rev Latin Microb* 2002;44(4):312.
14. Montalvo AM, Alberti E, **Monzote L**, Fonte L. Significant and transitory control of lesion's development in mice immunized with a genomic library of *Leishmania amazonensis*. *Rev Patol Trop* 2002;31(1):244-47.
15. **Monzote L**, Montalvo AM, Fonseca L, Perez R, Suarez M, Rodríguez H. Effect of derivatives of thiadiazine on amastigotes of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(3):329-30.
16. Montalvo AM, **Monzote L**, Fonseca L, Montano I, Fonte L, Soto M, Requena JM. Inmunización con subgenoteca de *Leishmania amazonensis* protege contra el reto a ratones BALB/c. *Rev Cub Med Trop* 2004;56(2):103-10.
17. **Monzote L**, Montalvo AM, Fonseca L, Perez R, Suarez M, Rodríguez H. *In vitro* activities of thiadiazine derivatives against *Leishmania amazonensis*. *Drug Research* 2005;55(4):232-8.
18. **Monzote L**, Montalvo AM, Fonseca L, Perez R, Suarez M, Rodríguez H. Efecto de derivados de la tiadiazina sobre la capacidad infectiva de promastigotes de *Leishmania amazonensis*. *Rev Cub Med Trop* 2006;58(1):25-9.
19. **Monzote L**. Essential oil from *Chenopodium ambrosioides*: a return to traditional medicine? *Int J Essential Oil Ther* 2007;1(4):179-183.
20. Montalvo AM, Folgueira C, Carrion J, **Monzote L**, Cañavate C, Requena JM. The *Leishmania* HSP20 is antigenic during natural infections, but, as DNA vaccine, it does not protect BALB/c mice against experimental *L. amazonensis*. *J Biomed Biotech* 2008;2008:1-9.
21. **Monzote L**. A Review of Anti-parasitic Patents (1988-2008). Recent Patents Anti-Infect Drug Disc. 2008 Nov;3(3):177-91.

22. Sariego I, **Monzote L**, Scull R, Díaz A, Caballero Y. Activity of essential oils from Cuban plants against *Leishmania donovani* and *Trichomonas vaginalis*. *Int J Essential Oil Ther* 2008;2:172-4.
23. Montalvo AM, **Monzote L**, Fraga J, Montano I, Muskus C, Marín M, Doncker S, Vélez ID, Dujardin JC. PCR-RFLP y RAPD para la tipificación de *Leishmania* neotropical. *Biomédica* 2008;28:597-606.
24. García M, **Monzote L**, Montalvo AM, Scull R. Evaluación antileishmanial *in vitro* de extractos provenientes de *Citrus limetta*, *Cucurbita maxima* y *Rhoeo spathacea*. *Rev Cub Med Trop* 2008; (En prensa).
25. **Monzote L**. Current Treatment of Leishmaniasis: A Review. *Open J Antimicrob Agent* 2009;1:9-19.
26. **Monzote L**. Mitochondria as promissory antiparasitic target. *Curr Clin Pharmacol* 2010, 5 (En prensa).
27. García M, **Monzote L**, Montalvo AM, Scull R. Screening of Cuban medicinal plants against *Leishmania amazonensis*. *Pharm Biol* 2009; (En prensa).

ANEXO 3
EVENTOS CIENTIFICOS

1. VIII Forum Estudiantil del Instituto de Farmacia y Alimentos, 1998. Cuantificación de promastigotes de *Leishmania amazonensis* sin necesidad de cromógeno. (Autora)
2. Forum Científico de la Universidad de la Habana, 1998. Cuantificación de promastigotes de *Leishmania amazonensis* sin necesidad de cromógeno. (Autora)
3. IX Jornada Estudiantil del Instituto de Farmacia y Alimentos, 1999. Nuevos principios activos con actividad antileishmanial. (Autora)
4. IX Exposición Forjadores del Futuro, 2000. Leishmaniosis Cutánea en Ratones BALB/c. (Autora)
5. IV Encuentro Iberoamericano sobre las Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, 2000. Reproducción experimental de la leishmaniosis cutánea en ratones BALB/c. (Autora)
6. III Jornada Municipal y IV Jornada Provincial de Ciencias Veterinarias, 2001. Leishmaniosis Cutánea experimental: Factores que influyen en la eficacia de la Anfotericina B. (Autora)
7. I Encuentro Interamericano de Farmacia y Nutrición, 2001. Estudio del efecto de aceites esenciales de plantas cubanas sobre promastigotes de *Leishmania mexicana amazonensis*. (Autora)
8. X Exposición Forjadores del Futuro Municipal y Provincial, 2002. Efecto antileishmanial de un extracto de *Chenopodium ambrosioides* (Apasote). (Autora)
9. 5th COST B9 Congress on Antiprotozoal Chemotherapy, 2002. Anti-leishmanial activity of essential oils from *Chenopodium ambrosioides*. (Autora)
10. V Encuentro Iberoamericano sobre las Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, 2002. Metabolitos de plantas medicinales con acción antileishmanial. (Autora)
11. XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología. VI Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. III Congreso Cubano de Medicina Tropical, 2002. Efecto “in vitro” de aceites esenciales frente a *Leishmania*. (Autora)
12. XVI Congreso Latinoamericano de Microbiología. VI Congreso Cubano de Microbiología y Parasitología. III Congreso Cubano de Medicina Tropical, 2002. Aproximaciones cubanas al estudio de las leishmaniosis. (Coautora)

13. Biotecnología Habana, 2003. Actividad de aceites esenciales extraídos de plantas cubanas frente a *Trichomonas vaginalis*. (Coautora)
14. VI Encuentro Iberoamericano de las Ciencias Farmacéuticas y Alimenticias, 2004. Actividad antileishmanial del aceite esencial extraído de *Chenopodium ambrosioides*. (Autora)
15. XV Forum de Ciencia y Técnica (Nivel Municipal), 2004. Evaluación de alternativas terapéuticas contra *Leishmania*. Una nueva capacidad tecnológica del IPK. (Autora)
16. International Conference “Drug development for parasitic diseases”, 2004. Activity, toxicity and induction of resistance of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* after intraperitoneal, oral and intralesional administration in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*: (Autora)
17. Medicina Natural y Tradicional, 2005. Nuevo producto natural activo frente a la leishmaniosis cutánea. (Autora)
18. XII Exposición Forjadores del Futuro (Nivel de Base), 2006. Evaluación *in vitro* del aceite esencial extraído de *Chenopodium ambrosioides* frente a *Leishmania donovani*. (Coautora)
19. Joven Ciencia, 2006. Nuevo aceite esencial con actividad antileishmanial. (Autora)
20. XVII Forum de Ciencia y Técnica, 2006. Potencialidades del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* como un nuevo agente antileishmanial. (Autora)
21. VIII Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical, 2007. Potencialidades del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* como un nuevo agente antileishmanial. (Autora)
22. VIII Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical, 2007. Interacción del aceite esencial extraído de *Chenopodium ambrosioides* con el ADN de *Leishmania amazonensis*. (Autora)
23. VIII Congreso Centroamericano y del Caribe de Parasitología y Medicina Tropical, 2007. Estrategia estandarizada para la evaluación simultánea de múltiples productos en *Leishmania*. (Coautora)
24. X Congreso de la Sociedad Cubana de Ciencias Farmacéuticas, 2008. Efecto combinado del aceite esencial extraído de *Chenopodium ambrosioides* y las drogas convencionales (Autora).

25. HABANA-REDOX, 2009. *Chenopodium ambrosioides*: antiparasitic drug that acts on mitochondrial respiratory chain (Autora).
26. IPK Congreso 70 Aniversario, 2009. Evaluación de productos sintéticos y naturales con potencialidades anti-*Leishmania*. (Autora)
27. IPK Congreso 70 Aniversario, 2009. La mitocondria como blanco terapéutico para el desarrollo de drogas antiparasitarias. (Autora)
28. International Conference of Free Radical Society, 2009. The influence of the endoperoxide ascaridole and extracts of *Chenopodium ambrosioides* on mammalian mitochondria. (Coautora)
29. International Conference of Free Radical Society, 2009. Vitamin E-related compounds with antiprotozoal activity. (Coautora)

ANEXO 4

Reactivos y medios utilizados en el estudio con sus correspondientes abreviaturas y la firma comercial de procedencia:

Producto	Abreviatura	Firma Comercial
2,3-dimetoxi-5-metil-6-decil-1,4-benzoquinona	dUQH2	Sigma Aldrich, Viena, Austria
3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio	MTT	SIGMA, St. Louis, EUA
5,5-dimetil-1-pirrolina-N-oxido	DMPO	Sigma Aldrich, Viena, Austria
5-difosfato de adenosina	ADP	Boehringer Mannheim GmbH, Alemania
Acetato de Sodio	NaAc	BDH, Poole, Inglaterra
Acetonitrilo	ACN	Merck, Dermstadt, Alemania
Ácido etilene-dinitrilo-tetraacético	EDTA	Merck, Dermstadt, Alemania
Albúmina de suero bovino	BSA	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Anfotericina B	-	Imefa, Ciudad de la Habana, Cuba
Bromocresol	-	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Carvacrol	-	Sigma Aldrich, Viena, Austria
Cianuro de potasio	KCN	Merck, Dermstadt, Alemania
Citocromo c	<i>Cit c</i>	Sigma Aldrich, Viena, Austria
Cloruro de sodio	NaCl	Merck, Dermstadt, Alemania
Dihidrógenofosfato de sodio	NaH ₂ PO ₄	Merck, Dermstadt, Alemania
Dimetilsulfóxido	DMSO	BDH, Poole, Inglaterra
Ditionito de sodio	Na ₂ S ₂ O ₄	Merck, Dermstadt, Alemania
Estigmatelina	-	Sigma Aldrich, Viena, Austria
Estreptomycin	-	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Fosfato inorgánico	Pi	Sigma Aldrich, Viena, Austria
Giemsa	-	Merck, Dermstadt, Alemania
Glucantime	-	Rhône-Poulenc Rorer, Mexico
Glutamato	-	Sigma Aldrich, Viena, Austria
Hidrocloruro de trietanolamina	TRAP	Merck, Dermstadt, Alemania
Hidrogenofosfato de sodio	Na ₂ HPO ₄	Merck, Dermstadt, Alemania

Malato	-	Sigma Aldrich, Viena, Austria
Medio 199	-	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Medio RPMI 1640	RPMI	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Medio Schneider	-	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Medio Triptona Soya Agar	TSA	Merck, Dermstadt, Alemania
Metanol	-	BDH, Poole, Inglaterra
Mygliol 810N	Mygliol	Hüls Aktiengesellschaft, Alemania
Óxido de cariofileno	-	Sigma Aldrich, Viena, Austria
para-Nitrofenilfosfato	pNFF	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Penicilina sódica	-	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Pentamidina	-	Richet, Buenos Aires, Argentina
Polivinilpirrolidona	PVP	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Sacarosa	-	Merck, Dermstadt, Alemania
Solución salina fisiológica estéril	SSFE	Imefa, Ciudad de la Habana, Cuba
Succinato	-	Sigma Aldrich, Viena, Austria
Suero fetal bovino	SFB	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Sulfato de hierro	FeSO ₄	Merck, Dermstadt, Alemania
Sulfato de neomicina	neomicina	SIGMA, St. Louis, MO, USA
Triton X-100	Triton	BDH, Poole, Inglaterra
α -terpineno	α -terpineno	Sigma Aldrich, Viena, Austria
Tris(hidroximetil)-aminometano	TRIS	Merck, Dermstadt, Alemania

ANEXO 5

Cepas, aislamientos y líneas celulares utilizados en este estudio, así como su procedencia y manutención.

Cepa de *L. amazonensis*

Se utilizó la cepa MHOM/77/LTB0016, donada por el Departamento de Inmunología de la Fundación Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ, Brasil. Los parásitos se mantuvieron en ratones de la línea BALB/c, se extrajeron mediante aspirado con jeringuilla y fueron inoculados en medio Schneider, suplementado con antibióticos (penicilina sódica 200 UI, estreptomicina 200 µg/mL) y al 10% de SFB inactivado con calor (56°C, 30 minutos). No se usaron promastigotes después del décimo pase *in vitro*.

Cepa de *L. donovani*

Se utilizó la cepa MHOM/ET/67/L82, donada por el Departamento de Infecciones y Medicina Tropical de la Escuela de Higiene y Medicina Tropical de Londres, Reino Unido. Los parásitos se mantuvieron en medio Schneider, suplementado con antibióticos (penicilina sódica 200 UI, estreptomicina 200 µg/mL) y al 10% de SFB bovino inactivado con calor (56°C, 30 minutos).

Cepa de *Plasmodium falciparum*

Se utilizó la cepa FCA/20GHA, donada por el Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Amberes, Bélgica. Los parásitos fueron mantenidos al 1 % de parasitemia en eritrocitos humanos (A+) en medio RPMI, 10 % de suero humano (A⁺), 1.77 g/l de glucosa, 2.0 g/L de NaHCO₃ y 8.3 g/l de HEPES.

Aislamiento de *Trichomonas vaginalis*

Se utilizó el aislamiento C173 del Departamento de Parasitología del IPK. El aislamiento se realizó de una paciente sintomática y se axenizó en condiciones de esterilidad en medio TYI-S-33 suplementado al 10 % de ternera recién nacido y antibióticos.

Cepa de *Escherichia coli*

Se utilizó la cepa ATCC 25922 del banco de cepas del Instituto Finlay. Las bacterias fueron sembradas en césped en medio TSA.

Cepa de *Staphylococcus aureus*

Se utilizó la cepa ATCC 29213 del banco de cepas del Instituto Finlay. Las bacterias fueron sembradas en césped en medio TSA.

Cepa de *Pseudomona aeruginosa*

Se utilizó la cepa ATCC 27853 del banco de cepas del Instituto Finlay. Las bacterias fueron sembradas en césped en medio TSA.

Cepa de *Candida albicans*

Se utilizó la cepa ATCC 10323 del banco de cepas del Instituto Finlay. Las levaduras fueron sembradas en césped en medio TSA.

Cepa de *Saccharomyces cerevisiae*

Se utilizó la cepa DBY747 del banco de cepas de la Universidad de Ciencias Veterinarias de Austria. Las levaduras fueron sembradas en medio TSA.

Cepa de *Herpes simplex* tipo I y II

Se utilizó la cepa 8WC, donada por el Instituto Carlos III de Madrid, España. Los virus fueron mantenidos en Medio 199.

Líneas celulares

Se utilizó las células ATCC CCL-81 VERO (Células de riñón de monos verdes africanos) del banco de cepas del Instituto Finlay y ATCC CCL-171 MRC-5 (Fibroblastos normales de pulmón humano) del banco de cepas del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”. Las células fueron mantenidas en Medio 199, suplementado con SFB al 5% y antibiótico (neomicina 100 UI/mL).

ANEXO 6

Animales de laboratorio utilizados en este estudio, procedencia y manutención.

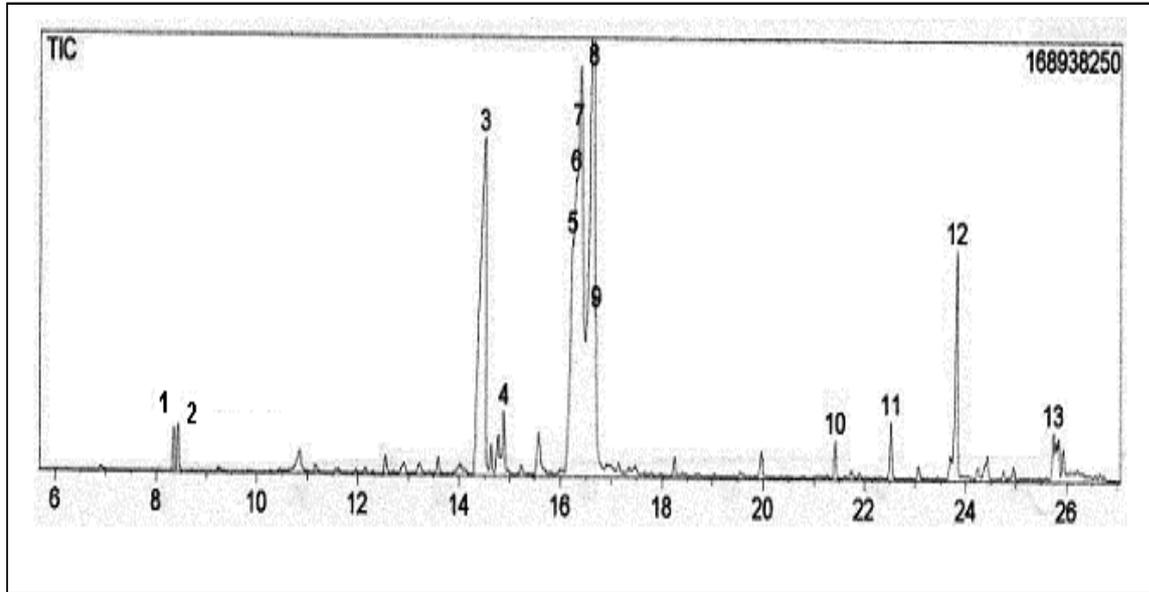
Se utilizaron ratones de la línea BALB/c (6 a 10 semanas de edad y peso entre 18 y 22 g) y ratas Wistar (8 a 12 semanas de edad y con un peso de 200 g \pm 20%) procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), Cuba, acreditados con sus correspondientes certificados de salud y calidad genética. Se utilizaron animales adultos jóvenes siguiendo las normas éticas para el uso de animales de experimentación y fueron mantenidos bajo condiciones sanitarias convencionales con un régimen de 12-12 horas luz-oscuridad. La alimentación consistió en pienso concentrado para roedores suministrado por CENPALAB. Tanto la cantidad de alimento como la de agua se suministraron para ser consumidos libremente. Los animales fueron alojados en cajas de macrolón, utilizando como cama el bagazo de caña desmeollado.

Ejemplares de adultos jóvenes *Bos taurus* fueron obtenidos de los Laboratorios de Animales de investigación de Himberg, Austria, acreditados con sus correspondientes certificados de salud y calidad genética.

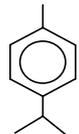
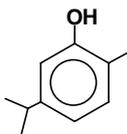
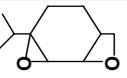
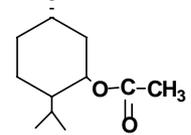
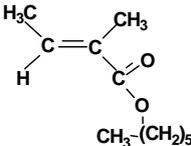
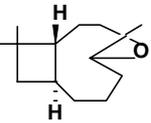
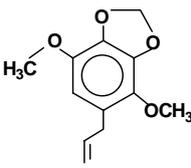
Para todos los experimentos se trabajó siguiendo las normas éticas para el uso de animales de experimentación.

ANEXO 7

Cromatograma obtenido por cromatografía gaseosa del aceite esencial de *C. ambrosioides*.



Principales componentes del aceite esencial de *C. ambrosioides* obtenidos por cromatografía gaseosa. Los componentes corresponden el 97,6 % del aceite esencial.

Picos	t _R ^a	Componentes	MM ^b	FQG ^c	Estructura	% ^d
1	8,35	Δ ⁴ -careno 3,7,7-trimetilbiciclo [4.1.0]-4-hepteno	136	C ₁₀ H ₁₆		0,76
2	8,44	p-cimeno 1-metil-4-(2-propil)-benceno	134	C ₁₀ H ₁₄		0,83
3-4 ^e	14,88	Ascaridol 1-metil-1,4-dioxi-4-(2-propil)-ciclohex-2-eno	168	C ₁₀ H ₁₆ O ₂		22,54
5-8 ^e	16,40	Carvacrol 1-hidroxi-2-metil-5-(2-propil)-benceno	150	C ₁₀ H ₁₄ O		62,36
9	16,70	Isoascaridol	168	C ₁₀ H ₁₆ O ₂		1,86
10	21,42	Acetato de Neomentil [1S-(1β,2β,5α)]-5-metil-2-(2-propil)-ciclohexanil acetato	198	C ₁₂ H ₂₂ O ₂		0,62
11	22,52	Hexil tiglato n-hexil 2-metil-2Z-butenoato	184	C ₁₁ H ₂₀ O ₂		1,01
12	22,82	Óxido de Cariofileno	220	C ₁₅ H ₂₄ O		5,64
13	25,74	Apio 1,2-metilenedioxi-3,6-dimetoxi-4-[1-(2-propenil)]-benceno	222	C ₁₂ H ₁₄ O ₄		1,98

^a: t_R; Tiempo de retención.

^d: %; Porcentaje de área total.

^b: MM; Masa molecular.

^c: Mezcla de enantiómeros

^c: FQG; Fórmula química general.

ANEXO 8

Para los experimentos se realizaron tres colectas del material vegetal en el mismo lugar y época del año. Se midieron parámetros físicos y biológicos para realizar el control del aceite esencial.

Parámetros	Muestras de cada colecta		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Color	Amarillo	Amarillo	Amarillo
Densidad (g/mL)	0,8893	0,8867	0,8830
Pico máximo en espectro UV-Vis	$\lambda = 290 \pm 2$ nm	$\lambda = 292 \pm 1$ nm	$\lambda = 291 \pm 2$ nm
Absorbancia en el pico máximo en espectro UV-Vis	$A = 0,766 \pm 0,004$	$A = 0,770 \pm 0,003$	$A = 0,770 \pm 0,005$
Índice de Retención	$0,58 \pm 0,02$	$0,60 \pm 0,04$	$0,60 \pm 0,02$
CI ₅₀ (µg/mL) frente a promastigotes	$3,7 \pm 0,6$	$3,3 \pm 0,4$	$3,4 \pm 0,5$
CI ₅₀ (µg/mL) frente a macrófagos	$58,2 \pm 0,05$	$58,2 \pm 0,08$	$59,1 \pm 0,08$