

Universidad Mayor de San Andrés
Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas
Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas



**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA MÚLTIPLE DE
ALCALOIDES TOTALES DE CORTEZA DE *Galipea
longiflora* KRAUSE KALLUNKI (Evanta)**

“Tesis de Post-grado para optar el título de Magíster Scientiarum en Ciencias
Biológicas y Biomédicas en la mención de Biología de Poblaciones”

Elaborado por:

Lic. Efraín Salamanca Capusiri

La Paz-Bolivia

2008

Universidad Mayor de San Andrés
Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas
Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas



**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA MÚLTIPLE DE
ALCALOIDES TOTALES DE CORTEZA DE *Galipea
longiflora* KRAUSE KALLUNKI (Evanta)**

“Tesis de Post-grado para optar el título de Magíster Scientiarum en Ciencias
Biológicas y Biomédicas en la mención de Biología de Poblaciones”

Elaborado por:

Lic. Efraín Salamanca Capusiri

Asesor:

Alberto Giménez Turba Ph. D.

La Paz-Bolivia

2008

Dedicatoria

*Con mi más sincero amor a la persona Sui Géneris de mi vida, mi querida
esposa y mi mejor amiga Iselita
A Mis Amados padres Pedro y Severa
hermanos Sandra, Jorge, Betty, Silvia, Angel, Kevin, por su constante
motivación, amor y cariño genuino que me brindaron siempre.*

AGRADECIMIENTOS

A la Maestría de Ciencias Biológicas y Biomédicas que mediante las becas del IRD, me permitieron realizar el presente trabajo.

A la AECI Programa Intercampus (PCI-Iberoamerica) de Cooperación Inter-Universitaria 2007 por el financiamiento del proyecto (PCI A/4954/07), que me permitieron realizar la actividad antiparasitaria de Evanta frente a dos especies de *Acanthamoeba*.

A los proyectos “Enfermedades Infecciosas” ASDI-SAREC y Flora Regional OEA por el financiamiento de equipos y reactivos para el desarrollo de la presente tesis.

A la fundación Alexander Von Humbolt por la donación de equipos y hacer posible la realización de este trabajo.

A Don Rogelio Chuqui y los comunarios de Santa Rosa de Maravilla por haber colaborado en la recolecta de está especie medicinal.

Al Dr. Alberto Gimenez Turba, no solo por ser el asesor de mi tesis si no por la amistad y paciencia brindada durante todo este tiempo de trabajo.

A la Dra. Grace Ruiz por su constante apoyo, colaboración, enseñanza en la parte experimental de este trabajo y además por su grata amistad brindada.

A la Dra. Ninoska Flores por hacer posible que amplie mucho más mi interes hacia la investigación.

Al Dr. David Gutierrez (Oso), Biotec. Crispin Paredes (Ballena), Dr. Marco Paco (Chato), Dr. Juan Carlos Ticono (Lencho) por su constante colaboración, orientación y amistad brindada durante la realización de este trabajo.

Al personal del area de Parasitología del IIFB: Dra. Grace Ruiz, Dr. Juan Antonio Avila, Dr. David Gutierrez.

A todos mis Amigos del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas y compañeros de la Maestría de Ciencias Biológicas y Biomédicas por su sincera amistad.

A los Peruchos Braulio ito, Sir Joahan por su amistad y los pocos pero buenos momentos compartidos.

Al Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, de la Universidad de La Laguna, por haberme acogido en sus laboratorios.

A la Dra. Gabriela Cabrera, Dr. Jacob Lorenzo Morales, Dr. Jose Piñero, Dr Basilio Valladares, Carmen, Fernando, Nieves, Marialina del Instituto de Enfermedades tropicales y Salud Pública, de la Universidad de La Laguna, por la calides de su amistad.

RESUMEN

Se determinó la actividad antiparasitaria *in vitro* de alcaloides totales de evanta (CAT) sobre: promastigotes y amastigotes axénicos de *Leishmania*, epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*, trofozoitos de *Acanthamoeba* y *Plasmodium falciparum*. Para determinar la actividad leishmanicida *in vitro* de CAT se obtuvo poblaciones estables de amastigotes axénicos mediante la transformación *in vitro* de promastigotes de cepas de *Leishmania amazonensis* MHOM/BR/77/LTB0016(LA), *Leishmania amazonensis* clon 1MHOM/BR/76/LBT-012 (Lma), y *Leishmania* spp (L.BTE-002) en medio M199 (M0393-Sigma) a 32⁰C, pH 5.7 y Suero Bovino Fetal (SBF) al 20%, a su vez se puso a punto un método colorimétrico basado en la reducción de la sal de tetrazolium (XTT) a una forma soluble en agua, formazan, frente a las 2 formas parasitarias de *Leishmania*, promastigotes y amastigotes axénicos con fenasin metosulfato (PMS) y fenasin etosulfato (PES) como acopladores de electrones, con lecturas a 450nm de longitud de onda y entre 2 a 5 horas de incubación. Bajo esas condiciones se pudo evidenciar que existe una buena correlación entre el método de conteo de parásitos en cámara de Neubauer y la medición de absorbancias como producto de la reducción del XTT frente a promastigotes ($R^2= 0.966$) y amastigotes axénicos ($R^2 = 0.952$). Mediante el método colorimétrico (XTT) se obtuvo la IC₅₀ de CAT frente a 8 cepas de *Leishmania* (promastigotes), presentando valores entre 26.9–40.5µg/mL, y frente a amastigotes axénicos (Lma) 23.1 µg/mL (+/-)0.4. Por el método de conteo óptico se determinó la IC₅₀ *in vitro* de CAT sobre epimastigotes de dos cepas de referencia (Tulahuen-Y) y 6 cepas nativas de *Trypanosoma cruzi* con valores de IC₅₀ entre 5.8 - 21.5µg/mL. Frente a tripomastigotes en ensayo *ex vivo* se evidenció un IC₅₀ de 122.7µg/mL (+/-) 23.3, sin presentar actividad en los ensayos *in vivo* a concentraciones entre 100 y 250mg/Kg de CAT. Se demostró la actividad *in vitro* de CAT sobre *Plasmodium falciparum* (cepa F32 sensible a cloroquina) mediante el método óptico con IC₅₀ de 20µg/mL. Por último el presente trabajo muestra de forma científica el uso tradicional de corteza de evanta como amebicida debido a los resultados encontrados de CAT frente a dos cepas de *Acanthamoeba castellanii* Neff con IC₅₀ de 12µg/mL (+/-0,6) y *Acanthamoeba polyfaga* MN7 con IC₅₀ 27.3µg/mL (+/- 2.6) resultados interesantes en relación a los rangos de inhibición de la

polihexametilenbiguanida-PHMB y la clorhexidina, antisépticos tópicos con capacidad antiprotozoaria, para el tratamiento de queratitis producidas por especies de *Acanthamoeba*.

ABSTRACT

The antiparasitic activity, *in vitro*, of the total alkaloids from Evanta (CAT) on promastigotes and axenic amastigotes of *Leishmania*, epymastigotes and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*, trophozoites of *Acanthamoeba* and *Plasmodium falciparum*.

To determine the leishmanicidal activity of CAT, stable populations of axenic amastigotes from promastigotes were obtained, *in vitro*, from strands of *Leishmania amazonensis* MHOM/BR/77/LTB0016(LA), *Leishmania amazonensis* clone 1MHOM/BR/76/LBT-012 (Lma), and *Leishmania* spp (L.BTE-002) in M199 (M0393-Sigma) medium at 32⁰C, pH 5.7 and Fetal Bovine Serum (SBF) at 20%, and at the same time the colorimetric method based on the reduction of a tetrazolium salt (XTT), to a water soluble formazan, was standardized for promastigotes and axenic amastigotes of *Leishmania*, using Phenazine Methosulphate (PMS) and Phenazine Ethosulphate (PES) as electron couplers with lectures at wave length of 405nm, with incubations between 2 to 5 hours. Under these conditions we could confirm that exist good correlation between the optical counting in a Neubauer chamber and the absorbance measured, as consequence of the reduction of the XTT by promastigotes ($R^2=0.966$) and axenic amastigotes ($R^2 = 0.952$). Using the colorimetric method (XTT) we did calculated the IC₅₀ for CAT against 8 *Leishmania* strands with values oscillating between 26.9 and 40.5µg/mL (promastigotes) and 23.1µg/mL (+/-)0.4 (axenic amastigotes, strand Lma). Using the optic method, the IC₅₀, for CAT against epymastigotes of 6 native strands and 1 of reference (Tulahuen-Y) of *Trypanosoma cruzi* was determined to be between 5.8 and 21.5µg/mL. Against trypomastigotes forms, the IC₅₀ was 122.7µg/mL (+/-) 23.3 and did not presented *in vivo* activity between 100 and 250mg/Kg of CAT. The *in vitro* activity of CAT against *Plasmodium falciparum* (strand F32 sensible to chloroquine) by the optic method gave an IC₅₀ of 20µg/mL. Finally, the present work confirms the traditional uses of evanta's bark, by scientific methods, as Amebicide based on the results obtained against *Acanthamoeba castellanii* Neff with an IC₅₀ of 12 µg/mL (+/-)0,6) and against *Acanthamoeba polyfaga* MN7 with IC₅₀ of 27.3 µg/mL (+/- 2.6), these are very interesting results when compared with the activity of poli-hexamethyl-enbiguanida-PHMB and Chlorhexidine, topic antiseptics used in the treatment of queratitis produced by *Acanthamoeba* species.

TABLA DE CONTENIDO

1	Introducción.	1
2	Antecedentes.	3
2.1.	<i>Galipea longiflora</i> Krause Kallunki (Evanta).	3
3	<i>Leishmania</i> .	7
3.1.	Ciclo biológico de la <i>Leishmania</i> .	7
3.2.	Amastigotes axénicos.	9
3.3.	Vector de la leishmaniasis.	12
3.4.	Epidemiología.	12
3.5.	Distribución en Bolivia.	13
3.6.	Aspectos clínicos y tratamiento.	16
4	Enfermedad de Chagas.	18
4.1.	<i>Trypanosoma cruzi</i> .	18
4.2.	Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	19
4.3.	Epidemiología de la enfermedad de Chagas.	21
4.4.	Distribución y situación actual en Bolivia.	22
4.5.	Mecanismos de transmisión.	24
4.6.	Aspectos clínicos y tratamiento.	25
5	Malaria.	27
5.1.	Ciclo biológico de la malaria.	27
5.2.	Vector de la malaria.	30
5.3.	Epidemiología en el mundo.	31
5.4.	Distribución en Bolivia.	32
5.5.	Aspectos clínicos y tratamiento.	34
6	Amebas- <i>Acanthamoeba</i> .	37
6.1.	Distribución de <i>Acanthamoeba</i> .	38
6.2.	Ciclo biológico de <i>Acanthamoeba</i> .	39
6.3.	Aspectos clínicos y tratamiento.	41
7	Objetivos.	43
7.1.	Objetivo general.	43
7.2.	Objetivos específicos.	43
8	Metodología.	44
8.1.	Aislamiento a partir de lesiones cutáneas en pacientes que cursan con leishmaniasis.	44
8.2.	Aislamiento de cepas nativas de <i>Trypanosoma cruzi</i> a partir de insecto vector (<i>Triatoma infestans</i>) como de modelo animal. (ratón swiss albino parasitado)	45
8.3.	Amastigotes axénicos.	46
8.3.1.	Preparación del medio M-199 modificado para amastigotes axénicos.	46
8.3.2.	Transformación de promastigotes en amastigotes axénicos.	47

8.4.	Puesta a punto del método colorimétrico XTT	48
8.4.1.	Preparación de soluciones XTT-PES y XTT-PMS.	48
8.4.2.	Puesta a punto del método colorimétrico (XTT) sobre promastigotes de LA.	48
8.4.3.	Selección de longitud de onda.	49
8.4.4.	Estudio de linealidad, tiempo optimo de incubación y población parasitaria de trabajo.	49
8.4.5.	Determinación de R^2 entre curvas de crecimiento obtenidos por conteo óptico en cámara de Neubauer y método colorimétrico (XTT-PMS)	49
8.4.6.	Puesta a punto del método colorimétrico XTT sobre amastigotes axénicos de Lma.	51
8.4.7.	Selección de longitud de onda.	51
8.4.8.	Estudio de linealidad, tiempo optimo de incubación y población parasitaria de trabajo.	52
8.4.9.	Determinación de R^2 entre curvas de crecimiento obtenidos por conteo óptico en cámara de Neubauer y método colorimétrico. (XTT-PES).	52
8.5.	Preparación de CAT para la evaluación biológica <i>in vitro</i> sobre promastigotes y amastigotes axénicos de <i>Leishmania</i> .	52
8.5.1.	Preparación del material biológico.	53
8.5.2.	Obtención de la IC_{50} por el método óptico para promastigotes de <i>Leishmania</i> .	54
8.5.3.	Obtención de la IC_{50} por el método colorimétrico XTT para promastigotes y amastigotes axénicos de <i>Leishmania</i> .	54
8.6.	Preparación de CAT para la evaluación biológica <i>in vitro</i> sobre epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	58
8.6.1.	Preparación del material biológico.	58
8.6.2.	Obtención de la IC_{50} por el método óptico para epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	58
8.7.	Determinación de la actividad tripanocida <i>ex vivo</i> de CAT.	58
8.8.	Tratamiento profiláctico con jarabe de CAT al 2 y 5% en ratones infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i> .	59
8.9.	Determinación de la sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>Plasmodium falciparum</i> .	61
8.9.1.	Preparación CAT	61
8.9.2.	Obtención de la IC_{50} por el método óptico para <i>Plasmodium falciparum</i> .	61
8.10.	Preparación de CAT para la evaluación biológica <i>in vitro</i> sobre trofozoitos <i>Acanthamoeba</i> .	62
8.10.1.	Preparación del medio PYG.	63
8.10.2.	Obtención de la IC_{50} por el método colorimétrico alamar blue sobre trofozoitos de <i>Acanthamoeba</i> .	63

9	Resultados y discusiones.	65
9.1.	Aislamiento a partir de lesiones cutáneas en pacientes que cursan con leishmaniasis.	65
9.2.	Aislamiento de cepas nativas de <i>Tripanosoma cruzi</i> a partir de insecto vector (<i>Triatoma infestans</i>) como de modelo animal. (ratón swiss albino parasitado)	65
9.3.	Amastigotes axénicos.	67
9.3.1.	Determinación del tiempo de transformación de promastigotes en amastigotes axénicos de LA - Lma y L.BTE-002.	67
9.3.2.	Transformación de promastigotes en amastigotes axénicos de LA Lma y LBTE-002.	68
9.4.	Puesta a punto del método colorimétrico XTT sobre promastigotes de LA.	70
9.4.1.	Selección de la longitud de onda - Barrido espectral de 400-550nm.	70
9.4.2.	Estudio de linealidad, tiempo optimo de incubación y población parasitaria de trabajo.	73
9.4.3.	Determinación de R^2 entre curvas de crecimiento obtenidos por conteo óptico en cámara de Neubauer y método colorimétrico XTT-PMS sobre promastigotes de LA.	75
9.5.	Puesta a punto del método colorimétrico XTT sobre amastigotes axénicos de Lma.	76
9.5.1.	Estudio de linealidad, tiempo optimo de incubación y población parasitaria de trabajo.	77
9.5.2.	Determinación de R^2 entre curvas de crecimiento obtenidos por conteo óptico en cámara de Neubauer y método colorimétrico XTT-PES sobre amastigotes axénicos de Lma.	79
9.6.	Determinación de la actividad antiparasitaria de CAT <i>in vitro</i> sobre dos formas parasitarias de <i>Leishmania</i> (promastigotes-amastigotes axénicos) mediante el método colorimétrico XTT.	80
9.7.	Determinación de la actividad antiparasitaria de CAT <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> sobre dos formas parasitarias de <i>Tripanosoma cruzi</i> (epimastigotes- Tripomas-tigotes sanguíneos) mediante métodos ópticos.	83
9.8.	Determinación de la actividad antiparasitaria de CAT <i>in vitro</i> sobre trofozoitos de <i>Plasmodium falciparum</i> mediante métodos ópticos.	87
9.9.	Determinación de la actividad antiparasitaria de CAT <i>in vitro</i> sobre trofozoitos de dos cepas de <i>Acantamoeba</i> (<i>castellani</i> - <i>polyfaga</i>) mediante el método colorimétrico Alamar Blue.	88
10	Conclusiones.	90
11	Recomendaciones.	93
12	Bibliografía	94
	Anexos	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación taxonómica de <i>Galipea longiflora</i> .	3
Tabla 2.	Rendimiento y actividad leishmanicida <i>in vitro</i> de alcaloides quinolinicos aislados de corteza del tronco, hojas, corteza y raíz de <i>Galipea longiflora</i> .	4
Tabla 3.	Sensibilidad <i>in vitro</i> de agentes leishmanicidas conocidos sobre promastigotes, amastigotes axénicos, amastigotes intracelulares de la cepa M379.	11
Tabla 4.	Enfermedades ocasionadas por especies diferentes de <i>Plasmodium</i> .	28
Tabla 5.	Componentes del medio M-199 modificado para amastigotes axénicos	46
Tabla 6.	Código, forma parasitaria de cepas de <i>Leishmania</i> utilizadas para la evaluación <i>in vitro</i> frente a CAT.	53
Tabla 7.	Absorbancia y valor promedio de tres réplicas de CAT, blancos y controles-lecturas a 4 horas de incubación con XTT-PMS.	55
Tabla 8.	Absorbancias sin interferencias de blancos o medio de cultivo.	56
Tabla 9.	Porcentaje de viabilidad de promastigotes de <i>Leishmania</i> frente a diferentes concentraciones de CAT.	56
Tabla 10.	Obtención de la IC ₅₀ por tendencia lineal.	57
Tabla 11.	Epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizadas para la evaluación <i>in vitro</i> frente a CAT.	58
Tabla 12.	Componentes del medio PYG.	63
Tabla 13.	Condiciones de cultivo para transformar promastigotes en amastigotes axénicos utilizando el medio M-199.	67
Tabla 14.	Absorbancias de poblaciones parasitarias decrecientes (promastigotes-LA) a diferentes tiempos de incubación con lecturas a 450nm de longitud de onda con XTT- PMS.	73
Tabla 15.	R ² para curvas de absorbancia vs tiempos de incubación para diferente número de promastigotes de LA con XTT-PMS.	74
Tabla 16.	R ² para curvas de absorbancia para una misma concentración de amastigotes axénicos de Lma con mezclas de XTT-PES y XTT-PMS.	76
Tabla 17.	Absorbancias de poblaciones parasitarias decrecientes (amastigotes axénicos de Lma) a diferentes tiempos de incubación con lecturas a 450 nm de longitud de onda con XTT-PES.	77
Tabla 18.	R ² para curvas de absorbancia vs tiempos de incubación para diferente número de amastigotes axénicos de Lma con XTT-PES.	78
Tabla 19.	IC ₅₀ de CAT <i>in vitro</i> a través del método colorimétrico XTT-PES y XTT-PMS y método óptico sobre promastigotes y amastigotes axénicos de diferentes cepas de <i>Leishmania</i> incubados a 26-32°C por 72 horas.	81
Tabla 20.	IC ₅₀ de CAT <i>in vitro</i> sobre epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> incubado a 26°C por 72 horas.	83

Tabla 21.	IC ₅₀ de CAT <i>ex vivo</i> sobre tripomastigotes sanguíneos de <i>Trypanosoma cruzi</i> incubado a 4°C por 24 horas.	85
Tabla 22.	Porcentaje de parasitemia en ratones tratados con jarabe de CAT al 2 y 5%.	85
Tabla 23.	IC ₅₀ de CAT <i>in vitro</i> sobre trofozoitos de <i>Plasmodium falciparum</i> sensible a cloroquina (F32)- Método óptico incubados a 37°C por 48 horas.	87
Tabla 24.	IC ₅₀ de CAT <i>in vitro</i> sobre trofozoitos de 2 cepas de <i>Acanthamoeba</i> a través del método colorimétrico alamar blue incubados a 28°C por 120 horas.	89

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1.	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> .	8
Figura 2.	Comparación de actividad antiparasitaria de glucantime frente a dos formas parasitarias de <i>L.infantun</i> (promastigotes y amastigotes axénicos) frente a diferentes concentraciones de droga.	11
Figura 3.	Distribución a nivel mundial de LV y LC.	13
Figura 4.	Tendencia secular de las leishmaniasis en todas sus formas. (35.714 casos desde 1983 hasta 2006)	14
Figura 5.	Estratificación de casos notificados como sospechosos de leishmaniasis. por nivel de riesgo-programa leishmaniasis 2007.	15
Figura 6.	Ciclo biológico de <i>Tripanosoma cruzi</i> .	20
Figura 7.	Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas.	21
Figura 8.	Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas en Bolivia.	23
Figura 9.	Habitad de <i>Triatoma infestans</i> .	24
Figura 10.	Ciclo biológico de la malaria.	29
Figura 11.	Epidemiología de la malaria en el mundo.	32
Figura 12.	La malaria en Bolivia.	33
Figura 13.	Incidencia parasitaria de la malaria -Anual IPA	33
Figura 14.	Ciclo biológico de <i>Acanthamoeba</i> .	39
Figura 15.	Retículo de conteo de parásitos en cámara de Neubauer	50
Figura 16.	Determinación de la IC ₅₀ de CAT sobre promastigotes de L pp75.	57
Figura 17.	Transformación biológica de XTT a sales de formazan.	70
Figura 18.	Barrido espectral de 400-550nm de longitud de onda sobre 1x10 ⁶ promastigotes de LA con XTT-PMS y XTT-PES a diferentes tiempos de incubación.	71
Figura 19.	Curvas de absorbancias con lecturas a 450nm (XTT-PMS) Vs. tiempo de incubación de LA a diferentes poblaciones parasitarias.	74
Figura 20.	Curva de crecimiento de promastigotes de LA en medio Schneider al 10% de SBF y 26°C-Método colorimétrico (XTT-PMS) y conteo óptico.	75
Figura 21.	Curvas de absorbancia de amastigotes axénicos de Lma a la misma concentración (1.5x10 ⁶ parásitos/mL) y diferentes tiempos de incubación con XTT-PMS y XTT-PES a 450 y 492nm.	76
Figura 22.	Curvas de absorbancias con lecturas a 450nm (XTT-PES) vs tiempos de incubación de amastigotes axénicos de Lma a diferentes poblaciones parasitarias.	78
Figura 23.	Curva de crecimiento de amastigotes axénicos de Lma en medio M199	

	con 20% de SBF y 32°C-Método colorimétrico (XTT-PES) y conteo óptico	79
Figura 24.	Valores de IC ₅₀ de CAT obtenidos a través del método colorimétrico XTT-PMS y método óptico sobre promastigotes de diferentes cepas de <i>Leishmania</i> .	80
Figura 25.	Valores de IC ₅₀ de CAT obtenidos a través del método colorimétrico XTT-PES sobre amastigotes axénicos de Lma.	82
Figura 26.	Actividad tripanocida de CAT sobre diferentes cepas de <i>Tripanosoma cruzi</i> . (epimastigotes)	83
Figura 27.	Actividad tripanocida de CAT <i>ex vivo</i> sobre tripomastigotes sanguíneos de la cepa Y.	84
Figura 28.	Tratamiento profiláctico con jarabe de CAT al 2 y 5 % en ratones infectados con <i>Tripanosoma cruzi</i> .	85
Figura 29.	Actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> de CAT frente a <i>Plasmodium falciparum</i> cepa F32.	87
Figura 30.	Actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> de CAT frente a <i>Acanthamoeba (castellani - polyfaga)</i> -Alamar blue.	88

INDICE DE FOTOS

Foto 1.	Promastigotes de LA aumento 40X tinción giemsa 25%.	68
Foto 2.	Amastigotes axénicos de LA - 25% de transformados a las 24 horas tinción giemsa al 25%.	68
Foto 3.	Amastigotes axénicos de LA - 40% de transformados a las 48 horas tinción giemsa al 25%.	68
Foto 4.	Amastigotes axénicos de LA - 54% de transformados a las 72 horas tinción giemsa al 25%.	68
Foto 5.	Amastigotes axénicos de LA - 92.5% de transformados a las 96 horas tinción giemsa al 25%.	69
Foto 6.	Amastigotes axénicos de L.BTE-002- 28.6% de transformados a las 24 horas tinción giemsa al 25%.	69
Foto 7.	Amastigotes axénicos de L.BTE-002-63.9% de transformados a las 72 horas tinción giemsa al 25%.	69
Foto 8.	Amastigotes axénicos de L.BTE-002-88% de transformados a las 96 horas tinción giemsa al 25%.	69
Foto 9.	Amastigotes axénicos de Lma - 50% de transformados a las 24 horas tinción giemsa al 25%.	69
Foto 10.	Amastigotes axénicos de Lma - 80% de transformados a las 48 horas tinción giemsa al 25%.	69
Foto 11.	Amastigotes axénicos de Lma - 90% de transformados a las 72 horas tinción giemsa al 25%.	69

ABREVIATURAS

IC ₉₀	Concentración inhibitoria del 90%.
IC ₅₀	Concentración inhibitoria del 50%.
LC	Leishmaniasis Cutánea.
LCM	Leishmaniasis Cutáneo Mucosa.
LCD	Leishmaniasis Cutáneo Difusa.
LV	Leishmaniasis Visceral.
M379	<i>Leishmania mexicana</i> .
Lma	<i>Leishmania amazonensis</i> clon1MHOM/BR/76/LTB-012.
LA	<i>Leishmania amazonensis</i> MHOM/BR/77/LTB-0016.
L.PH8	<i>Leishmania mexicana amazonensis</i> IFLA/BR/67/PH8.
L.690	<i>Leishmania amazonensis</i> .
L.pp75	<i>Leishmania Chagasi</i> .
L.642	<i>Leishmania Donovanii</i> .
L.M2903	<i>Leishmania braziliensis braziliensis</i> MHOM/BR/75/M2903.
L.BTE-002	<i>Leishmania.spp</i> Cepa nativa-Palos blancos-Bolivia.
<i>T.cruzi</i> A117	<i>Tripanosoma cruzi</i> spp.A117.Nativa aislada-IIFB.
<i>T.cruzi</i> R1	<i>Tripanosoma cruzi</i> spp.R1.Nativa aislada-IIFB.
<i>T.cruzi</i> R2	<i>Tripanosoma cruzi</i> spp.R2.Nativa aislada-IIFB.
<i>T.cruzi</i> 26	<i>Tripanosoma cruzi</i> spp.26.Nativa aislada-IIFB.
<i>T.cruzi</i> Pac.1	<i>Tripanosoma cruzi</i> spp.Paciente 1.Nativa aislada-IIFB.
<i>T.cruzi</i> Pac.2	<i>Tripanosoma cruzi</i> spp.Paciente 2.Nativa aislada-IIFB.
<i>T.cruzi</i> Y	<i>Tripanosoma cruzi</i> cepa de referencia Y
<i>T.cruzi</i> .Tulahuem.	<i>Tripanosoma cruzi</i> cepa de referencia tulahuem.
SBF	Suero Bovino Fetal.
CAT	Alcaloides totales de corteza de <i>Galipea longiflora</i> .(Evanta)
XTT	Sodio (2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2-H-tetrazolium-5carboxanilide.)
PES	Fenasin Etosulfato. (acoplador de electrones)
PMS	Fenasin Metosulfato. (acoplador de electrones)
TCS	Soya tripticasa.
HEPES	Acido(N-2-Hidroxietyl)-Piperazina-N-4-butano-sulfónico
NNN	Novy-MacNeal-Nicole. (medio de cultivo)
LIT	Infusión Hígado Triptosa. (medio de cultivo)
DMSO	Dimetilsulfóxido.
CQ	Difosfato de cloroquina.
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (medio de cultivo)
PBS	Tampón fosfato salino.
GRL	Glóbulos rojos no infectados.

GRI	Glóbulos rojos infectados.
R ²	Coefficiente de correlación lineal.
AA	Amastigotes axénicos.
AFO-B	Anfotericina B.
PHMB	Polihexametenbiguanida.
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro.
P	Promastigotes

1. Introducción

Dentro de las enfermedades infecciosas las enfermedades parasitarias continúan siendo el principal problema de salud pública, afectando a cientos de millones de personas, particularmente en países en vías de desarrollo. Estudios recientes han indicado que las enfermedades tropicales corresponden al 10% de las enfermedades globales. Dentro de las 11 enfermedades tropicales consideradas altamente prioritarias por el programa de enfermedades tropicales (TDR) de la Organización mundial de la salud, 7 son parasitarias. El territorio Boliviano está constituido en algo más del 70% por territorio tropical, el que paulatinamente incrementa su población debido al fenómeno de migración de la población de regiones no infectadas, por factores diversos por ejemplo socio-económicos.

Estas poblaciones no escapan a las endemias parasitarias del mundo tropical, entre ellas las tres grandes parasitosis que afecta a esta población son: la leishmaniasis, malaria y la enfermedad de Chagas, que son causa frecuente de trastornos en la salud de la población llegando a índices preocupantes lo que conlleva consecuencias sociales diversas. A su vez las amebiasis presentan una prevalencia en el altiplano entre 0.5% a 7.9%, en los valles entre 0% a 22,9% y en el trópico entre 0.4 % a 38.6%.

Todo esto se agrava por el marco de extrema pobreza y subdesarrollo en el que se debate la población afectada donde a las carencias de materiales se agregan las barreras culturales para la comprensión de la situación con el consiguiente desconocimiento de la magnitud del problema.

La morbilidad y la mortalidad asociadas con las enfermedades causadas por protozoarios han motivado la investigación de nuevos agentes antiparasitarios, donde los productos naturales juegan un papel crucial en el desarrollo de una nueva generación de fármacos antiparasitarios.

Un grupo de investigadores Franco-Bolivianos del Instituto Boliviano de Biología de Altura (IBBA), trabajó en base a la actividad antiparasitaria de la *Galipea longiflora* Krause como especie medicinal del pueblo Tsimani, algunos de los principios activos quinoleicos que fueron patentados con la esperanza de atraer el interés de empresas, a la fecha no dio ningún resultado tangible.

Considerando el poco interés de la industria farmacéutica sobre esta especie vegetal y tomando en cuenta los datos emergentes epidemiológicos de estas enfermedades, el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (I.I.F.B) busca promover el aprovechamiento sostenible de esta planta y sus derivados antiparasitarios en conjunto a nivel regional por su uso tradicional, por lo que el presente trabajo nos permitió demostrar la actividad antiparasitaria múltiple de los alcaloides totales de corteza de evanta frente a diversas formas parasitarias de *Leishmania* (promastigotes y amastigotes axenicos), *Tripanosoma cruzi* (epimastigotes y tripomastigotes sanguíneos), *Plasmodium falciparum* (trofozoitos) y *Acanthamoeba* (trofozoitos), mostrando de esta manera un compuesto base (alcaloides totales de corteza de evanta) de una especie vegetal de relativamente fácil y económica obtención con propiedades hemohistoparasitarias ampliando su espectro de acción sobre amebas.

Por otra lado el presente trabajo pretende apoyar científicamente con los resultados *in vitro* los estudios clínicos fase II que se vienen desarrollando en la localidad de Palos Blancos – La Paz - Bolivia, mediante el uso de los alcaloides quinolínicos en su fórmula farmacéutica de pomada para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea.

2. Antecedentes.

2.1. *Galipea longiflora* Krause Kallunki (Evanta)

El género *Galipea* cuenta con unas treinta especies aproximadamente distribuidas desde Panamá, Guatemala, Nicaragua, Cuba, Perú, Venezuela y el Sud de Brasil. En Bolivia la especie *Galipea longiflora* (K. Krause) J. A. Kallunki se distribuye en los bosques tropicales de los últimos contrafuertes andinos del departamento de Beni y La Paz. (1)

En Bolivia la etnia tacana reconoce a *Galipea longiflora* (K. Krause) J. A. Kallunki como yuruma huana existiendo dos clases de *Yuruma huana*, una clase es designada como *Yuruma huana epuna* (hembra) y la otra como *Yuruma huana d'ēja* (macho).

Los árboles de *Yuruma huana epuna* han sido determinados como *Galipea longiflora* y los árboles de *Yuruma huana d'ēja* como *Dexdropanax arboreus*. (2)

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Galipea longiflora*. (2)

Reino	Vegetal
División	Magnoliophita
Sub clase	Rosidea
Orden	Sapindales
Familia	Rutáceae
Género	<i>Galipea</i>
Especie	<i>Longiflora krause</i>
Sinónimo	<i>Angostura longiflora</i> (Kallunki y pirani,1998)
Nombre común	Yuruma huana epuna

Galipea longiflora es un árbol de una altura de hasta 12 metros, presenta hojas trifoliadas alternas o superpuestas sobre la misma rama, con un pecíolo frecuentemente alado, sus flores aparecen en forma de racimos, zigomorfos más o menos vistosos en los meses de mayo a junio, los frutos se observan en los meses de junio a julio. (1)

El uso más frecuente de esta planta por las etnias Tacana es para la *Leishmania* o espundia donde la forma de tratarse con esta es la siguiente: la corteza se pulveriza y este polvo se aplica como cataplasma en la úlcera cambiándola dos veces al día hasta que sane. Para un mejor efecto, se recomienda también tomar el sancochado de pedazos de corteza en agua, tomando dos vasos al día uno en la mañana y otro por la tarde por tres días consecutivos este mismo tratamiento es muy eficaz contra diarreas causadas por amebas o parásitos intestinales. (2) Se realizaron estudios etnofarmacológicos en Bolivia, de extractos crudos de corteza del tronco, corteza de raíz y hojas de *Galipea longiflora* de donde se aislaron alcaloides 2-aril y 2-alkil quinolínicos sustituidos en la posición 2, identificándose 13 componentes activos. (Tabla 2) (3)

Tabla 2. Rendimientos y actividad leishmanicida *in vitro* de alcaloides quinolínicos aislados de corteza del tronco, hojas, corteza y raíz de *Galipea longiflora*. (3)

Productos	Corteza %	Hojas %	Raíz %	CI ₉₀ (µg/mL)
2-fenilquinolina	47.7	29	66.7	100 ^{a,b,c}
2-fenil-4-metoxi-quinolina	2.8		3.3	50 ^{a,b,c}
2-(3', 4'-dimetoxifeniletíl)-quinolina	1.1			100 ^{a,b,c}
2-(3', 4'-metilendioxifeniletíl)-quinolina	10.2		6.7	100 ^{a,b,c}
2-(3', 4'-metilendioxifeniletíl)-4-metoxi-quinolina (cusparina)	3.1		2	100 ^{a,b,c}
2- <i>n</i> -pentil-4-metoxi-quinolina	1			100 ^{a,b,c}
2- <i>n</i> -pentilquinolina	2.4		17.3	100 ^{a,b,c}
2- <i>n</i> -propilquinolina	1.3	12.5		50 ^{a,b,c}
2- <i>n</i> -propil-4-metoxi-quinolina (Chimanina A)	2.4			100 ^{a,b,c}
2-(E)-prop-1'-enilquinolina (Chimanina B)		16.7		25 ^{a,b,c}
2-(1', 2'-trans-epoxipropil)-quinolina (Chimanina D)		1.7		25 ^{a,b,c}
2-(E)-prop-1'-enil-4-metoxi-quinolina (Chimanina C)		0.5		
Shiquimianina		1.7	4	100 ^{a,b,c}

CI₉₀= a) *L. braziliensis* (2903); b) *L. amazonensis* (PH8) y (H-142); c) *L. donovani* (2682) y (HS-70).

Los alcaloides aislados de hojas como la 2-propenilquinolina (chimanina B) y 2-*trans*-epoxipropilquinolina (chimanina D) mostraron actividad leishmanicida *in vitro* mediante el método óptico frente a varias cepas de especies de *Leishmania* en sus formas promastigotes con valores de IC₉₀=25 µg/mL respectivamente. El compuesto 2-*n*-propilquinolina aislado de hojas y 2-fenil-4-metoxi-quinolina aislado de la corteza, raíces y hojas fueron menos activos con un valor de IC₉₀=50 µg/mL. Los de más compuestos no

presentaron actividad antiparasitaria muy interesante con respecto a los anteriormente citados. (3,4)

Algunos de los principios activos aislados de las hojas de *G. longiflora* resultaron ser nuevas estructuras y debido a la eficacia demostrada y la baja toxicidad determinada en modelos *in vivo*, fueron patentados (Chimanina A, B, C, y D, US4209519/15/04/93) (5) estrategia que a la fecha no ha dado ningún resultado tangible.

En evaluaciones *in vivo* se han demostrado que los alcaloides aislados de evanta inhiben el efecto leishmanicida, mostrado por una reducción en tamaño de las lesiones y número de parásitos cuando los alcaloides purificados son administrados a ratones infectados con *L.amazonensis*, *L.venezuelensis* (6), como también se demostró la reducción parasitaria hasta en un 99% en ratones infectados con *L.donovani* (7), en tratamientos de 4-6 semanas con 2-propenilquinolina (chimanina B) pos-infección en ratones infectados con *L. amazonensis* y *L. venezuelensis*, redujo el número de parásitos en 95% y 70% respectivamente. (8)

Los alcaloides quinolínicos 2-propenilquinolina, (chimanina B), 2-*n*-propilquinolina, y 2-*trans*-epoxipropilquinolina (chimanina D) fueron activos *in vitro* contra varias cepas de referencia de *Tripanosoma cruzi* (CI₅₀ 25-50 µg/mL) (9), también se observó que con 2-*n*-propilquinolina en un ensayo para Chagas crónico mostró interesante resultados (85 días post tratamiento) (10), así mismo el compuesto 2-*n*-pentilquinolina mostró actividad antimalárica frente a *Plasmodium vinckei petteri* - modelo animal. (11)

Trabajos recientes muestran que el conjunto de alcaloides totales de evanta presentan un efecto antiproliferativo de esplenocitos y líneas celulares (J774,SP2/0) como una actividad antiinflamatorio debido a un efecto sobre la producción de INF- γ . (12)

El Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), dependiente de la facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés, a venido estudiando esta especie vegetal a partir de 1993 donde se ha desarrollado estudios comprendidos desde el aislamiento y caracterización de alcaloides quinolínicos de corteza y hojas de *G. longiflora*, como la evaluación *in vitro* de extractos orgánicos de corteza y hoja (método óptico) sobre promastigotes de: *L. amazonensis*(PH8), *L. brasiliensis*(M2903), *L. donovani*(642) y *L. chagasi*(pp75), como también la actividad tripanosida sobre epimastigotes de *Tripanosoma cruzi* cepa tulahuem, así mismo mediante

modelos toxico cinéticos, determinaron la toxicidad aguda, subcrónica y parámetros farmacocinéticos, para el extracto crudo, en modelos murino, sobre la base de los antecedentes descritos, el IIFB viene desarrollado formulaciones farmacéuticas tópicas y sistémicas, en base de los alcaloides totales de corteza de *Galipea longiflora*(Evanta), para estudios clínicos de Fase II.

Dada la importancia de esta especie medicinal, en el desarrollo de tratamientos alternativos para las leishmaniasis, se ha establecido un sistema de cultivo celular semi-continuo *in vitro*, de células de Evanta, destinados al estudio de la producción de metabolitos secundarios con actividad leishmanicida, bajo condiciones controladas. (13,14)

3. *Leishmania*.

Los protozoos del género *Leishmania* causan las leishmaniasis, un grupo de enfermedades muy diferentes entre si, que cursan como úlceras cutáneas o como graves afectaciones viscerales. Entre estos dos polos hay una gama amplia de posibilidades clínicas dependientes de la especie de *Leishmania* causante y de la respuesta inmune del huésped.

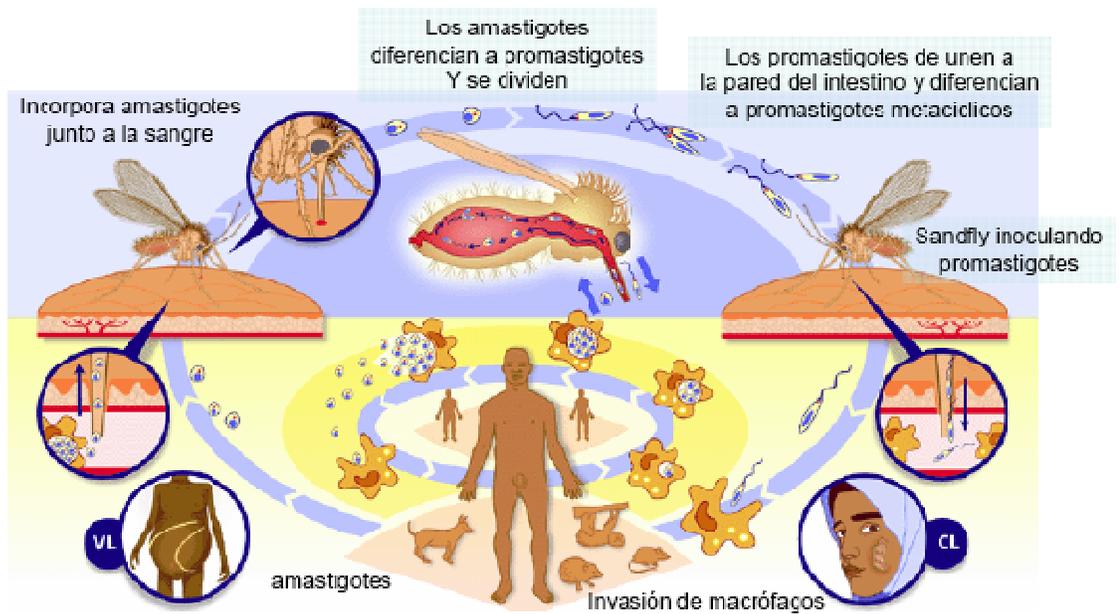
Al menos existen veinte especies patógenas de *Leishmania* que son transmitidas por la picadura de los flebotomos (clase Insecta, Orden Diptera) estos protozoos son, además parásitos obligados de los macrófagos del hospedador vertebrado. Por tanto, animal parasitado, insecto vector y sujeto susceptible conforman la cadena epidemiológica. (15, 16) Las leishmaniasis aparecen en 88 países de diversos contextos geográficos de los cuales 22 países pertenecen a América latina y afecta principalmente la población de las áreas rurales y semiurbanas donde prevalece la pobreza y donde los sistemas de salud son poco eficientes. (17) El impacto de las leishmaniasis en la salud pública probablemente esté subestimado. (15,18) *Leishmania* es un parásito digénico porque realiza parte de su ciclo biológico en el tubo digestivo del hospedador invertebrado en forma flagelada (promastigote, del gr. mastigos,látigo;) y parte en el vertebrado dentro de las células del sistema reticuloendotelial, sobre todo los macrófagos, en forma aflagelada o amastigote. (15,19)

3.1. Ciclo biológico de la *Leishmania*.

Leishmania es un parásito digénico porque realiza parte de su ciclo biológico en el tubo digestivo del hospedador invertebrado en forma flagelada (promastigote, del gr. mastigos,látigo; foto 1), y en el vertebrado dentro de las células del sistema reticuloendotelial, sobre todo los macrófagos, en forma aflagelada o amastigote. Cuando un flebotomo parasitado ingurgita sangre de un vertebrado, inocular con su saliva los promastigotes presentes en la probóscide. Una vez el parásito en los capilares cutáneos del hospedador vertebrado, se produce su fagocitosis por el macrófago que lo engloba en una vacuola parasitófora para tratar de eliminarlo mediante una cascada de metabolitos derivados del oxígeno, entre los que destaca el óxido nítrico y la liberación de hidrolasas

lisosomales, todas estas moléculas son vertidas en el espacio intravacuolar. Pero *Leishmania* evade esas reacciones inmunológicas inespecíficas del macrófago para vivir y multiplicarse en su interior. De la eficacia de la respuesta inmune y la virulencia de este protozoo depende la progresión de la leishmaniasis. Si sobreviven las *Leishmanias*, los macrófagos parasitados son ingeridos por otro flebotomo, en cuyo intestino se liberan los amastigotes que recuperan la forma de promastigotes y tras varios días, alcanzan la capacidad infectiva (metacicloogénesis) ya en la proximidad de la probóscide quedando así dispuestos para ser inoculados, con lo que se cierra el ciclo. (15,19)

Figura 1. Ciclo Biológico de *Leishmania*. (20)



La forma promastigotes de *Leishmania* es aquella forma parasitaria que se encuentra también en los medios de cultivo *in vitro* a condiciones de temperaturas similares al del insecto vector (aprox 26°C), esta forma parasitaria es la comúnmente utilizada para la evaluación de productos naturales y sintéticos con posible actividad antiparasitaria *in vitro*, también son utilizados en bioensayos dirigidos de citotoxicidad (21), con el motivo de estudiar propiedades estructurales, comportamiento fisiológico y bioquímico del parásito se indujo diferenciación de promastigotes en amastigotes axénicos mediante variaciones de pH

y temperatura en medios libres de células, como también se ha logrado diferenciación, maduración y replicación *in vitro* de *Leishmania* en cultivos celulares de macrófagos, principal célula hospedera durante el proceso de infección, con el motivo también de estudiar la posible actividad antiparasitaria de productos naturales sobre estas formas parasitarias, formas más cercanas a la que se encuentra en el huésped vertebrado. (22-25)

3.2. Amastigotes axénicos.

Los amastigotes axénicos son formas parasitarias de *Leishmania in vitro*, usadas para la evaluación de productos naturales y sintéticos con posible actividad antiparasitaria. (26,27,24), se obtienen a partir de cultivos *in vitro* de promastigotes de *Leishmania* los cuales son sometidos a mecanismos de selección de estadios por efecto combinado de cambios de temperatura, pH y concentraciones finales de suero bovino fetal. (28-30)

Los parásitos de *Leishmania* poseen mecanismos de adaptación que permite su actividad optima al pH o temperatura ambiente que corresponda, por ello el uso del pH ácido 5.5-5.8 para la obtención de amastigotes axénicos es debido a que se pretende acondicionar un ambiente en el que el amastigote intracelular se encontraria dentro del fagolisosoma (pH=4.6-6) del macrofago *in vivo* y estimular la transformación y supervivencia de esta forma parasitaria. La diferencia de temperatura entre los huéspedes del parásito, insecto vector y mamífero induce la diferencia morfológica a través de las proteínas de choque térmico (hsp70-hsp83) que se activan por aumento de la temperatura. (31,32)

El primer estudio para la obtención de amastigotes axénicos de *Leishmania* y propagación de estas formas parasitarias en medios de cultivo *in vitro* fueron reportados por Pan en 1984, desde entonces se viene intentando el cultivo de amastigotes axénicos por muchos investigadores. (33,34) Existen reportes de muchos autores con respecto a los protocolos de obtención de amastigotes axénicos y las exigencias peculiares de cada especie parasitaria. (35) Los amastigotes axénicos son una forma parasitaria, que presentan características morfológicas muy similares a los encontrados en amastigotes derivados de tejidos, también esta forma parasitaria se encarga de secretar ciertas sustancias químicas propias de

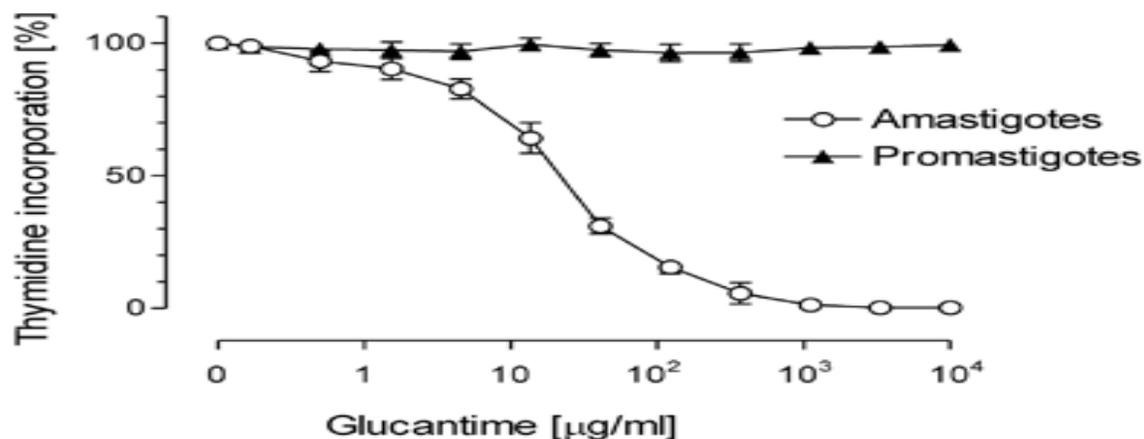
amastigotes intracelulares, por otro lado y con relación a los promastigotes estos amastigotes axénicos expresan niveles significativos de proteínas específicas de amastigotes (proteínaA2) derivados de lesión, que se encuentran casi ausentes en la forma promastigote, (36) a su vez y en los procesos de transformación presentan estructuras que fueron analizadas bajo un estudio morfométrico entre amastigotes axénicos y amastigotes de lesión estructuras como lisosomas (megasomas) mostrando que ambas formas presentaban estas estructuras en un volumen del 5% en amastigotes de lesión y 3.5% en amastigotes axénicos, (37) y se encontraban ausentes en los promastigotes, estos indican que los amastigotes obtenidos de cultivos axénicos están muy relacionados a amastigotes de tejido y que su relación con promastigotes es más distante (38), otros estudios sugieren que estas organelas y sus componentes puedan implicar la contagiosidad y la virulencia de la especie de *Leishmania* que se estudia. (39)

Estas formas celulares constituyen una alternativa ante la dificultad de obtener cantidades elevadas de amastigotes intracelulares (macrofagos) libres de contaminates celulares que es una dificultad para el estudio de sus propiedades metabólicas, bioquímicas y biológicas (chan-1980). (40,37)

Otra alternativa de uso de amastigotes son los amastigotes derivados de lesión sin embargo estos presentan en su superficie inmunoglobulinas del huésped algo que puede particularmente impedir su uso en estudios biológicos e inmunológicos. (41)

Otra de la ventajas del uso de amastigotes ya sean estos intracelulares o axénicos en relación a promastigotes son las pruebas de susceptibilidad *in vitro* frente a drogas leishmanicidas claramente observada, por ejemplo frente al glucantime y pentostan.

Figura 2. Comparación de actividad antiparasitaria de glucantime frente a dos formas parasitarias de *L.infantum* (promastigotes /amastigotes axénicos) a diferentes concentraciones de la droga. (42)



Pudiendo apreciar que esta droga de primera elección frente a la enfermedad de *Leishmania* a diferentes concentraciones no presenta actividad sobre promastigotes de cultivo *in vitro* de *L.infantum*, demostrando de esta forma que se puede estar frente a drogas muy prometedoras las cuales probadas *in vitro* sobre promastigotes darían resultados falsos negativos, sin embargo el uso de amastigotes (axénicos y/o intracelulares) nos revelaría la verdadera actividad de la droga en estudio. (42,43)

Tabla 3. Sensibilidad *in vitro* de agentes leishmanicidas conocidos sobre promastigotes, amastigotes axénicos, amastigotes intracelulares de la cepa M379. (43)

Antileishmanial agent ^a	IC ₅₀ ± SEM (µg/ml) ^b		
	Promastigotes	Axenic amastigotes	Amastigotes/macrophage
Amphotericin B	0.14 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.25 ± 0.01
Pentamidine	0.67 ± 0.1	5.0 ± 0.8	3.4 ± 0.4
Paromomycin	54 ± 10	41 ± 10	17 ± 1
WR6026	9.7 ± 3	12 ± 1	7.2 ± 3
Glucantime ^c	11,000 ± 2,000	30 ± 6	29 ± 3
Pentostam ^c	10,000 ± 3,000	48 ± 10	30 ± 6

3.3. Vector de la Leishmaniasis.

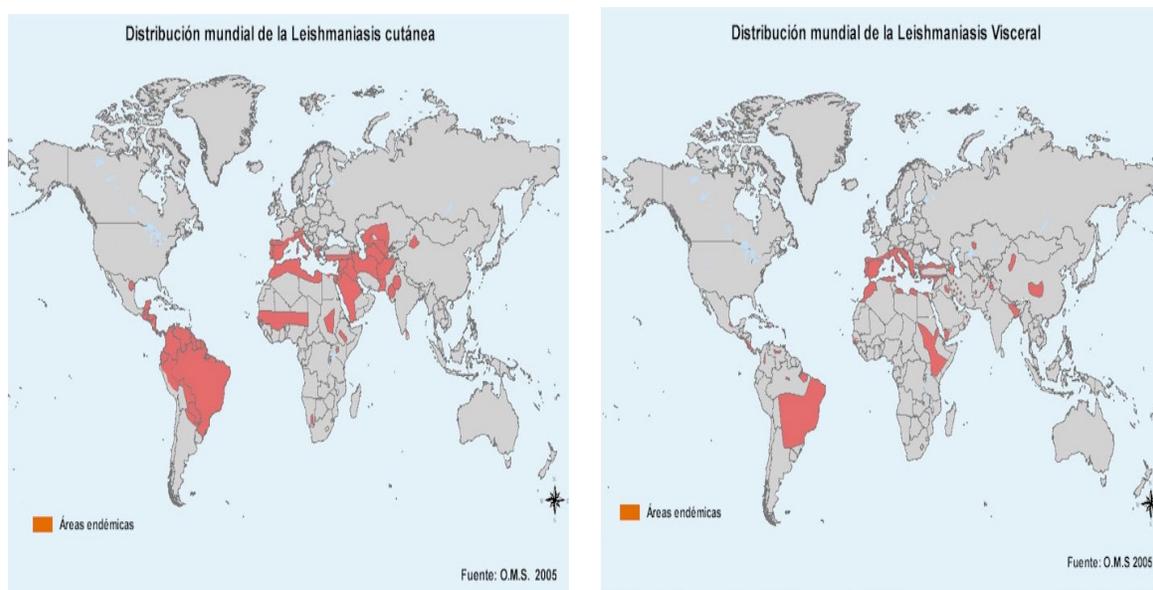
Los vectores de la leishmaniasis son mosquitos hematófagos, de los géneros *flebótomos* en el viejo mundo y *Lutzomia* en el nuevo mundo. Existen más de 350 especies de *flebótomos*, de los cuales 88 son vectores potenciales. Presentan una actividad crepuscular o nocturna, los *flebótomos* machos se alimentan de jugos vegetales y no son hematófagos, la hembra se alimenta de jugos vegetales y de sangre de diversos animales, incluido el hombre. Los *flebótomos* hembras requieren sangre para su reproducción, por ello pican a los hombres o animales. Las hembras infectadas transmiten la enfermedad cuando inoculan los promastigotes al picar a los hospederos susceptibles. (19)

3.4. Epidemiología

Las leishmaniasis constituye un grave problema de salud pública mundial, que afecta a 88 países, 67 en el viejo mundo y 21 en América, 72 de los cuales son países en vías de desarrollo y 13 se encuentran entre los países menos desarrollados. El 90% de los casos de LV se presenta en cinco países: Bangladesh, India, Nepal, Sudan y Brasil y el 90% de los casos de LC se dan en siete países: Afganistán, Argelia, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudí y Siria. (19)

Presenta una prevalencia de 12 a 14 millones de enfermos y una incidencia de unos dos millones de casos nuevos anuales, de ellos 500.000 viscerales y casi 1.500.000 cutáneos, lo que sobrepasa con creces estimaciones anteriores. La población en riesgo se eleva de 350 a 368 millones de personas. (18,44,45)

Figura 3. Distribución mundial de L.C. y L.V. (46)



3.5. Distribución en Bolivia

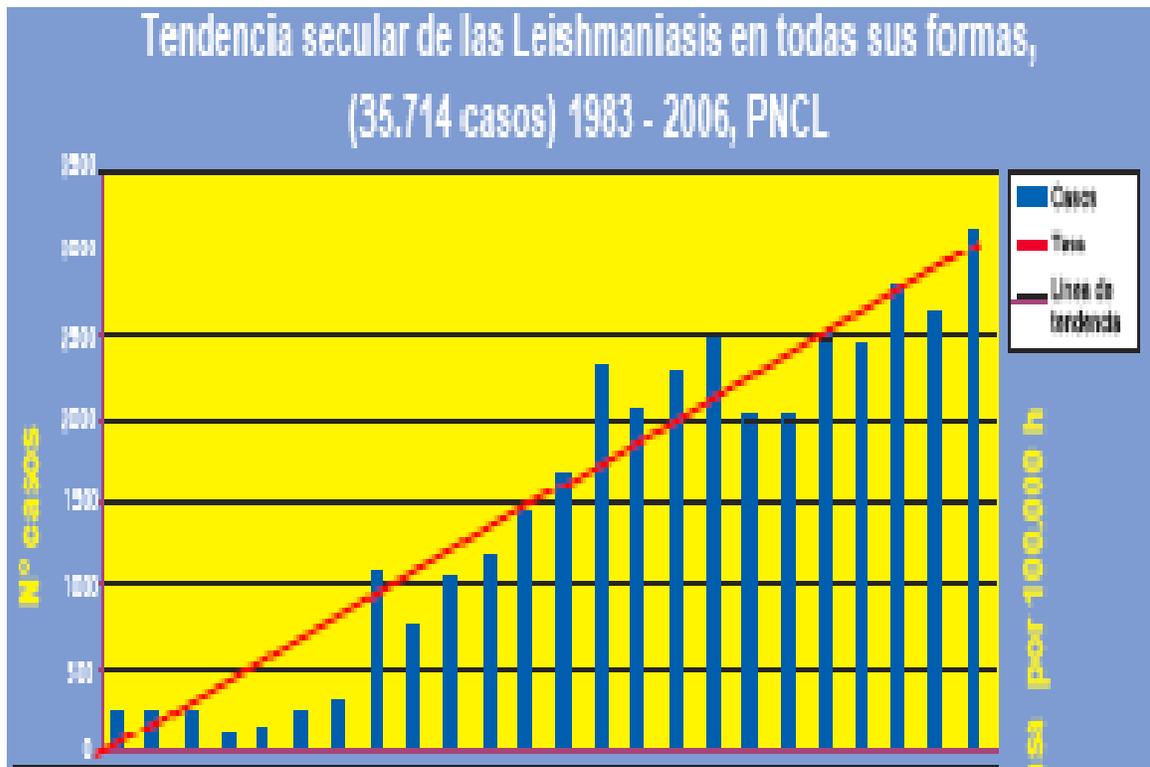
Las leishmaniasis son transmitidas en Bolivia por insectos vectores que pertenecen a varias especies de Flebotomíneos, de dos géneros : *Psychodopygus* y *Lutzomyias*, se encuentra distribuida geográficamente en el área rural de las zonas tropicales y sub-tropicales de los departamentos de La Paz, Beni, Pando, Santa Cruz, Cochabamba, Tarija y Chuquisaca en sus diferentes formas está muy difundida entre los 270 m.s.n.m. a 2.400 m.s.n.m. en los valles, trópico y sub-trópico.

Los nuevos focos activos se hallan ubicados en las tierras tropicales bajas (nuevos asentamientos humanos), donde existe contacto estrecho entre el hombre y el bosque primario (explotación de la madera), los nuevos asentamientos humanos, por la migración, han provocado que la transmisión se vuelva intra domiciliaria.

En Bolivia, aproximadamente 800.000 individuos se encuentra en alto riesgo de enfermarse con leishmaniasis, estos individuos están repartidos en 7 de los 9 departamentos de Bolivia, la tasa de incidencia más alta se encuentra en los departamentos de La Paz, Pando, Beni, las tasas de incidencia en Santa Cruz y Tarija son relativamente menores a las de otros departamentos, aunque por ello no menos preocupante. (47,48) En los últimos 24 años (1983-2006), fueron registrados en el país 35.714 casos autóctonos de leishmaniasis tegumentaria americana, menos de 10 casos de leishmaniasis visceral y 4 casos de leishmaniasis cutáneo difusa.

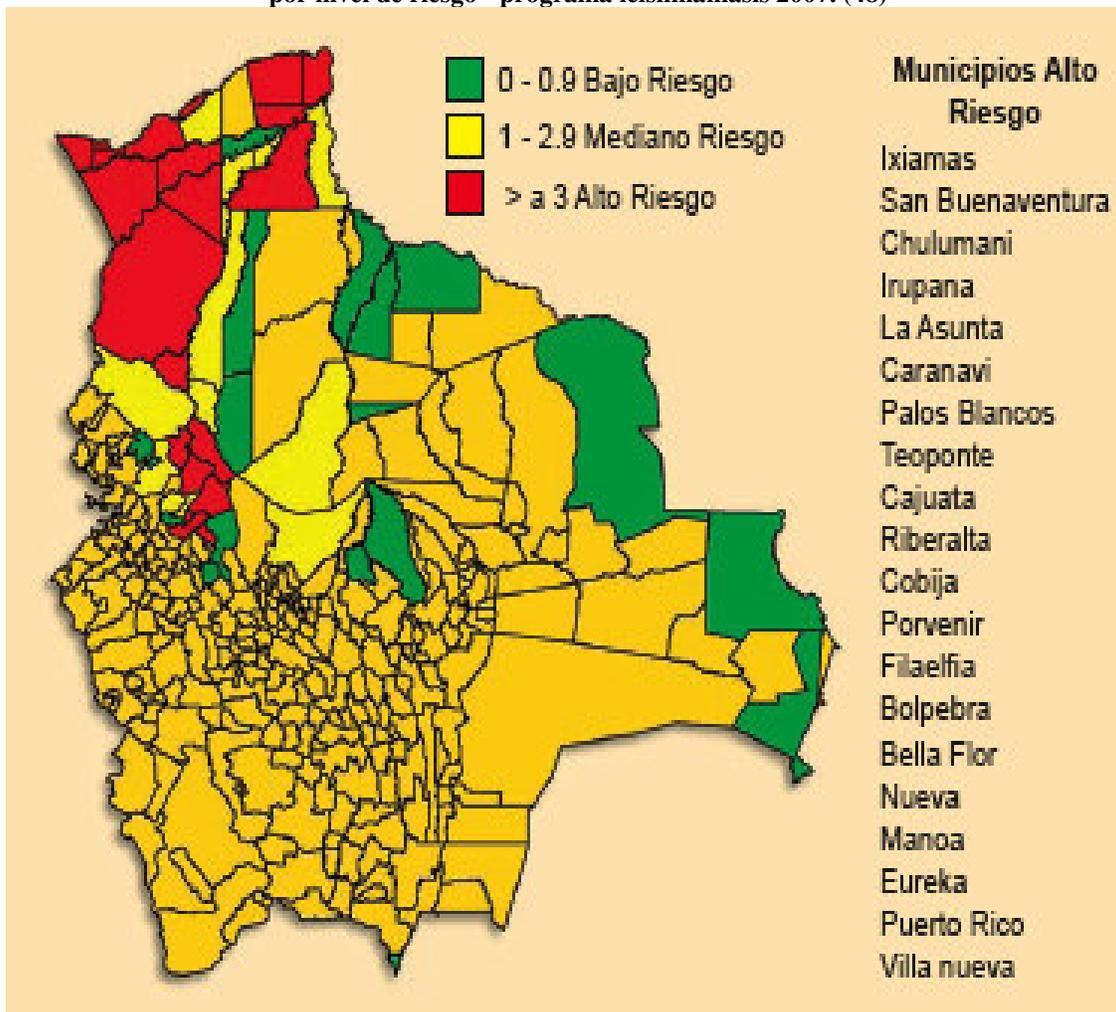
Comparando los casos reportados en 1983 (278 casos) con los del año 2003 (2452 casos), se observa que la tendencia secular de las leishmaniasis está en aumento, situación observada al comparar la tasa por 100.000 habitantes de 4.1 el año 1985, que pasa a 16,6 el año 1993 y alcanza 32,7 el año 2006. (Figura 4)(48)

Figura 4. Tendencia secular de las leishmaniasis en todas sus formas. (35.714 casos desde 1983 hasta 2006). (48)



Para el presente fin de siglo dentro de Bolivia se ha podido certificar que circulan 4 especies parasitarias: *Leishmania (V) braziliensis*; *Leishmania (L) amazonensis*; *Leishmania (L) chagasi* y *L. (V) lainsoni*; la primera especie es agente de la LCM, la segunda de LC y LCD, estas dos especies tiene un claro predominio en los índices epidemiológicos nacionales para la enfermedad, la tercera es agente de LV y la cuarta produce raros casos de LC, estas dos últimas especies generan casos clínicos esporádicos. (48)

Figura 5. Estratificación de casos notificados como sospechosos de leishmaniasis por nivel de riesgo - programa leishmaniasis 2007. (48)



3.6. Aspectos clínicos y tratamiento.

Las formas clínicas están en estrecha relación con la especie de *Leishmania* causante y la respuesta adaptativa, resultado del equilibrio entre la inmunidad celular y humoral. La patogenia y distribución en la piel del parásito en las leishmaniasis cutáneas depende de las especies, número de promastigotes inoculados, número de picaduras sufridas, ciclo zoonótico y respuesta del hospedador. La forma habitual es un nódulo que alcanza varios centímetros de diámetro a las pocas semanas de la inoculación pudiendo ulcerarse o no, si lo hace, presenta un fondo infiltrado que cura en varios meses de forma espontánea. Los protozoos inoculados quedan fagocitados por los macrófagos en la periferia de la lesión en los casos en los que hay participación linfática aparecen lesiones destructivas mucocutáneas. Desde el punto de vista histopatológico la reacción inflamatoria se expresa habitualmente como lesiones papulosas y ulceradas, pero las hay psoriasiformes, en forma de hiperqueratosis, granulomatosas o lupoides. Las leishmaniasis viscerales cursan de forma idéntica tanto si son causadas por *L.donovani* o por *L.infantum*: fiebre, esplenomegalia y leucopenia forman la tríada sintomática, signos que aparecen después de un periodo de incubación medio de dos a tres meses. Las leishmaniasis asociadas al sida pueden presentarse en localizaciones poco frecuentes debido a la anergia de los pacientes. (15,16,18)

El tratamiento de todas las leishmaniasis se realizan con antimoniales pentavalentes, pentamidina, anfotericina B y recientemente se está introduciendo el tratamiento con miltefosina, pero difieren la posología y ruta de administración de acuerdo a cada forma clínica y pronóstico.

Los antimoniales pentavalentes son las drogas antileishmaniasis de primera línea desde hace más de 40 años y probablemente las más regularmente activas, fueron utilizadas a partir el inicio del siglo XX, y han sido repetidamente probadas y motivo de numerosas publicaciones.

Existen dos formulaciones disponibles en el comercio internacional aunque en nuestro país solo se encuentra: Antimoniato de N-metil-glucamina (glucantime), el cual es de primera línea para el tratamiento de la leishmaniasis visceral y lesiones primarias de leishmaniasis tegumentaria, lamentablemente el acceso a este tratamiento es limitado debido principalmente al costo elevado del producto.

La Anfotericina B es un antibiótico poliénico macrocíclico de bajo espectro, este producto no tiene actividad contra bacterias pero si es muy activo frente a hongos por lo que se le conoce más con antimicótico (micosis profundas o sistémicas) y algunos parásitos (*Leishmanias*).

Anfotericina B es un medicamento de primera elección en casos de pacientes con leishmaniasis mucosa y de segunda elección en casos de leishmaniasis recidivantes, reactivas. Existen 3 nuevas formulaciones de este producto: anfotericina B liposomal, anfotericina B dispersión coloidal y anfotericina B lípido-compleja. De las 3, la anfotericina B liposomal (AmBisome®) es la que menos efectos secundarios presenta y la mejor tolerada pero es de alto costo (600 dólares por tratamiento) para los países en desarrollo, al costo elevado que presentan estas formulaciones químicas se suma lamentablemente los problemas de toxicidad y efectos secundarios. (49)

Otro medicamento recientemente utilizado es la miltefosina, medicamento originalmente antineoplásico que posee una potente actividad leishmanicida al interferir con vías metabólicas e inducir una muerte como la apoptosis (50). Hoy la miltefosina está aprobada en la India para el tratamiento de LV, en pacientes inmunocompetentes de dos años de edad en adelante, en Alemania para pacientes inmunocomprometidos afectados por LV y en Colombia para LC y LV, en Bolivia se vio que es efectiva en pacientes con lesiones cutáneas (88% de curaciones) comparadas con glantime (94% de curaciones) en pacientes que cursan infecciones con *Leishmania braziliensis* (51), por otro lado también se probó la miltefosina en pacientes que cursaban con lesiones mucocutaneas resultados comparados con la droga de elección para esta forma clínica como es la anfotericina B mostrando cura en pacientes con compromiso nasal hasta el 83% comparados con la de anfotericina B que mostró una cura de 50%(53), sin embargo miltefosina es teratogénica e induce abortos en animales por lo anterior, debe manejarse de una manera controlada asegurando que las mujeres que la reciben acepten y sigan las medidas apropiadas, necesarias para evitar el embarazo durante el tratamiento y hasta 2 a 3 meses después de recibir la última cápsula, también la miltefosina tiene una vida media larga, de aproximadamente siete días, lo que la predispone al desarrollo de resistencia por parte del parásito. (52)

4. Enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una afección hística y hemática producida por protozoo flagelado el *Tripanosoma cruzi*, que anida y se reproduce en los tejidos. (54,19) Esta enfermedad es transmitida principalmente por vectores de la especie *Triatominae* (55), también se transmite por transfusiones sanguíneas, en forma congénita, accidental y por trasplante de órganos. Su descubrimiento y descripción en el año 1909 por el Dr. Carlos Chagas es uno de los acontecimientos únicos en su género, ya que el mismo autor tuvo la virtud de describir el parásito, el vector, sus manifestaciones clínicas, sus complicaciones, sus aspectos socioculturales etc. Esta es una de las principales endemias propias de las Américas ya que su distribución va desde el sur de Estados Unidos hasta la Patagonia Argentina. (54)

En todo este tiempo se han desarrollado muchos avances respecto a su conocimiento y se han obtenido diferentes experiencias respecto a su control, vigilancia, diagnóstico y tratamiento, a los que nuestro país también aportó con el concurso de destacados investigadores e instituciones. Originalmente, la infección por *T. cruzi* era una zoonosis silvestre que, posteriormente, se convirtió en una entidad domiciliaria después de un proceso de captación del parásito por el ser humano. La participación del hombre en la cadena epidemiológica se inició cuando éste invadió el ambiente silvestre. Las modificaciones antrópicas del medio llevaron a su desmantelamiento progresivo y tuvieron como consecuencia una reducción de la fauna silvestre. La edificación por el hombre de viviendas con paredes de barro o madera llenas de grietas y techo vegetal ofreció el biótomo apropiado para los triatomíneos, quienes huyen de su medio natural amenazado por la reducción gradual de la fauna silvestre. Sin embargo, los ciclos silvestres y domiciliarios de *Tripanosoma cruzi* quedan interdependientes en las áreas donde permanece la circulación del parásito en los mamíferos reservorios. (55)

4.1. *Tripanosoma cruzi*.

El agente causal de la enfermedad de Chagas es *Tripanosoma cruzi*, un protozoario digenético que alterna, durante su ciclo de vida natural, entre un huésped vertebrado y otro

invertebrado, se encuentra emparentado con otro microorganismo que, en África, provoca la "enfermedad del sueño", transmitida por la mosca "Tse-tse". Los tripanosomas de los mamíferos han sido divididos en dos secciones: Salvaria y Estercolaria. A estercolaria pertenece *Tripanosoma cruzi* y es el único patógeno dentro de esta sección. La principal característica de los estercolaria es que son transmitidos por un insecto vector que elimina con sus deyecciones las formas infectantes del parásito (tripomastigotes metacíclicos) (54,56)

4.2. Ciclo biológico de *Tripanosoma cruzi*.

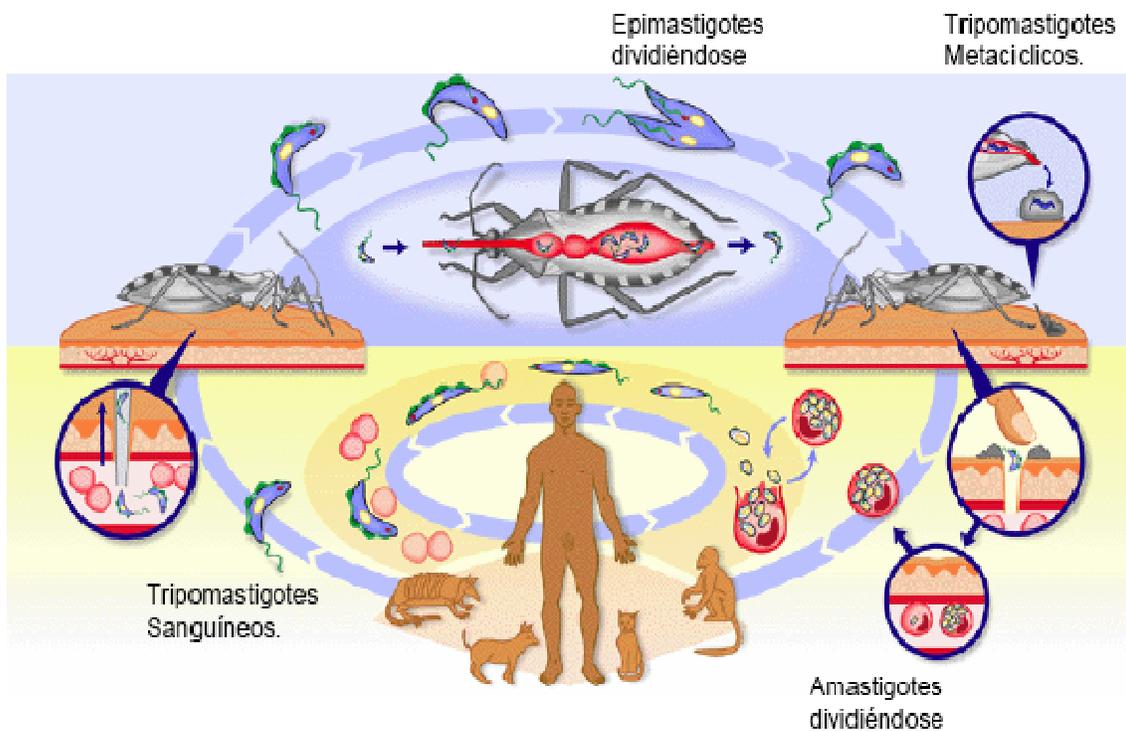
Tripanosoma cruzi tiene un ciclo de vida complejo y adopta diferentes formas en su evolución, estas poseen características propias que reflejan su adaptación a los distintos hábitats por los que debe pasar durante su ciclo evolutivo, presenta cuatro estadios morfológicos tripomastigote metacíclico, promastigote o tripomastigote sanguíneo, epimastigote y amastigote.

La infección del mamífero se inicia cuando un insecto vector (vinchuca) infectado defeca mientras se alimenta, liberando tripomastigotes metacíclicos en sus heces y orinas. Los tripomastigotes metacíclicos (deficiente en capacidad de reproducción), incapaces de atravesar la piel intacta, entran en el organismo a través de excoriaciones de la piel (sitio de la mordedura), o a través de las mucosas, invadiendo inmediatamente las células hospederas (células locales, nucleadas y musculares). Dentro de las células, los tripomastigotes pierden su flagelo y se redondean para formar amastigotes (forma leishmanoide con capacidad de replicación, por división binaria simple (57), los cuales se multiplican intracelularmente por fisión binaria. Cuando los amastigotes repletan la célula hospedera, se transforman en tripomastigotes procíclicos, los cuales son liberados a los espacios intersticiales y al torrente sanguíneo, rompiendo la célula. Los tripomastigotes tiene la habilidad de invadir otras células, donde se transforman de nuevo en amastigotes, repitiéndose indefinidamente el ciclo de infección. El ciclo de vida se cierra cuando un triatomino no infectado (vector) se alimenta de un animal con tripomastigotes circulantes. Dentro del vector y a lo largo de su tracto digestivo, el parásito sufre una serie de transformaciones antes de ser expulsado en las heces. En el estómago del insecto, los tripanosomas se redondean formando

esferomastigotes, a mitad del intestino se transforman en epimastigotes que se replican mediante fisión binaria y finalmente, aproximadamente 2-3 semanas después, llegan al recto, donde se convierten en tripanosomas metacíclicos. (54,58) El epimastigote es el estadio que presenta división binaria longitudinal y es la forma parasitaria que se encuentra en los medios de cultivo *in vitro* (58,59). Los epimastigotes han sido ampliamente estudiados para determinar su viabilidad frente a posibles drogas antiparasitarias a través de diferentes métodos. (60)

La infección es transmitida por triatominos a más de 100 diferentes especies de animales salvajes y domésticos. Los insectos que pueden actuar como vectores son hemípteros de la familia Reduviidae (61), subfamilia *Triatominae*, de aproximadamente 3cm de largo, que se alimentan de sangre durante la noche. Actualmente se reconocen 123 especies de triatominos, 110 especies están difundidas sólo en el nuevo mundo entre las latitudes 42° Norte y 46° Sur, en el viejo mundo se han señalado 13 especies sin significación epidemiológica. (55)

Figura 6. Ciclo biológico de *Tripanosoma cruzi*. (62)



4.3. Epidemiología de la enfermedad de Chagas.

En América Latina la enfermedad de Chagas también conocida como tripanosomiasis americana es un problema de salud pública en 17 países latinoamericanos (63) considerados como países con patología endémica México, América Central, Brasil, Perú, Bolivia, Uruguay, Argentina (64), la enfermedad de Chagas se encuentra diseminada, desde el sur de los Estados Unidos de Norteamérica hasta el sur Argentino. Esta enfermedad afecta fundamentalmente a las poblaciones más pobres, de 360 millones de personas que viven en los países endémicos, al menos 90 millones están expuestos al riesgo de contraer la enfermedad y entre 18 y 20 millones de personas están infectadas, en estos infectados el 40% desarrolla algún tipo de lesión crónica y el 0.2% presentan complicaciones cardíacas severas que requieren el uso de marcapasos(65), este marco se agrava puesto que los compuestos utilizados para el tratamiento de esta enfermedad (Benzimidazol-Nifurtimox) no son efectivas frente a Chagas crónico. Datos recientes muestran que esta enfermedad no se circunscribe solo a América latina puesto que se observó esta enfermedad en países donde no existía antes como son: Estados Unidos – Canadá – España, esto es debido al flujo migratorio de América Latina hacia países no endémicos. (66)

Figura 7. Distribución geográfica de la Enfermedad de Chagas. (67)



4.4. Distribución y situación actual en Bolivia.

En Bolivia la lucha contra la enfermedad de Chagas es considerada como prioridad nacional, debido a que sus principales indicadores son alarmantes. Más del 50% del territorio nacional es endémico, cerca del 20% de la población estaría infectada, la mayor tasa de infecciones de América Latina. La tradicional zona geográfica denominada “endémica de la enfermedad de Chagas en Bolivia”, se basa a la dispersión de los triatomos y esta comprendida entre 300 a 3000 m.s.n.m, la extensión territorial de esta endemia alcanza casi toda la superficie de los departamentos de Cochabamba, Chuquisaca, Santa Cruz y Tarija y parcialmente los departamentos de La Paz y Potosí, donde habitan aproximadamente 3.500.000 de personas que están en riesgo de contraer la enfermedad, de las cuales 1.800.000 están infectados. (68)

Bolivia presenta en el momento la más grave situación epidemiológica en cuanto a la Enfermedad de Chagas humana, entre los 19 países afectados en el continente. Con cerca de dos tercios de su territorio infestados por el vector principal *Triatoma infestans*.(conocida localmente como vinchuca). La magnitud del problema sanitario que representa la enfermedad de Chagas en Bolivia, obliga a que las investigaciones se orienten a la búsqueda del modo de control más eficaz y mas económico.

En Bolivia, los casos de infección por *Tripanosoma cruzi* y la presencia de su principal vector el *Triatoma infestans*, están distribuidos en gran parte del territorio nacional. En estudios realizados establecen porcentajes de infestación para la región oriental que oscilan entre el 11% y el 60%. El 64% de la población vive en áreas rurales del país y según datos censales disponibles, las viviendas rurales están predominantemente construidas de barro, poseen techos de paja y piso de tierra. (69)

Figura 8. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas en Bolivia. (70)



Los insectos triatominos infestan y se crían en las rendijas de las paredes de adobe o estaqueo, entre las tablas de madera y en los techos de paja, prefieren lugares oscuros, de mucha humedad y de poca ventilación (Figura 8). Es común encontrar triatominos en el peridomicilio en galpones, gallineros y en maderas apiladas, ladrillo etc, lo cual posibilita la gran dispersión del vector en las áreas rurales del país y consolida la asociación entre vector y tipo de vivienda predominante en dichas áreas.

Estimaciones sobre la incidencia de la enfermedad de Chagas en Bolivia calculan 14.680 nuevos infectados por año y una pérdida por años de trabajo debido a muertes prematuras para la fase aguda y crónica de la enfermedad de aproximadamente 30 millones de dólares. Al nivel poblacional y social, la enfermedad de Chagas tiene en Bolivia un elevado impacto, ocasionando más de 20% de muertes en individuos con la enfermedad aguda o connatal, generando cardiopatía grave en cerca de 20% (mínimo) de todos los infectados, lo que vale decir, unos 360.000 bolivianos. Investigaciones llevadas al cabo en Santa Cruz,

Cochabamba y Tupiza detectaron una prevalencia entre 35 y 55% de mujeres chagásicas en estos Departamentos y una incidencia de casos connatal entre 4 y 9% de los partos de mujeres.

Figura 9. Habitat de *Triatoma infestans*. (71)



4.5. Mecanismos de transmisión.

La transmisión por vectores representa más del 80% de todos los casos, y de la cadena epidemiológica de la enfermedad, el vector en el domicilio es el más vulnerable hasta el momento. Se ha encontrado que el promedio de vinchucas infectadas con el parásito *Tripanosoma cruzi* es de 30%, alcanzando en algunas áreas hasta el 90% de positividad. La situación de países como el nuestro, donde se observa una gran migración campo ciudad e interdepartamental, hace que esta patología manifieste una de sus formas de transmisión a través de la vía transfusional, especialmente en los grandes centros urbanos. También es necesario considerar, por los altos índices de infección en mujeres embarazadas el Chagas congénito considerada una de las vías de transmisión presentes en países no endémicos (72) siendo una forma importante de transmisión en nuestro país, aunque no se conoce su real magnitud.

En las zonas rurales de América Latina, la infección se transmite principalmente por las deyecciones de los triatomíneos parasitados. En cambio en las ciudades generalmente libres de vectores, la enfermedad de Chagas se transmite por transfusión de sangre, se habla entonces de la urbanización de la enfermedad. (73,55)

La transmisión por vía congénita se observa tanto en las zonas rurales como en las ciudades. Existen otras formas de transmisión menos frecuentes como son: por vía oral, por la leche materna, por accidentes de laboratorio o trasplante de órgano. (74,55)

4.6. Aspectos clínicos y tratamiento.

Dentro los aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas se puede citar una fase aguda que se inicia al momento de adquirir la infección por cualquiera de sus vías y dura de 2 a 4 meses, los síntomas y/o signos pueden ser muy leves y atípicos, lo que hace que con frecuencia la enfermedad no se detecte, o por lo contrario, el paciente puede presentar una sintomatología específica como una pequeña lesión llamada chagoma de inoculación que se localiza en el punto de entrada del parásito. (54)

La fase indeterminada se caracteriza por no presentar síntomas ni signos viscerales. Pueden durar toda la vida o derivar en la fase crónica con alguna manifestación orgánica al cabo de aproximadamente 15 a 20 años. El paciente se denomina en este caso infectado chagásico.

Se define que un paciente es chagásico crónico cuando presenta alguna manifestación orgánica. A esta fase llega aproximadamente el 30% de las personas que se infectan y derivan de la fase indeterminada, los síntomas y/o los signos son de expresión variada, siendo la forma cardíaca la más frecuente en quienes se cree que desarrollan un mecanismo de autoinmunidad para la patología de esta enfermedad cardíaca (75), en esta fase el paciente se denomina “enfermo chagásico”. (54,55)

La forma congénita, es un riesgo presente en toda mujer gestante chagásica. El parásito en sangre puede invadir al feto por la placenta. Se ha propuesto la producción de abortos espontáneos y prematuros.

La problemática terapéutica se hace patente porque los agentes quimioterápicos de los que se dispone desde hace décadas presenta un efecto antichagásico discreto y restringido actuando casi siempre en las fases tempranas de la enfermedad, por lo anterior las únicas medidas que se han demostrado realmente eficaces hasta el momento han sido de tipo profiláctico bajo campañas masivas destinadas al control de la población de vectores. (76)

Existen dos medicamentos que a pesar de su toxicidad, son los únicos disponibles para el tratamiento de la infección por *Trypanosoma cruzi* estos compuestos nitroheterociclos son: nifurtimox (nitrofurano) y el benznidazol (nitroamida), ambos fueron descubiertos en los años 70. Estos dos fármacos son a la fecha las únicas internacionalmente aprobadas. El tratamiento en personas adultas, generalmente en fase indeterminada o crónica de la enfermedad, puede realizarse con éxito en algunos casos, pero es peor tolerada y tiene peores tasas de curación que en niños por lo que no se recomienda como una medida de salud pública frente a la enfermedad de Chagas (77), sin embargo se viene estudiando la posibilidad de un esquema de tratamiento en personas adultas. (78)

Nifurtimox (Lampit), posee un mecanismo de acción vía reducción del grupo nitro a radicales aniónicos inestables, lo cual produce una reacción que conlleva a la producción de metabolitos de oxígeno reducido altamente tóxico: anión superóxido, peróxido de hidrógeno. El parásito es deficiente en mecanismo de detoxificación para metabolitos de oxígeno. Benznidazol (Rochagan, radanil), actúa por un mecanismo que involucra la modificación covalente de macromoléculas por intermediarios de la nitroreducción.

Nifurtimox y benznidazol, son utilizados en fase aguda y fase crónica reciente de la enfermedad especialmente en niños (79), casos congénitos y en infección accidental, el tiempo de duración del tratamiento oscila entre 90-120 días, su administración es por vía oral, en dos o tres dosis diarias. Ambos tienen una significativa actividad en fase aguda con un 80% de cura parasitológica (cura parasitológica es definida como un resultado negativo para todas las pruebas de parasitología y serología). Tienen significantes efectos colaterales, probablemente como una consecuencia del daño oxidativo o reductivo en el tejido del hospedador. En las primeras semanas puede haber anemia, intolerancia digestiva, foto dermatitis, pudiendo en algunos casos interrumpir el tratamiento.

5. Malaria

La malaria también conocida como paludismo es una antropozoonosis parasitaria causada por esporozoarios del género *Plasmodium* transmitidos por la picadura de mosquitos hembras del género *anopheles*. (80,19)

En el mundo esta enfermedad provoca la muerte de cerca a tres millones de personas y entre 300 a 500 millones de casos clínicos se registran cada año. Esto se debe a que la mayoría de la población está distribuida en zonas altamente endémicas que corresponden a zonas subtropicales y tropicales con una incidencia elevada en: África, Sud y Sudoeste de Asia, Sud y Centro América, donde el riesgo de infección es permanente. (81)

Plasmodium falciparum causante de la malaria terciana maligna, se encuentra entre las cuatro especies que provocan la malaria humana, la más peligrosa y mortal. La gravedad de esta enfermedad y su erradicación se ha complicado más con el desarrollo de resistencia del parásito frente a las drogas antipalúdicas de elección. Otro problema con el que han tenido que tropezar las organizaciones de salud pública mundial en la erradicación de la malaria, es el desarrollo de la resistencia del mosquito vector frente a los insecticidas utilizados para su eliminación y prevención en la transmisión. (82)

5.1. Ciclo biológico de la malaria

La malaria está causada por el *Plasmodium*, un microorganismo o protozooario unicelular. Existen cuatro formas diferentes de malaria en el hombre causado por cuatro especies distintas de *Plasmodium*: *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.ovale* y *P.malariae*. Estas especies de *Plasmodium* son exclusivamente parásitos del hombre, excepto en el caso de *P. malariae* que puede infectar a otros primates. Por consiguiente, a diferencia de algunas otras enfermedades tropicales, no existe un reservorio animal de la infección, excepto el mosquito que difunde la enfermedad. (83)

Tabla 4. Enfermedades ocasionadas por especies diferentes de *Plasmodium*. (83)

Tipo de <i>Plasmodium</i>	Tipo de enfermedad
<i>P.falciparum</i>	Malaria causada por <i>P. falciparum</i> , fiebre terciana maligna
<i>P.ovale</i>	Malaria causada por <i>P. ovale</i> , fiebre terciana por <i>P. ovale</i>
<i>P.vivax</i>	Malaria causada por <i>P. vivax</i> , fiebre terciana benigna
<i>P.malariae</i>	Fiebre cuartana, fiebre cuartana benigna

El parásito causante de la malaria tiene un ciclo vital que se reparte entre un huésped vertebrado (el hombre u otro mamífero) y un insecto vector. Debe vivir en ambos para completar el ciclo, que se muestra en la Figura 10 y que se detalla a continuación:

A. Multiplicación esquizogónica exo-eritrocitaria.

1. Mosquito *Anopheles* hembra, que ha succionado sangre infectada de un mamífero (o persona), inocular esporozoitos a otro mamífero (o persona) no infectada.
2. Los esporozoitos inoculados infectan las células del hígado.
3. Estos maduran a esquizontes.
4. Los merozoitos son liberados al torrente sanguíneo.

El *P. vivax* y el *P. ovale* poseen un estadio latente en el hígado llamados hypnozoitos pueden emerger a intervalos de semanas, meses o hasta años y provocar recaídas de malaria.

B. Multiplicación esquizogónica intra-eritrocitaria.

5. Los merozoitos infectan glóbulos rojos.
6. El estadio anillo de trofozoito madura a esquizonte, con la posterior liberación de los merozoitos.
7. Algunos parásitos se diferencian sexualmente en gametocitos. (los cambios de estadios en el torrente sanguíneo, son los responsables de las manifestaciones clínicas características de esta enfermedad). Los gametocitos, macho (microgametocito) y femenino

(macrogametocito), son ingeridos por el mosquito *Anopheles* hembra mientras succiona sangre pues necesita hemoglobina para que maduren sus huevos.

C. Los parásitos multiplicados en los mosquitos corresponden al ciclo esporogónico.

8. Cuando los gametocitos llegan al estomago del mosquito, los microgametocitos maduran formando un gran numero de microsporozitos, que son elementos flagelados, estos nadan en busca de macrogametos (macrogametocitos maduros) y esto origina el cigoto.

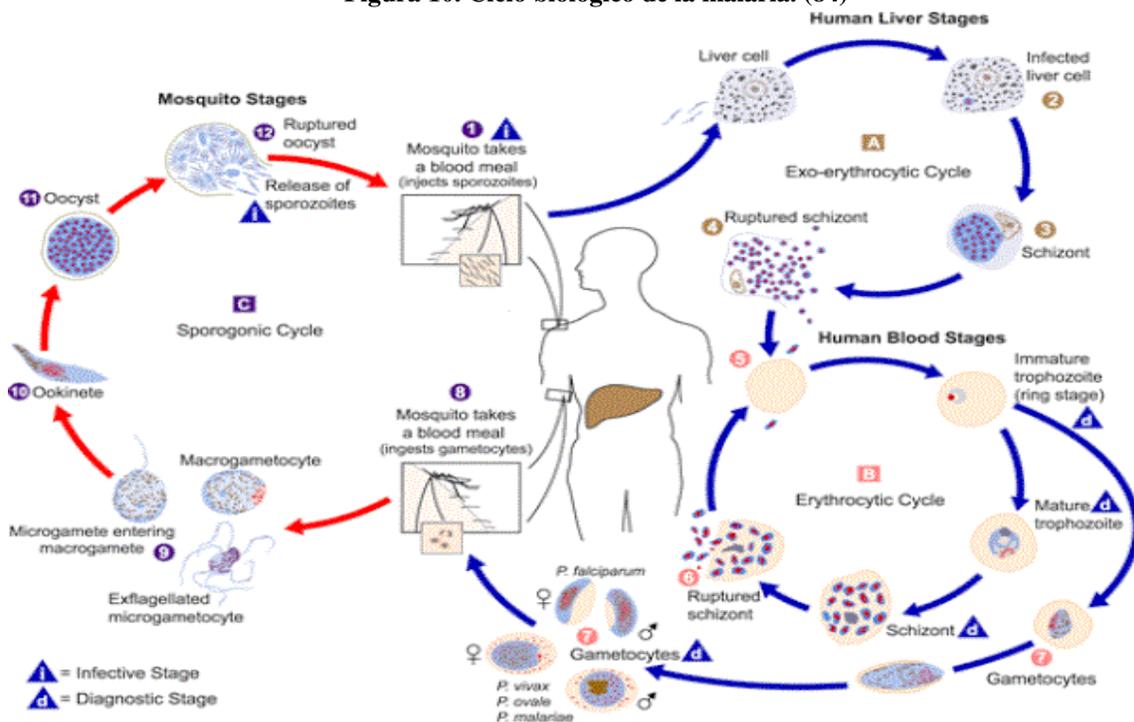
9. Cuando el cigoto se alarga, y se mueve se llama ookinete.

10. El ookinete atraviesa la pared estomacal del mosquito, y se redondea adhiriéndose a la cara externa de esta pared, convirtiéndose en ooquiste.

11. Los ooquistes sobresalen en la parte externa del estomago del mosquito, conduciendo a la producción asexual de numerosos esporozoitos.

12. Al liberarse estos esporozoitos se dispersan en el cuerpo del mosquito, y anidan en las glándulas salivales con 100 hasta 70.000 esporozoitos, estos son inyectados con la saliva del insecto en el momento de la picadura.

Figura 10. Ciclo biológico de la malaria. (84)



La multiplicación esquizogónica intra-eritrocitaria del parásito es la que se obtiene en técnicas de cultivo *in vitro*, y gracias a estos cultivos se pueden estudiar en todo el mundo los parásitos del paludismo de mayor importancia clínica.

Estas técnicas son la base de muchos adelantos en la biología, bioquímica, parasitología, inmunología y quimioterapia del paludismo. El cultivo continuo *in vitro* de *P. falciparum* fue puesto a punto en 1976 por William Trager y James Jensen (85) y consiste en el mantenimiento *in vitro* a 37°C en microaerofilia, de glóbulos rojos humanos infectados con cepas o aislados de *P. falciparum* suspendidos en el medio de cultivo celular RPMI suplementado con suero humano. Esta técnica no solo ha permitido el estudio de drogas antimaláricas, sino también las interacciones parásito-célula huésped. (85) Gracias a este método se han abierto nuevas puertas para el estudio de la biología, bioquímica, quimioterapia e inmunología de *P. falciparum*. (86)

5.2 Vector de la malaria.

El mosquito *Anopheles* es el vector de la malaria y no su causa, existen 380 especies de *Anopheles*, pero sólo 60 de ellas son capaces de diseminar la malaria, de estos, dos infestan a Bolivia, *A. darlingi* y *A. pseudopunctipennis*. Los parásitos causantes de la malaria se transmiten de una persona a otra únicamente mediante la succión de sangre que se produce por picadura de los mosquitos hembras que son las que necesitan de sangre. Los machos no transmiten la enfermedad ya que sólo se alimentan de la savia de las plantas.

El mosquito hembra del género *Anopheles* (huésped definitivo) se constituye en el vector de transmisión del paludismo y en este se lleva a cabo el ciclo sexual del parásito luego pasa hacia los mamíferos donde se desarrolla la fase asexual. Son más de 380 especies de mosquitos anofelinos las que existen, pero solo 60 aproximadamente actúan como huéspedes definitivos del parásito del paludismo en el mundo. (87)

Las especies que predominan en América Latina son principalmente:

Anopheles albimanus

Anopheles aquaralis

Anopheles darlingi

Anopheles nuñeztovari

Anopheles pseudopunctipennis

Anopheles punctimacula

Anopheles vestitipennis

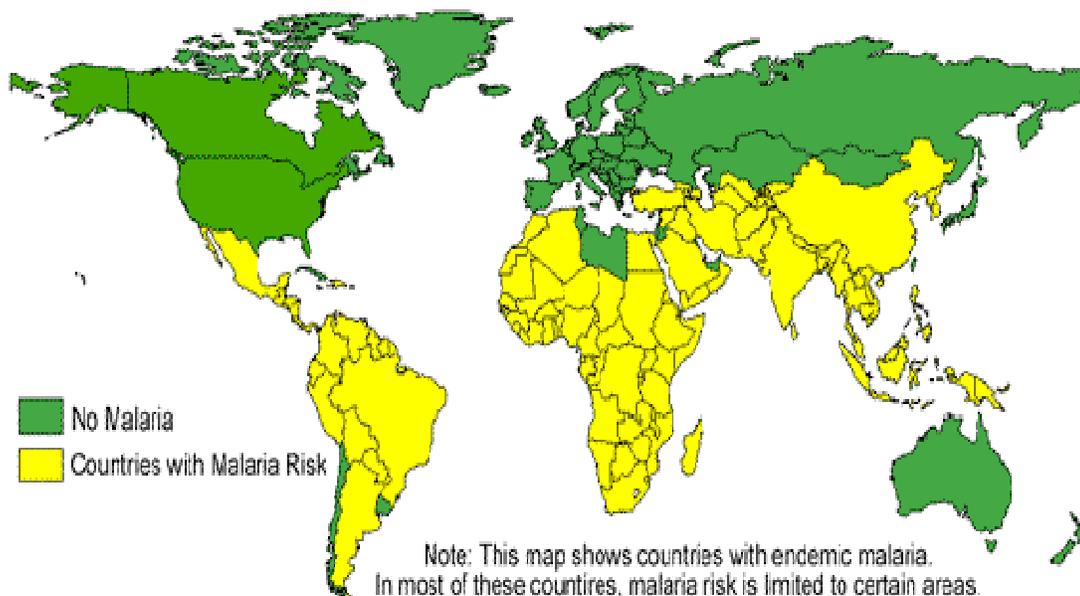
5.3. Epidemiología en el mundo.

Actualmente, 90 países en el mundo son considerados palúdicos, con casi la mitad de ellos localizados en la región del sub.-Sahara en África, el 90% de los casos y muertes mundiales se producen en ésta región. Epidemias palúdicas son comunes en Burundi, Rwanda y la República Democrática del Congo. (81)

La malaria es rara en el Norte de África, donde se encuentran las especies *P. vivax* y *P. malariae* y una menor proporción de *P. ovale*. En el este, en Madagascar, una verdadera epidemia hizo estragos entre 1987-1988, lo mismo que en Etiopía. (81) En Asia, el paludismo castiga intensamente las regiones de: Asia Menor, Península Indiana, China, Tailandia y Vietnam, donde predominan *P. falciparum* y *P. vivax*. En 1998, la malaria invadió áreas que anteriormente se encontraban bajo control, podemos citar Azerbaijón, Tayikistán, Irak y Turquía, Rajas tan y Bangla Desh.

Esta enfermedad existe en Sud América, donde está en progresión, particularmente en Brasil, ya que dos tercios de los casos de malaria que ocurren en América se dan en la cuenca Amazónica, también se presentan casos de paludismo en las Guayanas y en Haití, estando ausente en las Antillas Francesas. (81)

Figura 11. Epidemiología de la malaria en el mundo. (88)



5.4. Distribución en Bolivia.

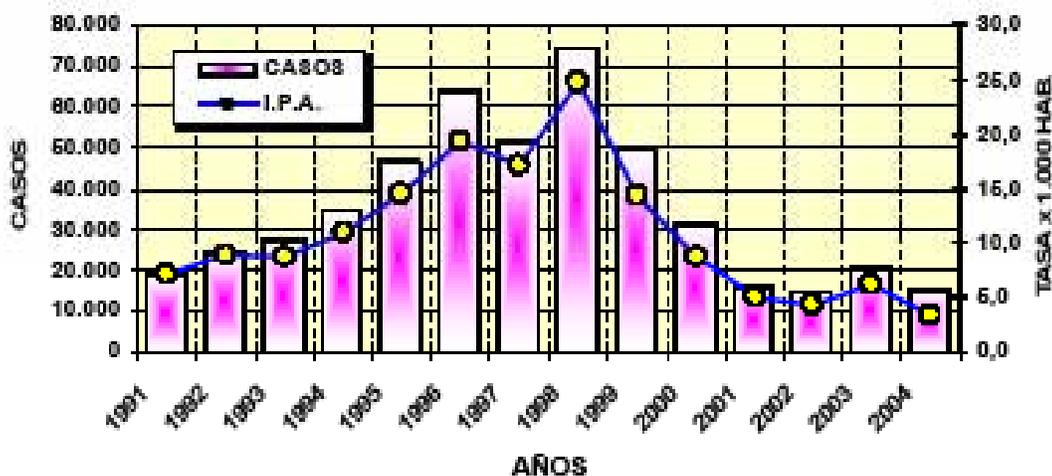
En Bolivia, aproximadamente 3/4 partes del territorio (75% de la superficie total) corresponden a zonas tropicales y subtropicales que son afectadas por el paludismo, Beni es el departamento más afectado por las características climatológicas que presenta, ya que más del 90% de los casos se registran en las localidades de Riberalta, Guayaramerín y Magdalena que son las zonas endémicas declaradas. (89)

Figura 12. La malaria en Bolivia, 2004 (90)



Según datos del año 2000, la población en riesgo se estima en 3.569.495 habitantes, considerando como indicador para los niveles de riesgo el Índice de Incidencia Parasitaria.

Figura 13. Incidencia parasitaria de la malaria- Anual (IPA). (91)



La enfermedad afecta mayormente a hombres (58%) y a la población económicamente activa (51.9%), principalmente a aquellos que se dedican a las actividades económicas de carácter agrícola que muchas veces implican migración desde las zonas altioplánicas. Le

sigue en importancia la población en edad escolar con el 26.5%. Mas allá de su efecto letal, las consecuencias económicas de la malaria son inmediatamente tangibles en términos de reducción de la fuerza productiva, sea en el caso extremo de muerte o al considerar las pérdidas por la discapacidad laboral producida por la enfermedad.

5.5. Aspectos clínicos y tratamiento.

La hemólisis de los glóbulos rojos parasitados y no parasitados, la liberación de los metabolitos del parásito, la respuesta inmunológica del huésped al antígeno y la formación del pigmento palúdico se traducen en los primeros efectos patológicos de la infección palúdica.

Las diferentes especies de *Plasmodium* se diferencian por su tendencia a infectar distintos glóbulos rojos. Los merozoitos de *P. vivax* y *P. ovale* invaden solo reticulocitos, en cambio los merozoitos de *P. malariae* se limitan a células viejas, casi al final de su vida, *P. falciparum* es capaz de invadir por igual, glóbulos rojos de todas las edades, por esto las infecciones con este parásito llevan rápidamente a la anemia. Sin embargo, junto a la destrucción masiva de los glóbulos rojos se presentan otras alteraciones en muchos casos irreversibles. (92)

El acceso simple se caracteriza por la fiebre que es provocada por el estallido de los esquizontes que liberan el pigmento malárico en el torrente sanguíneo. La anemia resulta tanto del estallido de los esquizontes como de la fagocitosis de los eritrocitos sanos. La esplenomegalia y la hepatomegalia frecuentes después de cierto tiempo de evolución demuestran la hiperactividad y la congestión de estos órganos. Las particularidades sintomáticas del acceso pernicioso palúdico se deben a la multiplicación rápida, particularmente de *P. falciparum* en los capilares viscerales que provocan una anoxia de los tejidos, predominantemente a nivel del encéfalo, riñones, hígado y pulmones por anemia hemolítica, disturbios de la microcirculación y fenómenos citotóxicos. La gravedad de la hemólisis en el acceso pernicioso es la consecuencia de la parasitemia elevada.

Las alteraciones de los capilares viscerales son de intensidad variable, los hematíes parasitados por los esquizontes desarrollan en su superficie protuberancias que los adhieren al endotelio de los capilares, los eritrocitos sanos se aglutinan a los parasitados formando así las rosetas. Estos dos fenómenos provocan la obstrucción de la luz vascular y la retardación de la circulación, los microtrombos capilares se forman por los eritrocitos aglutinados que se lisan y liberan una sustancia fosfolipídica que a veces lleva a un proceso de coagulación intravascular difuso.

Finalmente la hipoglicemia, la acidosis sanguínea y los desórdenes hidroeléctricos aumentan la hiponatremia. (93) Todas estas alteraciones pueden agravarse y llegar a una anemia severa, ictericia, desequilibrio electrolítico, falla renal, hipertermia, colapso respiratorio, alteraciones de la coagulación o sangrado, vómito incoercible, infección asociada, edema pulmonar, hipoglicemia y hemoglobinuria (87), hasta malaria cerebral, coma o finalmente la muerte. (92)

Los únicos antipalúdicos naturales son la Quinina y el Qinghaosu, actualmente existen más de 1.600 derivados de los que tan solo 5 están usándose en la práctica curativa. Naturales o de síntesis, estos fueron divididos en los años 60 en dos grupos: según su rapidez de acción y su capacidad de inducir una resistencia por parte del hematozoario, el grupo I comprende la quinina y las 4-aminoquinoleínas, antipalúdicos de acción rápida y para los cuales la resistencia es lenta y difícil de aparecer y el grupo II comprende los antifólicos (sulfonas y sulfonamidas) y los antifolínicos (diguánidas y diaminopirimidinas) antipalúdicos de acción lenta y por lo cual la resistencia aparece rápidamente. (93)

En 1973 se aisló de un arbusto de China (*Artemisia annua* L.) el Qinghaosu que es un sesquiterpeno lactona peróxido, que es un nuevo esquizonticida del que existen muchos derivados hidrosolubles y liposolubles, por lo tanto administrables por las vías intravenosa e intramuscular. La actividad del Qinghaosu es rápida, en especial sobre las cepas de *P. falciparum* cloroquino-resistentes. (93)

La cloroquina es un fármaco que pertenece al grupo de las 4-aminoquinoleinas, este fármaco sintético es activo contra las formas asexuales eritrocíticas de la mayoría de cepas de *Plasmodium malariae*, *ovale*, *vivax* y *falciparum* pero no produce un efecto significativo sobre los estadios tisulares exoeritrocíticos de los plasmodios, por lo tanto, este fármaco no es un agente profiláctico y no previene el establecimiento de la infección. Se utiliza para tratar ocasionalmente la artritis reumatoidea y lupus discoide por sus efectos antiinflamatorios, pero a dosis altas.

La resistencia a la cloroquina se ha desarrollado principalmente en cepas de *P. falciparum*, por lo que es importante determinar esta resistencia en el área geográfica donde se vaya a administrar el tratamiento. (94)

El número de nuevas drogas con que cuenta el arsenal de antipalúdicos es limitado y la amenaza de la resistencia del parásito a las drogas se incrementa. Desafortunadamente, no existe una vacuna con un impacto operacional de magnitud, además los instrumentos de diagnóstico proporcionados deben ser mejorados. (95)

6. Amebas- *Acanthamoeba*.

Se conoce a las amebas, por lo general, como organismos de forma cambiante, dentro de ellas, hay un grupo, el de las amebas de vida libre, que hasta hace unas décadas, no parecía interesar más que a los especialistas más estrictos y en la actualidad, se sabe que algunos de sus representantes, como son las especies de *Acanthamoeba*, afectan al hombre y pueden causarle graves patologías.

Las amebas de vida libre del género *Acanthamoeba* se han aislado en una amplia variedad de hábitat y su contacto con el hombre es un hecho aparentemente común. Se ha observado que, hasta un 80 % de la población, posee anticuerpos específicos frente a *Acanthamoeba*, siendo aisladas de la nariz y garganta de individuos asintomáticos. (96,97).

Las patologías que provoca *Acanthamoeba* están relacionadas con los tejidos que son capaces de colonizar. Pueden invadir el sistema nervioso central, provocando una meningitis denominada Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA). También pueden encontrarse formando ulceraciones en la piel o invadiendo la córnea, provocando queratitis oculares. En pacientes inmunodeprimidos, se han descrito casos en los que provocan infecciones diseminadas. Las especies del género *Acanthamoeba* están relacionadas entre sí básicamente: en su biología celular, sus relaciones con el medio ambiente, crecimiento, su multiplicación y enquistamiento, o sus cambios macromoleculares, en función del tipo de medio bioquímico en el que se desarrollen, además de su potencial como productores de enfermedades. (96)

Las amebas patógenas de vida libre constituyen un grupo de protozoos oportunistas que pertenecen a la familia *Acanthamoebidae*, formado por tres géneros: *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Valkanphia*. Estudios taxonómicos recientes del género *Acanthamoeba* lo han dividido en 16 especies agrupadas en tres grupos siendo aisladas frecuentemente en infecciones humanas, la especies *A. castellanii*, *A. culbertsonii*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti* (96).

Acantoamoeba spp es un protozoo de vida libre que se encuentra en tierra, agua y aire, se ha aislado en alcantarillado, tinas calientes, filtros de aire y sistemas de aire acondicionado,

estas amebas son los agentes causales de una encefalitis multifocal llamada encefalitis granulomatosa amebiana, como también la queratitis amebiana donde las proteases extracelulares de estos parásitos (serina y cisteína), son las determinantes para provocar daño que suele ocurrir después de la exposición al agua como el de nadar en lagos o charcos mientras se usa lentes de contacto, esta infección también se liga al uso de soluciones salinas hechas en casa no estériles las cuales son usadas para la limpieza de los lentes de contacto. (97,98)

6.1. Distribución de *Acanthamoeba*.

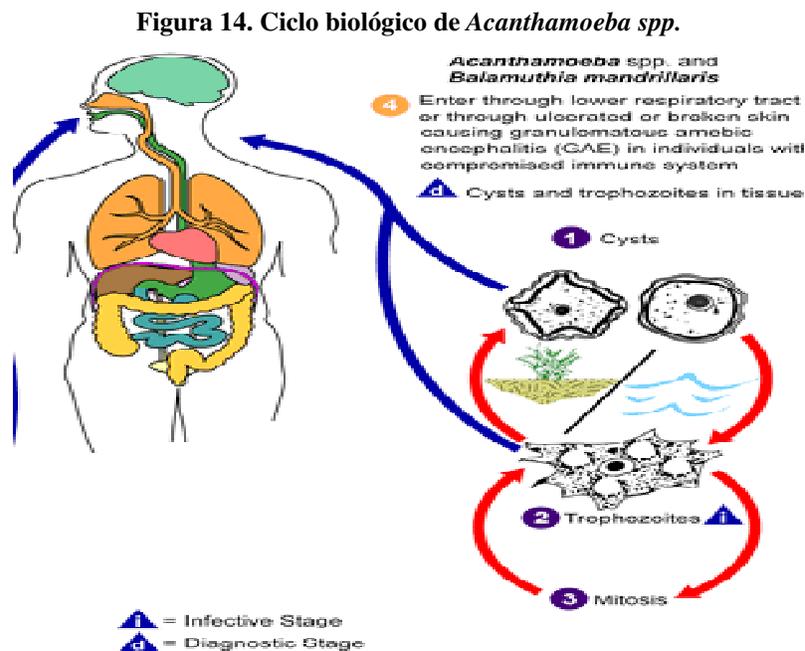
Desde el descubrimiento de estas amebas, en 1958, se han llevado a cabo un gran número de trabajos, cuya finalidad es establecer su distribución en la naturaleza. Esto nos ha permitido conocer la gran cantidad de hábitats donde se pueden encontrar, en los que se incluye agua dulce y salada. Así han podido ser aisladas de piscinas, conductos de calefacción y de ventilación, suelos, agua mineral embotellada, aire, balnearios, acuarios, vegetales, sedimentos marinos, lodos procedentes de aguas residuales. Además se han identificado en unidades de diálisis, polvo en suspensión, medios de cultivo de bacterias o células, lentes de contacto donde la mayoría de los casos reportados están asociados a una incorrecta limpieza de las lentes de contacto, empleando soluciones salinas de producción hogareña o el agua de red clorada para el enjuague de las mismas (99,100), sus estuches y soluciones para el cuidado de las mismas e, incluso en dispositivos intrauterinos (DIU). En el hombre, se han encontrado en la nariz y tráquea de pacientes con las vías respiratorias afectadas, secreciones bronquiales, oídos y en muestras de deposición de pacientes con diarreas. También se han aislado en la garganta y en la mucosa nasal de individuos sanos, por lo que se puede llegar a pensar que estas amebas forman parte de su flora normal. Su presencia en aguas dulces de superficie, donde se engloban a las aguas de ríos, fuentes, lagos, aguas de abasto público y aguas de piscinas, representa un riesgo para la salud humana, ya que el contacto con éstas es la principal vía de contagio. Han sido observadas diferencias estacionales en su densidad, siendo en primavera y otoño cuando se las encuentra en mayores concentraciones, lo que parece estar relacionado con la aparición de los síntomas de queratitis por *Acanthamoeba*, en los meses más cálidos del año. Las

especies de *Acanthamoeba*, como amebas de vida libre que son, no son parásitas por sí, en contraste con lo que ocurre con otros muchos protozoos amebianos, por lo que no necesitan ningún tipo de hospedador para su desarrollo. Su presencia en el hombre es completamente accidental, siendo las patologías a las que se le asocian, raras y oportunistas.

Cuando se encuentran de forma libre, se alimentan de bacterias, hongos, otros protozoos y algunas cianobacterias, actúan como fagotrofos móviles en las superficies aerobias de los suelos y sedimentos. Si llegado el caso, invaden un organismo, éstas se nutren de los tejidos que colonizan de su hospedador. (96)

6.2. Ciclo biológico de *Acanthamoeba*.

El ciclo de vida de las especies de *Acanthamoeba* se desarrolla en dos fases: una fase trofozoítica en la que *Acanthamoeba* se alimenta y multiplica de forma activa y que es la fase invasiva y una fase quística o de resistencia, que adquiere cuando las condiciones del medio no le son favorables. (99) (Figura 14)



Los trofozoítos de *Acanthamoeba* tienen un tamaño de entre veinticinco y cuarenta micras,

poseen poca movilidad, presentan un núcleo con un único nucleolo grande y prominente, un citoplasma abundante y granuloso, con una vacuola pulsátil citoplasmática contráctil, que se observa como un círculo refringente, que aumenta de tamaño lentamente y se cierra de forma brusca. Durante su movimiento, se puede observar como unos pseudópodos, finos y delgados, a modo de espinas, que reciben el nombre de acantópodos, que se extienden lentamente, en su desplazamiento. En cultivo sólido en placa, aparecen como pequeñas masas, más o menos evidentes, y sin que pueda apreciarse su forma de manera precisa. *Acanthamoeba*, a diferencia de lo que ocurre con otras especies de amebas de vida libre, no presenta formas flagelares. Son organismos aeróbicos, aunque sus trofozoítos pueden adaptarse a ambientes con baja presión parcial de oxígeno, durante un corto periodo de tiempo, o a un ambiente anóxico, durante unas horas. Cuando los trofozoítos de *Acanthamoeba*, tanto de forma natural como *in vitro*, se encuentran en situaciones de anoxia, carencia de nutrientes durante unos días o en medios con concentraciones de magnesio por encima de 50 mM, evolucionan a su forma de resistencia y forman un quiste. La forma quística le confiere a la ameba resistencia frente a la desecación, temperaturas extremas y agentes químicos. El enquistamiento puede ser inducido, además, con el empleo de ciertos inhibidores, como la mitomicina C, que es un inhibidor de la síntesis de ADN, el cloranfenicol, que inhibe la síntesis de proteínas, o el 2,4-dinitro-fenol, que impide la formación de ATP. Distintas variaciones en las condiciones físicas del medio provocan también el enquistamiento, como el calor húmedo o el frío extremo (estrés térmico), la desecación y los cambios en la osmolaridad del medio. *Acanthamoeba* puede permanecer en este estado de latencia durante años y seguir siendo viable, si se expone a los quistes en un medio que les sea favorable, donde encuentren alimento, volverán a recuperar su forma activa de trofozoíto. Los quistes presentan una gran variedad de formas, pero todos ellos poseen una serie de aspectos que los caracterizan: su tamaño es ligeramente menor que el de los trofozoítos (entre quince y veintiocho micras), contienen un solo núcleo (aunque excepcionalmente poseen dos), tienen una pared compuesta por dos envolturas, más o menos separadas, la exina y la intina. La intina, la más interna, se adhiere muy estrechamente al protoplasma, formando lo que se denomina endoquiste, dando al quiste una estructura poligonal. La exina, la más externa, se encuentra más o menos plegada y forma, alrededor de la intina, un velo poco refringente, que es el exoquiste. En las uniones

entre ambas envolturas se forman los ostiolos u orificios de salida. Cada ostiolo posee un opérculo, que es arrancado en el momento del desenquistamiento y la abertura que se genera es empleada por los trofozoítos para abandonar su envoltura quística. (96,99)

6.3. Aspectos clínicos y tratamiento.

Debido a la gran distribución de *Acanthamoeba* en la naturaleza, el contacto humano con estos organismos es frecuente e inevitable. Las patologías que *Acanthamoeba* puede llegar a causar en el hombre están íntimamente relacionadas con la vía de transmisión y, sobre todo, con el estado inmunológico del paciente. Las infecciones sistémicas y las que afectan al sistema nervioso central se van a producir en pacientes que presentan una inmunodepresión general, mientras que, en el caso de las infecciones corneales, van a estar favorecidas por una inmunosupresión local. Para que *Acanthamoeba* pueda llevar a cabo sus efectos citopáticos sobre su hospedador, requiere una serie de procesos previos, como son la adhesión a las células o superficies epiteliales, la secreción de proteasas, para desorganizar a estos tejidos y, por último, la fagocitosis celular. Debido al incremento del número de pacientes que requieren una terapia inmunosupresiva, como consecuencia de trasplantes de órganos, al aumento de pacientes que han desarrollado SIDA, y a la aparición de queratitis oculares, principalmente en usuarios de lentes de contacto, *Acanthamoeba* se ha convertido en una de las infecciones oportunistas que es importante poder reconocer y diagnosticar.

Las lesiones cutáneas suelen presentarse de dos formas. Como una inflamación supurativa de la subepidermis, con epidermis intacta que, al cabo de los meses, se transforma en una úlcera violácea, con la base endurecida y extendida o bien como una forma nodular, dura y bien delimitada, que se extiende progresivamente en superficie y profundidad. En ambos casos la evolución es lenta, de uno a tres años, pudiendo llegar a producirse metástasis superficiales. En su tratamiento, el uso combinado de forma tópica de clorhexidina, sulfadiazina, ketoconazol, flucitosina, itraconazol y anfotericina suele ser satisfactorio. La Encefalitis Granulomatosa Amebiana (EGA) es una infección oportunista y poco frecuente del Sistema Nervioso Central (SNC), de evolución lenta, de difícil diagnóstico y sin

tratamiento eficaz. Normalmente afecta a individuos con su sistema inmunitario comprometido, ya sea, por tratamientos con esteroides, quimioterapia y radioterapia, o por alcoholismo, enfermedades autoinmunes, como lupus eritematoso sistémico y diabetes mellitus o pacientes con alteraciones hematológicas o con SIDA. Por el momento, no existen tratamientos efectivos y, normalmente, los pacientes inmunodeprimidos afectados fallecen. La queratitis por *Acanthamoeba* es una infección invasiva de la córnea, que se caracteriza por una pérdida gradual de agudeza visual, llegando en algunos casos, a provocar ceguera. En este caso, las afecciones corneales no están asociadas a individuos inmunodeprimidos, sino principalmente, a usuarios de lentes de contacto.

Sin embargo no todas las queratitis por *Acanthamoeba* tienen lugar en usuarios de lentes de contacto. Entre el diez y el quince por ciento de los diagnósticos se realizan en pacientes que no las emplean. Normalmente, suelen estar asociados a una lesión ocular, normalmente con alguna materia vegetal o exposición a agua o tierra contaminada. La eficacia de diferentes desinfectantes empleados en las lentes de contacto ha sido estudiada en detalle en distintos estudios. Soluciones desinfectantes que contienen clorhexidina al 0.004 y 0.005 % son efectivas para la eliminación de trofozoítos, después de un tiempo de exposición que oscila entre una y cuatro horas, pero sin ningún efecto quisticida. (96,101,102,103)

A comienzos de los noventa, se comprobó la actividad *in vitro* que presentaba el desinfectante catiónico polihexametilenbiguanida (PHMB) para eliminar, tanto trofozoítos, como quistes de *Acanthamoeba*, de un gran número de cepas. Su actividad a bajas concentraciones (0.02 %) y al no presentar problemas de toxicidad, al contrario de lo que ocurría con otros tratamientos, hizo del PHMB, solo o combinado con propamidina, aplicado en los estadios iniciales de la infección, una terapia con buenos resultados que evitaba, en muchos casos, tener que recurrir a la cirugía. (96,104)

7. Objetivos

7.1. Objetivo general

Determinar la actividad antiparasitaria múltiple de alcaloides totales de corteza (CAT) de *Galipea longiflora* Krause Kallunki (evanta).

7.2. Objetivos específicos

Determinar el tiempo y porcentaje de transformación de promastigotes de LA, Lma y L.BTE-002 para la obtención de poblaciones estables de amastigotes axénicos.

Poner a punto el método colorimétrico XTT para la determinación de la IC₅₀ de CAT sobre 2 formas parasitaria de *Leishmania* (promastigotes - amastigotes axénicos) dentro del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (I.I.F.B).

Determinar la correlación que existe entre la absorbancia como producto de reducción del XTT frente a células vivas y conteo en cámara de Neubauer de promastigotes y amastigotes axénicos de *Leishmania*.

Determinar la actividad antiparasitaria de CAT sobre 2 formas parasitarias de *Leishmania* (promastigotes - amastigotes axénicos) mediante el método colorimétrico XTT.

Determinar la actividad antiparasitaria de CAT *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* sobre dos formas parasitarias de *Trypanosoma cruzi* (epimastigotes-tripomastigotes sanguíneos) mediante conteo óptico.

Determinar la actividad antiparasitaria de CAT *in vitro* sobre trofozoitos de *Plasmodium falciparum* (F32) mediante conteo óptico.

Determinar la actividad antiparasitaria de CAT *in vitro* sobre trofozoitos de 2 cepas de *Acanthamoeba castellani* (Neff) y *Acanthamoeba polyfaga* (MN7) mediante el método colorimétrico alamar blue.

8. Metodología

8.1. Aislamiento a partir de lesiones cutáneas en pacientes que cursan con leishmaniasis.

De 4 pacientes que acudieron a consulta externa del Hospital de Palos Blancos– Departamento parasitología-*Leishmania*-LaPaz-Bolivia se procedió al aislamiento de cepas mediante la técnica de aspiración previamente descrito por Cuba (105) ligeramente modificado, usando jeringa de 1ml con aguja de calibre 21G x 1 1/2 siendo él vehículo suero fisiológico estéril y una solución de antibióticos (gentamicina 100mg/mL-estreptomicina 5000µg/mL-Penicilina 5000 U/mL) en volumen de 0.3mL.

Previa y rigurosa asepsia para evitar los problemas de contaminación por microorganismos como bacterias y hongos, la superficie del área de trabajo fue limpiada con agua y jabón, se punzó suavemente dentro del margen no necrotizada de la úlcera, luego se aspiró, tanto aguja y jeringa fueron retiradas aplicando ligera presión hacia atrás, al mismo tiempo se gira suavemente la jeringa.

El material obtenido fue inoculado en tubos con medio Schneider (pH=6.8) suplementado con 10% de SBF y gentamicina (100mg/mL).

Las muestras obtenidas de 2 pacientes fueron inoculadas en el dorso de una de las patas posteriores de hamsters dorados (*Mesocricetus auratus*) provistos por el Bioterio del I.I.F.B con el fin de tener mayor éxito en el aislamiento, y evitar contaminaciones indeseables (106), los hamsters fueron puestos dentro del bioterio del I.I.F.B bajo ciclos de 12horas luz:12 horas oscuridad a una temperatura ambiente de 22°C, comida y agua *ad libitum*, a quienes se examinaron semanalmente.

8.2. Aislamiento de cepas nativas de *Tripanosoma cruzi* a partir de insecto vector (*Triatoma infestans*) como de modelo animal.(ratón swiss albino parasitado)

Para el aislamiento de cepas nativas de *Tripanosoma cruzi* se trabajaron con insectos vectores de esta enfermedad (*Triatomas infestans*-Vinchucas) utilizadas para xenodiagnóstico por el Instituto Nacional de Laboratorios de Salud- La Paz-Bolivia (INLASA) institución que facilito los insectos vectores.

Se trabajo en una cámara de seguridad biológica (Securiplus-PSM-ClasseII) donde se examinaron a los insectos vectores a quienes comprimiendo suavemente el abdomen se les extrajo sus heces las que se depositaron sobre cobre y portaobjetos para visualizar los tripomastigotes metacíclicos, bajo observación microscópica (Leits-Wetzlar-Type307-148.001) con aumento 40X.

A continuación los vectores que presentaban tripomastigotes metacíclicos en heces fueron sacrificados, se disecciono el abdomen y con ayuda de una pinza y tijeras se extrajo el intestino, el cual fue depositado en medio de cultivo bifásico NNN suplementado con medio LIT y 5% de SBF, finalmente fueron incubados a 26°C (Stufa-WTB-BINDER), todo el trabajo se realizo bajo estrictas medida de seguridad (guantes – lentes – mangas de látex para guardapolvos) y dentro de una cámara de seguridad biológica. Estos tubos de cultivo fueron examinados diariamente con la ayuda de una microscopio invertido (Axiovert 25-Zeiss), los cultivos donde existía desarrollo de las formas parasitarias (epimastigotes) se realizo inmediatamente el mantenimiento correspondiente a cajas de cultivo celular de 25cm² (NUNC) que contenía medio monofásico LIT suplementado con 5% de SBF e incubados a 26°C.

Para el aislamiento de cepas nativas de Chagas también se utilizo ratones swiss albinos infectados con heces de vectores positivos para Chagas que también fueron proporcionados por el INLASA, a estos animalitos se les realizo un corte en el extremo terminal de la cola con una tijera y la gota de sangre fue observada entre porta y cubreobjetos al microscopio (107), los ratones que presentaban las formas de tripomastigote

sanguíneos fueron sacrificados (cloroformo) a quienes inmediatamente se les extrajo sangre mediante punción cardiaca, muestra que fue inoculada en cajas de cultivo (NUNC) de 25cm² el cual contenía medio de LIT suplementado con 5% SBF, estas cajas de cultivo fueron examinados diariamente bajo un microscopio invertido. (108,109)

8.3. Amastigotes axénicos.

8.3.1. Preparación del medio M-199 modificado para amastigotes axénicos.

Se preparo el medio M199 para cultivo de amastigotes áxenicos previamente descrito por Sereno (110), para 250mL.

Se pesaron (Balanza-AND-HR-200) los siguientes compuestos (Tabla 5).

Tabla 5. Componentes del medio M199 modificado para amastigotes axénicos.

Medio 199	2.75g
TCS 0.5%	1.25g
Glucosa	0.67g
NaHCO ₃	87.5g
Hepes	1.48mL
L.Glutamina	2.5mL
Hemina ^(*)	0.7mL
Penicilina – Estreptomicina	3.25mL

^(*) Hemina en Na(OH) 1N (5mg/mL), la cual es añadida sobre la solución antes preparada.

Toda la solución fue filtrada con filtros millipore 0.2 μ m de diámetro (Filtros-Millipore-0,22 μ M) dentro una campana de seguridad biológica, teniendo una pH final de 5.7 y SBF al 20%, solución conservada a 4°C hasta su uso.

8.3.2. Transformación de promastigotes en amastigotes axénicos.

Las cepas de promastigotes usados para la transformación a amastigotes axénicos fueron LA gentilmente cedida por Dr. José Piñero y Dra Gabriela Cabrera-Serra del Instituto de Enfermedades Tropicales y Salud Publica de la Universidad de la Laguna España-Tenerife, Lma gentilmente cedida por Dra. Lucia Acevey del Laboratorio Mixto UMR 152 de la Universidad Paul Sabaties Toulouse III, y L.BTE-002 aislada de paciente con LC = frotis positivo por el I.I.F.B de la localidad de Palos Blancos, La Paz -Bolivia. Los cultivos fueron mantenidos a 26°C de temperatura en medio Schneider (Sigma aldrich,st Louis MO.,USA), pH 6.8 y suplementado con 10% con SBF (Sigma aldrich,st Louis MO,USA), previamente descritos por Gimenez,et.al. (111)

Una concentración de 6x10⁶ promastigotes/mL con 48 horas de incubación de cada una de las cepas en estudio fueron sembradas en frascos para cultivo celular de 25cm²(NUNC) con 3mL (33) de medio M-199 a pH final de 5.7 y suplementado con 20% SBF e incubados a 32°C (COMPACT CO₂ Series-5000) de temperatura durante 5 días.

Se tomaron muestras cada-24 horas de cada uno de los cultivos, las muestras fueron centrifugados a 1800rpm por 3 minutos, tomando una pequeña gota del sedimento se realizo un frotis sobre un portaobjetos, posteriormente se fijo la placa con metanol (96%) y se paso a realizar una tinción giemsa al 25%, las placas fueron secadas a temperatura ambiente, se realizo la observación microscópica (aumento 100X) usando aceite de inmersión. (33,35)

Se contaron todos los promastigotes transformados en amastigotes axénicos en 1.000 células, tomando como criterios de transformación la forma (redondeada- ovoide), retracción total del flagelo dentro del bolsillo flagelar del promastigotes, presencia de

megasomas o vacuolas citoplasmáticas, para luego aplicar la siguiente formula:

$$\text{Porcentaje de transformados} = \frac{\text{Promastigotes transformados}}{1.000 \text{ células}} \times 100$$

Se siguió el mismo proceso de transformación con una sola cepa de *Leishmania* Lma, cambiando el Medio M-199 al medio Schneider con pH final de 5.7, suplementado con SBF al 20% y temperatura de incubación de 32°C durante 5 días previamente descrito por Callahan. (43)

8.4. Puesta a punto del método colorimétrico XTT.

8.4.1. Preparación de soluciones XTT-PES y XTT-PMS.

Las soluciones fueron preparadas previo a su uso, se preparo una solución de XTT 1mg/mL disuelto en buffer fosfato salino pH 7.0 previamente descrito (111,112,113) el cual fue dividido en dos tubos e incubados durante 10 minutos a 37°C, al primer tubo se añadió PMS (Sigma-Aldrich) 0.06mg/mL suspendido en PBS pH 7.0, al segundo tubo se añadió PES (Sigma-Aldrich) 0.06mg/mL preparado de igual forma que el anterior.

8.4.2. Puesta a punto del método colorimétrico XTT sobre promastigotes de LA.

Para la realización de los ensayos se utilizo promastigotes de LA.

8.4.3. Selección de longitud de onda.

Se realizó un barrido espectrofotométrico (espectrofotómetro de doble haz Cintra 5) entre 400-550nm de longitud de onda con la finalidad de encontrar el máximo pico de absorbancia (114,115), se prepararon 8 tubos de ensayo con promastigotes a una concentración de 1×10^6 promastigotes/mL, los promastigotes fueron tomados de cultivo *in vitro* en medio Schneider pH 6.8 y 26°C y 10% SBF, estos fueron incubados en presencia de XTT-PES (4 tubos) y XTT-PMS (4 tubos) por 2-3-4 y 5 horas a las condiciones de cultivo antes descritas. Las lecturas en el espectrofotómetro se realizaron en celdas de cuarzo de 10mm.

8.4.4. Estudio de linealidad, tiempo optimo de incubación y población parasitaria de trabajo.

A partir de un cultivo *in vitro* de promastigotes en fase de crecimiento logarítmico de LA a una concentración de 12×10^6 promastigotes/mL se realizaron diluciones seriadas 1/2 abarcando concentraciones entre 1.2×10^7 hasta 9.4×10^4 promastigotes /mL, los cuales fueron distribuidos en placas de cultivo de 96 pozos (Nunc) por duplicado a tres repeticiones, a cada pozo se añadió por un lado 50µl de XTT-PES y por otro lado se añadió 50µl de XTT-PMS a las concentraciones previamente descritas, los tiempos de incubación fueron de 2,3,4,5,6 y 7 horas.

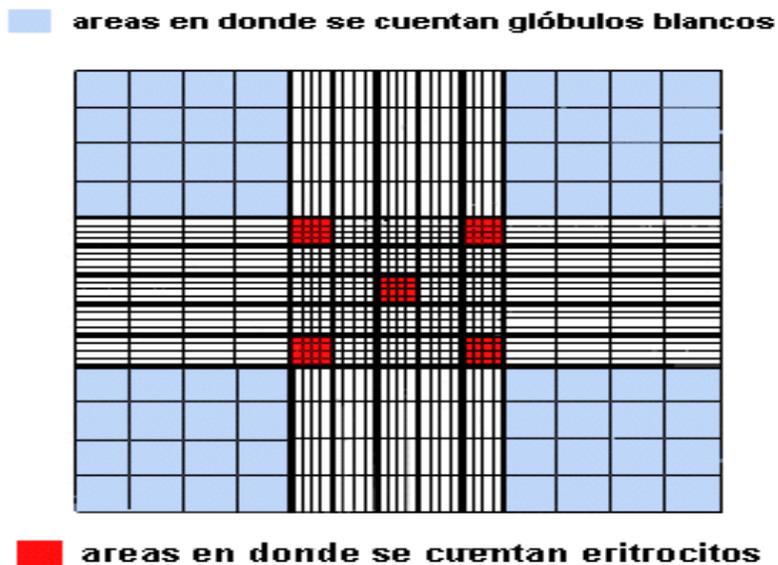
Las placas fueron leídas en un lector ELISA (Model 2100 series-Plate Reader) a 450nm.

A partir de los datos, se obtuvieron curvas de absorbancia en función a las concentraciones de parásitos, para los diferentes tiempos de incubación.(114,116)

8.4.5. Determinación de R^2 entre curvas de crecimiento obtenidos por conteo óptico en cámara de Neubauer y método colorimétrico (XTT-PMS).

Para conocer la R^2 entre el método por conteo de parásitos en cámara de Neubauer y la medición de absorbancias como producto de la reducción de XTT-PMS frente a células vivas (112,115), se realizó una curva de crecimiento partiendo de un cultivo *in vitro* de promastigotes de LA en fase de crecimiento logarítmico, el cual se centrifugó (centrifuga-CR3-JOVON) a 1.800rpm por 5 minutos y se resuspendió en medio Schneider pH 6.8 y 10% de SBF, incubados a 26°C, se realizó una dilución 1/10 con glutaraldehído 5% con la finalidad de realizar el conteo en cámara de Neubauer (retículo glóbulos rojos) (117,118) para ajustar la concentración a 1×10^6 parásitos /mL.

Figura 15. Retículo de conteo de parásitos en cámara de Neubauer.



Número **total** de células contadas en 5 cuadrantes x 10 x 50 x 1000 = **promastigotes /mL**

Donde:

10= Dilución realizada

50= Factor de la cámara de Neubauer, Área-Volumen (retículo glóbulos rojos)

1000= Factor para llevar de mm^3 a mL

Se distribuyó en frascos de cultivo celular (Nunc) siendo estos incubados durante 5 días. Se tomaron muestras diarias por cuadruplicado, 2 fueron fijadas con glutaraldehído al 5% para realizar el conteo de parásitos diariamente durante los 5 días en cámara de Neubauer, las otras 2 muestras fueron alicuotadas en una placa de 96 pozos y procesadas con 50 μ L XTT- PMS incubándose durante 4 horas, los valores de absorbancia fueron medidos en un lector ELISA-Modelo 2100 empleando una longitud de onda de 450nm, este procedimiento también se realizó durante los 5 días.

8.4.6. Puesta a punto del método colorimétrico XTT sobre amastigotes axénicos de Lma.

Para la realización de los ensayos se utilizó amastigotes axénicos de Lma.

8.4.7. Selección de longitud de onda.

Se emplearon las soluciones de XTT-PES y XTT-PMS anteriormente descritas, para la selección de la longitud de onda más adecuada para el ensayo con amastigotes axénicos.

En vista que el espectrofotómetro del I.I.F.B presentaba fallas (lámparas quemadas) se realizó el siguiente ensayo, a un tubo de cultivo de amastigotes axénicos de 48 horas de incubación se centrifugó a 1800 r.p.m durante 3 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 1mL de medio M199 (pH 5.7) fresco suplementado con 20% de SBF. Se realizó el conteo en cámara de Neubauer y se ajustó la población parasitaria a 1.5×10^6 parásitos/mL estos fueron distribuidos en placas de 96 pozos a los que fueron añadidos por separado y en duplicado las soluciones de XTT-PES y XTT-PMS en un volumen de 50 μ L por pozo.

Las placas fueron leídas en un lector ELISA (Model 2100 series-Plate Reader) a 492 y 450nm de longitudes de onda.

A partir de los datos, se obtuvieron curvas de absorbancia en función al tiempo de incubación (2-7 horas) para una misma concentración de amastigotes axénicos utilizada.

8.4.8. Estudio de linealidad, tiempo óptimo de incubación y población parasitaria de trabajo.

Para el estudio de linealidad, tiempos óptimos de incubación y la población parasitaria de trabajo se siguieron los mismos pasos anteriormente citados para linealidad de promastigotes de *Leishmania*, utilizando en este caso el medio M-199 (pH 5.7, SBF=20%, T=32°C) y la mezcla de XTT-PES que fue la que mejores resultados dio en el anterior ensayo. A partir de los datos, se obtuvieron curvas de absorbancia en función a las concentraciones de amastigotes axénicos, para los diferentes tiempos de incubación.

8.4.9. Determinación de R^2 entre curvas de crecimiento obtenida por conteo óptico en cámara de Neubauer y método colorimétrico (XTT-PES).

Para determinar la correlación entre curvas de crecimiento de amastigotes axénicos obtenidas por conteo en cámara de Neubauer y el método colorimétrico XTT-PES, se siguieron los mismos pasos que para los promastigotes de *Leishmania* anteriormente citados utilizando el medio M-199 (pH 5.7, SBF=20%, T=32°C) con lecturas a 450nm de longitud de onda. (110)

8.5. Preparación de CAT para evaluación biológica *in vitro* sobre promastigotes y amastigotes axénicos de *Leishmania*.

Se utilizaron 2mg (Balanza-AND-HR-200) de CAT facilitadas por el departamento de química de productos naturales del I.I.F.B disueltos en 200 µL de DMSO (GC-Sigma-

Aldrich) al 99.5% de concentración, luego se realizó una dilución 1/50 con medio Schneider o medio M-199 según se trabajaría con promastigotes o amastigotes axénicos, para tener una concentración de trabajo de 200µg/mL de CAT y 2% de concentración de DMSO aproximadamente, a partir de esta solución se realizaron diluciones 1/2 teniendo como soluciones de trabajo finales 100µg/mL, 50µg/mL, 25µg/mL, 12,5µg/mL, 6.25µg/mL de CAT en las placas de 96 pozos y 1% de DMSO.

8.5.1. Preparación del material biológico.

Se utilizaron promastigotes y amastigotes axénicos en fase de crecimiento logarítmico. (Tabla 6)

Tabla 6. Código, forma parasitaria de cepas de *Leishmania* utilizadas para la evaluación *in vitro* frente a CAT.

Promastigotes	L.PH8	L.690	Lma	LA	L.pp75	L.642	L.M2903	L.BTE-002
Amastigotes axénicos	Lma							

Se tomaron 20 µL de las cajas de cultivo (solución madre) y se depositó en 180 µL de glutaraldehído (dilución 1/10) al 5% para fijar los parásitos y poderlos contar en cámara de Neubauer (retículo glóbulos rojos) para luego ajustar la concentración a 1×10^6 parásitos/mL con medio Schneider (pH=6.8) con 10% SBF o M-199 (pH 5.7) y 20% SBF, y distribuirlos en placas de 96 pozos (Nunc) en un volumen de 100µL e incubarlos a 26°C y 32°C respectivamente. (111)

Cabe recalcar que antes de tomar la alícuota de 20 µL de cultivos de amastigotes axénicos se debe agitar de manera vigorosa para romper las rosetas que forman los amastigotes axénicos en cultivo *in vitro*.

A continuación se procedió a añadir las distintas concentraciones de CAT en volumen similar al de los parásitos, se diseñó un blanco para cada concentración de CAT (100µL medio Schneider o M-199 + 100µL de la concentración de CAT correspondiente).

Se realizó además un control de parásitos + DMSO al 1% (concentración no tóxica para los parásitos), para evaluar la viabilidad y un control de parásitos con la droga control (anfotericina B).

Las placas de 96 pozos fueron incubadas durante 72 horas a 26°C y 32°C de temperatura respectivamente.

8.5.2. Obtención de la IC₅₀ por el método óptico para promastigotes de *Leishmania*.

Al término de la incubación por 72 horas se realiza la lectura a través del microscopio de fase invertida. La actividad leishmanicida se mide por: porcentaje de lisis, mortalidad, disminución de la motilidad de los parásitos, cambios morfológicos evidentes y lisis de los parásitos obteniendo así un porcentaje de actividad. El valor de la IC₅₀ es calculado por una curva de actividad: porcentaje de inhibición frente al logaritmo de las diferentes concentraciones de la droga. (111)

8.5.3. Obtención de la IC₅₀ por el método colorimétrico XTT para promastigotes y amastigotes axénicos de *Leishmania*.

El análisis de datos fueron realizados en Microsoft Excel programa 2000 el cual ejecuto las siguientes operaciones, previamente descrito por Cornelly et.al. (112)

A: Cálculo del valor promedio de las absorbancias de las tres replicas de la muestra (CAT a diferentes concentraciones) frente a promastigotes, como el promedio de sus respectivos blancos y control (+). (Tabla 7)

Tabla 7. Absorbancias y valor promedio de las tres replicas de CAT, blancos y controles, lecturas a 4 horas de incubación con XTT-PMS.

			Absorbancias de promastigotes diluidos con alcaloides totales de corteza de evanta (CAT) a diferentes concentraciones ($\mu\text{g/mL}$)					Absorbancias de alcaloides totales de corteza de evanta a diferentes concentraciones ($\mu\text{g/mL}$)(blancos)				
	Control Medio (-) (blanco)	Control parásitos (+)	6,25	12,5	25	50	100	6,25	12,5	25	50	100
	0,398	2,283	2,284	2,171	1,102	0,628	0,515	0,391	0,396	0,372	0,423	0,398
	0,414	2,192	2,192	2,215	1,112	0,628	0,499	0,39	0,419	0,402	0,405	0,414
	0,414	2,192	2,193	2,215	1,112	0,628	0,499	0,39	0,419	0,402	0,405	0,414
X	0,409	2,222	2,223	2,2	1,109	0,628	0,504	0,39	0,411	0,392	0,411	0,409
SD	0,01	0,06	0,06	0,03	0,007	0	0,01	0,0007	0,02	0,02	0,01	0,01

A continuación se realiza la sustracción del valor de absorbancia de los blancos (Tabla 8) tanto al control positivo como a las diferentes concentraciones de CAT frente a los promastigotes.

Tabla 8. Absorbancias sin interferencias de blancos o medio de cultivo.

	Blanco de color	Absorbancia a 6,25 µg/mL	Absorbancia a 12,5 µg/mL	Absorbancia a 25 µg/mL	Absorbancia a 50 µg/mL
	1,89	1,89	1,78	0,73	0,21
	1,78	1,80	1,80	0,71	0,22
	1,78	1,80	1,80	0,71	0,22
Promedio	1,81	1,83	1,79	0,72	0,22
SD	0,06	0,05	0,01	0,01	0,01

Luego se realizo la conversión de las diferentes absorbancias (Tabla 9) a porcentaje de viabilidad de los parásitos, donde el 100% representa la absorbancia del control sin extracto, por ejemplo:

$$1.89 \times 100 / 1.89 = 100\% \text{ de viabilidad}$$

Tabla 9. Porcentaje de viabilidad de promastigotes de *Leishmania* frente a diferentes concentraciones de CAT.

	6,25µg/mL	12,2µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100µg/mL
	100	94	39	11	6
	101	101	40	13	5
	101	101	40	13	5
Promedio	101	99	40	12	5
SD	0	4	1	1	1

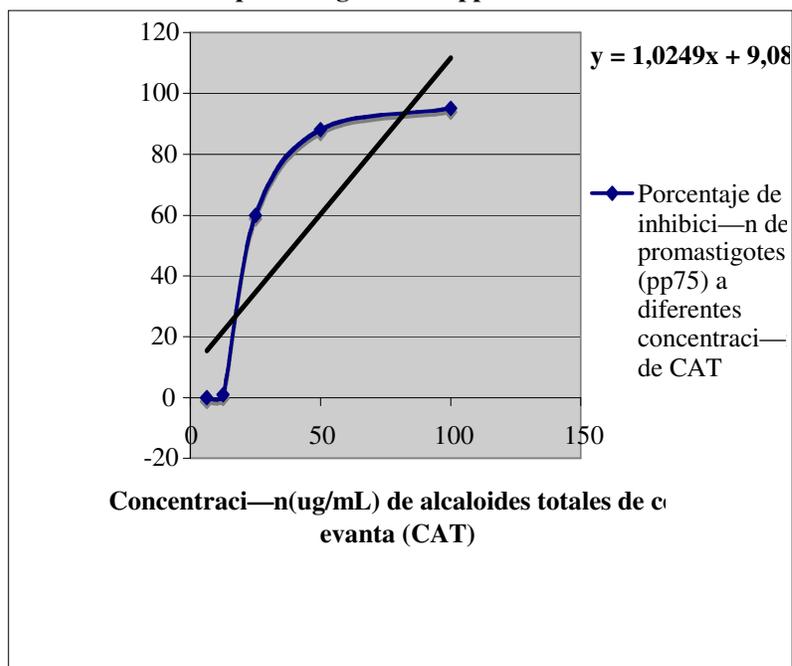
La conversión del porcentaje de viabilidad a su correspondiente valor de IC₅₀ se realizo por función de tendencia lineal que ajusta la recta calculada por el método de los mínimos cuadrados a los valores de las matrices Y= porcentaje de inhibición y X = concentración de la droga (CAT), devolviendo los valores de Y=50% de inhibición a su respectivo valor de X.

Tabla 10. Obtención de la IC₅₀ por tendencia lineal.

Concentración de CAT (μg/mL)	Porcentaje de inhibición	IC ₅₀
100	95	39,6
50	88	
25	60	
12,5	1	
6,25	0	

La IC₅₀ también puede ser calculada mediante el uso de la ecuación de la recta obtenida por la figura concentración de droga Vs. porcentaje de inhibición (Figura 16) :

Figura 16. Determinación de la IC₅₀ de CAT sobre promastigotes de L.pp75.



$y = 1,0249 x + 9,0833$
$50 = 1,0249 x + 9,0833$
$x = 39,9 \mu\text{g/mL}$

8.6. Preparación de CAT para evaluación biológica *in vitro* sobre epimastigotes de *Tripanosoma cruzi*.

Se siguieron los mismos pasos que para la evaluación de CAT sobre promastigotes de *Leishmania*, usando el medio LIT suplementado con 5% de SBF, pH 6.8 e incubados a 26°C durante 72 horas.

8.6.1. Preparación del material biológico.

Las cepas utilizadas para la evaluación *in vitro* fueron las siguientes: (Tabla 11)

Tabla 11. Epimastigotes de *Tripanosoma cruzi*, utilizadas para la evaluación *in vitro* frente a CAT. (códigos)

<i>T. cruzi</i> A117	<i>T. cruzi</i> R1	<i>T. cruzi</i> R2	<i>T. cruzi</i> 26	<i>T. cruzi</i> Pac. 1	<i>T. cruzi</i> Pac. 2	<i>T. cruzi</i> Y	<i>T. cruzi</i> Tulahuen
-------------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	---------------------------	---------------------------	----------------------	-----------------------------

8.6.2. Obtención de la IC₅₀ por el método óptico para epimastigotes de *Tripanosoma cruzi*.

Se siguieron los mismos pasos anteriormente citados para promastigotes de *Leishmania*.

8.7. Determinación de la actividad tripanocida *ex vivo* de CAT.

Formas tripomastigotes de *Tripanosoma cruzi* cepa Y, fueron mantenidas por pases semanales en ratones swiss albinos del bioterio del I.I.F.B los que permanecían bajo ciclos de 12horas luz:12 horas oscuridad a una temperatura ambiente de 22°C, comida y *agua ad libitum*.

La determinación de la actividad antiparasitaria de los CAT se realizo en sangre parasitada de ratón de 4 a 5 semanas de edad, obtenida a través de punción cardiaca (7 días post

infección) con jeringa (1mL) heparinizada, diluida en medio LIT a una concentración de parásitos de 3×10^5 - 4×10^5 tripomastigotes/mL. (111,119)

Número de tripomastigotes en 50 campos x Factor microscopio = Número de parásitos en 0.1mL de sangre

La sangre parasitada en un volumen de 50 μ L fue colocada en placas de 96 pozos por duplicado, a estos se les añadió CAT (50 μ L) previamente disueltos en DMSO con la dilución correspondiente en medio LIT para llegar a las concentraciones de trabajo (200-100-50-25-12,5 μ g/mL) como se realizo en la parte de promastigotes de *Leishmania*, las placas de 96 pozos fueron incubados a 4°C durante 24 horas en cámara húmeda.

La concentración final del DMSO no fue mayor del 1%. Después de las 24 horas de incubación, se tomo 5 μ L de cada pozo de cultivo previa homogenización (Agitateur Microbitration-86247) la cual fue puesta entre porta y cubreobjetos, obteniendo una fina y delgada capa de sangre la que fue examinada al microscopio (aumento 40X microscopio Dialux-20-Leits), el recuento de 50 campos se realizo de izquierda a derecha y viceversa evitando los extremos del cubreobjetos.

El violeta de genciana fue usada como droga control (100 a 400 μ g/mL). La actividad fue expresada por el porcentaje de reducción del número de parásitos (lisis) y la IC₅₀ (μ g/mL) previamente descrito por Giménez et al. (111)

8.8. Tratamiento profiláctico con jarabe de CAT al 2 y 5% en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*.

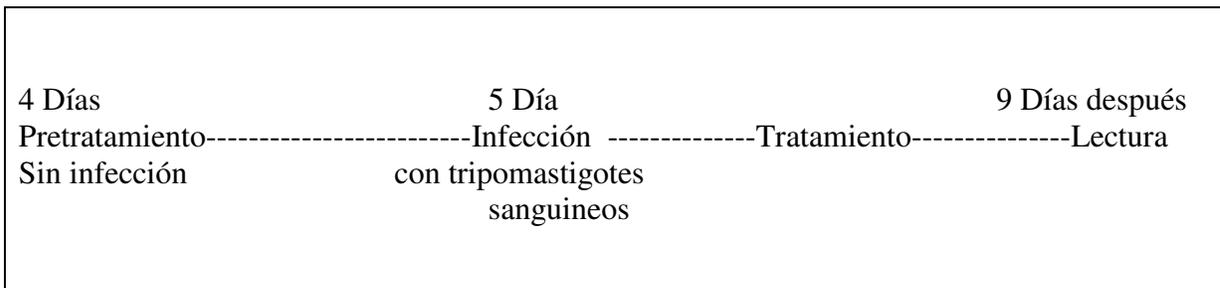
Se utilizaron ratones machos de la cepa swiss albino distribuidos en 4 grupos de 3 componentes cada uno, con un peso comprendido entre 18 (+/-2) gramos, a una temperatura de 21°C (+/-0.2) alimento y agua *ad limitum* dentro del biotério del I.I.F.B. Se aplico un tratamiento profiláctico de jarabe de CAT a 2 grupos, tratamiento que consistió en dar a los

ratones por vía oral y con la ayuda de una cánula de metal, 100 µL de jarabe de CAT al 2 % y 5% el cual fue preparado por el departamento de química de productos naturales del I.I.F.B., se administro 4 días antes de la infección de los ratones, el 5^{to} día se procedió a la infección vía intraperitoneal de los ratones con sangre parasitada con tripomastigotes sanguíneos a una concentración de 2×10^5 tripomastigotes sanguíneos/mL, obtenidos de ratones previamente infectados con la cepa Y de *Tripanosoma cruzi*. Posterior a la infección, se dio tratamiento por 5 días más.

Se uso como control positivo bezmidazol a 250mg/Kg (120), y control negativo ratones infectados a quienes se administró por vía oral solo el vehículo del jarabe.

Al día 6 post infección se tomo una muestra de 50uL de sangre de la cola del ratón (previo corte del extremo de la cola) la cual fue puesta entre cubre y porta objeto y se realizo la lectura correspondiente de tripomastigotes sanguíneos en un microscopio óptico (Leitez - Dialux -20), procedimiento realizado por triplicado. El cálculo de tripomastigotes sanguíneos es el mismo citado para el ensayo *ex vivo*.

Esquema de tratamiento profiláctico



8.9. Determinación de la sensibilidad *in vitro* de *Plasmodium falciparum*

8.9.1. Preparación de CAT.

Se prepararon soluciones madre de CAT disolviéndolo en DMSO a una concentración de 2mg/mL, a partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas de 10 –50 – 100 µg/mL, distribuidas de menor a mayor concentración por duplicado.

Se empleo difosfato de cloroquina (CQ) (Sigma, PM=516), como droga de referencia a partir de una solución madre de la cual se realizaron diluciones seriadas en concentraciones de 10 a 1000 nM, que fueron distribuidas por duplicado en la micro-placa de titulación en orden creciente.

De cultivos *in vitro* de *Plasmodium falciparum* F32 sensible a la cloroquina cultivado en medio RPMI-1640 suplementada con suero humano al 10% y un hematocrito de 4% obtenido por la adicción de 200µL de glóbulos rojos (ORH+) totales en 4,5mL de RPMI 1640 y 0.5mL de suero o plasma incubados a 37°C en un medio anaeróbico (candell) previamente descrito (83,121,122) se tomo un volumen de 100µL de glóbulos rojos con un hematocrito del 2 % (para esto se utiliza RPMI con suero o plasma al 20 %), además de una parasitemia del 1 % (los parásitos deben estar en estadio anillo en su mayoría, no se toman en cuenta los otros estadios), fueron colocados en placa de 96 pozos a estos se les añadieron las concentraciones seriales de CAT (dando un volumen final de 200 µL), la placa se incubó a 37°C por el lapso de 48 horas, al cabo de este tiempo se evaluó la actividad de los extractos por el método visual.

8.9.2. Obtención de la IC₅₀ por el método óptico para *Plasmodium falciparum*.

Luego que la placa de 96 alveólos fue incubada, se eliminó completamente la fase superior del cultivo, se hizo un frotis del sedimento de cada alveólo, fijando primeramente con metanol y realizando la tinción por 15 minutos con la solución de giemsa (al 20 % con PBS), posteriormente este se lavo con agua. Dejando secar a medio ambiente. Por último se observó en el microscopio, con lente de inmersión X 100, contando tanto glóbulos rojos no

infectados (GRL) como infectados (GRI), para así tener el porcentaje de inhibición, el cual se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inh} = \frac{(\text{GRL} - \text{GRI})}{\text{GRL}} \times 100$$

El cálculo para hallar la concentración inhibitoria del 50% en la maduración de los esquizontes (IC₅₀), se hizo por el método gráfico mediante el programa Cricket Graph 1,3.

Los resultados del IC₅₀ se interpreta de la siguiente manera:

Inactivo	>	50 µg/mL
Medianamente activo	<	25 µg/mL
Activo	<	10 µg/mL

Controles:

Cinchona officinalis	=	4,2µg/mL
Remijia Peruviana	=	7,4µg/mL
Patrón (Cloroquina)	=	0,02 µg/mL (34 nM)

8.10. Preparación de CAT para la evaluación biológica *in vitro* sobre trofozoitos de *Acanthamoeba*.

Se siguieron los mismos pasos que para la evaluación de CAT sobre promastigotes de *Leishmania* con la diferencia del uso medio PYG. (Tabla 12)

8.10.1. Preparación del medio PYG.

Se peso :

Tabla 12. Componentes del medio PYG.

Peptona(difco)	20g
Extracto de levadura	1g
Agua destilada	950mL
Se preparó y esterilizó cada uno de los componentes y se añadieron directamente al medio en el siguiente orden:	
MgSO ₄	0,4M 10mL
CaCl ₂	0,5M 20mL
Citrato sódico 2H ₂ O	0.5M 34mL
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ 6H ₂ O	0.0005M 10mL
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	0.25M 10mL
KH ₂ PO ₄	0.25M 10mL

Se ajusta el pH a 6.5, se autoclava 121°C 25 minutos y se añade 50mL de glucosa 2M esterilizada por filtración, previamente descrito por Morales J. (99)

8.10.2. Obtención de la IC₅₀ por el método colorimétrico alamar blue sobre trofozoitos de *Acanthamoeba*.

Las cepas de *Acanthamoeba* fueron sembradas por duplicado en placas de 96 pozos en un volumen de 50µL y una concentración de 8x10³ parásitos/mL, luego se dejó por un pequeño lapso de tiempo que las amebas se adhirieran a los pozos correspondientes, transcurrido este tiempo se procedió a añadir 50µL de las diluciones seriadas de CAT diluido en medio PYG para finalmente añadir el Alamar Blue ® (Biosource, Europe, Nivelles, Belgium) en cantidad del 10% del volumen final.

Fueron incubados por 120 horas a 28⁰C bajo agitación leve, se realizó la lectura luego de este tiempo de incubación por un lector de microplacas usando una longitud de onda de 570 y una longitud de onda de referencia de 630nm.

El porcentaje de inhibición y las concentraciones inhibitorias del 50% (IC₅₀), fueron calculados por análisis de regresión lineal. Todos los experimentos se realizaron tres veces y por duplicado.

El análisis estadístico que permitió el obtener las curvas de inhibición fue mediante el uso de Sigma Plot 0.9 (Systat Software Inc.).

9. Resultados y discusiones

9.1. Aislamiento a partir de lesiones cutáneas en pacientes que cursan con leishmaniasis.

Se observo al microscopio invertido (40X) los tubos de cultivo con medio Schneider, en el que se pudo comprobar la evolución de las formas promastigotes derivadas de sus respectivas formas intracelulares al 5^{to} día de cultivo de una de las 4 muestras tomadas. Pese a haber tenido los cuidados respectivos de limpieza de las lesiones, dos de los tubos de cultivo terminaron contaminadas con hongos, lo cual elimino la posibilidad de crecimiento del parásito. (123)

En uno de los tubos no se vio crecimiento de ningún microorganismo sin embargo cabe recalcar que las muestras presentaban algo de sangre del paciente lo cual es posible que perjudicaría al desarrollo del parásito por el contenido de proteínas séricas altamente inhibitorias para el crecimiento de promastigotes de *Leishmania*. (124)

Si bien es conocido que la técnica de inoculación en hámster dorados con el triturado de biopsias de las lesiones es la mejor y la más eficiente manera de aislar *Leishmania*, puesto que el animal limpia los contaminantes bacterianos y fúngicos de las muestra patológicas (105,125), en nuestro caso no fue así, es posible que con la técnica de aspirado de lesión que fue la que usamos no se obtenga la cantidad de formas intracelulares de *Leishmania* para desarrollar una lesión en el hámster (105) por lo que ninguno de los 2 hámster inoculados con aspirado de lesión desarrollaron la enfermedad hasta 5 semanas de observación.

9.2. Aislamiento de cepas nativas de *Tripanosoma cruzi* a partir de insecto vector (*Triatoma infestans*) como de modelo animal.(ratón swiss albino parasitado)

De 4 vectores a los que se realizo la disección del intestino, 2 desarrollaron la forma epimastigotes en medio bifásico NNN y las otras 2 terminaron contaminadas .

De los 5 hemocultivos que se realizo a 5 muestras de sangre de punción cardiaca de 5 ratones infectados con Chagas, se pudo evidenciar al 3 día de cultivo bajo observación en

microscopio invertido (40X) la evolución de las formas epimastigotes de sus respectivas formas tripomastigotes sanguíneos en 4 de los 5 hemocultivos realizados.

Se sabe que el inóculo y procedencia de tripomastigotes son factores importantes en el desarrollo de la infectividad en ratones (126), por lo que es posible que uno de los ratones de nuestro estudio no haya tenido una parasitemia e infectividad elevada, por lo que no existió un desarrollo de las formas epimastigotes en condiciones de cultivo *in vitro*.

9.3. Amastigotes axénicos.

9.3.1. Determinación del tiempo de transformación de promastigotes en amastigotes axénicos de LA-Lma y L.BTE-002.

El tiempo y porcentaje de transformación de las diferentes cepas de *Leishmania* en estudio se llevo a cabo en medio M199 (M0393-Sigma).

Una concentración de 100% de promastigotes en medio Schneider fue sujeto a cambios de temperatura de 26°C a 32°C, cambios de pH de 6.8 a 5.7, como también cambios en la concentración de SBF de 5% a 20%, obteniendo así un máximo de transformación del 93% al 4^{to} día de LA, seguido de Lma con 90% de transformados al 3^{ro} día y por último la L.BTE-002 con 88% de transformados al 4^{to} día. (Tabla 13)

Tabla 13. Condiciones de cultivos para transformar promastigotes en amastigotes axénicos utilizando el medio M-199.

Especie	Temperatura	pH	S.B.F.	Días de cultivo	Porcentaje de transformados
Lma	32°C	5.7	20%	3	90%
LA	32°C	5.7	20%	4	93%
L.BTE-002	32°C	5.7	20%	4	88%

A continuación se realizo la mantención correspondiente de las cepas en medio nuevo (M199) siendo la cepa Lma de las tres transformadas la única que se mantiene viable.

Con el fin de reducir costos ante el uso del medio M199 se transformo promastigotes de Lma usando solamente el medio Schneider (pH 5.7) y concentración de SBF al 20% y 32°C de temperatura (35), obteniendose amastigotes axénicos al 5^{to} día, sin embargo no se pudo mantener los amastigotes axénicos al pase correspondiente.

9.3.2. Transformación de promastigotes en amastigotes axénicos de LA, Lma y L.BTE-002.

La observación microscópica de los extendidos previa tinción giemsa mostró claramente la transformación de los promastigotes de *Leishmania* a formas clásicas ovales y piriformes de amastigotes axénicos (35,33), donde en el transcurso del tiempo (24-48-72-96h) se observa como el flagelo de los promastigotes se va retrayendo dentro de su bolsa flagelar, es así que al 3^{ro} o 4^{to} día se tenga formas parasitarias libres de flagelo.

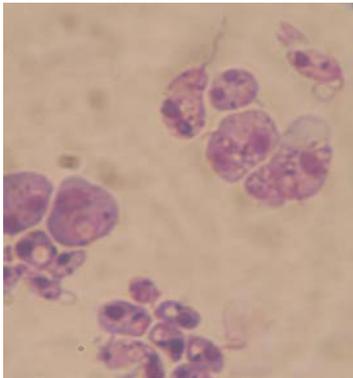
Se verificó el porcentaje de conversión bajo las condiciones mostradas en la Tabla 13 de promastigotes (Foto 1 - tinción giemsa 25% - 40X) en amastigotes axénicos bajo la observación microscópica de las tres cepas en estudio (Foto 2 al 11-tinción giemsa 25%-100X).

Promastigotes-LA
(Foto1)

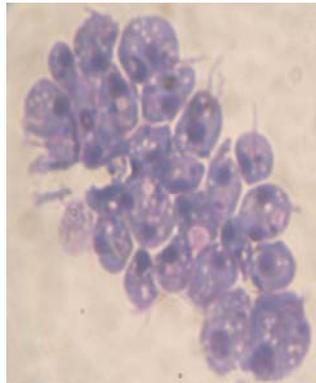


Amastigotes axénicos- LA

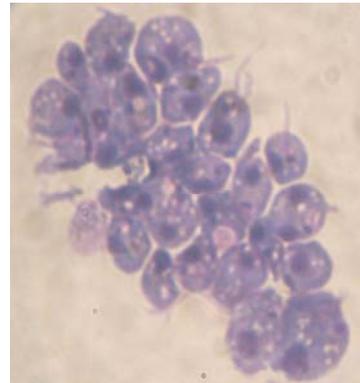
24 horas (Foto 2)
25% Transformados



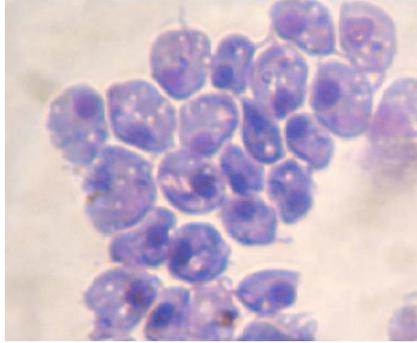
48 horas (Foto 3)
40% Transformados



72 horas (Foto 4)
54% Transformados

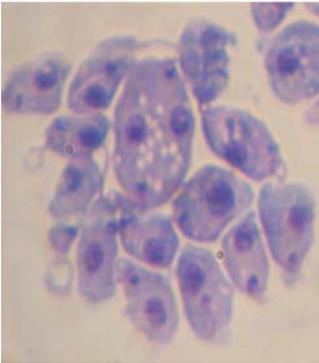


96 horas (Foto 5)
92.5% Transformados

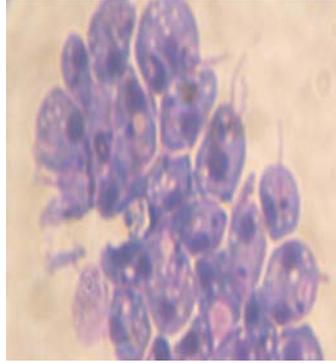


Amastigotes axénicos. L.BTE -002.

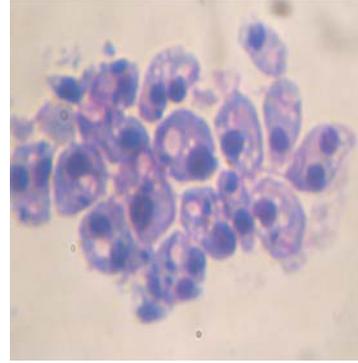
24 horas (Foto 6)
28.6% Transformados



72 horas (Foto 7)
63.9% Transformados

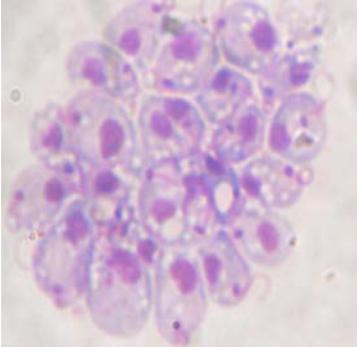


96 horas (Foto 8)
88% Transformados

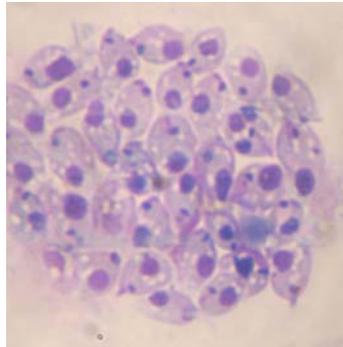


Amastigotes axénicos. Lma

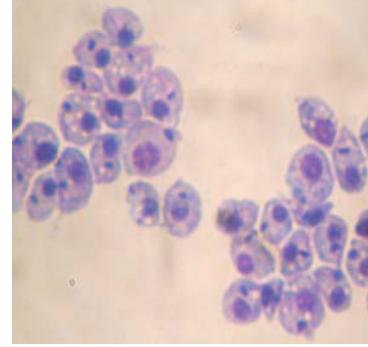
24 horas (Foto 9)
50% Transformados



48 horas (Foto 10)
80% Transformados



72 horas (Foto 11)
90% Transformados



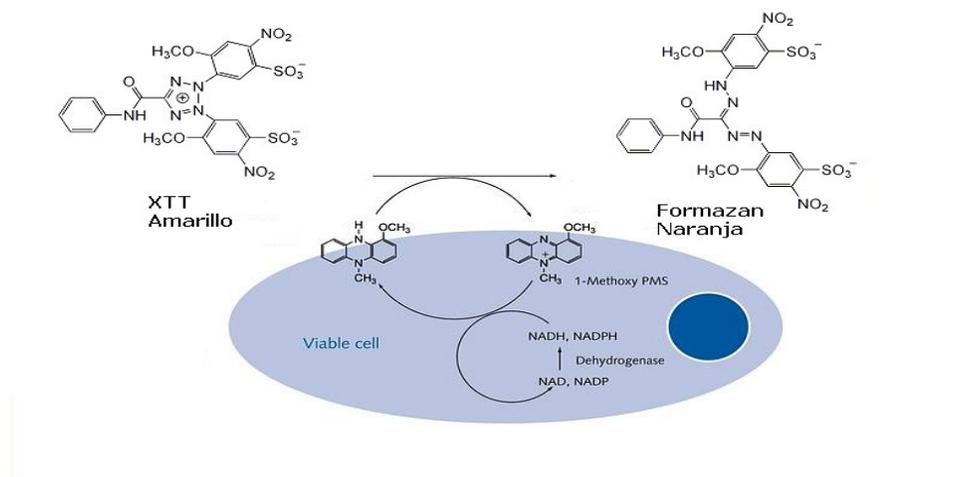
Estas formas parasitarias presentan megasomas (estructura como vesículas dentro del citoplasma) (37), donde según revisión bibliografía estas organelas y sus componentes sugieren que suelen implicar virulencia y patogenicidad de la especie de *Leishmania* que se estudia, estas estructuras son propias de esta forma parasitaria lo cual nos indica que estamos hablando de estructuras mucho mas cercanas a un amastigotes que se encuentra en una lesión que un promastigotes de cultivo *in vitro* (alfred a pan), se pudo evidenciar también que muchos de los amastigotes axénicos se encontraban en plena división por fisión binaria (Foto 6) puesto que se observo un par de núcleos como también un par de kinetoplastos dentro de una misma célula.(33)

9.4. Puesta a punto del método colorimétrico XTT sobre promastigotes de LA.

9.4.1. Selección de longitud de onda - Barrido espectral de 400nm-550nm.

Los métodos colorimétricos basados en la reducción de sodium-2,3- bis-[2-methoxy-4-nitro-5-⁶sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) por la actividad deshidrogenada de la mitocondrias de las células vivas, a sales de formazan, se han empleado con eficacia en análisis de la proliferación celular, como en estudios de productos naturales frente a *Leishmania*.(112) La forma reducida del XTT es una sal de formazan soluble en agua (color naranja), que evita la necesidad de la solubilidad, con solventes orgánicos como el caso del MTT. (Weislow et el al, 1989).

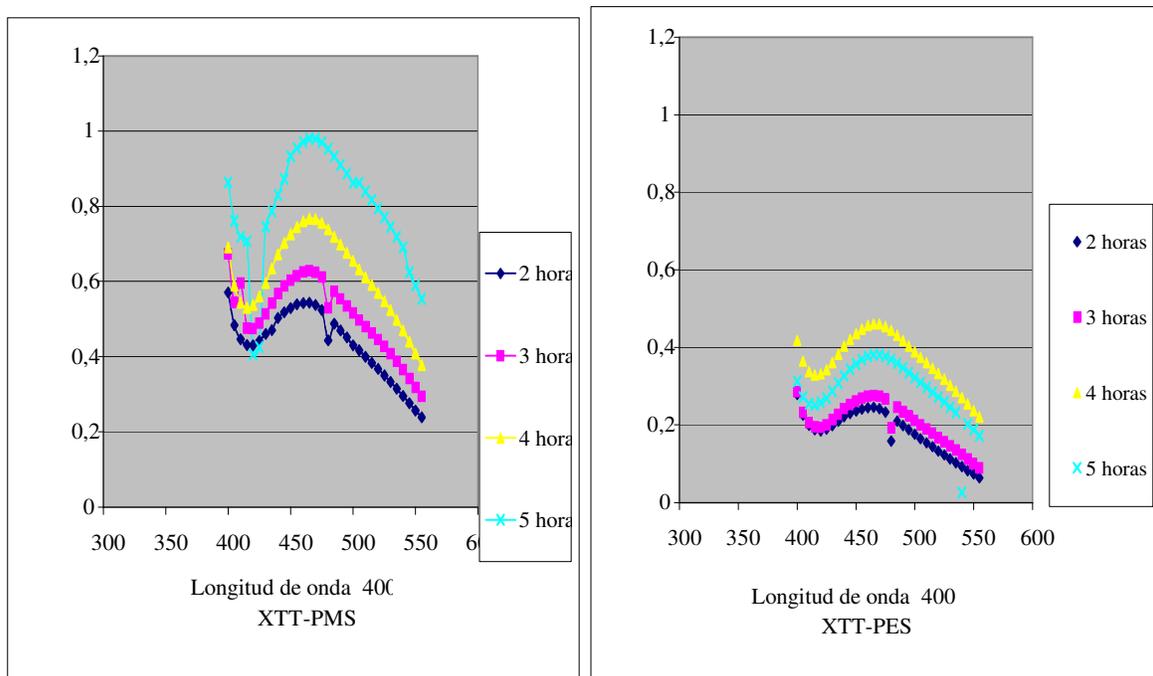
Figura 17. Transformación biológica de XTT a sales de Formazan



Una ventaja adicional de este método (XTT) es el período más corto de incubación como resultado de la adición del agente PMS (fenasin metosulfato) que es un acoplador de electrón que acelera la reducción del sustrato. (Buttke et al., 1999)

Dentro del I.I.F.B se cuenta con 2 acopladores de electrones, PMS y el PES, ambos usados en la determinación de la viabilidad celular, es así que para descartar y/o aceptar el uso de uno de ellos se realizó un barrido espectral entre 400-550nm de longitud de onda con una concentración de 1×10^6 promastigotes de LA con el fin de saber la longitud de onda óptima (máximo pico de absorbancia) para los ensayos colorimétricos posteriores, como también la combinación ideal de XTT-PMS o XTT-PES.

Figura 18. Barrido espectral de 400-550nm de longitud de onda sobre 1×10^6 promastigotes de LA con XTT-PMS (Izquierda) y XTT-PES (Derecha) a diferentes tiempos de incubación.



Se puede apreciar (Figura 18) que a medida que aumenta el tiempo de incubación aumenta la absorbancia para la mezclas XTT-PMS, sin embargo para la mezcla XTT-PES si bien aumenta la absorbancia hasta las 4 horas se observa que esta disminuye a las 5 horas de incubación mostrando así cierta inestabilidad con está mezcla a medida que transcurre el tiempo de incubación, se obtuvieron valores de absorbancia hasta 1 a las 5 horas de incubación con la mezcla XTT-PMS, y con la mezcla XTT-PES se tiene valores de

absorbancia de 0.38 a 5 horas de incubación, tomando en cuenta que son valores de absorbancia para una misma concentración parasitaria y que la formación de color (Formazan) por el XTT es directamente proporcional a la concentración de células vivas podemos asumir que la combinación XTT y el aceptor de electrones PMS es el más adecuado para los ensayos colorimétricos con promastigotes de *Leishmania*, por los valores de absorbancia que estos presentan, y la estabilidad que esta combinación presenta hasta las 5 horas de incubación.

Dentro del ensayo XTT-PMS sobre promastigotes de *Leishmania* se observa picos máximos de absorbancia entre 464-468nm de longitud de onda, teniendo en cuenta que estos valores de absorbancia son más cercanos al filtro de 450nm de longitud de onda que presenta el lector ELISA (Model 2100 series-Plate Reader) del I.I.F.B es que se utilizó esta longitud de onda en los posteriores ensayos colorimétricos.

9.4.2. Estudio de linealidad, tiempo óptimo de incubación y población parasitaria de trabajo.

Para determinar la linealidad del ensayo XTT-PMS fueron medidas las absorbancias de promastigotes de LA en concentraciones decrecientes ($1.2 \times 10^7 - 9.4 \times 10^4$) en placas de 96 pozos a diferentes tiempos de incubación (2-7 horas) y con lecturas a 450nm de longitud de onda, filtro más próximo a los picos de máxima absorbancia obtenidos en el ensayo previo. Como se puede observar en la Tabla 14 existe una respuesta lineal de la absorbancia al el incremento del número de parásitos a partir de una concentración de 3.7×10^5 promastigotes /mL para 5 horas de incubación y a partir de 9.4×10^4 promastigotes /mL para las 6 y 7 horas de incubación a 26°C. (114)

Tabla 14. Absorbancias de poblaciones parasitarias decrecientes (promastigotes-LA) a diferentes tiempos de incubación con lecturas a 450nm de longitud de onda con XTT-PMS.

P./mL Tiempo	$1,2 \times 10^7$	6×10^6	3×10^6	1.5×10^6	$7,5 \times 10^5$	$3,7 \times 10^5$	$1,9 \times 10^5$	$9,4 \times 10^4$
2horas	2,16±0,1	1,21±0,06	0,79±0,02	0,62±0,05	0,51±0,01	0,48±0,01	0,53±0,01	0,49±0,02
3horas	2,64±0,07	1,62±0,09	0,95±0,04	0,69±0,05	0,55±0,01	0,52±0,01	0,54±0,01	0,51±0,02
4horas	2,81±0,07	2,08±0,12	1,13±0,07	0,77±0,05	0,59±0,01	0,55±0,01	0,56±0,01	0,54±0,01
5horas	2,71±0,04	2,30±0,18	1,28±0,1	0,83±0,05	0,63±0,003	0,58±0,01	0,59±0,01	0,57±0,01
6horas	2,69±0,04	2,54±0,18	1,48±0,1	0,92±0,05	0,70±0,007	0,63±0,01	0,62±0,02	0,60±0,01
7horas	2,64±0,06	2,63±0,19	1,66±0,17	1,02±0,05	0,76±0,01	0,68±0,01	0,66±0,02	0,64±0,01

Podemos observar en la Figura 18 las poblaciones más adecuadas de trabajo para este método colorimétrico se encuentran entre 1.5×10^6 y 3×10^6 promastigotes/mL (127), ya que presentan coeficientes de correlación lineal (R^2) más cercanos a la unidad como muestra la Tabla 15, mostrándonos de esta forma una elevada probabilidad estadística de cumplirse esta regresión (absorbancia/horas de incubación para diferentes poblaciones parasitarias) y también porque por debajo de estas poblaciones la diferencia de absorbancias entre las distintas poblaciones es mínima.

Figura 19. Curvas de absorbancias con lecturas a 450nm (XTT-PMS) Vs. tiempo de incubación de LA a diferentes poblaciones parasitarias.

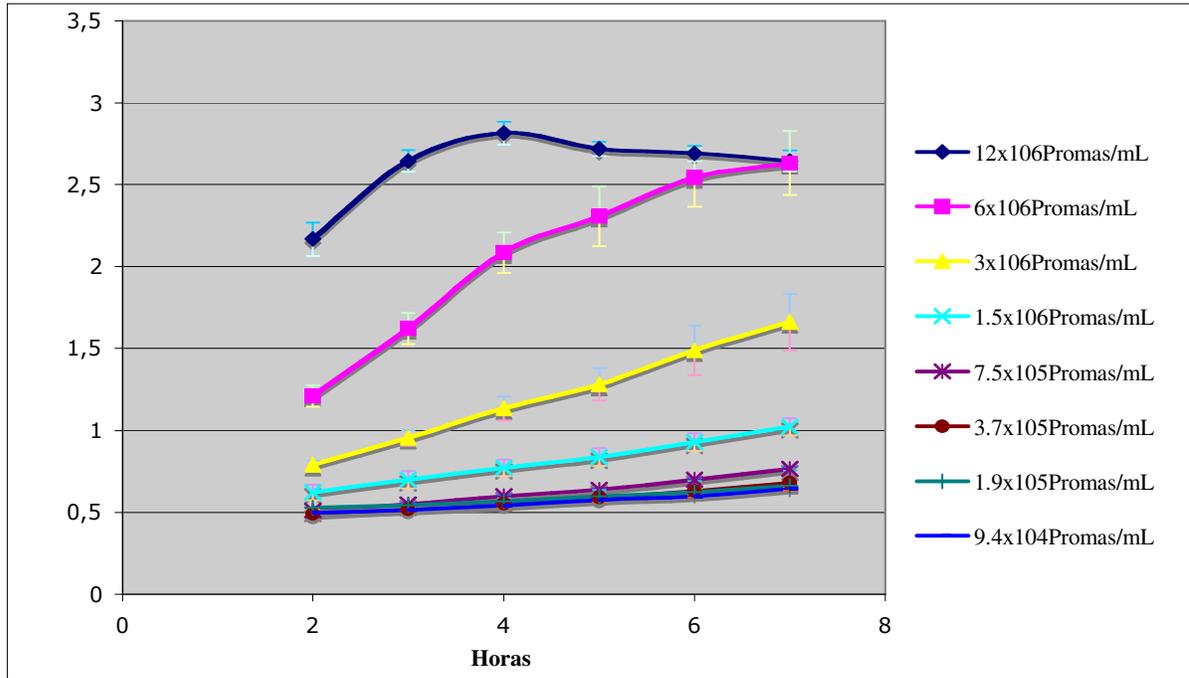


Tabla 15. R² para curvas de absorbancia Vs. tiempos de incubación para diferentes número de promastigotes de LA con XTT-PMS.

P. /mL	12x10 ⁶	6x10 ⁶	3x10 ⁶	1.5x10 ⁶	7.5x10 ⁵	3.7x10 ⁵	1.9x10 ⁵	9.4x10 ⁴
R ²	0.327	0.947	0.998	0.995	0.990	0.9928	0.9844	0.9831

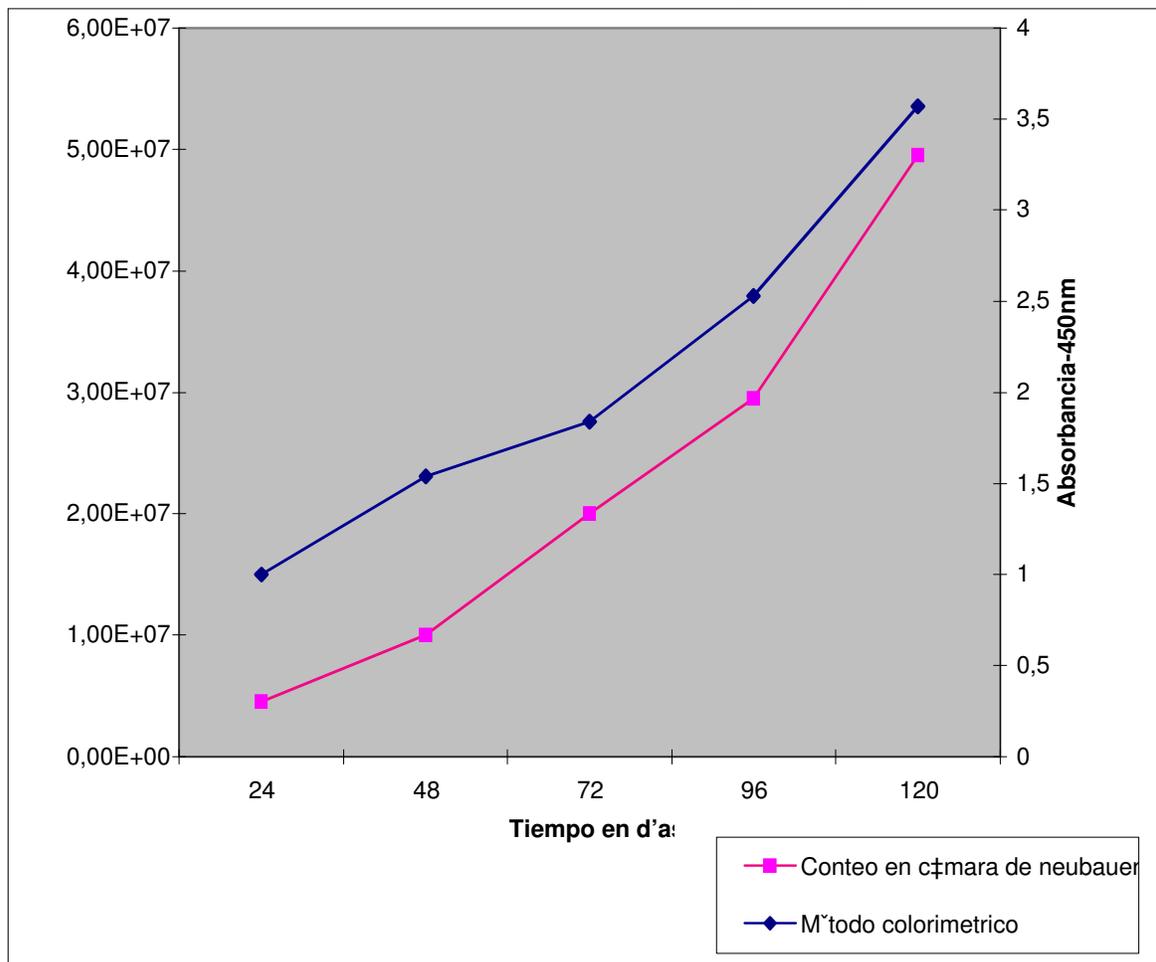
A su vez podemos observar en la Figura 19 que las medidas de absorbancia tienden a descender a partir de la 4 horas de incubación.

Por los resultados obtenidos sugerimos tiempos de incubación entre 2-4 horas, población de trabajo entre 1.5x10⁶ y 3x10⁶ promastigotes/mL.

9.4.3. Determinación de R^2 entre curvas de crecimiento obtenidos por conteo óptico en cámara de Neubauer y método colorimétrico XTT-PMS sobre promastigotes de LA.

Bajo las condiciones de trabajo anteriormente mencionadas se pudo observar (Figura 20) que existe una buena correlación ($R^2= 0,951$) entre el método clásico de conteo de parásitos (conteo en cámara de Neubauer) y la medición de absorbancias como producto de la reducción de XTT-PMS frente a células vivas, en relación a otras encontradas (bibliografía =0.965). (112)

Figura 20. Curva de crecimiento de promastigotes de LA en medio Schneider a 10% de SBF y 26°C, método colorimétrico (XTT-PMS: 450nm) y conteo óptico.



9.5. Puesta a punto del método colorimétrico XTT sobre amastigotes axénicos de Lma.

Con el fin de saber la longitud de onda optima para los ensayos colorimétricos con amastigotes axénicos (AA) se tomo una concentración de 1.5×10^6 AA/mL de cultivo *in vitro* los cuales fueron colocados en cajas de 96 pozos a los que se añadió XTT-PES como XTT-PMS y se realizo lecturas a diferentes tiempos de incubación a 2 diferentes longitudes de onda 450-492nm en un lector ELISA(Model 2100 series-Plate Reader), no se realizo un barrido espectral debido a fallas del equipo.(Figura 21- Tabla 16)

Figura 21. Curvas de Absorbancia de amastigotes axénicos de Lma a la misma concentración (1.5×10^6 parásitos/mL) y diferentes tiempos de incubación con XTT-PMS y XTT-PES a 492 y 450nm.

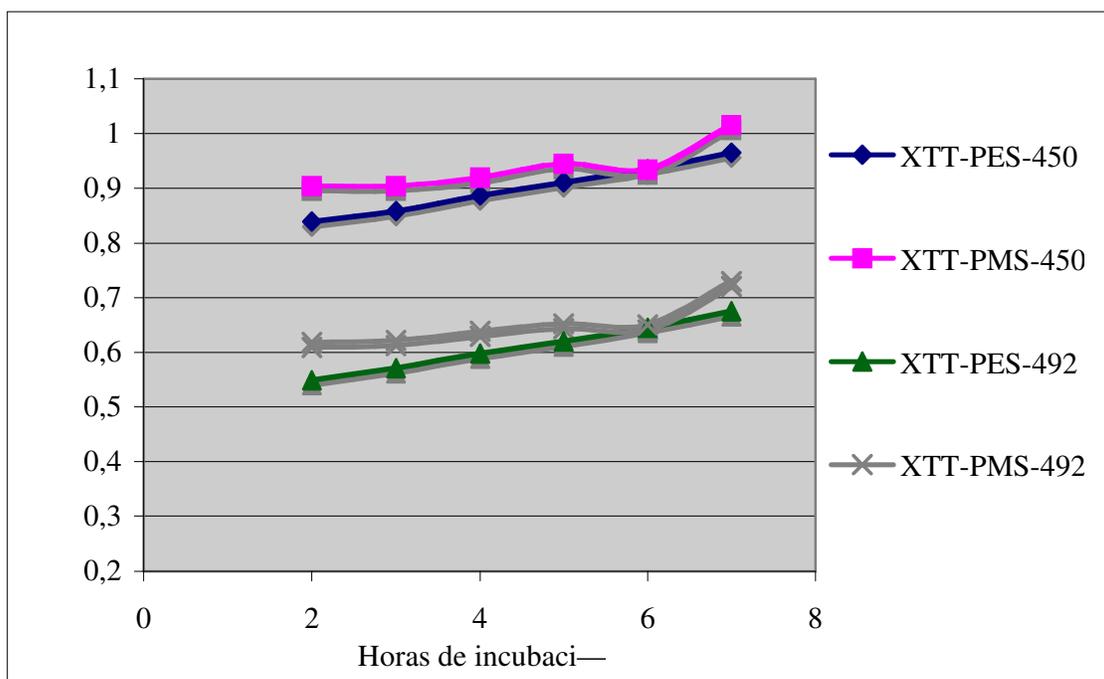


Tabla 16. R^2 para curvas de absorbancia para una misma concentración de amastigotes axénicos de Lma con mezclas de XTT-PES y XTT-PMS.

Absorbancias	XTT-PES a 450 nm	XTT-PMS a 450 nm	XTT-PES a 492 nm	XTT-PMS a 492 nm
R^2	0.9965	0.7386	0.9977	0.7459

Debido a que la formación de color (formazan) por el XTT es directamente proporcional a la concentración de células vivas podemos asumir que la mezcla con XTT-PMS y XTT-PES con lecturas a 450nm son las que presentan mejores absorbancias, absorbancias que llegan hasta 1, de estas dos mezclas, la mezcla de XTT-PES es la que presenta un coeficiente de correlación lineal ($R^2=0.9965$) más cercanos a la unidad, mostrándonos de esta manera una elevada probabilidad estadística de cumplirse esta regresión (absorbancia/tiempo de incubación), por los valores de absorbancia que estos presentan, y la estabilidad que se observa con esta combinación hasta las 7 horas de incubación se tomo en cuenta esta mezcla y longitud de onda para los posteriores ensayos.

9.5.1. Estudio de linealidad, tiempo óptimo de incubación y población parasitaria de trabajo.

Para determinar la linealidad del ensayo XTT-PES fueron medidas las absorbancias de amastigotes axénicos de Lma en concentraciones decrecientes desde 1.2×10^7 hasta 9.4×10^4 amastigotes axénicos/mL en placas de 96 pozos a diferentes tiempos de incubación (2-7 horas) y lecturas a 450nm de longitud de onda. Como se puede observar en la Tabla 17 existe una respuesta lineal de la absorbancia a 450nm de longitud de onda a el incremento del número de células.

Tabla 17. Absorbancias de poblaciones parasitarias decrecientes (amastigotes axénicos de Lma) a diferentes tiempos de incubación con lecturas a 450nm de longitud de onda con XTT-PES.

AA/mL \ Tiempo	$1,22 \times 10^7$	6×10^6	3×10^6	1.5×10^6	$7,5 \times 10^5$	$3,7 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$9,4 \times 10^4$
2horas	$1,57 \pm 0,04$	$1,13 \pm 0,019$	$0,94 \pm 0,007$	$0,84 \pm 0,006$	$0,80 \pm 0,005$	$0,79 \pm 0,01$	$0,78 \pm 0,008$	$0,78 \pm 0,003$
3horas	$1,73 \pm 0,03$	$1,22 \pm 0,02$	$1 \pm 0,009$	$0,85 \pm 0,005$	$0,82 \pm 0,007$	$0,81 \pm 0,01$	$0,80 \pm 0,01$	$0,79 \pm 0,003$
4horas	$2 \pm 0,034$	$1,30 \pm 0,03$	$1,03 \pm 0,006$	$0,89 \pm 0,006$	$0,83 \pm 0,006$	$0,82 \pm 0,02$	$0,82 \pm 0,01$	$0,80 \pm 0,004$
5horas	$2,02 \pm 0,03$	$1,4 \pm 0,04$	$1,08 \pm 0,006$	$0,91 \pm 0,004$	$0,85 \pm 0,005$	$0,83 \pm 0,03$	$0,81 \pm 0,008$	$0,81 \pm 0,005$
6horas	$2,24 \pm 0,04$	$1,50 \pm 0,04$	$1,14 \pm 0,01$	$0,93 \pm 0,004$	$0,86 \pm 0,009$	$0,83 \pm 0,03$	$0,83 \pm 0,01$	$0,83 \pm 0,007$
7horas	$2,4 \pm 0,05$	$1,6 \pm 0,05$	$1,2 \pm 0,01$	$1 \pm 0,005$	$0,9 \pm 0,009$	$0,85 \pm 0,03$	$0,84 \pm 0,008$	$0,84 \pm 0,004$

Podemos observar en la Figura 22 la población más adecuadas de trabajo con amastigotes axénicos que es de 3×10^6 AA/mL, ya que presenta coeficiente de correlación lineal (R^2) más cercanos a la unidad como muestra la Tabla 18, mostrándonos de esta forma una elevada probabilidad estadística de cumplirse esta regresión.(absorbancia/horas de incubación para diferentes poblaciones parasitarias) y también porque por debajo de esta población la diferencia de absorbancias entre las distintas poblaciones es mínima.

Figura 22. Curvas de absorbancias con lecturas a 450nm (XTT-PES) Vs. tiempos de incubación de amastigotes axénicos de Lma a diferentes poblaciones parasitarias.

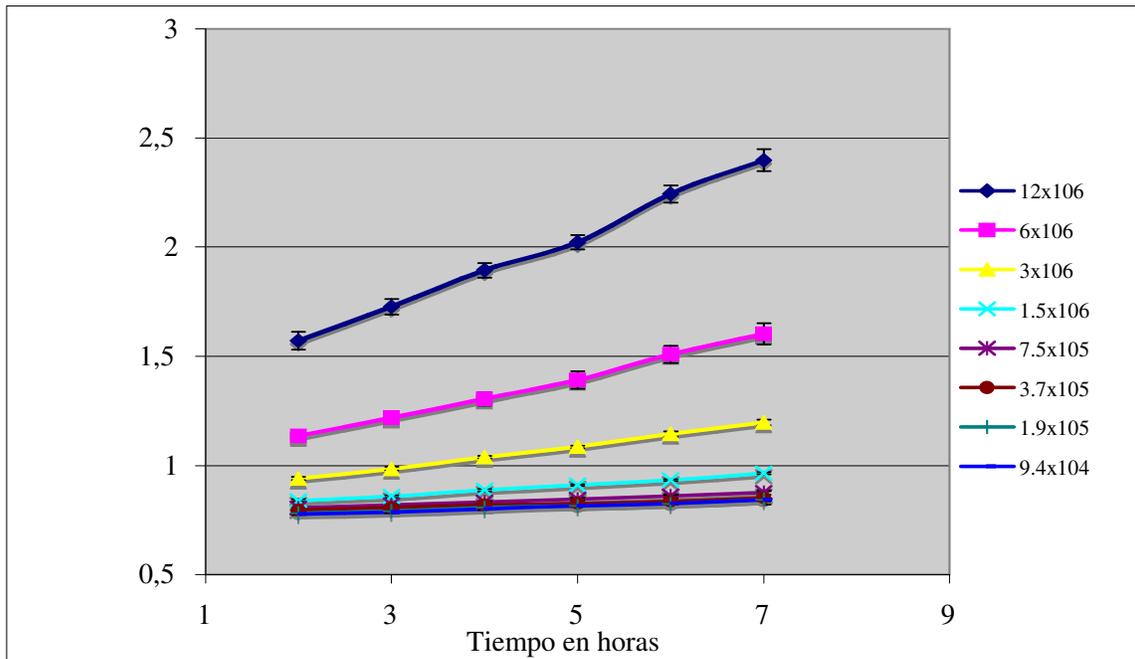


Tabla 18. R^2 para curvas de absorbancia Vs. tiempos de incubación para diferente número de amastigotes axénicos de Lma con XTT-PES.

AA/mL	12×10^6	6×10^6	3×10^6	1.5×10^6	7.5×10^5	3.7×10^5	1.9×10^5	9.4×10^4
R^2	0.9961	0.9967	0.9984	0.9965	0.9965	0.9877	0.9854	0.9923

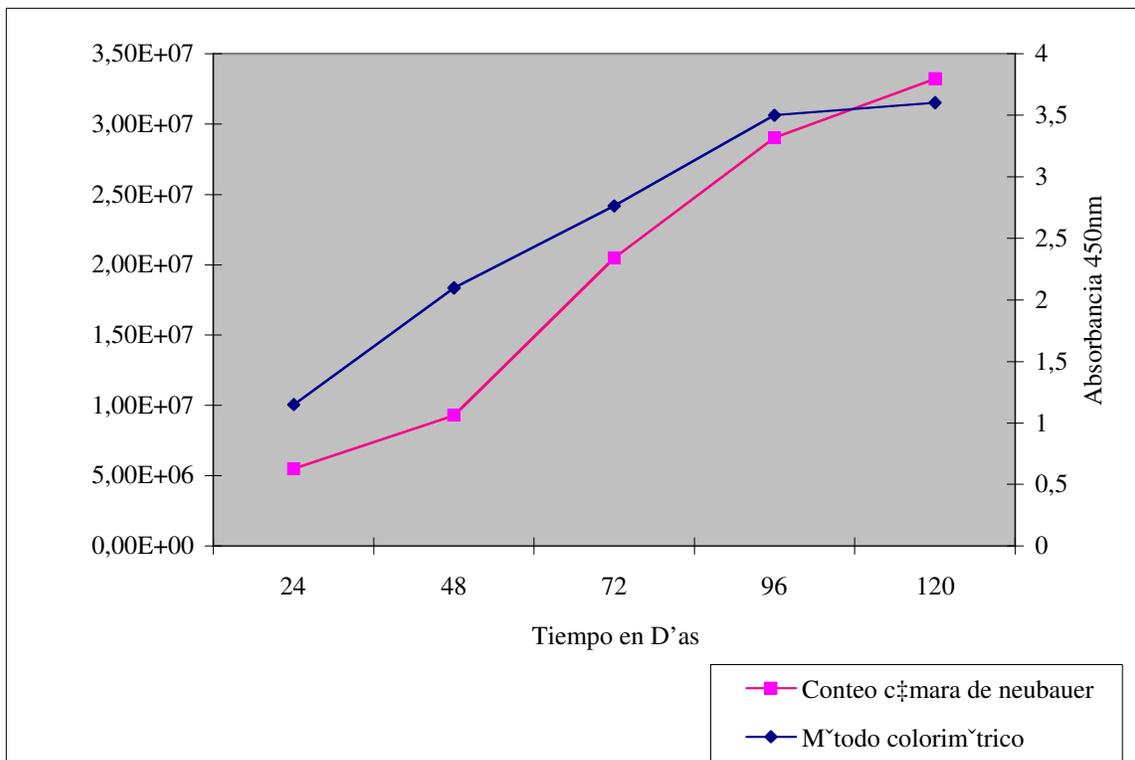
A su vez podemos observar en la figura 19 que las medidas de absorbancia tienden a descender a partir de la 5 horas de incubación.

Por los resultados obtenidos sugerimos tiempos de incubación entre 2 a 5 horas y una población de trabajo 3×10^6 amastigotes axénicos/mL.

9.5.2. Determinación de R^2 entre curvas de crecimiento obtenida por conteo óptico en cámara de Neubauer y método colorimétrico XTT-PES sobre amastigotes axénicos de Lma.

De igual forma que para los promastigotes, se determinó la correlación entre el método clásico de conteo de parásitos (conteo en cámara de Neubauer) y la medición de absorbancias como producto de la reducción de XTT-PES frente a amastigotes axénicos bajo las condiciones de tiempo y longitud de onda antes descrita. (Figura 23)

Figura 23. Curva de crecimiento de amastigotes axénicos de Lma en medio M199 con 20% SBF y 32°C, método colorimétrico (XTT-PES: 450nm) y conteo óptico.

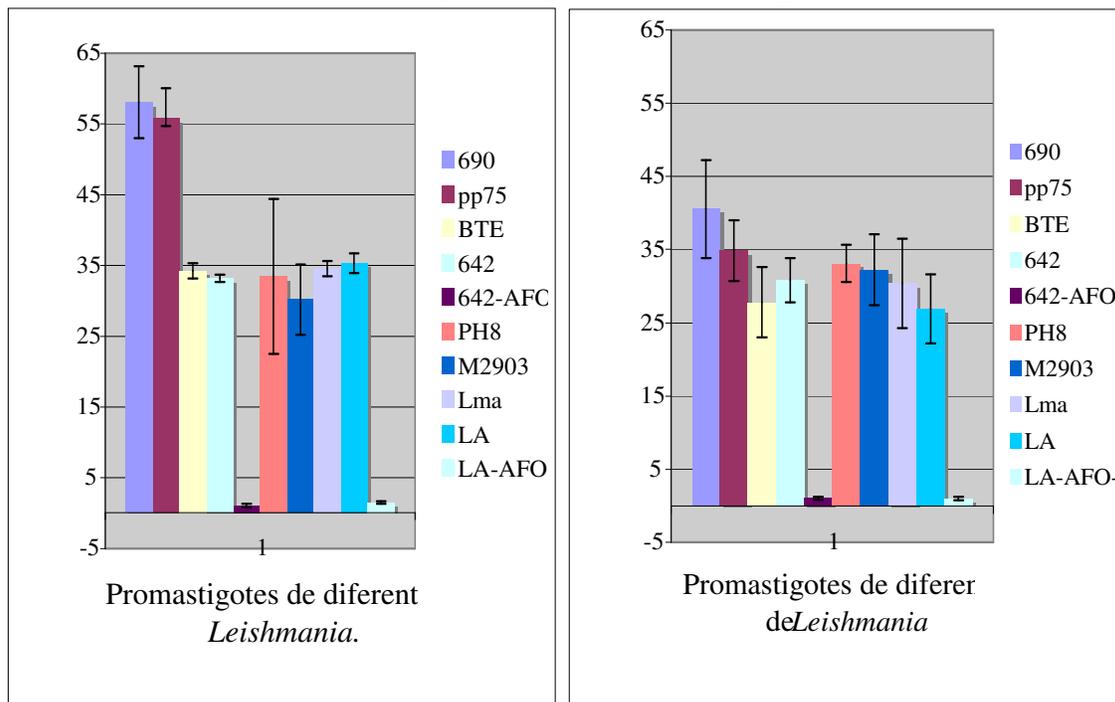


Donde se puede apreciar que existe una buena correlación ($R=0.952$) entre ambas metodologías de cuantificación de parásitos.

9.6. Determinación de la actividad antiparasitaria de CAT *in vitro* sobre dos formas parasitarias de *Leishmania* (promastigotes-amastigotes axénicos) mediante el método colorimétrico XTT.

Luego de poner a punto el método colorimétrico (XTT) y la obtención de los amastigotes axénicos, se procedió a la determinación de las IC₅₀ de CAT sobre promastigotes de diferentes cepas de *Leishmania* (Tabla 19) y amastigotes axénicos de Lma, cepa que se mantiene en condiciones de cultivo *in vitro*. Las IC₅₀ sobre promastigotes se determinaron a través de 2 métodos de cuantificación de parásitos como son el método colorimétrico (XTT-PMS) y el conteo con cámara de Neubauer (conteo óptico) mostrándonos a través de un análisis de t estudent que no existen diferencias significativas entre ambas metodologías con un p<0.05.(Figura 24) mostrando una vez más la eficacia del método colorimétrico frente a el método clásicamente usado como es el conteo óptico para la determinación de sustancias con posible actividad antiparasitaria. Por otro lado los valores de IC₅₀ de anfotericina B sobre Lpp75 obtenidos por este método colorimétrico son comparables a los valores obtenidos por otros métodos colorimétricos (MTT) frente a la misma cepa. (127)

Figura 24. Valores de IC₅₀ de CAT obtenidos a través del método colorimétrico (izquierda) y método óptico (derecha) sobre promastigotes de diferentes cepas de *Leishmania*.



Se pudo evidenciar (Tabla 19) que existe una actividad leishmanicida de CAT frente a todas las cepas de *Leishmania* ensayadas, reportadas con anterioridad por Fournet et.al (3) con $IC_{90}=50\mu\text{g/mL}$ a través de métodos ópticos, sin embargo cabe recalcar que el presente trabajo muestra esta actividad antiparasitaria a través de métodos cuantitativos y es el primer reporte de actividad antiparasitaria de esta especie vegetal sobre al menos una cepa nativa, circulante en nuestro medio.

Tabla 19. IC_{50} de CAT *in vitro* a través del método colorimétrico XTT-PES y XTT-PMS y el método óptico sobre promastigotes y amastigotes axénicos de diferentes cepas de *Leishmania* incubados a 26-32°C por 72 horas.

Códigos cepas de <i>Leishmania</i> .	$IC_{50}\mu\text{g/mL}$ Promastigotes Método Colorimétrico	$IC_{50}\mu\text{g/mL}$ Promastigotes Método óptico	$IC_{50} \mu\text{g/mL}$ Amastigotes axenicos- Método colorimétrico	$IC_{50} \mu\text{g/mL}$ Anfotericina B Método Colorimétrico	$IC_{50} \mu\text{g/mL}$ Anfotericina B Método óptico
L.PH8	33,1± 2,5	33,4 ± 10.9			
L.690	40,5 ± 6,7	58,0±5,0			
Lma.	30,3 ± 6,1	34,5±1,0	23,1 ±0,4	0,8	
LA	26,9 ± 4,6	35,3±1,3		1,0 ± 0,2	1,4 ±0,1
L.pp75	34,8 ± 4,1	55,7±4,2		1,0 ± 0,2	1,0 ±0,2
L.642	30,8 ± 3,0	33,2±0,5			
L.M2903.	32,2±4,8	30,2±4,9			
L.BTE-002.	27,8 ± 4,8	34,2±1,0		1,2 ± 0,2	

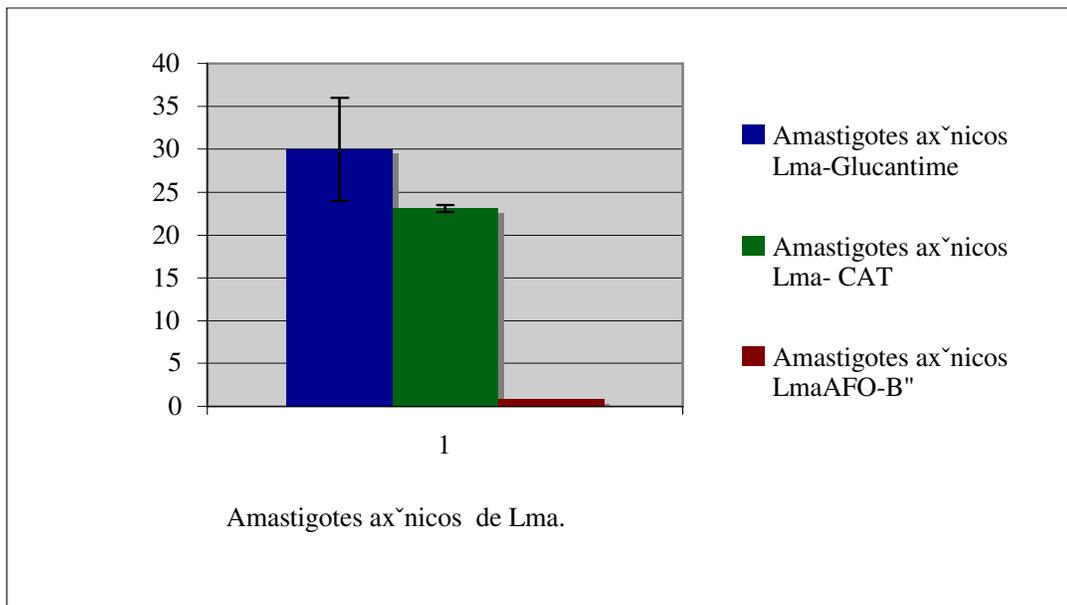
La cepa de L.690 es menos sensible a CAT presentando valores de IC_{50} de 40.5 ± 6.7 y la cepa de LA es la cepa más sensible a CAT presentando un IC_{50} de 26.9 ± 4.6 tomando en cuenta la IC_{50} de la pentamidina – droga de referencia (IC_{50} 10-60 $\mu\text{g/mL}$) de diferentes referencias bibliográficas. (128,129)

A su vez la cepa nativa L.BTE-002 que fue aislada por el I.I.F.B el 2006 presenta una IC_{50} de $27.8 \mu\text{g}/\text{mL} \pm 4.8$ sensible, frente a CAT, resultado muy alentador puesto que se encontraría dentro de las más sensibles al tratamiento con CAT.

Demostrando así la eficacia de este producto natural frente a promastigotes de al menos una cepa que circula en nuestro medio.

La determinación de la IC_{50} de CAT sobre amastigotes axénicos obtenidos a partir de promastigotes de Lma (Figura 25), muestra una actividad leishmanicida muy interesante sobre esta forma parasitaria con un IC_{50} de $23.1 \mu\text{g}/\text{mL} \pm 0.42$, siendo menor a la IC_{50} del glucantime, droga de primera línea para el tratamiento de la leishmaniasis en nuestro país, ensayada y reportada por Estevez.et al (130) sobre amastigotes axénicos cepa *Leishmania amazonensis* (Lma) con IC_{50} de $30 \pm 6 \mu\text{g}/\text{mL}$. Mostrando de esta manera que CAT podrían presentar una mejor actividad antiparasitaria frente a amastigotes que estarían presentes por ejemplo en un lesión ulcerada que son los responsables de la patología misma de esta enfermedad.

Figura 25. Valores de la IC_{50} de CAT obtenidos a través del método colorimétrico XTT-PES sobre amastigotes axénicos de Lma.



9.7. Determinación de la actividad antiparasitaria de CAT *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* sobre dos formas parasitarias de *Tripanosoma cruzi* (epimastigotes - tripomastigotes sanguíneos) mediante métodos ópticos.

Se determinó la actividad tripanocida *in vitro* de CAT sobre epimastigotes de 6 cepas nativas de *Tripanosoma cruzi* spp (A117,R1,R2,26,P1,P2) y dos de referencia (Y-Tulahuen), con valores de IC₅₀ entre 5.84 y 21.5 µg/mL como se puede observar Figura 26 en relación a la IC₅₀ encontrada en bibliografía del benzimidazol medicamento de referencia (3.25-7.4 µg/mL). (131,132,119)

Figura 26. Actividad tripanocida de CAT sobre diferentes cepas de *Tripanosoma cruzi* (epimastigotes).

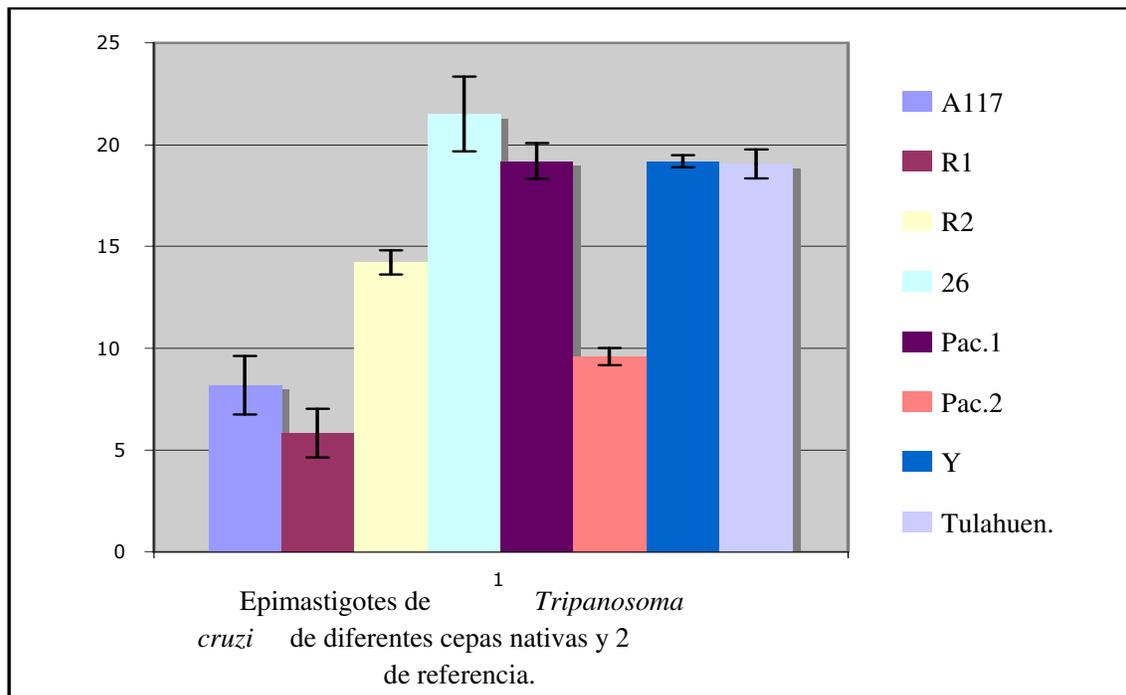


Tabla 20. IC₅₀ de CAT *in vitro* sobre epimastigotes de *Tripanosoma cruzi* incubado a 26°C por 72 horas.

Cepas	A117	R1	R2	26	Pac 1	Pac 2	Y	Tulahuen
IC ₅₀ (µg/mL)	8.2±1.4	5.8±1.2	14.2±0.5	21.5±2	19±0.8	9.6±0.4	19.2±0.3	19±0.7

Cabe recalcar que si bien se reporto la actividad *in vitro* de algunos compuestos de los alcaloides de *Galipea longiflora* por Fournet et.al (9) sobre epimastigotes de *Tripanosoma cruzi* (cepas de referencia) con IC₅₀ de 25-50µg/mL, el presente trabajo muestra los IC₅₀ de está especie vegetal sobre al menos 6 cepas circulantes en nuestro medio constituyendose así en el primer reporte de actividad tripanocida de esta especie vegetal sobre cepas circulantes. (Tabla 20)

Es importante resaltar que casi todas las cepas circulantes presentan IC₅₀ bajos en relación a los IC₅₀ encontrados con las cepas de referencia y muy próximos a los IC₅₀ encontrados con el benzimidazol medicamento usado en fase aguda de la enfermedad de Chagas.

Por los buenos resultados obtenidos *in vitro* (Tabla 20), se infectaron ratones swiss albinos en el bioterio del I.I.F.B con una cepa de *Tripanosoma cruzi* (Y) cepa que mejor resultados brinda para la infección de animales en laboratorio, luego se determino la actividad tripanocida *ex vivo*, mostrandonos que la IC₅₀ de 122,7µg/mL (+/-) 23,3 se encontraba cercano al obtenido por el colorante violeta de genciana IC₅₀ 100 µg/mL (133,119) (Tabla 21) quimioprolifatico usado dentro los bancos de sangre para tratar bolsas de sangre infectados con Chagas.

Figura 27. Actividad tripanocida de CAT *ex vivo* sobre tripomastigotes sanguíneos cepa Y.

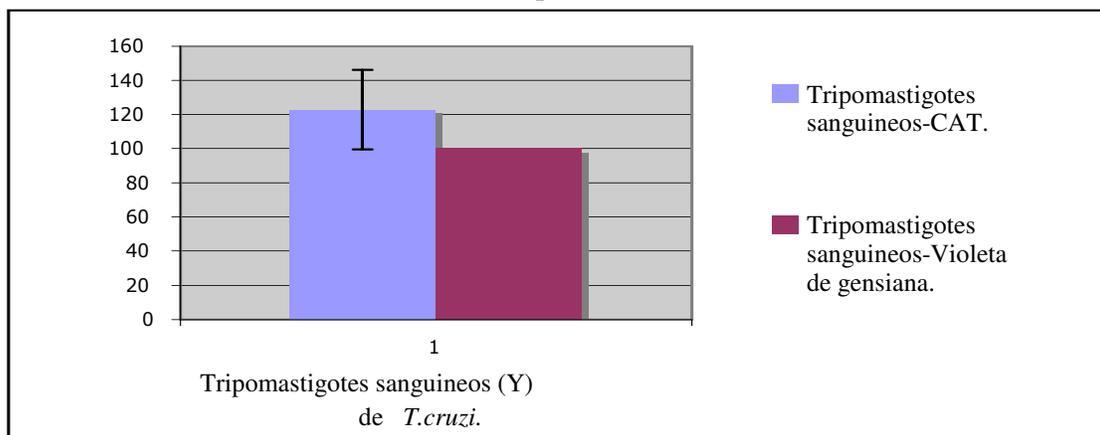


Tabla 21. IC₅₀ de CAT *ex vivo* sobre tripomastigotes sanguíneos de *Trypanosoma cruzi* incubado a 4°C por 24 horas.

<i>T. cruzi</i> -cepa Y	Y con CAT	Y con violeta de genciana
IC ₅₀ µg/mL	122.8± 23.4	100

En vista que los anteriores ensayos realizados *in vitro* sobre *epimastigotes* y *ex vivo* sobre tripomastigotes sanguíneos (Figura 27) de *trypanosoma cruzi* cepa Y, mostraron buenos resultados (IC₅₀) se pretendió evidenciar estos mismos bajo la realización de un ensayo *in vivo* profiláctico sobre ratones de la cepa swiss albino. Obteniéndose los siguientes resultados :

Figura 28. Tratamiento profiláctico con Jarabe de CAT al 2 y 5% en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*.

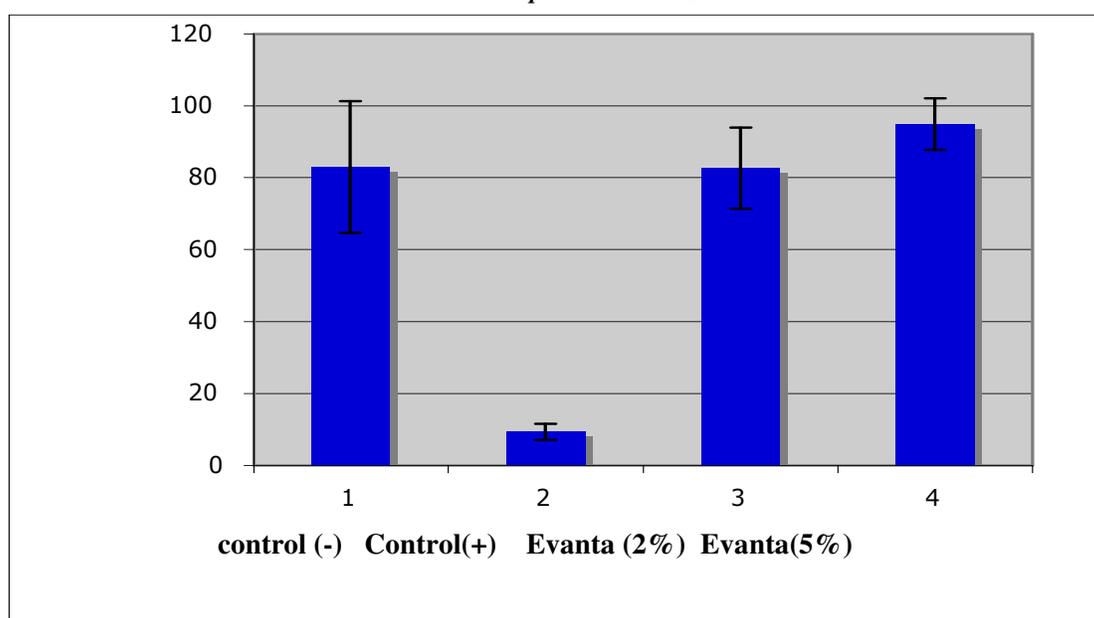


Tabla 22. Porcentaje de parasitemia en ratones tratados con jarabe de CAT al 2 y 5%.

Control negativo	Control bezmidazol	Jarabe 2%	Jarabe 5%
83% ± 18	9.3% ± 2.3	82.6% ± 11.3	95% ± 7

Donde se puede evidenciar claramente (Figura 28- Tabla 22) una elevada parasitemia tanto en el grupo tratado con 5% y 2 % de jarabe de CAT, correlacionando con el grupo tratado con benzimidazol, inclusive el grupo tratado con 5% de jarabe presenta una parasitemia elevada (95%+/-7) que el grupo de control negativo(83% ±18 de parasitemia).

Se pudo evidenciar también que los grupos tratados con jarabe de CAT (2% y 5%) presentaban un peso menor al finalizar el tratamiento en relación al los grupos control (datos no mostrados) es así que es probable que ante la no ingesta de alimentos asociado a una depresión de la capacidad de los animales infectados para montar una respuesta humoral normal (134), que se tenga una elevada parasitemia, como también puede deberse a que el jarabe no haya tenido las condiciones necesarias para que los alcaloides totales de corteza de evanta lleguen al torrente sanguíneo y así ejercer su actividad tripanocida claramente observada en los ensayos *in vitro* y *ex vivo*. Creemos que los estudios farmacocinéticos de los alcaloides de evanta son impresindibles .

Por otro lado este estudio nos demuestra que no siempre los resultados *in vitro* puedan extrapolarse a los estudios *in vivo* debido a que existen diferentes factores como ser la velocidad de llegada de la sustancia química que se este probando hacia la célula diana, las barreras biológicas que esta tenga que atravesar, etc.

9.8. Determinación de la actividad antiparasitaria de CAT *in vitro* sobre trofozoitos de *Plasmodium falciparum* mediante métodos ópticos.

Se determino la actividad *in vitro* de CAT sobre *plasmodium falciparum* cepa F32 (sensible a cloroquina) mostrando un IC₅₀ de 20µg/mL siendo esta aproximadamente 5 veces menos potente que los alcaloides totales de *Cinchona officinalis* IC₅₀ 4,2 µg/mL y tres veces menos potente que los extractos de *Remijia peruviana* IC₅₀=7.4µg/mL (Tabla 23) plantas tradicionales usadas por sus propiedades febrífugas y antipalúdicas por la presencia en ambas plantas de alcaloides en su corteza.

Sin embargo los alcaloides de corteza de evanta son catalogados como medianamente positivos según criterios de aceptación y rechazo para extractos de plantas dentro el I.I.F.B.

Figura 29. Actividad antiparasitaria *in vitro* de CAT frente a *Plasmodium falciparum* (F32).

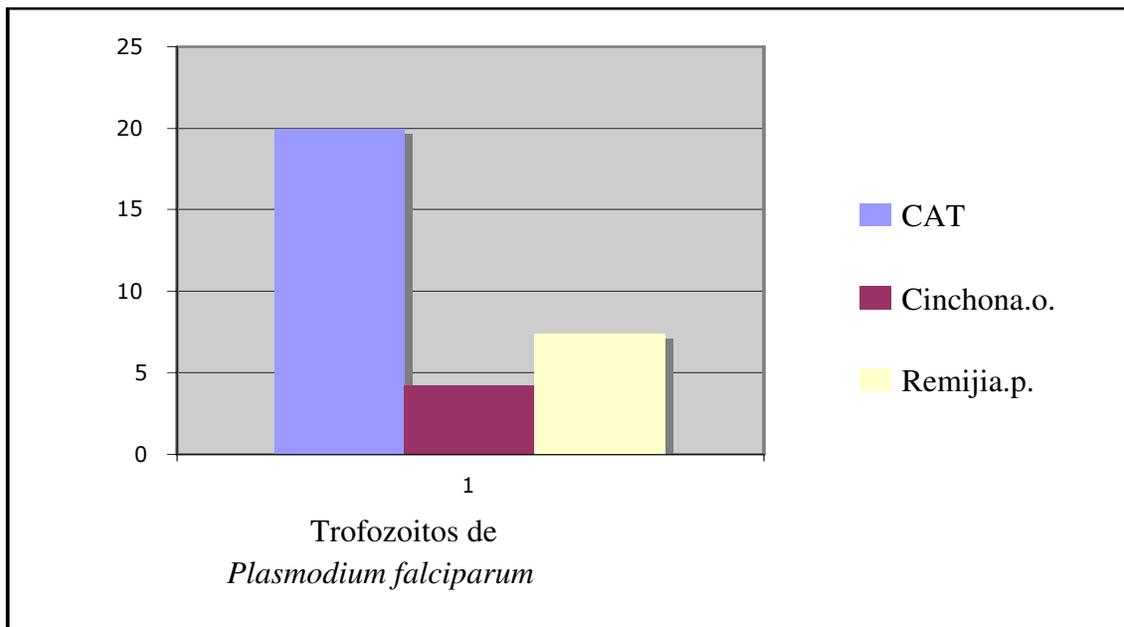


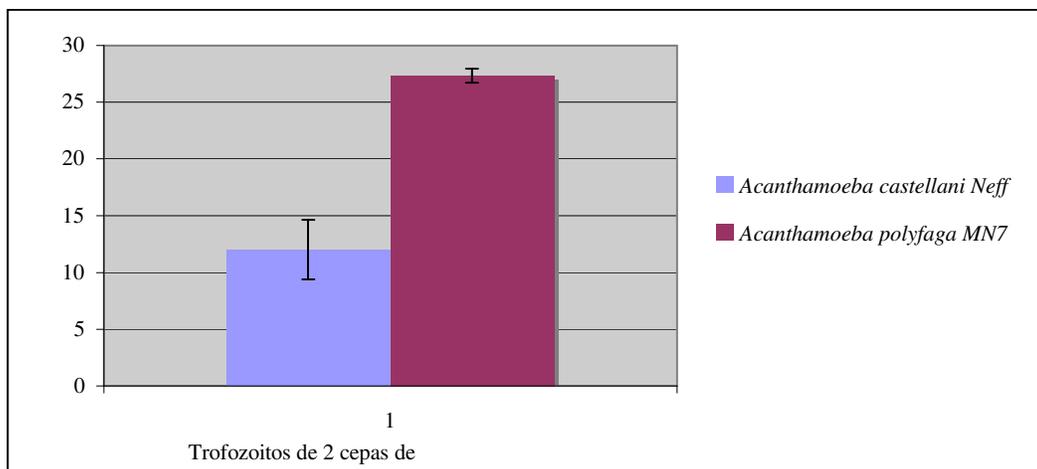
Tabla 23. IC₅₀ de CAT *in vitro* sobre trofozoitos de *Plasmodium falciparum* sensible a cloroquina (F32) -Método óptico incubados a 37°C por 48 horas.

Producto	Evanta (CAT)	<i>Cinchona officinalis</i>	<i>Remigia peruviana</i>	Cloroquina
IC ₅₀	20 µg/mL	4,2 µg/mL	7.4 µg/mL	0.02 µg/mL

9.9. Determinación de la actividad antiparasitaria de CAT *in vitro* sobre trofozoitos de dos cepas de *Acanthamoeba (castellani-polyfaga)* mediante el método colorimétrico Alamar Blue.

La queratitis por *Acanthamoeba* spp es una afección poco frecuente pero potencialmente grave, las actuales medidas terapéuticas para la queratitis consiste el uso tópico de un conjunto de antimicrobianos , sin embargo estos tratamientos no son eficaces contra etapas enquistadas del protozoario, en los últimos años se viene realizando estudios de actividad antiparasitaria de alquilfosfolipidos que fueron inicialmente diseñados como anticancerígenos que a su vez mostraron una excelente actividad antiparasitaria sobre promastigotes de *Leishmania* (136) como también frente a trofozoitos de *Acanthamoeba* (135) Es así que los resultados mostrados por CAT son relevantemente buenos en relación a los rangos de inhibición de la polihexametilenbiguanida-PHMB (0.49-3.9µg/mL) y la clorhexidina (0.49-1.9µg/mL) antisépticos tópicos más eficaces utilizados en queratitis por *Acanthamoeba* reportados por Elder et.al.(104), mostrando también una estrecha relación a los IC₅₀ de Miltefosina reportados en estudios previos por McBride et.al.(137,138) como el más prometedor derivado fosfolipidico para el tratamiento de Acanthamoebiasis ensayado sobre las mismas especies de *Acanthamoebas*, mostrando IC₅₀ de 2.38 y 9.52 µg/mL frente a *A.Castellani* y *A polyfaga* repectivamente, coincidiendo estos resultados a la sensibilidad que presenta *A castellani* a CAT en relación a *A.polyfaga*.

Figura 30. Actividad antiparasitaria *in vitro* de CAT frente a *Acanthamoeba (castellani-polyfaga)*. Alamar Blue.



**Tabla 24. IC₅₀ de CAT *in vitro* sobre trofozoitos de 2 cepas de *Acanthamoeba*
Método colorimétrico Alamar Blue incubados a 28°C por 120 horas.**

Cepa	<i>Acanthamoeba castellani</i> Neff	<i>Acanthamoeba polyfaga</i> MN7
IC ₅₀ µg/mL	12.01±2,6	27.34±0,6

Es conocido el uso tradicional de esta especie vegetal por las etnias Tacanas, Mosetenes y Chimanes de Bolivia, quienes recomiendan usar pedazos de corteza molida de Evanta sancochada en tres litro de agua en casos de diarrea con sangre (2), es así y debido a que *Acanthamoeba* pertenece al mismo Orden Amoebida en el cual se encuentra *Entamoeba histolytica* que es la responsable de una serie de diarreas en nuestro país (139), que el presente trabajo muestra de una forma científica la validación de los usos tradicionales de esta planta (Evanta) como amebicida.

10. Conclusiones.

Se obtuvo poblaciones estables de amastigotes axénicos *in vitro*, a partir de promastigotes de Lma a una temperatura de 32⁰C, pH 5.7 y concentraciones finales de SBF al 20%, evidenciando esta transformación bajo la observación microscópica (100X-tinción giemsa) las características peculiares de esta forma parasitaria como son: la forma (redonda - piriforme), retracción del flagelo de los promastigotes dentro del bolsillo flagelar a medida que transcurría el tiempo de incubación (24-72Horas), como también la presencia de vesículas citoplasmáticas, organelas casi exclusivas de esta forma parasitaria, demostrando así que nos encontramos frente a células con características estructurales muy similares al de los amastigotes que se encuentran en lesiones del huésped vertebrado (ulceras) y que son los que producen en última instancia la enfermedad de la *Leishmania*, teniendo de esta manera formas celulares *in vitro* ideales para el trabajo en la investigación de agentes con posible actividad antiparasitaria.

Se puso a punto el método colorimétrico XTT bajo las condiciones de trabajo del laboratorio frente a promastigotes y amastigotes axénicos de *Leishmania* determinando el uso de un acoplador de electrones que acelera la reducción del sustrato (PMS-PES) más adecuado para la forma parasitaria que se trate (promastigotes – amastigotes axénicos). Como también se determinó la longitud de onda y tiempo de incubación óptimos para los ensayos colorimétricos, como las poblaciones ideales de trabajo para este tipo de ensayo, es así y bajo esas condiciones que se pudo evidenciar bajo un ensayo de cinética de crecimiento que existe correlación fuerte entre el método clásico de conteo de parásitos (conteo en cámara de Neubauer) y la medición de absorbancias como producto de la reducción de XTT frente a promastigotes ($R^2=0,9765$) y amastigotes axénicos ($R^2=0.9704$) en relación a otras encontradas (112) ($R^2 =0.965$), contando de esta forma con una técnica colorimétrica rápida, menos laboriosa que el conteo en cámara de Neubauer y cuantitativa, brindando así apoyo a estudios encaminados a utilizar esta técnica colorimétrica como herramienta de investigación y obtención de IC₅₀ de posibles agentes antiparasitarios de origen natural, sintético y semisintético.

Se evidencio mediante el método colorimétrico (XTT-PMS) la actividad antiparasitaria de CAT frente a todas las cepas de *Leishmania* mantenidas en el cepario del I.I.F.B con rangos de IC₅₀ que van desde 26.9µg/mL hasta 40.53µg/mL.

A su vez cave recalcar que CAT presentan buena actividad antiparasitaria sobre promastigotes de una cepa nativa L.BTE-002 aislada por el I.I.F.B con un IC₅₀ de 27.82 µg/mL± 4.82, demostrando de esta manera la eficacia de CAT sobre al menos una cepa circulante en nuestro medio, constituyendose así el primer reporte de está actividad sobre al menos una cepa circulante de *Leishmania* en nuestro país, apoyando también así los estudios clínicos fase II que se vienen desarrollando en la localidad de Palos Blancos (La Paz-Bolivia) con pomada de alcaloides totales de Evanta.

La actividad antiparasitaria de CAT sobre amastigotes axénicos presenta un IC₅₀ de 23.1µg/mL (±)0.42, obtenido mediante el método colorimétrico XTT-PES, muy interesante siendo menor a la IC₅₀ del glucantime, droga de primera línea para el tratamiento de la leishmaniasis en nuestro país, ensayada y reportada por Estevez et. al. (130) sobre amastigotes axénicos cepa *Leishmania amazonensis* (Lma) con IC₅₀ de 30±6 µg/mL.

Mostrando de esta manera que CAT podrían presentar una actividad antiparasitaria buena frente a amastigotes que estarían presentes por ejemplo en un lesión ulcerada que son los responsables de la patología misma de esta enfermedad, es así que esperamos que la aplicación tópica de pomada de CAT brinde resultados muy alentadores en los estudios clínicos Fase II de está enfermedad.

También se pudo evidenciar una interesante actividad tripanocidas *in vitro* de CAT sobre dos cepas de referencia (Tulahuen-Y) como cepas nativas aisladas a partir de ratón y también de insecto vector con IC₅₀, que van desde 5.84 hasta 21.5µg/mL, mostrando de esta forma la eficacia de CAT *in vitro* sobre al menos 6 cepas circulantes en nuestro medio, es importante resaltar que casi todas las cepas circulantes presentan IC₅₀ bajos en relación a los IC₅₀ encontrados con las cepas de referencia y muy próximos a los IC₅₀ encontrados con el benzimidazol medicamento usado en fase aguda de la enfermedad de Chagas.

Se obtuvo también interesantes resultados en modelos *ex vivo* con la cepa Y, teniendo IC₅₀ de 122.79µg/mL (±) 23.38, debido a que este IC₅₀ se encuentra muy cercano al IC₅₀ del quimioproláctico violeta de genciana (100µg/mL) usado para el tratamiento de bolsas de sangre sospechosas o infectadas con Chagas, a si también se pudo evidenciar que el jarabe de CAT tanto al 2% como al 5% no presentaban actividad antiparasitaria en los ensayos *in vivo*, es posible que ante la no ingesta de alimentos de los grupos tratados con jarabe de CAT asociado a una depresión de la capacidad de los animales infectados para montar una respuesta humoral normal (132), se tenga elevadas parasitemias en los grupos tratados con CAT, como también puede deberse a que el jarabe no haya tenido las condiciones necesarias para que los alcaloides totales de corteza de evanta lleguen al torrente sanguíneo y así ejercer su actividad tripanocida claramente observada en los ensayos *in vitro* y *ex vivo*.

La actividad *in vitro* de CAT sobre *Plasmodium falciparum* cepa F32 (sensible a cloroquina) mostró un IC₅₀ de 20µg/mL considerando a este resultado como medianamente positivos en comparación a las IC₅₀ de plantas usadas como antimalaricos como son *Cinchona officinalis* IC₅₀ = 4.2 µg/mL y *Remijia peruviana* IC₅₀ = 7.4 µg/mL.

Por ultimo el presente trabajo muestra de una forma científica el uso tradicional de corteza de Evanta como amebicida debido a los resultados de IC₅₀ encontrados de CAT frente a dos cepas de *Acanthamoeba (castellani-polyfaga)* IC₅₀ = 12.01µg/mL(±)0,67 y 27.34µg/mL (±)2,65 mediante el método colorimétrico alamar blue, resultados realmente muy interesantes en relación con los rangos de concentración de inhibición de polihexametilenbiguanida-PHMB (0.49-3.9 µg/mL) y la Clorhexidina (0.49-1.9 µg/mL) reportados por Elder et. al. (104) como antiamebianos más eficaces en queratitis por *Acanthamoeba*, así también muestra una estrecha relación a los IC₅₀ de Miltefosina reportados en estudios previos por McBride et.al.(137,138) como el más prometedor derivado fosfolipidico para el tratamiento de Acanthamoebiasis ensayados *in vitro* sobre las mismas especies de *Acanthamoebas*, mostrando IC₅₀ de 2.38 y 9.52 µg/mL respectivamente.

11. Recomendaciones.

Sobre la base de los resultados obtenidos creemos que :

La obtención de amastigotes axénicos mediante los cambios de temperaturas, pH y concentraciones de suero bovino fetal, de las diferentes formas de *Leishmania* (*Leishmania* cutánea, mucocutánea y visceral) como formas celulares alternativas para la evaluación de productos con posible actividad antiparasitaria es importante.

El aislamiento de cepas nativas tanto de *Leishmania* como de *Tripanosoma cruzi* son imprescindibles ya que se tendría la posibilidad de trabajar con especies circulantes en nuestro medio y apoyar estos trabajos con cepas de referencia.

La implementación de técnica moleculares dentro del I.I.F.B. para la identificación de las cepas nativas tanto de *T.cruzi* como *Leishmania* y el estudio de amastigotes axénicos es de suma importancia.

La puesta a punto de métodos colorimétricos (MTT) para la evaluación de productos con posible actividad antiparasitaria sobre epimastigotes de *Tripanosoma cruzi* (MTT) sería un paso importante.

Siendo la cepa Y de *Tripanosoma cruzi* la menos sensible en los ensayos *in vitro* creemos que la infección de ratones con epimastigotes de cepas nativas de Chagas y el posterior ensayo con jarabe de CAT brindaría resultados muy interesantes.

Sobre la base de los alentadores resultados de CAT frente a trofozoitos de dos cepas de *Acanthamoeba* (*castellani- polyfaga*) creemos que la puesta a punto del cultivo celular como de un método colorimétrico (Alamar Blue) dentro del I.I.F.B. para la evaluación de esta parasitosis es importante.

12. Bibliografía.

1. Killen T J, García E, Beck S..*Guía de árboles de Bolivia*. La Paz-Bolivia. 1993; 709-710.
2. Bourdy G, Giménez A, Quenevo C. “Tacana: Ecuánasha aquí, ecuanasha id’rene cuana, me schanapaque” (Tacana: Conozcan nuestros árboles, nuestras hierbas).UMSA: IIFB-IIQ-IBBA; FONAMA-EIA; IRD. Plural. La Paz, Bolivia. 1999; 411-416
3. Fournet A, Hocquemiller R, Roblot F, Cavé A, Richomme P, Bruneton J. Les chimanines, nouvelles quinoleines substituees en 2, isolees de une plante Bolivienne antiparasitaire : *Galipea longiflora*. *Journal of Natural Products*. 1993; 56:1547-1552.
4. Caron S, Desfossés S, Dionea R, Théberge N, Burnell R. Synthesis of some minor quinoline alkaloids found in *Galipea longiflora*. 1993. *Journal of Natural Products*. 1993;56:138-139.
5. <http://www.Patentes.ibm/cgi.bin/viewpat.cmd>. Fecha visitada marzo 2008.
6. Fournet A, Barrios A, Muñoz V, Hocquemiller R, Cavé A, Bruneton J. 2-Substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1993;37:859-863.
7. Fournet A, Gantier JC, Gautheret A, Leysalles L, Munos M H, Mayrargue J, Moskowitz H, Cavé A, Hocquemiller R. The activity of 2-substituted quinoline alkaloids in Balb/c mice infected with *Leishmania donovani*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 1994;33:537-544.
8. Fournet A, Ferreira M E, Rojas A, Torres S, Fuentes S, Nakayama H, Schinini A, Hocquemiller R. In vivo efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1996;40: 2447-2451
9. Fournet A, Barrios AA, Muñoz V, Hocquemiller R, Roblot F, Cavé A, Richomme P, Bruneton. Antiprotozoal activity of quinoline alkaloids isoleted from *Galipea longiflora*, a Bolivian plant used as a treatmet for cutaneous leishmaniasis. *Phytotherapy Research*. 1994;8:174-178.

10. Nakayama H , Ferreira M, Rojas de Arias A, Bilbao S, Schinini Alicia, Fournet A. Experimental Treatment of cronic *Tripanosoma cruzi* infection in mice with 2-N-Propylquinoline. *Phytotherapy Research*. 2001;15:630-632.
11. Gantier JC, Fournet A, Munos M H, Hocquemiller R. The effect of some 2-substituted quinolines isolated from *Galipea longiflora* on *Plasmodium vinckei petteri* infected mice. *Planta Medica*. 1996;62:285-286.
12. Calla-Carrasco J, Troye-Blomberg M, Fernandez C. Extracto de alcaloides de *Galipea longiflora* (Evanta) afecta la proliferación celular y la producción de citoquinas pro-inflamatorias :Factor de necrosis tumoral e interferon- γ *in vitro*.*Revista-Biofarbo*. 2007;14:57-66.
13. Giménez A, Avila J, Ruiz G, Paz M, Udaeta E, Ticona J, Salamanca E, Paredes C, Rodríguez N, Quints K, Feraudy C, Gutierrez I, Chuqui R, Quenevo C, Dalence M, Bascope M. Estudios químicos, biológicos y farmacológicos de *Galipea longiflora*, Krause. *Revista Boliviana de Química*.2005;22:94-107.
14. Paz Magali, Vázquez Felipe, Chuqui Rogelio, Paredes Crispin, Sauvain Michel, Gimenez Alberto. Establecimientos de cultivos *in vitro* de *Galipea longiflora* una Rutacea de la Amazonia Boliviana. *Acta Farm.Bonaerense*. 2007;26:15-19.
15. Alvar Ezquerro J. Las leishmaniasis: de la biología al control .Instituto de salud CarlosIII (España) Centro colaborador de la OMS para Leishmaniasis. 2002;2:17-22.
16. Ampuero J S. Leishmaniasis. Módulos técnicos. Serie de documentos monográfico N°8. Ministerio de salud del Perú. 2000: 7-12.
17. Murray HW, Berman J, Davies C, Saravia N. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005;366:1561-1577.
18. Weitzel T, Muhiberger N, Jelinek T, Schunk M, Ehrhardt S, Bogdan C, Arasteh K, Schneider T, Kern W.Imported leishmaniasis in Germany 2001–2004: data of the SIMPID surveillance network. *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*. 2005;24:471-476.
19. Atias A. Parasitología Médica - Mediterráneo. 1999;242-268.
20. Upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/83/Leishmania_LifeCycle.gif

21. Croft L Simon, Seifert Karin, Yardley Vanesa. Current scenario of drug development for Leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research*. 2006;123:399-410.
22. Camargo Muñoz C. Análisis de la susceptibilidad de una línea celular de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) a la infección con *Leishmania* (L) *chagasi* y *Leishmania* (V) *braziliensis*. *Revista Ciencias de la salud- Bogotá*. 2005; 3:119-128.
23. Fumarola L, Spinelli R, Brandonisio O. In vitro assays for evaluation of drug activity against *leishmania* spp. *Research in Microbiology*. 2004;155:224–230
24. Brito S, Crescente O, Fernandez A. Eficacia de un ácido Kaurénico extraído de la planta venezolana *Wedelia trilobata* (Asterácea) contra *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Biomédica*. 2000;26:180.187.
25. Abdulrahman Ismael, Jeremy Garmson, Molyneux David, Bates Paul. Transformation, development, and transmission of axenically cultured amastigotes of *Leishmania mexicana* *in vitro* and in *Lutzomyia longipalpis*. *Am J. Trop. Med. Hyg* . 1998;59:421-425.
26. Callahan H, Portal A, Devereaux R, Grogl M. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1997;41:818-822.
27. Brendle J, Outlaw A, Kumar A, Boykin D, Patrick D, Tidwell R, Werbovets A. Antileishmanial activities of several classes of aromatic dications. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002;46:797–807.
28. Saar Y, Ransford A, Waldman E, Mazareb S, Amin-Spector S, Plumblee S, Zilberstein D. Characterization of developmentally-regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 1998;95:9-20.
29. Hodgkinson H, Soong L, Duboise M, McMahon-Pratt. *Leishmania amazonensis*: Cultivation and Characterization of Axenic Amastigote-like Organisms, *Experimental parasitology*. 1996; 83:94–105.

30. Valencia G, Vera B, Flores A, Andrade F. Obtención de cultivo axénico de amastigotes de tres cepas de *Leishmania (Leishmania) mexicana* a partir de promastigotes aislados de pacientes con leishmaniasis cutánea localizada en México. *Revista Biomedica Mexico*. 1998;9:206-213.
31. Zilberstein D, Shapira M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* paras . *Rev. Microbiol.* 1994;48:449-70
32. Zaidenberg A, Tournier G, Schinella G, Buschiazzi O. *Trypanosoma cruzi*: Obtención de amastigotes extracelulares y estudio de su crecimiento en diferentes condiciones de cultivo. *Revista latinoamericana de microbiología*. 2000;42:.21-26.
33. Aquino Teixeira, Marcia Jesus, Santos Regiline. Sampaio Romina, Pontes-de-Carvalho, Dos-Santos Washington. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. *Parasitol. Res.* 2002;88:963-968.
34. Pan.AA. *Leishmania mexicana*: Serial cultivation of intracellular stages in a cell-free medium. *Experimental parasitology*. 1984;58:72-80.
35. Gupta Nidhi, Goyal Neena, Rastogi Anil. In vitro cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. *Trends in parasitology*. 2001;17:150-153.
36. Debrabant A, Joshi M, Pimenta P, Dwyer D. Generation of *Leishmania donovani* axenic amastigotes: their growth and biological characteristics. *International Journal for Parasitology*. 2004;34:205–217.
37. Ueda-Nakamura T, Attias M, Souza W. Megasoma biogénesis in *Leishmania amazonensis*: a morphometric and cytochemical study. *Parasitol Res.* 2001;87:89-97.
38. Pan A, Pan SC. *Leishmania mexicana*: Comparative fine structure of amastigotes and promastigotes *in vitro* and *in vivo*. *Experimental parasitology*. 1986;62:254-265.
39. Ueda-Nakamura T, Attias M, Souza W. Comparative analysis of megasomes in members of the *Leishmania mexicana* complex. *Res Microbiol.* 2007;158:456-462.

40. Puentes F, Diaz D, Hoya R, Gutierrez J, Lozano J, Patarroyo M, Moreno A. Cultivation and characterization of stable *Leishmania guyanensis* complex axenic amastigotes derived from infected U937 cells. *Am J. Trop. Med. Hyg.* 2000;63:102–110.
41. Peters C, Aebischer T, York-Dieter S, Funchs M, Overath P. The role of macrophage receptors in adhesion and uptake of *Leishmania mexicana* amastigotes. *Journal of Cell Science.* 1995;108:3715-3724.
42. Grimm F. Leishmaniasis: Development of an *in vitro* assay for drug screening. 3R-Info-Bulletin 12-Instituto de Parasitología Universidad de Zurich,Suiza. 1999.
43. Callahan H, Portal A, Devereaux R, Grogl M. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 1997;41:818–822
44. Organización mundial de la salud. Special Program for Research and Training in tropical Disease (TRD) Life in the 21 Century. A vision for all Report of the Director. Geneva:OMS. 1998: 44-51.
45. Légraré D, Cayer S, Singh A, Dave R, Papadopoulou B, Ouellette M. ABC Proteins of *Leishmania*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* 2001;33:1-6
46. WHO/CSR/EDC-UNAIDS; Public Health Mapping Group Communicable Diseases (CDS) World Health Organization. 2003.
47. Batista Molier R. Situación de Salud Bolivia 2004-Documentos de divulgación científica Enero-2006 Ministerio de Salud y Deportes. 2006;69-71.
48. Mollinedo S, Monasterios H, Magne M, Vallejos E, Velarde J, Chuquimia G, Parra R, Ayllon J, Surriabre N, Muñoz B. Leishmaniasis Guía Operativa para el Control en Bolivia. Unidad de Epidemiología, Programa Nacional de Control de las Leishmaniasis Comité de Identidad Institucional - Ministerio de Salud y Deportes. 2007.
49. Mollinedo S, Holguin E, Giron W, Barroso B, Delgado W, Diaz V, Aranda R, Balboa V, Selaez H, Gamarra E. Manual práctico de tratamiento de leishmaniasis.Ministerio de Salud y previsión social. Unidad de Parasitología y Entomología. INLASA.Publicación Técnica N10. La Paz. 2002;1- 41.

50. Paris C, Loiseau P, Borjes C, Bréard J. Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania donovani* Promastigotes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;48:852–859.
51. Soto J, Rea J, Valderrama M, Toledo J, Soto P, Valda L, Berman J. Efficacy of Miltefosine for Bolivian Cutaneous Leishmaniasis. Fundación FADER, Bogota, Colombia; Puesto de Salud, Campamento OSCAR, Palos Blancos, Bolivia. *Am J. Trop. Med. Hyg.* 2008;78 : 210–211
52. Soto J, Soto P. Miltefosina oral para el tratamiento de la leishmaniasis. *Biomédica*. 2006;26: 207-17.
53. J Soto, J Toledo, L Valda, I Rea, R Parra, J Ardilles, P Soto, A Gomez, F Molleda, C Fuentelsaz, G Anders, H Sidermann, J Engel, J Berman. Treatment of Bolivian Mucosal Leishmaniasis with Miltefosine. *Infectious Diseases Society of America-CID*. 2007;44:350-356.
54. Storino R, Milei J. Enfermedad de Chagas. Mosby, Dogma Argentina 1996;1-51.
55. Cassab A, Noireau F, Guilen G. .Enfermedad de Chagas en Bolivia. Conocimientos Científicos al inicio de programa de control. La Paz-Bolivia. 1994;17-33.
56. A Prata. Clinical and Epidemiological aspects of Chagas disease. *The lancet infectious diseases*. 2001;1:92-100.
57. Guzman M, Zabala E, Castro J, Acosta K, Barrera M. Importancia de la caracterización de cepas de *Tripanosoma cruzi*. *Revista Biomedica*. 1999;10:177-184.
58. Saldaña C, Córdova O, Vargas F. Utilización de *Lepidium peruvianum* (MACA), como medio de cultivo para el crecimiento de *Tripanosoma cruzi*. *Revista Peruana de medicina experimental y salud pública*. 2006;23:137-140.
59. S Maraghi, R Wallbanks, D Molyneux, Hafez Abdel. In vitro cultivation of *Tripanosoma acomys*: production of insect stages and bloodstream forms. *Parasitology research*. 1995; 81:672-676.
60. Serrano M, Ruiz N, Barrio G. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Tripanosoma cruzi* epimastigotes. *Journal Parasitol Res*. 2000;86:999-1002.

61. Vargas F. Epidemiología molecular de la Tripanosomiasis americana (*Tripanosoma cruzi* y *Tripanosoma rangelyi*) en la región Norte y Nororiental del Perú. Tesis doctoral. Universidad de Granada. 2005.
62. www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm.
63. Vianey V, Sergio I. Infección natural de Chinchas Triatominae con *Tripanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. *Revista Salud Publica México*. 2000;42:496-503.
64. Tuculet C, Navarro P, Enz P, Galimberti G, Galimerti R. Enfermedad de Chagas: Manifestación cutánea en un paciente con trasplante hepático. Reactivación. Servicio de Dermatología. Hospital Italiano de Buenos Aires. 2007;35:25-28.
65. Linares G, Ravaschino E, Rodríguez J. Progreses in the Field of Drug Desing to Combat Tropical Protozoan. *Parasitic Diseases*. 2006;13:335-360.
66. Muñoz J, Gascóm J. Enfermedad de Chagas importada. *Revista Enfermedades Emergentes*. 2005;7:134-138.
67. www.cdfound.to.it/HTML/tc2.htm.
68. Mollinedo Sergio, Brutus Laurent, Schneider Dominique, J Postigo, J Santalla, A Salas, H Castillo, G Michel V Díaz. Chagas Congénito en Bolivia (Revisión de Tema). Recherche pour le Developpement (IRD) “Salud de la Madre y del Niño en Medio Tropical-UMSA. 2005;1-17
69. Rojas Loayza D. Control de la Enfermedad de Chagas a través del mejoramiento de la vivienda en la provincia de Sud Yungas-Proyecto en vivienda saludable-Iniciativa de la OPS/OMS, red VIVAS, RIE y Red APA,La Paz-Bolivia. 2002
70. www.iadb.org/stories/1999/por/3-4k2.htm.
71. www.unine.ch/zool/para/guerin.
72. Informe de la Consulta Técnica sobre Información, Educación y Comunicación (IEC) en Enfermedad de Chagas Congénita. 2007.CLAP-OPS/OMS :3-12
73. Sosa-Estani Sergio. La seroepidemiología en la investigación de la infección con *Tripanosoma cruzi*. Grupo de trabajo OPS en Enfermedad de Chagas. 2001:15-22.

74. Moreno E, Rivera I, Moreno S, Alarcán M, Lugo-Yarbuh A. Transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en ratas Wistar durante la fase aguda de la infección. Investigación clínica. *Revista Cielo*. 2003;44:241-254.
75. Gironés N, Cuervo H, Fresno M. Is there a pathogenic role of autoimmune responses in Chagas disease?. *Rev.Immunologia*. 2004;23:185-199.
76. Urbina J, Docampo R. Specific Chemotherapy of Chagas Disease. Controversias and advances. *Trends in Parasitology*. 2004;19:459-501.
77. Villanueva L, Villa E, Rodríguez P. Resultados del tratamiento de la enfermedad de Chagas en menores de 15 años en el proyecto de médicos sin fronteras en Tarija (Bolivia). *Revista Pediatría de atención primaria*. 2005;7:61-76.
78. Goiri J. Un nuevo paso en la historia de Chagas en Bolivia: por primera vez se ofrece tratamiento a adultos. *Médicos sin fronteras en Bolivia*; 2007.
79. Schenone H, Contreras M, Solari A, Marcia A, Rojas A, Lorca M. Tratamiento con Nifurtimox de la infección chagásica crónica en niños. *Revista Médica Chile*. 2003;131:1089-1090.
80. Knell A J. Malaria. A publication of the Tropical Programme of the Wellcome Trust. *The Wellcome Trust*.1991.
81. Kondrachine A, Trigg P I. "Control of Malaria in the World". *Indian Journal of Malariology*. 1997: 34; 92-110
82. Mollinedo S, Mollinedo R. La Malaria en Bolivia. Ministerio de Salud y Prevención Social. Publicación Técnica N° 3. La Paz – Bolivia: 2000.
83. Deharo E, Gautret Ph, Muñoz V, Sauvain M. Técnicas de Laboratorio para la selección de sustancias antimaláricas. 2000. 1ª Ed
84. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Malaria.htm>
85. Trager W, Jensen J. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*. 1976; 693:673-675.
86. Chulay J, Haynes J, Diggs L. *Plasmodium falciparum*: Assessment of *in vitro* Growth by [³H] Hypoxantine Incorporation. *Experimental parasitology*. 1983. 55: 138-139.
87. Botero D, Restrepo M. Parasitosis Humana. 1992:149-189.

88. <http://www.med.sc.edu:85/parasitology/malariamap-2003.gif>
89. Avila J C. Prueba de sensibilidad *in vivo* de *Plasmodium falciparum* a la cloroquina y sulfadoxina – pirimetamina. Informe presentado al Ministerio de Previsión Social y Salud Pública-Bolivia. Dirección Nacional de Epidemiología. Servicio Nacional Control de la Malaria. 1993.
90. www.paho.org/spanish/ad/dpc/cd/bahia-bol.pdf
91. www.paho.org/spanish/ad/dpc/cd/bahia-bol.pdf.
92. Markell E K, Voge M, John D T. Parasitología Médica. 6a Ed. Interamericana Mc Graw – Hill. Madrid. 1994.
93. Gentilini M, Caumes E, Danis M, Mouchet J, Duflo B, Lagardère B, Richard-Lenoble D, Brucker G, *Médecine Tropical*. 5ª Ed. Flammarion. Paris. 1995.
94. Oporto Patricia. Estudio de la sensibilidad *in vitro* a diferentes antipalúdicos, de aislados de *Plasmodium falciparum* de pacientes de la localidad de Guayaramerin. Tesis de Licenciatura. UMSA. 2002
95. Kondrachine A, Trigg P . “Control of Malaria in the World”. *Indian Journal of Malariology*. 1997;34:92-110.
96. Ortega Rivas Antonio. Aplicación de la técnica de Rapd para la caracterización de especies de género *Acanthamoeba*-Universidad de la Laguna-Tesis doctoral. 2002:1-6.
97. Lorenzo-Morales J, Monteverde-Miranda C, Jiménez C, Tejedor M, Valladares B, Ortega-Rivas A. Evaluation of *Acanthamoeba* Isolates from Environmental Sources in Tenerife, Canary Islands, Spain. *Ann Agric Environ Med*. 2005;12:233-236.
98. Rodrigo D, Mura J, López Mauricio. *Acanthamoeba* keratitis treated with propamidine and polyhexamethyl biguanide. *Rev.Med.Chilena*. 2002;130:396-401.
99. Morales Jacob Lorenzo. Estudios Epidemiológicos y Moleculares del Género *Acanthamoeba* en Regiones Tropicales y Subtropicales. Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias- Tesis Doctoral. 2006: 19-20.

100. Radford C, Minassian D, Dart J. *Acanthamoeba* keratitis in England and Wales: incidence, outcome, and risk factors. *Br J Ophthalmol*. 2002; 86:536-542.
101. Moore M, Ubelaker J, Martin J. *In vitro* penetration of human corneal epithelium by *Acanthamoeba castellani* a transmission and scanning electron microscopy. *Cornea*.1991;10:291-298.
102. Teramoto Silvia, Andrea Tsuru Cintia, Nancy Raquel. Queratitis por *Acanthamoeba* en usuarios de Lentes de Contacto. Revista de Posgrado de la Via Cátedra de Medicina. 2003;123:18-21.
103. Garner A. Pathogenesis of *Acanthamoeba keratitis* hypothesis based on histological analysis of 30 cases. *Br J Ophthalmol*. 1993;77:366-370.
104. Elder M J, Kilvington S, Dart J K G. A. Clinicopathological study of *in vitro* sensitivity testing and *Acanthamoeba* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994; 35:1059-1064.
105. Cuba Cuba C. Diagnóstico Parasitológico de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana. *Revista Medica Experimental*. 2000; 17:39-49.
106. Wilson H. Diekman B , Childs G. *Leishmania brasiliensis* and *Leishmania mexicana*: Experimental cutaneous infections in golden hamsters. *Experimental Parasitol*. 1979;47:270-283.
107. Maria R, Pira S, Silvana B, Luis M. Diagnostico de la Enfermedad de Chagas y Aislamiento de *Tripanosomas* del complejo *cruzi*. Centro Nacional de Parasitología y Enfermedades Tropicales (CENPETROP). 2006:1-3.
108. Lopez R. Infectividad en ratón de las formas de *Tripanosoma cruzi*. Med-ULA, *Revista de la Facultad de Medicina*, Universidad de los Andes - Mérida Venezuela. 1999;5:44-47.
109. Rodríguez E, Briceño L, Chiurillo M, Mosca W, Campos Y. Tripanosomiasis Americana: Aspectos teóricos. Curso Latinoamericano sobre enfermedades infecciosas. 2004:1-26.
110. Sereno D, Semestre J. Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis* *in vitro*. *Parasitol.Res*. 997;83:401-403.
111. Giménez A, Gupta M Deharo E. Manual de Técnicas de laboratorio para la Evaluación de Sustancias Tripanocidas y Leishmanicidas. 2005:89-90.

112. Cornelly W, Espinosa O, Montenegro H, Cubila L, Capson T, Ortega-Barria E, Romero L. Hydrosoluble formazan XTT : Its application to natural products drug discovery for *Leishmania*. *Journal of Microbiological Methods*. 2003;55:813-816.
113. Goodwin C, Holt S, Downes S, Marshall N. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts, XTT and MTS. *Journal of Immunological Methods*. 1995;179:95-103.
114. Ganguly S, Bandyopadhyay S, Sarkar A, Chatterjee M. Development of a semi-automated colorimetric assay for screening anti-leishmanial agents. *Journal of Microbiological Methods*. 2006;66:79-86.
115. Marcel A, Rojas L, Rodríguez S, López Y, Ramos I. Aplicación de un método alternativo al conteo de cámara de Neubauer para determinar la concentración de *Trichomonas vaginalis*. *Revista Cubana Med.Trop*. 2001;53:180-188.
116. Montalvo M, Sifontes S, Montano I, Espino M. Necesidad del uso de cromógenos para cuantificar promastigotes de *Leishmania* en placas de 96 pozos. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2000;52:95-100.
117. Vives C, Joan L. Manual de técnicas de laboratorio en hematología .2001:56.
118. Zambrano M, Cortijo M. Manual de procedimientos de laboratorio en técnicas básicas de hematología, *Red nacional de laboratorios en salud pública* 2005:29-40.
119. Del Olmo E, Armas M, López P, Ruiz G, Vargas F, Giménez A, Deharo E, San Feliciano A. Anti-Tripanosoma Activity of some Natural Stilbenoids and Synthetic Related Heterocyclic Compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2001;11:2755-2757.
120. Batista R, Humberto J, Chiari E, Braga de Oliveira A. Synthesis and Trypanocidal activity of ent-Kaurane glycosides. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2006;15:381-391.
121. Gutierrez Y D, Paco M, Romero L, Gimenez A. Fluorometria : Un método rápido y sencillo para evaluar la actividad antipaludica. *Revista Biofarbo*. 2005;13:3-9.

122. Gutierrez Y D, Paco M, Ortega E, Peña L, Deharo E, Gimenez A. Evaluación de la actividad antipalúdica por medio de un método colorimétrico alternativo. *Revista Biofarbo*. 2005;13:99-105.
123. Herrer A, Thatcher V, Jhonson C. Natural Infections of *Leishmania* and *Tripanosomas* demonstrated by skin cultures. *Journal. Parasitol.* 1966;52:954-957.
124. Evans DA. *Leishmania. In Vitro* Methods for parasite cultivation. *Academic Press, New York*.1987; p52-57.
125. Urgel R, Recacochea M, Fuente L, Orellana A. A simple method for the collections of materials from cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis. *Trans.R.Soc.Tropical.Med.Hyg.* 1983;77:882-890.
126. Rodriguez A, Aragort de Rossell R, De Jesus R, Calcagno M, Maizo de Segnini Z, Segnini S, Diaz S. Blood and Culture Trypomastigotes Forms of *Tripanosoma cruzi* Y. *Parasitología al Día*. 2000;24:0716-0720.
127. Braga F, Bouzada M, Fabri R, Matos M, Moreira F, Scio E, Coimbra E. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal Ethnopharmacology*.2006:111;396-402.
128. Atta-ur-Rahmant, Choudhary M. Recent Studies on Bioactive Natural Products. *Pure Appe.Chem*.1999;71:1079-1981.
129. Osorio E, Arango G, Jiménez N, Alzate F, Grace R, Gutierrez D, Marco P, Giménez A, Robledo S. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;1-5.
130. Estevez Y, Castillo D, Jangoa M, Arevalo J, Rojas R, Alban J, Deharo E, Bourdy G, Souvain M.Evaluation of the leishmanicid activity of plants used by Peruvian chayahuita ethnic group. *Journal Ethnopharmacology*. 2007;114:254-259.
131. Jimenez N, Arango G, Valencia L, Triana O. Actividad Tripanocida de Extractos de plantas Colombianas (annonaceae y Euphorbiceae).II Congreso Internacional de Plantas medicinales y Aromaticas .Universidad de Colombia Sede Palmira. 2006.

132. Sulse V, Guida C, Coussio J, Pveto C, Muschiettu L, Martino V. *In Vitro* evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine. *Parasitol Research*. 2005:1-4.
133. Grace R, Del Olmo E, Deharo E, Giménez A. Actividad Anti-Tripanosoma de Estilbenoides naturales y sintéticos. *Revista.Biofarbo*. 2002;10:21-26.
134. Palomo I, Ferreira A, Sepulveda C, Rossemblatt M, Vergara U. *Fundamentos de Inmunologia*. 1998:389-404.
135. McBride J, Ingram P, Henriquez F, Roberts C. Development of Colorimetric microtiter plate assay for assessment of antimicrobials against *Acanthamoeba*. *Journal of clinical microbiology*. 2004;43:629-634.
136. Cabrera-Serra G, Lorenzo-Morales J, Romero M, Valladares B, Piñero J. *In vitro* activity of perifosine: A novel alkylphospholipid against the promastigotes stage of *Leishmania* species. *Parasitol Res*. 2007;100:1155-1157.
137. McBride J, Mullen A, Carter Ch, Roberts W. Differential cytotoxicity of pathogenic *Acanthamoeba* species and mammalian cells. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007;60:521-525.
138. McBride J, Ingram P, Henriquez F, Roberts W. Development of colorimetric microtiter plate assay for assessment of antimicrobials against *Acanthamoeba* *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(2):629-634.
139. Mollinedo S, Prieto C. El enteroparasitismo en Bolivia (1975-2004). Ministerio de Salud y Deportes de Bolivia. 2006:29-34.

ANEXO 1. Determinación de la IC₅₀ de CAT mediante el método colorimétrico XTT-PMS sobre diferentes cepas de *Leishmania* (promastigotes y amastigotes axénicos).

IC₅₀ de CAT, *Leishmania amazonensis* (690) 23-11-07 2007

	Control (-) medio	Control (+) parasit. CAT(µg/mL)	Promastigotes L.690 a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)					Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
				6.25	12.5	25	50	100		6.25	12.5	25	50	100
	0,398	2,19	0	2,19	2,261	1,822	0,873	0,497	0	0,391	0,396	0,372	0,423	0,398
	0,414	2,136	0	2,136	2,189	1,562	0,839	0,539	0	0,39	0,419	0,402	0,405	0,414
	0,414	2,136	0	2,136	2,189	1,562	0,839	0,539	0	0,39	0,419	0,402	0,405	0,414
Promedio	0,409	2,154	0,000	2,154	2,213	1,649	0,850	0,525	0,000	0,390	0,411	0,392	0,411	0,409
SD	0,009	0,031	0	0,031	0,041	0,150	0,019	0,0242	0	0,0005	0,013	0,0173	0,0103	0,009

	Control (-) Blanco de color						
			6.25	12.5	25	50	100
	1,79	0,00	1,80	1,87	1,45	0,45	0,10
	1,72	0,00	1,75	1,77	1,16	0,43	0,13
	1,72	0,00	1,75	1,77	1,16	0,43	0,13
promedio	1,75	0,00	1,76	1,80	1,26	0,44	0,12
SD	0,04	0,00	0,03	0,05	0,17	0,01	0,02

Concentración CAT	% inhib	IC ₅₀
100	93	
50	75	47,8 µg/mL
25	28	
12,5	0	
6,25	0	

% de Supervivencia	CAT µg/mL						
			6.25	12.5	25	50	100
		0	100	104	81	25	6
		0	101	103	67	25	7
		0	101	103	67	25	7
Promedio		0	101	103	72	25	7
SD		0	1	1	8	0	1

IC₅₀ de CAT, *Leishmania chagasi* (pp75) 23-11-07 2007

Control (-) medio	Control (+) parasit. CAT µg/mL	Promastigotes L.pp75 a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
			6.25	12.5	25	50	100		6.25	12.5	25	50	100	
0,398	2,283	0	2,283	2,171	1,102	0,628	0,515	0	0,391	0,396	0,372	0,423	0,398	
0,414	2,192	0	2,192	2,215	1,112	0,628	0,499	0	0,39	0,419	0,402	0,405	0,414	
0,414	2,192	0	2,192	2,215	1,112	0,628	0,499	0	0,39	0,419	0,402	0,405	0,414	
Promedio	0,409	2,222	0,000	2,222	2,200	1,109	0,628	0,504	0,000	0,390	0,411	0,392	0,411	0,409
SD	0,009	0,052	0	0,052	0,025	0,005	0	0,0092	0	0,0005	0,013	0,017	0,010	0,009

Control (-) Blanco de color			6.25	12.5	25	50	100
1,78	0,00	1,80	1,80	0,71	0,22	0,09	
1,78	0,00	1,80	1,80	0,71	0,22	0,09	
Promedio	1,81	0,00	1,83	1,79	0,72	0,22	0,10
SD	0,06	0,00	0,05	0,01	0,01	0,01	0,02

% de Supervivencia

CAT µg/mL		6.25	12.5	25	50	100
0	100	94	39	11	6	
0	101	101	40	13	5	
0	101	101	40	13	5	
Promedio	0	101	99	40	12	5
SD	0	1	4	1	1	1

Concentración CAT	% inhib	IC ₅₀
100	95	
50	88	39,6
25	60	
12,5	1	
6,25	0	

IC₅₀ de CAT, *Leishmania spp* (L.BTE-002) 23-11-07

CONTROL (-) medio	CONTROL (+)	Promastigotes L.BTE-002 a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
	parasit. CAT µg/ml		6.25	12.5	25	50	100		6.25	12.5	25	50	100	
0,398	2,139	0	2,139	2,041	0,661	0,601	0,627	0	0,391	0,396	0,372	0,423	0,398	
0,414	2,204	0	2,204	1,936	0,7	0,604	0,628	0	0,39	0,419	0,402	0,405	0,414	
0,414	2,204	0	2,204	1,936	0,7	0,604	0,628	0	0,39	0,419	0,402	0,405	0,414	
Promedio	0,409	2,182	0,000	2,182	1,971	0,687	0,603	0,628	0,000	0,390	0,411	0,392	0,411	0,409
SD	0,009	0,037	0	0,037	0,060	0,022	0,0017	0,0005	0	0,00057	0,0132	0,017	0,010	0,009

Control (-)		Blanco de color					
			6.25	12.5	25	50	100
	1,74	0,00	1,75	1,65	0,29	0,18	0,23
	1,79	0,00	1,81	1,52	0,30	0,20	0,21
	1,79	0,00	1,81	1,52	0,30	0,20	0,21
Promedio	1,77	0,00	1,79	1,56	0,30	0,19	0,22
SD	0,03	0,00	0,04	0,07	0,01	0,01	0,01

% de Supervivencia	CAT µg/mL		6.25	12.5	25	50	100
			0	100	94	17	10
	0	101	85	17	11	12	
	0	101	85	17	11	12	
Promedio	0	101	88	17	11	12	
SD	0	1	6	0	1	1	

Concentración CAT	% inhib	IC ₅₀
100	88	
50	89	36,0
25	83	
12,5	12	
6,25	0	

IC₅₀ de CAT, *Leishmania donovani* (642) 23-11-07

	CONTROL (-)	CONTROL (+)	Promastigotes L.642 a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)					Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
	medio	parasit.												
		CAT(µg/mL)		6.25	12.5	25	50	100		6.25	12.5	25	50	100
	0,398	1,847	0	1,847	1,435	0,497	0,521	0,548	0	0,391	0,396	0,372	0,423	0,398
	0,414	1,57	0	1,57	1,436	0,498	0,51	0,539	0	0,39	0,419	0,402	0,405	0,414
	0,414	1,57	0	1,57	1,436	0,498	0,51	0,539	0	0,39	0,419	0,402	0,405	0,414
Promedio	0,409	1,662	0,000	1,662	1,436	0,498	0,514	0,542	0,000	0,390	0,411	0,392	0,411	0,409
SD														

	Control (-)						
	Blanco de color		6.25	12.5	25	50	100
	1,45	0,00	1,46	1,04	0,13	0,10	0,15
	1,16	0,00	1,18	1,02	0,10	0,11	0,13
	1,16	0,00	1,18	1,02	0,10	0,11	0,13
Promedio	1,25	0,00	1,27	1,02	0,11	0,10	0,13
SD	0,17	0,00	0,16	0,01	0,02	0,00	0,01

Concentración de CAT	% inhib	IC ₅₀
100	89	
50	92	33,6
25	92	
12,5	17	
6,25	0	

% de Supervivencia	CAT(µg/mL)		6.25	12.5	25	50	100
		0	100	72	9	7	10
	0	102	88	8	9	11	
	0	102	88	8	9	11	
Promedio	0	102	83	8	8	11	
SD	0	1	9	0	1	0	

IC₅₀ de anfotericina B, *Leishmania donovani* (642) 23-11-07

CONTROL (-) medio	CONTROL (+) parasit. AFO-B µg/mL	Promastigotes L.642 a diferentes concentraciones de AFO-B (µg/mL)						Blancos de AFO-B a diferentes concentraciones (µg/mL)						
			0,19	0,39	0,78	1,56	3,1		0,19	0,39	0,78	1,56	3,1	
0,398	2,125	0	2,125	0,577	0,564	0,576	0,552	0	0,391	0,396	0,372	0,423	0,398	
0,414	2,055	0	2,055	0,614	0,566	0,582	0,552	0	0,39	0,419	0,402	0,405	0,414	
0,414	2,055	0	2,055	0,614	0,566	0,582	0,522	0	0,39	0,419	0,402	0,405	0,414	
Promedio	0,409	2,078	0,000	2,078	0,602	0,565	0,580	0,542	0,000	0,390	0,411	0,392	0,411	0,409
SD	0,009237604	0,040414519	0	0,040414519	0,02136196	0,001154701	0,003464102	0,017320508	0	0,00057735	0,013279056	0,017320508	0,010392305	0,009237604

CONTROL (-) Blanco de color		Promastigotes L.642 a diferentes concentraciones de AFO-B (µg/mL)				
		0,19	0,39	0,78	1,56	3,1
1,73	0,00	1,73	0,18	0,19	0,15	0,15
1,64	0,00	1,67	0,20	0,16	0,18	0,14
1,64	0,00	1,67	0,20	0,16	0,18	0,11
Promedio	1,67	0,00	1,69	0,19	0,17	0,13
SD	0,05	0,00	0,04	0,01	0,02	0,01

% de Supervivencia

AFO-B µg/mL		0,19	0,39	0,78	1,56	3,1
	0	100	10	11	9	9
	0	101	12	10	11	8
	0	101	12	10	11	7
Promedio	0	101	11	10	10	8
SD	0	1	1	1	1	1

Concentración de AFO-B	% inhib	IC ₅₀
3,1	92	
1,56	90	0,9
0,78	90	
0,39	89	
0,19	0	

IC₅₀ de CAT, *Leishmania amazonensis* (690) 1-12-07 2007

	Control (-) medio	Control (+) parasit. CAT µg/mL)	Promastigotes L.690 a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)					Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
				6.25	12.5	25	50	100		6.25	12.5	25	50	100
	0,402	1,516	0	1,516	1,466	1,051	0,477	0,497	0	0,367	0,37	0,345	0,375	0,402
	0,389	1,636	0	1,636	1,387	0,914	0,44	0,458	0	0,359	0,359	0,346	0,374	0,389
	0,389	1,636	0	1,636	1,387	0,914	0,44	0,458	0	0,359	0,359	0,346	0,374	0,389
Promedio	0,393	1,596	0,000	1,636	1,413	0,960	0,452	0,471	0,000	0,362	0,363	0,346	0,374	0,393
SD														

	Control (-) Blanco de color						
	1,11	0,00	1,15	1,10	0,71	0,10	0,11
	1,25	0,00	1,28	1,03	0,57	0,07	0,07
	1,25	0,00	1,28	1,03	0,57	0,07	0,06
Promedio	1,20	0,00	1,23	1,05	0,61	0,08	0,08
SD	0,08	0,00	0,07	0,04	0,08	0,02	0,02

% de Supervivencia	CAT µg/mL		6.25	12.5	25	50	100
	0	102	82	46	5	6	
	0	102	82	46	5	5	
Promedio	0	103	88	51	7	7	
SD	0	0	9	10	2	3	

Concentración de CAT	% inhib	IC ₅₀
100	93	
50	93	39,2
25	49	
12,5	12	
6,25	0	

IC₅₀ de CAT, *Leishmania chagasi* (pp75) 1-12-07- 2007

Control (-) medio	Control (+) parasit. CAT(µg/mL)	Promastigotes L. pp75 a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
			6.25	12.5	25	50	100		6.25	12.5	25	50	100	
0,402	1,493	0	1,493	1,184	0,548	0,412	0,477	0	0,367	0,37	0,345	0,375	0,402	
0,389	1,53	0	1,53	1,163	0,667	0,443	0,466	0	0,359	0,359	0,346	0,374	0,389	
0,389	1,53	0	1,53	1,163	0,667	0,443	0,466	0	0,359	0,359	0,346	0,374	0,389	
Promedio	0,393	1,518	0,000	1,518	1,170	0,627	0,433	0,470	0,000	0,362	0,363	0,346	0,374	0,393
SD	0,00750	0,021	0	0,021	0,0121	0,0687	0,0178	0,0063	0	0,004	0,006	0,0005	0,0005	0,007

Control (-) Blanco de color			6.25	12.5	25	50	100
1,14	0,00	1,17	0,80	0,32	0,07	0,08	
1,14	0,00	1,17	0,80	0,32	0,07	0,07	
Promedio	1,12	0,00	1,16	0,81	0,28	0,06	0,08
SD	0,03	0,00	0,03	0,01	0,07	0,02	0,01

CAT(µg/mL)		6.25	12.5	25	50	100
0	103	70	28	6	7	
0	103	70	28	6	6	
Promedio	0	103	72	25	5	7
SD	0	0	2	6	2	1

% de Supervivencia

Concentración de CAT	% inhib	IC ₅₀
100	93	
50	95	33,0
25	75	
12,5	28	
6,25	0	

IC₅₀ de CAT, *Leishmania spp* (L.BTE-002) 1-12-07-2007

CONTROL (-) medio	CONTROL (+) parasit. CAT(µg/mL)	Promastigotes L. BTE-002 a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
			6.25	12.5	25	50	100		6.25	12.5	25	50	100	
0,402	2,19	0	2,151	0,636	0,467	0,449	0,483	0	0,367	0,37	0,345	0,375	0,402	
0,389	2,14	0	2,085	0,588	0,469	0,456	0,467	0	0,359	0,359	0,346	0,374	0,389	
0,389	2,14	0	2,085	0,588	0,469	0,456	0,467	0	0,359	0,359	0,346	0,374	0,389	
Promedio	0,393	2,157	0,000	2,107	0,604	0,468	0,454	0,472	0,000	0,362	0,363	0,346	0,374	0,393
SD														

Control (-) Blanco de color		6.25	12.5	25	50	100
1,79	0,00	1,78	0,27	0,12	0,07	0,09
1,75	0,00	1,73	0,23	0,12	0,08	0,08
1,75	0,00	1,73	0,23	0,12	0,08	0,07
Promedio	1,76	0,00	1,75	0,24	0,12	0,08
SD	0,02	0,00	0,03	0,02	0,00	0,01

% de Supervivencia	CAT(µg/mL)	6.25	12.5	25	50	100
		0	100	15	7	4
	0	99	13	7	5	4
	0	99	13	7	5	4
Promedio	0	99	14	7	5	5
SD	0	1	1	0	0	1

Concentración de CAT	% inhib	IC ₅₀
100	95	
50	95	26,9
25	93	
12,5	86	
6,25	1	

IC₅₀ de CAT, *Leishmania donovani* (642) 1-12-07-2007

	CONTROL L (-) medio	CONTROL (+) parasit.	Promastigotes L.642 a diferentes concentraciones de CAT(µg/mL)					Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
		CAT(µg/mL)		6.25	12.5	25	50	100		6.25	12.5	25	50	100
		0,402	1,001	0	1,001	0,612	0,428	0,433	0,454	0	0,367	0,37	0,345	0,375
	0,389	1,388	0	1,388	0,607	0,428	0,42	0,441	0	0,359	0,359	0,346	0,374	0,389
	0,389	1,388	0	1,388	0,607	0,428	0,42	0,441	0	0,359	0,359	0,346	0,374	0,389
Promedio	0,393	1,259	0,000	1,259	0,609	0,428	0,424	0,445	0,000	0,362	0,363	0,346	0,374	0,393
SD														

	Control (-)		6.25	12.5	25	50	100
	Blanco						
	0,60	0,00	0,63	0,24	0,08	0,06	0,07
	1,00	0,00	1,03	0,25	0,08	0,05	0,05
	1,00	0,00	1,03	0,25	0,08	0,05	0,05
Promedio	0,87	0,00	0,90	0,25	0,08	0,05	0,05
SD	0,23	0,00	0,23	0,00	0,00	0,01	0,01

% de Supervivencia	CAT(µg/mL)		6.25	12.5	25	50	100
		0	106	40	14	10	11
	0	103	25	8	5	5	
	0	103	25	8	5	5	
Promedio	0	104	30	10	6	7	
SD	0	2	9	3	3	3	

Concentración de CAT	% inhib	IC ₅₀
100	93	
50	94	27,6
25	90	
12,5	70	
6,25	0	

IC₅₀ de Anfotericina B, *Leishmania donovani* (642) 1-12-07-2007

Control (-) medio	Control (+) parasit. AFO (µg/mL)	Promastigotes L.642 a diferentes concentraciones de AFO-B(µg/mL)						Blancos de AFO-B a diferentes concentraciones (µg/mL)						
			0,19	0,39	0,78	1,56	3,1		0,19	0,39	0,78	1,56	3,1	
0,402	1,389	0	1,781	1,389	0,747	0,446	0,446	0	0,367	0,37	0,345	0,375	0,402	
0,389	1,274	0	1,633	1,274	0,747	0,456	0,425	0	0,359	0,359	0,346	0,374	0,389	
0,389	1,274	0	1,633	1,274	0,747	0,456	0,425	0	0,359	0,359	0,346	0,374	0,389	
Promedio	0,393	1,312	0,000	1,682	1,312	0,747	0,453	0,432	0,000	0,362	0,363	0,346	0,374	0,393
SD	0,007505553	0,0663	0	0,085	0,066	0	0,0057	0,012	0	0,0046	0,00635	0,00057	0,00057	0,0075

Control (-) Blanco de color			0,19	0,39	0,78	1,56	3,1
0,99	0,00	0,00	1,41	1,02	0,40	0,07	0,06
0,89	0,00	0,00	1,27	0,92	0,40	0,08	0,04
0,89	0,00	0,00	1,27	0,92	0,40	0,08	0,03
Promedio	0,92	0,00	1,32	0,95	0,40	0,08	0,04
SD	0,06	0,00	0,08	0,06	0,00	0,01	0,01

% de Supervivencia	AFO-B(µg/mL)		0,19	0,39	0,78	1,56	3,1
		0	0	143	103	41	7
	0	0	144	103	45	9	4
	0	0	144	103	45	9	4
Promedio	0	0	144	103	44	9	4
SD	0	0	0	0	3	1	1

Concentración AFO-B	% inhib	IC ₅₀
3,1	96	
1,56	91	1,3
0,78	56	
0,39	0	
0,19	0	

IC₅₀ de CAT, *Leishmania amazonensis* (Lma) 1-12-07-2007

	Control (-) medio	Control (+) parasit. CAT(µg/mL)	Promastigotes Lma a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)					
			3.12	6.25	12.5	25	50	100	3.12	6.25	12.5	25	50	100
	1,104	2,671	0	2,397	2,471	1,139	1,014	1,038	0	1,108	1,1	1,097	1,1	1,104
	1,1	2,626	0	2,361	2,396	1,034	1,047	1,022	0	1,118	1,094	1,023	1,003	1,112
	1,097	2,454	0	2,474	2,419	1,059	1,049	1,049	0	1,118	1,094	1,023	1,003	1,112
Promedio	1,100	2,584	0,000	2,411	2,429	1,077	1,037	1,036	0,000	1,115	1,096	1,048	1,035	1,109
SD	0,0035	0,11452	0	0,0577	0,0384	0,0548	0,0196	0,0135	0	0,0057	0,0034	0,042	0,056	0,004

	Control (-) Blanco de color	Promastigotes Lma a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)					
		3.12	6.25	12.5	25	50	100
	1,57	0,00	1,29	1,37	0,04	-0,09	-0,07
	1,53	0,00	1,24	1,30	0,01	0,04	-0,09
	1,36	0,00	1,36	1,33	0,04	0,05	-0,06
Promedio	1,48	0,00	1,30	1,33	0,03	0,00	-0,07
SD	0,11	0,00	0,06	0,04	0,02	0,08	0,01

% de Supervivencia	CAT(µg/mL)	3.12	6.25	12.5	25	50	100
		0	82	87	3	-5	-5
	0	81	85	1	3	-6	
	0	100	98	3	3	-4	
Promedio	0	88	90	2	0	-5	
SD	0	10	7	1	5	1	

Concentración de CAT	% inhib	IC ₅₀
100	100	
50	100	22,8
25	98	
12,5	10	
6,25	0	

IC₅₀ de anfotericina B, amastigotes axénicos *Leishmania amazonensis* (Lma) 1-12-07-2007

Control (-) medio	Control (+)	Amastigotes axénicos Lma diferentes concentraciones de AFO-B(µg/mL)						Blancos de AFO-B a diferentes concentraciones (µg/mL)						
	parasit. AFO-B ug/mL		0,19	0,39	0,78	1,56	3,1		0,19	0,39	0,78	1,56	3,1	
1,125	2,671	0	2,474	2,358	1,133	1,075	1,068	0	1,108	1,1	1,097	1,1	1,104	
1,095	2,626	0	2,433	2,605	1,105	1,064	1,076	0	1,118	1,094	1,023	1,003	1,112	
1,095	2,454	0	2,433	2,605	1,105	1,064	1,076	0	1,118	1,094	1,023	1,003	1,112	
Promedio	1,105	2,584	0,000	2,447	2,523	1,114	1,068	1,073	0,000	1,115	1,096	1,048	1,035	1,109
SD	0,017320508	0,114526562	0	0,0236	0,142	0,016	0,0063	0,0046	0	0,0057	0,0034	0,0427	0,0560	0,0046

Control (-)		Blanco de					
color		0,19	0,39	0,78	1,56	3,1	
1,55	0,00	1,37	1,26	0,04	-0,03	-0,04	
1,53	0,00	1,32	1,51	0,08	0,06	-0,04	
1,36	0,00	1,32	1,51	0,08	0,06	-0,03	
Promedio	1,48	0,00	1,33	1,43	0,07	0,03	-0,04
SD	0,10	0,00	0,03	0,15	0,03	0,05	0,01

		Concent	% inhib	IC ₅₀			
% de Sobrevivencia	AFO-B ug/mL	0,19	0,39	0,78	1,56	3,1	
		0	88	81	2	-2	-3
		0	86	99	5	4	-2
		0	97	111	6	4	-2
	Promedio	0	90	97	5	2	-3

3,1	100	
1,56	98	0,8
0,78	95	
0,39	3	

IC₅₀ CAT *Leishmania amazonensis* (690) 14-12-07 2007

Control(-) medio	Control (+) parasit. CAT(µg/mL)	Promastigotes L690 a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
		0	6.25	12.5	25	50	100	0	6.25	12.5	25	50	100	
0,411	2,482	0	2,333	2,297	1,027	0,481	0,472	0	0,336	0,339	0,313	0,338	0,367	
0,422	2,566	0	2,333	2,109	0,88	0,468	0,488	0	0,331	0,323	0,32	0,334	0,367	
0,422	2,566	0	2,333	2,109	0,88	0,468	0,488	0	0,331	0,323	0,32	0,334	0,367	
Promeio	0,418	2,538	0,000	1,636	2,172	0,929	0,472	0,483	0,000	0,333	0,328	0,318	0,335	0,367
SD	0,006350853	0,048497423	0	0	0,108	0,0848	0,00750	0,00923	0	0,0028	0,0092	0,0040	0,0023	0,367

Control (-) Blanco de		Promastigotes L690 a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)					
color		0	6.25	12.5	25	50	100
2,07	0,00	2,00	1,96	0,71	0,14	0,11	
2,14	0,00	2,00	1,79	0,56	0,13	0,12	
2,14	0,00	2,00	1,79	0,56	0,13	0,12	
Promedio	2,12	0,00	2,00	1,84	0,61	0,14	0,12
SD	0,04	0,00	0,00	0,10	0,09	0,01	0,01

% de Supervivencia	CAT(µg/mL)	Promastigotes L690 a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						Concentración de CAT	% inhib	IC ₅₀
		0	6.25	12.5	25	50	100			
	0	96	95	34	7	5	100	95		
	0	93	83	26	6	6	50	94	34,6	
	0	93	83	26	6	6	25	71		
	0	93	83	26	6	6	12,5	13		
	0	93	83	26	6	6	6,25	6		
Promedio	0	94	87	29	6	5				
SD	0	2	6	5	0	0				

IC₅₀ de CAT, *Leishmania chagasi* (pp75) 14-12-07

Control (-) medio	Control (+)	Promastigotes Lpp75 a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
	parasit. CAT(µg/mL)		6.25	12.5	25	50	100		6.25	12.5	25	50	100	
0,411	2,499	0	2,246	2,069	0,509	0,468	0,501	0	0,336	0,339	0,313	0,338	0,367	
0,422	2,438	0	2,219	1,893	0,682	0,44	0,448	0	0,331	0,323	0,32	0,334	0,367	
0,422	2,438	0	2,219	1,893	0,682	0,44	0,448	0	0,331	0,323	0,32	0,334	0,367	
Promedio	0,418	2,458	0,000	2,228	1,952	0,624	0,449	0,466	0,000	0,333	0,328	0,318	0,335	0,367
SD	0,00635	0,03521	0	0,0155	0,1016	0,099	0,016	0,0305	0	0,002	0,009	0,004	0,0023	0,367

Control (-) Blanco de color	Promastigotes Lpp75 a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						
		6.25	12.5	25	50	100	
2,09	0,00	1,91	1,73	0,20	0,13	0,13	
2,02	0,00	1,89	1,57	0,36	0,11	0,08	
2,02	0,00	1,89	1,57	0,36	0,11	0,08	
Promedio	2,04	0,00	1,90	1,62	0,31	0,11	0,10
SD	0,04	0,00	0,01	0,09	0,10	0,01	0,03

Concent	% inhib	IC ₅₀
100	95	
50	94	31,9
25	85	
12,5	20	
6,25	7	

% de Supervivencia	CAT(µg/mL)	Promastigotes Lpp75 a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)					
			6.25	12.5	25	50	100
	0	91	83	9	6	6	
	0	94	78	18	5	4	
	0	94	78	18	5	4	
Promedio	0	93	80	15	6	5	
SD	0	1	3	5	1	1	

IC₅₀ de CAT, *Leishmania spp* (L.BTE-002) 14-12-07

Control (-) medio	Control (+) parasit. CAT(µg/mL)	Promastigotes LBTE-002 a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
		3.12	6.25	12.5	25	50	100	3.12	6.25	12.5	25	50	100	
0,411	2,248	0	2,035	1,279	0,53	0,516	0,541	0	0,336	0,339	0,313	0,338	0,367	
0,422	2,394	0	2,159	1,05	0,478	0,489	0,528	0	0,331	0,323	0,32	0,334	0,367	
0,422	2,394	0	2,159	1,05	0,478	0,489	0,528	0	0,331	0,323	0,32	0,334	0,367	
Promedio	0,418	2,345	0,000	2,118	1,126	0,495	0,498	0,532	0,000	0,333	0,328	0,318	0,335	0,367
SD	0,0063	0,084	0	0,071	0,1322	0,030	0,0155	0,0075	0	0,0028	0,0092	0,0040	0,0023	0,367

Control (-) Blanco de color		3.12	6.25	12.5	25	50	100
	1,84	0,00	1,70	0,94	0,22	0,18	0,17
	1,97	0,00	1,83	0,73	0,16	0,16	0,16
	1,97	0,00	1,83	0,73	0,16	0,16	0,16
Promedio	1,93	0,00	1,79	0,80	0,18	0,16	0,17
SD	0,08	0,00	0,07	0,12	0,03	0,01	0,01

% de Supervivencia

CAT(µg/mL)	3.12	6.25	12.5	25	50	100
	0	92	51	12	10	9
	0	93	37	8	8	8
	0	93	37	8	8	8
Promedio	0	93	42	9	8	9
SD	0	0	8	2	1	1

Concentración CAT	% inhib	IC ₅₀
100	91	
50	92	27,0
25	91	
12,5	58	
6,25	7	

IC₅₀ CAT, *Leishmania donovani* (642) 14-12-07

	Control (-) medio	Control (+) parasit. CAT(µg/mL)	Promastigotes L.642 a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)					Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
			3.12	6.25	12.5	25	50	100	3.12	6.25	12.5	25	50	100
	0,411	1,488	0	1,488	0,701	0,394	0,452	0,495	0	0,336	0,339	0,313	0,338	0,367
	0,422	1,276	0	1,276	0,819	0,39	0,442	0,515	0	0,331	0,323	0,32	0,334	0,367
	0,422	1,276	0	1,276	0,819	0,39	0,442	0,515	0	0,331	0,323	0,32	0,334	0,367
Promedio	0,418	1,347	0,000	1,347	0,780	0,391	0,445	0,508	0,000	0,333	0,328	0,318	0,335	0,367
SD	0,0063	0,122	0	0,122	0,068	0,0023	0,0057	0,0115	0	0,0028	0,0092	0,0040	0,00230	0,376

Sans interferantia	Control (-) Blanco de							
	color		3.12	6.25	12.5	25	50	100
	1,08	0,00	1,15	0,36	0,08	0,11	0,13	
	0,85	0,00	0,95	0,50	0,07	0,11	0,15	
	0,85	0,00	0,95	0,50	0,07	0,11	0,15	
Promedio	0,93	0,00	1,01	0,45	0,07	0,11	0,14	
SD	0,13	0,00	0,12	0,08	0,01	0,00	0,01	

% de Supervivencia

CAT(µg/mL)	3.12	6.25	12.5	25	50	100
	0	107	34	8	11	12
	0	111	58	8	13	17
	0	111	58	8	13	17
Promedio	0	109	50	8	12	16
SD	0	2	14	0	1	3

Concentracion CAT	% inhib	IC ₅₀
100	84	
50	88	31,2
25	92	
12,5	50	
6,25	0	

IC₅₀ de anfotericina B, *Leishmania donovani* (642) 14-12-07

Control (-) medio	Control (+)	Promastigotes L.642 a diferentes concentraciones de AFO-B (µg/mL)						Blancos de AFO-B a diferentes concentraciones (µg/mL)						
	parasit.	AFO-B(µg/mL)	0,19	0,39	0,78	1,56	3,1		0,19	0,39	0,78	1,56	3,1	
0,411	1,252	0	1,252	1,016	0,471	0,486	0,465	0	0,336	0,339	0,313	0,338	0,367	
0,422	1,135	0	1,135	1,016	0,454	0,471	0,448	0	0,331	0,323	0,32	0,334	0,367	
0,422	1,135	0	1,135	1,016	0,454	0,471	0,448	0	0,331	0,323	0,32	0,334	0,367	
Promedio	0,418	1,174	0,000	1,174	1,016	0,460	0,476	0,454	0,000	0,333	0,328	0,318	0,335	0,367
SD	0,0063	0,0675	0	0,06754	0	0,009	0,0086	0,0098	0	0,00288	0,0092	0,00404	0,0023	0,367

Control (-)		Blanco de color					
		0,19	0,39	0,78	1,56	3,1	
	0,84	0,00	0,92	0,68	0,16	0,15	0,10
	0,71	0,00	0,80	0,69	0,13	0,14	0,08
	0,71	0,00	0,80	0,69	0,13	0,14	0,08
Promedio	0,76	0,00	0,84	0,69	0,14	0,14	0,09
SD	0,07	0,00	0,06	0,01	0,01	0,01	0,01

Concentracion AFO-B	% inhib	IC ₅₀
3,1	89	
1,56	81	1,2
0,78	81	
0,39	8	
0,19	0	

AFO-B(µg/mL)		0,19	0,39	0,78	1,56	3,1	
	0	109	80	19	18	12	
	0	113	97	19	19	11	
	0	113	97	19	19	11	
% de Supervivencia	Promedio	0	111	92	19	19	11
	SD	0	2	10	0	1	0

IC₅₀ de CAT, *Leishmania amazonensis* (Lma) 14-12-07

Control (-) medio	Control (+) parasit.	Promastigotes Lma a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
		CAT (µg/mL)	6.25	12.5	25	50	100		6.25	12.5	25	50	100	
1,051	1,991	0	1,991	1,25	1,039	1,031	1,034	0	1,061	1,061	1,027	1,04	1,051	
1,042	1,862	0	1,862	1,211	1,033	1,019	1,019	0	1,14	1,14	1,095	1,134	1,042	
1,042	1,75	0	1,75	1,202	1,046	1,036	1,025	0	1,14	1,14	1,095	1,134	1,042	
Promedio	1,045	1,868	0,000	1,868	1,221	1,039	1,029	1,026	0,000	1,114	1,114	1,072	1,103	1,045
SD	0,00519	0,1205	0	0,1205	0,025	0,0065	0,0087	0,0075	0	0,0456	0,0456	0,039	0,054	0,0051

Control (-) Blanco de							
color		6.25	12.5	25	50	100	
0,94	0,00	0,93	0,19	0,01	-0,01	-0,01	
0,82	0,00	0,72	0,07	-0,06	-0,12	-0,02	
0,71	0,00	0,61	0,06	-0,05	-0,10	-0,02	
Promedio	0,82	0,00	0,75	0,11	-0,03	-0,07	-0,02
SD	0,12	0,00	0,16	0,07	0,04	0,06	0,01

Concentración CAT	% inhib	IC ₅₀
100	100	
50	100	23,4
25	100	
12,5	87	
6,25	9	

% de Supervivencia

CAT (µg/mL)		6.25	12.5	25	50	100
	0	99	20	1	-1	-1
	0	88	9	-8	-14	-3
	0	86	9	-7	-14	-3
Promedio	0	91	13	-4	-10	-2
SD	0	7	7	5	7	1

IC₅₀ de anfotericina B sobre amastigotes axénicos de Lma 14-12-07

	Control (-) medio	Control (+) parasit.	Promastigotes Lma a diferentes concentraciones de AFO-B (µg/mL)					Blancos de AFO-B a diferentes concentraciones (µg/mL)						
			0,19	0,39	0,78	1,56	3,1	0,19	0,39	0,78	1,56	3,1		
	1,042	2,221	0	2,08	1,663	1,096	1,106	1,097	0	1,061	1,061	1,027	1,04	1,051
	1,253	2,258	0	2,093	1,563	1,089	1,103	1,087	0	1,14	1,14	1,095	1,134	1,042
	1,253	2,274	0	2,093	1,563	1,089	1,103	1,087	0	1,14	1,14	1,095	1,134	1,042
Promedio	1,183	2,251	0,000	2,089	1,596	1,091	1,104	1,090	0,000	1,114	1,114	1,072	1,103	1,045
SD	0,121	0,027	0	0,0075	0,057	0,0040	0,0017	0,0057	0	0,0456	0,0456	0,0392	0,0542	0,0051

	Control (-) Blanco de color		0,19	0,39	0,78	1,56	3,1
			1,18	0,00	1,02	0,60	0,07
	1,01	0,00	0,95	0,42	-0,01	-0,03	0,04
	1,02	0,00	0,95	0,42	-0,01	-0,03	0,04
Promedio	1,07	0,00	0,98	0,48	0,02	0,00	0,05
SD	0,10	0,00	0,04	0,10	0,04	0,06	0,01

Concentracion CAT	% inhib	IC ₅₀
3,1	96	
1,56	100	0,8
0,78	100	
0,39	59	
0,19	7	

	Paras(+) diluc CAT	3.125 ug/ml	0,19	0,39	0,78	1,56	3,1
			0	86	51	6	6
	0	95	42	-1	-3	4	
	0	93	41	-1	-3	4	
% de Supervivencia	Promedio	0	92	45	2	0	4

IC₅₀ de CAT, *Leishmania amazonensis* (PH 8) 1-12-07

Control (-)	Control (+)	Promastigotes LPH8 a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
		parasit.												
Medio	CAT (µg/mL)		6.25	12.5	25	50	100		6.25	12.5	25	50	100	
0,438	1,281	0	1,281	0,839	0,6	0,619	0,833	0	0,402	0,412	0,402	0,431	0,454	
0,441	1,233	0	1,233	1,133	0,607	0,641	0,841	0	0,405	0,415	0,406	0,448	0,463	
0,441	1,233	0	1,233	1,133	0,607	0,641	0,841	0	0,405	0,415	0,406	0,448	0,463	
Promedio	0,440	1,249	0,000	1,636	1,035	0,605	0,634	0,838	0,000	0,404	0,414	0,405	0,442	0,460
SD	0,00173	0,0277	0	0,027	0,169	0,0040	0,0127	0,0046	0	0,0017	0,00173	0,00230	0,0098	0,0051

Control (-)	Blanco de color	Promastigotes LPH8 a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)					
			6.25	12.5	25	50	100
	0,84	0,00	0,88	0,43	0,20	0,19	0,37
	0,79	0,00	0,83	0,72	0,20	0,19	0,38
	0,79	0,00	0,83	0,72	0,20	0,19	0,38
Promedio	0,81	0,00	0,85	0,62	0,20	0,19	0,38
SD	0,03	0,00	0,03	0,17	0,00	0,00	0,01

Concentración de CAT	% inhib	IC ₅₀
50	76	33,3
25	75	
12,5	33	
6,25	0	

% de Supervivencia	CAT (µg/mL)	Promastigotes LPH8 a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)					
			6.25	12.5	25	50	100
		0	104	51	23	22	
		0	105	91	25	24	
		0	105	91	25	24	
Promedio		0	104	77	25	24	
SD		0	0	23	1	1	

IC₅₀ de CAT, *Leishmania braziliensis* (M2903) 1-12-07

	CONTROL (-) medio	CONTROL (+) parasit.	Promastigotes L M2903 diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)					Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
				6.25	12.5	25	50	100		6.25	12.5	25	50	100
	0,438	1,369	0	1,357	1,225	0,668	0,609	0,854	0	0,402	0,412	0,402	0,431	0,454
	0,441	1,326	0	1,399	1,236	0,679	0,625	0,86	0	0,405	0,415	0,406	0,448	0,463
	0,441	1,326	0	1,399	1,236	0,679	0,625	0,86	0	0,405	0,415	0,406	0,448	0,463
Promedio	0,440	1,340	0,000	1,385	1,232	0,675	0,620	0,858	0,000	0,404	0,414	0,405	0,442	0,460
SD	0,00173	0,0248	0	0,0242	0,0063	0,00635	0,0092	0,0034	0	0,00173	0,00173	0,0023	0,0098	0,00519

	Control (-) Blanco de color	Promastigotes L M2903 diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)					
		3.12	6.25	12.5	25	50	100
	0,93	0,00	0,96	0,81	0,27	0,18	0,39
	0,89	0,00	0,99	0,82	0,27	0,18	0,40
	0,89	0,00	0,99	0,82	0,27	0,18	0,40
promedio	0,90	0,00	0,98	0,82	0,27	0,18	0,40
SD	0,03	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00

% de Supervivencia	CAT µg/mL	3.12	6.25	12.5	25	50	100
			0	103	87	29	19
		0	112	93	31	20	45
		0	112	93	31	20	45
Promedio		0	109	91	30	20	44
SD		0	6	3	1	1	2

Concentración CAT	% inhib	IC ₅₀
50	80	37,4
25	70	
12,5	9	
6,25	0	

IC₅₀ de CAT *Leishmania amazonensis* (Lma) 1-12-07

Control (-) medio	Control (+) parasit.	Promastigotes Lma a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
			6.25	12.5	25	50	100		6.25	12.5	25	50	100	
0,438	2,286	0	1,967	1,597	0,875	0,684	0,732	0	0,402	0,412	0,402	0,431	0,454	
0,441	2,359	0	1,946	1,41	0,79	0,685	0,742	0	0,405	0,415	0,406	0,448	0,463	
0,441	2,359	0	1,946	1,41	0,79	0,685	0,742	0	0,405	0,415	0,406	0,448	0,463	
Promedio	0,440	2,335	0,000	1,953	1,472	0,818	0,685	0,739	0,000	0,404	0,414	0,405	0,442	0,460
SD	0,00173	0,042	0	0,0121	0,107	0,0490	0,00057	0,0057	0	0,00171	0,00173	0,0023	0,0098	0,0051

Control (-) Blanco de color		Promastigotes Lma a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)					
			6.25	12.5	25	50	100
1,85	0,00	1,57	1,19	0,47	0,25	0,27	
1,92	0,00	1,54	1,00	0,38	0,24	0,28	
1,92	0,00	1,54	1,00	0,38	0,24	0,28	
Promedio	1,89	0,00	1,55	1,06	0,41	0,24	0,28
SD	0,04	0,00	0,01	0,11	0,05	0,01	0,01

Concentración de CAT	% inhib	IC ₅₀
100	85	
50	87	27,4
25	78	
12,5	44	
6,25	18	

% de Supervivencia

CAT (µg/mL)		6.25	12.5	25	50	100
	0	85	64	26	14	15
	0	80	52	20	12	15
	0	80	52	20	12	15
Promedio	0	82	56	22	13	15
SD	0	3	7	3	1	0

IC₅₀ de CAT, *Leishmania amazonensis* (LA) 1-12-07

Control - medio	Control (+) parasit.	Promastigotes LA a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)					Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
		6.25	12.5	25	50	100	6.25	12.5	25	50	100		
0,438	2,297	2,225	1,047	0,601	0,672	0,681	0	0,402	0,412	0,402	0,431	0,454	
0,441	2,302	2,268	1,197	0,641	0,662	0,696	0	0,405	0,415	0,406	0,448	0,463	
0,441	2,302	2,268	1,197	0,641	0,662	0,696	0	0,405	0,415	0,406	0,448	0,463	
Promedio	0,440	2,300	2,254	1,147	0,628	0,665	0,691	0,000	0,404	0,414	0,405	0,442	0,460
SD	0,00173	0,0021	0,0248	0,086	0,0230	0,0057	0,0086	0	0,0017	0,0017	0,0023	0,0098	0,00519

Control (-) Blanco de color	Promastigotes LA a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)				
	6.25	12.5	25	50	100
1,86	1,82	0,64	0,20	0,24	0,22
1,86	1,86	0,78	0,24	0,21	0,23
1,86	1,86	0,78	0,24	0,21	0,24
Promedio	1,86	1,85	0,73	0,22	0,22
SD	0,00	0,02	0,08	0,02	0,02

Concent	% inhib	IC ₅₀
100	88	
50	88	26,9
25	88	
12,5	61	
6,25	1	

% de Supervivencia	CAT (µg/mL)	Promastigotes LA a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)				
		6.25	12.5	25	50	100
	98	34	11	13	12	
	100	42	13	11	13	
	100	42	13	11	13	
Promedio		99	39	12	12	
SD	0	1	5	1	1	

IC₅₀ de anfotericina B, promastigotes de *Leishmania amazonensis* (LA) 1-12-07

	Control (-)	Control (+)	Promastigotes LA a diferentes concentraciones de AFO-B (µg/mL)					Blancos de AFO-B a diferentes concentraciones (µg/mL)						
	medio	parasit.		0,19	0,39	0,78	1,56	3,1		0,19	0,39	0,78	1,56	3,1
	0,438	2,296	0	2,304	2,251	0,978	1,211	0,654	0	0,402	0,412	0,402	0,431	0,454
	0,441	2,244	0	2,291	2,247	0,869	1,032	0,641	0	0,405	0,415	0,406	0,448	0,463
	0,441	2,244	0	2,291	2,247	0,869	1,032	0,641	0	0,405	0,415	0,406	0,448	0,463
Promedio	0,440	2,261	0,000	2,295	2,248	0,905	1,092	0,645	0,000	0,404	0,414	0,405	0,442	0,460
SD	0,00171	0,030	0	0,007	0,002	0,062	0,103	0,007	0	0,0017	0,0017	0,0023	0,0098	0,0051

	Control (-)	Blanco de color					
			0,19	0,39	0,78	1,56	3,1
	1,86	0,00	1,90	1,84	0,58	0,78	0,19
	1,80	0,00	1,89	1,83	0,46	0,58	0,18
	1,80	0,00	1,89	1,83	0,46	0,58	0,18
Promedio	1,82	0,00	1,89	1,83	0,50	0,65	0,18
SD	0,03	0,00	0,01	0,00	0,07	0,11	0,01

Concentración AFO-B	% inhib	IC ₅₀
3,1	90	
1,56	64	1,3
0,78	73	
0,39	0	
0,19	0	

AFO-B (µg/mL)		0,19	0,39	0,78	1,56	3,1
	0	102	99	31	42	10
	0	105	102	26	32	10
	0	105	102	26	32	10
Promedio	0	104	101	27	36	10
SD	0	1	2	3	6	0

IC₅₀ de CAT, *Leishmania amazonensis* (PH 8) 14-12-07 2007

Control(-) medio	Control(+) parasit.	Promastigotes L.PH8 diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
		3.12	6.25	12.5	25	50	100	3.12	6.25	12.5	25	50	100	
0,418	1,165	0	1,165	1,165	0,503	0,52	0,638	0	0,371	0,362	0,36	0,384	0,408	
0,431	1,228	0	1,228	1,008	0,513	0,534	0,646	0	0,359	0,361	0,351	0,39	0,414	
0,431	1,288	0	1,288	1,008	0,513	0,534	0,646	0	0,359	0,361	0,351	0,39	0,414	
promedio	0,427	1,227	0,000	1,636	1,060	0,510	0,529	0,643	0,000	0,363	0,361	0,354	0,388	0,412
SD	0,0075	0,061	0	0,061	0,0906	0,0057	0,0080	0,0046	0	0,0069	0,0005	0,0051	0,0034	0,0034

Sans interferantia

Control(-) Blanco de color	Promastigotes L.PH8 diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						
	3.12	6.25	12.5	25	50	100	
0,75	0,00	0,79	0,80	0,14	0,14	0,22	
0,80	0,00	0,87	0,65	0,16	0,14	0,23	
0,86	0,00	0,93	0,65	0,16	0,14	0,23	
promedio	0,80	0,00	0,86	0,70	0,16	0,14	0,23
SD	0,06	0,00	0,07	0,09	0,01	0,00	0,01

% de
Sobrevivencia

CAT (µg/mL)	3.12	6.25	12.5	25	50	100
	0	106	107	19	18	30
	0	109	81	20	18	29
	0	108	75	19	17	27
Promedio	0	108	88	19	18	29
SD	0	1	17	1	1	1

Concentración CAT	% inhib	IC ₅₀
100	70	
50	82	35,4
25	81	
12,5	12	
6,25	0	

IC₅₀ de CAT, *Leishmania braziliensis* (M2903) 14-12-07

Control (-) medio	Control (+) parasit.	Promastigotes L.M2903 diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
		3.12	6.25	12.5	25	50	100	3.12	6.25	12.5	25	50	100	
0,418	1,819	0	1,61	1,322	0,579	0,568	0,771	0	0,371	0,362	0,36	0,384	0,408	
0,431	1,712	0	1,576	1,387	0,589	0,569	0,761	0	0,359	0,361	0,351	0,39	0,414	
0,431	1,712	0	1,576	1,387	0,589	0,569	0,761	0	0,359	0,361	0,351	0,39	0,414	
Promedio	0,427	1,748	0,000	1,587	1,365	0,586	0,569	0,764	0,000	0,363	0,361	0,354	0,388	0,412

Control (-) Blanco de color	Promastigotes L.M2903 diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						
	3.12	6.25	12.5	25	50	100	
1,40	0,00	1,24	0,96	0,22	0,18	0,36	
1,28	0,00	1,22	1,03	0,24	0,18	0,35	
1,28	0,00	1,22	1,03	0,24	0,18	0,35	
Promedio	1,32	0,00	1,22	1,00	0,23	0,18	0,35
SD	0,07	0,00	0,01	0,04	0,01	0,00	0,01

Concentración CAT	% inhib	IC ₅₀
100	73	
50	86	31,5
25	82	
12,5	24	
6,25	7	

% de Supervivencia	CAT (µg/mL)	Promastigotes L.M2903 diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)					
		3.12	6.25	12.5	25	50	100
		0	88	69	16	13	25
		0	95	80	19	14	27
		0	95	80	19	14	27
Promedio		0	93	76	18	14	27
SD		0	4	7	2	0	1

IC₅₀ de CAT *Leishmania amazonensis* (LA) 14-12-07.

Control (-) medio	Control (+) parasit.	Promastigotes LA a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)							
		3.12	6.25	12.5	25	50	100	3.12	6.25	12.5	25	50	100		
0,418	2,417	0	2,257	1,975	0,64	0,646	0,611	0	0,371	0,362	0,36	0,384	0,408		
0,431	2,502	0	2,257	1,966	0,657	0,613	0,631	0	0,359	0,361	0,351	0,39	0,414		
0,431	2,502	0	2,304	1,966	0,657	0,613	0,631	0	0,359	0,361	0,351	0,39	0,414		
Promedio	0,427	2,474	0,000	2,273	1,969	0,651	0,624	0,624	0,00	0	0,363	0,361	0,354	0,388	0,412

Control (-) Blanco de color	Promastigotes LA a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						
	3.12	6.25	12.5	25	50	100	
2,00	0,00	1,89	1,61	0,28	0,26	0,20	
2,07	0,00	1,90	1,61	0,31	0,22	0,22	
2,07	0,00	1,95	1,61	0,31	0,22	0,22	
Promedio	2,05	0,00	1,91	1,61	0,30	0,24	0,21
SD	0,04	0,00	0,03	0,00	0,02	0,02	0,01

Concentración CAT	% inhib	IC ₅₀
100	90	
50	88	33,1
25	85	
12,5	21	
6,25	7	

% de Supervivencia	CAT (µg/mL)	Promastigotes LA a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)					
		3.12	6.25	12.5	25	50	100
		0	94	81	14	13	10
		0	92	77	15	11	10
		0	94	77	15	11	11
Promedio		0	93	79	15	12	10
SD		0	1	2	0	1	0

IC₅₀ de anfotericina B sobre promastigotes de *Leishmania amazonensis* (LA) 14-12-07.

CONTR OL (-)	CON TRO L (+)	Promastigotes LA diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
		0	0,19	0,39	0,78	1,56	3,1	0	0,19	0,39	0,78	1,56	3,1	
medio	parasit.													
0,418	2,33	0	2,333	2,343	0,813	0,643	0,633	0	0,371	0,362	0,36	0,384	0,408	
0,431	2,345	0	2,345	2,273	0,939	0,63	0,599	0	0,359	0,361	0,351	0,39	0,414	
0,431	2,345	0	2,345	2,273	0,939	0,63	0,599	0	0,359	0,361	0,351	0,39	0,414	
Promedio	0,427	2,340	0,000	2,341	2,296	0,897	0,634	0,610	0,000	0,363	0,361	0,354	0,388	0,412

Contr ol (-)	Blan co de color	Promastigotes LA diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)					
		0	0,19	0,39	0,78	1,56	3,1
1,91	0,00	1,96	1,98	0,45	0,26	0,22	
1,91	0,00	1,99	1,91	0,59	0,24	0,19	
1,91	0,00	1,99	1,91	0,59	0,24	0,19	
Promedio	1,91	0,00	1,98	1,94	0,54	0,25	0,20
SD	0,00	0,00	0,01	0,04	0,08	0,01	0,02

Concentracion AFO-B	% inhib	IC ₅₀
3,1	90	
1,56	87	1,2
0,78	72	
0,39	0	
0,19	0	

% de Supervivencia	Promedio	Promastigotes LA diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)					
		0	0,19	0,39	0,78	1,56	3,1
		0	103	104	24	14	11
		0	104	100	31	13	10
		0	104	100	31	13	10
	0	103	101	28	13	10	
	SD	0	1	2	4	1	1

IC₅₀ de CAT, *Leishmania amazonensis* (PH8) 13-8-07 2007

Control (-) medio	Control (+) parasit.	Promastigotes L.PH8 diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
		3.12	6.25	12.5	25	50	100	3.12	6.25	12.5	25	50	100	
0,403	3,576	2,207	2,521	2,782	2,047	0,619	0,809	0,429	0,371	0,368	0,364	0,38	0,387	
0,457	3,576	2,207	2,521	2,782	2,047	0,619	0,809	0,433	0,364	0,368	0,362	0,38	0,38	
0,457	3,576	2,207	2,521	2,782	2,047	0,619	0,809	0,433	0,364	0,368	0,362	0,38	0,38	
Promedio	0,439	3,576	2,207	2,521	2,782	2,047	0,619	0,809	0,432	0,366	0,368	0,363	0,380	0,382

Control (-) Blanco de color	Blancos de						
	3.12	6.25	12.5	25	50	100	
3,17	1,78	2,15	2,41	1,68	0,24	0,42	
3,12	1,77	2,16	2,41	1,69	0,24	0,43	
3,12	1,77	2,16	2,41	1,69	0,24	0,43	
Promedio	3,14	1,78	2,15	2,41	1,68	0,24	0,43
SD	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

% de Supervivencia	Blancos de						
	3.12	6.25	12.5	25	50	100	
	56	68	76	53	8	13	
	57	69	77	54	8	14	
	57	69	77	54	8	14	
Promedio	57	69	77	54	8	14	
SD	0	1	1	1	0	0	

Concentración CAT	% inhib	IC ₅₀
100	86	
50	92	30,5
25	46	
12,5	23	
6,25	31	

IC₅₀ de CAT, *Leishmania braziliensis* (M2903) 17 Agosto 2007

CONTROL (-) medio	CONTROL (+) parasit.	Promastigotes L.M2903 diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
		3.12	6.25	12.5	25	50	100	3.12	6.25	12.5	25	50	100	
0,448	1,576	0	1,144	1,005	0,64	0,65	0,786	0	0,371	0,368	0,364	0,38	0,387	
0,459	1,769	0	1,232	0,996	0,609	0,638	0,792	0	0,364	0,368	0,362	0,38	0,38	
0,44	1,769	0	1,232	0,996	0,609	0,638	0,792	0	0,364	0,368	0,362	0,38	0,38	
Promedio	0,449	1,705	0,000	1,203	0,999	0,619	0,642	0,790	0,000	0,366	0,368	0,363	0,380	0,382

Control (-)								
Blanco de color		3.12	6.25	12.5	25	50	100	
1,13	0,00	0,77	0,64	0,28	0,27	0,40		
1,31	0,00	0,87	0,63	0,25	0,26	0,41		
1,33	0,00	0,87	0,63	0,25	0,26	0,41		
Promedio	1,26	0,00	0,84	0,63	0,26	0,26	0,41	
SD	0,11	0,00	0,05	0,01	0,02	0,01	0,01	

Concentración CAT	% inhib	IC ₅₀
100	67	
50	79	27,8
25	79	
12,5	49	
6,25	33	

		3.12	6.25	12.5	25	50	100
		0	69	56	24	24	35
		0	66	48	19	20	31
		0	65	47	19	19	31
% de Supervivencia	Promedio	0	67	51	21	21	33
	SD	0	2	5	3	3	2

IC₅₀ de CAT, *Leishmania amazonensis*(LA) 27 julio 07

	CONTROL (-) medio(-)	CONTROL (+) parasit(+).	Promastigotes LA diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)					Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
			3.12	6.25	12.5	25	50	100	3.12	6.25	12.5	25	50	100
	0,341	3,562	3,562	2,89	0,776	0,666	0,679	0,718	0,352	0,323	0,332	0,326	0,344	0,405
	0,336	3,562	3,562	2,854	0,984	0,683	0,68	0,711	0,331	0,319	0,314	0,318	0,338	0,417
	0,399	3,562	3,562	2,854	0,984	0,683	0,68	0,711	0,351	0,327	0,324	0,33	0,353	0,409
Promedio	0,359	3,562	3,562	2,866	0,915	0,677	0,680	0,713	0,345	0,323	0,323	0,325	0,345	0,410

	Control (-) Blanco de color	Promastigotes LA diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)					
		3.12	6.25	12.5	25	50	100
	3,22	3,21	2,57	0,44	0,34	0,34	0,31
	3,23	3,23	2,54	0,67	0,37	0,34	0,29
	3,16	3,21	2,53	0,66	0,35	0,33	0,30
Promedio	3,20	3,22	2,54	0,59	0,35	0,33	0,30
SD	0,04	0,01	0,02	0,13	0,01	0,01	0,01

CAT (µg/mL)	Promastigotes LA diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						Concent	% inhib	IC ₅₀
	3.12	6.25	12.5	25	50	100	100	91	
	100	80	14	11	10	10	50	90	25,8
	100	79	21	11	11	9	25	89	
	102	80	21	11	10	10	12,5	82	
	102	80	21	11	10	10	6,25	21	
Promedio	100	79	18	11	10	9	3,125	0	
SD	1	1	4	0	0	0			

IC₅₀ de CAT, *Leishmania amazonensis*(Lma) 27 julio 07

	Control (-) medio	Control (+) parasit.	Promastigotes Lma a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)					
			3.12	6.25	12.5	25	50	100	3.12	6.25	12.5	25	50	100
	0,341	2,837	3,073	2,487	0,816	0,597	0,587	0,528	0,352	0,323	0,332	0,326	0,344	0,405
	0,336	2,489	3,098	2,2	0,878	0,645	0,63	0,611	0,331	0,319	0,314	0,318	0,338	0,417
	0,399	2,984	3,098	2,2	0,878	0,645	0,63	0,611	0,351	0,327	0,324	0,33	0,353	0,409
Promedio	0,359	2,770	3,090	2,296	0,857	0,629	0,616	0,583	0,345	0,323	0,323	0,325	0,345	0,410

-

	Control (-) Blanco de color	Promastigotes Lma a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)					
		3.12	6.25	12.5	25	50	100
	2,50	2,72	2,16	0,48	0,27	0,24	0,12
	2,15	2,77	1,88	0,56	0,33	0,29	0,19
	2,59	2,75	1,87	0,55	0,32	0,28	0,20
Promedio	2,41	2,75	1,97	0,53	0,30	0,27	0,17
SD	0,23	0,02	0,17	0,04	0,03	0,03	0,04

Concent	% inhib	IC ₅₀
100	93	
50	89	26,3
25	87	
12,5	78	
6,25	18	
3,125	0	

% de Supervivencia	CAT (µg/mL)	Promastigotes Lma a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)					
		3.12	6.25	12.5	25	50	100
		109	87	19	11	10	5
		129	87	26	15	14	9
		106	72	21	12	11	8
Promedio		115	82	22	13	11	7
SD		12	8	3	2	2	2

IC₅₀ de CAT, *Leishmania spp*(BTE-002) 27 julio 07

CONTROL (-) medio	CONTROL (+) parasit.	Promastigotes L.BTE-002 a diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
		3.12	6.25	12.5	25	50	100	3.12	6.25	12.5	25	50	100	
0,341	2,685	2,868	0,84	0,547	0,56	0,555	0,709	0,352	0,323	0,332	0,326	0,344	0,405	
0,336	2,367	3,515	0,754	0,548	0,576	0,555	0,71	0,331	0,319	0,314	0,318	0,338	0,417	
0,339	2,367	3,515	0,754	0,548	0,576	0,555	0,71	0,351	0,327	0,324	0,33	0,353	0,409	
Promedio	0,339	2,473	3,299	0,754	0,548	0,571	0,555	0,710	0,345	0,323	0,323	0,325	0,345	0,410

Control (-) Blanco de color		3.12	6.25	12.5	25	50	100
		2,34	2,52	0,52	0,22	0,23	0,21
2,03	3,18	0,44	0,23	0,26	0,22	0,29	
2,03	3,16	0,43	0,22	0,25	0,20	0,30	
Promedio	2,13	2,95	0,46	0,22	0,25	0,21	0,30
SD	0,18	0,38	0,05	0,01	0,01	0,01	0,01

Concent	% inhib	IC ₅₀
100	86	
50	90	23,2
25	88	
12,5	89	
6,25	78	
3,125	0	

% de Supervivencia	CAT (µg/mL)	3.12	6.25	12.5	25	50	100
			107	22	9	10	9
		157	21	12	13	11	14
		156	21	11	12	10	15
Promedio		140	22	11	12	10	14
SD		28	1	1	1	1	1

IC₅₀ de CAT, *Leishmania amazonensis*(LA) 7 julio 07

Control (-) medio	Control (+) parasit.	Promastigotes LA diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						Blancos de CAT a diferentes concentraciones (µg/mL)						
		3.12	6.25	12.5	25	50	100	3.12	6.25	12.5	25	50	100	
0,44	2,249	1,577	1,503	1,108	0,675	0,588	0,627	0,432	0,369	0,377	0,369	0,382	0,419	
0,439	1,921	1,68	1,277	0,833	0,569	0,589	0,656	0,433	0,365	0,367	0,369	0,381	0,396	
0,497	1,901	1,68	1,277	0,833	0,569	0,589	0,656	0,433	0,365	0,367	0,369	0,381	0,396	
Promedio	0,459	2,024	1,646	1,352	0,925	0,604	0,589	0,646	0,433	0,366	0,370	0,369	0,381	0,404

Control (-) Blanco de color	Promastigotes LA diferentes concentraciones de CAT (µg/mL)						
	3.12	6.25	12.5	25	50	100	
1,81	1,15	1,13	0,73	0,31	0,21	0,21	
1,48	1,25	0,91	0,47	0,20	0,21	0,26	
1,40	1,25	0,91	0,47	0,20	0,21	0,26	
promedio	1,57	1,21	0,99	0,55	0,24	0,24	
SD	0,21	0,06	0,13	0,15	0,06	0,03	

Concent	% inhib	IC ₅₀
100	84	
50	87	21,8
25	85	
12,5	65	
6,25	33	
3,1	21	

% de Supervivencia

CAT (µg/mL)	3.12	6.25	12.5	25	50	100
	63	63	40	17	11	11
	84	62	31	13	14	18
	89	65	33	14	15	19
Promedio	79	63	35	15	13	16
SD	14	2	5	2	2	4

