

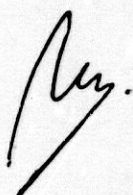
UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

QUIMIOTERAPIA EXPERIMENTAL EN LEISHMANIOSIS CON
COMPLEJOS METALICOS DE NUEVA SINTESIS.

El Director



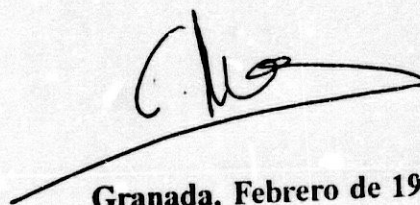
Prof. Dr. D. ANTONIO OSUNA
CARRILLO DE ALBORNOZ

La Tutora



Prof. Dra. Dña CARMEN
MASCARO LAZCANO

Tesis Presentada para optar al Grado de Doctora en Farmacia, por la
Licenciada CONCEPCION MARIA MESA VALLE.



Granada, Febrero de 1991



ACTA DE GRADO DE DOCTOR

DOCTORANDO D. CONCEPCION MARIA MESA VALLE
LICENCIADO EN FARMACIA por la Universidad de GRANADA
PROGRAMA DE DOCTORADO FUNDAMENTOS Y TECNICAS EN PARASITOLOGIA EXPERIMENTAL

DEPARTAMENTO RESPONSABLE PARASITOLOGIA
TITULO DE LA TESIS "QUIMIOTERAPIA EXPERIMENTAL EN LEISHMANIASIS CON COMPLEJOS METALICOS DE NUEVA SINTESIS"

DIRECTOR/ES DR. D. ANTONIO OSUNA CARRILLO DE ALBORNOZ

TUTOR DRA. D^a CARMEN MASCARO LAZCANO

TRIBUNAL

PRESIDENTE

VOCALES

SECRETARIO

D. Salvador Jorras Jorras (S.P.)
D. Juan Ocaña Sierra (S.P.)
D. Antonio Toros Toros (S.P.)
D. Jacques Barthe
D. Andrés Jorras Jorras - Jorras de Hevo

Reunido el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D. CONCEPCION MARIA MESA VALLE éste procede al acto de mantenimiento y defensa de la Tesis Doctoral.

Terminado dicho acto y contestadas las objeciones formuladas por el Tribunal, éste le calificó APTO CUM LAUDE POR UNANIMIDAD

Granada 18 de Marzo de 1990

El Secretario del Tribunal.

EL PRESIDENTE.
[Signature]

Fdo.: S. Jorras

EL VOCAL.

[Signature]

Fdo.: J. Ocaña

EL VOCAL.

[Signature]

Fdo.: A. Toros

EL VOCAL.

[Signature]

Fdo.: Andrés Jorras

[Signature]

Fdo.: J. Barthe

Los trabajos de investigación que se exponen en la presente Memoria titulada "QUIMIOTERAPIA EXPERIMENTAL EN LEISHMANIOSIS CON COMPLEJOS METALICOS DE NUEVA SINTESIS", han sido realizados en el Laboratorio del Departamento de Parasitología de la Universidad de Granada, bajo la supervisión de la Doctora Dña Carmen Mascaró Lazcano y el Doctor D. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz.

Granada, Febrero de 1991

EL DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO

Fdo.: Profesor Doctor D. FRANCISCO MORILLAS MARQUEZ

A mis Padres
A Valentin
A mis Hijos

La realización del presente trabajo ha sido posible gracias a la dirección, ayuda y ánimo constantes recibidos por el prof. Dr. D. ANTONIO OSUNA.

Su amistad, consejo y estímulo han inculcado en mí una gran inquietud por la investigación.

Deseo expresar mi mas sincero agradecimiento:

- A la Profesora Dr^a Dñ^a M^a CARMEN MASCARO, amiga y compañera. Siempre me animó con sus consejos y simpatía.

- A mis compañeros y amigos D^a MARI NIEVES RODRIGUEZ, D. JUAN DIAZ y D. JAIME LAZUEN. Con su ayuda y ánimos, han hecho posible y llevadera la realización de esta Tesis.

- Al resto de mis compañeros del Departamento que me han ofrecido su amistad y ayuda desinteresada.

- Al Profesor Dr. D. CRACIUNESCU por su extraordinaria colaboración.

- A D^a MONIQUE BOY por su inapreciable labor en la parte de microcopía electrónica.

- A D. ANTONIO MESA y D^a PRESENTACION VALLE que han vivido paso a paso la realización de esta Tesis; su apoyo moral y humano ha sido constante durante todo este periodo.

- A D. VALENTIN MORALEDA por su comprensión, paciencia y extraordinaria ayuda durante la realización de todo mi trabajo.

INDICE

1. <u>INTRODUCCION</u>	2
1.1. EPIDEMIOLOGIA.....	5
1.2. BIOQUIMICA DEL PARASITO.....	6
1.2.1. Metabolismo energético.....	6
1.2.2. Acidos grasos y esteroleos.....	7
1.2.3. Nucleósidos de purinas y enzimas de nucleótidos.....	7
1.2.4. Superóxido dismutasa y hidrolasas ácidas.....	9
1.2.5. Polisacáridos.....	10
1.2.6. Poliaminas.....	10
1.3. QUIMIOTERAPIA DE LA LEISHMANIOSIS VISCERAL.....	11
1.3.1. Compuestos antimoniales.....	12
1.3.2. Diamidinas.....	15
1.3.3. Amfotericina B.....	18
1.3.4. Agentes terapeuticos experimentales.....	19
1.3.4.1. Pirazolipirimidinas.....	20
1.3.4.1.1. Alopurinol.....	20
1.3.4.1.2. Tiopurinol.....	22
1.3.4.1.3. Formicin B.....	23
1.3.4.2. 8-Aminoquinoleinas.....	25
1.3.4.3. Compuestos con otras actividades biológicas.....	28
1.3.4.3.1. Compuestos antibacterianos.....	28
1.3.4.3.2. Paramomicina, monomicina y compuestos relacionados.....	28
1.3.4.3.3. Compuestos antimaláricos.....	29
1.3.4.3.4. Emetina y comp. rel.....	29
1.3.4.3.5. Comp. antitripanosomicos.....	30
1.3.4.3.6. Comp. de diamidinas.....	30
1.3.4.3.7. Comp. antihelmínticos.....	30
1.3.4.3.8. Comp. antifúngicos.....	31
1.3.4.3.9. Otros agentes.....	32

1.3.4.4. Medicamentos encapsulados en liposomas.....	34
1.3.4.5. Complejos metálicos.....	35
2. MATERIAL Y METODOS.....	39
2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	40
2.1.1.El parásito: <u>Leishmania donovani</u>	40
2.1.2.Ciclo biológico.....	41
2.1.3.Morfología.....	43
2.1.4.Ultraestructura.....	44
2.1.5.Historia y procedencia de los parásitos.....	49
2.1.6.Mantenimiento de <u>L. donovani</u> por criopreservación.....	49
2.1.7.Cultivo "in vitro" de <u>L. donovani</u>	50
2.1.8.Historia y procedencia de los macrófagos J 774.....	51
2.1.9.Mantenimiento en nuestro laboratorio.....	52
2.2. COMPLEJOS METÁLICOS.....	53
2.3. METODOS.....	57
2.3.1.Estudio de la actividad leishmaicida "in vitro".....	57
2.3.2.Determinación de citotoxicidad mediante Cr ⁵¹	59
2.3.3.Estudio de la acción de los complejos metálicos sobre los niveles de incorporación de Timidina, Leucina y Uridina 3H.....	62
2.3.4.Microcopía electrónica de transmisión.....	64
2.3.4.1.Fijación.....	64
2.3.4.2.Lavado.....	65
2.3.4.3.Segunda fijación.....	65
2.3.4.4.Segundo lavado.....	65
2.3.4.5.Deshidratación.....	65
2.3.4.6.Inclusión en resina Spurr.....	66
2.3.4.7.Corte y tinción.....	66
2.3.5.Ensayos "in vivo".....	67
2.3.5.1.Estudio morfológico de los bazos.....	68
2.3.5.2.Determinación de la proporción de amastigotes por células nucleadas normales de bazo.....	68

2.3.5.3.Determinación del porcentaje de parasitación en bazo.....	68
2.3.5.4.Determinación de la viabilidad de los amastigotes por captación de aminocidos marcados.....	72
3.RESULTADOS.....	73
3.1.Estudio de la actividad leishmanicida "in vitro".....	75
3.2.Evaluación de la citotoxicidad sobre macrófagos J 774.....	88
3.3.Efecto sobre la incorporación de precursores radioactivos en formas promastigotes de <u>L.donovani</u>	96
3.4.Estudio ultraestructural de los parásitos tratados.....	120
3.5.Estudio de la actividad leishmanicida "in vivo".....	133
4.DISCUSION.....	137
4.1.ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LEISHMANICIDA "IN VITRO".....	139
4.1.1.Acción de los complejos neutros del cis-PtII.....	141
4.1.2.Acción de los complejos de Rh(I) y Rh(III).....	150
4.1.3.Acción de los complejos neutros de Ir(III).....	162
4.1.4.Acción de las sales metálicas.....	162
4.2.EFECTO CITOTOXICO.....	172
4.3.INFLUENCIA DE LOS COMPLEJOS METALICOS MAS ACTIVOS SOBRE LA BIOSINTESIS DE MACROMOLECULAS.....	174
4.4.ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LOS PARASITOS TRATADOS.....	203
4.5.ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LEISHMANICIDA "IN VIVO".....	205
5.CONCLUSIONES.....	210
6.BIBLIOGRAFIA.....	213

I. INTRODUCCION

1.- INTRODUCCION

Leishmania es un protozoo miembro del orden Kinetoplastida. Agente causal de las leishmaniosis humanas, enfermedades transmitidas por los mosquitos del género Phlebotomus y Lutzomia. Bajo el nombre de leishmaniosis se encuadran tres manifestaciones clínicas bien diferenciadas: la infección visceral generalizada o leishmaniosis visceral o Kala-azar; leishmaniosis cutánea localizada y la leishmaniosis mucocutánea con ulceración de la piel y desarrollo considerable de las membranas mucosas.

Aunque las leishmaniosis originan importantes problemas de salud pública, son insuficientes los esfuerzos que se están haciendo para combatirlas. La amplia diversidad tanto de las formas clínicas de dichas enfermedades como de las situaciones epidemiológicas obliga a aplicar en cada foco principios y métodos de lucha específicos. Además, la lucha contra las leishmaniosis suele estar obstaculizada por la ignorancia de la verdadera prevalencia de estas enfermedades y por la subestimación de los sufrimientos e incapacidades que causan en el hombre.

Centrándonos en la leishmaniosis visceral, enfermedad causada entre otras por L. donovani (objeto de nuestro estudio), L. infantum y L. chagasi, considerada esta última, recientemente como una Leishmania del Viejo mundo llevada a América por las migraciones humanas, puede ser endémica, esporádica o epidémica. Las manifestaciones clínicas suelen diferir según se trate de una u otra de estas tres situaciones.

a) Leishmaniosis visceral endémica. Afecta especialmente a los niños. En el área Mediterránea, Asia sudoriental, China y América Latina, el grupo de edad más afectado son los niños y adolescentes. La incidencia es dos veces mayor entre los hombres que entre las mujeres. El período de incubación oscila entre 10 días y más de un año, siendo gradual la manifestación de la enfermedad. Los síntomas más frecuentes son fiebre, malestar, pérdida de peso, anorexia y molestias en el hipocondrio izquierdo. La tos y la diarrea son comunes en algunos casos, no observándose en otros. Los signos clínicos habituales son marcada esplenomegalia indolora a la presión, hepatomegalia moderada y linfadenopatía, consunción y palidez de las membranas mucosas.

b) Leishmaniosis visceral esporádica. Las personas no nativas de cualquier edad que penetran en una zona endémica pueden contraer leishmaniosis visceral. La fiebre suele empezar en forma abrupta entre 3 semanas y 2 años después de la exposición. La enfermedad puede avanzar en forma aguda con escalofríos, fiebre alta ondulante, a menudo con dos máximos diarios, sudor copioso, rápida pérdida de peso y malestar profundo. Estos pacientes presentan con alguna probabilidad mayores complicaciones, como anemia hemolítica aguda grave, lesión renal aguda y hemorragia intensa de las mucosas.

c) Leishmaniosis visceral epidémica. Todas las edades son susceptibles, excepto los que hayan sido infectados en una epidemia anterior. En los hombres la infección es más frecuente que en las mujeres, en una proporción de 4:3. Siendo raras las formas agudas.

d) Enfermedad subclínica. Se trata de aquellos pacientes que no muestran la típica sintomatología de la enfermedad. Se estima que en algunos países (Italia, Kenya) los casos

subclínicos superan a los casos clínicos en una proporción de 5:1.

Badaro et al. (1986) en un estudio anual realizado en Bahía (zona endémica de Brasil), de 86 chicos identificados como seropositivos, 20 fueron asintomáticos y 15 desarrollaron el kala-azar clásico. De los 51 restantes, 13 (25%) desarrollaron un kala-azar clásico en un tiempo aproximado de 5 meses y en 38 (75%) la enfermedad curó en un tiempo medio de 35 meses. La enfermedad inicial en el grupo subclínico se caracterizó por hepatomegalia, a menudo esplenomegalia, tos intermitente, diarrea y bajos grados de fiebre. También fue común el malestar y la pérdida de peso. Los frotis teñidos con Giemsa y cultivos de aspirados de médula ósea fueron negativos para *Leishmania*.

Es importante destacar el hecho de que la leishmaniosis visceral es diagnosticada a menudo en enfermos inmunodeprimidos tales como enfermos de SIDA o en transplantados renales (Aguade et al. 1986).

Alvar et al. (1987) presentan la historia clínica de una mujer de 38 años adicta al la heroína a la que se le diagnostica leishmaniosis visceral y hepatitis crónica. Tras repetidos tratamientos que resultaron ineficaces se le desarrolló un cuadro de insuficiencia renal y posteriormente edema agudo de pulmón y muerte. Estudios serológicos retrospectivos para el virus HIV dieron positivos.

Un caso de leishmaniosis visceral en un enfermo de SIDA fué diagnosticado por la detección de *Leishmania* en médula ósea y un título de anticuerpos antileishmania de 1:2048. El tratamiento hubo de interrumpirse por la aparición de disnea, cardiomegalia y derrame pericardiaco que cesó 2 o 3 días después de cesar el medicamento. Después del tratamiento la

espienomegalia disminuyó y no se detectaron parásitos pero los títulos de anticuerpos aumentaron a 1:16.000 (Rizzi et al. 1988).

Por último es preciso hacer mención de la transmisión congénita de la enfermedad, acerca de lo cual no existe mucha información no estando muy clara la forma de transmisión de la leishmaniosis visceral. En los casos de infección congénita, el parásito fue probablemente transmitido via placenta "in utero". Sin embargo, también es posible que la infección ocurra en el momento del nacimiento o a través de la leche materna (Massip et al. 1986; Mittal et al. 1987).

1.1.- EPIDEMIOLOGIA

Excepto en la India, la leishmaniosis visceral es una zoonosis. En los focos africanos, los elementos conocidos de esta enfermedad son L. donovani, Phlebotomus orientalis, roedores y carnívoros. Los flebotómos y mamíferos reservorios son los huéspedes naturales que aseguran la supervivencia del parásito. El hombre es un huésped "accidental" que probablemente influye poco en el mantenimiento del ciclo biológico. En China, la cuenca del mediterráneo y en Brasil, los cánidos intervienen en la persistencia de los focos, con subespecies de L. donovani como agente infectivo. Los vectores en estos focos son Phlebotomus chinensis (Asia), P. ariasi, P. perniciosus y otras especies (cuenca del Mediterráneo) y Lutzomyia longipalpis (Brasil). Sin embargo, en el nordeste de la India, el kala-azar es una antroponosis. No hay indicios de huéspedes reservorios mamíferos aparte del hombre mismo. El parásito es también L. donovani, pero el vector es P. argentipes.

1.2.- BIOQUIMICA DEL PARASITO

Las investigaciones bioquímicas de las especies de Leishmania han sido limitadas. Los primeros trabajos datan de la década de los 40 con el trabajo de Chang (1948) y el de Fulton y Joyner (1949). Conocemos aspectos de la biosíntesis de macromoléculas, metabolismo energético y de nucleósidos con aspectos comunes y desiguales con otras células eucariotas. Se han revisado numerosos trabajos de investigación con la esperanza de encontrar rutas metabólicas o moléculas diferentes de las de las células del hospedador en Leishmania con el fin de lograr una quimioterapia específica de la enfermedad.

1.2.1.- Metabolismo energético

Se han encontrado todas las enzimas glicolíticas y del ciclo de los ácidos tricarbóxicos en ambos estados de Leishmania (promastigotes y amastigotes). Su respiración es sensible a CN y utiliza estas rutas para la producción de energía.

Krassner y Flory (1972) demuestran la existencia de la gluconeogénesis mediada por transaminasas, que convierten ciertos aminoácidos en intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Así hay tres puntos principales de entrada en este ciclo:

- 1.- Por Acetil CoA a través del Piruvato en el que se transforman aminoácidos como la Alanina y la Serina.
- 2.- Por α -Cetoglutarato a través del glutamato en el que se transforman aminoácidos como fenilalanina, isoleucina, valina, Leucina, tirosina y ornitina.
- 3.- Por oxalacetato en el que se transforman la glicina y el ácido aspártico.

Esta actividad parece mas que suficiente para el crecimiento de ciertas especies de Leishmanias en un medio libre de glucosa usando los aminoacidos como fuente de energía. Zilberstein y Dwyer (1984) encontraron sistemas de transporte eficientes para la glucosa y los aminoacidos en L. ionovani.

Otro punto de interés es la existencia de enzimas para la B- oxidación de ácidos grasos y la utilización de los mismos como substrato respiratorio con una actividad mucho mas alta en amastigotes que en promastigotes (Hart et al. 1981; Hart y Coombs 1982). Se piensa que la Leishmania puede encontrar unas condiciones naturales pobre en hexosas en el intestino del mosquito y abundante en ácidos grasos en el compartimento lisosomal de los macrófagos.

1.2.2.- Acidos grasos y esteroides

Se piensa en una posible implicación de los ácidos grasos en la inmunopatología de la leishmaniasis (Chang, et al. 1985). La presencia de ergosterol en Leishmania es la base bioquímica para la actividad anti-leishmania de la Anfotericina B y el Ketoconazol (Berman et al. 1984).

1.2.3.- Nucleósidos de purinas y enzimas de nucleótidos

Las especies de Leishmania no realizan la síntesis de Novo de purinas (Trager 1974). Esto supone la inclusión de un mínimo de nucleobases o nucleósidos en el medio de cultivo para el crecimiento de los promastigotes; sin embargo bajo estas condiciones es posible inducir la biosíntesis de Novo por mecanismos feedback (Henderson y Paterson 1973).

Marr et al. (1978) estudian el metabolismo de purinas en un medio libre de estas y demuestran que no hay síntesis de Novo cuando se utilizan precursores marcados radiactivamente tales como glicina, serina o formiato. Además, organismos puestos en un medio libre de purinas durante una semana no crecen, sin embargo el crecimiento se reemprende tan pronto como se añadía una purina. El mayor crecimiento se consigue con adenina e hypoxantina tanto para L. donovani como para L. braziliensis.

En este trabajo, se usaron bases púricas y nucleósidos marcados con objeto de seguir las rutas metabólicas de las púricas en las dos especies anteriores. Encontrándose que la adenina y la inosina son convertidos hasta un intermediario común, la hypoxantina, siendo transformado a continuación hasta nucleótidos. La adenina se transforma hasta hypoxantina por la enzima adenina aminohidrolasa y los productos fueron metabolizados y excretados al medio.

Las enzimas en la ruta alternativa han sido los objetivos principales para la nueva quimioterapia de la leishmaniosis usando análogos de nucleósidos tales como el Alopurinol y Formycin B. El modo preciso de la acción anti-leishmania de estos medicamentos presenta controversias (Robinson et al. 1984). Hay evidencias que sugieren la inhibición de la síntesis de proteínas por el mRNA que contiene formycin A en Leishmanias tratadas con formycin B (Nolan et al. 1984).

Dwyer y Gottlieb (1983) proponen que las enzimas desfosforilantes encontradas en la membrana plasmática pueden tener una función de reciclaje para la adquisición de nucleósidos necesarios para los parásitos.

Iovannisci et al. (1984) usando clones de mutantes de promastigotes de L. donovani identifican dos sistemas de transporte de membrana distintos para nucleósidos.

1.2.4.- Superoxido dismutasa y hidrolasas ácidas

La superóxido dismutasa descrita en *Leishmania* y otros parásitos relacionados contiene hierro y es insensible a la cianidina (Meshnick y Eaton 1981), tiene dos subunidades de 43 kDa cada una y su composición en aminoácidos es más similar a la enzima bacteriana que a la de las células de mamíferos (Trang et al. 1983). Esta enzima se piensa que protege a la *Leishmania* contra los metabolitos de oxígeno tóxicos producidos por los macrófagos y se presupone ser un objetivo ideal para la quimioterapia.

Las hidrolasas ácidas han sido ensayadas en numerosas especies de *Leishmania*. Steiger et al. (1979) detectan alta actividad de proteasas ácidas y alfa-D-manosidasa en promastigotes de L. donovani; otros enzimas lisosomales ensayados se encontraron que tenían muy baja actividad. Glew et al. (1982) confirmaron este dato y purificaron una fosfatasa ácida que tiene un peso molecular de alrededor de 170 kDa, un espectro de sustrato amplio y un pH óptimo de 5.

Coombs (1982) y Coombs y Baxter (1984) encontraron altas actividades de cistein-proteasas, especialmente en amastigotes de L. mexicana y actividad anti-leishmania de inhibidores como la antipaina y leupeptina cuando se añadía a macrófagos infectados.

En 1984 Pupkis y Coombs purificaron dos clases de proteasas de amastigotes, con pesos moleculares de 31 y 67 kDa; sólo la de mayor peso molecular fue encontrada en promastigotes.

1.2.5.- Polisacáridos

Decker-Jackson y Honigberg en 1978 y Greenblatt et al. en 1984 encontraron que los "factores excretados" o EF por *Leishmania* (Hernandez 1983) contenían moléculas de carbohidratos (peptidoglicanos) semejantes a los antígenos de los grupos sanguíneos humanos. Se ha propuesto una posible implicación de este antígeno semejante al del huésped en la inmunopatología de la leishmaniasis.

Turco et al. (1984) identifican en promastigotes de *L. donovani* una molécula de azúcar fosforilada de Man-PO₄-Gal, que puede estar repetida formando un carbohidrato complejo.

Dagger et al (1984) demuestran que la tunicamicina, un inhibidor de glicosiltransferasas para oligosacáridos unidos a N, es citotóxica para *L. braziliensis* e inhibía la incorporación de manosa.

Hay sin duda un aumento en el interés por los carbohidratos de *Leishmania* en vista del posible papel que juegan como señales en el reconocimiento celular, en el papel de los mismos como antígenos protectores específicos y en las modificaciones que dichos peptidoglicanos juegan en la relación parásito-hospedador (Mcneely et al. 1990; Tolson et al. 1990; Turco et al. 1990).

1.2.6.- Poliaminas

Las poliaminas están presentes, con muy pocas excepciones, en todas las células vivas tales como la putrescina, espermidina y espermina. Estas pequeñas moléculas catiónicas se

piensa que juegan papeles importantes en el crecimiento y diferenciación celular.

En promastigotes de *Leishmania*, Bachrach et al (1979) encontraron que los niveles de putrescina y espermidina son muy altos, mientras que la espermina es apenas detectable. El nivel de poliaminas y la razón putrescina-espermidina fluctua con las fases de crecimiento de las *Leishmanias*, como se encontró en otros organismos.

Durante la diferenciación de *L. donovani* desde amastigotes hasta promastigotes, se encontró que la espermina decrecía hasta un nivel despreciable, con el consiguiente aumento en los de putrescina y espermidina, y en sus enzimas biosintéticas, ornitina y S-adenosilmetionina descarboxilasa. (Morrow et al. 1980).

Algunos compuestos anti-tripanosomátidos afectan el nivel de poliaminas y la biosíntesis de ácidos nucleicos de *Leishmania* (Bachrach et al. 1979b).

1.3.-QUIMIOTERAPIA DE LA LEISHMANIOSIS VISCERAL

Una enfermedad tan difundida y grave como la leishmaniosis ha desafiado los esfuerzos de los investigadores en la búsqueda de una quimioterapia eficaz. No hay tratamiento satisfactorio para ninguna de las formas de leishmaniasis y las expectativas son escasas. Esto es debido en parte a la reciente aplicación de la bioquímica y la inmunología al problema de las enfermedades parasitarias en general y de la leishmaniosis en particular.

Los medicamentos que se utilizan en la actualidad para el tratamiento de la leishmaniosis visceral o kala-azar en el hombre son los siguientes:

- Compuestos antimoniales
- Diamidinas
- Amfotericina B

1.3.1.- Compuestos antimoniales

Los antimoniales fueron los primeros compuestos usados en el tratamiento de la leishmaniasis desde principios de siglo. En 1908 se encontró que el tártaro hemético presentaba cierta actividad contra los trypanosomas, y Vianna en 1912 fue el primero que lo uso con éxito en el tratamiento de la leishmaniosis visceral.

Los antimoniales trivalentes, tanto orgánicos como inorgánicos, fueron generalmente muy tóxicos y fueron dando paso a los compuestos pentavalentes hacia el año 1920. Los dos compuestos de uso común son el estibogluconato sódico (Pentostam®) y el antimonio de meglumina (Glucantime®), introducidos en el campo de la quimioterapia de la enfermedad en la década de los cuarenta, siendo los de elección para el tratamiento de la leishmaniosis debido a su gran eficacia y baja toxicidad. Estos dos medicamentos no se absorben por vía oral por lo que deben administrarse parenteralmente, por infusión intravenosa lenta o por inyección intramuscular durante un periodo de 10 días.

La primera preparación de estibogluconato sódico probada contenía solamente 20 mg Sb/ml (Sati 1942; Maegraith et al. 1947). La solución de Pentostam contiene 100 mg Sb/ml y la de Glucantime 85 mg Sb/ml. Chulay et al. (1988) estudiaron la farmacocinética de ambos medicamentos y comprobaron que era muy similar para ambos, con picos de concentración máximos de aproximadamente 10 mg/ml a las 2 horas de la dosis inicial.

La mayor parte del Sb se elimina rápidamente, sin embargo las concentraciones de Sb aumentan gradualmente durante el tratamiento, siendo de 0.04-0.08 mg/ml 24 horas después de la primera dosis y de 0.19-0.33 mg/ml 24 horas después de 30 dosis. El modelo farmacocinético propuesto por estos autores para los dos compuestos está representado por una fase de absorción inicial con una vida media de 0.85 h, una fase de eliminación rápida con una vida media de 2.02 h, y una fase de eliminación lenta con una vida media de 76 h. La fase de eliminación lenta se puede relacionar "in vivo" con la conversión del Sb pentavalente en Sb trivalente, lo cual puede explicar la toxicidad asociada con los tratamientos largos y/o las altas dosis.

En estudios hechos sobre hamsters Gellhorn et al. (1946) comprobaron que el estibogluconato sódico se concentra preferentemente en el bazo y no hay acumulación apreciable en hígado, riñón u otros órganos. Otto et al. (1947) aseguran que este medicamento no se acumula en los glóbulos rojos humanos.

Berman et al. (1988) tratan a hamster, sin infectar o infectados con L. donovani, con Pentostam y posteriormente miden los niveles de Sb en suero, hígado, bazo y piel observando que los niveles de Sb en piel una hora después de la administración son más altos que los de hígado o bazo. Sin embargo 8 horas después de haber dado el medicamento los niveles son comparables en los 3 órganos. Esto sugiere que en clínica se debe administrar la misma dosis

para la leishmaniosis visceral y la cutánea.

Chulay et al. (1985a) estudiaron la ultraestructura de amastigotes de L. donovani antes y durante el tratamiento de 6 pacientes con estibogluconato sódico, observando una reducción en el tamaño medio, gran irregularidad de los contornos celulares y un moderado incremento en la densidad electrónica del citoplasma asociado con una gran concentración de ribosomas. Estos efectos sugieren que el medicamento afecta las funciones del transporte activo o la permeabilidad de la membrana plasmática.

Los antimoniales pentavalentes parecen tener diversos modos de acción contra *Leishmania*. Según Berman et al. (1985) inhiben los nucleótidos trifosfato de las purinas y la síntesis macromolecular.

Gambarelli et al. (1987) estudiaron la sensibilidad *in vitro* de 10 cepas de *Leishmania* (6 de L. infantum, L. donovani, L. tropica, L. braziliensis guyanensis y L. mexicana) al Glucantime en cultivos celulares de macrófagos de ratón; comprobando que 3 de las cepas de L. infantum (1 humana y dos de perro, todas ellas habían respondido al tratamiento con el medicamento) presentaron muy buena sensibilidad "in vitro" con una $DL_{50} < 15 \mu\text{g/ml}$. Mientras que las otras tres cepas (una aislada del bazo de un niño con kala-azar y con resistencia al tratamiento con antimoniales y dos de perro) mostraron una sensibilidad muy reducida "in vivo" e "in vitro" con una $DL_{50} > 45 \mu\text{g/ml}$.

A pesar de que los compuestos derivados del Sb son muy usados en el tratamiento del kala-azar no están exentos de toxicidad, mostrándose esta fundamentalmente a nivel del riñón y corazón. Como efectos secundarios es frecuente que aparezca dolor abdominal, hipotensión

y disfunción hepática.

Veiga et al. (1985) hacen un estudio sobre 10 pacientes tratados con Glucantime y Pentostam observando un mal funcionamiento del riñón durante el tratamiento que se manifestó en una alta osmolaridad en la orina y un clearance negativo del agua libre.

Kennedy y Anderson (1983) hicieron un estudio con 35 hamsters golden infectados con L. donovani y tratados con estibogluconato sódico. Comprobaron que cuando aparecían cuerpos amiloides en orina durante el tratamiento ello progresaba invariablemente al fallo renal.

En India, 4 pacientes que no respondían al tratamiento con estibogluconato sódico se les administró el medicamento a una dosis elevada de 30 mg/Kg diariamente, repartido en 3 dosis. Los 4 pacientes murieron, 3 de ellos debido a fallo cardíaco. Se considera que las muertes fueron debidas a la cardiotoxicidad inducida por el medicamento a esta dosis tan alta (Thakur 1986).

1.3.2. Diamidinas

Las diamidinas aromáticas se emplean en clínica en el caso de que haya resistencia al tratamiento con antimoniales. Son muy efectivas en el tratamiento del kala-azar pero se consideran medicamentos de segunda elección debido a sus muchos y frecuentes efectos secundarios.

La pentamidina surgió a principios de los 40 como la diamidina mas segura (Steck 1974). Fue menos efectiva que la estilbamidina (Sen Gupta 1953) pero carecia de neurotoxicidad, por lo que es el único compuesto utilizado.

La pentamidina no se absorbe por vía oral. El medicamento se une fundamentalmente al hígado y riñón (Launoy et al. 1960) y se excreta lentamente, el 50% de la dosis inyectada comienza a eliminarse a los 5 días, una parte por la orina y otra parte por las heces. Se pueden detectar trazas en orina hasta 217 días despues de la adminstración y en el riñón hasta 240 días despues.

Clement y Raether (1985) ensayaron el efecto de 2 derivados N-hidroxilados de la pentamidina (diamidoxima y monoamidoxima) contra Trypanosoma brucei, T.vivax, T. rhodesiense, T. evansi y T. congolense, asi como contra Leishmania donovani y en todos los casos el efecto fué menor que el producido por la pentamidina.

Pradinaud et al. (1985) destacan los excelentes resultados terapeuticos obtenidos en el tratamiento de la leishmaniosis cutánea en la Guayana Francesa, utilizando bajas dosis y periodos cortos de tiempo.

Berman y Aikawa (1984), en experimentos "in vitro", trataron macrófagos de ratón infectados con Leishmania donovani con pentamidina encapsulada en membranas de glóbulos rojos ligadas a IgG (una media de 1.4 microgramos de pentamidina) dando lugar a una inhibicion de la multiplicación de los parásitos dentro de los macrófagos del 73%. Sin embargo se necesitaron 27 microgramos/ml de pentamidina sin encapsular para conseguir resultados similares. Un examen al microscopio electrónico 5 horas despues de la fagocitosis de las

membranas-IgG reveló que el 95% de los parásitos estaban pegados a las membranas de los globulos rojos en los fagolisosomas.

En 1986 Berman et al. repitieron la experiencia anterior pero "in vivo" con hamsters, inyectando la pentamidina contenida en membranas de glóbulos rojos ligadas a IgG por vía intracardiaca o intramuscular. Esta formulación eliminaba todos los parásitos del hígado a una dosis igual o superior a 1.5 mg de pentamidina/Kg de peso pero sólo eliminaba al 65% de los parásitos a 3.5 mg/Kg, esta fué la mayor dosis ensayada. Cuando se administró la pentamidina contenida en membranas de glóbulos rojos pero sin ligar a IgG la actividad mostrada fué 200 veces superior a la que muestra el estibogluconato sódico libre, eliminando casi todos los parásitos del hígado y un 80% de los parásitos esplénicos. La diferencia entre la eliminación de los parásitos del hígado y del bazo probablemente se debe a la mayor captación del medicamento por el hígado (11 a 14 $\mu\text{g/g}$ de tejido) que por el bazo (2 a 3 $\mu\text{g/g}$ de tejido). El uso de esta formulación contra la leishmaniosis visceral se puede considerar para el tratamiento en clínica.

En cuanto a la toxicidad de la Pentamidina podemos considerar 4 grupos de efectos tóxicos: inmediatos, acumulativos, los debidos a un dosis excesiva y los locales. Los efectos que siguen a la administración intravenosa son sensación de quemazón u hormigeo, dolor de cabeza, presión en el pecho, ansiedad, disnea, nauseas, vómitos, hipotensión, taquicardia y síncope (Hazarika 1949; Gasq y Lapeysonnie 1949; Sen Gupta 1953; Bryceson 1970).

Los efectos acumulativos que a menudo hacen preciso reducir la dosis o la frecuencia de la administración son debilidad, nauseas, vómitos y dolor abdominal que puede indicar daño pancreatico (Sen Gupta 1953; Bryceson 1970; Jha 1983a). Son muy marcados los efectos sobre

el metabolismo de los carbohidratos. Se han descrito casos de hipoglucemia posiblemente como resultado de un daño hepático hasta en un 6% de los pacientes (Waltzer et al. 1974) y esta puede llegar a ser irreversible y fatal (Manson-Bahr y Heisch 1956). También puede ocurrir hiperglucemia la cual puede conducir a diabetes (Bryceson 1968; Lichey et al. 1979; Jha y Sharma 1984; Neafs 1985). Los casos de pancreatitis aguda en tratamientos con pentamidina han sido descritos por Murphey y Josephs (1981).

Las dosis elevadas de Pentamidina en animales causan daño hepático, renal depresión cerebral (Wein 1943). En el lugar donde se pone la inyección intramuscular es común que aparezca una inflamación dolorosa que puede sangrar o supurar (Bryceson et al. 1985).

1.3.3. Amfotericina B

La amfotericina B es un antibiótico macrólido poliénico que actúa sobre los esteroides y fosfolípidos de las membranas celulares, efectivo contra ciertos hongos y Leishmania (Steck 1974).

Al igual que la Pentamidina es un medicamento de segunda elección debido a su toxicidad y requerimientos para la administración intravenosa, se usa en casos de tratamientos resistentes a los compuestos antimoniales. Es inestable a pH distinto al neutro y sensible al aire y a la luz. El 90% del medicamento inyectado se une a las proteínas plasmáticas. La vida media es de 24 horas y el medicamento se excreta lentamente por la orina.

La administración repetida de la amfotericina B por infusión intravenosa tiende a producir esclerosis lo cual obstaculiza el tratamiento. La mayoría de los pacientes experimentan

rigidez durante la infusión. Además un 25% de los pacientes desarrollan anomalías renales. El medicamento causa un defecto de permeabilidad en los túbulos distales que permiten la salida de potasio y se vuelven permeables a los iones hidrógeno, produciendo azotemia, acidosis y poliuria. Este defecto normalmente es reversible si la dosis administrada ha sido menos de 5 gramos (Burgess y Birchall 1972). La misma proporción de pacientes desarrollan anemia debido a una depresión de la médula ósea y hemólisis. Algunos pacientes presentan anorexia y profundo malestar.

Los efectos inmediatos asociados con la infusión del medicamento son náuseas, vómitos, escalofríos y fiebre.

La amfotericina B no se emplea en la leishmaniosis cutánea producida por L. trópica, L. major o L. mexicana. Weinrauch y El-On (1984) demostraron la ineficacia de este medicamento sobre ratones infectados con promastigotas de L. major o L. mexicana amazonensis.

1.3.4. Agentes terapéuticos experimentales

La lista de compuestos que han sido probados *in vitro* o *in vivo* como agentes terapéuticos de la leishmaniosis es muy larga.

En general, su efectividad ha sido limitada, o su toxicidad excesiva, o sus requerimientos para la administración molestos.

Podemos establecer 4 grandes grupos:

- Pirazolopirimidinas
- 8-aminoquinolinas
- Compuestos con otras actividades biológicas
- Medicamentos encapsulados en liposomas

1.3.4.1. Pirazolopirimidinas

Estos compuestos son análogos estructurales de las purinas en las que hay un cambio del nitrógeno desde la posición 7 del anillo de la purina hasta lo que sería la posición 8. Esta alteración convierte al compuesto en una pirazolo(3,4-d)pirimidina y ello altera bastante su metabolización. En este grupo de compuestos incluimos:

- Alopurinol
- Tiopurinol
- Formicin B

1.3.4.1.1. Alopurinol

Es el 4-hidroxipirazolo(3,4-d)pirimidina, un análogo estructural de la hipoxantina y fue introducido como un candidato dentro de los agentes antineoplásicos basándose en su parecido estructural con las purinas (Elion et al. 1963).

El alopurinol no tiene actividad antimetabólica pero actúa como sustrato de la xantina oxidasa siendo un inhibidor competitivo de la misma. Esta enzima convierte al alopurinol en oxipurinol (4,6-dihidroxipirazolo(3,4-d)pirimidina) el cual es un inhibidor más efectivo de la enzima que el sustrato (Spector 1977). A pesar de su parecido estructural, el alopurinol y su producto metabólico no se incorporan dentro de los ácidos nucleicos de los tejidos de mamíferos.

Frank et al. (1970) investigando actividades antitumorales de diversos compuestos, encontraron que el alopurinol inhibía el crecimiento de Crithidia fasciculata. Postularon que inhibía la conversión de ácido fólico a bipterina por inhibición de la xantina oxidasa o interfería en la biosíntesis de pirimidinas en el organismo. Una investigación posterior por Pfaller y Marr (1974) demuestra que el alopurinol era un efectivo agente antileishmanico contra L. braziliensis. La misma investigación demuestra que ni L. braziliensis ni C. fasciculata contienen xantina oxidasa por lo que se pone en duda el mecanismo de acción postulado por Frank et al. (1970).

El alopurinol se mostró muy efectivo contra promastigotes de L. donovani y L. mexicana. Así mismo el oxipurinol fue menos activo contra L. donovani e inactivo contra L. mexicana y L. braziliensis (Marr y Berens 1977). Además la actividad del alopurinol era reversible por adenina, inosina e hipoxantina. Estos tres compuestos representan el pool metabólico disponible de muchos organismos lo que llevó a estos investigadores a la hipótesis de que el alopurinol actuaba interrumpiendo el metabolismo de las purinas.

Este hallazgo inusual implica que el alopurinol y, quizás otras pirazolopirimidinas eran metabolizadas por estos hemoflagelados de una manera totalmente distinta a como lo hacen la mayoría de los organismos. En la misma investigación se demostró que el alopurinol podía inhibir la transformación de amastigotes hasta promastigotes lo que sugiere que el compuesto puede ser efectivo también contra las formas intracelulares de L. donovani.

Otro metabolito del alopurinol es el alopurinol ribonucleósido que fue más activo que el compuesto de partida sobre los promastigotes (Nelson et al. 1979) y amastigotes intracelulares (Berens et al. 1980). Su actividad contra las formas promastigotes fue leishmanistática más que leishmanicida.

El alopurinol ribonucleósido es convertido selectivamente hasta alopurinol ribonucleótido y 4-aminopirazolopirimidina ribonucleótido (Nelson et al. 1980; Krenitsky et al. 1980). Esta conversión metabólica no se ha visto en el hospedador. Al parecer estos metabolitos actúan como inhibidores de las enzimas que metabolizan las purinas afectando la función del RNA y reduciendo la síntesis de proteínas (Looker et al. 1983).

1.3.4.1.2. Tiopurinol

Recientemente se ha visto que los análogos tío del alopurinol y sus ribonucleósidos también son efectivos. La actividad del tiopurinol (4-tiopirazolo(3,4-d) pirimidina) y del tiopurinol ribonucleósido contra los promastigotes y los amastigotes intracelulares es similar a la serie de compuestos del alopurinol.

El metabolismo de este compuesto en el hombre, aunque está poco estudiado, parece ser análogo al del alopurinol, excepto que no se ha detectado el tiopurinol ribonucleósido (Grahame et al. 1974; Grahame et al. 1977).

El tiopurinol puede ser activado por la hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa hasta el ribonucleósido monofosfato y el ribonucleósido del tiopurinol también puede ser activado por una nucleósido fosfotransferasa hasta el mismo producto. No hay conversión posterior de este a ribonucleótidos de aminopirazolopirimidinas. Esto sugiere que hay diferencias en el metabolismo entre las tio- y las hidroxipirazolopirimidinas lo que supone un modo de acción diferente contra *Leishmania* (Marr et al. 1981).

El tratamiento de macrófagos de la línea celular P388D, infectados con *L. donovani*, reduce el número de amastigotes/célula, y los amastigotes que quedan no son viables (Marr et al. 1981).

1.3.4.1.3. Formicín B

Es una pirazolopirimidina en la que hay una inversión de los átomos de carbono y nitrógeno de las posiciones 8 y 9 del anillo imidazólico (7-hidroxi-3-B-D-ribofuranosil pirazolo(4,3-d)pirimidina).

Este compuesto es un análogo estructural de los nucleósidos C de la inosina que no es fosforilado ni desdoblado por las células de mamíferos (Umezawa et al. 1967; Sheen et al. 1968).

Parece ser que la toxicidad del formicin B es baja; en ratón la DL_{50} fue aproximadamente de 1000 mg/Kg administrados cada día durante 10 días (Muller et al. 1975).

Carson y Chang (1981) demuestran la actividad leishmanioestática del formicin B sobre promastigotes de L. donovani y L. mexicana y sobre amastigotes de L. mexicana en macrófagos de la línea celular J774 G8, a una concentración de 1 μ M. Cuando se aumentaba la concentración del compuesto 10 veces la inhibición del crecimiento de los amastigotes intracelulares aumentaba de un 50% a un 90% pero los macrófagos inhibían su crecimiento un 30% lo cual es indicativo de cierta toxicidad. El formicin B reducía el número de parásitos en el hígado de hamsters infectados con L. donovani, cuando se daba 10 mg del medicamento 4 veces al día durante 5 días.

Berman et al. (1983) consiguen una reducción de la parasitación en hígado de hamsters infectados con L. donovani del 85 al 90% después de haber administrado el formicin B por vía oral. La eficacia del compuesto por vía oral es de 4 a 8 veces mayor que por vía intramuscular y 4 veces superior al medicamento que se empleó como control positivo, el glucantime, también administrado por vía intramuscular. A las dosis empleadas (26 μ g/kg/día o 104 μ g/kg/día) no se manifestó toxicidad en médula ósea ni en los elementos formes de la sangre; la única toxicidad estadísticamente significativa en hígado fue un aumento en los niveles séricos de bilirrubina. Como consecuencia de la eficacia demostrada "in vivo" así como de su ligera toxicidad el formicin B podría emplearse como un agente oral contra la leishmaniosis visceral.

En el mecanismo de acción del formicin B se piensa que están implicadas las mismas enzimas específicas que metabolizan al alopurinol ribonucleósido. Carson y Chang (1981) incubaron formas promastigotes de *Leishmania* con formicin B y este era fosforilado hasta

formicin B monofosfato; sin embargo no detectaron formicin A monofosfato. El formicin B monofosfato inhibía a la succino-AMP sintetasa de el organismo pero no servía como sustrato.

Nelson et al. (1982) en estudios posteriores confirman que el formicin B es un agente antileishmania pero tambien demuestran que L. donovani convierte este compuesto en el ribonucleótido del formicin A. El RNA del parásito contenía una parte del formicin A en un enlace 3',5'-polinucleótido. Además estos investigadores encontraron que la succino-AMP sintetasa usaba el formicin B monofosfato como un sustrato alternativo. Esto indica que la ruta metabólica en el parásito es exactamente la misma que para el alopurinol ribonucleósido.

Hay una diferencia significativa entre el formicin B monofosfato y el alopurinol monofosfato, el primero es tambien un sustrato de la succino-AMP sintetasa de mamíferos y el segundo no. Por lo tanto puede haber formación de ribonucleótidos del formicin en células de mamíferos y ello puede justificar la inhibición del crecimiento en macrófagos descrito por Carson y Chang (1981).

1.3.4.2.- 8-Aminoquinoleinas

Mucha de la información sobre la actividad química y farmacológica de las 8-aminoquinoleinas se ha conseguido en estudios sobre malaria. Estos compuestos surgen a partir de la demostración de Ehrlich en 1981 sobre la cierta actividad plasmodicida que tenía el azul de metileno.

Steck et al. (1976) investigaron aproximadamente 800 compuestos con actividades antimalaricas, antibacterianas o con estructuras químicas peculiares, con objeto de encontrar compuestos con actividad antileishmania. Unicamente las 8-aminoquinoleinas se presentaron como una buena promesa para el tratamiento de la enfermedad.

Uno de los primeros estudios que demostraron la efectividad de las 8-aminoquinoleinas contra *Leishmania* fue realizado por Kinnamon et al. (1978). El compuesto WR6026 resultó ser entre 470-700 veces mas activo que el antimonio de meglumina al tratar un hamster infectado con *Leishmania* al tercer día de la infección. Si el hamster se trataba al día 17 de la infección el compuesto WR6026 era solo 160 veces mas efectivo que el antimonio de meglumina.

Chapman et al. (1979) trataron con WR 6026 perros infectados con *L. donovani* y consiguieron una reducción en el número de amastigotes hepáticos del 94% cuando el compuesto se administró por vía intramuscular a una dosis de 3.25 mg/kg por día durante 5 días.

La primaquina tiene muy poca actividad en infecciones experimentales con *L. donovani*. Las leishmaniosis cutáneas experimentales son menos sensibles a las 8-aminoquinoleinas que las leishmaniosis viscerales. Aunque la 2-metilprimaquina parece ser mas activa contra *L. major* que la primaquina.

Tambien sse ha observado actividad con las 6- y 7- aminoquinoleinas, aunque menor que con las 8-aminoquinoleinas (Hanson et al. 1977).

Johnson y Werbel (1983) ensayaron la actividad sobre L. donovani de ciertos compuestos análogos de las quinoleinas insertando diferentes grupos en el anillo y únicamente en el análogo 2-hidroxiopilo se observó un incremento de la actividad.

Cuando las 8-aminoquinoleinas se administran oralmente se absorben enseguida. Son metabolizadas muy rápidamente, sin embargo, sólo una pequeña proporción de la dosis administrada se excreta como tal. Las concentraciones plasmáticas máximas se dan alrededor de las 6 horas, y rápidamente disminuyen no detectándose nada a las 24 horas.

A las dosis terapéuticas ordinarias (la mayoría de las veces administradas a pacientes con malaria) la primaquina se ha mostrado relativamente inócua. Cuando el tratamiento es muy prolongado puede ocurrir dolor abdominal, anemia, cianosis y leucocitosis. En individuos deficientes en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa el medicamento puede inducir una reacción hemolítica grave.

Las 8-aminoquinoleinas aceleran la eliminación de hidrógeno del NADPH, glutatión reducido, la hemoglobina y los grupos sulfidrilos de las proteínas. En eritrocitos normales, el índice de regeneración del NADPH puede acelerarse aumentando la cantidad de glucosa metabolizada a través de la ruta de las pentosas fosfato. Por este mecanismo se dispone de NADPH suficiente para la reducción del glutatión oxidado y para la reducción de la metahemoglobina. Los eritrocitos de individuos deficientes en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa son incapaces de regenerar el NADPH suficientemente para compensar los efectos destructivos de los metabolitos oxidativos de las 8-aminoquinoleinas.

1.3.4.3.- Compuestos con otras actividades biológicas

Debido al alto interés que existe en la quimioterapia de Leishmania, se ha examinado la actividad frente a este parásito de muchos compuestos que se han usado en el hombre para el tratamiento de otras enfermedades.

1.3.4.3.1.- compuestos antibacterianos

Los compuestos antibacterianos presentaron poca o ninguna actividad "in vitro" a altas concentraciones. La actividad fué muy poca "in vivo". Cuando se administró trimetoprin junto con sulfadiazina a ratones infectados con L. major la actividad no aumentó con respecto a los medicamentos por separado (Neal 1972).

Sin embargo el efecto de la rifampicina en ratones infectados con L. mexicana amazonensis se potenció con la isoniazida y la amfotericina (Peters et al. 1981).

Raether et al. (1989) inocularon intravenosamente a hamsters (LAK:LVGKI) con L. donovani y despues estos fueron tratados oralmente con potentes fluoroquinolonas antibacterianas. Todas las fluoroquinolonas ensayadas indujeron una reducción significativa en el número de amastigotes hepáticos respecto a los lotes control.

1.3.4.3.2.- Paromomicina, monomicina y compuestos relacionados

Neal (1968) en ensayos "in vivo" comprobó la alta actividad de la paramomicina, hidroximicina y aminosidina sobre L. major. La neomicina, framisetina y kanamicina

fueron inactivas.

En estudios "in vitro" la paramomicina y monomicina presentaron una actividad moderada frente a amastigotes de L. major, y baja frente a amastigotes de L. mexicana. La kanamicina resultó inactiva para los amastigotes de L. major (Mattock y Peters 1975a).

Yusupov et al. (1981) ensayaron el efecto de la monomicina sola y de un complejo de monomicina más colágeno sobre promastigotes de una cepa virulenta de L. tropica en medio NNN. En ambos casos la actividad fue elevada. El colágeno solo inhibía el crecimiento de los parásitos probablemente debido al cambio de pH que inducía en el medio.

1.3.4.3.3.- Compuestos antimaláricos

Ciertos compuestos usados como antimaláricos han presentado actividad. Así Mattock y Peters (1975a) en ensayos in vitro con amastigotes de distintas especies de *Leishmania* observaron que compuestos como el cicloguanil, primetamina, mefloquina, mepacrina, cloroquina, quinina, clociguanil... presentaban una actividad alta o moderada.

1.3.4.3.4.- Emetina y compuestos relacionados

Al-khateeb y Molan (1981) afirman que la dehidroemetina tiene propiedades anti-L. donovani por reducir el peso del bazo y del hígado de hamsters infectados. Sin embargo, estos autores no correlacionan la reducción del peso de los órganos con el número de amastigotes.

También el cloruro de berberine inhibía "in vitro" el crecimiento de promastigotes de L. donovani alrededor del 50%. Así mismo cuando se incubó médula ósea de pacientes con ka-la-azar con el medicamento no se vieron promastigotes en el medio, y el compuesto inhibía la respiración endógena y la oxidación de glucosa. Los estudios de incorporación demostraron que el cloruro de berberine inhibía la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas.

1.3.4.3.5.- Compuestos antitripanosómicos

Ciertos compuestos antitripanosómicos, tales como el nifurtimox o la suramina, presentan alguna actividad antileishmanica (Mattock y Peters 1975a), esto es de esperar ya que el desarrollo intracelular de T. cruzi es similar al de Leishmania. Sin embargo no hay que olvidar los efectos tóxicos del nifurtimox.

1.3.4.3.6.- Compuestos de diamidinas

A pesar de la moderada actividad antileishmania demostrada por algunos de estos compuestos (Hanson et al. 1963) y 1977; Raether et al. 1978; Trotter et al. 1980) su aplicación se ve disminuida por su toxicidad.

1.3.4.3.7.- Compuestos antihelmínticos

No se han encontrado compuestos de este tipo con una actividad considerable sobre Leishmania (Mattock et al. 1975; Peters et al. 1980).

1.3.4.3.8.- Compuestos antifúngicos

Mattock y Peters (1975) en ensayos "in vitro" con amastigotes de L. mexicana encontraron que el Atrican presentaba actividad moderada, mientras que la 5-fluorocitosina era inactiva.

En ensayos "in vitro" con amastigotes de L. mexicana en macrófagos derivados de monocitos humanos el ketoconazol inhibía el crecimiento de los parásitos así como la biosíntesis de esteroides. El mecanismo de acción para el ketoconazol contra los promastigotes puede ser el postulado para Candida albicans: interferencia con la permeabilidad de la membrana secundaria a una pérdida de desmetil esteroides y acumulación de 14 alfa-metil esteroides (Berman et al. 1984).

Goad et al. (1985) encuentran que los esteroides del ketoconazol inhiben el crecimiento de los promastigotes de L. mexicana mexicana. Sus estudios demuestran que la bioquímica de los esteroides es muy parecida a la de los hongos, lo que hace aumentar el interés en los medicamentos antimicóticos como agentes quimioterapéuticos para las infecciones de Leishmania.

En Arabia Saudí y Venezuela se han empleado compuestos antifúngicos para el tratamiento de leishmaniosis cutáneas obteniéndose resultados positivos (El-Saalee et al. 1986; Kubba et al. 1986; Viallet et al. 1986; Borelli 1987).

Beach et al. (1988) cultivaron distintas cepas de *Leishmania* en presencia de ketoconazol, itraconazol y fluconazol. En general los 3 medicamentos inhibieron el crecimiento de las distintas especies y subespecies tratadas.

1.3.4.3.9.- Otros agentes

El metronidazol, trimetoprim mas sulfametoxazol, e isoniazida asociada a rifampicina se han usado para el tratamiento de leishmaniosis cutáneas con resultados opuestos.

El metronidazol no mostró una actividad experimental significativa. Fué bastante activo "in vitro" sobre amastigotes de *L. mexicana* pero a una concentración muy elevada, de 10000 $\mu\text{g/ml}$ (Mattock y Peters 1975).

Berman y Lee (1983) recogen la actividad "in vitro" de diversos agentes antileishmania administrados por vía oral sobre *L. tropica* en macrófagos humanos. El trimetoprim mas sulfametoxazol y la isoniazida mas rifampicina fueron inefectivos in vitro. El metronidazol solo eliminó el 30% de los parásitos.

Weinrauch y El-On (1984) inocularon ratones con promastigotes de *L. major* o *L. mexicana amazonensis*. Después de 40 (*L. major*) o 60 días (*L. mexicana*) se les administró rifampicina por vía oral y rifampicina asociada con amfotericina B inyectada intraperitonealmente, en ambos casos el tratamiento fué ineficaz.

Los tranquilizantes del tipo de las fenotiazinas también han presentado propiedades antileishmania "in vitro". La clorpromazina fue activa contra promastigotes y amastigotes intracelulares, mientras que la trifluoperazina y la butaperazina fueron activas "in vitro" contra promastigotes (Pearson et al. 1981).

Pearson et al. (1984) encontraron que la clorpromazina a una concentración superior o igual a 3.12 $\mu\text{g/ml}$ reducía la viabilidad de los promastigotes de L. donovani. En ensayos "in vivo" la concentración leishmanicida mínima dada a los hamsters infectados con L. donovani fue de 13.2 $\mu\text{g/ml}$, esta reducía el número de parásitos hepáticos un 64.2% y los parásitos esplénicos un 67.9%. Sin embargo esta dosis es unas 10 veces superior a la tolerada por los pacientes con tratamiento psiquiátrico lo que hace descartar su uso en el tratamiento de la leishmaniosis visceral.

En ensayos "in vitro" realizados por El-On et al. (1986) la clorpromazina fue efectiva contra promastigotes y amastigotes de L. mexicana, L. aethiopica y L. major. Cuando se administró la clorpromazina junto con el antimonio de meglumina, se observó un efecto sinérgico para promastigotes de L. donovani y amastigotes "in vitro" de L. major. Mientras que no hubo efecto significativo sobre amastigotes "in vivo" de L. major y L. mexicana.

El Berberine, un alcaloide extraído del Berberis aristata también se ha ensayado su acción frente a L. donovani (Ghosh et al. 1983 y 1985). Este compuesto a 1 $\mu\text{g/ml}$ inhibía el crecimiento de los promastigotes de L. donovani un 50% y a 5 $\mu\text{g/ml}$ la inhibición fue total. También inhibía la multiplicación de amastigotes "in vitro" y su transformación hasta promastigotes en cultivos libres de células. En cuanto a su mecanismo de acción al aparecer el berberine inhibe la respiración endógena así como la oxidación de glucosa. Y estudios de

incorporación demuestran que inhibe la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas.

1.3.4.4.- Medicamentos encapsulados en liposomas

Los liposomas se han presentado como una promesa de sistemas de transporte de medicamentos, después de la inyección intravenosa, siendo principalmente transportados desde la circulación hasta el hígado y bazo, por lo que sería un sistema ideal de liberación del medicamento para el tratamiento de parásitos en estos órganos, como por ejemplo el caso de la leishmaniosis visceral.

Usando ratones infectados con L. infantum, y administrando intravenosamente estibogluconato sódico encapsulado en liposomas, se encontró que el medicamento en liposomas era más activo que el medicamento libre. Black et al. (1977) indican que la actividad aumenta más de 200 veces. Mientras que New et al. (1978) encuentran un aumento de la actividad pero menor que la expresada por los autores anteriores.

El tratamiento de la leishmaniosis visceral también lo ha estudiado Alving y sus colaboradores. Usando hamsters infectados con L. donovani de la cepa Khartoum y liposomas conteniendo antimonio de meglumina inyectados intracardiamente, encontraron que el compuesto encapsulado era 300 veces más activo que el medicamento libre (Alving et al. 1978a).

Los liposomas solos no parecían mostrar toxicidad, pero las muertes debidas a la leishmaniosis eran más frecuentes que en los controles (Alving et al. 1978b). Se demostró que este efecto se debía a una infección bacteriana que acompañaba a la leishmaniosis visceral y se podía controlar mediante la administración de tetraciclina en el agua de bebida (Alving et al.

1980).

Es importante la vía de administración de los liposomas y la mayoría de los autores han empleado la vía intravenosa. Alving et al. (1980) hicieron un estudio comparativo y mostraron que la vía intraperitoneal y la intramuscular eran igualmente eficaces que la intracardiaca en hamsters infectados, sin embargo la vía subcutánea y la oral no eran efectivas.

La tecnología de los liposomas es también válida para medicamentos no antimoniales. Alving et al. (1980) encuentran que el compuesto WR 6026 encapsulado en liposomas es unas 1000 veces más activo que el antimonio de meglumina libre.

La eficacia de los liposomas contra las leishmaniasis cutáneas experimentales no está muy estudiada. Panosian et al. (1984) trataron ratones infectados con L. tropica con amfotericina B contenida en liposomas y no se observó un descenso significativo en el número de parásitos en los tejidos.

La actividad de la amfotericina B contenida en liposomas está afectada por cambios en la composición de estos (New et al. 1981).

1.3.4.4.- Complejos metálicos

Todos los complejos metálicos en base a los cuales se ha elaborado el presente trabajo han sido sintetizados por el Dr. D.G. Craciunescu con el propósito de encontrar un agente efectivo antitumoral.

Un paso fundamental en el desarrollo de los complejos de platino como agentes antitumorales está representado por la síntesis de complejos de platino II con 1,2-diaminociclohexano, entre los que han sido encontrados agentes realmente efectivos en varios experimentos de sistemas tumorales. Algunos de estos complejos han sido introducidos en ensayos clínicos y al parecer se prometen como agentes antitumorales.

El metabolismo de ciertos protozoos parásitos (*Trypanosoma*, *Leishmania*) presenta cierto parecido con el de las células tumorales (Brenner 1961; Riou 1967; Filardi et al. 1978) lo que ha llevado a numerosos investigadores a ensayar la acción de agentes antitumorales sobre determinadas especies de *Trypanosoma* y/o *Leishmania* (Osuna et al. 1983; Ruiz-Perez et al. 1986; Mesa-Valle et al. 1989).

Según Farrell et al. (1983) algunos complejos del Pt (II) de simetría molecular "cis" desplegaban un intenso efecto antitripanosómico frente a las ratas infectadas con *Trypanosoma rhodesiense*.

Parece que la idea de buscar nuevos agentes antitripanosómicos entre los complejos metálicos de comprobada acción antitumoral puede llevar a interesantes observaciones no solo de las interacciones ADNk sino también hacia el diseño de medicamentos de baja toxicidad renal y/o hepática, y de elevada acción frente a las infecciones producidas por distintos protozoos tales como *T. cruzi* o *L. donovani*.

Craciunescu et al. (1986) estudiaron la actividad antitumoral y/o antitripanosómica de 2 series de complejos del Pt (II): $\text{cis-Pt(L)}_2\text{Br}_2$ donde L = Derivado de Tiazol y/o sulfonamida; cis-Pt(L)(X)_n donde $n = 1$ ó 2 , L = 1,2-diaminociclohexano y X = Anión mono o bidentado de

ácidos orgánicos. Estos últimos fueron mas activos que los de la serie cis-Pt(L)Br_2 , y estos fueron mas activos cuando L = derivado de tiazol que en el caso de que fuera un derivado de sulfonamida (tanto frente a la infección producida por T. brucei brucei como por T. congolense).

Estudios sobre los complejos con estructura: $\text{Rh}^{\text{III}}(\text{L})_3$, demostraron que había una relación bien definida entre la actividad antitumoral y la actividad antitripanosómica. Cuanto mas potente actúa un complejo de este tipo sobre los tumores, mas fuerte actuaría como agente antitripanosómico. Además la línea de infección parasitaria T. brucei brucei es mas sensible a la actuación de estos complejos, respecto a la línea de infección parasitaria T. congolense (Craciunescu et al. 1987).

Otros complejos de Os (III) y Ru (III) con estructura similar a los anteriores se sintetizaron y estudiaron sus actividades antitumorales y antitripanosómicas, así como su nefrotoxicidad, por Craciunescu et al. (1988). Los complejos de Os son mucho mas activos que los complejos de Ru en las tres líneas de infecciones parasitarias ensayadas (T. brucei brucei, T. congolense y T. cruzi). T. brucei brucei es el mas sensible frente a los dos tipos de complejos mientras que T. congolense es el mas resistente. Por último los complejos con ligandos ditiocarbamatos son mas activos frente a los 3 parásitos que los complejos donde los ligandos son derivados de xantatos.

Craciunescu et al. (1989) realizan un estudio de las actividades antiparasitarias "in vivo"/"in vitro" frente a las cepas de Tripanosomas americanos y Tripanosomas africanos (T. cruzi, T. gambiense, T. venezueliense) desplegadas por complejos catiónicos del Rh (III), de estructura $[\text{Rh}(\text{L})_4 \text{Cl}_2]^+ \text{Cl}^-$, donde L = derivado de tiazol y/o derivado de benzotiazol. Llegan a la conclusión que los tripanosomas africanos son mas resistentes al tratamiento con este tipo

de complejos que T. cruzi.

En la actualidad en nuestro laboratorio así como en Venezuela, Inglaterra y Estados Unidos se está investigando la acción de numerosos complejos metálicos de nueva síntesis sobre diversos protozoos parásitos con la esperanza de encontrar un agente quimioterápico eficaz y poco tóxico frente a enfermedades como el kala-azar, muy extendida y sin un tratamiento satisfactorio.

II. MATERIAL Y METODOS

2.- MATERIAL Y METODOS

2.1.-MATERIAL BIOLÓGICO

2.1.1. El parásito: Leishmania donovani

Leishmania donovani es un protozoo perteneciente al Orden Kinetoplástida, familia Trypanosomatidae. Responsable de la leishmaniosis visceral o kala-azar, enfermedad muy extendida en ciertas zonas tropicales y subtropicales de América, África, India, Asia Oriental y Central; la cuenca mediterránea y algunas zonas rurales europeas próximas.

Fue Cunningham (1885) quien primero vio amastigotes de *Leishmania* en cortes microscópicos de lesiones cutáneas de pacientes indios y pensó que posiblemente se trataba de un miembro de Mycetozoa. Borovsky (1898) estudiando lesiones cutáneas similares en Turkenistan fue el primero en reconocer la naturaleza protozoológica del organismo, sin embargo no intentó identificarlo más ampliamente.

Leishman (1903) descubrió cuerpos intracelulares en las vísceras de casos fatales de Kala-azar en la India, con mucha intuición reconoció que morfológicamente se parecían a los trypanosomas. En el mismo año Donovan (1903) hizo observaciones similares. Hacia 1900 se diagnosticaron los primeros casos de leishmaniosis visceral en China confirmada por Marchand y Ledingham en 1904. Laveran y Mesnil (1903) pensaron que el parásito asociado con el Kala-azar indio era un piroplasma y lo nombraron Piroplasma donovani, un nombre que fue corregido rápidamente por Ross en 1903 a Leishmania donovani.

2.1.2.- Ciclo biológico

El ciclo de vida de Leishmania donovani consta de dos etapas claramente diferenciadas: una en el hospedador intermediario y vector, y otra en el mamífero que actúa como reservorio.

El mosquito que actúa como vector en la transmisión de la leishmaniosis ya sea cutánea o visceral pertenece a los géneros Phlebotomus o Lutzomya, variando las especies según la localización geográfica y la especie de Leishmania transmitida. Así tenemos que para L. donovani el género siempre es Phlebotomus y las especies pueden ser:

Phlebotomus chinensis: en China.

P. martini: en Kenia.

P. orientalis: en Sudan.

P. argentipes: en India.

P. ariasi: en Francia.

P. perniciosus: en Malta, Marruecos y Argelia.

El Phlebotomus succiona sangre de un hospedador mamífero infectado y con ella ingiere macrófagos cargados con las formas amastigotas del parásito. A continuación ocurre la ruptura de estos macrófagos y la consiguiente liberación de los amastigotes en el principio del intestino del mosquito, donde se multiplican y transforman hasta formas promastigotes, las cuales se reproducen y colonizan el intestino medio y posterior; algunos se pegan a la pared intestinal embebiendo su flagelo en las microvellosidades de las células epiteliales intestinales o bien ensanchan su flagelo y se unen a la cutícula de la pared intestinal del píloro o íleon por medio de hemidesmosomas (Killick-Kendrick et al. 1974; Molyneux et al. 1975). Los promastigotes se mueven hacia adelante hasta la mitad del tórax como haptomonadas con el

flagelo ensanchado y pegados a la cutícula de la pared intestinal llegan hasta la válvula estomacal, faringe y cavidad bucal. Los promastigotes móviles que se encuentran en la boca del mosquito son liberados cuando este pica a un hospedador mamífero.

A continuación ocurre una adhesión y englobamiento por fagocitosis de los promastigotes por los macrófagos. Después hay una fusión del fagosoma que contiene al promastigote con el lisosoma del macrófago; y en el interior de este fagolisosoma ocurre la transformación del promastigote hasta amastigote. Posteriormente ocurre la multiplicación del amastigote y la formación de vacuolas parasitóforas que envuelven a cada amastigote. Finalmente la célula estalla liberando los parásitos que nuevamente son capturados por otros macrófagos.

La duración precisa de la existencia de los promastigotes inoculados por el mosquito en el medio extracelular del lugar de la picadura es desconocida, pero puede depender de la proporción de macrófagos que migran al lugar de la picadura.

Según Adler y Ber (1941) hay evidencias de que no todos los promastigotes pueden ser capaces de iniciar una infección tras la picadura del mosquito. Algunos pueden ser destruidos tras la captación por los macrófagos.

Killick-Kendrick et al. (1977) piensan que no todos los parásitos que hay en el mosquito son infectivos. Puede que una proporción de promastigotes en el inóculo no sea viable e incapaz por tanto de infectar al hospedador mamífero.

2.1.3.- Morfología

Según lo referido anteriormente podemos deducir que Leishmania donovani es un protozoo flagelado que, dependiendo del tipo de hospedador y su localización puede presentar una u otra Morfología.

Cada una de las formas adoptadas por este parásito tiene sus propias peculiaridades que en resumen son:

A.-AMASTIGOTES

Es la forma como se encuentran en el interior de los macrófagos del hospedador mamífero, rodeados por la vacuola parasitófora. Son redondeados y libres de flagelo. El núcleo ocupa una posición central en la célula y el kinetoplasto se encuentra adyacente a él. El núcleo es redondeado u oval y tiene un diámetro aproximado de 1 a 1.2 μm . El kinetoplasto también puede ser redondeado u oval y en tinciones aparece más teñido que el núcleo; sus dimensiones son de 0.5 a 0.8 μm de longitud y 0.4 a 0.6 de diámetro.

El tamaño de las formas amastigotes de *Leishmania* varía según la especie de que se trate, en general va de 4 a 5 μm (Muniz y Medina 1948; Gardener et al. 1977).

B.-PROMASTIGOTES

El promastigote es la forma típica de *leishmania* hallada en el intestino medio del mosquito. Killick-Kendrick et al. (1974) apuntan que en algunas especies de *Leishmania* se distinguen dos formas de promastigotes:

-Promastigotes nectomónadas que se unen a la pared intestinal del mosquito insertando su largo flagelo entre las microvellosidades intestinales. Estas formas miden unas 12 μm de longitud. Tienen un kinetoplasto a poca distancia del extremo anterior de donde emerge el flagelo cuya longitud es aproximadamente la misma que el cuerpo, aunque puede llegar hasta 20 μm . El núcleo se encuentra en el centro del cuerpo del parásito. Estas formas al microscopio electrónico son muy electrodensas debido a su gran contenido en ribosomas.

-Promastigotes haptomonadas: Menos electrodensos, mas cortos y mas gruesos que los nectomónadas, estos promastigotes se unen a la cutícula que recubre la valva estomacal modificando su flagelo. Su longitud puede ser alrededor de 5 μm . El kinetoplasto esta en el extremo anterior y el flagelo mide por encima de 15 μm .

C.-PARAMASTIGOTES

Killick-Kendrick en 1979 asegura haber encontrado una forma del parásito en el mosquito cuya forma no coincide con la configuración clásica de promastigote. El kinetoplasto no esta situado anterior al núcleo, sin embargo el flagelo si emerge del extremo anterior. La bolsa flagelar se encuentra muy profunda y el kinetoplasto esta al lado del núcleo.

2.1.4.- Ultraestructura

Al microscopio electrónico las principales estructuras que apreciamos son:

A.- MEMBRANA PLASMÁTICA Y ORGANOS ASOCIADOS

La membrana plasmática de *Leishmania* es una unidad de membrana típica, trilaminar, con una anchura de 2-4 nm. Debajo se sitúa una película de microtúbulos con un diámetro externo de 20 a 22 nm y separados entre si unos 35 a 42 nm. Estos túbulos están en un área

cortical libre de ribosomas. La ausencia de ribosomas sugiere que el área que rodea a los microtúbulos es funcionalmente una parte integral de el órgano completo (Vickerman y Preston 1976). Probablemente los microtúbulos sirvan como un citoesqueleto. Molyneux et al. (1975) observan que no existe conexión entre ellos y la membrana plasmática, Así como la dificultad de romper el ordenamiento de los microtúbulos.

Así mismo parecen demostrar que las formas nectomonadas de promastigotes poseen menos microtúbulos que las haptomonadas.

La estructura uniforme de la membrana plasmática y la película subyacente de microtúbulos se modifica en los promastigotes en el punto de salida del flagelo desde el reservorio flagelar. La membrana del reservorio flagelar no está forrada con microtúbulos.

Se han observado desmosomas cuando la membrana plasmática del flagelo corre paralela a la del reservorio entre el cuerpo del parásito y el flagelo, cuya función parece ser la de mantener la integridad del flagelo y el cuerpo del parásito como una unidad móvil.

Próxima a la membrana plasmática de el reservorio de promastigotes se sitúa una vacuola o pulsátil. Aparece como una vacuola limitada por una membrana contigua con el retículo endoplásmico liso, su función no es muy conocida en flagelados patógenos y no se sabe si no es otra que la osmoregulatoria.

B.- FLAGELO Y KINETOSOMA

La estructura axonemal característica del flagelo en promastigotes de *Leishmania* consta de nueve pares de coletes axonemales periféricos que rodean a un par central. Esta

disposición se observa distal al kinetosoma y el doblete central surge de la primera placa basal.

Alexander (1978) encuentra que en los amastigotes de L. mexicana mexicana, L. enriettii y L. major hay una disposición diferente del axonema desapareciendo la configuración 9+2. Esto es en parte debido a la reducción flagelar observada en amastigotes. En amastigotes de L. m. mexicana, los microtúbulos centrales están presentes sólo para una distancia limitada y uno o dos de los dobletes exteriores colapsan el centro del axonema. Este proceso precede la reducción del flagelo. Alexander sugiere que, en amastigotes, la ausencia de 2 tubulos centrales (singletes) es porque su papel en células móviles es determinar la dirección flagelar y no tiene sentido en células no móviles.

Los promastigotes con un largo flagelo tienen un bastoncillo paraxial, es una estructura paracristalina, situada paralelamente al axonema. Esta formado por dobletes 4-7. Su estructura es similar a la de los tripanosomas.

C.- KINETOPLASTO. ESTRUCTURA MITOCONDRIAL

El kinetoplasto es un órgano característico del orden Ki. toplastida; se sitúa posteriormente al kinetosoma, entre el núcleo y el flagelo, unido al aparato mitocondrial por sus bordes. Las crestas mitocondriales se pueden observar en la parte superior del kinetoplasto.

Es un disco arqueado que contiene gran cantidad de DNA, de un 20 a un 25 % del total del DNA celular. Compuesto en su mayor parte por moléculas minicirculares de DNA de 0.45 micrómetros de perímetro, con forma de "8" y dispuestos paralelamente dando sensación de doble hilera. Se calcula que hay $2 \cdot 10^4$ minicírculos/kinetoplasto (Barker, 1980). También hay algunas moléculas maxicirculares de 10 micrómetros de perímetro, Así como cadenas

lineales de distinto tamaño (Leon et al. 1980).

La transformación amastigote-promastigote está asociada con un aumento en el número de cristales mitocondriales por sección. Brun y Krassner (1976) presentan un descenso significativo en el volumen mitocondrial relativo durante la transformación pero el tamaño absoluto del parásito aumentó. Alrededor de 5 horas después de que haya comenzado la transformación hasta promastigote ocurre un gran ensanchamiento mitocondrial.

D.- NUCLEO

La ultraestructura del núcleo para todas las formas de *Leishmania* es similar a la de otros organismos eucariotas.

El núcleo está rodeado por una doble membrana nuclear de 7nm de grosor. Posee un nucleolo prominente situado centralmente, con un diámetro de 0.6 a 1 μ m. La cromatina se sitúa periféricamente. El nucleolo y la cromatina periférica son de una densidad similar al nucleoplasma siendo más electrodensos pero conteniendo pequeños acúmulos de gránulos. La membrana externa es continua con el retículo endoplásmico.

Al igual que ocurre con otros kinetoplastidos, las membranas nucleares quedan intactas durante la división. El núcleo dividiéndose presenta menos cromatina periférica que la célula no dividiéndose.

E.- ESTRUCTURAS CITOPLASMICAS

Estudios ultraestructurales de *Leishmania* revelan la presencia dentro del citoplasma de orgánulos asociados a membrana tales como:

-Retículo endoplásmico

-Aparato de Golgi

El retículo endoplásmico tanto liso como rugoso se encuentra a lo largo del citoplasma, particularmente rodeando al núcleo.

El aparato de Golgi se encuentra próximo al reservorio y al Kinetoplasto. Los productos de Golgi están empaquetados como lisosomas y juegan un papel en la digestión intracelular, pero la proximidad del aparato de Golgi al reservorio y la observación de varias hidrolasas en el reservorio de otros trypanosomátidos indica que la digestión extracelular puede ocurrir en el bolsa flagelar. (Preston, 1969).

Los lisosomas de *Leishmania* han sido poco estudiados y las se han hecho deducciones por comparación con lo que se conoce sobre su papel en otros kinetoplastidos. Así se relacionan, primero, con el mecanismo de digestión de macromoléculas ingeridas y su presunta fusión con lisosomas primarios derivados del aparato de Golgi y, segundo, con la exocitosis de cuerpos multivesiculados en la bolsa flagelar donde se detectan restos celulares y actividad citoquímica. Una tercera función de los lisosomas en Kinetoplastidos sugerida por Vickerman y Preston (1976), es la de controlar el reciclaje de las organelas por medio de la fusión de los lisosomas primarios con orgánulos o estructuras del interior del parásito para formar autofagosomas.

Molineux et al. (1975) y Kanan (1975) encuentran en el citoplasma tanto de amastigotes como de promastigotes inclusiones de cuerpos lipídicos no rodeados de membrana y con un diámetro de 0.5 μm .

Otras estructuras que se han encontrado en el citoplasma de *Leishmania* son los peroxisomas que contienen enzimas oxidativas y juegan un papel importante en el metabolismo oxidativo de la célula.

2.1.5.- Historia y procedencia de los parásitos utilizados

La cepa de *Leishmania donovani* empleada en nuestras experiencias ha sido la LCR-L133 (*Leishmania Reference Center*, Jerusalen). Procede de un caso humano de Kala-azar, aislado en 1967 en la localidad de Begemder (Etiopia), siendo mantenida en nuestro laboratorio desde 1985 como promastigotes mediante pases quincenales en medio NNN, en incubación a 28 °C.

2.1.6.- Mantenimiento de *Leishmania donovani* por criopreservacion

Se seleccionan los cultivos "in vitro" con mayor concentración de parásitos. Estos se transfieren a frascos "Steriline" de fondo cónico y se centrifugan a 1.500 g durante 10 minutos en una centrífuga ALC modelo 4226. El pellet se resuspende en medio de cultivo nuevo con un 10% de glicerol y la suspensión de parásitos se vierte en viales de congelación (Nalgene Cryoware). Seguidamente se someten a un enfriamiento progresivo: 2 horas a 4 °C, 2 horas a -20 °C y finalmente llevados a un arcón congelador KOXKA, regulado a -80 °C. Pudiendo transferirse a Nitrógeno líquido siendo así mantenidos a -170°C.

La descongelación se realiza introduciendo los viales en un baño termoregulado a 37 °C.

La suspensión de parásitos es retirada del vial y vertida en frascos "steriline" de fondo cónico, donde se añade 2 veces su volumen de solución de Hanks. Tras centrifugar la suspensión a 1.500 g durante 10 minutos, para retirar el medio con glicerol, se resuspende el botón en el medio de cultivo adecuado.

2.1.7.- Cultivo "in vitro" de Leishmania donovani

Para la realización de los ensayos descritos en la presente memoria se emplearon formas promastigotes de L. donovani obtenidas a partir de un medio de cultivo bifásico y resembrados en un medio de cultivo monofásico como a continuación se detalla.

- Medio de cultivo bifásico

Este medio posee como fase sólida el medio NNN (denominado Así atendiendo a las iniciales de sus autores: Nicolle, Novy, McNeal) y como fase líquida el medio MEM (Minimal Essential Medium) de la casa GIBCO, enriquecido con un 20% de SBF1 (v/v).

El medio NNN está constituido por agar nutritivo, tripticasa, cloruro sódico y sangre fresca e inactivada. Los componentes de este medio, a excepción de la sangre, son disueltos en agua bidestilada y esterilizados al autoclave durante 20 minutos a 120 °C. Tras la esterilización, el frasco que contiene el medio se lleva a un baño de maría termoregulado a 45 °C, donde se deja enfriar hasta alcanzar dicha temperatura por espacio de 2 horas como máximo.

La inactivación de la sangre se realiza en un baño a 56 °C durante 30 minutos, se mezcla con la solución de los demás componentes del medio NNN, que se encuentran a 45 °C en el baño maría, repartiéndose en los frascos de cultivo, los cuales posteriormente son incubados a 37 °C durante 48 horas, para comprobar su esterilidad. Confirmada la ausencia de contaminación se guarda a 4 °C hasta el momento de su utilización.

La fase líquida del medio, como anteriormente se ha expuesto, la constituyen el medio MEM, enriquecido con un 20% de SBFI (v/v).

- Medio de cultivo monofásico

A los 7 días de cultivo en el medio bifásico, las formas promastigotes se encuentran en plena fase exponencial de crecimiento.

En este momento, ajustamos el número de parásitos en 500.000 parásitos/ml en un volumen determinado, cultivándolos en medio monofásico 199 de la casa GIBCO suplementado con un 30% de SBFI.

2.1.8.- Historia y procedencia de los macrófagos J-774

La línea de macrófagos utilizada para la realización de la presente tesis ha sido la J-774, obtenida a partir de un tumor que apareció en un ratón hembra BALB/c en 1968. Esta línea celular es capaz de sintetizar gran cantidad de lisozima presentando una fagocitosis anticuerpo-dependiente.

2.1.9.- Mantenimiento en nuestro laboratorio

Los macrófagos J-774 Así como otras líneas celulares que se mantienen en nuestro laboratorio son conservados bien por criopreservación a -85°C o -170°C o por subcultivos sucesivos.

a) Criopreservación

Este método de mantenimiento parte de los cultivos en monocapa cultivados en frascos ROUX (Nunc).

Una vez despegada la monocapa se les añade medio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con un 10% de SBFI (v/v) y un 10% de dimetil sulfóxido para que la concentración final sea de 10^5 - 10^6 células/ml.

Esta suspensión celular es pasada a viales de congelación (Nalgene Cryoware). Los viales son sometidos a un proceso de congelación progresivo hasta -80°C .

Cuando se necesiten utilizar estas células de nuevo, basta con descongelarlas rápidamente, para evitar recristalizaciones intracelulares que dañarían las células, sumergiendo los viales en un baño maría termorregulado a 37°C .

Tras la descongelación de los viales, y en un ambiente estéril, la suspensión celular contenida en los mismos se pasa a frascos "steriline" de fondo cónico, centrifugando a 636 g durante 10 minutos, Después de haber añadido el doble de su volumen en medio RPMI 1640, enriquecido con un 10% de SBFI.

El sobrenadante obtenido, Después de esta centrifugación, es desechado, volviéndose a resuspender el botón celular en medio RPMI 1640. Esta nueva suspensión celular se vierte sobre frascos ROUX (NUNC) de 25 cm² de superficie, que son llevados a un incubador automático de en una atmósfera húmeda enriquecida con el 5% de CO₂ (ASSAB), regulado a 37 °C.

Aproximadamente a las 6 horas de cultivo, las células comienzan a adherirse al frasco y multiplicarse hasta formar una monocapa.

b) Cultivos de macrófagos J-774

El medio empleado para el cultivo es el medio RPMI 1640 con L- glutamina enriquecido con un 10% de SBFI (v/v). El pH del medio se ajusta a 7.2 y se estabiliza con Hepes 1M. Para evitar las posibles contaminaciones bacterianas o por micoplasmas, se añadió 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina, 50 µg/ml de kanamicina y 100 UI/ml de penicilina G sódica.

El cultivo se inicia inoculando en frascos ROUX (NUNC), de 25 cm² de superficie 1 ml de una suspensión de células y añadiendo 5 ml del medio de cultivo. Siendo preciso realizar subcultivos cada vez que se forme una monocapa sobre la superficie del frasco.

2.2.- COMPLEJOS METÁLICOS

En la presente tesis se han ensayado 81 complejos metálicos de nueva síntesis. La síntesis ha sido realizada en el departamento de química inorgánica y analítica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid por el Dr. Dan Craciunescu.

Los compuestos probados responden a las siguientes estructuras generales:

- A) cis-Pt^{II} (L) (X)_n
- B) Rh^I (CO)₂ (Cl) (L)
- C) [Rh^{III} (X)_n X₂]⁺ X⁻
- D) Rh^{III} (L)₃
- E) Ir^{III} (L)₃
- F) [Pt^{IV} X₆] H₂ (L) o [Pt^{II} X₄] H₂ (L)
- G) [Os^{IV} Cl₆] H₂ (L)_n
- H) [Pd^{II} Cl₄] H₂ (L)_n
- I) [Au^{III} Cl₄] H (L)
- J) [Ir^{IV} X₆] H₂ (L)

Dentro de la serie A tenemos los siguientes complejos metálicos:

- cis-Pt (DDH) (Naranja de metilo) (NO₃)
- cis-Pt (DDH) (N-acetil-metionina)
- cis-Pt (DDH) (N-acetil-Leucina)
- cis-Pt (DDH) (Acido 6-nitroftálico)
- cis-Pt (DDH) (Acido nitroorótico)
- cis-Pt (DDH) (Rojo de metilo) (NO₃)
- cis-Pt (DDH) (Acido 1,2-bencenodisulfónico)
- cis-Pt (DDH) (Acido 2,5-dihidroxibencenodisulfónico)₂
- cis-Pt (DDH) (Amarillo de Alizarina)
- cis-Pt (DDH) (Amarillo de Alizarina)₂
- cis-Pt (DDH) (Naranja de Metilo)₂
- cis-Pt (DDH) (Leukeran)₂
- cis-Pt (NH₃)₂ (Naranja de benzilo)₂
- cis-Pt (NH₃)₂ (Acido 2-benzilamino-5-hidroxinaftalensulfónico)₂
- cis-Pt (NH₃)₂ (Acido ortofluorobenzoico)₂
- cis-Pt (DAP) (Naranja de benzilo)
- cis-Pt (2,3,4,5,6-Pentafluoroanilina)₂ (Br)₂
- cis-Pt (2,3,5,6-Tetrafluoroanilina)₂ (Br)₂
- cis-Pt (Methamidium) (Br)₂
- cis-Pt (Guanetidina) (Cl)₂
- cis-Pt (Octodryl)₂ (Cl)₂
- cis-Pt (Tranycipromina)₂ (Br)₂
- cis-Pt (4-Nitroimidazol)₂ (Cl)₂
- cis-Pt (2-amino-4-feniltiazol)₂ (Cl)₂
- cis-Pt (2-piperacil(1)etanol) (Cl)₂
- cis-Pt (Lampit) (Cl)₂
- cis-Pt (Pentamidina) (I)₂
- cis-Pt (Oxamiquina) (Cl)₂

Serie B:

- Rh (CO)₂ (Cl) (2-aminobenzotiazol)
- Rh (CO)₂ (Cl) (5-Cl-2-metilbenzotiazol)
- Rh (CO)₂ (Cl) (2-amino-naftotiazol)
- Rh₂ (CO)₄ (Cl)₂

Serie C:

- [Rh (2-amino-6-etoxibenzotiazol)₄ Br₂] Br⁻
- [Rh (4-nitroimidazol)₄ Cl₂]⁺ Cl⁻
- [Rh (Tiabendazol)₂ Cl₂]⁺ Cl⁻
- [Rh (2-dimetilamina)-1-metil-2-nitroimidazol-5il)metoxiacetanilida)₄ Cl₂]⁺ Cl⁻
- [Rh (benzonidazol)₄ Cl₂]⁺ Cl⁻
- [Rh (2-Bromotiazol)₄ Br₂]⁺ Br⁻
- [Rh (Alopurinol)₂ Cl₂]⁺ Cl⁻
- [Rh (Mefloquina)₄ Cl₂]⁺ Cl⁻
- [Rh (Mepacrina)₄ Cl₂]⁺ Cl⁻
- [Rh (niridazol)₄ Cl₂]⁺ Cl⁻
- [Rh (Oxamniquina)₄ Cl₂]⁺ Cl⁻
- [Rh (Primaquina)₄ Cl₂]⁺ Cl⁻
- [Rh (Tinidazol)₄ Cl₂]⁺ Cl⁻

Serie D:

- Rh (piperacinditiocarbamato)₃
- Rh (Etilxantato)₃
- Rh (n-Butilxantato)₃
- Rh (Isopropilxantato)₃
- Rh (n- Propilxantato)₃
- Rh (Pentilxantato)₃

Serie E:

- Ir (Anilinditiocarbamato)₃
- Ir (Butilxantato)₃
- Ir (Metilxantato)₃
- Ir (Pirolidinditiocarbamato)₃
- Ir (Morfolinditiocarbamato)₃
- Ir (Metilciclohexilditiocarbamato)₃

Serie F:

- [Pt Cl₆] H₂ (Berenil)
- [Pt Br₆] H₂ (Pentamidina)
- [Pt Br₆] H₂ (Nifurtimox)
- [Pt Br₆] H₂ (Stilbamidina)
- [Pt Cl₆] H₂ (2-piperacilin(1)etilamina)
- [Pt Cl₆] H₂ (Piperacina)
- [Pt Cl₆] H₂ (3-Piperacilin(1)propilamina)
- [Pt Cl₆] H₂ (Pyrantel)₂

Serie G:

- [Os Cl₆] H₂ (2-Piperacilin(1)etanol)
- [Os Cl₆] H₂ (2-amino-4-feniltiazol)₂
- [Os Cl₆] H₂ (Aminoantipirina)₂
- [Os Cl₆] H₂ (2-piperacilin(1)etilamina)
- [Os Cl₆] H₂ (2-aminobenzotiazol)
- [Os Cl₆] H₂ (1-metilpiperacina)

Serie H:

- [Pd Cl₄] H₂ (2-aminobenzotiazol)₂
- [Pd Cl₄] H₂ (Aminoantipirina)₂
- [Pd Cl₄] H₂ (2-Acetamidotiazol)₂
- [Pd Cl₄] H₂ (2-Amino-4Cl-metiltiazol)₂

Serie I:

- [Au Cl₄] H (Aminobenzotiazol)
- [Au Cl₄] H (2-Amino-6 Br-benzotiazol)

Serie J:

- [Ir Cl₆] H₂ (Pentamidina)
- [Ir Cl₆] H₂ (Berenil)
- [Ir Br₆] H₂ (Berenil)
- [Ir Cl₆] H₂ (Alopurinol)

2.3.- METODOS

2.3.1.-Estudio de la actividad leishmanicida in vitro

Con el fin de evaluar el posible efecto leishmanicida desarrollado por los diferentes compuestos, se efectuó un "screening in vitro" en función de la concentración y del tiempo (Mesa-Valle et al. 1989).

- Preparación de los parásitos

Con el fin de evitar la dificultad de la utilización de un medio bifásico a la hora de proceder al estudio de la posible acción leishmanicida de estos complejos, se cultivaron las leishmanias en el medio 199 utilizando un inóculo de parásitos procedentes del sobrenadante resultado del cultivo en medio NNN y bifásico.

La concentración debe estar comprendida entre 500.000 y 1.000.000 de parásitos/ml.

- Preparación de los complejos metálicos ensayados

Los complejos metálicos ensayados se disolvieron en Dimetil Sulfóxido (DMSO), a la concentración final en el medio de cultivo de 0.1% (v/v). Preparando una solución madre para las posteriores diluciones de los complejos metálicos con una concentración de 20 µg/ml.

- Tratamiento con los complejos metálicos

Para llevar a cabo esta experiencia se emplearon placas de microtitulación estériles de fondo plano (NUNC).

Las concentraciones ensayadas para los complejos metálicos fueron de 100, 10 y 1 $\mu\text{g/ml}$. Para cada concentración se efectuaron 3 réplicas mas unos pocillos control sin ningún fármaco para permitir observar el desarrollo de los protozoos. Las placas fueron incubadas a 28 °C.

La acción de los complejos metálicos sobre los flagelados, fueron estudiados a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento, respecto al control. Para ello los parásitos fueron contados en cámara de recuento hemocitométrica de Neubauer.

- Cálculo de los porcentajes de inhibición del crecimiento

Con el fin de evaluar comparativamente la inhibición del crecimiento que ejerce cada una de las diferentes dosis de los productos ensayados, en los diferentes periodos de tiempo, se procedió al cálculo de los porcentajes de inhibición del crecimiento en relación al número de flagelados existentes en los controles, para lo cual se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ I.C.} = \frac{T_c - T_p}{T_c} 100$$

% I.C. = Porcentaje de inhibición del crecimiento para cada periodo de tiempo y para cada dosis del producto ensayado.

T_c = Número de flagelados por ml existentes en los pocillos control.

T_p = Número medio de flagelados por ml correspondientes a los diferentes productos ensayados y sus respectivas dosis.

2.3.2.- Determinación de citotoxicidad mediante Cr^{51}

Para determinar el grado de deterioro celular producido por los complejos metálicos más activos se empleó Cr^{51} , como marcador de lisis celular ocasionado por los complejos metálicos sobre cultivos celulares.

Se seleccionaron aquellos complejos que inhibieron el crecimiento de las formas promastigotas de L. donovani por encima de un 50% a partir de las 24 horas de tratamiento.

Escogimos así los 23 complejos siguientes:

- Cis-Pt (2,3,4,5,6-Pentafluoroanilina)₂ Br₂
- Cis-Pt (2,3,5,6-Tetrafluoroanilina)₂ Br₂
- Cis-Pt (Guanetidina) Cl₂
- Cis-Pt (octodryl)₂ Cl₂
- Cis-Pt (Tranylcipromina)₂ Br₂
- Cis-Pt (Pentamidina) I₂
- Cis-Pt (Oxamniquina) Cl₂
- Rh (CO)₂ Cl (2-aminobenzotiazol)
- Rh (CO)₂ Cl (5-Cl-2-metilbenzotiazol)
- [Rh (2-amino-6-etoxibenzotiazol)₄ Br₂]⁺ Br⁻
- [Rh (2-dimetilamina(1-metil-2nitroimidazol-5il) metoxiacetanilida)₄ Cl₂]⁺ Cl⁻
- [Rh (2-Bromotiazol)₄ Br₂]⁺ Br⁻
- [Rh (Mefloquina)₄ Cl₂]⁺ Cl⁻
- [Rh (Mepacrina)₄ Cl₂]⁺ Cl⁻
- [Rh (Oxamniquina)₄ Cl₂]⁺ Cl⁻
- Rh (Etilxantato)₃
- Ir (Anilinditiocarbamato)₃
- Ir (Butilxantato)₃
- Ir (Pirolidinditiocarbamto)₃

- [Pt Br₆] H₂ (Pentamidina)
- [Pt Br₆] H₂ (Stilbamidina)
- [Pt Cl₆] H₂ (2-Piperacilin(1)etilamina)
- [Ir Cl₆] H₂ (Pentamidina)
- [Ir Cl₆] H₂ (Berenil)

Se ha empleado el Cr⁵¹ como marcador dada la objetividad de este método en la medida de lisis celular al evitarse así los errores subjetivos de contar visualmente células teñidas con Azul Tripan.

Se tomó un cultivo en monocapa de macrófagos J-774. Con la ayuda de una micropipeta automática se distribuyó esta suspensión celular en los pocillos de una placa de microtitulación de fondo plano sembrándose del orden de $3 \cdot 10^5$ células por pocillo, llevándose la placa a un incubador automático a 37 °C con atmósfera húmeda y enriquecido al 5% de CO₂, esperándose el tiempo suficiente para que estas células formaran una monocapa.

Paralelamente, se preparó una solución de Cr⁵¹ a partir de una solución en RPMI 1640 de Cr⁵¹ de 2 mCi/ml (Con una actividad específica de 200-900 Ci/g) (DUPONT) hasta una concentración final de 50 µCi/ml; esta solución fue llevada a un baño termostático a 37 °C hasta que alcanzó esta temperatura.

Una vez preparada la solución de Cr radioactivo se tomó la placa de microtitulación, con las células ya en monocapa, y mediante una pipeta Pasteur se retiró el medio de cultivo existente en los pocillos de la placa, seguidamente se adicionaron 100 µl por receptáculo de la solución de Cr⁵¹, incubándose en estufa a 37 °C y con un 5% de CO₂ durante 3 horas (tiempo suficiente para que las células captaran este isótopo).

Transcurrido el tiempo de marcaje se retiró el medio de cultivo conteniendo el Cr^{51} . A continuación se hacen 3 lavados con solución de HANKS' para eliminar el Cr^{51} extracelular que quedara, tras lo cual se procedió a adicionar los diferentes productos a las distintas concentraciones ensayadas (100, 10 y 1 $\mu\text{g/ml}$).

Transcurrido el tiempo previsto para la experiencia (6, 12 y 24 horas) se retira el medio de cultivo pasandose a tubos eppendorf. A las células adheridas se añadieron 100 μl de SDS-NaOH (SDS 0,1%, NaOH .N). El SDS-NaOH con los restos celulares fue trasvasado a nuevos tubos eppendorf, midiendose la cantidad de radiación gamma que contenian el sobrenadante y los sedimentos en un contador de centelleo líquido para gamma (LKB).

Con las cpm obtenidas para cada caso se calculó el % de liberación específica de Cr^{51} , que nos dió el porcentaje de células adheridas con respecto a los controles, conociendo así el efecto citopatológico de los complejos metálicos seleccionados en el apartado anterior. A mayor liberación específica mayor lisis celular y por tanto mayor citotoxicidad.

La fórmula para el cálculo de la liberación específica de Cr^{51} es la siguiente:

$$\% \text{ LE} = \frac{\text{CPM Sbn. Ctrl.}}{\text{CPM Sbn. Ctrl.} + \text{CPM Pellet Ctrl.}} \cdot 100$$

$$\% \text{ LSP} = \frac{\text{CPM Sbn. Prb}}{\text{CPM Sbn. Prb.} + \text{CPM Pellet Prb.}} \cdot 100$$

LE = Liberación espontánea

LSP = Liberación específica

Sbn = Sobrenadante

Ctrl = Control

Prb = Problema

2.3.3.- Estudio de la acción de los complejos metálicos sobre los niveles de incorporación de Timidina, Uridina y Leucina H³.

Esta experiencia se llevó a cabo con los mismos complejos del apartado anterior.

Para estos estudios se tomaron formas promastigotas en cultivo durante crecimiento exponencial, de manera que el número de parásitos fuese de 5×10^5 a 1×10^6 .

El volumen total de este cultivo se dividió en tres lotes a los que se les adicionó respectivamente $5 \mu\text{Ci}$ de 6-H^3 -timidina (actividad específica 26-30 Ci/mmol), 5-H^3 -uridina (actividad específica 25-30 Ci/mmol) y $4,5\text{-H}^3$ -leucina (actividad específica 35-70 Ci/mmol) por ml de medio de cultivo. Todos estos radiotrazadores fueron suministrados por Radiochemical Center U.R.

El tiempo de incubación con los isótopos radioactivos, fue de 15 minutos a 28°C , transcurridos los cuales, cada lote se dividió en tres, utilizando uno como lote control, al que solo se le añadió la concentración máxima de disolvente (DMSO al 0.1% v/v) y los otros dos como lotes problemas, a los que se adicionaron respectivamente 50 y 100 μg de producto ensayado por ml de medio de cultivo.

Todos los lotes se incubaron a 28 °C durante 135 minutos, al cabo de los cuales se tomaron las alícuotas de cada cultivo en intervalos de 45 minutos, a partir de la adición del producto.

Las muestras se tomaron con una micropipeta automática (Socorex) y lavadas repetidas veces con PBS mediante centrifugación a 7000 g durante 3 minutos en una microfuga (Beckman), adicionando en el último lavado PBS-Albúmina, a una concentración final de 0.3 meq/ml.

Tras una agitación leve se agregó ácido tricloroacético (TCA) al 10% v/v, a fin de precipitar las proteínas del parásito, incubando seguidamente durante 2 horas a 4 °C.

Una vez transcurrido este tiempo, las muestras tratadas se filtraron en un equipo de filtración múltiple Millipore, con filtros Whatman GF/C de fibra de vidrio.

A continuación, los filtros se lavaron con 10 ml de TCA al 5% v/v frío.

Una vez lavados, los filtros se secaron mediante una lámpara de infrarrojos durante 15 minutos, facilitando de esta manera la evaporación del TCA.

Una vez secados los filtros se introdujeron en viales de centelleo, a los que se les adicionó 4 ml de líquido de centelleo, compuesto por:

PPO.....4.0 g

POPOP.....0.1 g

Tolueno.....1000 ml

Tras una agitación durante 30 segundos, de cada uno de los tubos, se midieron en un contador de centelleo líquido para partículas β modelo Beckman.

2.3.4.- Microscopia electrónica de transmisión

Para observar las posibles alteraciones sufridas por las leishmanias al ser tratadas con los complejos metálicos se procesaron muestras de estas en contacto con aquellos complejos que tenían elevada actividad "in vitro" y además no inducían citotoxicidad. Estos mismos compuestos fueron seleccionados para los posteriores ensayos "in vivo".

La concentración empleada fue de 100 $\mu\text{g/ml}$ y el tiempo de interacción varió entre 6 y 8 horas. Los complejos metálicos fueron los siguientes:

- Cis-Pt (Guanetidina) Cl_2
- $[\text{Rh} (2\text{-amino-6-etoxibenzotiazol})_4 \text{Br}_2]^+ \text{Br}^-$
- Ir (Butilxantato) $_3$
- $[\text{Pt} \text{Cl}_6] \text{H}_2$ (2-Piperacilin(1)Etilamina)
- $[\text{Ir} \text{Cl}_6] \text{H}_2$ (Berenil)

El protocolo seguido para la microscopia electrónica de transmisión fue el siguiente:

2.3.4.1.- Fijación

Se lleva a cabo con glutaraldehído al 2.5% en tampón cacodilato/CIH 0.1 M con sacarosa 0.1 M, ajustándose el pH a 7.2, tal como recomiendan Brunk y col. (1981).

Los parásitos se centrifugan y el sedimento se resuspende en la solución fijadora de glutaraldehído y se vuelve a centrifugar. Esta operación se puede repetir un par de veces con objeto de hacer un lavado de la preparación.

2.3.4.2.- Lavado

Los sedimentos se lavan 3 veces, durante unos 15 minutos, en solución tamponada de Milloning a temperatura ambiente.

2.3.4.3.- Segunda fijación

Esta se realiza con tetróxido de Osmio al 1% en PBS; se lleva a cabo a temperatura ambiente y se mantiene durante media hora.

2.3.4.4.- Segundo lavado

Al igual que el anterior, se realiza tres veces, pero en esta ocasión con agua destilada, también a temperatura ambiente, y se mantiene durante un tiempo similar a los anteriormente descritos.

2.3.4.5.- Deshidratación

Para este proceso se emplean una serie de alcoholes de graduación creciente, comenzamos con un alcohol de 70°, continuándose con tres baños en alcohol absoluto, cada uno de 15 minutos. El alcohol absoluto ha de ser de una pureza garantizada y fiable, esto es,

que el frasco ha de estar lleno en mas de 2/3 de su capacidad, ya que es higroscópico y puede tomar agua del ambiente, impidiendo de esta forma completar la deshidratación.

2.3.4.6.- Inclusión en resina Spurr

Inicialmente, la muestra ha de permanecer en una mezcla a partes iguales de alcohol absoluto y resina Spurr, durante hora y media. A continuación se deja en resina Spurr pura durante toda la noche, polimerizando a 60 °C, en el interior de moldes de silicio.

2.3.4.7.- Corte y tinción

Una vez obtenido el bloque, se procede al corte del mismo en ultramicrotomo "Ultratomo 8000", de la casa LKB.

Se comienza por realizar cortes semifinos, que nos sirvan de orientación sobre las zonas más interesantes en las que centrar la observación. Estos cortes se tiñen con azul de toluidina al 1% en solución de borax al 1%.

Cuando la zona está escogida, se realizan en ella los cortes ultrafinos y se montan en rejillas de cobre de 200 mesh. El corte ultrafino se contrasta con metales pesados, manteniendose durante 30 minutos en acetato de uranilo al 8% y Después en citrato de plomo durante 5 minutos, siguiendo la técnica descrita por Reynolds en 1963.

Todas las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico tipo Jerol 100 B. Para la fotografía fueron empleadas placas Kodak, "Electron Microscope Film 4489 Estar Thick Base".

2.3.5.- Ensayos "in vivo"

Los animales empleados para estos ensayos fueron ratas Wistar de unos 50 gramos de peso. Para cada complejo metálico se utilizaron lotes de 5 ratas a las cuales se les administró por vía intraperitoneal la mitad de la dosis letal 50 (DL_{50}) (Craciunescu, 1989) repartida en 5 dosis de administración diarias. Para cada uno de los complejos trabajamos con un lote control también de 5 ratas

El método seleccionado para el estudio de la actividad leishmanicida desarrollada por los complejos metálicos seleccionados en el apartado anterior consiste en la evaluación comparativa del grado de afectación de los amastigotes esplénicos, mediante la determinación de los parámetros que se citan a continuación.

Con este propósito, los animales son sacrificados a los tres días de terminado el tratamiento, extrayéndose los bazo y operando durante el procesamiento de los mismos en condiciones estériles.

2.3.5.1.- Estudio morfológico de los bazos

En el momento de la extracción, los bazos son pesados en una balanza analítica y sus dimensiones determinadas (Segovia et al. 1984a), al objeto de valorar la posible influencia ejercida por el tratamiento experimental sobre dichos parámetros en los modelos tratados, con respecto a los grupos control.

2.3.5.2.- Determinación de la proporción de amastigotes por células nucleadas normales de bazo

Con posterioridad, los bazos son seccionados transversalmente, efectuándose una serie de improntas de los cortes. Tras secado de los portas a temperatura ambiente, las preparaciones son fijadas con alcohol metílico y teñidas con solución de Giemsa al 10%, durante 15 minutos.

A continuación se realiza un detenido examen al microscopio óptico, contabilizándose la proporción de amastigotes por 500 células nucleadas normales de pulpa esplénica (Segovia et al. 1984b).

2.3.5.3.- Determinación del porcentaje de parasitación en bazo

Tres fases fundamentales pueden distinguirse a lo largo de este proceso de evaluación:

A) Aislamiento de formas intracelulares

Para la obtención de las formas amastigotas de L. donovani (LCR-L133) albergadas en el interior de las células, los bazos son finamente divididos y macerados en un potter a 4° C, en presencia de solución salina fisiológica (ClNa 0.9%).

Las suspensiones resultantes son centrifugadas en recipientes estériles, a 1000 r.p.m. durante 10 minutos, en una centrífuga ALC (Modelo 4226). Después de sucesivos lavados con solución tamponada (PBS) pH 7.2, los sedimentos derivados de la centrifugación, en condiciones idénticas a las anteriores, se tratan con tripsina (Difco 1:250) al 0.25% en PBS durante 5 minutos en agitación constante y a temperatura ambiente, para la ruptura de las células (Gamarro 1983).

Dicho enzima no altera la composición proteica del parásito, actuando sobre las membranas de los citoplasmas hipertrofiados, repletos de parásitos; al redondearse las células, la presión interna en los citoplasmas debe de aumentar considerablemente, haciendo que las células estallen (Gamarro, 1983; Childs et al. 1976).

Tras el tratamiento con tripsina, las formas intracelulares obtenidas en suspensión son rápidamente bañadas en medio MEM conteniendo un 20% de SBFI, al objeto de que los factores inespecíficos que bloquean el enzima inactiven este y no actuen sobre los parásitos.

B) Purificación de las formas intracelulares

La purificación de los amastigotes de L. donovani (LCR-L133) salidos de células esplénicas y obtenidos por tratamiento enzimático, se efectúa por centrifugación en gradiente discontinuo de densidad de Percoll (Chang, 1980). El medio empleado al respecto, Percoll (Pharmacia Fine Chemicals), está constituido por sílice coloidal revestida con polivinilpirrolidona, y permite la eliminación de los contaminantes celulares.

La preparación de estos gradientes se realiza partiendo de una solución stock de Percoll isotónico con ClNa 1.5 M. Dicha solución se prepara diluyendo 9 volúmenes de Percoll concentrado (densidad inicial 1.130 g/ml y osmolaridad 16 mOs/kg H₂O), con 1 volumen de ClNa 1.5 M, presentando una densidad final de 1.123 g/ml.

Se utilizan 5 gradientes de densidad (1.09, 1.08, 1.07, 1.06, 1.05 g/ml) de 1.5 ml de volumen cada uno, obtenidos por adición de ClNa 0.15 M (densidad 1,0058 g/ml) a la solución stock de Percoll isotónico, basándose en la siguiente expresión:

$$V_y = V_t \frac{dt - dx}{dy - dx}$$

- V_y = Volumen de la solución de Percoll isotónico.
- V_t = Volumen total deseado.
- dt = densidad final.
- dx = densidad de ClNa 0.15 M.
- dy = densidad de la solución de Percoll isotónico.

Los gradientes preparados son teñidos alternativamente con azul de metileno, para una mejor diferenciación de las bandas.

Posteriormente al aislamiento, y una vez eliminado el sobrenadante resultante de una nueva centrifugación a 1.000 r.p.m. durante 10 minutos, las formas amastigotas son suspendidas en 4 ml de la solución de Percoll de mayor densidad (1,123 g/ml) y colocadas en el botón de un tubo de vidrio de 15 ml. Después de adicionar los gradientes en sentido ascendente de mayor a menor densidad, los tubos se centrifugan en un rotor JS-13 en una centrífuga refrigerada Beckman de alta velocidad (Modelo J2-21M) a 358 g durante 60 minutos a 4 °C, siendo el tiempo de aceleración 4 minutos y el tiempo de deceleración 6 minutos.

Durante este proceso, las formas amastigotas se distribuyen por las diferentes interfases creadas por los gradientes, en función de la diversidad de masas y volúmenes del parásito, permitiendo el recuento posterior en ausencia de contaminantes celulares (Hart et al. 1981).

A partir de este momento, bandas de unos 0.75 ml aproximadamente son recogidas, transferidas conjuntamente a 10 ml de solución de Hanks y centrifugadas a 150 g durante 10 minutos. Este último tratamiento se repite una vez más, para eliminar la solución de Percoll.

C) Recuento de formas intracelulares

Finalizado el proceso de purificación, y al objeto de evaluar la proporción de formas amastigotas esplénicas, los botones obtenidos se resuspenden en volúmenes adecuados de solución de Hanks, realizándose un recuento microscópico en cámara hemocitométrica de Neubauer del número total de amastigotes por bazo y por gramo de bazo.

2.3.5.4.- Determinación de la viabilidad de los amastigotes por captación de aminoácidos marcados

La determinación de la viabilidad de los amastigotes aislados de bazo en los animales tratados, con respecto a los grupos control, se efectúa por evaluación del grado de captación e incorporación en material precipitable de Leucina- H^3 .

En este sentido, las suspensiones de formas intracelulares anteriores son centrifugadas a 1000 r.p.m. en una centrífuga Micro Centaur (MSE) durante 3 minutos. Los sedimentos resultantes son tratados con 50 μ l de solución de Leucina- H^3 (con una actividad específica de 53 Ci/mmol). (Dupont) en medio 199, de concentración igual a 20 μ Ci/ml, e incubados a 37 °C y 5% de CO_2 , siendo el tiempo estimado para la incorporación del aminoácido de 1 hora.

Una vez transcurrido dicho periodo, el aminoácido marcado, no captado por las formas amastigotas, es eliminado mediante sucesivos lavados de las muestras con medio 199.

Antes de proceder a evaluar el grado de incorporación, las suspensiones de amastigotes son tratadas con 20 μ l de solución de lauril sulfato sódico (SDS) al 0.1% y NaOH 0.1 N, con objeto de disgregar y disolver la capa celular.

Para la lectura de las muestras, alícuotas de 2 μ l se adicionan a 4 ml de líquido de centelleo, efectuándose la misma en un contador de partículas beta, Beckman (modelo LS-2800). Los resultados obtenidos, expresados en CPM y correspondientes a Leucina- H^3 incorporada, permitirán evaluar el efecto ejercido por el tratamiento experimental sobre la viabilidad de los amastigotes esplénicos.

III. RESULTADOS

3.- RESULTADOS

Al objeto de reflejar con exactitud los datos experimentales derivados del proceso de investigación, los resultados se han agrupado en 5 apartados:

3.1.- Estudio de la actividad leishmanicida "in vitro".

3.2.- Evaluación de la citotoxicidad sobre macrófagos J 774.

3.3.- Efecto sobre la incorporación de precursores radioactivos en formas promastigotes de Leishmania donovani.

3.4.- Estudio ultraestructural de los parásitos tratados con los complejos seleccionados para los ensayos "in vivo".

3.5.- Estudio de la actividad leishmanicida "in vivo".

3.1.- Estudio de la actividad leishmanicida "in vitro"

Las tablas I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X y XI recogen los resultados obtenidos expresados en porcentajes de inhibición del crecimiento.

Los resultados son la media de 5 experiencias.

Tabla I: Efecto de los Complejos Cis-Pt^{II}(DDHRA)_n sobre el crecimiento de formas promastigotas de *Leishmania donovani*.

Tiempo de Incubación	24 Horas			48 Horas			72 Horas		
	100	10	1	100	10	1	100	10	1
Concentración (µg/ml)									
(Naranja de metilo) (NO ₃) ⁿ	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(N-Acetilmetionina)2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(N-Acetilileucina)2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(Ac 6-Nitroftalico)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(Ac Nitroorotico)2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(Rojo de Metilo) (NO ₃)	42.3	0	0	82	61.5	0	94.2	71.7	12.6
(Ac 1-2, Benzenodisulfonico)	0	0	0	0	0	0	23.8	0	0
(Ac 2-5, Dihidroxibencensulfonico)2	43.3	0	0	47.8	0	0	67.2	0	0
(Amarillo de Alizarina)	0	0	0	22.3	0	0	16.8	0	0
(Amarillo de Alizarina)2	19.6	0	0	21.5	0	0	16.2	0	0
(Naranja de metilo)2	19.1	0	0	33.7	0	0	16.7	0	0
(Leukeran)2	0	0	0	0	0	0	28.1	0	0

Tabla IIa: Efecto de los Complejos Cis-Pt(II) (X)_n (L)_n sobre el crecimiento de formas Promastigotas de *Leishmania donovani*.

Tiempo de incubación	24 Horas			48 Horas			72 Horas		
	100	10	1	100	10	1	100	10	1
Concentración (µg/ml)	19.6	0	0	78	30.5	19	86	51.6	10.8
Cis-Pt (NH ₃) ₂ (Bencilorange) ₂	17.5	0	0	37	31.3	0	31.5	5	0
Cis-Pt (NH ₃) ₂ (Acido 2-bencilamino-5-hidroxinaftalensulfónico) ₂	56.4	0	0	58.6	0	0	71.6	0	0
Cis-Pt(Guanetidina) Cl ₂	44.2	44.7	17.5	44.6	37.3	0	56.2	46.8	39.7
Cis-Pt(NH ₃) ₂ (Ortofluorobenzoico) ₂	51.1	0	0	50.4	0	0	39.3	0	0
Cis-Pt(Octodry) ₂ Cl ₂	26.9	0	0	48	0	0	64.5	28.6	28
Cis-Pt(4-Nitroimidazol) ₂ Cl ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cis-Pt(2-Amino-4-Feniltiazol) ₂ Cl ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cis-Pt(2-Piperacilil(1)Etanol) Cl ₂	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cis-Pt(Lampit) Cl ₂	100	91.7	50.2	100	100	95.1	100	100	98.3
Cis-Pt(Pentamidina) I ₂	67.8	0	0	72.7	0	0	96.5	0	0
Cis-Pt(Oxamniquina) Cl ₂									

Tabla IIb: Efecto de los Complejos Cis-Pt(II) (X)_n (L)_n sobre el crecimiento de formas Promastigotas de *Leishmania donovani*.

Tiempo de incubación	24 Horas			48 Horas			72 Horas		
	100	10	1	100	10	1	100	10	1
Concentración (µg/ml)	100	10	1	100	10	1	100	10	1
Cis-Pt (DAP) (Naranja de Benzilo)	31.9	0	0	31	0	0	50.8	0	0
Cis-Pt(2,3,4,5,6-Pentafluoroanilina)2Br2	100	24.7	0	100	29.7	0	100	17.6	0
Cis-Pt(2,3,5,6-Tetrafluoroanilina)2 Br2	56.4	0	0	46.1	16.8	0	27.1	0	0
Cis-Pt(Methamidium) Br2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cis-Pt(Tranilcipromina)2 Br2	55.4	41.1	27.5	52.4	42.2	29.3	50.3	23.1	23.7

Tabla III: Efecto de los Complejos: Rh(I) (CO)2 Cl (L)n sobre el crecimiento de formas Promastigotas de *Leishmania donovani*.

Tiempo de incubación	24 Horas			48 Horas			72 Horas		
	100	10	1	100	10	1	100	10	1
Concentración (µg/ml)									
Rh(CO)2 Cl (2-aminobenzotiazol)	54.9	0	0	60	0	0	97	0	0
Rh(CO)2 Cl (5-Cl-2-Metilbenzotiazol)	72.5	0	0	66.4	26.4	0	83.6	14.2	0
Rh(CO)2 Cl (2-Acetamidobenzotiazol)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rh(CO)2 Cl (2-Aminonaftotiazol)	33.9	0	0	68	0	0	55.3	0	0
Rh2(CO)4 Cl2	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla IV: Efecto de los Complejos: [Rh(III) (L)_n X₂]+ X- sobre el crecimiento de formas Promastigotas de *Leishmania donovani*.

Tiempo de incubación	24 Horas			48 Horas			72 Horas		
	100	10	1	100	10	1	100	10	1
Concentración (µg/ml)	100	10	1	100	10	1	100	10	1
(L)n X	94.6	43	19.7	94.6	56.6	38.9	100	50.3	37.3
(2-amino-6-etoxibenzotiazol)4 Br	0	0	0	27.7	0	0	48	0	0
(4-nitroimidazol)4 Cl	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(Tiabendazol)2 Cl	100	40.4	0	100	71.2	0	100	90.2	41.4
(2-dimetilamino)[1-metil-2-nitroimidazol-5il)metoxiacetanilida)4 Cl	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(Benzonidazol)4 Cl	90	63.8	24.3	97.8	53.5	0	100	70.4	0
(2-Bromotiazol)4 Br	0	0	0	13.7	0	0	66.2	18.5	0
(Niridazol)4 Cl	100	0	0	100	0	0	100	15.6	0
(Oxamniquina)4 Cl	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(Primaquina)4 Cl	24.5	0	0	66	0	0	48	0	0
(Tinidazol)4 Cl	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(Aloporinol)2 Cl	95.6	91.7	85.6	100	100	91.7	100	100	97.9
(Mefloquina)4 Cl	100	91.7	76.8	100	100	93.4	100	100	95
(Mepacrina)4 Cl									

Tabla VI: Efecto de los Complejos: [Ir(III) (L)₃] sobre el crecimiento de formas Promastigotas de *Leishmania donovani*.

Tiempo de incubación	24 Horas			48 Horas			72 Horas		
	100	10	1	100	10	1	100	10	1
Concentración (µg/ml)	100	10	1	100	10	1	100	10	1
(Anilinditiocarbamato) ₃ (L) ₃	70	29	0	97	34.9	0	97.4	57.1	33.1
(Butilxantato) ₃	83.1	50.6	26.2	100	65.1	0	100	75.1	58
(Metilxantato) ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(Pirolidinditiocarbamato) ₃	100	0	0	100	0	0	100	37.5	0
(Morfolinditiocarbamato) ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(Metilciclohexilditiocarbamato) ₃	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla VII: Efecto de las sales complejas de Pt(IV) sobre el crecimiento de formas Promastigotas de *Leishmania donovani*.

Tiempo de incubación	24 Horas			48 Horas			72 Horas		
	100	10	1	100	10	1	100	10	1
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	100	10	1	100	10	1	100	10	1
[PtIV Cl6] H2 (Berenile)	16.3	0	0	63.1	0	0	75.7	37.1	0
[PtIV Br6] F' (pantamidina)	69	51.7	0	100	84.3	13	100	100	67.2
[PtIV Br6] H2 (Nifurtimox)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
[PtIV Br6] H2 (Estilbamidina)	95	70.2	0	100	90.8	37.2	100	100	30
[PtIV Cl6] H2(2-Piperacínil(1)Etilamina)	60.5	0	0	68.6	0	0	92.2	0	0
[PtIV Cl6] H2 (Piperacina)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
[PtIV Cl6] H2 (3-Piperacínil(1)Propil- amina)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
[PtIV Cl6] H2 (Pyrantel)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla VIII: Efecto de las sales Complejas de Os(IV) sobre el crecimiento de formas Promastigotas de *Leishmania donovani*.

Tiempo de incubación	24 Horas			48 Horas			72 Horas		
	100	10	1	100	10	1	100	10	1
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	100	10	1	100	10	1	100	10	1
[Os Cl6] H2 (2-Piperacínil(1)etanol)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
[Os Cl6] H2 (2-Amino-4-Feniltiazol)2	0	0	0	28	0	0	0	0	0
[Os Cl6] H2 (Aminoantipirina)2	0	0	0	15.8	0	0	0	0	0
[Os Cl6] H2 (2-Piperacínil(1)Etilamina)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
[Os Cl6] H2 (2-Aminobenzotiazol)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
[Os Cl6] H2 (1-Metilpiperazina)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla X: Efecto de las sales Complejas de Au(III) sobre el crecimiento de formas Promastigotas de *Leishmania donovani*.

Tiempo de incubación	24 Horas			48 Horas			72 Horas		
	100	10	1	100	10	1	100	10	1
Concentración (µg/ml)	100	10	1	100	10	1	100	10	1
[Au Cl ₄] H (2-Aminobenzotiazol)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
[Au Cl ₄] H (2-Amino-6-Br-Benzotiazol)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla XI: Efecto de las Sales Complejas Ir(IV) sobre el crecimiento de formas Promastigotas de *Leishmania donovani*.

Tiempo de Incubación	24 Horas		48 Horas		72 Horas		
	10	1	100	10	100	10	1
Concentración (µg/ml)	100	100	100	100	100	100	100
[Ir Cl6] H2 (Pentamidina)	100	81.8	43.7	100	100	90.9	88.3
[Ir Cl6] H2 (Berenile)	51.2	0	0	89.2	60	27.7	97
[Ir Br6] H2 (Berenile)	0	0	0	0	0	0	38.9
[Ir Cl6] H2 (Alopurinol)	0	0	0	0	0	0	0

3.2.- Evaluación de la citotoxicidad sobre macrófagos J 774

Las tablas XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII y XVIII reflejan los resultados obtenidos, para aquellos complejos que mostraron una alta actividad "in vitro" frente a las formas promastigotas de *L. donovani*, expresados en porcentajes de liberación específica de Cr⁵¹.

Los resultados son la media de 5 experiencias.

Tabla XII: Citotoxicidad producida por los complejos de Cis-Pt(II) sobre Macrofagos J 774.

Tiempo de incubación	6 Horas			12 Horas			24 Horas		
	100	10	1	100	10	1	100	10	1
Concentración (µg/ml)									
Cis-Pt(2,3,4,5,6-Pentafluoroanilina)2Br2	1.6	2	1.9	5.9	6.9	6.1	1.4	2	3.3
Cis-Pt(2,3,5,6-Tetrafluoroanilina)2Br2	2.7	1.9		0	0	0	4.5	3.3	1.1
Cis-Pt(Guanetidina) Cl2	3.7	2.8	0	0	0	0	3.7	3	5
Cis-Pt(Octodryl) Cl2	0	0	0	5.4	0	0	26.2	0	0
Cis-Pt(Tranilcipromina) Br2	0	0	0	10.1	4.1	3.8	20.6	0	0
Cis-Pt(Pentamidina) I2	0	0	0	0	0	0	27.7	8.2	5.2
Cis-Pt(Oxamniquina) Cl2	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla XIII: Citotoxicidad producida por los complejos de Rh(I) sobre Macrofagos J 774.

Tiempo de incubación	6 Horas			12 Horas			24 Horas		
	100	10	1	100	10	1	100	10	1
Concentración (µg/ml)									
Rh(CO)2 Cl (2-aminobenzotiazol)	0	0	0	2.4	3.2	0	24.2	3.2	0
Rh(CO)2 Cl (5Cl-2-Metilbenzotiazol)	0	0	0	2.9	0	0	3.2	0	0

Tabla: XVII: Citotoxicidad producida por las sales complejas Ir(IV) sobre Macrofagos J 774.

Tiempo de incubación	6 Horas			12 Horas			24 Horas		
	100	10	1	100	10	1	100	10	1
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)									
[Ir Cl ₆] H ₂ (Berenil)	2.9	4.2	1.9	0	3.8	3.2	2.2	2.2	1.9
[Ir Cl ₆] H ₂ (Pentamidina)	4.4	0	0	8.8	3.4	0	31.8	9.3	5.2

Tabla XVIII: Citotoxicidad producida por las sales complejas de Pt(IV) sobre Macrofagos j 774.

Tiempo de incubacion	24 Horas			48 Horas			72 Horas		
	100	10	1	100	10	1	100	10	1
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)									
[Pt Br6] H2 (Estilbamidina)	4.3	0	0	35.1	1.8	0	58.2	9.2	1.3
[Pt Cl6] H2 (2-Piperacínil(1)Etilamina)	0	0	0	2.9	0	0	7.3	0	0
[Pt Br6] H2 (Pentamidina)	1.3	0	0	1.2	0	0	23.7	1.7	0

3.3.- Efecto sobre la incorporación de precursores radioactivos en formas promastigotes de Leishmania donovani

Estos ensayos se llevaron a cabo con los mismos 23 complejos del apartado anterior. Los resultados se recogen en las tablas que van desde la XIX hasta la XLI y se expresan en cpm.

A los resultados obtenidos se les aplicó la desviación estandar de 5 experimentos.

Tabla XIX: Efecto del complejo $\text{cis-Pt}^{\text{II}}$ (2,3,5,6-Tetrafluoroanilina)₂ Br₂ sobre la incorporación de (H^3)-Timidina, (H^3)-Leucina y (H^3)-Uridina en *L. donovani*, expresado en CPM.

Tiempo	Precursor											
	Timidina				Leucina				Uridina			
	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml
0	2283±53	2283±53	2283±53	1425±125	1425±125	1425±125	3393±168	3393±168	3393±168	3393±168	3393±168	3393±168
45	3361±67	3327±59	3594±4	2643±1	1970±145	2333±37	3497±146	4075±121	4183±25	4623±158	4623±158	4623±158
90	3964±132	4251±303	3527±249	3479±33	3294±23	2770±151	5000±115	4723±101	4623±158	4623±158	4623±158	4623±158
135	7322±127	7446±116	6260±2	3747±131	4043±36	3552±53	8504±131	8534±223	8170±121	8170±121	8170±121	8170±121

Tabla XX: Efecto del complejo cis-Pl^{II} (Guanetidina) Cl2 sobre la incorporación de (H³)-Timidina, (H³)-Leucina y (H³)-Uridina en *L. donovani*, expresado en CPM.

Precursor												
Tiempo	Timidina				Leucina				Uridina			
	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml
	0	1083±147	1083±147	1083±147	339±2	339±2	339±2	310±1	310±1	310±1	310±1	310±1
45	1953±1	2094±178	1358±182	979±3	802±9	990±96	12600 ±206	9798±117	11322 ±510	12600 ±206	9798±117	11322 ±510
90	2567±34	3070±289	2238±203	1394±69	1318±220	1273±1	19928 ±380	14204 ±639	23250±12	19928 ±380	14204 ±639	23250±12
135	4424±424	4071±374	3772±75	1617±192	1441±1	1926±103	24714	21642	23250±53	24714	21642	23250±53

Tabla XXI: Efecto del complejo cis-Pt^{II} (Octodryl)2 Cl2 sobre la incorporación de (H³)-Timidina, (H³)-Leucina y (H³)-Uridina en *L. donovani*, expresado en CPM.

Precursor										
Precursor										
Tiempo	Timidina			Leucina			Uridina			
	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	50 µg/ml
0	241±6	241±6	241±6	113±3	113±3	113±3	1409±124	1409±124	1409±124	1409±124
45	1882±45	1833±159	1143±126	601±32	812±11	764±42	2564±203	2462±66	3472±101	
90	4534±59	2946±82	4168±27	1037±38	1008±59	1158±149	4473±132	2284±55	3977±96	
135	4715±137	3381±212	4768±29	1372±10	1051±31	1394±32	5330±77	3369±43	5424±256	

Tabla XXII: Efecto del complejo cis-Pt^{II} (Tranylcipromina)₂ Br₂ sobre la incorporación de (H³)-Timidina, (H³)-Leucina y (H³)-Uridina en *L. donovani*, expresado en CPM.

Precursor												
Leucina												
Uridina												
Tiempo	Timidina			Leucina			Uridina					
	Control	100µg, .nl	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml
0	764±3	764±3	764±3	697±18	697±18	697±18	813±116	1813±116	1813±116	813±116	1813±116	1813±116
45	4776±184	3759±191	4582±17	1389±193	1121±69	1546±43	4243±36	4760±230	4725±6	4243±36	4760±230	4725±6
90	6240±173	4209±104	6738±234	2469±20	2000±107	1874±133	7160±3	6471±76	6601±298	7160±3	6471±76	6601±298
135	9356±219	7276±38	9549±147	2444±120	2828±115	2216±143	10523 ±143	7824±92	7723±85	10523 ±143	7824±92	7723±85

Tabla XXIII: Efecto del complejo [Rh^{III} (2-amino-6-etoxibenzotiazol)₄ Br₂] Br⁻ sobre la incorporación de (H³)-Timidina, (H³)-Leucina y (H³)-Uridina en *L. donovani*, expresado en CPM.

Precursor												
Precursor												
Tiempo	Timidina				Leucina				Uridina			
	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml
0	2103±47	2103±47	2103±47	832±24	832±24	832±24	4293±132	4293±132	4293±132	4293±132	4293±132	4293±132
45	3779±64	1676±89	2568±52	1156±13	462±44	624±30	7808±72	1496±172	1602±14			
90	6261±57	987±67	1683±61	1865±56	512±40	482±47	10207 ±158	1767±52	2654±63			
135	9134±38	1084±62	1871±56	1930±86	420±3	568±43	14054±2	2841±117	2677±184			

Tabla XXIV: Efecto del complejo $[Ir^{IV}Cl_6]H_2$ (Berenil) sobre la incorporación de (H^3) -Timidina, (H^3) -Leucina y (H^3) -Uridina en *L. donovani*, expresado en CPM.

Precursor											
Timidina			Leucina			Uridina					
Tiempo	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml		
0	1644±16	1644±16	1644±16	1219±59	1219±59	1219±59	9533±108	9533±108	9533±108		
45	2677±25	2235±62	2263±110	1522±55	1451±37	1494±161	12422±25	11686±50	11406±108		
90	2551±159	2873±92	2474±139	2075±142	1801±93	1960±142	15090±10	15439±10	15527±239		
135	3567±23	3532±119	3549±118	2220±50	2260±116	2271±6	19152±9	15372±208	19129±70		

Tabla XXV: Efecto del complejo $[Pt^{IV} Br_6] H_2$ (Pentamidina) sobre la incorporación de (H^3) -Timidina, (H^3) -Leucina y (H^3) -Uridina en *L. donovani*, expresado en CPM.

Tiempo	Precursor											
	Timidina				Leucina				Uridina			
	Control	100 $\mu g/ml$	50 $\mu g/ml$	Control	100 $\mu g/ml$	50 $\mu g/ml$	Control	100 $\mu g/ml$	50 $\mu g/ml$	Control	100 $\mu g/ml$	50 $\mu g/ml$
0	2742±129	2742±129	2742±129	1125±53	1125±53	1125±53	6648±61	6648±61	6648±61	6648±61	6648±61	6648±61
45	3964±34	3325±159	3705±148	1454±143	953±87	723±121	8402±175	6522±154	6790±157	8858±121	8975±85	8975±85
90	5432±195	4073±11	4799±52	1997±77	1871±81	1365±54	10583±77	8858±121	8975±85	8858±121	8975±85	8975±85
135	6746±185	4323±139	5585±195	2264±6	2048±80	2043±78	13709 ±131	13661±89	13741±82	13661±89	13741±82	13741±82

Tabla XXVI: Efecto del complejo Ir^{III} (Butilxantato)₃ sobre la incorporación de (H^3) -Timidina, (H^3) -Leucina y (H^3) Uridina en *L. donovani*, expresado en CPM.

Precursor												
Leucina												
Uridina												
Tiempo	Timidina			Leucina			Uridina					
	Control	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Control	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Control	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Control	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$
0	7.3 ± 12	753 ± 12	753 ± 12	446 ± 19	446 ± 19	446 ± 19	3598 ± 181	3598 ± 181	3598 ± 181	3598 ± 181	3598 ± 181	3598 ± 181
45	1838 ± 59	1447 ± 87	1501 ± 34	931 ± 112	756 ± 54	999 ± 90	6027 ± 117	4921 ± 80	5076 ± 50			
90	2817 ± 74	1944 ± 61	2193 ± 143	1505 ± 13	1278 ± 103	1440 ± 12	8902 ± 189	7481 ± 139	9020 ± 27			
135	3273 ± 40	3066 ± 39	3092 ± 41	1808 ± 71	1474 ± 73	1417 ± 103	9785 ± 70	8928 ± 168	9770 ± 11			

Tabla XXVII: Efecto del complejo cis-Pt^{II} (Oxamniquina) Cl₂ sobre la incorporación de (H³)-Timidina, (H³)-Leucina y (H³)-Uridina en *L. donovani*, expresado en CPM.

Tiempo	Precursor											
	Timidina				Leucina				Uridina			
	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml
0	1022±186	1022±186	1022±186	34±9	344±9	344±9	1381±155	1381±155	1381±155	344±9	344±9	1381±155
45	2084±129	2004±85	2073±31	787±1	716±48	858±29	2136±97	2166±94	2208±105	1148±45	1148±45	4255±153
90	1669±106	2097±217	2172±10	939±62	959±83	1148±45	4021±19	4202±63	4255±153	1114±50	1114±50	5044±44
135	3180±123	3171±17	3166±18	1373±91	1123±163	1114±50	4869±20	5090±190	5044±44	1114±50	1114±50	5044±44

Tabla XXVIII: Efecto del complejo $\text{cis-Pt}^{\text{II}}$ (2,3,4,5,6-Pentafluoroanilina)₂ Br₂ sobre la incorporación de (H³)-Timidina, (H³)-Leucina y (H³)-Uridina en *L. donovani*, expresado en CPM.

Precursor		Timidina						Leucina			Uridina									
		Control		50 µg/ml		100 µg/ml		Control		50 µg/ml		100 µg/ml		Control		50 µg/ml		100 µg/ml		
		Tiempo	1142±88	1142±88	1142±88	1142±88	710±64	710±64	710±64	710±64	1471±157	1471±157	1270±64	1270±64	1611±12	1611±12	3820±272	3820±272	4124±124	4124±124
0	2078±177	2128±28	2431±145	2583±199	1666±108	1599±28	1494±41	1475±46	4547±83	4254±188	4879±153	6109±75	6376±139	6336±131						
45	2653±68	2649±63	2583±199	1666±108	1599±28	1494±41	1475±46	4547±83	4254±188	4879±153	6109±75	6376±139	6336±131							
90	3066±20	2767±74	2861±35	1599±28	1494±41	1475±46	4547±83	4254±188	4879±153	6109±75	6376±139	6336±131								
135																				

Tabla XXIX: Efecto del complejo Rh^{III} (E:ilxentato)₃ sobre la incorporación de (H³)-Timidina, (H³)-Leucina y (H³)-Uridina en *L. donovani*, expresado en CPM.

Precursor												
Timidina				Leucina				Uridina				
Tiempo	Control	100 µg/ml	50 µg/ml	Control	100 µg/ml	50 µg/ml	Control	100 µg/ml	50 µg/ml	Control	100 µg/ml	50 µg/ml
0	1275±8	1275±8	1275±8	776±34	776±34	776±34	1479±79	1479±79	1479±79	1479±79	1479±79	1479±79
45	1877±3	1217±11	1484±1	1207±108	735±18	907±20	1913±116	1503±22	1783±11	3575±65	2051±76	2592±47
90	1967±62	1016±46	1225±44	1384±65	837±8	819±39	4345±21	2326±38	2484±137	4345±21	2326±38	2484±137
135	2901±149	1162±35	1570±55	1263±10	859±12	868±5	4345±21	2326±38	2484±137	4345±21	2326±38	2484±137

Tabla XXX: Efecto del complejo Rh¹ (CO)₂ (Cl) (5-Cl-2-metilbenzotiazol) sobre la incorporación de (H³)-Timidina, (H³)-Leucina y (H³) Uridina en *L. donovani*, expresado en CPM.

Precursor											
Timidina											
Tiempo	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml
0	1787±98	1787±98	1787±98	712±20	712±20	712±20	1628±153	1628±153	1628±153	1628±153	1628±153
45	3440±178	1679±78	2587±43	1259±7	807±11	1165±13	2226±126	2308±32	2349±228	2349±228	2349±228
90	4688±124	1972±1	3005±68	1879±82	812±30	1154±67	3599±293	1742±21	3437±62	3437±62	3437±62
135	5909±55	1672±101	3063±75	1849±150	751±24	1104±73	6479±100	2591±148	4220±257	4220±257	4220±257

Tabla XXXI: Efecto del complejo [Rh^{III} (2-Bromotiazol)₂ Br₂]⁺ Br⁻ sobre la incorporación de (H³)-Timidina, (H³)-Leucina y (H³)-Uridina en *L. donovani*, expresado en CPM.

Precursor												
Leucina												
Uridina												
Tiempo	Timidina			Leucina			Uridina			Uridina		
	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml
0	1347±46	1347±46	1347±46	505±33	505±33	505±33	4172±171	4172±171	4172±171	4172±171	4172±171	4172±171
45	1908±125	1290±87	1867±53	613±35	380±24	473±26	6918±183	2567±138	3490±47			
90	3264±136	984±18	1454±45	1217±76	359±41	349±15	10767 ±156	2282±152	5415±90			
135	4078±37	1074±86	1373±152	950±81	341±38	372±37	11502±80	2620±29	4398±16			

Tabla XXXII: Efecto del complejo $[Pt^{IV} Cl_6] H_2$ (2-piperacini(1)etilamina) sobre la incorporación de (H^3) -Timidina, (H^3) -Leucina y (H^3) -Uridina en *L. donovani*, expresado en CPM.

Precursor											
Leucina											
Uridina											
Tiempo	Timidina			Leucina			Uridina				
	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml		
0	701±53	701±53	701±53	522±1	522±1	522±1	2052±159	2052±159	2052±159		
45	1378±20	1817±25	1647±64	1038±19	1110±42	1349±97	4410±144	4333±61	1241±140		
90	1354±36	1265±122	1258±23	1198±49	1120±24	872±6	5189±264	4528±228	5148±210		
135	2271±165	2157±14	2148±64	1353±23	1310±176	1372±32	9919±147	8563±100	8659±83		

Tabla XXXIII: Efecto del complejo Rh¹ (CO)₂ (Cl) (2-aminobenzotiazol) sobre la incorporación de (H³)-Timidina, (H³)-Leucina y (H³)-Uridina en *L. donovani*, expresado en CPM.

Precursor												
Tiempo	Timidina				Leucina				Uridina			
	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml
	0	736±60	736±60	736±60	521±2	521±2	521±2	5750±93	5750±93	5750±93	5750±93	5750±93
45	1779±124	1551±7	1526±13	766±1	742±46	781±24	10690±141	9455±200	9815±138	14547±195	13436±11	14547±195
90	2116±4	1836±9	1939±101	1054±9	1077±56	996±10	15296±157	18238±22	18609±200	19455±71	18238±22	18609±200
135	2672±47	2427±23	2524±147	1379±48	1245±138	1323±101	19455±71	18238±22	18609±200	19455±71	18238±22	18609±200

Tabla XXXIV: Efecto del complejo I_r^{III} (Anilinditiocarbamato), sobre la incorporación de (H^3) -Timidina, (H^3) -Leucina y (H^3) -Uridina en *L. donovani*, expresado en CPM.

Precursor											
Tiempo	Timidina				Leucina				Uridina		
	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	
0	590±50	590±50	590±50	445±46	445±46	445±46	445±46	3379±18	3379±18	3379±18	
45	1058±117	704±21	875±24	409±55	520±3	590±8	2321±99	3692±170	2527±152		
90	818±13	751±38	715±10	721±19	741±17	734±18	9389±160	8461±97	9247±190		
135	1914±160	1292±36	1325±22	1089±111	1098±51	973±13	11888±15	9568±41	11734±25		

Tabla XXXVI: Efecto del complejo $[Rh^{III} (Mepacrina)_4 Cl_2]^+ Cl^-$ sobre la incorporación de (H^3) -Timidina, (H^3) -Leucina y (H^3) -Uridina en *L. donovani*, expresado en CPM.

Precursor										
Timidina			Leucina			Uridina				
Tiempo	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	
0	3362±52	3362±52	3362±52	1453±70	1453±70	1453±70	4546±186	4546±186	4546±186	
45	5582±216	4617±128	5136±43	3507±57	3143±72	3304±90	12403 ±113	8452±226	8700±47	
90	5746±150	4077±75	5595±49	3160±173	2840±214	3082±42	12269 ±189	11591±61	12075±26	
135	5903±137	4775±149	5760±31	3587±51	3448±30	3636±18	13810±76	13486±3	14198±38	

Tabla XXXVII: Efecto del complejo [Rh^{III} (Mefloquina)₄ Cl₂]·Cl⁻ sobre la incorporación de (H³)-Timidina, (H³)-Leucina y (H³)-Uridina en *L. donovani*, expresado en CPM.

Precursor										
Precursor										
Precursor										
Tiempo	Timidina			Leucina			Uridina			50 µg/ml
	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	
0	3572±66	3572±66	3572±66	2319±67	2319±67	2319±67	4646±175	4646±175	4646±175	4646±175
45	5638±173	3153±61	2783±108	2742±139	2094±71	2708±91	6135±52	3186±102	3904±133	3904±133
90	4097±3	2452±192	2339±17	2310±106	2296±97	2266±108	6009±26	2534±15	3565±48	3565±48
135	4708±10	1274±80	1895±97	1916±22	1607±67	1856±72	5918±31	2437±143	3844±134	3844±134

Tabla XXXVIII: Efecto del complejo [Rh^{III} (Oxamniquina), Cl₂]⁺ Cl⁻ sobre la incorporación de (H³)-Timidina, (H³)-Leucina y (H³)-Uridina en *L. donovani*, expresado en CPM.

Precursor												
Leucina												
Uridina												
Tiempo	Timidina			Leucina			Uridina			Uridina		
	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml
0	3602±128	3602±128	3602±128	1107±106	1107±106	1107±106	1848±2	1848±2	1848±2	1848±2	1848±2	1848±2
45	4750±32	1199±45	1612±1	1690±117	352±38	349±16	3739±26	884±25	970±6			
50	5013±137	583±10	1337±59	1300±97	339±33	293±54	4743±2	1133±30	893±37			
135	4869±146	869±31	1064±110	1681±53	313±7	469±7	4241±150	709±23	900±20			

Tabla XXXIX: Efecto del complejo cis-Pt^{II} (DDH) (Acido 2,5-dihidroxibencensulfónico), sobre la incorporación de (H³)-Timidina, (H³)-Leucina y (H³)-Uridina en *L. donovani*, expresado en CPM.

Precursor												
Tiempo	Timidina						Leucina			Uridina		
	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml
	0	2859±217	2859±217	2859±217	1347±47	1347±47	1347±47	2799±182	2799±182	2799±182	2799±182	2799±182
45	4476±24	4400±100	489±53	2876±149	1973±26	1680±30	4547±86	4312±65	3923±23	5371±90	5326±81	5306±92
90	4318±131	4767±53	3955±79	2196±119	2358±51	2156±130	6247±157	6316±104	6129±71	6247±157	6316±104	6129±71
135	7032±181	7334±105	7001±101	3604±9	3290±40	3179±114	6247±157	6316±104	6129±71	6247±157	6316±104	6129±71

Tabla XL: Efecto del complejo cis-Pt^{II} (Pentamidina) I₂ sobre la incorporación de (H³)-Timidina, (H³)-Leucina y (H³)-Uridina en *L. donovani*, expresado en CPM.

Tiempo	Precursor											
	Timidina				Leucina				Uridina			
	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml	Control	100µg/ml	50 µg/ml
0	1201±8	1201±8	1201±8	1222±38	1222±38	1222±38	1606±39	1606±39	1606±39	1606±39	1606±39	1606±39
45	3089±1	999±71	1254±26	3124±9	1161±37	1172±2	3962±54	1079±138	1410±70			
90	2903±10	712±48	738±7	2351±197	1038±36	1046±145	3595±112	1130±1	1056±120			
135	3761±107	766±66	897±7	2010±190	798±13	772±8	4182±41	1172±171	1119±38			

Tabla XLI: Efecto del complejo $[Ir^{IV} Cl_6] H_2$ (Pentamidina) sobre la incorporación de (H^3) -Timidina, (H^3) -Leucina y (H^3) -Uridina en *L. donovani*, expresado en CPM.

Precursor											
Precursor											
Tiempo	Timidina				Leucina				Uridina		
	Control	100 µg/ml	50 µg/ml	Control	100 µg/ml	50 µg/ml	Control	100 µg/ml	50 µg/ml	Control	50 µg/ml
	0	949±6	949±6	949±6	732±5	732±5	732±5	3633±33	3633±33	3633±33	3633±33
45	1635±151	923±41	1348±10	1932±79	1609±161	1724±104	6712±61	5446±223	5763±87		
90	1849±59	1158±27	1081±107	2506±40	1768±57	1736±14	9643±232	8268±37	8665±158		
135	2753±114	1641±49	1652±66	2610±15	2252±40	2109±75	13760±34	8021±5	10487±137		

3.4- Estudio ultraestructural de los parásitos tratados con los complejos seleccionados para los ensayos "in vivo"

Las figuras 1a y 1b corresponden a los lotes control, presentando la estructura típica de una célula eucariota. La disposición del núcleo, es por lo general central en forma redondeada u ovalada y con la heterocromatina normalmente repartida. En el citoplasma se aprecian algunas vacuolas autofágicas, mitocondrias, microtúbulos localizados en la vecindad de la membrana citoplasmática, flagelo constituido por 9 pares de microtúbulos periféricos y 1 par central. Igualmente se observa el kinetoplasto con su forma típica en doble hilera.

Las figuras 2, 3, 4, 5 y 6 recogen las estructuras de los parásitos tratados con el complejo metálico correspondiente.



Figura 1a. Ultraestructura de formas promastigotes no tratadas de L. donovani.

N: núcleo; K: kinetoplasto; F: flagelo.



Figura 1b. Ultraestructura de formas promastigotes no tratadas de L. donovani.

N: núcleo; K: kinetoplasto; F: flagelo.



Figura 2. Efecto ultraestructural de la sal $[Pt Cl_6] H_2$ (2-Piperaciniil(1)Etilamina) sobre formas promastigotas de L. donovani.

N: núcleo; K: kinetoplasto; M: mitocondria; L: cuerpo lipídico.



Figura 2 (cont.). Efecto ultraestructural de la sal $[Pt Cl_6] H_2$ (2-Piperacil(1)Etilamina) sobre formas promastigotas de *L. donovani*.

N: núcleo; K: kinetoplasto; M: mitocondria; L: cuerpo lipídico.

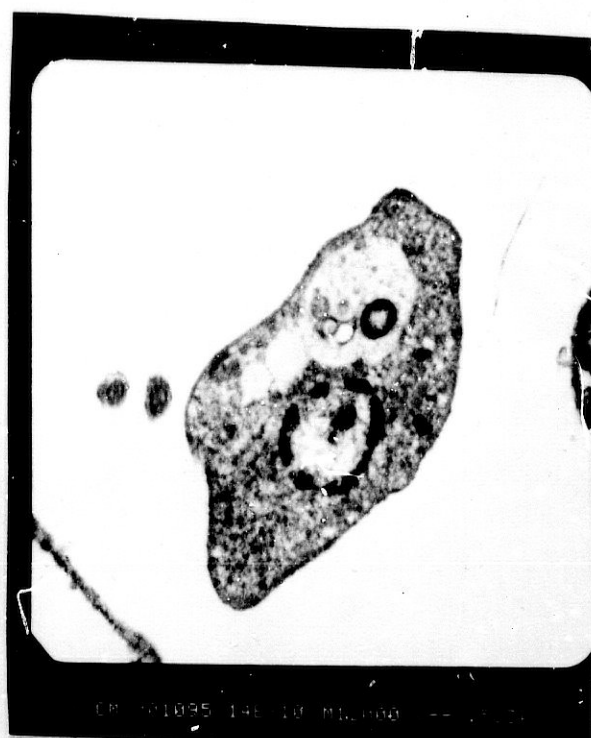
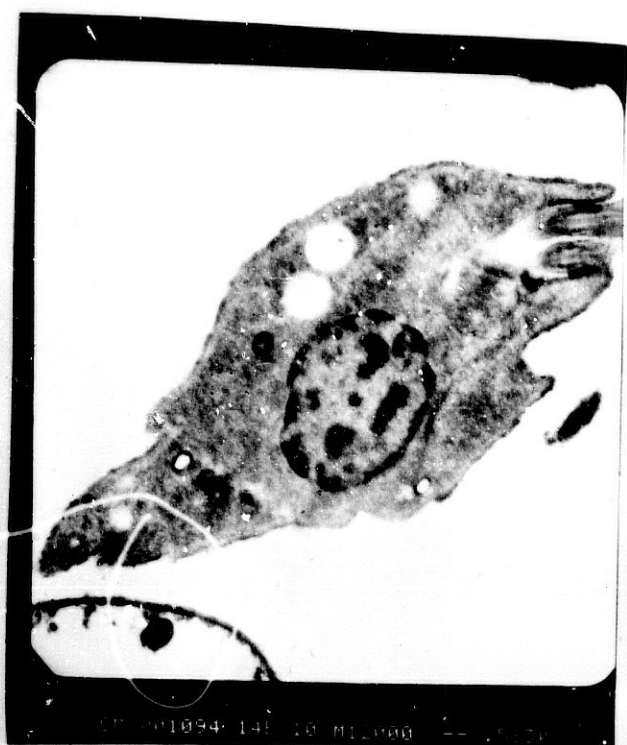


Figura 2 (cont y 3). Efecto ultraestructural de la sal $[\text{Pt Cl}_6] \text{H}_2$ (2-Piperacil(1)Etilamina) sobre formas promastigotas de *L. donovani*.

N: núcleo; K: kinetoplasto; M: mitocondria; L: cuerpo lipídico.

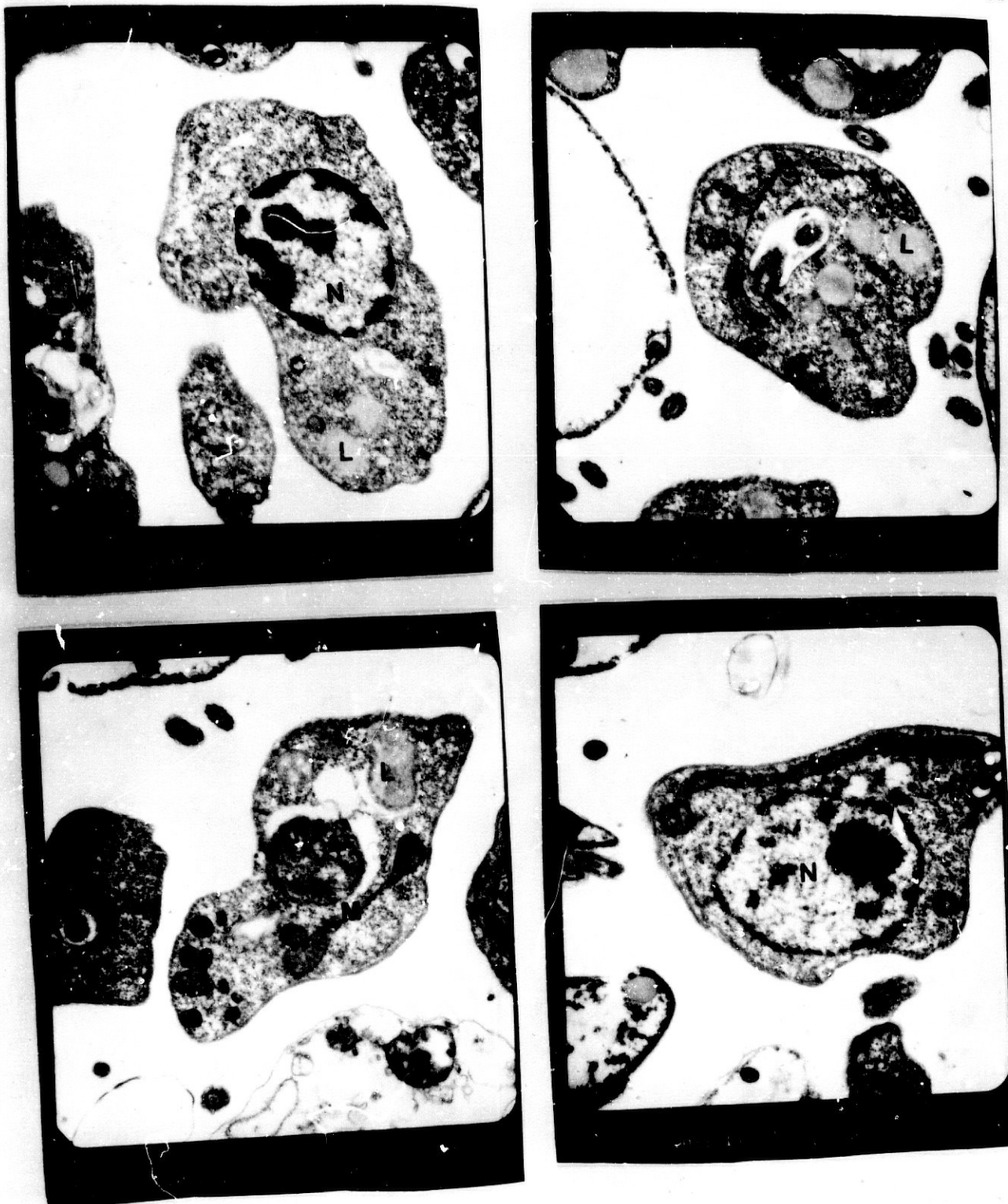


Figura 3. Efecto ultraestructural de la sal $[\text{Ir Cl}_6] \text{H}_2$ (Berenil) sobre formas promastigotas de *L. donovani*.

N: núcleo; K: kinetoplasto; M: mitocondria; L: cuerpo lipídico.



Figura 4. Efecto ultraestructural del complejo Ir (Butilxantato)₃ sobre formas promastigotas de L. donovani.

N: núcleo; K: kinetoplasto; M: mitocondria; L: cuerpo lipídico.

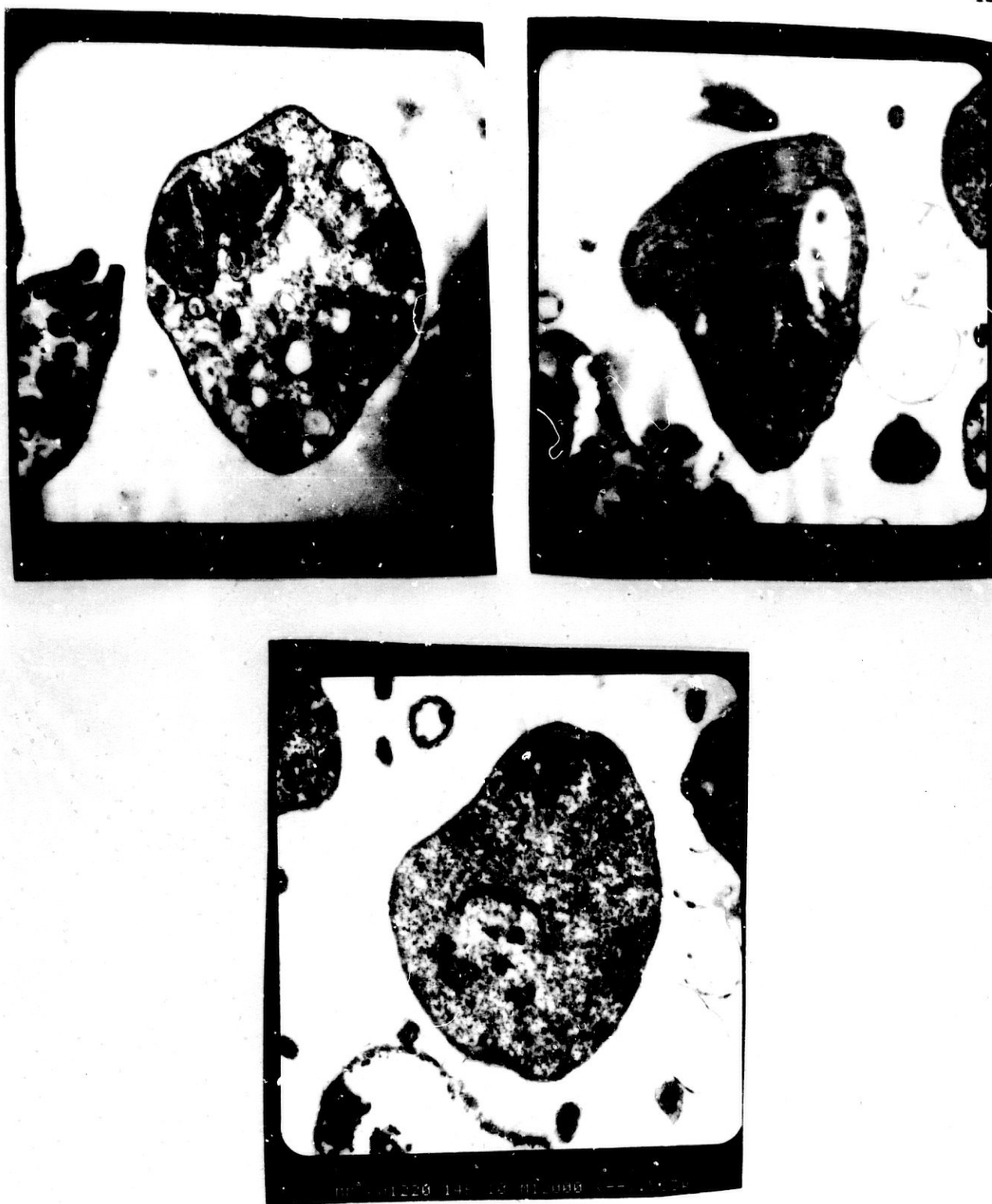


Figura 5. Efecto ultraestructural del complejo $\text{cis-Pt}(\text{Guanidina})\text{Cl}_2$ sobre formas promastigotas de L. donovani.

N: núcleo; K: kinetoplasto; M: mitocondria; L: cuerpo lipídico.

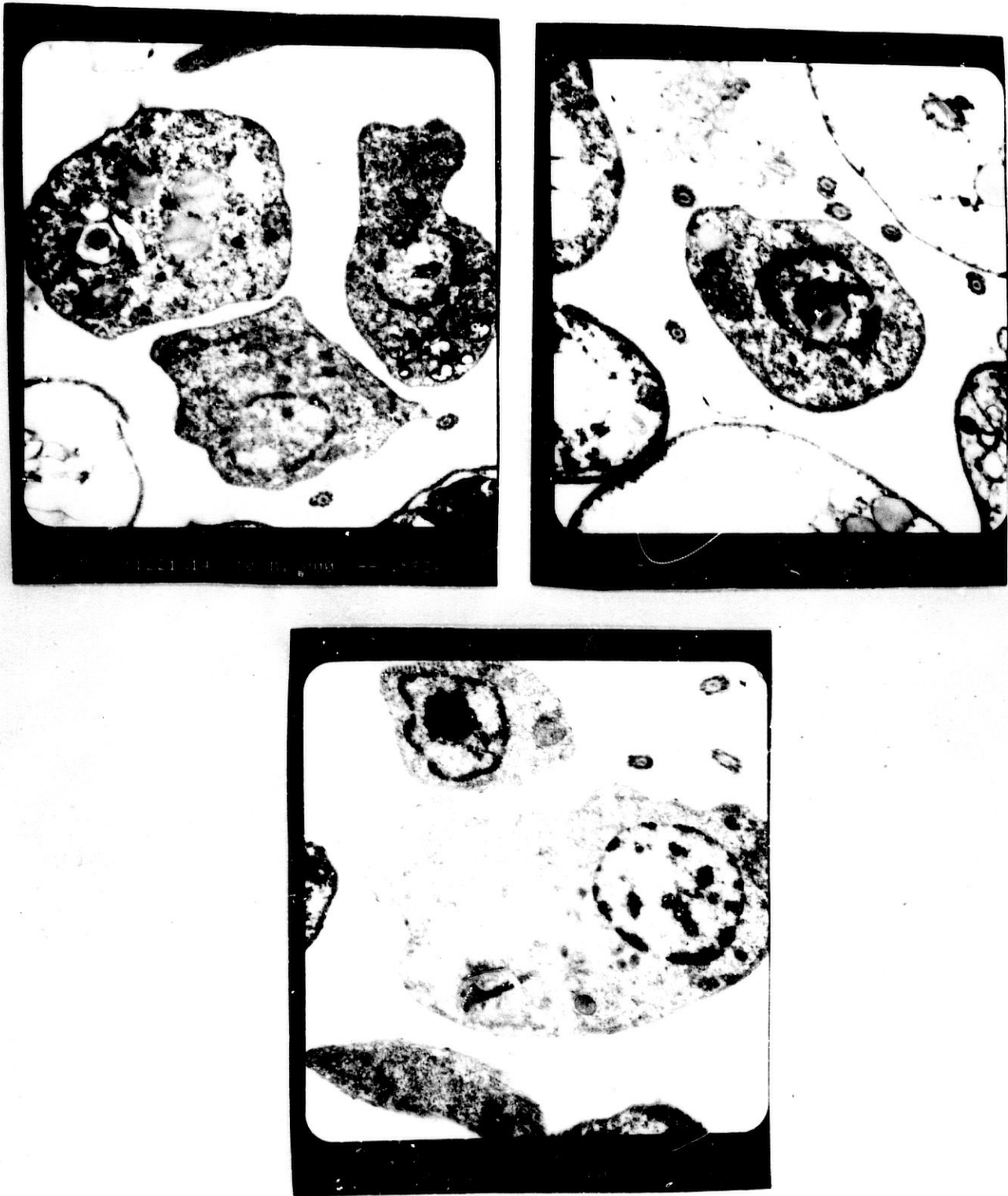


Figura 5 (cont.). Efecto ultraestructural del complejo $\text{cis-Pt}(\text{Guanetidina}) \text{Cl}_2$ sobre formas promastigotas de *L. donovani*.

N: núcleo; K: kinetoplasto; M: mitocondria; L: cuerpo linfoide.

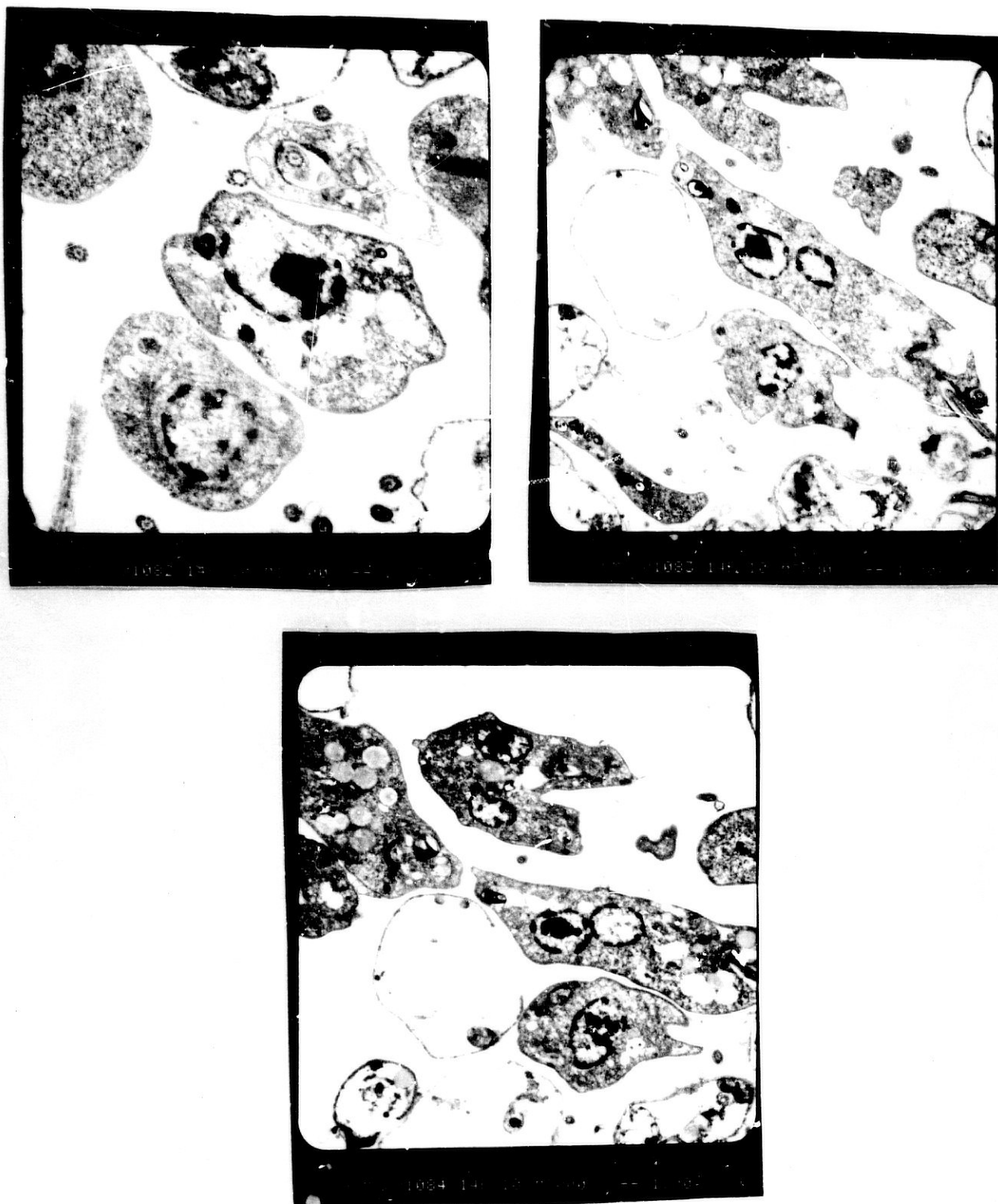


Figura 5 (cont. y 3). Efecto ultraestructural del complejo *cis*-Pu (guanetidina) Cl_2 sobre formas promastigotas de *L. donovani*.

N: núcleo; K: kinetoplasto; M: mitocondria; L: cuerpo lipídico.

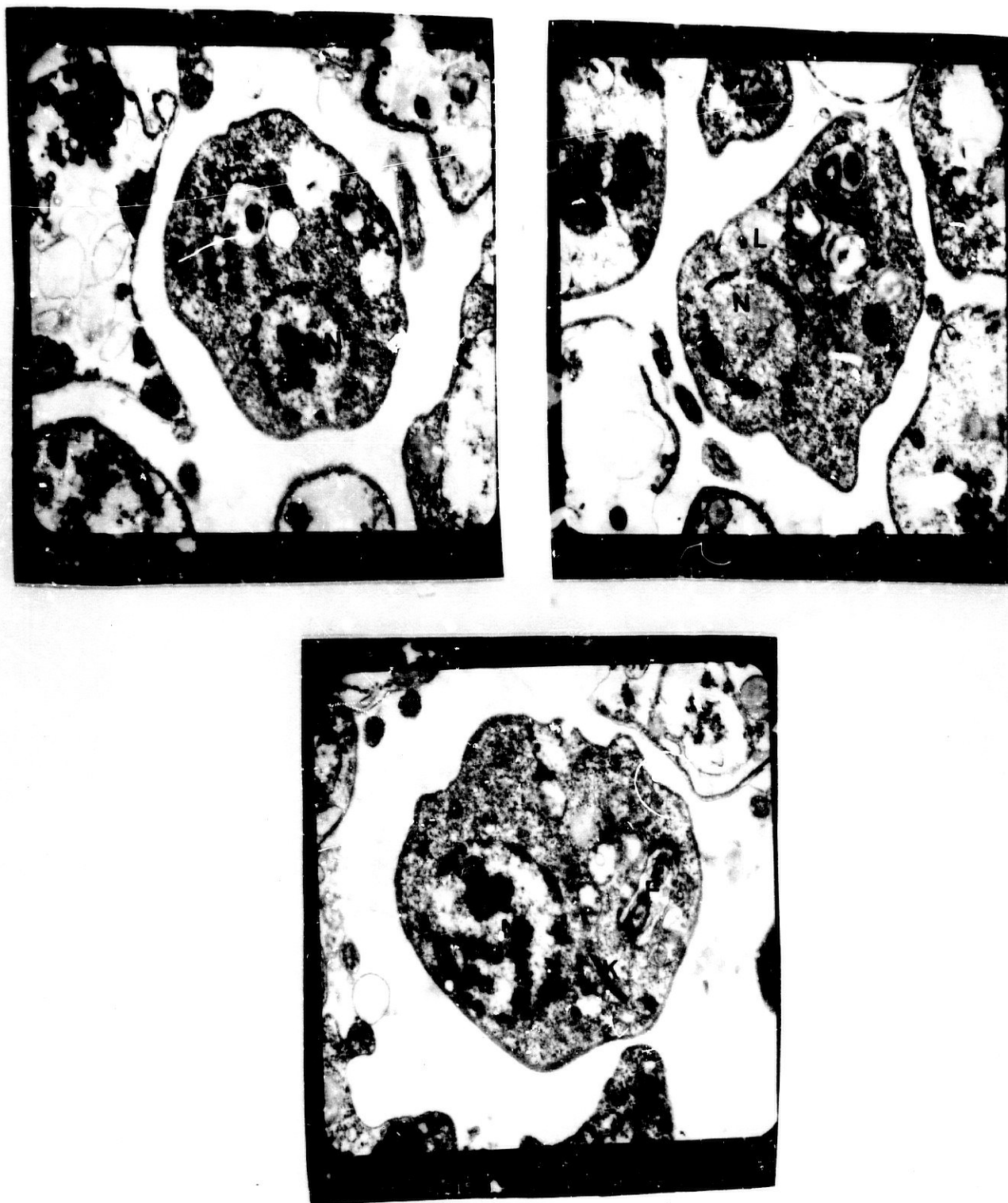


Figura 6. Efecto ultraestructural del complejo [Rh(2-amino-6-etoxibenzotiazol)₄ Br₂]⁺ Br⁻ sobre formas promastigotas de L. donovani.

N: núcleo; K: kinetoplasto; M: mitocondria; L: cuerpo lipídico.

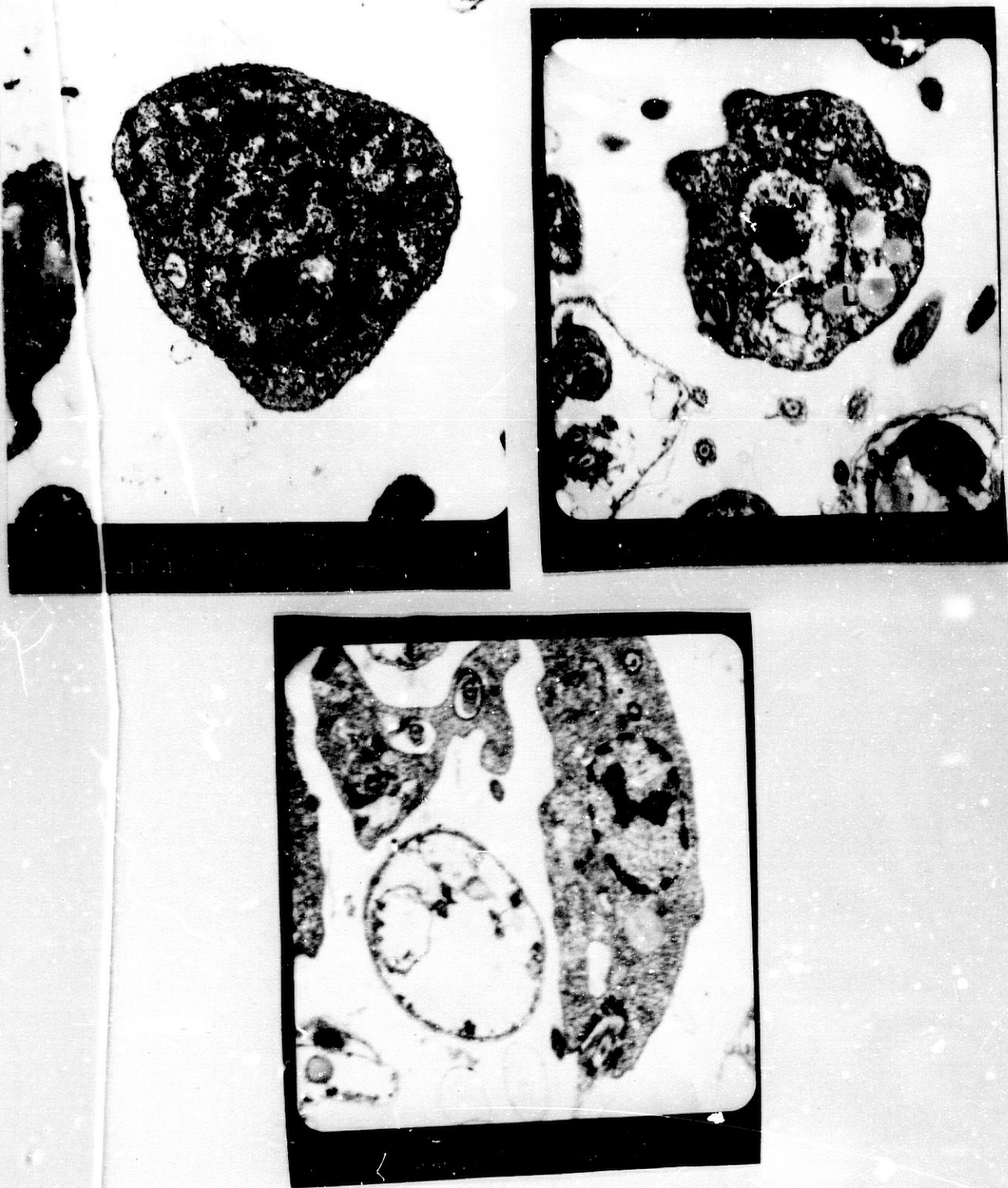


Figura 6 (cont. y 2). Efecto ultraestructural del complejo $[\text{Rh}(2\text{-amino-6-eto\xi\text{benzotiazol)}, \text{Br}_2]^+$
 Br^- sobre formas promastigotas de *L. donovani*.

N: n\xfcleo; K: kinetoplasto; M: mitocondria; L: cuerpo lis\xf3dico.

3.5.- Estudio de la actividad leishmanicida "in vivo"

Los resultados derivados del aislamiento, purificación y recuento microscópico de las formas intracelulares esplénicas, correspondientes a número de amastigotes en bazo (por unidad y por gramo) aparecen recogidos en las tablas XLII, XLIII y XLIV.

Tabla XLII: Efecto de los complejos seleccionados sobre los amastigotes esplenicos de *Leishmania donovani*. ($\times 10^4$).

	Amastigotes/ml	Amastigotes/Bazo	Amastig/g Bazo
Control	37	62	75
[Pt Cl6] H2 (2-Piperacilin(1)Etilamina)	26	26	41
Control	78	78	127
[Ir Cl6] H2 (Berenil)	34	34	57
Control	62	62	94
[Ir (Butilxantato)3]	25	25	46
Control	42	42	66
Cis-Pt(Guanetidina) Cl2	12	12	15
Control	48	96	142
[Rh(2-amino-6-etoxibenzotiazol)4 Br2]+ Br-	34	34	47

Tabla XLIII: Efecio de los complejos seleccionados sobre la parasitación esplénica de ratas "Wistar" infectadas con *Leishmania donovani*.

	Porcentaje de Parasitación
Control	5
[Pt Cl6] H2 (2-Piperacínil(1)Etilamina)	0.8
Control	6
[Ir Cl6] H2 (Berenil)	1
Control	5
[Ir (Butilxantato)3]	2
Control	8
Cis-Pt(Guanetidina) Cl2	3
Control	8
[Rh (2-amino-6-etoxibenzotiazol)4 Br2]+ Br-	1.5

Tabla XLIV: Determinación de la viabilidad de amastigotes esplenicos por captación de aminoácidos marcados.

	CPM
Control	6528
[Pt Cl6] H2 (2-Piperacínil(1)Etilamina)	5565
Control	4676
[Ir Cl6] H2 (Berenil)	4263
Control	3828
[Ir (Butilxantato)3]	4018
Control	3743
Cis-Pt(Guanetidina) Cl2	1892
Control	7044
[Rh(2-amino-6-etoxibenzotiazol)4Br2]+Br-	3843

IV. DISCUSSION

4.-DISCUSION

Ante la necesidad de establecer una quimioterapia eficaz de la leishmaniosis visceral, dada la problemática desencadenada por el empleo de fármacos convencionales, se ha evaluado el efecto letal desarrollado por diferentes complejos metálicos de nueva síntesis sobre el crecimiento de formas promastigotes de Leishmania donovani (LCR - L 133) en cultivo.

Tradicionalmente en la quimioterapia frente a Leishmania se han utilizado complejos metálicos derivados del Sb o As. En la actualidad los compuestos antimoniales son los de elección para el tratamiento de la leishmaniosis visceral o Kala-azar. Los compuestos empleados son fundamentalmente el estibogluconato sódico (Pentostam[®]) (Smith et al. 1980; Rees et al. 1984) y el antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) (Peters, 1983; Neal, 1983).

Sin embargo el hecho de la elevada toxicidad que inducen estos medicamentos, tanto a nivel renal como cardíaco (Thakur, 1986; Veiga et al. 1985; Chulay et al. 1985b), al igual que la quimioterapia alternativa actual (Pentamidina, Estilbamidina, Formycin B, etc...) (Bryceson et al. 1985; Naafs, 1985; Berman et al. 1983), hace que en estos momentos sean muchos los investigadores que orientan sus estudios a conseguir una quimioterapia eficaz y a ser posible exenta de efectos secundarios.

Es sabido que determinados agentes antineoplásicos poseen actividad tripanocida "in vivo" (Kinnamon et al. 1979; Osuna et al. 1983; Craciunescu et al. 1988). Este hecho puede ser aclarable a una cierta semejanza entre el metabolismo de estos parásitos y el de las células tumorales (Borst, 1977; Grady et al. 1984).

El primer objetivo de este trabajo fué el determinar los efectos de distintos compuestos sobre el crecimiento del parásito. Posteriormente y con objeto de eliminar aquellos complejos que indujeran toxicidad celular realizamos un estudio de citotoxicidad con macrófagos J 774. Después en un intento de estudiar el modo de acción de los compuestos más activos se evaluaron los efectos que ejercen sobre la biosíntesis de macromoléculas en el protozoo a partir del estudio de la incorporación de precursores marcados. Así mismo se han estudiado las modificaciones ultraestructurales que se producen sobre las formas promastigotes en cultivo tras el tratamiento con los diferentes compuestos con dosis efectivas.

Por último realizamos ensayos "in vivo" sobre ratas wistar con los complejos más activos "in vitro", a dosis no tóxicas para los hospedadores y que respondían a cada una de las diferentes estructuras.

El conjunto de estos datos nos ha permitido obtener una visión bastante aproximada de la acción que puedan tener dichos complejos sobre las formas promastigotes y amastigotes de *L. donovani*.

4.1. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LEISHMANICIDA IN VITRO

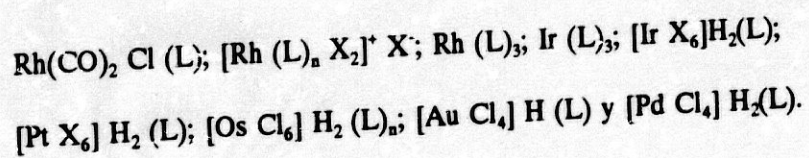
Los problemas que han planteado los complejos metálicos clásicamente antitumorales como el cis-DDP son principalmente su elevada toxicidad e ineficacia a bajas dosis (Cleare, 1974).

Sin embargo se han descrito ventajas en la acción frente a T. rhodesiense al ser administrado "in vivo" bien hidratado o unido a disulfiran (Wysor et al. 1982).

Farrell et al (1984) en un intento por aumentar el efecto antitripanosómico del cis-DDP unieron a la molécula diferentes compuestos, obteniendo así complejos metálicos generalmente menos tóxicos que el citado.

Nuestros estudios se realizaron con complejos de estructura análoga al cis-DDP en los que los átomos de Cl se sustituyeron por otras moléculas: cis-Pt (NH₃)₂ (X)_n, con objeto de disminuir su toxicidad. O bien sus grupos amino se sustituyeron por compuestos de mayor liposolubilidad, teniendo presentes los resultados obtenidos por Ruiz-Perez (1988) según los cuales al aumentar la liposolubilidad de los ligandos aumentaba la actividad frente a las formas epimastigotas de T. cruzi. Así se emplearon como ligandos compuestos de conocida acción antitumoral como el diamino ciclohexano (DLH) o con otras actividades también conocidas como la tranilcipromina (inhibidor de la MAO); Oxamniquina, Pentamidina, Estilbamidina, Mefloquina, Mepacrina, Lampit o Nifurtimox, Niridazol, Tinidazol, Alopurinol, Pyrantel (antiparasitarios); Leukeran y Berenil (intercalante del DNA).

Por otra parte también nos planteamos ensayar la acción de otros complejos de Rh(I), Rh(III), Ir(III), Ir(IV), Pt(IV), Os(IV), Au(III) y Pd(II):



Todos ellos de probada acción antitumoral y algunas de estas estructuras habían mostrado ya una alta actividad frente a T. cruzi y/o L. donovani (Ruiz-Perez et al. 1986, 1988; Mesa Valle et al. 1989).

4.1.1.- Acción de los complejos neutros del cis-Pt(II)

Como se deduce de los resultados reflejados en la tabla I, los complejos: cis-Pt (DDH) (X)_n no resultaron ser muy activos "in vitro" frente a las formas promastigotas de L. donovani. Cabe destacar la acción del complejo cis-Pt (DDH) (Rojo de metilo) (NO₃) que a las 24 horas del tratamiento prácticamente no actuaba sobre los parásitos pero su acción aumentó con el tiempo y a las 72 horas incluso a la menor concentración ensayada inhibía ligeramente el crecimiento.

El resto de los complejos metálicos ensayados con esta estructura no muestran interés dada su escasa actividad.

Como se puede apreciar en la tabla II, este tipo de complejos son mas activos que los anteriores.

El complejo cis-Pt(2,3,4,5,6-Pentafluorocanilina)₂ Br₂ mostró una gran actividad; a 100 µg/ml su efecto fué letal para los parásitos a las 24 horas del tratamiento. A la concentración de 10 µg/ml inhibió el crecimiento alrededor del 20% para los tres tiempos estudiados.

Sin embargo al eliminar un átomo de Fluor en el ligando: cis-Pt (2,3,5,6-Tetrafluoroanilina)₂ Br₂ la actividad disminuye considerablemente.

También resultó ser muy activo el cis-Pt(Pentamidina) I₂, a la concentración mayor, a las 24 horas del tratamiento y para 10 µg/ml a las 48 y 72 horas frente a las formas promastigotes de L. donovani ejerciendo a la menor concentración una inhibición del crecimiento elevada.

Estos resultados son muy semejantes a los obtenidos por Mesa-Valle et al. (1989) para la Pentamidina libre sobre promastigotes de L. donovani. No ocurriendo lo mismo para el caso del Lampit^R que al formar el complejo cis-Pt (Lampit) Cl₂ pierde toda actividad frente al protozoo.

Ruiz-Perez et al. (1986) ensayaron la acción del complejo cis-Pt(Pentamidina) Cl₂ frente a formas epimastigotas de T. cruzi, la inhibición del crecimiento nunca llegó con este parásito al 100%, resultados semejantes a los obtenidos para la Pentamidina libre frente a T. cruzi por Mesa-Valle et al. (1989).

De todo lo anterior deducimos que nuestros resultados no coinciden con los obtenidos por Ruiz-Perez et al. (1986) para las formas epimastigotas de T. cruzi; según estos autores los complejos derivados del cis-Pt(II) que llevaban Cl en su estructura eran más activos que los que llevaban otro halógeno. En nuestros ensayos obtuvimos los mejores resultados con 2 complejos cuyos halógenos eran Br y I. Quizás los diferentes resultados se deban a diferencias entre el metabolismo, captación, metabolización, etc, de ambos protozoos parásitos.

FIGURA 7. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS EN CULTIVO, EN PRESENCIA DE cis-Pt (2,3,4,5,6-Pentafluoroanilina)₂ Br₂

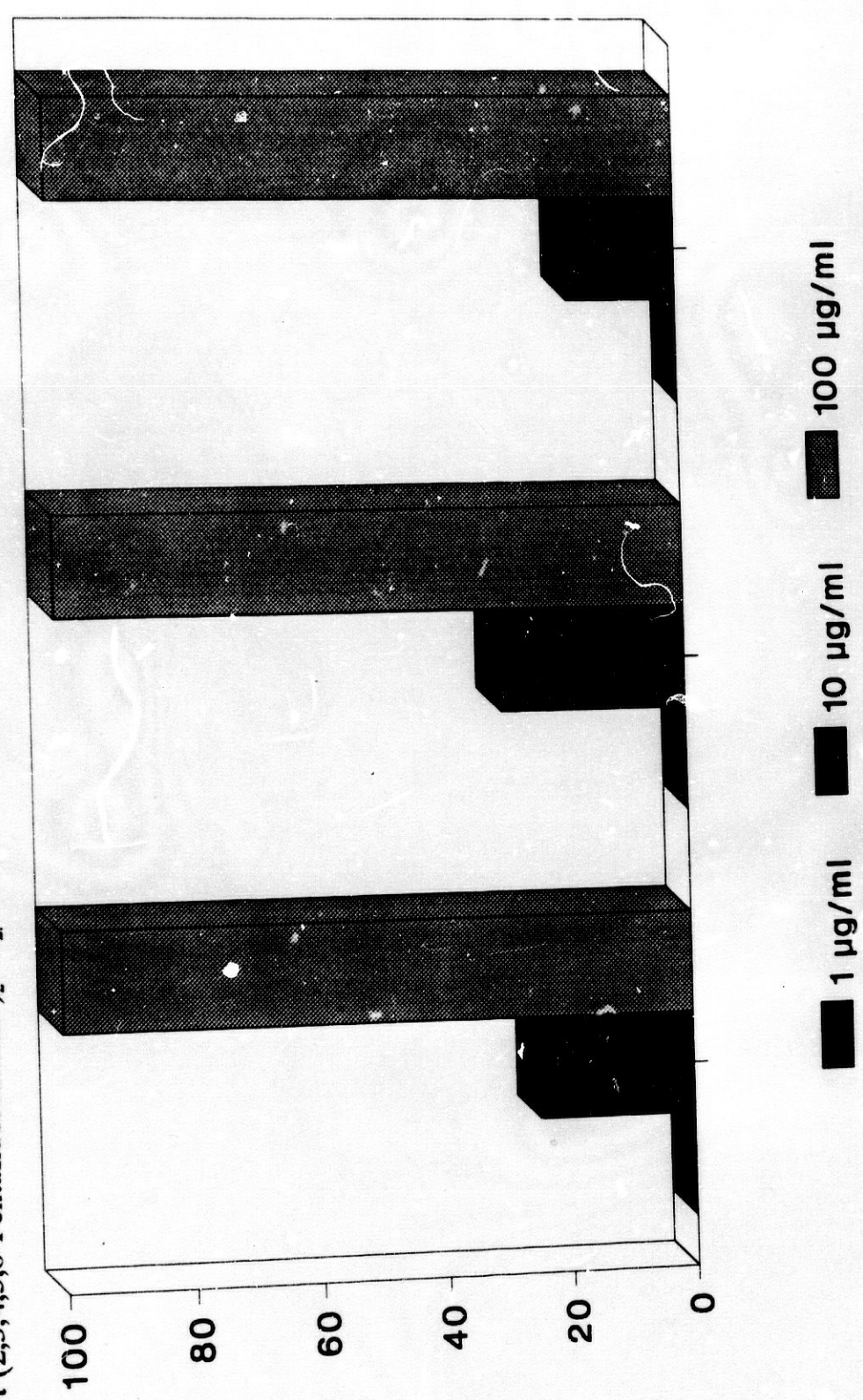


FIGURA 8. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS EN CULTIVO, EN PRESENCIA DE *cis*-Pt (2,3,5,6-Tetrafluoroanilina)₂ Bt₂.

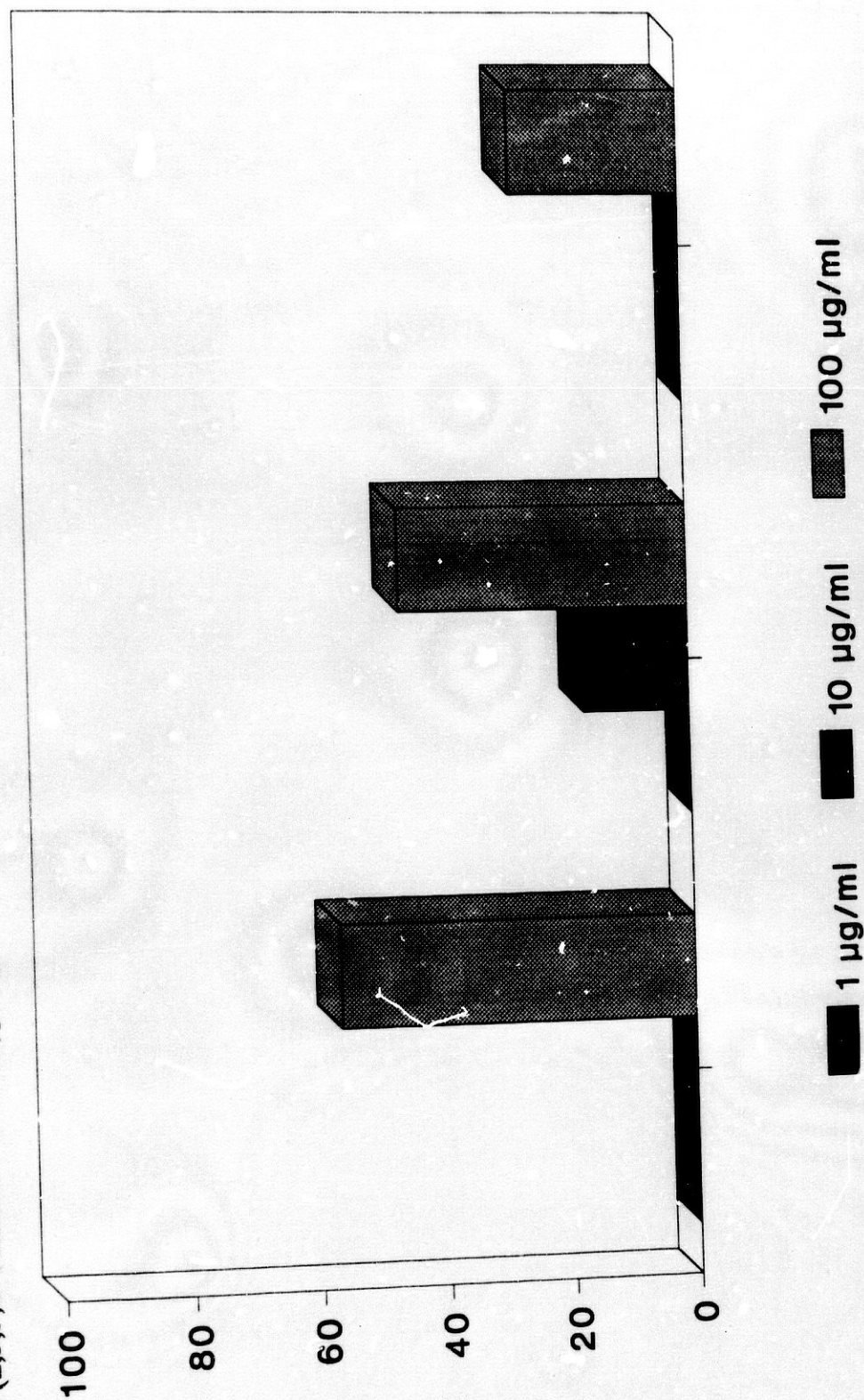


FIGURA 9. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS EN CULTIVO, EN PRESENCIA DE cis-Pt(Guanetidina) Cl₂.

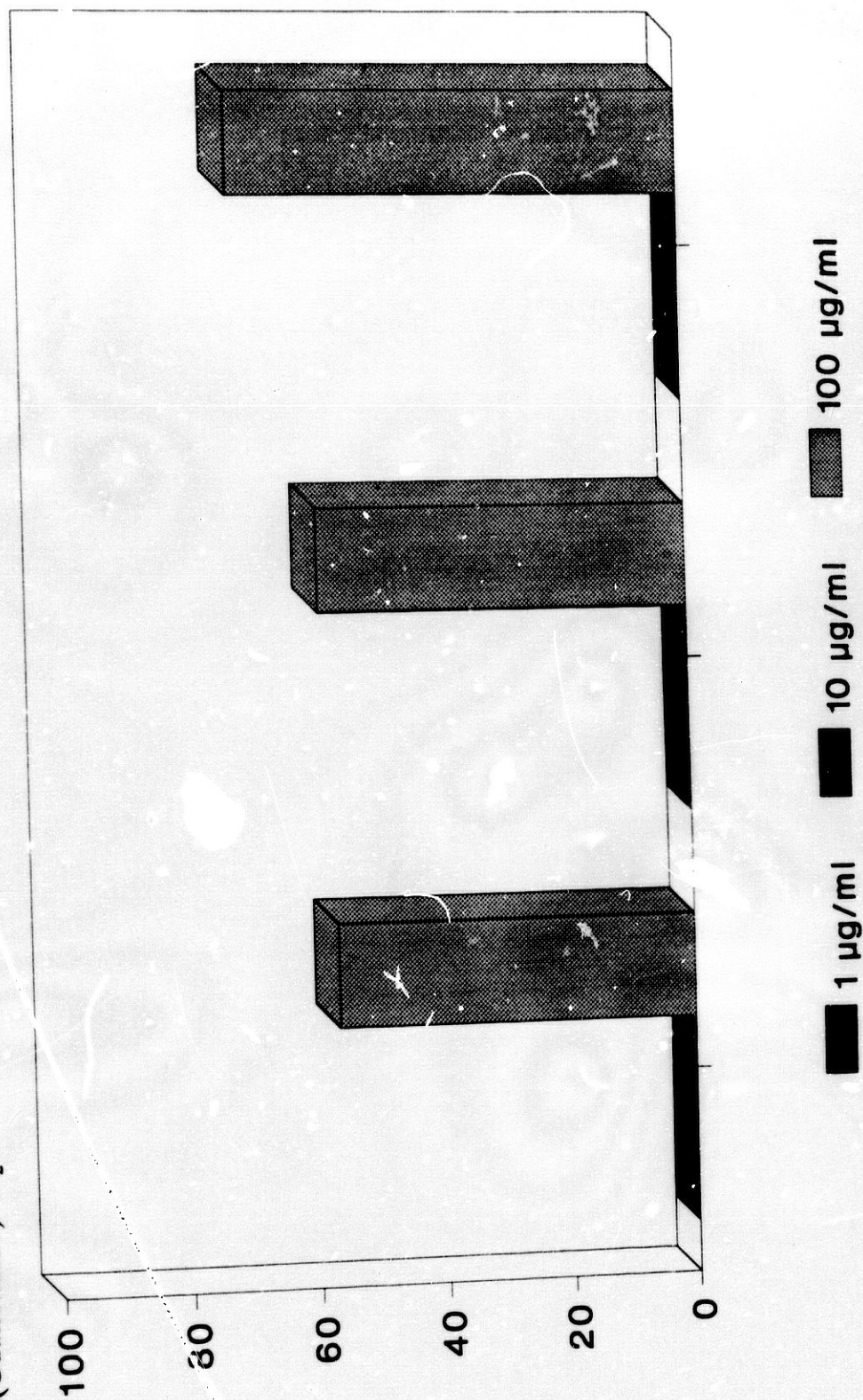


FIGURA 10. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS EN CULTIVO, EN PRESENCIA DE $\text{cis-Pt}(\text{Octodryl})_2 \text{Cl}_2$.

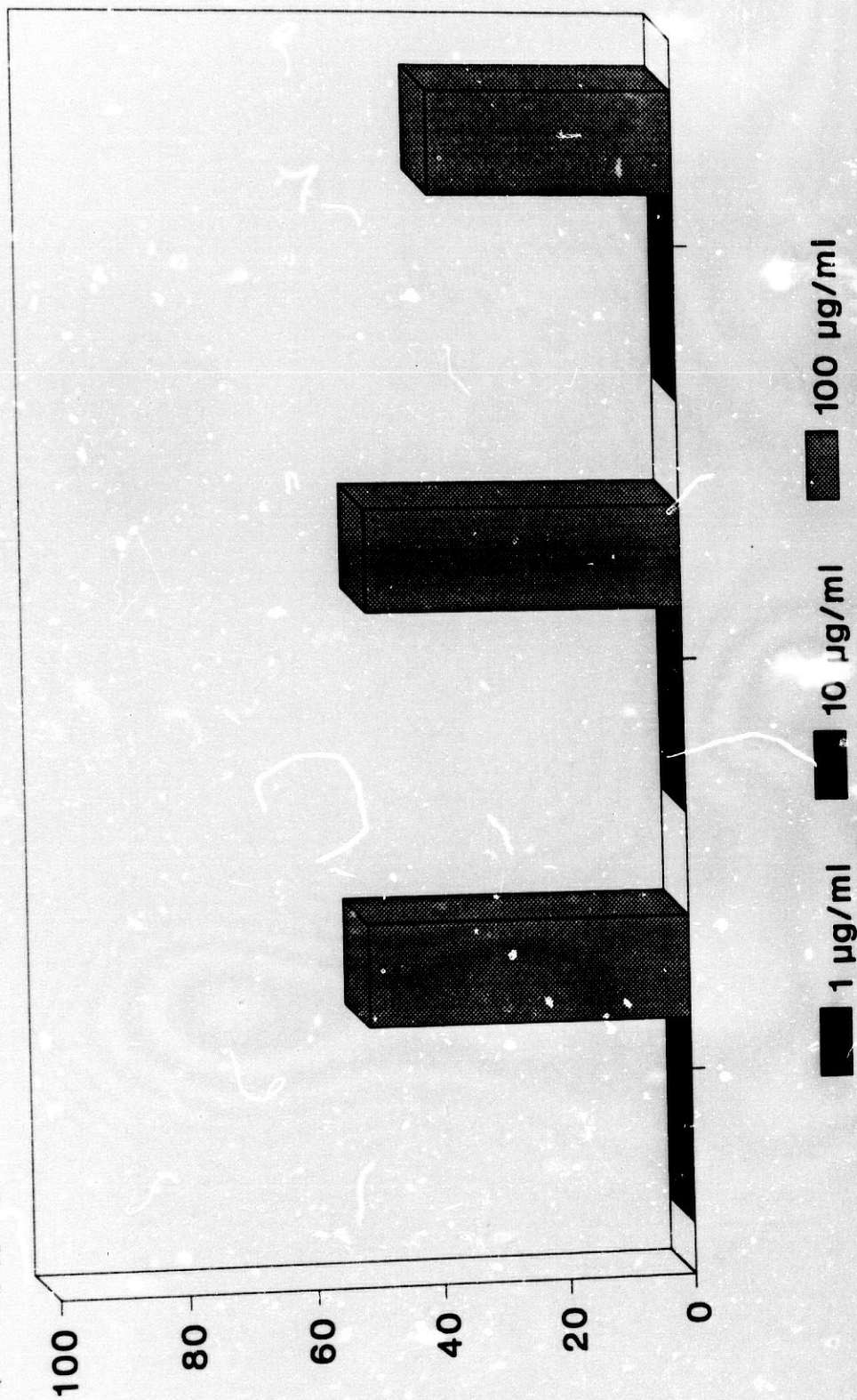


FIGURA 11. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS EN CULTIVO, EN PRESENCIA DE $\text{cis-Pt}(\text{Tranylcipromina})_2 \text{Br}_2$.

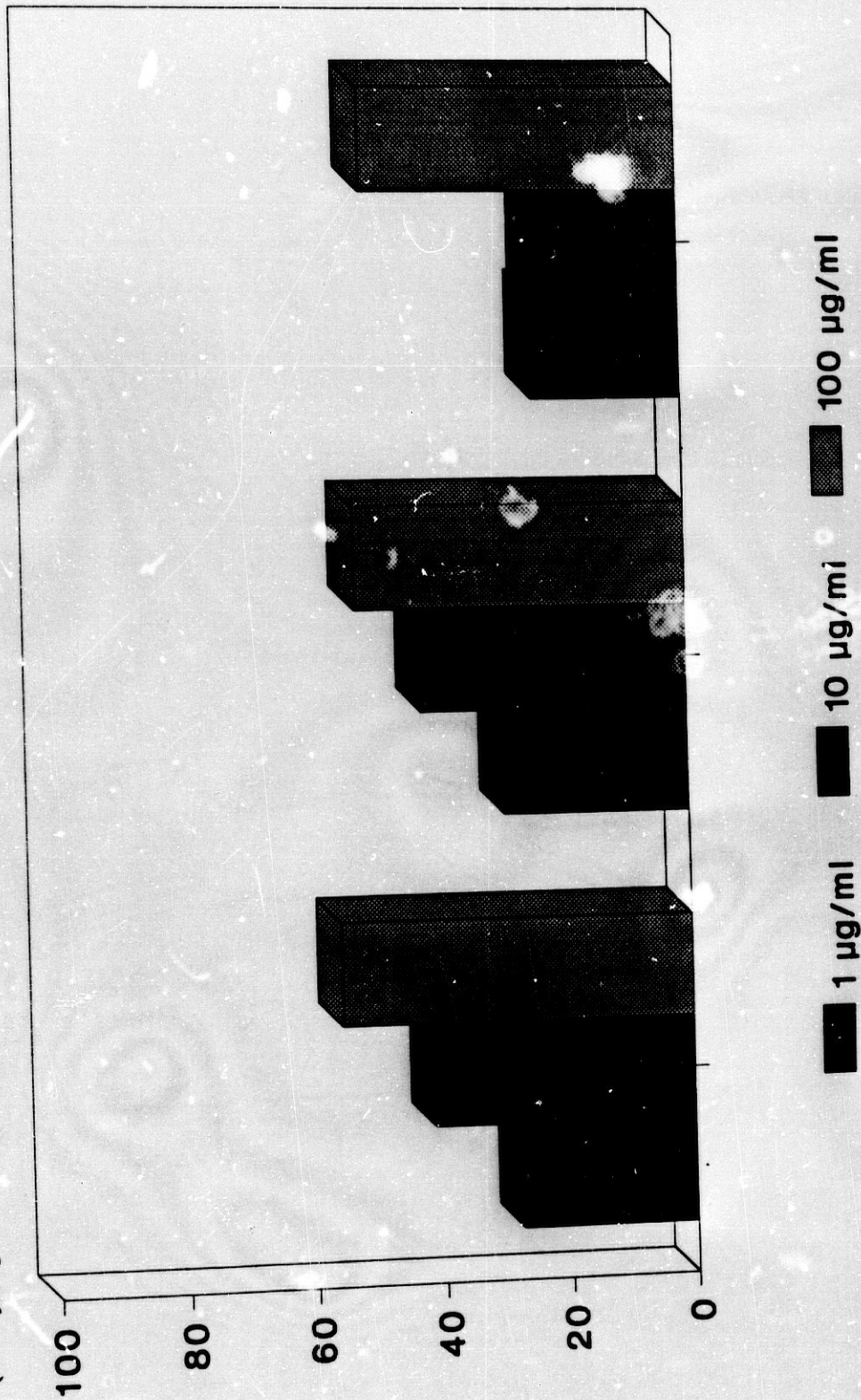


FIGURA 12. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS EN CULTIVO, EN PRESENCIA DE cis-Pt(Pentamidina) I₂.

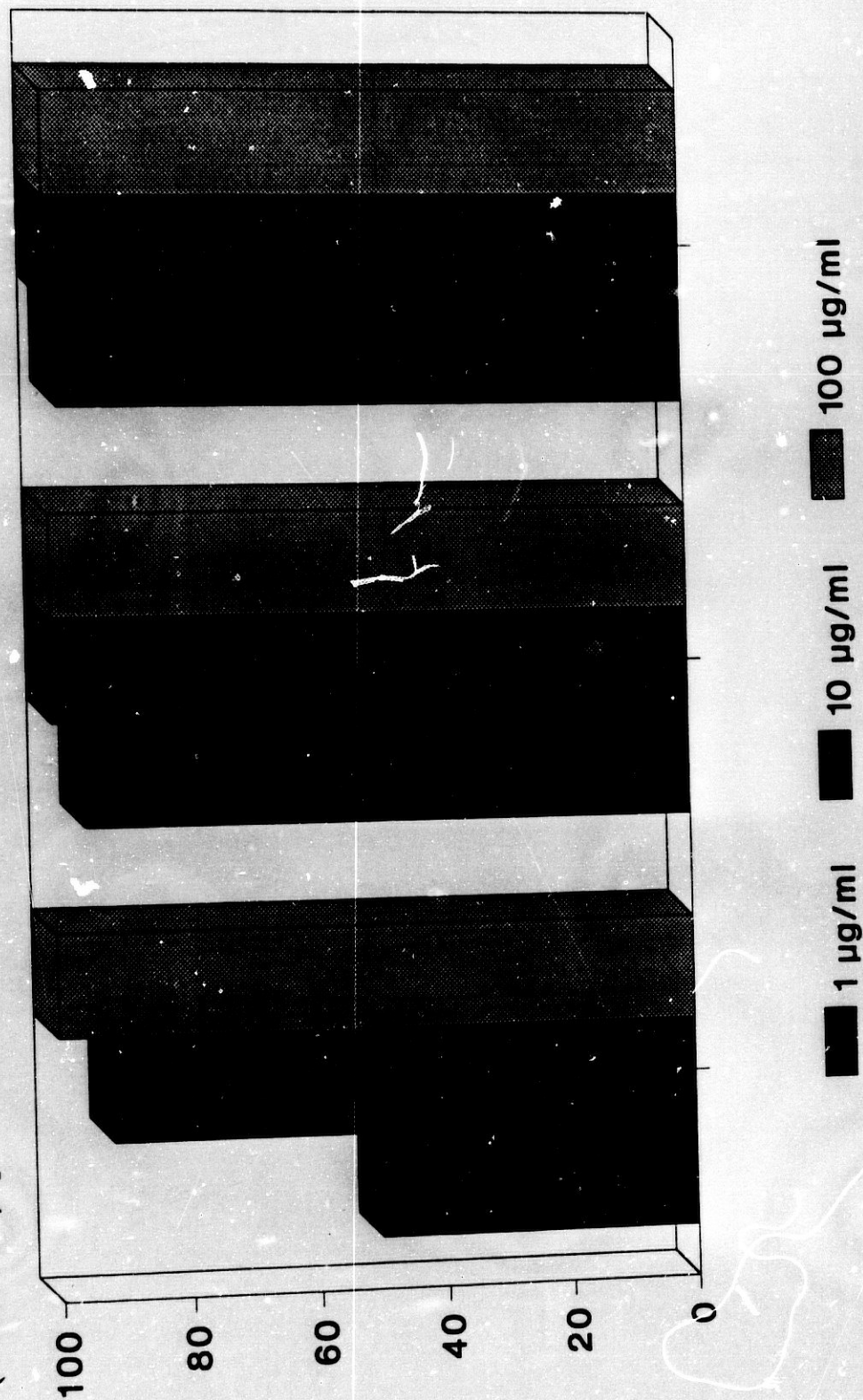
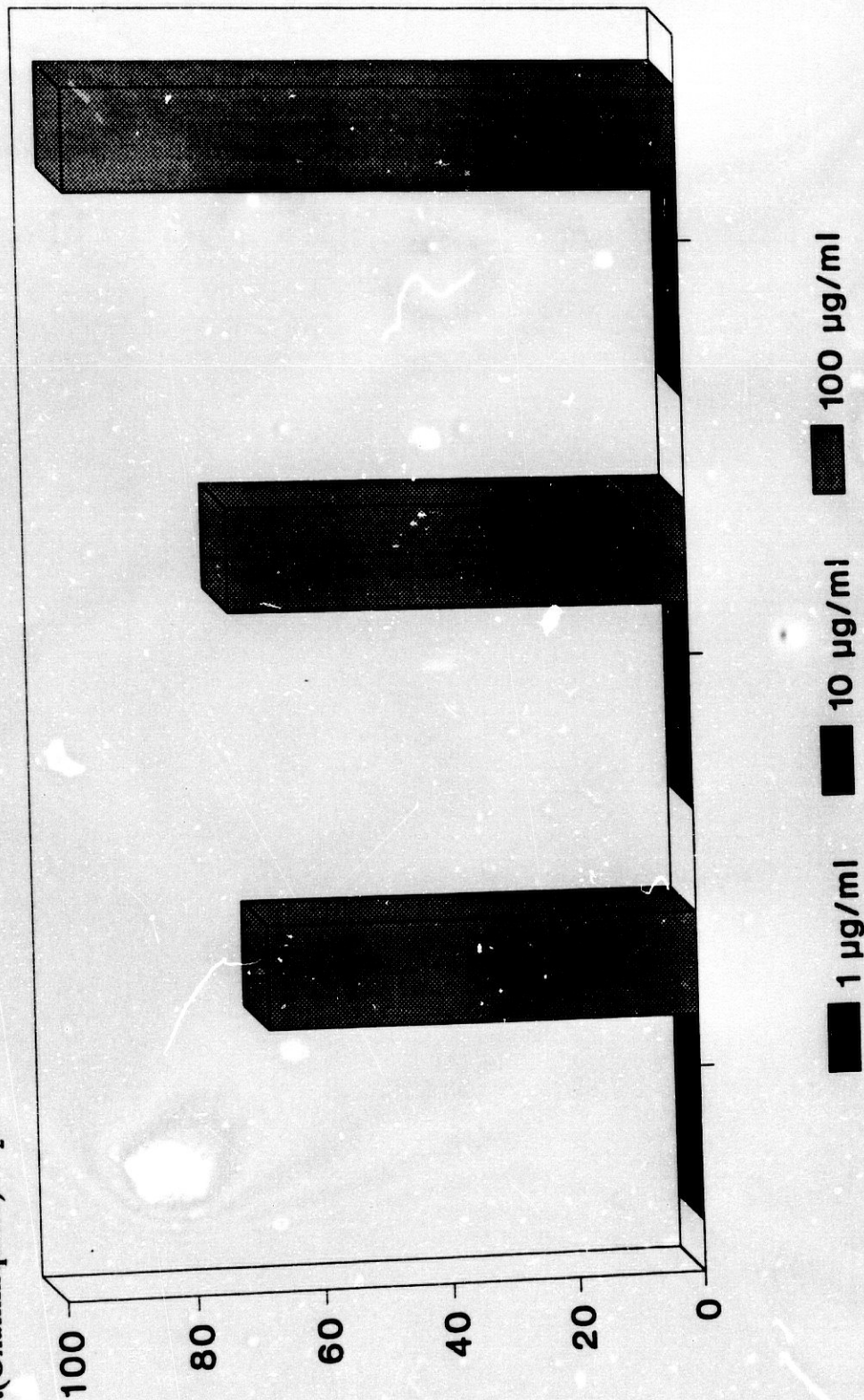


FIGURA 13. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS EN CULTIVO, EN PRESENCIA DE cis-Pt(Oxamniquina) Cl₂.



4.1.2. Acción de los complejos de Rh(I) y Rh(III)

Actualmente los complejos de Rh, tanto de Rh(I) como de Rh(III) se están empleando como una alternativa a la quimioterapia antitumoral de los complejos derivados de cis-Pt(II), obteniéndose resultados efectivos frente a tumores y bacterias (Dehand y Jordanov, 1976; Craciunescu et al. 1982, 1987).

Los complejos de Rh(I) similares al cis-DDP teniendo una configuración cuadrada plana, han sido examinados por su actividad antineoplásica en animales experimentales. Giraldi et al. (1974, 1977) ensayan complejos de Rh(I) observando diferentes grados de actividad dependiendo de la naturaleza de los grupos unidos presentes en la molécula.

Entre la bibliografía consultada no existen trabajos con este tipo de complejos sobre protozoos parásitos en general ni sobre L. donovani en particular.

En el presente trabajo una parte de nuestra atención la hemos centrado en complejos del Rh(I) con estructura: $\text{Rh}(\text{CO})_2 \text{Cl}(\text{L})$ donde L es un derivado del tiazol. Tanto bajo la forma monómera como dímera: $\text{Rh}_2(\text{CO})_4 \text{Cl}_2$. Algunos de estos complejos han sido ensayados frente a tumores P 388, L 1210 y S 180 (ascítico) con actividad antitumoral moderada (Craciunescu et al. 1985).

En nuestras experiencias los dos complejos seleccionados para las siguientes experiencias por haber inducido porcentajes de inhibición del crecimiento elevados han sido: $\text{Rh}(\text{CO})_2 \text{Cl}$ (2-aminobenzotiazol) y $\text{Rh}(\text{CO})_2 \text{Cl}$ (5-Cl-2-metilbenzotiazol).

Craciunescu et al. (1987) miden la actividad antitripanosómica de complejos neutros del Rh(III): $Rh(L)_3$, frente a ratas infectadas con T. brucei brucei y/o T. congolense, llegando a la conclusión que existe una relación bien definida entre la actividad antitumoral y la actividad antitripanosómica. Cuanto mas potente actua un complejo del Rh(III) sobre los tumores mas fuerte actuaría como agente antitripanosómico.

Estos autores tambien afirman que hay una relación lineal entre la actividad antitumoral y la fuerza del enlace Rh-S tanto para los ligandos ditiocarbamatos como en el caso de los ligandos xantatos.

En nuestros ensayos los ligandos para el Rh(III) siempre fueron xantatos a excepción del complejo: Rh (Piperacinditiocarbamato)₃ que curiosamente no presentó ninguna actividad frente a los promastigotes de L. donovani.

Los otros cinco complejos ensayados con esta estructura sí ejercieron efecto, siendo el mas activo el Rh (Etilxantato)₃ con porcentajes de inhibición del crecimiento próximos al 100% incluso a 1 μ g/ml. A la mayor concentración los parásitos estaban muertos a todos los tiempos.

De los complejos ensayados del Rh(III) con estructura octaédrica: $[Rh(L)_2X_2]^+ X^-$ mostraron actividades elevadas aquellos complejos cuyo ligando era un derivado del tiazol: (2-amino-6-etoxibenzotiazol) y (2-Bromotiazol), resultados que coinciden con los obtenidos por Ruiz-Perez et al. (1988) para T. cruzi.

Sin embargo según este autor los complejos con Cl en su estructura parecen ser mas activos, no ocurriendo así en nuestro caso ya que la actividad parece depender de la naturaleza del ligando exclusivamente.

Es de destacar la acción ejercida por el complejo: $[\text{Rh} [2\text{-dimetilamino (1-metil-2-nitroimidazol-5il) metoxiacetanilida}]_4 \text{Cl}_2]^+ \text{Cl}^-$, los parásitos aparecían muertos a las 24 horas y a la mayor concentración de producto ensayado.

Por otro lado se ensayaron complejos iónicos octaédricos del Rh(III) en los que el ligando era una molécula de conocida acción antiparasitaria como: Alopurinol, Mefloquina, Mepacrina, Niridazol, Oxamniquina; Primaquina y Tinidazol, siempre con el Cl en su estructura.

Los complejos con Alopurinol, Niridazol y Primaquina como ligandos, no mostraron actividad a pesar de su actividad anti-leishmania como radicales libres (Marr y Berens, 1977; Peters et al. 1980).

Siendo muy activos los complejos cuyos ligandos eran Mefloquina, Mepacrina y Oxamniquina los cuales producían un efecto letal a $100 \mu\text{g/ml}$ y a las 24 horas de tratamiento. Incluso cuando el ligando eran la Mefloquina y la Mepacrina este efecto se observaba a $10 \mu\text{g/ml}$ pero a las 48 y 72 horas del tratamiento.

FIGURA 14. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS EN CULTIVO, EN PRESENCIA DE Rh (CO)₂ Cl (2-aminobenzotiazol).

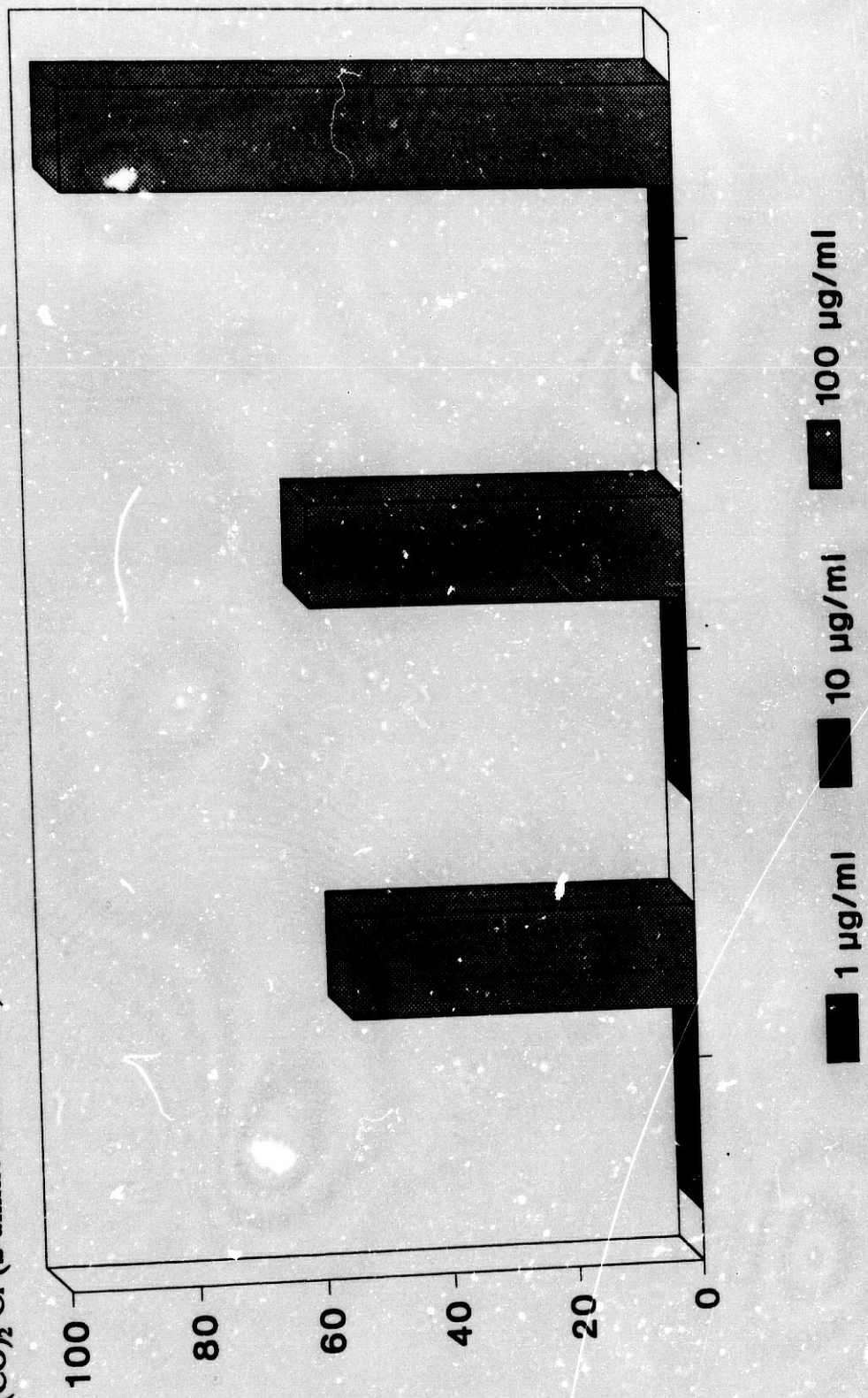


FIGURA 15. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS EN CULTIVO, EN PRESENCIA DE Rh (CO)₂ Cl (5-Cl-2-metilbenzotiazol)

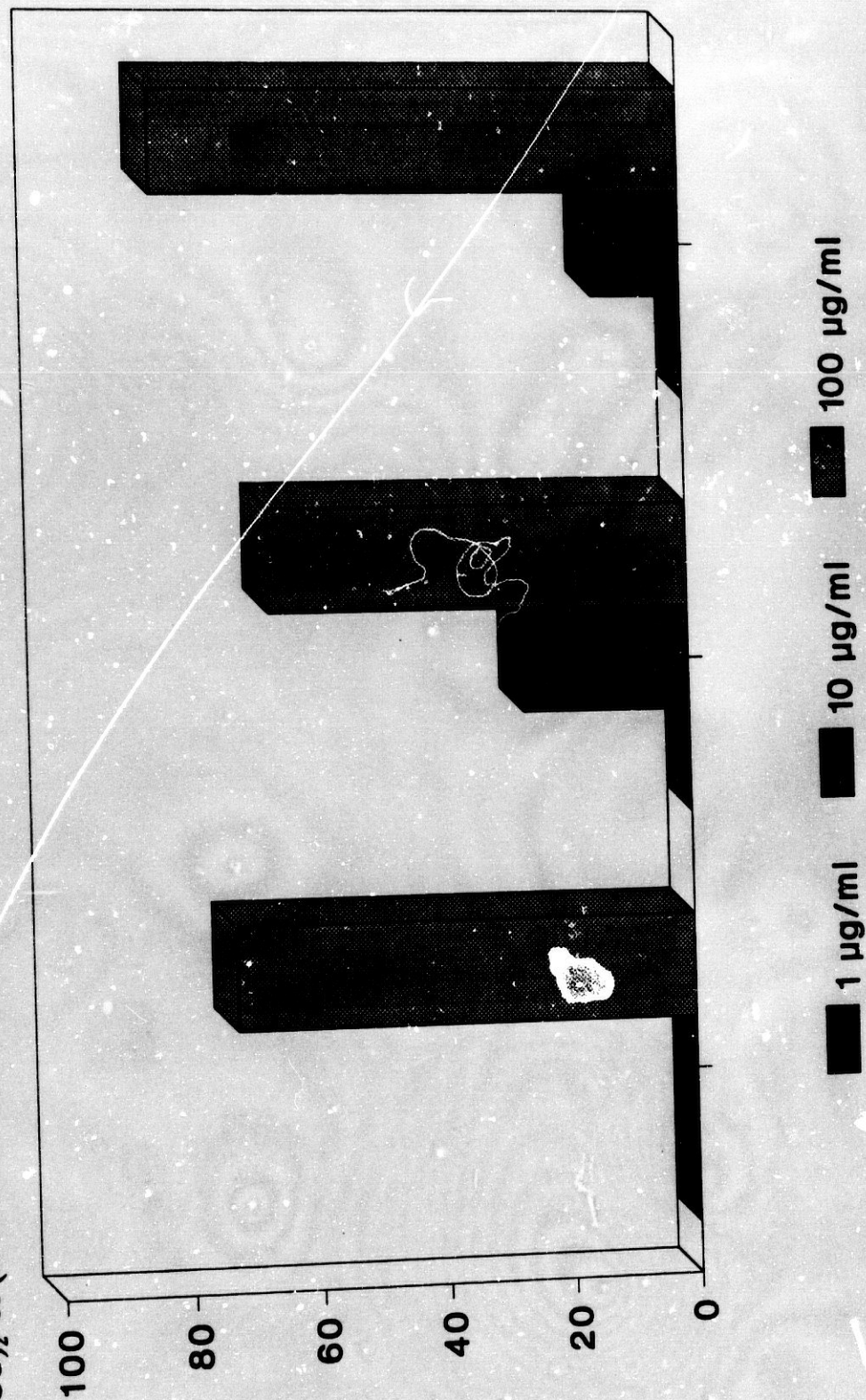


FIGURA 16. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS EN CULTIVO, EN PRESENCIA DE [Rh (2-amino-6-etoxibenzotiazol)₄ Br₂]⁺ Br⁻.

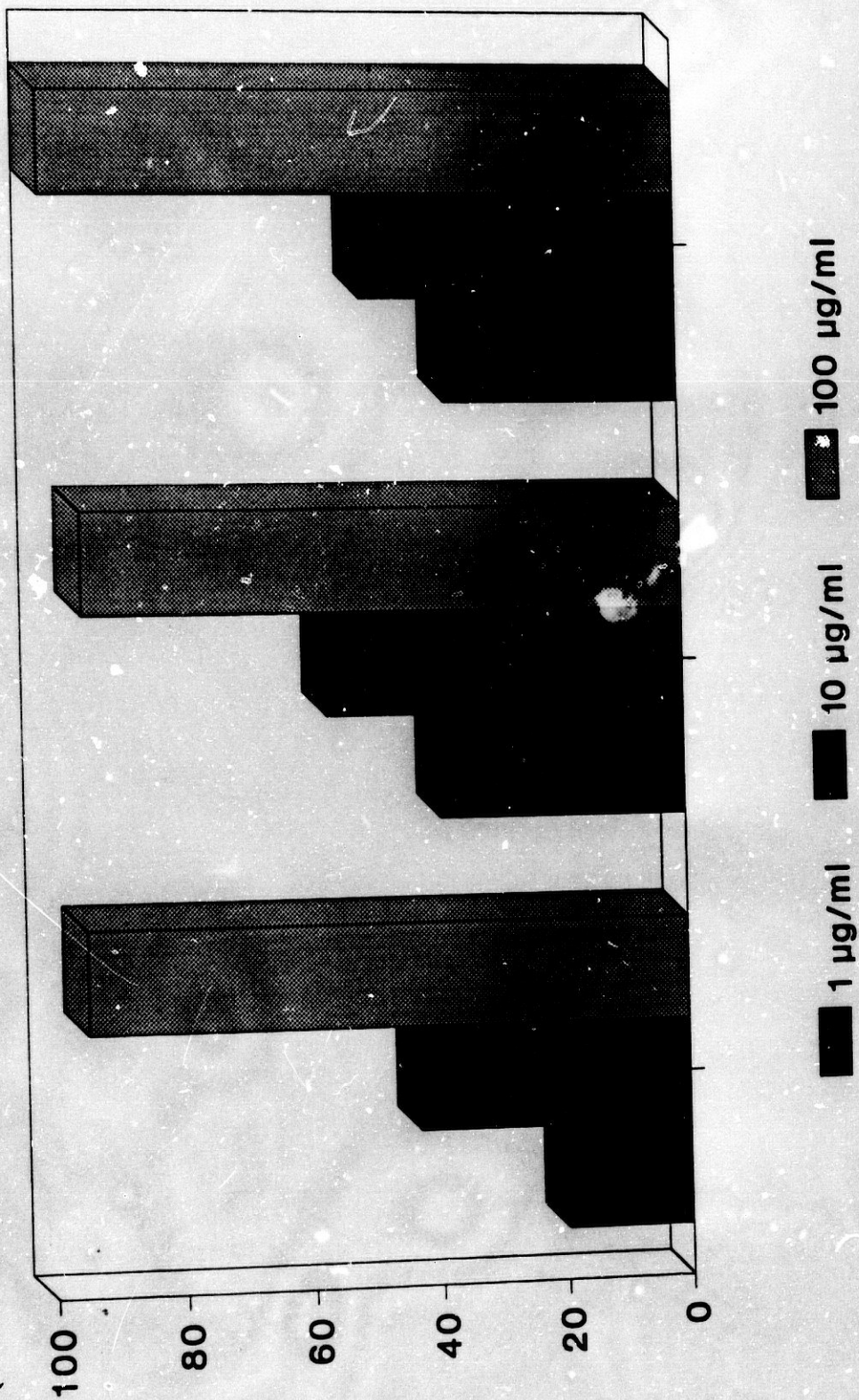


FIGURA 17. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS EN CULTIVO, EN PRESENCIA DE [Rh (2-dimetilamino (1-metil-2-nitroimidazol-5-il) metoxiacetaniilida), Br₂]⁺ Br⁻.

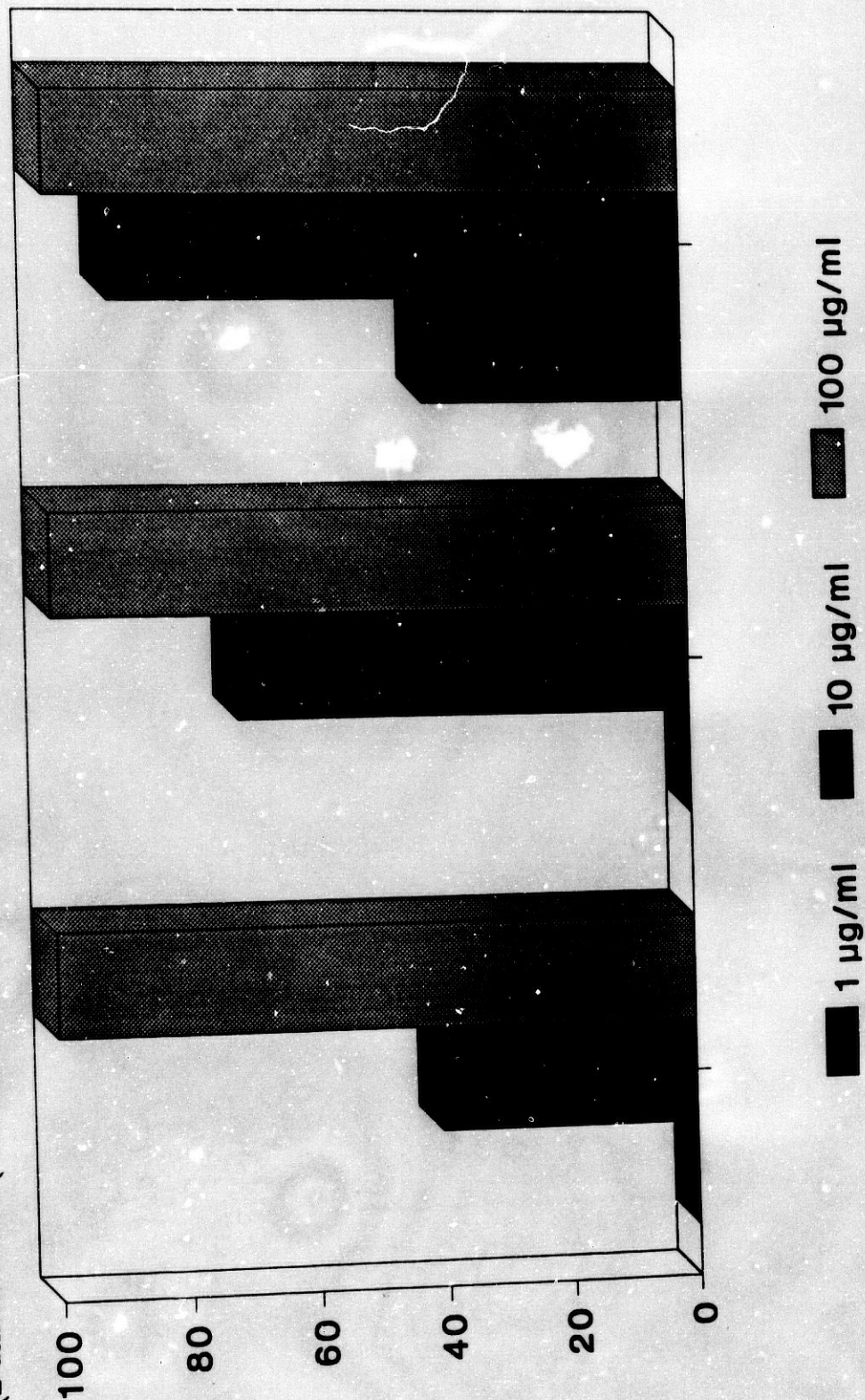


FIGURA 18. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS EN CULTIVO, EN PRESENCIA DE [Rh (2-Bromotiazol)₄ Br₂]⁺ Br⁻.

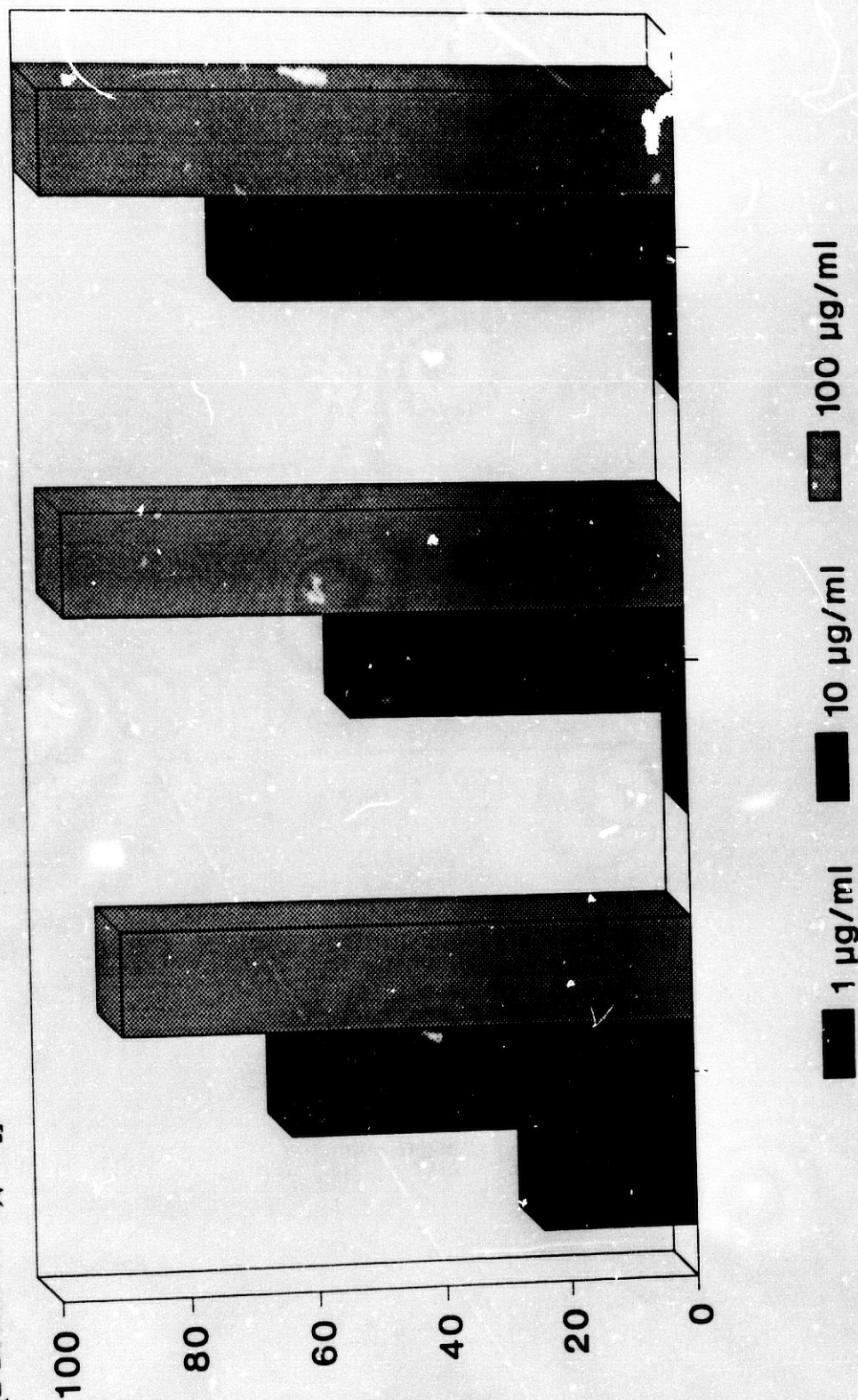


FIGURA 19. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS EN CULTIVO, EN PRESENCIA DE [Rh (Mefloquina)₄ Cl₂]⁺ Cl⁻.

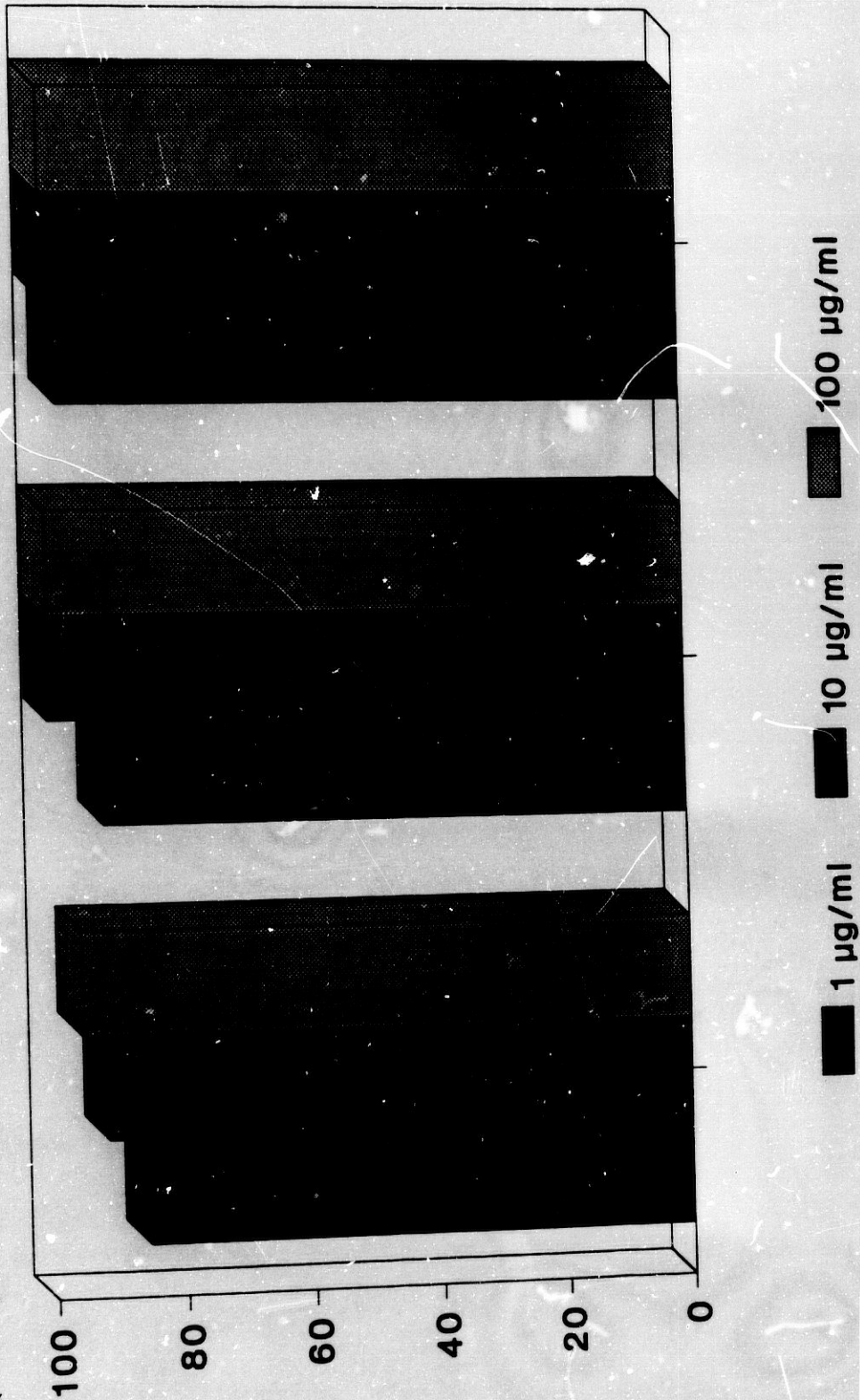


FIGURA 20. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS EN CULTIVO, EN PRESENCIA DE [Rh (Mepacrina), Cl₂]⁺ Cl⁻.

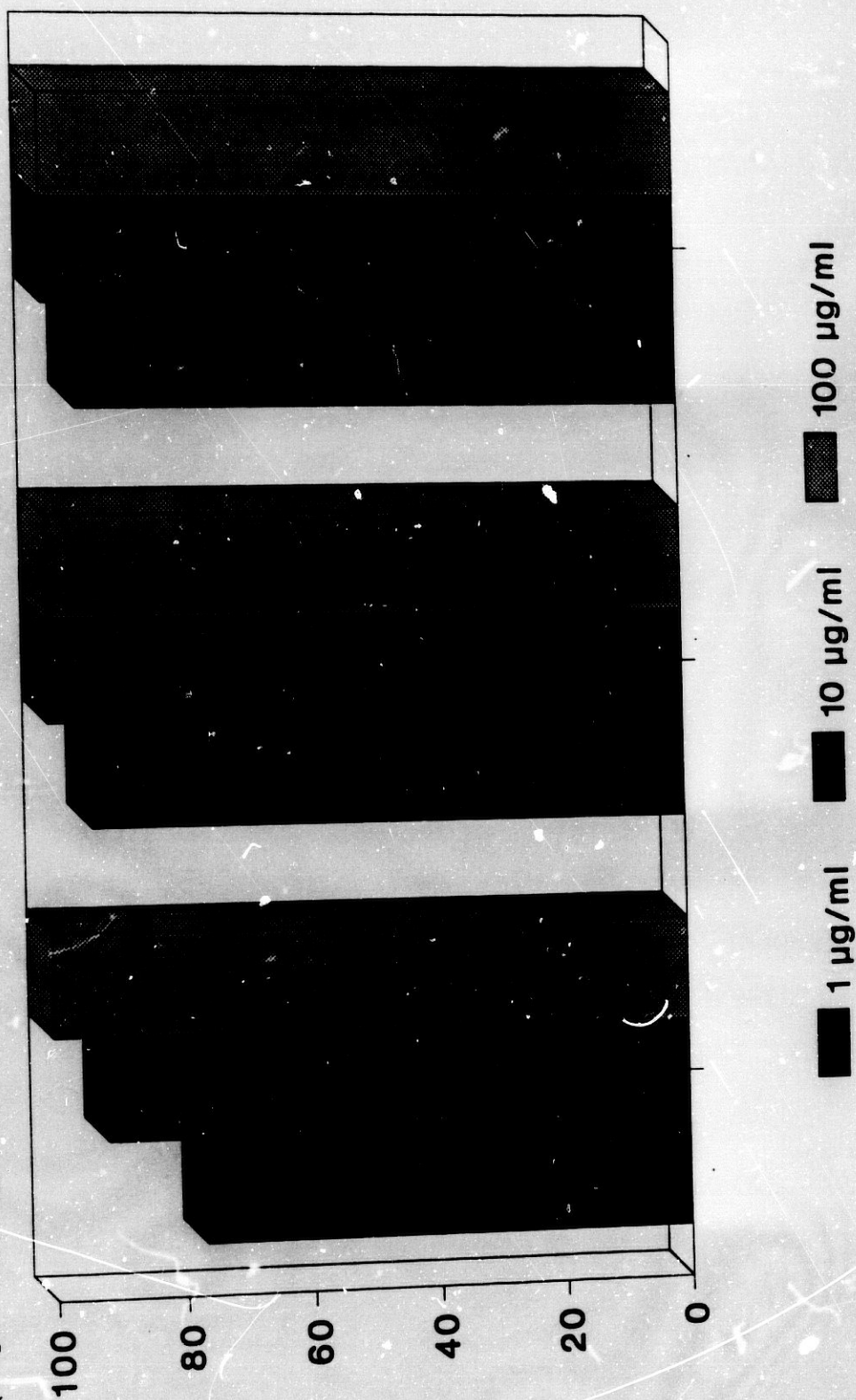


FIGURA 21. INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS EN CULTIVO, EN PRESENCIA DE [Rh (Oxamniquina)₄ Cl₂]⁺ Cl⁻.

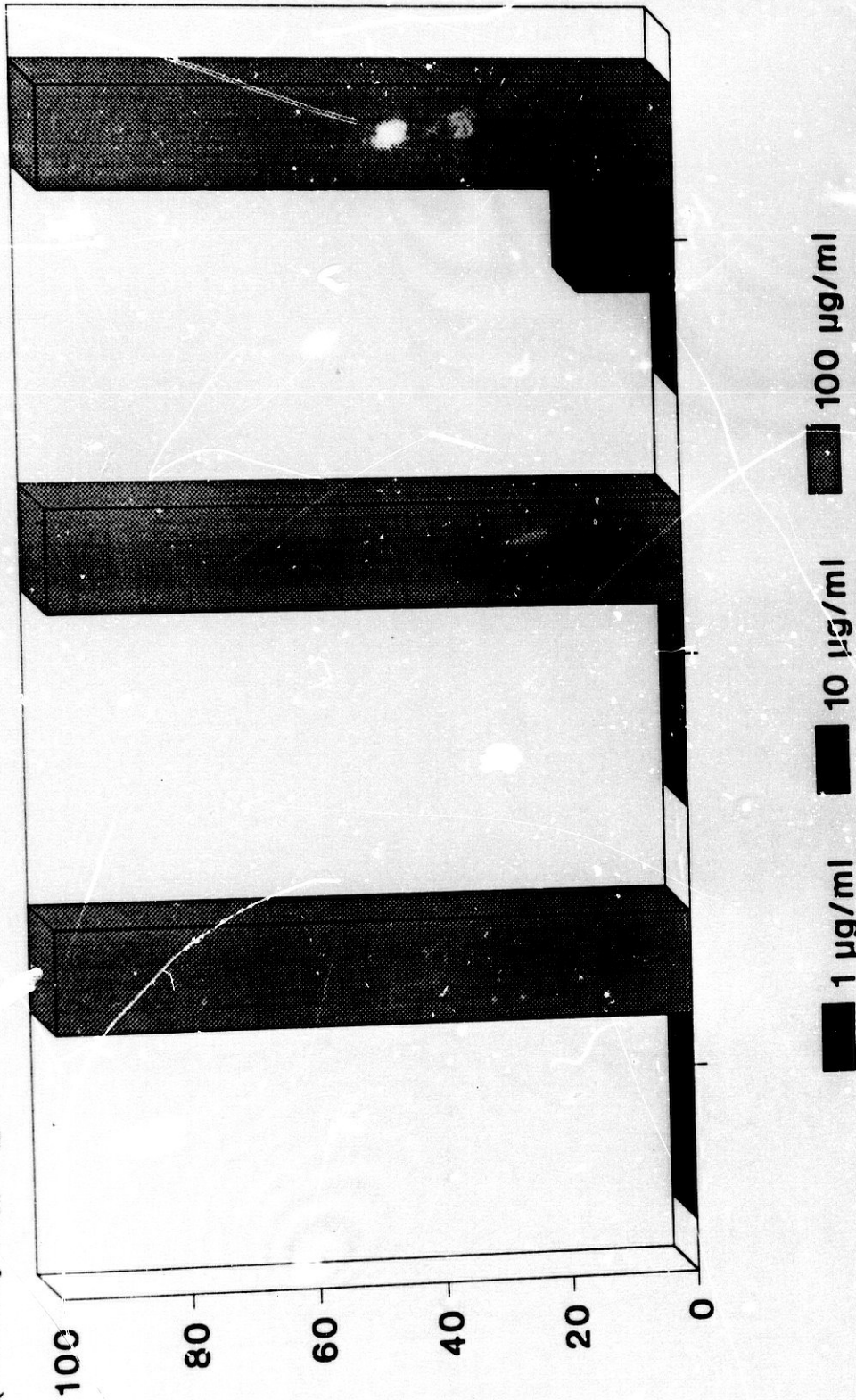
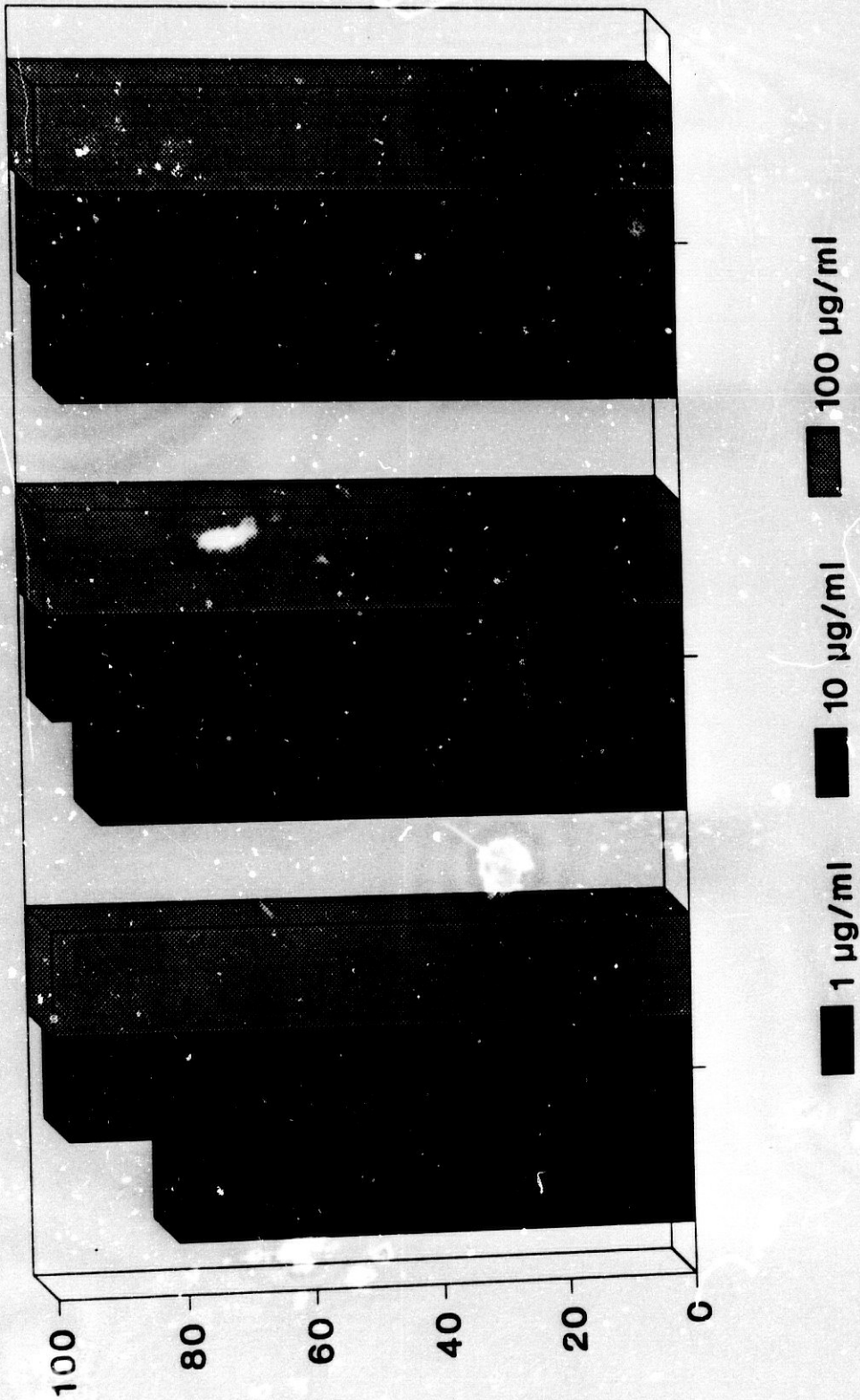


FIGURA 22. INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS EN CULTIVO, EN PRESENCIA DE Rh(Etilxantato)₃.



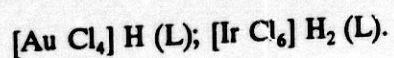
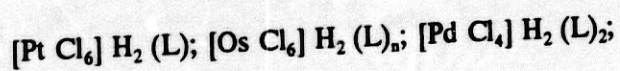
4.1.3.- Acción de los complejos neutros de Ir(III)

Los complejos neutros del Ir(III) de estructura octaédrica: Ir (L)₃, al igual que los de Rh(III), Os(III) y Ru(III), donde L = aniones bidentados derivados de los alquil, arilditiocarbamatos y/o xantatos presentan interesantes relaciones duales actividad antimitótica/antitripanosómica (Craciunescu et al. 1988).

De los seis complejos de Ir(III) ensayados en nuestro laboratorio, tres resultaron muy activos, seleccionando sólo dos de ellos: Ir (Anilinditiocarbamato), e Ir (Butilxantato), pues inhiben el crecimiento incluso a las dosis más bajas.

4.1.4.- Acción de las sales metálicas

Según Korolkovics (1970) es sumamente importante tener presente que los complejos interaccionan con los receptores de membrana preferentemente en su forma ionizada (aunque su paso a través de la membrana se hace preferentemente en su forma no ionizada). Esta observación, unido a que es posible que los complejos de Pd²⁺, Pt⁴⁺, Au³⁺ e Ir⁴⁺, debido a que su estructura y disponibilidad en la bicfase podrían presentar una acción leishmanicida elevada, nos ha llevado a la idea de estudiar la acción antitripanosómica de ciertas sales complejas del tipo:



Este tipo de complejos posee una toxicidad inferior a los correspondientes complejos neutros ya que son de fácil excrección (Craciunescu et al. 1982).

Al igual que en los casos anteriores la elección de los ligandos recayó en aquellos ligandos conocidos de rápida absorción en la biofase o en grupos funcionales que aumentasen la solubilidad en la fase lipídica de las drogas, como son derivados de piperacina, tiazol, antipirina u otros heterociclos conteniendo en su estructura un átomo de nitrógeno. También se emplearon como ligandos compuestos de elevada acción anti-protozoos como el caso de la Pentamidina, Stilbamidina, Nifurtimox o el Berenil (intercalante).

En la tabla VII aparecen los resultados obtenidos al tratar las formas promastigotes de L. donovani con las sales complejas de Pt(IV).

Observamos como los dos complejos que no mostraron actividad L era la piperacina y un derivado de la misma: (3-piperacini(1)propilamina), sin embargo cuando L = (2-piperacini(1)etilamina) el complejo inhibía el crecimiento un 60.5% a 100 $\mu\text{g/ml}$ y a las 24 horas de tratamiento.

Los dos complejos cuya acción fué muy elevada fueron aquellos que llevaban en su estructura diamidinas aromáticas como la Pentamidina y Stilbamidina.

Las tablas VIII, IX y X reflejan los resultados obtenidos para las sales de Os(IV), Pd(II) y Au(III), las cuales no han ejercido efecto alguno sobre los parásitos.

Cabe destacar que las dos sales de Au(III) ensayadas son las mismas probadas por Ruiz-Perez (1985) sobre formas epimastigotas de T. cruzi y en este caso sí mostraron actividad considerable.

Por último probamos la acción de las sales de Ir(IV) cuyos ligandos fueron Berenil, Pentamidina y Alopurinol. Aquí destacamos la acción elevadísima de: $[\text{Ir Cl}_6] \text{H}_2$ (Pentamidina).

También resultó activo, pero muy por debajo del anterior, $[\text{Ir Cl}_6] \text{H}_2$ (Berenil), sin embargo cuando el Cl se sustituye por Br este compuesto pierde toda la actividad.

FIGURA 23. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS EN CULTIVO, EN PRESENCIA DE Ir (Anilinditiocarbamato)₃.

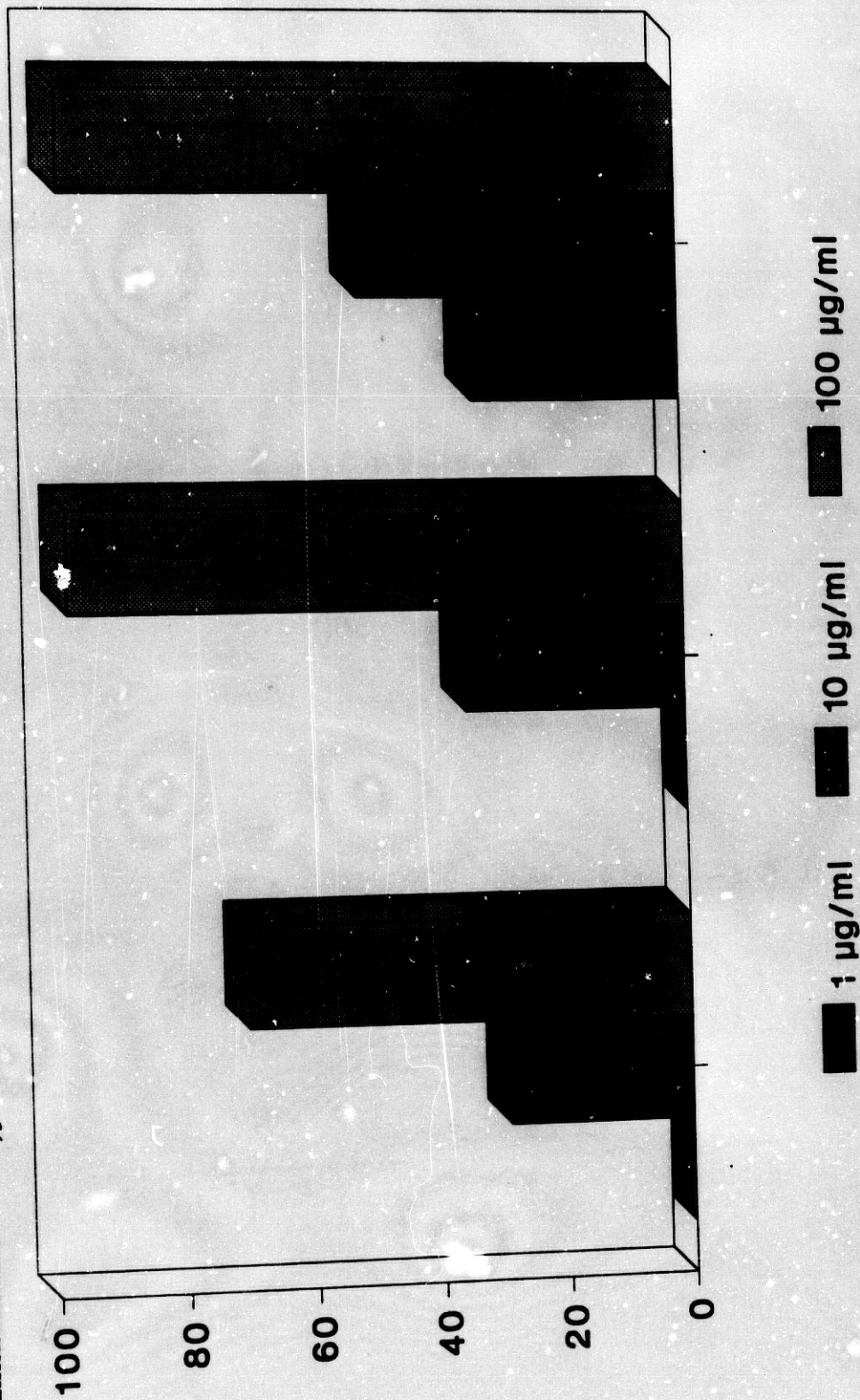


FIGURA 24. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS EN CULTIVO, EN PRESENCIA DE Ir (Butilxantato)₃.

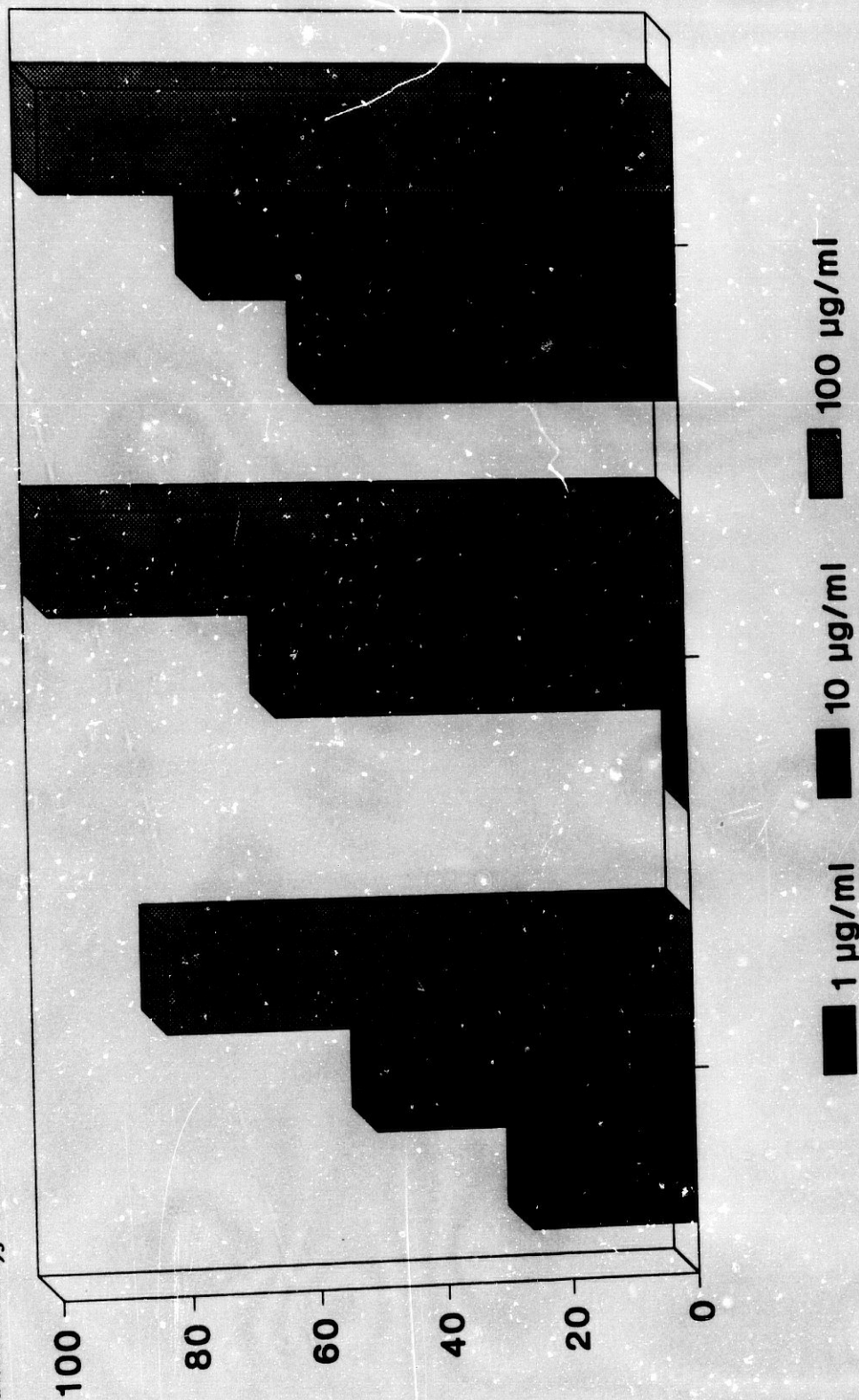


FIGURA 25. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS EN CULTIVO, EN PRESENCIA DE [Pt Br₆] H₂ (Pentamidina).

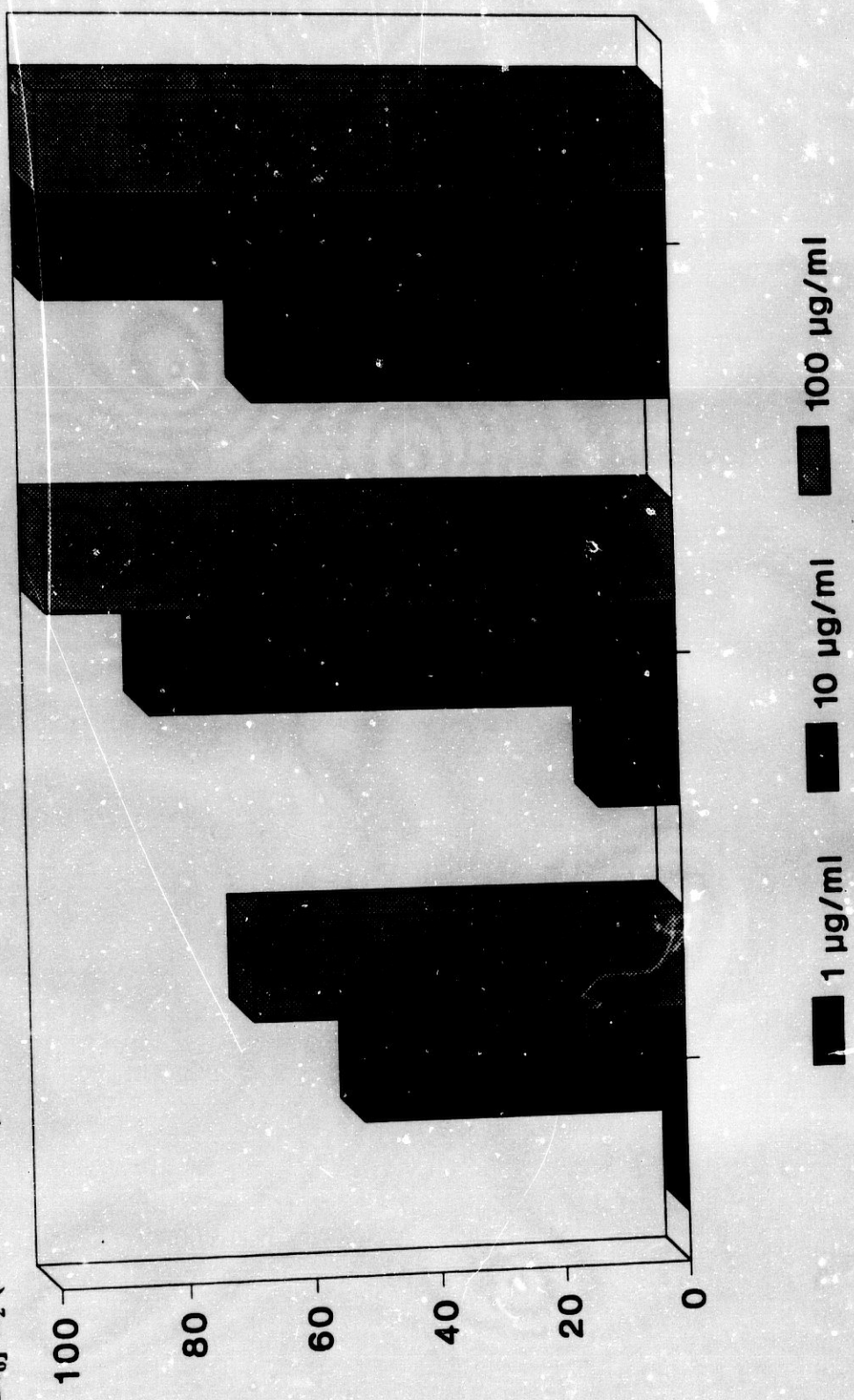


FIGURA 26. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS EN CULTIVO, EN PRESENCIA DE [Pt Br₆] H₂ (Estilbamidina).

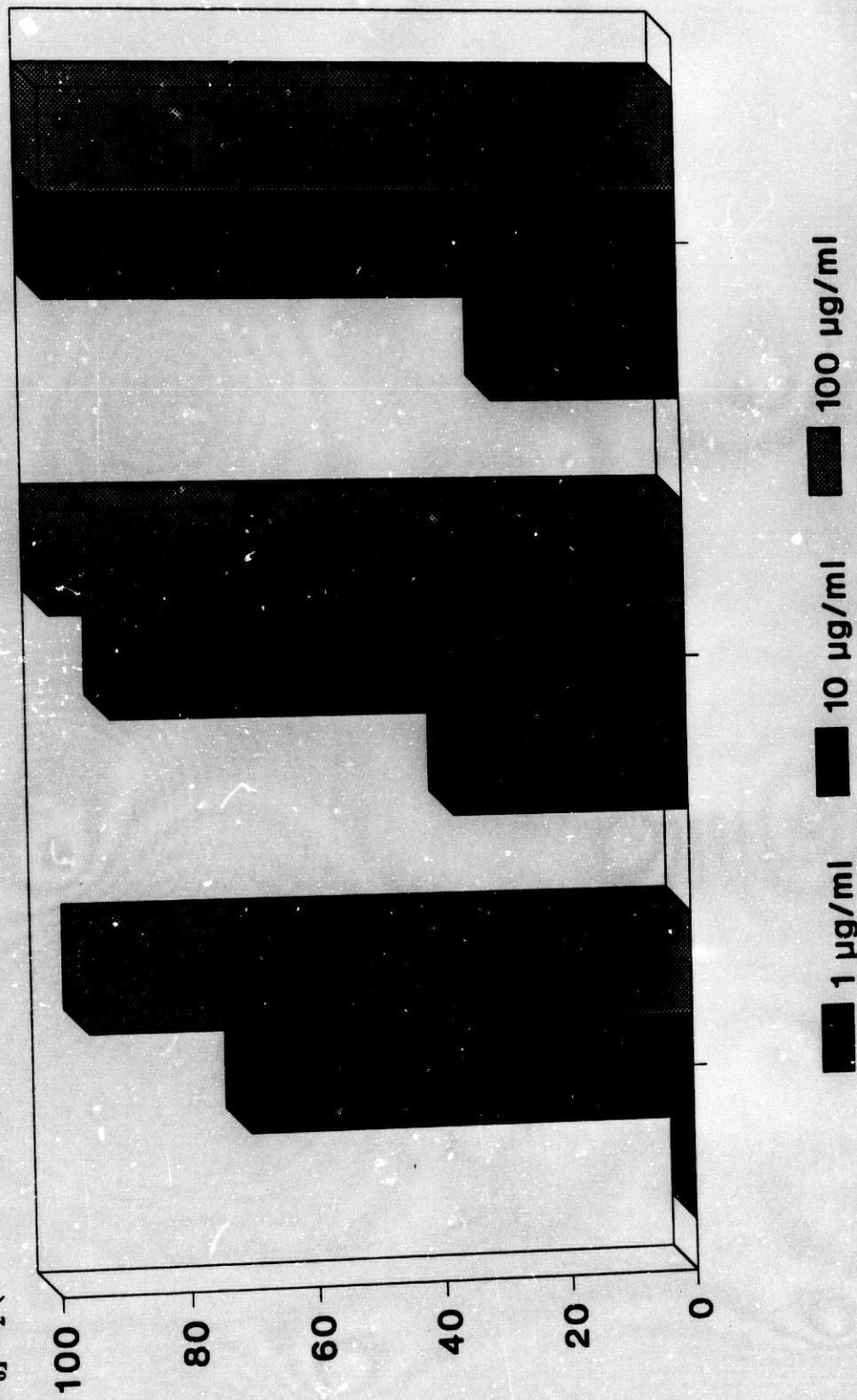


FIGURA 27. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS EN CULTIVO, EN PRESENCIA DE [Pt Cl₆] H₂ (2-Piperacil(1)etilamina).

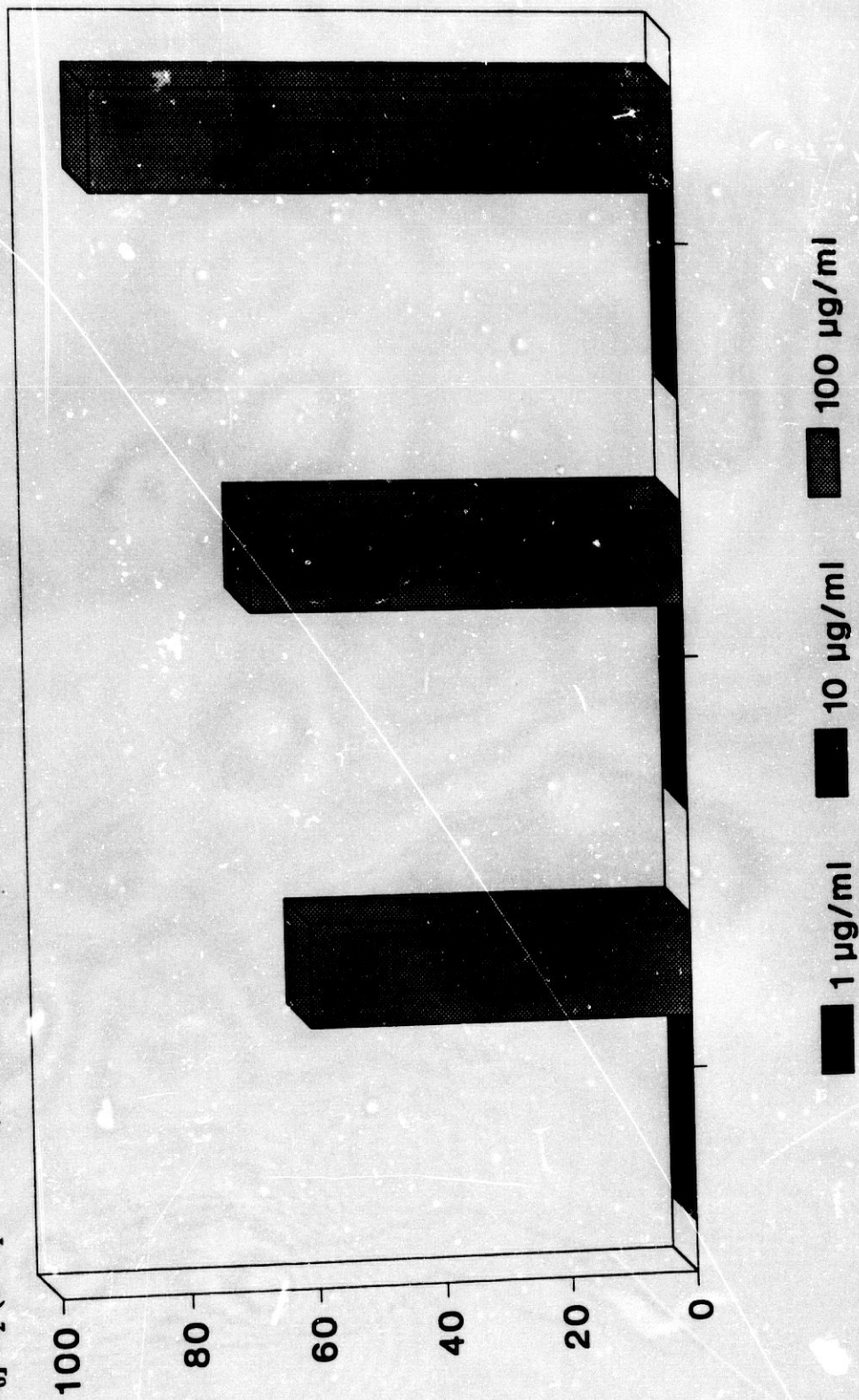


FIGURA 28. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS EN CULTIVO, EN PRESENCIA DE [Ir Cl₆] H₂ (Pentamidina).

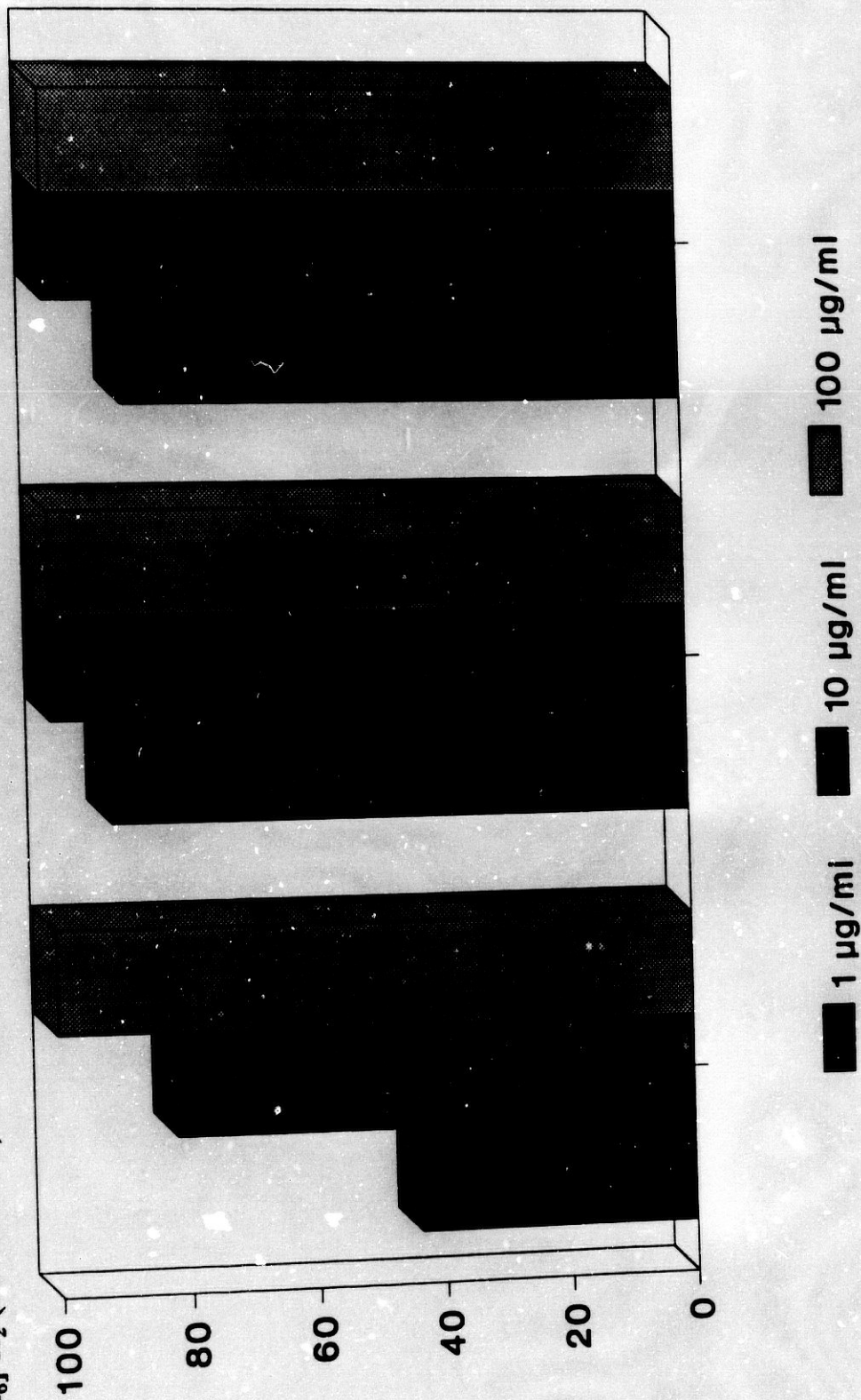
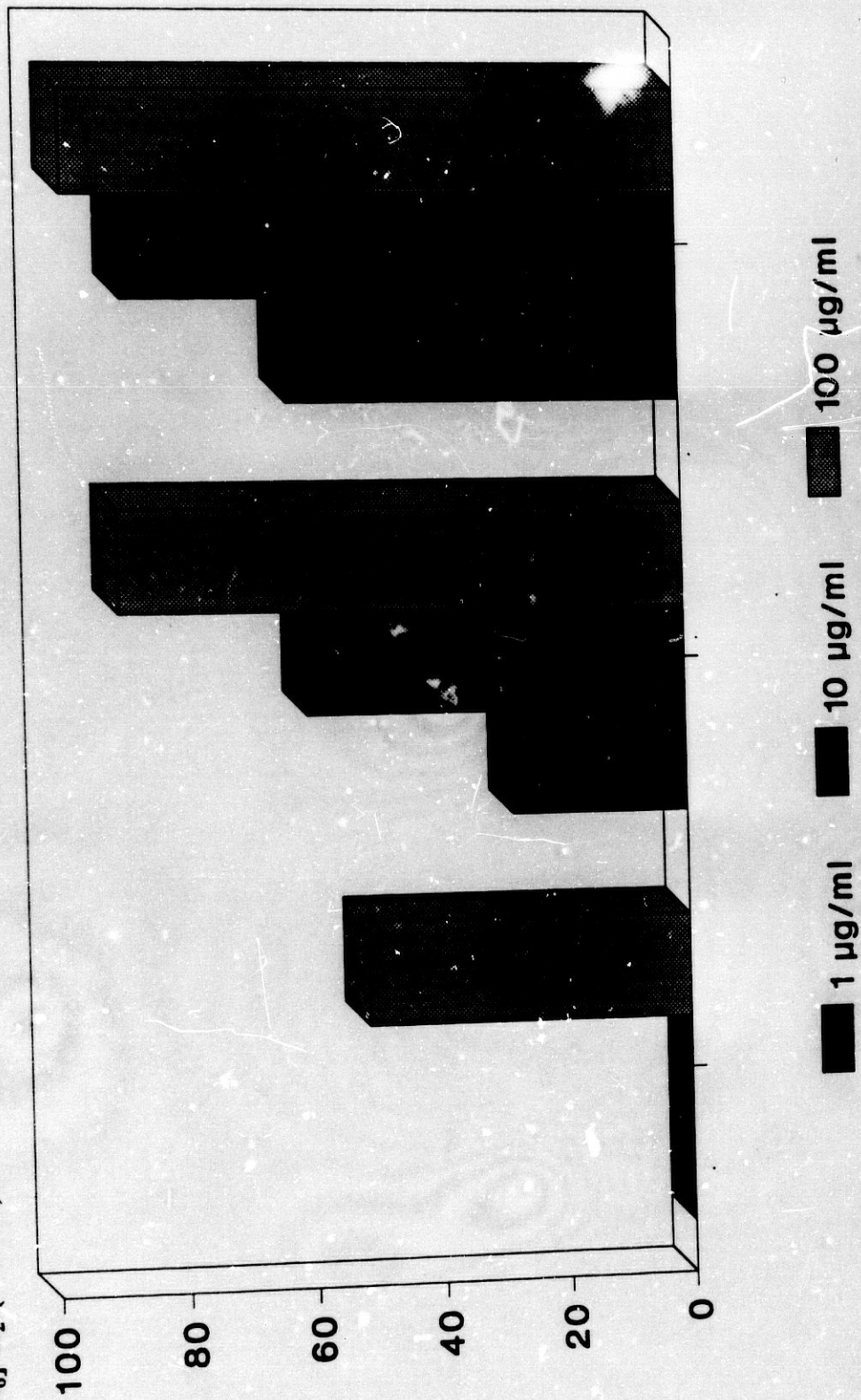


FIGURA 29. INHIBICION DEL CRECIMIENTO DE FORMAS PROMASTIGOTAS EN CULTIVO, EN PRESENCIA DE [Ir Cl₆] H₂ (Berenil).



4.2.- EFECTO CITOTOXICO

Con objeto de mostrar que a las dosis utilizadas sobre las formas promastigotes de L. donovani, se presenta cierta selectividad sobre el parásito y no sobre cualquier célula "in vitro" decidimos realizar una serie de experiencias en las que cultivos de macrófagos J 774 fueron tratados con los complejos metálicos seleccionados como mas activos "in vitro" frente a promastigotes de L. donovani.

De los siete complejos de Pt(II), seleccionados por haber ejercido elevados porcentajes de inhibición del crecimiento, solamente tres no mostraron toxicidad frente a la línea celular ensayada.

Los complejos cuyos ligandos eran las moléculas: Tranylcipromina, Pentamidina y Octodryl indujeron toxicidad.

El complejo: cis-Pt (2,3,4,5,6-Pentafluoroanilina)₂ Br₂ induce una toxicidad elevada a las 24 horas de contacto y a la mayor concentración, sin embargo al eliminar el F de la posición 4 en el ligando, el complejo resultante no fué tóxico para los macrófagos aunque como tambien hemos visto en los ensayos "in vitro" este cambio tambien suponía una disminución notable en la actividad.

En el caso de los complejos de Rh, habíamos seleccionado 2 complejos de Rh(I) y siete de Rh(III). De entre los complejos de Rh(III) seis respondían a la estructura octaédrica: $[\text{Rh}(\text{L})_4\text{X}_2]^+ \text{X}^-$, y uno era un complejo neutro, tambien con estructura octaédrica: $\text{Rh}(\text{L})_3$; este último

no resultó tóxico para las células mientras que de los complejos catiónicos del Rh(III), tres fueron muy tóxicos, concretamente los complejos cuyos ligandos eran tres conocidos antiparasitarios: Mefloquina, Mepacrina y Oxamniquina. Mientras que los otros tres complejos cuyos ligandos eran moléculas inorgánicas de nueva síntesis derivados del tiazol o de la anilida no fueron tóxicos o su toxicidad fué prácticamente despreciable como en el caso del $[\text{Rh}(\text{2-amino-6-etoxibenzotiazol})_4 \text{Br}_2]^+ \text{Br}^-$ que a las 24 horas de contacto y a $100 \mu\text{g/ml}$ el porcentaje de liberación específica de Cr^{51} inducida sobre los macrófagos J 774 fué de 7.2.

Es de destacar que cuando la Oxamniquina forma parte del complejo de Pt(II): cis-Pt (Oxamniquina) Cl_2 , este no inducía toxicidad sobre los macrófagos J 774.

Los dos complejos neutros de Ir(III) ensayados no resultaron tóxicos. Sin embargo de las dos sales de Ir(IV) con la Pentamidina y el Berenil como ligandos, la sal: $[\text{Ir} \text{Cl}_6] \text{H}_2$ (Pentamidina) fué tóxica, habiéndose obtenido valores de porcentaje de liberación específica muy parecidos a los obtenidos con el complejo: cis-Pt (Pentamidina) I_2 .

Por último se ensayaron tres sales de Pt(IV) en las que se volvió a repetir lo ya dicho anteriormente para los complejos de Rh(III), es decir las dos sales cuyos ligandos eran las conocidas diamidinas aromáticas antiparasitarias Stilbamidina y Pentamidina resultaron ser citotóxicas, mayormente la primera; en la segunda se obtuvieron resultados similares a los ya mencionados para otros complejos con dicho ligando.

La toxicidad inducida por la sal $[\text{Pt} \text{Cl}_6] \text{H}_2$ (2-Piperacilil(1)Etilamina) fué prácticamente nula pues a las 24 horas y a la mayor concentración ensayada el porcentaje de

liberación específica de Cr^{51} fué de 7.3, porcentaje practicamente despreciable teniendo en cuenta ademas que las experiencias se llevaron a cabo con una monocapa de células.

4.3.- INFLUENCIA DE LOS COMPLEJOS METALICOS MAS ACTIVOS SOBRE LA BIOSINTESIS DE MACROMOLECULAS

Con el fin de aclarar el mecanismo de acción de estos nuevos derivados, se realizó en L. donovani un grupo de experiencias con objeto de poder evaluar la acción de los mismos sobre la biosíntesis de macromoléculas del parásito tal y como se describe en el apartado de Material y Métodos.

Estudios biológicos y bioquímicos llevados a cabo con los complejos de Pt(II) sugieren que se produce una modificación en la estructura secundaria del DNA que va a conducir a una inhibición en la replicación del mismo. Igualmente se ha observado que el mayor efecto se produce con los complejos de isomería cis mientras que la acción intercalante de los isómeros trans es menos manifiesta, tanto "in vitro" como en cultivos celulares o tumore (Roberts et al. 1979).

Todas las experiencias llevadas a cabo hasta el momento parecen indicar que el cis-Pt(II) se intercala produciendo extra e intracruzamientos en la hélice del DNA (Macquet y Butour 1978).

Estudios realizados con DNA de timo de buey (Lopez et al. 1985) indican que la temperatura de fusión del ácido nucléico se modifica al estar en contacto con este tipo de sustancias lo que pone de manifiesto la existencia de alteraciones en la estructura secundaria del

DNA como consecuencia de la interacción con el producto.

En contraposición con lo observado para células HeLa y tumores, Ruiz-Perez et al. (1987) observaron que el cis-DDP no altera significativamente la biosíntesis de macromoléculas en T. cruzi, tal vez debido a una mayor dificultad de estas sustancias para atravesar la membrana del parásito.

Sin embargo, estudios hechos por los mismos autores con análogos del cis-DDP, de mayor liposolubilidad, debido a la sustitución de los grupos NH_2 por benzotiazol o tranilcipromina, inducían cambios en la biosíntesis de macromoléculas en T. cruzi.

Nuestros primeros ensayos los realizamos con complejos del Pt(II) con estructura cuadrado plana: $\text{cis-Pt(L)}_2\text{X}_2$, donde L es el ligando, en su forma mono o bidentada, y X un halógeno.

Cuando el halógeno se trataba del Cl observamos que si el ligando era el Octodryl en su forma monodentada, el complejo, $\text{cis-Pt(II)(Octodryl)}_2\text{Cl}_2$, a los tiempos estudiados y a la mayor concentración, inhibía de manera patente la incorporación de timidina y uridina y ligeramente la de leucina.

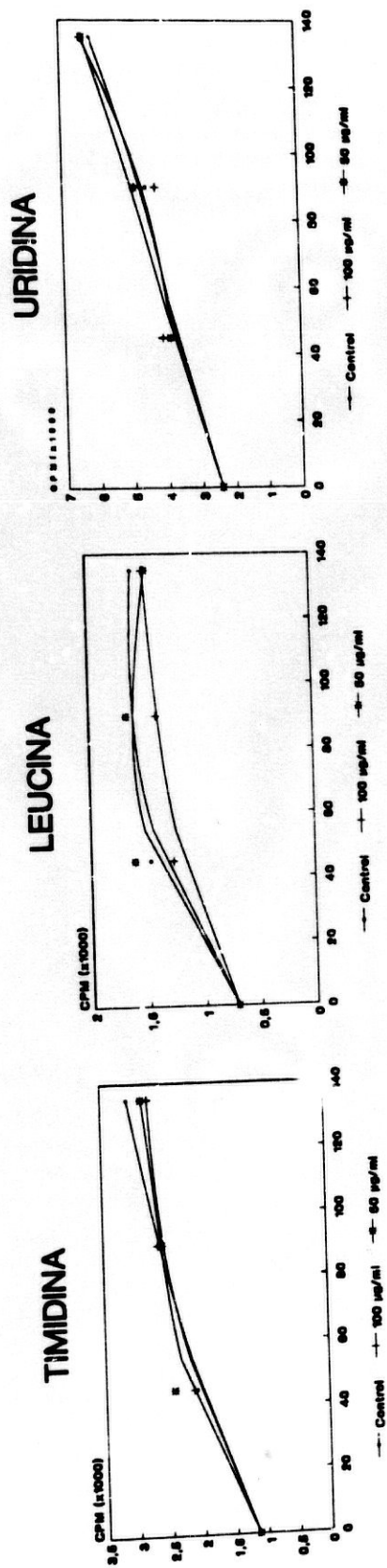
Sin embargo cuando los ligandos eran Oxamniquina y Guanetidina, unidos al Pt(II) por enlace bidentado, lo que aumentaría su estabilidad termodinámica, los complejos no inhibían la incorporación de ningún precursor.

Resultados similares se obtuvieron para los dos complejos: $\text{cis-Pt(2,3,4,5,6-Pentafluoroanilina)}_2\text{Br}_2$ y $\text{cis-Pt(2,3,5,6-Tetrafluoroanilina)}_2\text{Br}_2$ a pesar de que sus ligandos

estaban unidos de forma monodentada, sin embargo en ambos casos el halógeno se trataba del Br.

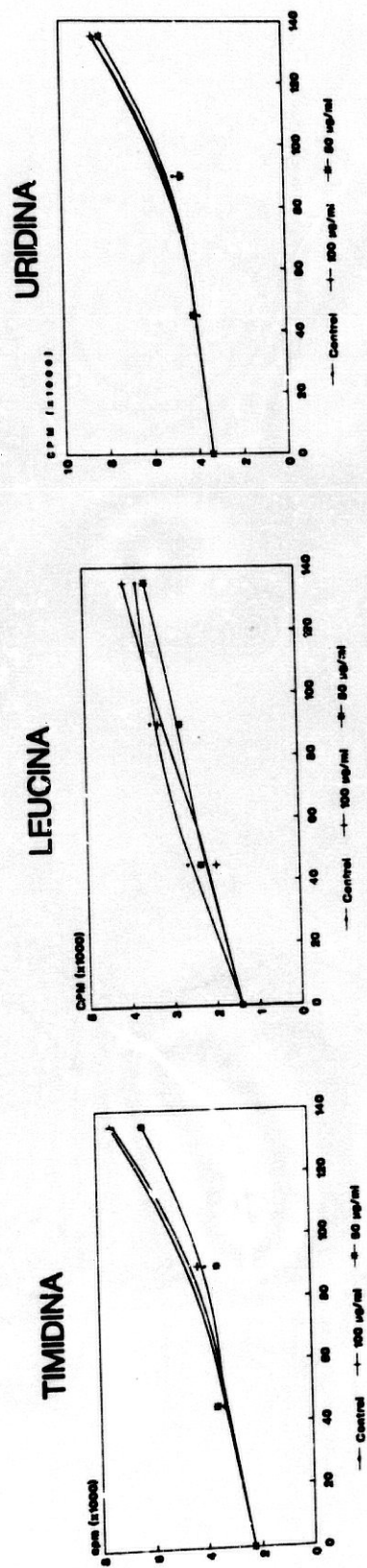
Por el contrario el complejo: cis-Pt (Pentamidina) I₂ inhibe de forma total la incorporación de timidina, leucina y uridina a las dos concentraciones ensayadas.

FIGURA 30



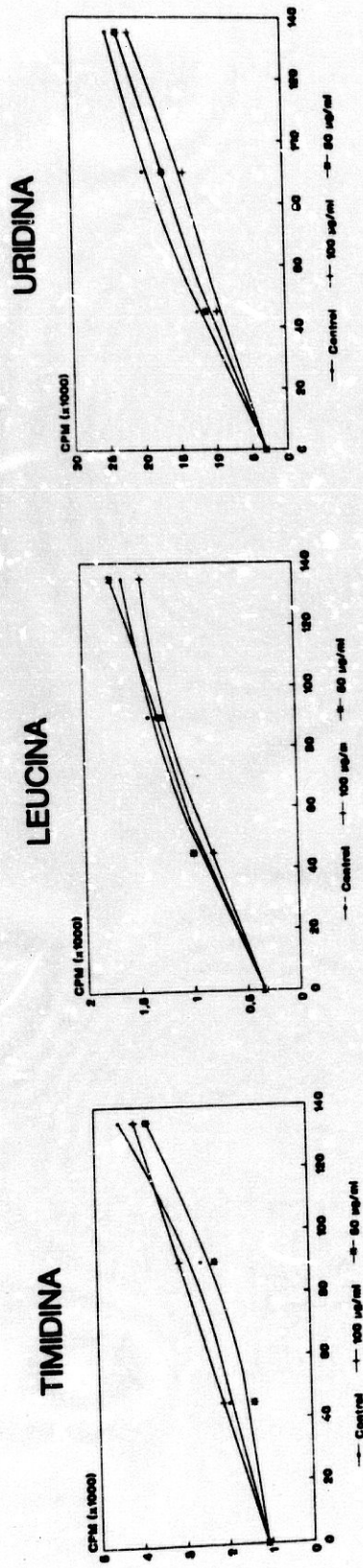
Efecto del *cis*-Pt(2,3,4,5,6-Pentafluoroanilina)₂ Br₂ sobre la incorporación de Timidina, Leucina y Uridina 3H en *L. donovani*

FIGURA 31



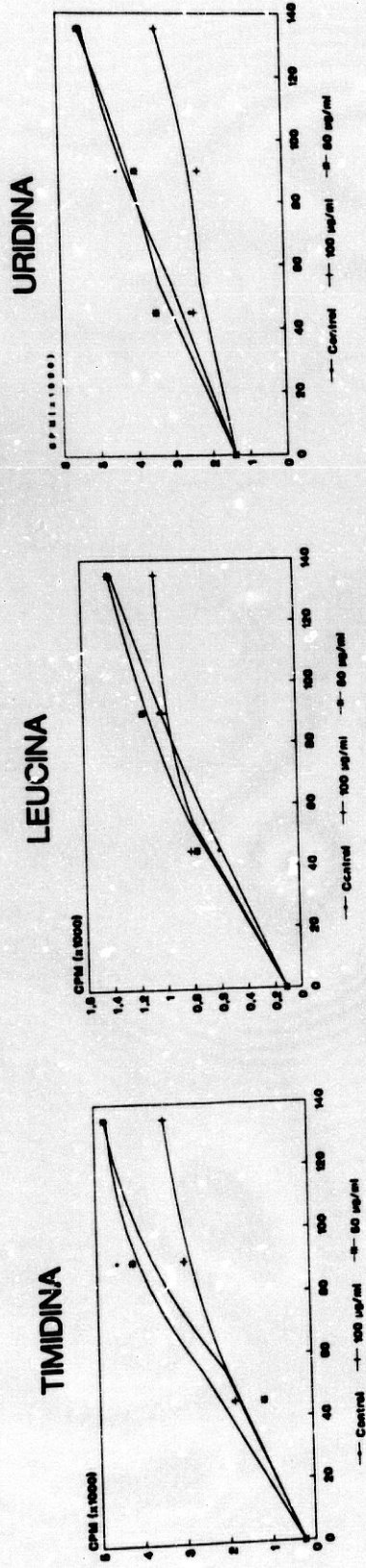
Efecto del Cis-Pt(2,3,5,6-Tetrafluoroanilina)₂ Br₂ sobre la incorporación de Timidina, Leucina y Uridina 3H en *L. donovani*

FIGURA 32



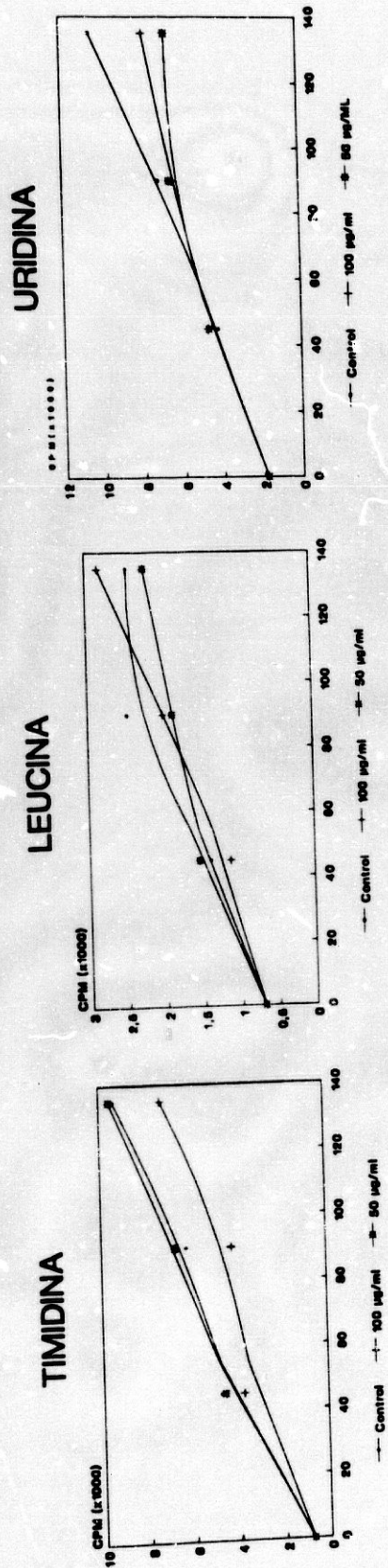
Efecto del Cis-Pt(Guanetidina) Cl2 sobre la incorporacion de Timidina, Leucina y Uridina 3H en L. donovani

FIGURA 33



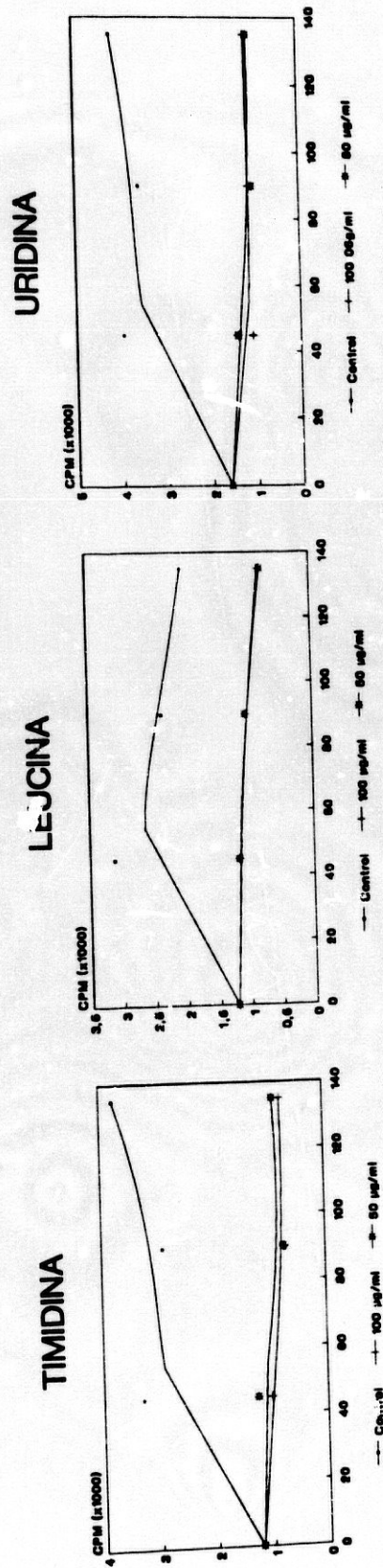
Efecto del cis-Pt(Octodryl)2 Cl2 sobre la incorporacion de Timidina, Leucina y Uridina 3H en L. donovani

FIGURA 34



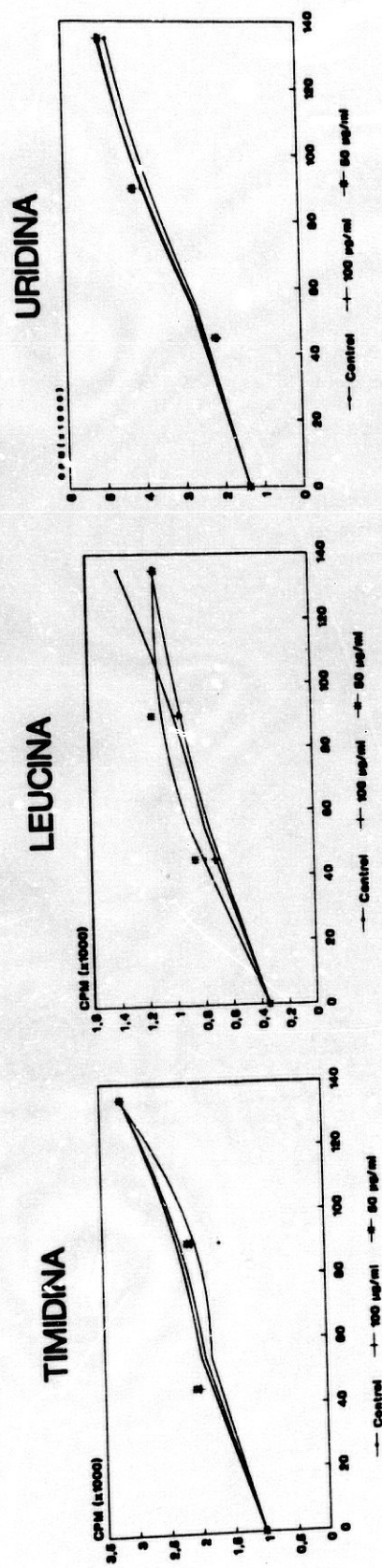
Efecto del Cis-Pt(Tranilcipromina)₂ Br₂ sobre la
incorporación de Timidina, Leucina y Uridina 3H en
L. donovani

FIGURA 35



Efecto del cis-Pt(Pentamidina) 12 sobre la incorporación de Timidina, Leucina y Uridina 3H en *L. donovani*

FIGURA 36



Efecto del cis-Pt(Oxamniquina) Cl₂ sobre la incorporación de Timidina, Leucina y Uridina 3H en *L. donovani*

En segundo lugar establecimos el efecto producido por los derivados de Rh, tanto de Rh(I) como de Rh(III), sobre la biosíntesis de macromoléculas en L. donovani.

Hay que tener presente que la información que se posee con respecto al modo de acción de este tipo de complejos es prácticamente nula a pesar de su conocido efecto positivo sobre tumores y bacterias (Craciunescu, 1983).

Giraldi y col. (1974, 1977) demuestran que el mecanismo de acción de los complejos de Rh(I), con estructura cuadrado plana similar al Neoplatin es diferente a este último.

Mientras que el Neoplatin causa una inhibición marcada del DNA los complejos de Rh(I) inhiben preferentemente la síntesis de proteínas y RNA respectivamente.

Para nuestro estudio dividimos los complejos de Rh en 3 grupos:

- Rh(I): $\text{Rh}(\text{CO})_2 \text{Cl}(\text{L})$
- Rh(III): $[\text{Rh}(\text{L})_4 \text{X}_2]^+ \text{X}^-$
- Rh(III): $\text{Rh}(\text{L})_3$

De los dos complejos de Rh(I) ensayados, el complejo cuyo ligando era L = 5-Cl-2-metilbenzotiazol inhibía marcadamente la incorporación de los 3 precursores, mientras que cuando el ligando se trataba del 2-aminobenzotiazol no actuaba sobre la biosíntesis de macromoléculas del parásito, a pesar de que este complejo resultaba tóxico frente a los macrófagos J 774.

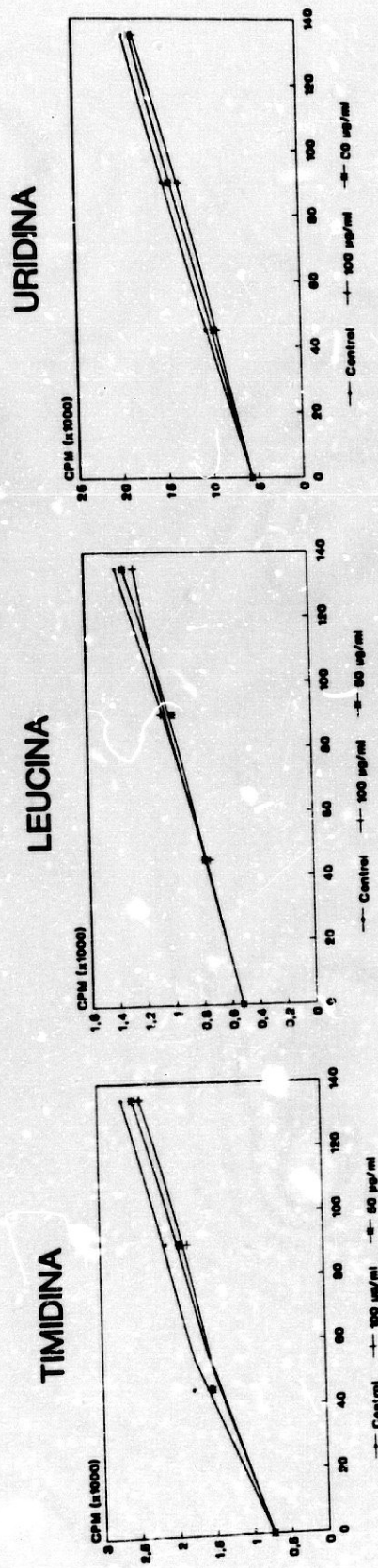
Los resultados obtenidos con los complejos de Rh(III) con la estructura: $[Rh(L)_4 X_2]^+$ nos muestran como en general este tipo de complejos actúan inhibiendo la incorporación de alguno o de todos los precursores ensayados.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Ruiz-Perez (1986) para este tipo de compuestos, confirmando que los derivados del tiazol inhiben la síntesis de DNA, RNA y proteínas.

También el complejo de Rh(III): Rh(Etilxantato)₃, indujo una marcada inhibición en la incorporación de leucina, timidina y uridina; curiosamente este mecanismo de acción debe ser selectivo frente al parásito pues este complejo no inducía ninguna toxicidad celular.

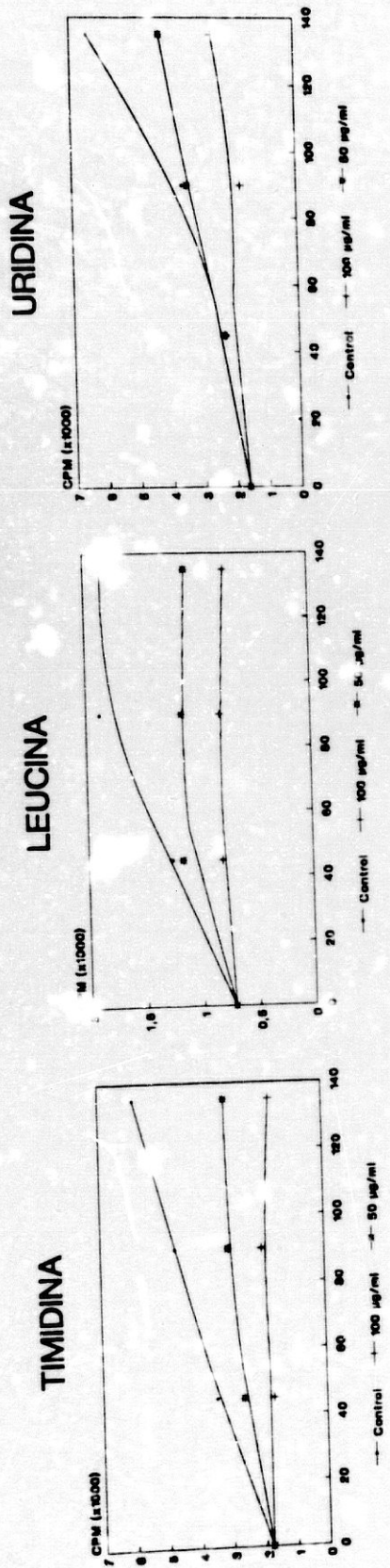
En un tercer grupo estudiamos el efecto ejercido por dos complejos neutro de Ir(III) con una estructura: $Ir(L)_3$, y cuyos ligandos eran un derivado del xantato y otro del carbamato. El derivado del carbamato inhibió ligeramente la incorporación de timidina pero no actuó ni sobre la leucina, ni la uridina, al igual que el derivado del xantato que no actuó sobre ningún precursor. Ambos compuestos tampoco habían resultado tóxicos para los macrófagos.

FIGURA 37



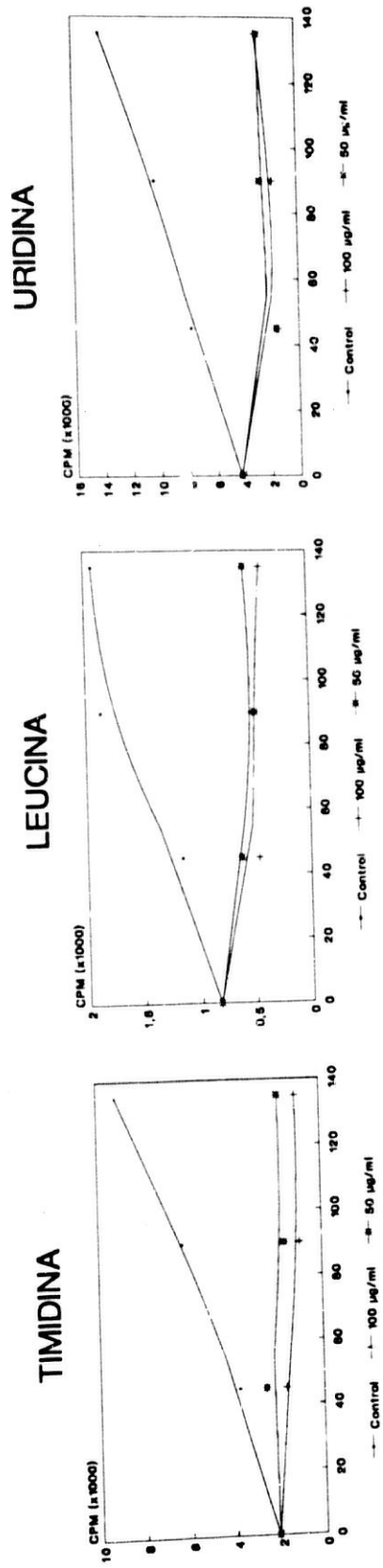
Efecto del $\text{Rh}(\text{CO})_2 \text{Cl}$ (2-aminobenzotiazol) sobre la incorporación de Timidina, Leucina y Uridina 3H en *L. donovani*

FIGURA 38



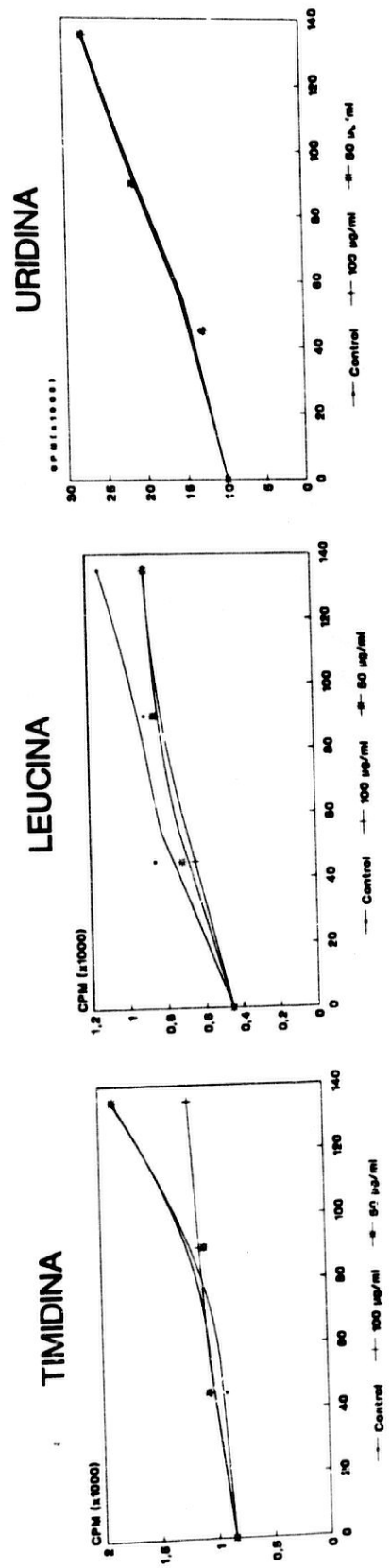
Efecto del Rh(CO)₂ CI (5-Cl-2-Metilbenzotiazol) sobre la incorporación de Timidina, Leucina y Uridina 3H en *L. donovani*

FIGURA 39



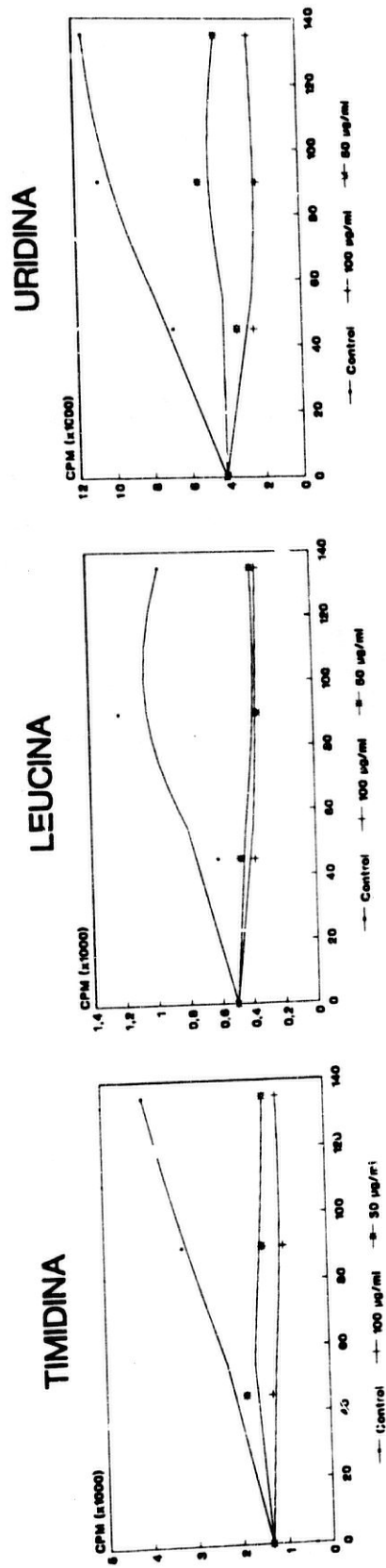
Efecto del [Rh (2-amino-6-etoxibenzotiazol)4 Br₂]+ Br⁻ sobre la incorporación de Timidina, Leucina y Uridina 3H en *L. donovani*

FIGURA 40



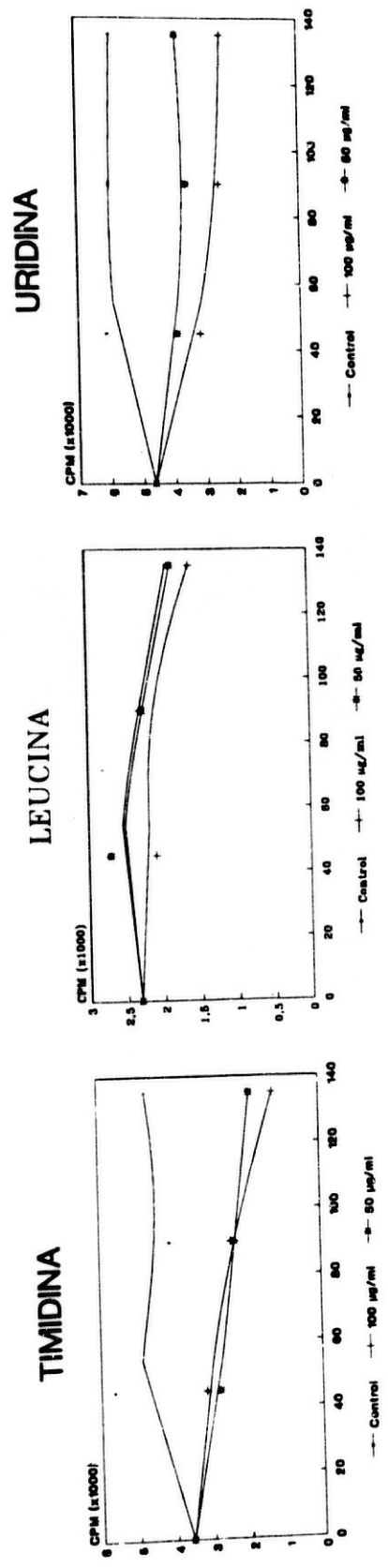
Efecto del [Rh (2-dimetilamino (1-metil-2-nitroimidazol-5-il metoxiacetanilida)4 Cl₂)+ Cl⁻ sobre la incorporacion de Timidina, Leucina y Uridina 3H en *L. donovani*

FIGURA 41



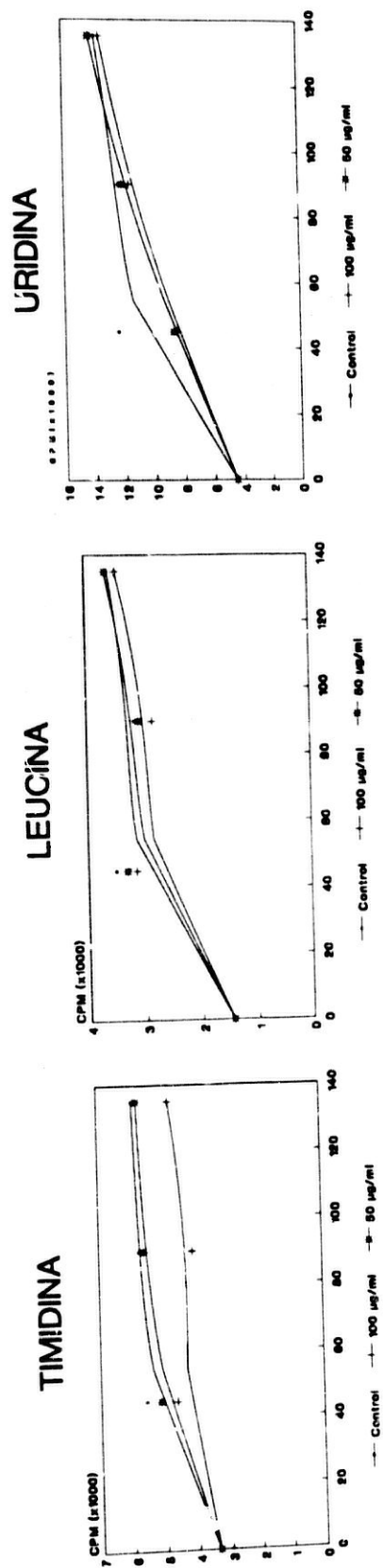
Efecto del [Rh(2-Bromotiazol)4 Br2]+ Br- sobre la incorporación de Timidina, Leucina y Uridina 3H en *L. donovani*

FIGURA 42



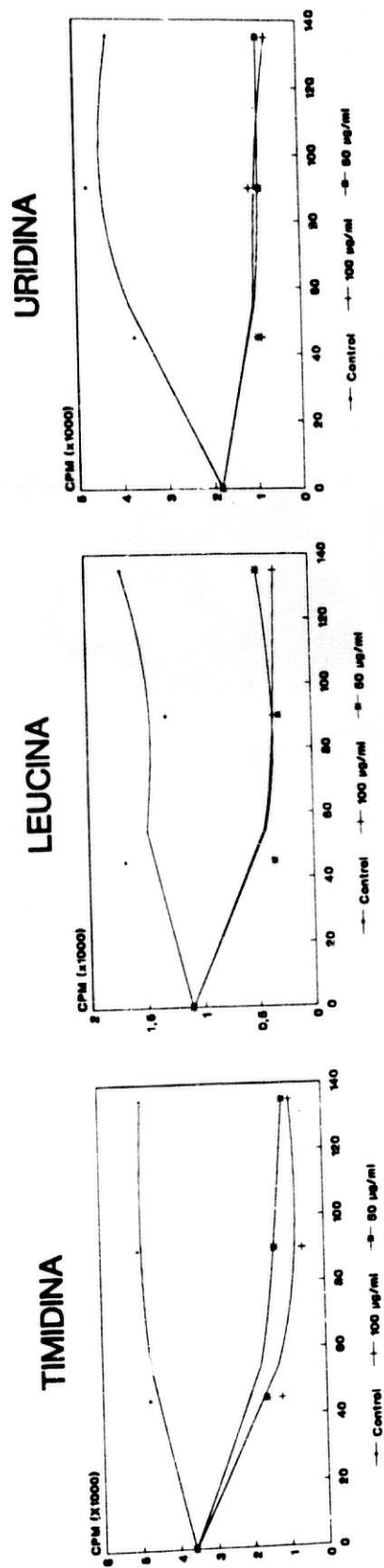
Efecto del [Rh(Mefloquina)₄ Cl₂]⁺ Cl⁻ sobre la incorporacion de Timidina, Leucina y Uridina 3H en L. donovani

FIGURA 43



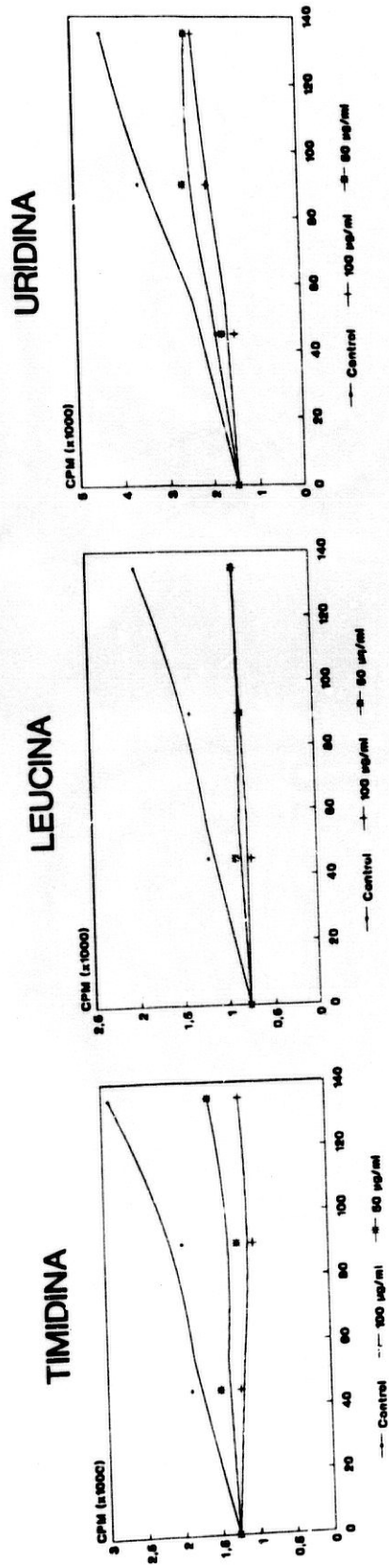
Efecto del [Rh(Mepacrina)₄ Cl]⁺ sobre la incorporación de Timidina, Leucina y Uridina 3H en *L. donovani*

FIGURA 4.4



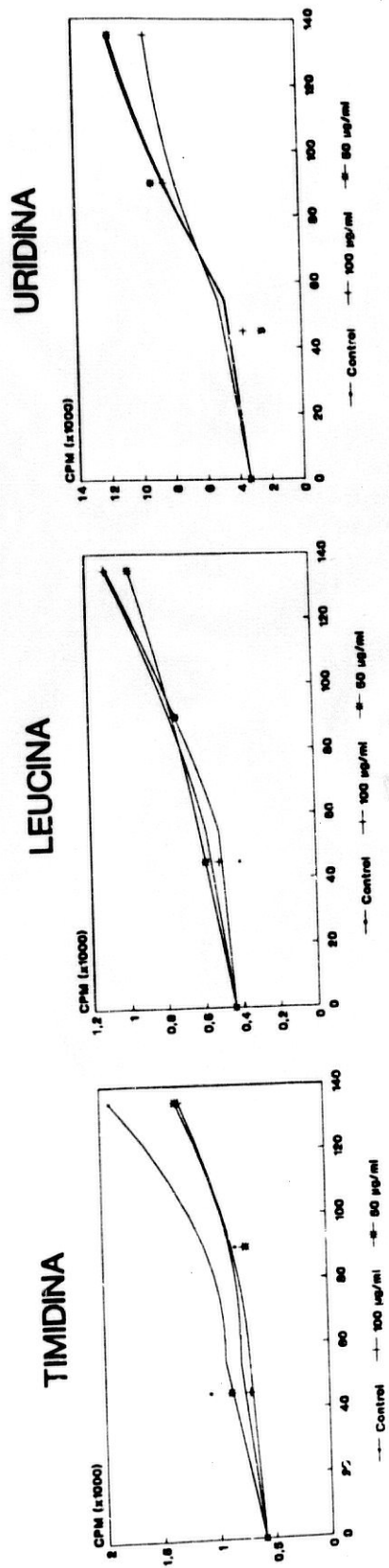
Efecto del [Rh(Oxamniquina)₄ Cl₂]⁺ Cl⁻ sobre la incorporación de Timidina, Leucina y Uridina 3H en *L. donovani*

FIGURA 45



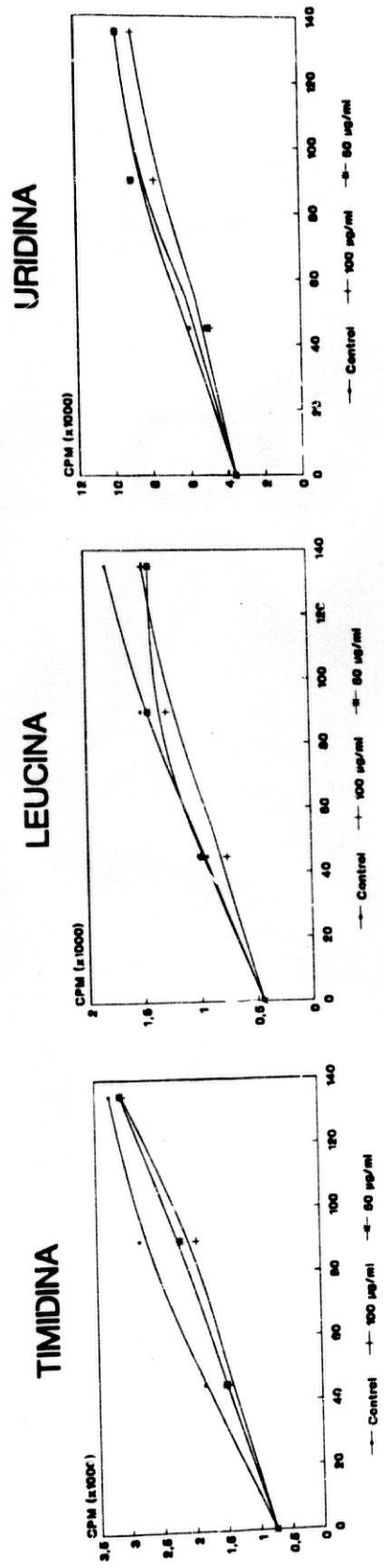
Efecto del Rh (Etilxantato)³ sobre la incorporación de Timidina, Leucina y Uridina 3H sobre *L. donovani*

FIGURA 46



Efecto del Ir(Anilinditiocarbamato)3 sobre la incorporacion de Timidina, Leucina y Uridina 3H en *L. donovani*

FIGURA 47



Efecto del Ir(Butilxantato)3 sobre la incorporacion de
 Timidina, Leucina y Uridina 3H en L. dorovani

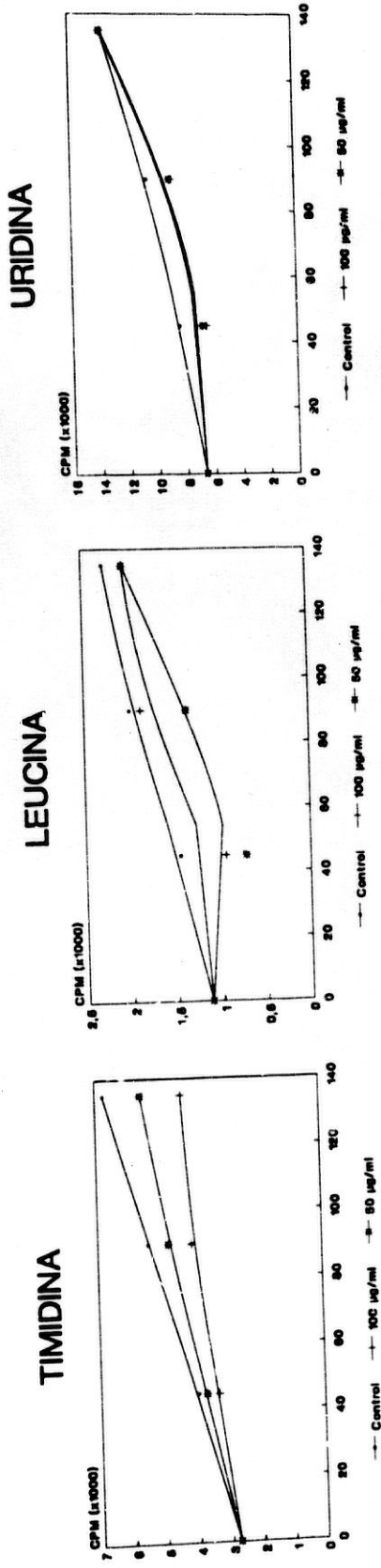
Por último se ensayaron cinco sales complejas: 2 de Ir(IV) y 3 de Pt(IV).

Los ligandos de las dos sales de Ir, eran las dos conocidas moléculas: Pentamidina y Berenil. Curiosamente el complejo con Berenil no mostró ninguna inhibición a pesar de ser este un conocido intercalante del DNA. Así mismo cuando el ligando es la Pentamidina sí hay inhibición en la incorporación de los tres precursores aunque esta fué menor que la que obtuvimos cuando este compuesto formaba parte del complejo cis-Pt (Pentamidina) I₂.

Y cuando esta formaba parte de la sal de Pt(IV): [Pt Br₆] H₂ (Pentamidina) sólo hubo inhibición en la incorporación de timidina. Sin embargo al sustituir la Pentamidina por la Stibamidina el complejo inhibió marcadamente la incorporación de timidina, leucina y uridina.

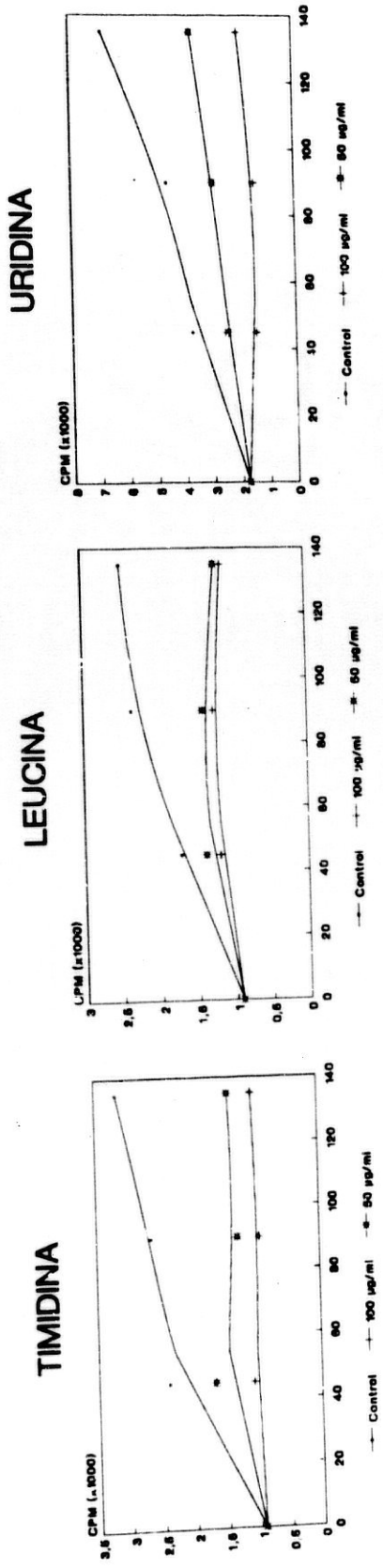
La sal: [Pt Cl₆] H₂ (2-piperacil(1)etilamina) no actuó sobre la biosíntesis de macromoléculas y además fué la única de las tres estudiadas que no resultó citotóxica.

FIGURA 48



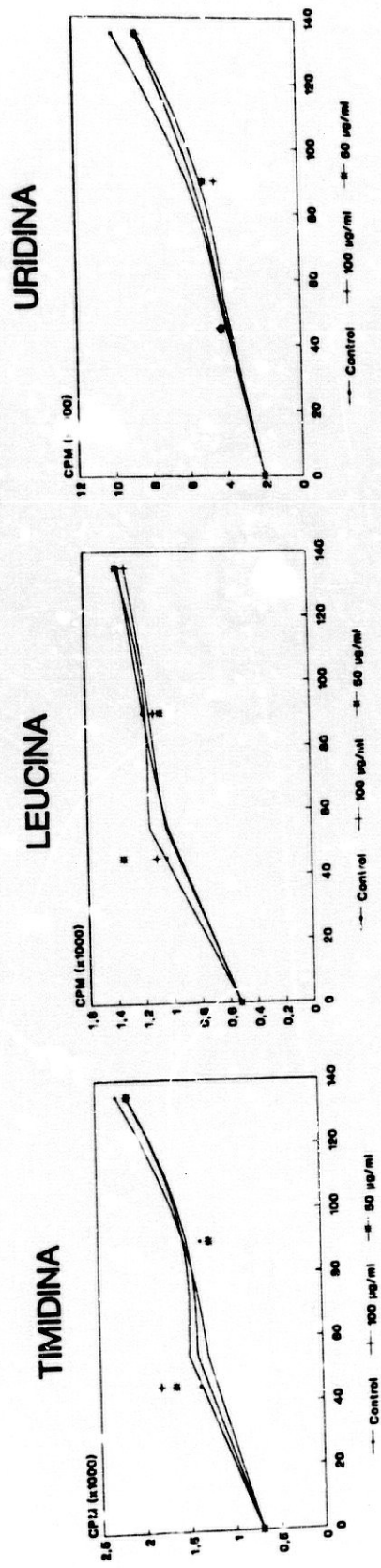
Efecto de la sal [Pt Br6] H2 (Pentamidina) sobre la incorporación de Timidina, Leucina y Uridina 3H en *L. donovani*

FIGURA 49



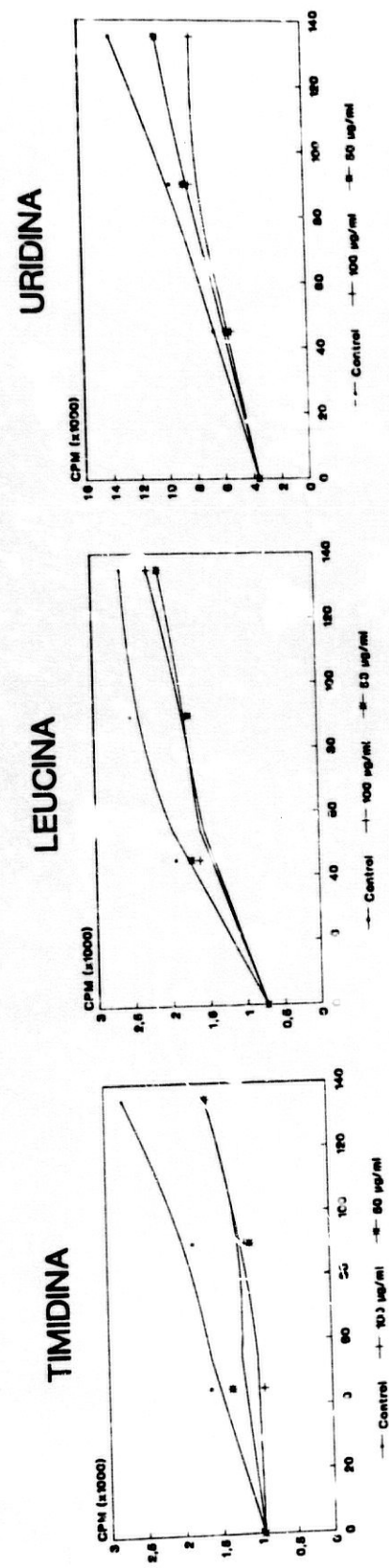
Efecto de la sal [Pt Br6] (Estilbamidina) sobre la incorporación de Timidina, Leucina y Uridina 3H en *L. donovani*

FIGURA 50



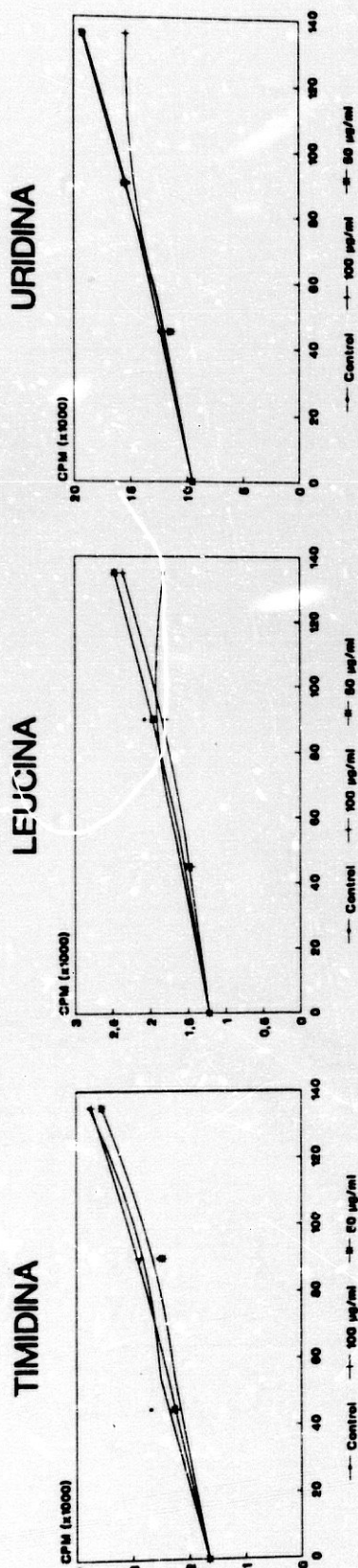
Efecto de la sal [Pt Cl6] H2 (2-Piperacilin(1)Etilamina) sobre la incorporación de Timidina, Leucina y Uridina 3H en *L. donovani*

FIGURA 51



Efecto de la sal [1r C16] H2 (Pentamida) sobre la incorporación de Timidina, Leucina y Uridina 3H en *L. donovani*

FIGURA 52



Efecto de la sal [Ir Cl6] H2 (Berenil) sobre la incorporación de Timidina, Leucina y Uridina 3H en *L. donovani*

4.4.- ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL DE LOS PARASITOS TRATADOS

Con objeto de valorar las posibles alteraciones ultraestructurales producidas por los distintos complejos sobre las formas promastigotes de L. donovani, sometimos, como se indica en el Material y Métodos, a los parásitos a la acción de los mismos, a la dosis de 100 $\mu\text{g/ml}$, durante 8 horas procesandose para microscopía electrónica de transmisión.

El estudio al microscopio electrónico de los parásitos tratados con la sal $[\text{Pt Cl}_6] \text{H}_2$ (2-Piperacini(1)Etilamina) demuestra un citoplasma denso, sin figuras de membrana.

Parecen iniciarse alteraciones en la estructura nuclear, en el sentido de que el endosoma central aparece fragmentado y la envoltura del núcleo no es muy neta. La cromatina está condensada en la periferia y laxa en el interior nuclear.

Aparecen gran cantidad de vacuolas en algunas de las microfotografías. Lo que podría ser reflejo de un proceso degenerativo que precede a la muerte y desintegración del parásito.

Con la sal $[\text{Ir Cl}_6] \text{H}_2$ (Berenil) la morfología de Leishmania se muestra fuertemente alterada. A nivel de citoesqueleto, el protozoo aparece mas distendido, con menos rigidez que los controles; de ahí que los organismos parezcan de mayor tamaño. El citoplasma aparece laxo, poco condensado y con espacios lacunares vacíos, al tiempo que se observan vacuolas lipídicas e inclusiones electrodensas.

Las alteraciones mas notables, sin embargo son las producidas a nivel mitocondrial. La mitocondria o bien aparece fragmentada, (Figura 3) o alterada fuertemente con estrechamientos y con extremos mazudos.

En la ultraestructura de los parásitos tratados con el complejo de Ir(III): Ir(Butilxantato)₃, se observa el citoplasma laxo, poco electrodense, rico en ribosomas libres. El contorno celular es irregular. Se observan vacuolas lipídicas y espacios lacunares vacíos.

La mitocondria aparece fragmentada, con criptas poco numerosas y matriz poco electrodensa, así como vacuolización intramitocondrial.

Las mayores alteraciones son las observadas a nivel nuclear. La contiguidad de la envoltura nuclear se ha perdido existiendo zonas de contacto nucleo-citoplasma, parecido a lo observado con intercalantes como las benzo-D-isoquinolinas (Osuna et al. 1983). El nucleo plasma aparece poco denso, la cromatina dispersa y lo mas notable es la formación de figuras de membrana mielínicas en huella digital. La cromatina y los endosomas aparecen muy condensados y se observan vacuolas intranucleares.

En la Figura 4 se observan las alteraciones producidas por cis-Pt (Guanetidina) Cl₂. La mayoría de los parásitos aparecen distendidos, con márgenes irregulares. Los túbulos del citoesqueleto aparecen netos así como la estructura flagelar.

El citoplasma es laxo, poco electrodense. En él se aprecian tanto vacuolas vacías como lipídicas, estas últimas a veces en número elevado. Así mismo aparecen vacuolas de contenido electrodense rodeadas por una unidad de membrana.

El kinetoplasto muestra una estructura normal. En contraposición a los resultados obtenidos por Ruiz-Perez et al. (1987) para el cis-DDP, así como otros análogos estructurales, frente a las formas epimastigotes de T. cruzi. Según estos autores la alteración a nivel de

kinetoplasto sería debido al efecto intercalante sobre el DNA mitocondrial que ejercen este tipo de complejos.

La existencia de varias secciones nucleares por célula puede llevar a pensar en una interrupción del proceso de división o en modificaciones de la estructura nuclear normal. La cromatina aparece fuertemente condensada en la periferia con estructura laxa en el interior del núcleo. El endosoma central muestra acúmulos electrodensos en la periferia. Estos efectos, sin embargo, si son comparables a los mostrados por sustancias con reconocida acción intercalante como el Bromuro de Etidio y la ellipticina (Benard y Riou, 1977).

Por último, los parásitos tratados con el complejo $[Rh(2\text{-Amino-6-etoxibenzotiazol})_4Br_2]^+ Br^-$ se observan con contorno irregular, lo que puede indicar alteraciones a nivel de la rigidez del citoesqueleto. Vacuolas lipídicas en número elevado y un citoplasma laxo.

Aparecen figuras membranales intranucleares e intramitocondriales. La cromatina periférica aparece fuertemente condensada y laxa en el interior nuclear. El endosoma central aparece fuertemente electrodenso.

4.5.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LEISHMANICIDA "IN VIVO"

Después de una serie de experiencias llevadas a cabo tal y como se describió en apartados anteriores, sobre la efectividad de los productos "in vitro", el siguiente paso obligado en los ensayos de quimioterapia es el estudio de su posible aplicación terapéutica.

Así realizamos la experiencia con animales infectados con formas promastigotes (infectivas) tal y como se detalla en el apartado de Material y Métodos, administrándole una vez establecida la infección por vía intraperitoneal los diferentes compuestos.

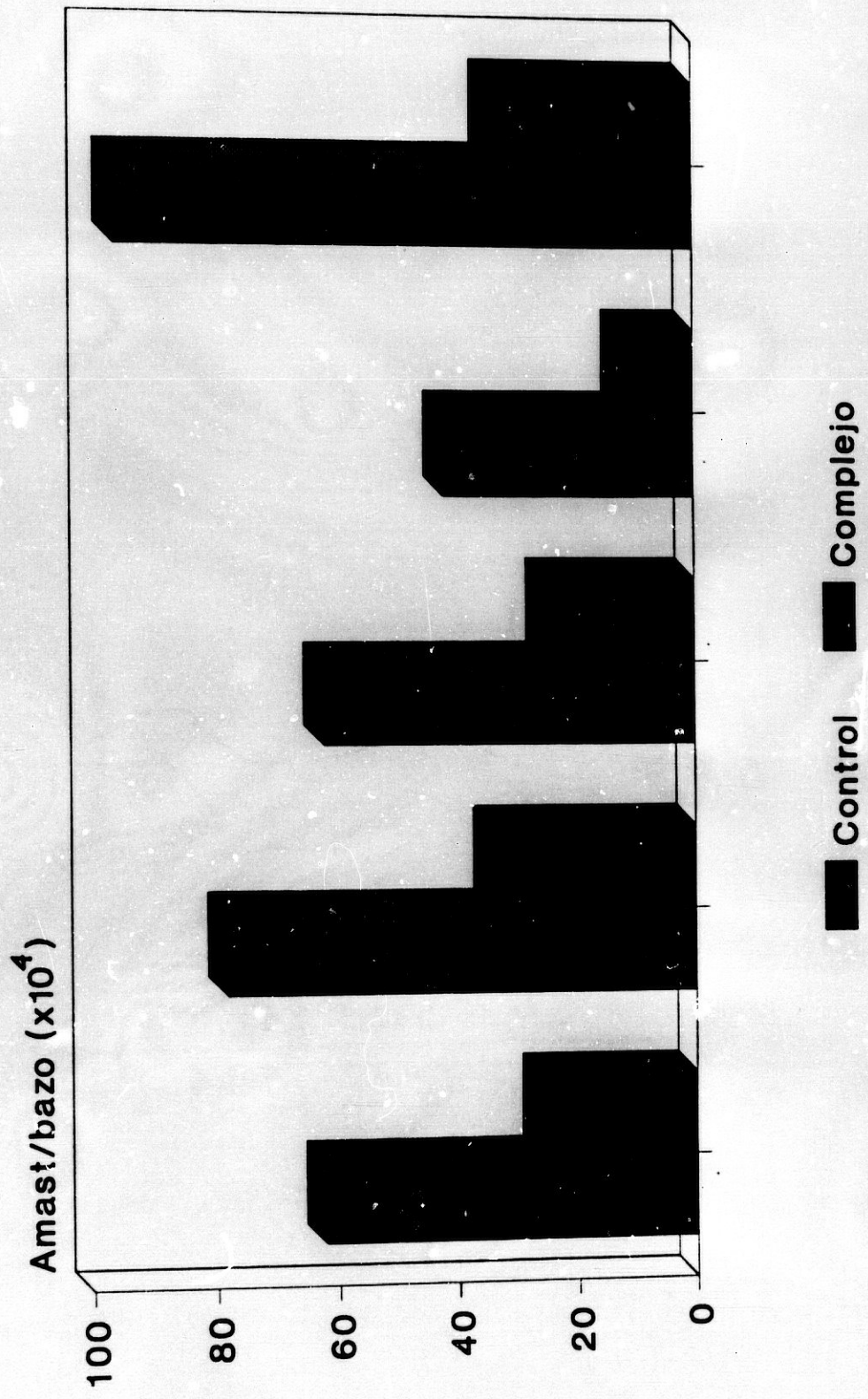
Evaluamos el grado de afectación de los amastigotes esplénicos tras la administración de los distintos complejos metálicos. Así mismo a lo largo de todo el periodo experimental, los animales fueron sometidos a un control de peso corporal. La evolución del mismo fué practicamente similar en los grupos control y en los tratados.

De los resultados obtenidos, reflejados en las tablas XLII, XLIII y XLIV, concluimos que los cinco complejos seleccionados para estos ensayos "in vivo" han sido efectivos contra los amastigotes de L. donovani, disminuyendo la parasitación esplénica (fig. 54a y 54b) así como la proporción de amastigotes por células nucleadas normales de bazo (fig. 55).

Teniendo en cuenta los resultados de estos estudios y el hecho de que la administración de los complejos sólo se realizó durante los primeros estadios de la enfermedad creemos que sería de gran interés realizar estudios farmacológicos mas profundos a fin de determinar la biodisponibilidad, modo de excreción, acumulación del complejo, diferentes pautas de administración, etc.

El objeto de estas investigaciones sería encontrar un nuevo fármaco para ser utilizado con fines terapeuticos, que supusiera abrir un nuevo camino en el tratamiento de la leishmaniosis visceral o kala-azar.

FIGURA 53a. EFECTO DE LOS COMPLEJOS SELECCIONADOS SOBRE LOS AMASTIGOTES ESPLENICOS.



1: Sal Pt(IV); 2: Sal Ir(IV); 3: Complejo Ir(III)
4: Complejo Cis-Pt(II); 5: Complejo Rh(III)

FIGURA 53b.

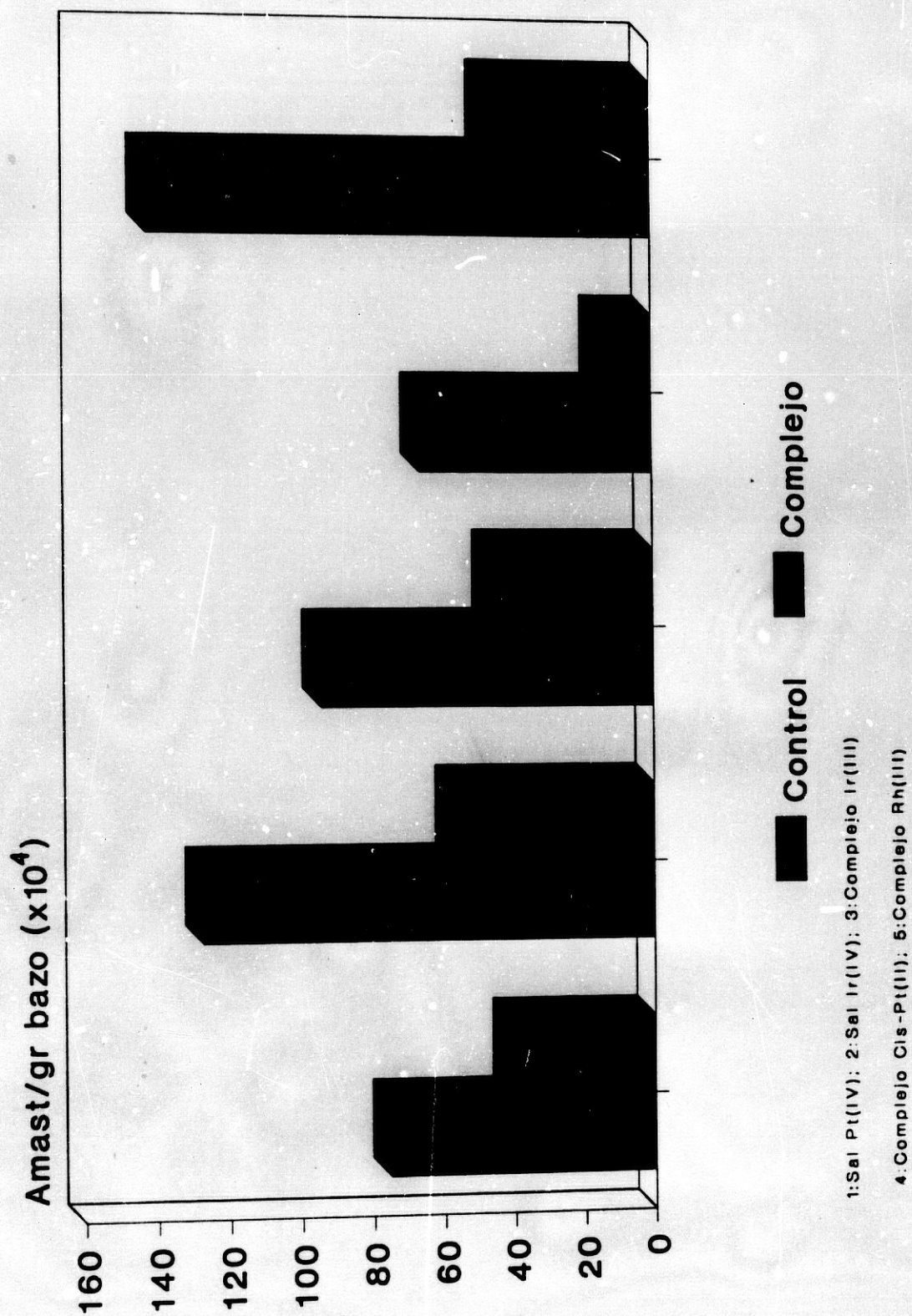
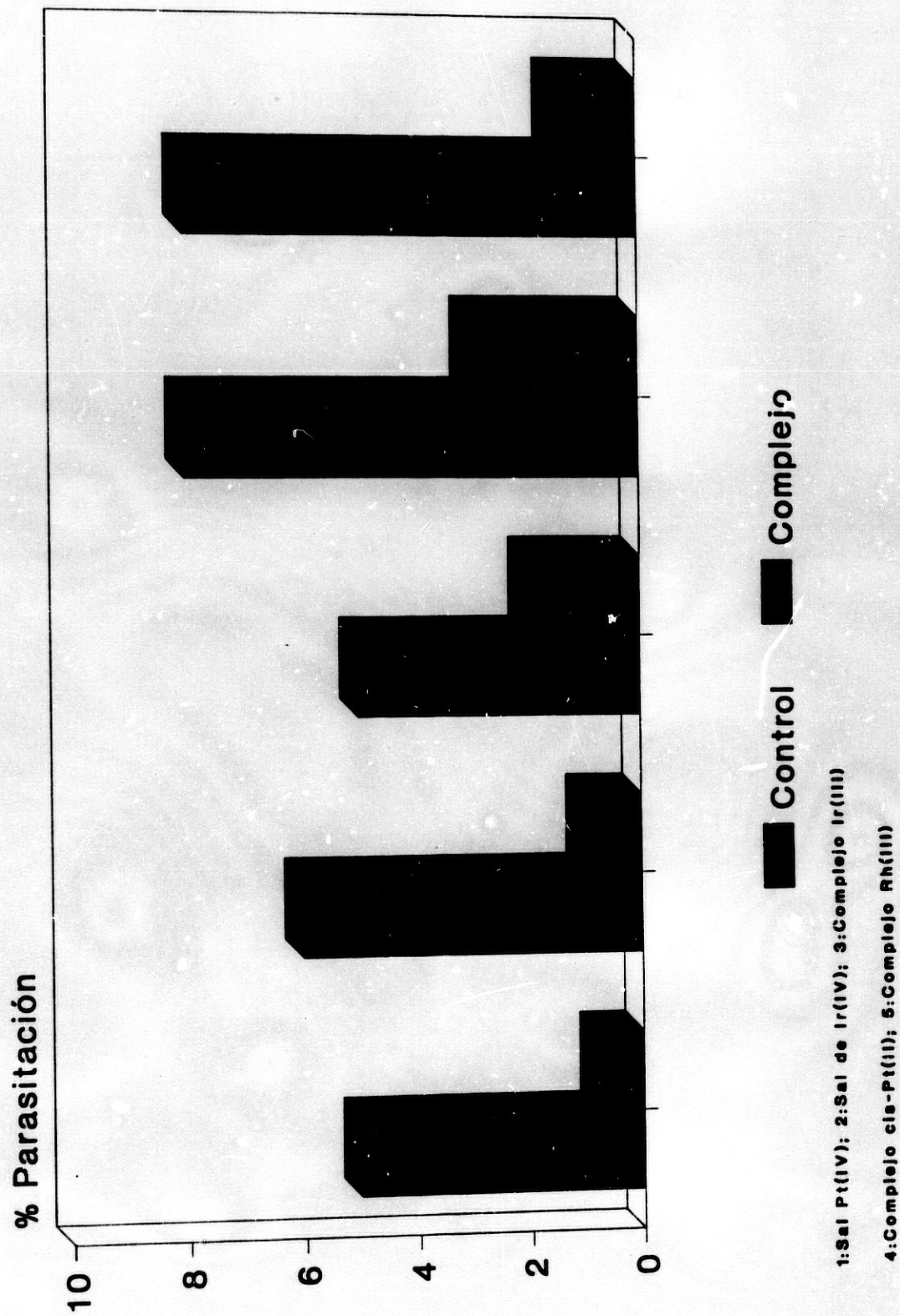


FIGURA 54. DISMINUCION EJERCIDA POR LOS COMPLEJOS SELECCIONADOS, EN EL PORCENTAJE DE PARASITACION ESPLENICA.



V. CONCLUSIONES

5.- CONCLUSIONES

1.- Los complejos metálicos derivados del cis-Pt(II) con el grupo DDH en su estructura no parecen mostrar una elevada actividad "in vitro" frente a las formas promastigotas de L. donovani.

2.- Los complejos del cis-Pt(II): cis-Pt(2,3,4,5,6-Pentafluoroanilina)₂ Br y cis-Pt(Pentamidina) I₂ fueron los mas activos "in vitro" frente a los parásitos aunque su elevada toxicidad frente a los macrófagos J 774 nos hizo descartarlos para posteriores ensayos "in vivo".

3.- De los complejos de Rh ensayados los que ejercieron mayores porcentajes de inhibición del crecimiento fueron los catiónicos de Rh(III): [Rh (L)_n X₂]⁺ X⁻.

4.- Las sales de Os(IV), Pd(II) y Au(III) ensayadas no mostraron ninguna actividad frente a promastigotes de L. donovani.

5.- Las sales de Pt(IV) con la Pentamidina, Stilbamidina y (2-Piperacilil(1)Etilamina) como ligandos ejercieron una inhibición del crecimiento elevada.

6.- Las sales de Ir(IV) con Cl en su estructura son mas activas que las que llevan Br, frente a la cepa empleada de L. donovani.

7.- Los complejos metálicos cuyos ligandos eran moléculas de acción conocida empleadas en quimioterapia parasitaria en general resultaron tóxicos para los macrófagos J774.

8.- Los complejos de Rh(III) con estructura octaédrica y con ligandos derivados del tiazol inhiben la síntesis de DNA, RNA y proteínas en promastigotes de L. donovani.

9.- La sal de Ir(IV): $[\text{Ir Cl}_6] \text{H}_2$ (Berenil) a nivel ultraestructural da lugar a la formación de figuras de membrana mielínicas en huella digital, lo que prueba un efecto lesivo a nivel de membrana. El complejo de Ir(III): Ir(Butilxantato)₃ da lugar a la aparición de figuras membranales en huella digital intranucleares, indicativo de procesos degenerativos a alta escala.

10.- Los dos complejos anteriores no inhibieron la síntesis de ADN ni de ARN en las formas promastigotes de L. donovani.

11.- El complejo de Pt(II): cis-Pt (Guanetidina) Cl₂ así como la sal de Pt(IV): $[\text{Pt Cl}_6] \text{H}_2$ (2-Piperacilil(1)Etilamina) a nivel ultraestructural producen alteraciones en el núcleo celular a pesar de no haber ejercido efecto sobre la incorporación de timidina, leucina y uridina 3H.

12.- El complejo de Rh(III): $[\text{Rh} (2\text{-amino-6-etoxibenzotiazol})_4 \text{Br}_2]^+ \text{Br}^-$ induce considerables alteraciones a nivel ultraestructural, inhibiendo además la síntesis de DNA, RNA y proteínas de las forma promastigotas de L. donovani.

13.- El complejo anterior fué el mas activo frente a las formas amastigotas de L. donovani en los ensayos "in vivo".

CONCLUSION FINAL

De los resultados obtenidos concluimos que algunos de los complejos metálicos ensayados podrían ser una nueva alternativa en la quimioterapia de la leishmaniosis visceral o kala-azar.

VI. BIBLIOGRAFIA

Adler, S. y Ber, M. 1941 The transmission of Leishmania tropica by the bite of Phlebotomus papatasi Indian Journal of Medical Research 29 803-9

Aguado, J. M.; Bonet, F.; Plaza, J. J. y Escudero, A. 1986 Visceral leishmaniasis in a renal transplant recipient: a diagnostic and therapeutic challenge. Journal of Infection 13 (3) 301-3

Alexander, J. 1978 Unusual axonemal doublet arrangement in the flagellum of Leishmania amastigotes. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 72 345-7

Alvar, J.; Verdejo, J.; Osuna, A.; najera, R. 1987 Visceral leishmaniasis in a patient seropositive for HIV. European Journal of Clinical Microbiology 6 (5) 604-6

Alving, C. R.; Steck, E. A.; Chapman, W. L. Jr; Waits, V. B.; Hendricks, L. D.; Swartz, G. M. jr y hanson, W. L. 1978b Therapy of leishmaniasis: superior efficacy of liposome encapsulated drugs. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75 2959-63

Alving, C. R.; Steck, E. a.; Hanson, W. L.; Loizeaux, P. S.; Chapman, W. L. Jr y Waits, V. B. 1978a Improved therapy of experimental leishmaniasis by use of a liposome-encapsulated antimonizal drug. Life Sciences 22 1021-6

Alving, C. R.; Steck, e. A.; Chapman, W. L. Jr; Waits, V. B.; Hendricks, L. D.; Swartz, G. M. y Hanson, W. L. 1980 Liposomes in leishmaniasi: therapeutic effects of antimonial drugs, 8-aminoquinolines and tetracyclines. Life Sciences 26 2231-8

Bachrach, U.; Brem, S.; Wertman, S. B.; Schnur, L. F. y Greenblatt, C. L. 1979a *Leishmania* spp: Cellular Levels and Synthesis of Polyamines during Growth Cycles *Experimental Parasitology* 48 457-63

Bachrach, U.; Brem, S.; Wertman, S. B.; Schnur, L. F. y Greenblatt, C. L. 1979b *Leishmania* spp: Effect of Inhibitors on Growth and on Polyamine and Macromolecular Syntheses. *Experimental Parasitology* 48 464-70

Badaro, R.; Jones, T. C.; Carvalho, E. M.; Sampaio, D.; Reed, S. G.; Barral, A.; Telzeira, R. y Johnson, W. D. Jr. 1987 New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniosis *Journal of Infectious Diseases* 154 (6) 1003-11

Barker, D. C. 1980 The ultrastructure of kinetoplast DNA with particular reference to the interpretation of dark field electron microscopy images of isolated purified networks *Micron* 11 1-72

Beach, D. H.; Goad, L. J.; Holz, G. G. J. 1988 Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania* promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 31 (2) 149-62

Benard, J.; Riou, G. 1977 Effects of 9-hydroxyellipticine on "in vitro" transcription of *T. cruzi* DNA. *Bioche. Biophys. Research Communic.* 77 1189-94

Berens, R. L.; Marr, J. J.; Nelson, D. J. y Lafon, S. W. 1980 Antileishmanial effect of allopurinol and allopurinol ribonucleoside on intracellular forms of Leishmania donovani. *Biochemical Pharmacology* 29 2397-8

Berens, R.L.; Deutsch, L.C. and Marr, J.J. 1980 "Regulation of aerobic fermentation in Protozoans. IX. Leishmania donovani and Leishmania braziliensis: hexokinase, glucose-6-phosphate dhydrogenase, and pentose phosphate shunt activity *Experimental Parasitology* 49 1-3

Berman, J. D. y Aikawa, M. 1984 Activity of immunoglobulin G- coated red cells ghosts containing pentamidine against macrophage-contained Leishmania in vitro. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 33 (6) 1112-8

Berman, J. D. y Lee, L. S. 1983 Activity of oral drugs against Leishmania tropica in human macrophages in vitro. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32 (5) 947-51

Berman, J. D.; Gallalee, J. F. y Gallalee, J. V. 1988 Pharmacokinetics of pentavalent antimony (Pentostam) in hamsters. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 39 (1) 41-47

Berman, J. D.; Holz, G. G. y Beach, D. H. 1984 Effects of ketoconazole on growth and sterol biosynthesis of Leishmania mexicana promastigotes in culture. *Molecular and Biochemical Parasitology* 12 (1) 1-13

Berman, J. D.; Keenan, C. M.; Lamb, S. R.; Hanson, W. L. y Waits, V. B. 1983 Leishmania donovani: oral efficacy and toxicity of formycin B in the infected hamster. *Experimental Parasitology* 56 (2) 215-21

Berman, J. D.; Waddell, D. y Hanson, B. D. 1985 Biochemical mechanisms of the antileishmanial effects of sodium stibogluconate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 27 916-20

Berman, J. D.; Gallalee, J. V.; Willians, J. S. y Hocmeyer, W. D. 1986 Activiti of pentamidine-containing human red cell ghosts against visceral leishmaniasis in the hamsters. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35 (2) 297-302

Black, C. D. V.; Watson, G. J. y Ward, R. J. 1977 The use of Pentostam liposomes in the chemotherapy of experimental leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 71 350-2

Blez, m. F. 1970 Cutaneous leishmaniasis. *Bulletin de la Societe Française de Dermatologie et de syphiligraphie* 77 280-1

Borelli, D. 1987 A clinical trial of itraconazole in the treatment of deep mycoses and leishmaniasis. *Reviews of Infectious Diseases* 9 (1) 557-70

Borovsky, P. F. 1898 On Sart Sore *Voenno-Medicinskij Zurnal* 195 (11) 925-41

Borst, P. 1977 Metabolism and Chemotherapy of African trypanosomes Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 71 3-4

Brunk, U.; Collins, U. P. y Arro, E. 1981 The fixation, dehydration, drying and coating of cultured cells for SEM Journal of Microscopy 123 121

Bryceson, A. D. M. 1968 Pentamidine-induced diabetes mellitus East Africa Medical Journal 45 110-7

Bryceson, A. D. M. 1970 Diffuse cutaneous leishmaniasis: II Treatment. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 64 369-79

Bryceson, A. D. M.; Chulay, J. D.; Mugambi, M.; Were, J. B.; Gachihi, G.; Chunge, C. N.; Muigai, R.; Bhatt, S. M.; Ho, M.; Spencer, H. C.; Meme, J. y Anabwani, G. 1985 Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs, II: Response to high dose sodium stibogluconate or prolonged treatment with pentamidine. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 62 152-3

Burgess, J. L. y Birchall, R. 1972 Nephrotoxicity of amphotericin B, with emphasis on changes in tubular function. American Journal of Medicine 53 77

Carson, D. A. y Chang, K. P. 1981 Phosphorilation and antileishmanial activity of formycin B. Biochemical biophysical Research Communications 100 1377-83

Cleare, M.J. 1974 Transition Metal Complexes in Cancer Chemotherapy Coord. Chem. Rev. 12 349-405

Connors, T. A.; Jones, M.; Ros, W. C. J.; Braddock, P. D.; Khokhar, A. R.; Tobe, M. L. 1972 New platinum complexes with antitumour activity Chem. Biol. Interactions 5 415-22

Coombs, G. H. 1982 Proteinases of Leishmania mexicana and other flagellate protozoa Parasitology 84 149-55

Coombs, G. H. y Baxter, J. 1984 Inhibition of Leishmania amastigote growth by antipain and leupeptin Ann. Trop. Med. Parasitol. 78 21-4

Coombs, G.H.; Craft, J.A. and Hart, D.T. 1982 A comparative study of Leishmania mexicana amastigotes and promastigotes. Enzyme activities and subcellular locations Molecular and Biochemical Parasitology 5 199-211

Craciunescu, D. G.; Parrondo-iglesias, E.; Alonso, M. P.; Molina, C.; Doadrio, A.; Gomez, A.; Mosquera, R.M. Ghirvu, C.; Gaston de Iriarte, E. 1988 Sintesis, caracterizacion estructural estudio de las propiedades duales (actividades antitumorales y antitripanosomicas) y evaluacion de la nefrotoxicidad de algunos nuevos complejos (Os III (L)3) y (Ru III (L)3), donde L = derivado de alquil o ... An. Real Acad. Farm. 54 16-45

Craciunescu, D. G.; Furlani, A.; Scarcia, V. y Doadrio, A. 1985 Synthesis, Cytostatic, and Antitumour Properties of New Rh(I) Thiazole Complexes Biological Trace Element Research 8 251-61

Craciunescu, D. G.; Molina, C.; Doadrio, A.; Parrondo, E.; Gomez, A.; Sanchez de Leon, M.; Gaston de Iriarte, E. y Ghirvu, C. 1987 Sintesis y caracterizacion estructural, estudio de las propiedades duales (actividades antitumorales y actividad antitripanosomica) y evaluacion de la nefrotoxicidad de algunos nuevos complejos (RhIII (L)₃), donde L = derivado de alquil o aril...
An. Real Acad. Farm. 53 205-32

Craciunescu, D. G.; Parrondo-Iglesias, E.; Doadrio, A.; Ruiz- Perez, L. M.; Osuna, A.; Ercoli, N. y Gaston de Iriarte, E. 1989 Complejos del Rh(III) de accion antitripanosomica An. Real Acad. Farm. 55 213-36

Craciunescu, D. G.; Parrondo-Iglesias, E.; Molina, C.; Doadrio- Lopez, A.; Gaston de Iriarte, E.; Ghirvu, C. 1988 Estudio de las actividades farmacologicas duales (actividades antitripanosomicas y actividades antitumorales) y de la nefrotoxicidad de algunos nuevos complejos de Ru(II) e Ir(II) donde L = derivado de alquil o aril ditiocarbamato y/o xantato. An. Real Acad. Farm. 54 46-69

Craciunescu, D.; Doadrio, a.; Furlani, A.; Scarcia, V. 1983 Relationship for the Rh(III) complexes with sulphonamide and thiazole derivatives An. Real Acad. Farmacia 49 515-31

Craciunescu, D.; Ghirvu, C.; Doadrio, A. 1983 Structure-activity relationships for the Rh(III) complexes with sulphonamide and thiazole derivatives. An. R. Acad. Farm. 49 515-31

Craciunescu, D.; Molina, C.; Carvajal, R. M.; Doadrio-Lopez, A.; Berger, M. y Ghirvu, C. 1986 Estudio de las actividades antitumorales y/o antitripanosomicas de dos nuevas series de complejos del Pt(II): cis-Pt(L)₂(Br)₂ (donde L = derivado de tiazol y/o derivado de sulfonamida) y cis-Pt(L)(X) (donde n = 1 o 2; L = 1,2-Diaminociclohexano... Anales de la Real Academia de Farmacia 52 45-64

Cunningham, D.D. 1885 On the presence of peculiar parasitic organisms in the tissue culture of a specimen of Delhi boil Scientific Memoirs by Medical Officers of the Army of India 1 21-31

Chang, K. P. 1980 Science 201 1240-2

Chang, S. L. 1948 Studies on hemoflagellates. IV Observations concerning some biochemical activities in culture and respiration of the three species of Leishmania and Trypanosoma cruzi Journal of Infections Diseases 82 109-18

Chapman, W. L. Jr; Hanson, W. L.; Waits, V. B. y Kinnamon, K. E. 1979 Antileishmanial activity of selected compounds in dogs experimentally infected with Leishmania donovani. Revista do Instituto de Medicina Tropical, Sao Paulo 21 189-93

Childs, G. E.; Mc Roberts, M. J. y Fester, K. A. 1976 Trypanosoma cruzi: Interaction with Vertebrate Cells DNA Synthesis and Relationship to Host Cell DNA, Synthesis and Growth. J. Protozool. 26 599-604

Chulay, J. D.; Fawcett, D. W. y Chunge, C. N. 1985a Electron microscopy of Leishmania donovani in splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis during treatment with sodium stibogluconate. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 79 (4) 417-29

Chulay, J. D.; Smith, D. H. y Pamplin III, C. L. 1988 Pharmacokinetics of antimony during treatment of East African kala-azar with sodium stibogluconate and N-methyl glucamine antimoniate. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82 (1) 69-72

Chulay, J.D.; Spencer, H.C.; Mugambi, M. 1985 Electrocardiographic changes during treatment of leishmaniasis with pentavalent antimony (sodium stibogluconate). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 34 702-9

Chung, H. L. 1953 A resume of kala-azar work in China *Chinese Medical Journal* 71 421-64

Dagger, F.; Ayesta, C. y hernandez, A. G. 1984 The effect of tunicamycin on Leishmania braziliensis cell growth, cell morphology and ultrastructure *Biol. Cell.* 50 173-80

Decker-Jackson, J. E. y Honigberg, B. M. 1978 Glycoproteins Released by Leishmania donovani: Immunologic Relationships with Host and Bacterial Antigens and Preliminary Biochemical Analysis *Journal Protozoology* 25 514-25

Dehand, J.; Jordanov, J. 1976 Antitumour activity the Rh(III) complexes *Inorganica Chim. Acta*

Donovan, C. 1903 On the possibility of the occurrence of tripanosomiasis in India British Medical Journal 2 79

Dwyer, D. M. y Gottlieb, M. 1983 J. Cell. Biochem. 23, 35- 46. Citado por Chang, K. P.; Fong, D. y Bray, R. S. Biology of Leishmania and leishmaniasis en "Leishmaniasis" (Chang/Bray, eds.) 1985 10

Elion, G. B.; Callahan, S.; Rundles, R. W. y Hitchings, G. H. 1963 Relationship between metabolic fates and antitumor activities of thiopurines. Cancer Research 23 1207

El-On, J.; Rubinstein, N.; Kernbaum, S. y Schnur, L. F. 1986 In vitro and in vivo anti-leishmanial activity of chlorpromazine alone and combined with N-meglumine antimonate. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 80 (5) 509-17

El-Saalee, L.; Khalifa, T. y Saleh, A. 1986 Fouadin and metronidazole combination in cutaneous leishmaniasis. Journal of the Faculty of Medicine Baghdad 28 (2) 11-8

Evans, A. T.; Croft, S. L.; Peters, W. y Neal, R. A. 1989 Hydrazide antidepressants possess novel antileishmanial activity in vitro and in vivo. Annals of tropical Medicine and Parasitology 83 (1) 19-24

Farrell, N. P.; Williamson, J. y McLaren, J. 1984 Trypanocidal and antitumour activity of platinum-metal and platinum-metal-drug dual function complexes Biochemical Pharmacology 33 961-71

Farrell, N. P.; Willianson, J. y McLaren, D. J. 1983 Platinum- metal complexes as dual-function agents in chemotherapy. Fourth International Symposium on Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy, Vermont USA

Frank, O.; Baker, H y Hutner, S. H. 1970 Antagonist of growth inhibition of Crithidia by allopurinol, a guanine analogue. *Journal Protozoology* 17 (2) 153-8

Fulton, J. D. y Joyner, L. P. 1949 Studies on Protozoa. Part I. The metabolism of Leishman-Donovan bodies and flagellates of Leishmania donovani *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 43 273-86

Furtado, T. A. 1968 An appraisal of chemotherapy of American Leishmaniasis. *Dermatologia Ibero Latino-Americana (English Edition)* III 257-68

Gamarro, F. 1983 Contribuci"n al Conocimiento de las Interiorizaciones entre Trypanosoma cruzi-Celula hospedadora. Tesis Doctoral 92-6

Gambarelli, F.; Franck, J. y Dumon, H. 1987 Sensitivity of *Leishmania* spp to antimonials. Use of mouse peritoneal macrophages. *Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale* 67 (2) 149-55

Gardener, P. J.; Shchory, L. y Chance, M. L. 1977 Species differentiation in the genus Leishmania by morphometric studies with the electron microscope *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 71 147-55

Gasq, M. y Lapeysonnie, L. 1949 Les diamidines aromatiques incidents de traitement action sur le glycemie. *Medecine Tropicale, Marseille* 9 785-804

Gellhorn, A.; Tupikova, N. A. y Van Dyke, H. B. 1946 The tissue distribution and excretion of four organic antimonials after single or repeated administration to normal hamsters. *Journal of Pharmacology* 27 169-80

Giraldi, T.; Sava, G.; Bertoli, G.; mestroni, G. y Zassinovich, G. 1977 Antitumour action of two rhodium and ruthenium complexes in comparison with cis-dichlorodiamino platinum (II) *Cancer Re.* 37 2662

Giraldi, T.; Sava, G.; Mestroni, G.; Zassinovich, G. y Stolfa, D. 1978 Antitumour action of Rhodium (I) and Iridium (I) complexes *Chem. Biol. Interactions* 22 231-238

Giraldi, T.; Zassinovich, G. y Mestroni 1974 Antitumour action of planar, organometallic rhodium (I) complexes *Chem. Biol. Interactions* 9 389

Glew, R. H.; Czuczman, Ms; Diven, W. F.; Berens, R. L.; Pope, M. T. y Katsoulis, D. E. 1982 *Comp. Biochem. Physiol.* 72-B, 581-90. Citado por Chang, K.P.; Fong, D and Bray, R.S. *Biology of Leishmania and leishmaniasis en "Leishmaniasis" (Chang/Bray, eds.)* 1985 11

Goad, L. J.; Holtz, G. G. y Beach, D. H. 1985 Sterols of ketoconazole-inhibited Leishmania mexicana mexicana promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 15 (3) 257- 79

Grady, R. W.; Blobstein, S. H.; Meshnick, S. R.; Ulrich, C. P.; Cerami, A.; Amirmoazzami, J. y Hodnett, E. M. 1984 The in vitro trypanocida activity of n-substituted p-benzoquinone imines: Assessment of biochemical structure activity relationship using the Hansch approach Journal of Cellular Biochemistry 25 15-29

Grahame, R.; Simmonds, H. A.; Cameron, J. S. y Cadenhead, A. 1977 Thiipurinol: Dose-related effect on urinary oxypurine excretion. Adv. Exp. Med. Biol. 76B 312-

Grahame, R.; Simmons, H. A.; Cadenhead, A. y Bean, B. M. 1974 Metabolic studies of thiopurinol in man and pig. Adv. Exp. Med. Biol. 41 597-

Greenblatt, C. L.; Meline, D.; Slutzky, M. y Schnur, L. F. 1984 Surface reaction of Leishmania. III Ulex europaeus II Lectin affinity for excreted factor (EF) serotype A strains Ann. Trop. Med. Parasitol. 78 99-107

Hanson, W. L.; Chapman, W. L. Jr y Kinnamon, K. E. 1977 Testing of drugs for antileishmanial activity in golden hamsters infected with Leishmania donovani. International Journal of Parasitology 7 443-7

Hanson, W. L.; Chapman, W. L. Jr. y Kinnamon, K. E. 1977 Testing of drugs for antileishmanial activity in golden hamsters infected with Leishmania donovani. International Journal of Parasitology 7 443-7

Hanson, e. D.; Nakabayashi, T.; Ishibasai, M. e Inoki, S. 1963 editResistance to the drug propamidine in Leishmania donovani Biken Journal 6 1-7

Hart, D. T.; Vickerman, K. y Coombs, G. H. 1981 A quick, simple method for purifying Leishmania mexicana amastigotes in large numbers. *Parasitol.* 82 345-55

Hazarika, A. N. 1949 Treatment of kala-azar with pentamidine isethionate: a study of 55 cases. *Indian Medical Gazette* 84 140-5

Henderson, J. F. y Paterson, A. R. P. 1973 in *Nucleotide Metabolism*, p. 116, Academic Press, New York. Citado por Marr J. J. y Berens R. L. "Purine and pyrimidine metabolism in Leishmania" in *Leishmaniasis* (Chang/Bray, eds.) 1985 68

Hernandez, A. G. 1983 in *Cytopathology of Parasitic Diseases*. Ciba Found. Symp. 99, 138-56. Citado por Chang, K. P.; Dunne Fong y Bray, R. S. "Biology of Leishmania and leishmaniasis" in *Leishmaniasis* (Chang/Bray, eds.) 1985 11

Iovannisci, D. M.; Kaur, K.; Young, L. y Ullman, B. 1984 Genetic analysis of nucleoside transport in Leishmania donovani *Mol. Cell. Biol.* 4 1013-9

Jha, I. K. 1983 Evaluation of diamidine compound (pentamidine isethionate) in the treatment of resistant cases of kala-azar occurin in North Bihar, India. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 77 167-70

Jha, T. K. y Sharma, V. K. 1984 Pentamidine-induced diabetes mellitus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygien.* 78 (2) 252-3

Johnson, J. L. y Werbel, L. M. 1983 Synthesis and antileishmanial activity of 6-methoxy-4-methyl-N-[6-(substituted- 1-piperazinyl)hexyl]-8-quinolinamines and related compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* 26 (2) 185-94

Kanan, M. W. 1975 The fine structure of Leishmania enriettii in the Guinea pigs. *International Journal of Parasitology* 5 651-7

Kennedy, J. S. y Anderson, J. D. 1983 The effect of treatment of the associated disease on the development of amyloidosis in the experimental animal. *Journal of Parasitology* 14 (1) 11-15

Killick-Kendrick, R. 1979 Biology of Leishmania in Phlebotomine sandflies. In: *Biology of the kinetoplastida* (W. H. R. Lumsden and D. A. Evans, Eds.) Academic Press Inc.: London, New York 2 395-460

Killick-Kendrick, P.; Leaney, A. I.; Ready, T. D. y Molyneux, D. H. 1977 Leishmania in phlebotomid sandflies. IV. The transmission of Leishmania mexicana amazonensis to hamsters by the bite of experimentallyinfected Lutzomyia longipalpis *Proceedings of the Royal Society, London B* 196 105-15

Killick-Kendrick, R.; Molyneux, D. H. y Ashford, R. W. 1974 Leishmania in phlebotomid sandflies. I. Modifications of the flagellum associated with attachment to the mid-gut and oesophageal valve of the sandfly *Proc. R. Soc. London ser. B* 187 409-19

Kinnamon, K. F.; Steck, E. A. y Rane, S. D. 1979 Activity of antitumour drugs against African trypanosomes *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 15 157-60

Kinnamon, K. E.; Steck, E. A.; Loizeau, P. S.; Hansen, W. L.; Chapman, W. L. Jr y Waits, V. B. 1978 The antileishmanial activity of lepidines. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene* 27 (4) 751-7

Korolkovacs, A. 1970 *Essentials of molecular pharmacology* Academic Press, N. Y. New York

Krassner, S. M. y Flory, B. 1972 Proline metabolism in Leishmania donovani promastigotes *Journal Protozoology* 19 682-5

Krenitsky, T. A.; Koszalka, G. W.; Tuttle, J. V.; Adamczyk, D. L.; Elion, G. B. y Marr, J. J. 1980 Purine salvage enzymes in man and Leishmania donovani. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 122 51-6

Kubba, R.; Al-Gindan, Y.; El-Hassan, A. M.; El-Hamid, A. y Omer, S. 1986 Ketoconazole in cutaneous leishmaniasis: results of a pilot study. *Saudi Medical Journal* 7 (6) 596-604

Launoy, L.; Guillot, M y Jouchere, H. 1960 Etude du stockage et l'élimination de la pentamidine chez la souris et le rat blanc. *Annales Pharmaceutique Francaises* 18 223-84

Laveran, A y Mesnil, F. 1903 Sur un protozoaire nouveau (Piroplasma donovani Lav. et Mesn.) Parasite d'une fièvre de L'Inde *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de L'Academie des Sciences* 137 957-61

Leishman, W. B. 1903 On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India *British medical Journal* 1 252-54

Leon, W.; Frasch, A.; Hoeijmakers, J. A.J.; Fase-Fowler, F.; Borst, P.; Davison, J. 1980
Maxi-circles and mini-circles in kinetoplast DNA from Trypanosoma cruzi *Biochim. Biophys.*
Acta 607 221-31

Lichey, J.; Linderer, Th. yissmann, Th. 1979 Ein Erkrankungsfall an viszeraler Leishmaniose
(Kala-azar): Nebenwirkungen bei der Behandlung mit Pentamidine. *Munchener Medizinische*
Wochenschrift 121 665-6

Looker, D. L.; Berens, R. L. y Marr, J. J. 1983 A mechanism for the antileishmanial action of
pyrazolopyrimidines. *Molecular and Biochemical Parasitology* 9 15-28

Lopez, M. C.; Ruiz-Perez, L. M.; Craciunescu, D.; Doadrio, A.; Osuna, A.; Alonso, C. 1986
Studies on the interaction between cis-DDP analogs with DNA *Chem. Biol. Interactions* 59
99-111

Macquet, J. P.; Butour, J. L. 1978 Modifications of the DNA secondary structure upon platinum
binding: a proposed model *Biochimie.* 60 901-14

Maegraith, B. G.; Brundrett, J. C.; Rigby, J. D. y Sladden, R. A. 1947 Sodium stibogluconate
in the treatment of kala-azar: Report on the treatment of eight cases and the appearance of
probable drug reactions. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 41 118-28

Manson-Bahr, P. E. C. y Heisch, R. B. 1956 Studies in leishmaniasis in East Africa. III.
Clinical features and treatment. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and*
Hygiene 50 465-71

Marchand, F. y Ledingham, J. C. G. 1904 On the question of trypanosoma infection in man
Lancet 166 145-50

Marr, J. J. y Berens, R. L. 1977 Antileishmanial effect of allopurinol. II. Relationship of adenine metabolism in Leishmania species to the action of allopurinol. Journal of Infectious Diseases 136 724-31

Marr, J. J.; Berens, R. L. y Nelson, D. I. 1978 Purine metabolism in Leishmania donovani and Leishmania braziliensis. biochem. Biophys. Acta 544 360-71

Marr, J. J.; Berens, R. L.; Nelson, D. J.; Krenitsky, T. A.; Spector, T.; Lafon, S. W. y elion, G. B. 1981 Antileishmanial action of 4-thiopyrazolo (3,4-d)pyrimidine and its ribonucleoside: biological effects and metabolism. Biochemical Pharmacology 31 143-8

Marr, J.J. 1980 In Biochemistry and Physiology of Protozoa (Levandowsky, M. and Hutner, S.H. eds) 2nd eddn. Academic Press, New York. 3 313-40

Mattock, N. M. y Peters, W. 1975 The experimental chemotherapy of leishmaniasis. II. The activity in tissue culture of some antiparasitic and antimicrobial compounds in clinical use. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 69 359-71

Mcneely, T.B. and Turco, S.J. 1990 Lipophosphoglycan for intracellular survival of Leishmania donovani within human monocytes. Journal of Immunology 144 2745-50

Mesa-Valle, C. M.; Craciunescu, D.; Parrondo-Iglesias, E. y Osuna, A. 1989 In vitro action of Platinum (II) and Platinum (IV) Complexes on *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* *Arzneimittel-Forschung/Drug Research* 39 (II) 338-42

Meshnic, K. S. R. y Eaton, J. W. 1981 Leishmanial superoxide dismutase: a possible target for chemotherapy *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102 970-6

Mittal, V.; Shegal, S.; Yadav, T. P. y Singh, V. K. 1987 Congenital transmission of Kala-azar *Journal of Communicable Diseases* 19 (2) 184-5

Molyneux, D. H.; Killick-Kendrick, R. y Ashford, R. W. 1975 *Leishmania* in phlebotomid sandflies. III. The ultrastructure of *L. mexicana amazonensis* in the midgut and pharynx of *Lutzomyia longipalpis* *Proc. R. Soc. London jSer. B* 190 341-57

Molyneux, D. H.; Killick-Kendrick, R. y Ashford, R. W. 1975 *Leishmania* in phlebotomid sandflies. III. The ultrastructure of *Leishmania mexicana amazonensis* in the midgut and pharynx of *Lutzomyia longipalpis* *Proceedings of the Royal Society, London B* 190 341-57

Morgan, F.M.; Watten, R. H. y Kuntz, R. E. 1962 Post-kala-azar dermal leishmaniasis: a case report from Taiwan (Formosa). *Journal of Formosa Medical Association* 61d 282-9

Morrow, C. D.; Flory, B. y Krassner, S. M. 1980 Poliamines in the hemoflagellate, *Leishmania donovani*: evidence for spermine in the amastigote stage. *Biochem. Physiol.* 66B 307-11

Mukkada, A.J. 1977 Tricarboxylic acid and glyoxylate cycles in the *Leishmaniae* Acta Tropica 34 167-75

Muller, W. E. G.; Rohde, H. J. y Steffen, R. 1975 Influence of formycin B on polyadenosine diphosphoribose synthesis in vitro and in vivo. Cancer Research 35 3673-

Munis, J. y Medina, H. 1948 Leishmaniose tegumentar do cobaio Hospital Rio de Janeiro 33 7-25

Murphey, S. A. y Josephs, A. S. 1981 Acute pancreatitis associated with pentamidine therapy. Annals of International Medicine 141 56-8

Naafs, B. 1985 Pentamidine-induced diabetes mellitus. Transactions of royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 79 (1) 141

Neal, R. A. 1964 Chemotherapy of cutaneous leishmaniasis: Leishmania tropica infections in mice. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 58 420-30

Neal, R. A. 1968 The effect of antibiotics of the neomycin group in experimental cutaneous leishmaniasis. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 62 54-62

Neal, R. A. 1972 Effect of dihydrofolate reductase inhibitors on experimental cutaneous leishmaniasis with especial emphasis on Leishmania isolates from Latin-America. Revista do Instituto de Medicina Tropical, Sao paulo 14 341-51

Neal, R.A. 1983 Experimental Chemotherapy of leishmaniasis in "Chemotherapy and immunology in the control of malaria, filariasis and leishmaniasis". (Edited by Nitya Anand; Sen, A.B.). New Delhi, India. 255-63

Nelson, D. J.; Lafon, S. W.; Elion, G. B.; Marr, J. J. y Berens, R. L. 1980 Comparative metabolism of a new antileishmanial agent, allopurinol riboside, in the parasite and host cell. *Advances in experimental Medicine and Biology* 122 B 7-12

Nelson, D. J.; Lafon, S. W.; Jones, T. E.; Spector, T.; Berens, R. L. y Marr, J. J. 1982 The metabolism of formycin B in Leishmania donovani *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108 (1) 349- 54

Nelson, D. J.; Lafon, S. W.; Tuttle, J. V.; Miller, W. H.; Miller, R. L.; Krenitsky, T. A. Y Elion, G. B. 1979 Allopurinol ribonucleoside as an antileishmanial agent: biological effects, metabolism and enzymatic phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 254 11544-9

New, R. P. R.; Chance, M. L.; Thomas, S. C. y Peters, W. 1978 Antileishmanial activity of antimonials entrapped in liposomes. *Nature, London.* 272 55-6

New, R. R. C.; Chance, M. L.; Thomas, S. C. and Heath, S. 1981 Antileishmanial activity of amphotericina and other antifungal agents entrapped in liposomes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 81 371-81

Noian, L. L.; Berman, J. D. y Giri, L. 1984 The effect of formycin B on mRNA translation and uptake of purine precursors in Leishmania mexicana. *Biochem. Internat.* 9 207-18

Osuna, A.; Castanys, S.; Ortega, G.; Gamarro, F.; Aneiros, J.; Braça, M. F. y Roldan, C. M. 1983 Estudio ultraestructural de la acción de dos derivados benzo(de) isoquinolil-1,3,-diona sobre Trypanosoma cruzi Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo 25 133-8

Otto, G. F.; Maren, T. H. y Brown, H. W. 1947 Blood levels and excretion rates of antimony in persons receiving trivalent and pentavalent antimonials. American Journal of Hygiene 46 193-211

Panosian, C. B.; Barza, M.; Szoka, F. y Wyler, d. J. 1984 Treatment of experimental cutaneous leishmaniasis with liposome- intercalated amphotericin B Antimicrobial Agents and Chemotherapy 25 (5) 655-6

Parodi, A. J.; Martin-Barrientos, J. y Engel J. 1984 Glycoprotein assembly in: Leishmania mexicana Biochem. Biophys. Res. Commun. 118 1-7

Pearson, R. D.; Marcus, J. L.; Manian, A. A. y Hewlett, E. 1981 Lethal effect of phenothiazines on the protozoan Leishmania donovani. 21st Interscience Conference Antimicrobial Agents Chemotherapy. Abstract no. 84

Pearson, P. d.; Manian, A. A.; Hall, D.; Marcus, J. L. y Hewlett, E. L. 1984 Antileishmanial activity of chlorpromazine. Antimicrobial Agents and chemotherapy 25 (5) 571-4

Peters, W. 1983 Chemotherapy of leishmaniasis present status, problems and prospects in "Chemotherapy and immunology in the control of malaria, filariasis and leishmaniasis". (Edited by Nitya Anand; Sen, A.B.) New Delhi, India. 243-54

Peters, W.; Trotter, E. R. y Robinson, B. L. 1980 The experimental Chemotherapy of leishmaniasis. V. The activity of potential leishmanicides against L. infantum LV 9 in NMRI mice *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 74 289-98

Peters, W; Lainson, R.; Shaw, J. J.; Robinson, B. L. y Franca Leao, A. 1981 Potentiating action of rifampicin and isoniazid against Leishmania mexicana amazonensis. *Lancet* i 1122-4

Pfaller, M. A. y Marr, J. J. 1974 Antileishmanial effect of allopurinol. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 5 (5) 469-72

Pradinaud, R.; Giordeau, I. y Sainte-Marie, D. 1985 Pentamidine-excellent drug for the treatment of cutaneous leishmaniasis. Single dose treatment schedule recommended in French Guiana. *Anais Brasileira de Dermatologia* 60 (6) 385-7

Preston, T. M. 1969 The form and function of the cytostome- cytopharynx of the culture forms of the elasmobranch haemoflagellate Trypanosoma raiae Laveran and Nesmil *Journal of Protozoology* 16 320-33

Pupkis, M. F. y Coombs, G. H. 1984 *J. Gen. Microbio.* 130, 1501- 5. Citado por Chang, K. P.; Dunne Fong and R. S. Bray "Biology of Leishmania and leishmaniasis" in *Leishmaniasis* 1985 (Chang/Bray, eds) 1985 11

Raether, W.; Seidenath, H. y Hofmann, J. 1989 Potent antibacterial fluoroquinolones with marked activity against Leishmania donovani in vivo. *Parasitology Research* 75 (5) 412-3

Raether, W.; Seidenath, H. y Loewe, H. 1978 Action of p(4-amidinophenoxy)benzaldehyde-p-amidinophenylhydrazone dihydrochloride on Leishmania donovani infections in the golden hamster. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 72 543-7

Rees, P.H.; Kager, P.A.; Wellde, B.T.; Hockmeyer, W.T. 1984 The reponse of Kenyan kala-azar to treatment with sodium stibogluconate *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 33 (3) 357-61

Rizzi, m.; Arici, C.; Bonaccorso, C. y Gavazzeni, G. 1988 Visceral Leishmaniasis in a patient with human immunodeficiency virus *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 82 (4) 565

Roberts, J. J.; Thomson, A. J. 1979 The mechanism of action of antitumor platinum compounds *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 22 71-133

Robinson, N.; Kaur, K.; Emmett, K.; Iovannisci, D. M. y Ullman, B. 1984 Biochemical Genetic Analysis of Formycin B Action in Leishmania donovani *J. Biol. Chem.* 259 7637-43

Ross, R. 1903 (1)Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and(2)further notes on Leishman's bodies *British Medical Journal* 2 1261-401

Ruiz-Perez, L. M.; Osuna, A.; Castanys, S.; Gamarro, F.; Craciunescu, D. and Doadrio, A. 1986 Evaluation of the toxicity of Rh(III) and Pt(II) complexes against Trypanosoma cruzi culture forms *Drug-Research* 36 13-16

Ruiz-Perez, L. M.; Osuna, A.; Lopez, M. C.; Castanys, S.; Gamarro, F.; Craciunescu, D.; Alonso, C. 1987 Mode of action of intercalating drug, cis-Pt(II)(DDH) Cl₂, cis-Pt(II)(DDH)(metafluorobenzoic)₂ and cis-Pt(II)(mucobromic)₂ on *Trypanosoma cruzi*. *Trop. Med. Parasitol.* 38 45-8

Sati, M. H. 1942 Antimony treatment of Sudan kala-azar *Annals of Tropical Medicine and Hygiene* 36 1-8

Segovia, M.; Canteras, M. y Artero, J. M. 1984 Leishmaniasis experimental. I. Estudio de la infeccion cutanea y visceral en ratones BALB/C. *Revista Iberica de Parasitologia* 44 265-278

Segovia, M.; Gomez, F. y Martin, F. 1984 Leishmaniasis experimental. III. Estudio de la infeccion cutanea y visceral en ratas wistar. *Revista Iberica de Parasitologia* 44 419-27

Sen Gupta, P. C. 1953 Chemotherapy of leishmanial diseases: a resume of recent researches. *Indian Medical Gazatte* 88 20-35

Sheen, M. R.; Kinm, B. K. y Parks, R. F. 1968 Purine nucleoside phosphorylase from human erythrocytes. III. Inhibition by the inosine analogue formycin B of the isolated enzyme and of nucleoside metabolism in intact erythrocytes and sarcoma. *Molecular Pharmacology* 4 (3) 293-9

Simon, M.W.; Martin, E. and Mukkada, A.J. 1978 *J. Bacteriol.* 135 895-9

Smith, D.H.; Roberts, C.M.D.; Hockmeyer, W.T.; Welde, B.T. 1980 Efficacy of therapy of visceral leishmaniasis with pentavalent antimonials. A preliminary report. In: "Recent development in medical research in eastern Africa" (Edited by: Njogu, A.R.; Tukei, P.M.; Roberts, J.M.D.) Nairobi, Kenya. 214-17

Spector, T. 1977 Inhibition of urate production by allopurinol. *Biochem. Pharmacol.* 26 (5) 355-8

Steck, E. A. 1974 The leishmaniasis. In *Progress in drug research.* (E. Jucker, Ed.) Birkhauser Verlag: Basel and Stuttgart. 289-351

Steck, E. A. 1976 Chemotherapy of Leishmaniasis. Fourth Latin American Congress of Parasitology. Office of Publications of the University of Costa Rica, San Jose 143-65

Steiger, R. F.; Van Hoof, F.; Bontemps, J.; Nyssens-Jadin, M. y Druetz, J. E. 1979 Acid hidrolases of trypanosomatid flagellates *Acta Tropica* 36 335-341

Strobel, M.; Marchand, J.P. y Dedet, J. P. 1979 Le traitement des leishmanioses cutanees de l'ancien monde: revue critique. *Medicine et Maladies Infectieuses* 9 360-8

Thakur, C. P. 1986 Harmful effect of high stibogluconate treatment of kala-azar in India. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 80 (4) 672-3

Tolson, L.L.; Turco, S.J. and Pearson, T.W. 1990 Expression of a repeating phosphorylated disaccharide lipophosphoglycan epitope on the surface of macrophages infected with Leishmania donovani. *Infection and Immunity* 58 3500-7

Trager, W 1974 in Ciba Foundation Symposium 20, 225-246. Citado por Marr, J. J. y Berens, R. L. "Purine and pyrimidine metabolism in Leishmania" in *Leishmaniasis* (Chang/Bray, eds.) 1985 68

Trang, N. L.; Meshnick, S. R.; Kitchener, K.; Eaton, J. W. y Cerami, A. 1983 Iron-Containing Superoxido Dismutase from Crithidia fasciculata *J. Bio. Chem.* 258 125-30

Trotte, E. R.; Peters, W y Robinson, B. L. 1980 The experimental chemotherapy of leishmaniasis. IV. The development of rodent models for visceral infection. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 74 127-38

Turco, S. J.; Wilkerson, M. A. y Clawson, D. R. 1984 Expression of an Unusual Acidic Glycoconjugate in Leishmania donovani *J. Biol. Chem.* 259 3883-9

Turco, S.J.; Mclean, D.L. and Mcneely, T.B. 1990 Survival of *Leishmania* parasites within phagocytic cells - requirement for lipophosphoglycan. *Glycobiology* 111 23-4

Umezawa, H.; Sawa, T.; Fukugawa, Y.; Homma, I.; Ishizuka, M. y Takeuchi, T. 1967 Studies on formycin and formycin B in cells of Ehrlich carcinoma and E. coli. *Journal Antibiotics* (Tokyo) 20 308-16

Veiga, J.P.R.; Rosa, T.T.; Kimachi, T.; Wolff, E.R.; Sampaio, R.N.; Gagliardi, A.R.T.; Junqueira, L.F.Jr.; Costa, J.M.L.; Marsden, P.D. 1985 Renal function in patients with mucocutaneous leishmaniasis treated with pentavalent antimonials *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 27 298-302

Viallet, J.; MacLean, J. D. y Robson, H. 1986 Response to ketoconazole in two cases of longstanding cutaneous leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 35 (3) 491-5

Vickerman, K. y Preston, T. M. 1976 Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. In *Biology of the kinetoplastida* (W. H. R. Lumsden and D. A. Evans, Eds.) Academic Press Inc.: London, New York 1 35-130

Waltzer, P. D.; Perl, D. P.; Krogstad, D. J.; Rawson, P. G. y Schultz, M. G. 1974 Pneumocistis carinii pneumonia in the United States. *Annals of International Medicine* 80 83-93

Weinrauch, L. y El-On, J. 1984 The effect of ketoconazole and a combination of rifampicin/amphotericin B on cutaneous leishmaniasis in laboratory mice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 78 (3) 389-90

Weinrauch, L. y El-On, J. 1984 The effect of ketoconazole and a combination of rifampicin/amphotericin B on cutaneous leishmaniasis in laboratory mice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 78 (3) 389-90

Wein, R. 1943 The pharmacological action of certain aromatic diamidines possessing trypanocidal activity. *Annals of Tropical Medical Parasitology* 37 1-18

Wennberg, E. and Weiss, L. 1969 *Ann. Rev. Med.* 20 29-40

Wysor, M. S.; Zwelling, L.A.; Sanders, J. E.; Grenan, M. M. 1982 Cure of mice infected with T. rhodesiense by cis-diammine dichloroplatinum (II) and disulfiram rescue *Science* 217 454-6

Yusupov, K. A., Dzhaksim, A. K. y Tursunov, S. S. 1981 Tashkent, ussr Tashkentskii Gosudarstvennyi Meditsinskiy Institut 47-53

Ziberstein, D. y Dwyer, D. M. 1984 Glucose transport in Leishmania donovani promastigotes *Molecular and Biochemical Parasitology* 12 327-36