Derivados de isoniazida sintetizados en laboratorio: estudio de su efecto sobre dos protozoarios de importancia médica.

Munguia-Robledo Susana[1], Ramírez-Moreno Ernesto[1], Trujillo-Chávez Gonzalo[2]

[1]Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
Laboratorio de Protozoología-Departamento de Parasitología.

[2] Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
Laboratorio 8, Departamento de Química Orgánica.
Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n. México, D.F. CP 11340.

eramírez777@yahoo.com.mx

Fecha de aceptación: 13 de agosto de 2015 Fecha de publicación: 23 de septiembre de 2015

RESUMEN
Compuestos como la isoniazida se podrían usar para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea y de la Enfermedad de Chagas. El objetivo del trabajo es estudiar la actividad *in vitro* de 6 compuestos sintéticos derivados de la isoniazida sobre la vitalidad de *Trypánosoma cruzi* y *Leishmania mexicana*. Se sometieron $1X10^6$ parásitos respectivamente al efecto de tres compuestos con un sustituyente –OH en el anillo trizólico (A, B y C) y tres compuestos con un sustituyente –SH en el anillo triazólico (D,E y F), a ocho concentraciones diferentes respectivamente. Después de incubarlos, la viabilidad se cuantificó por el método del Alamar Azul. Se corrieron pruebas con Anfotericina B y Radanil como fármacos de referencia. El compuesto F arrojó la mayor actividad parasiticida a una concentración de 150 µg/ mL. Concluimos que *in vitro* el compuesto F elimina a los parásitos bajo estudio a mayor concentración que los fármacos de referencia. Proponemos ampliar los estudios con otras variantes del compuesto F.

Palabras clave: isoniazida, *Leishmania mexicana, Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT
Compounds such as isoniazid could be used for the treatment of cutaneous leishmaniasis and Chagas disease. The aim of this work is to study the in vitro activity of six synthetic compounds derived from isoniazid on the vitality of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. $1X10^6$ parasites were respectively subjected to the effect of three compounds with an -OH substituent in the trizolic ring (A, B and C) and three compounds with a substituent -SH in the triazole ring (D, E and F), were respectively used eight different concentrations. After incubating, the viability was quantified by the method of Alamar Blue. Also were run assays with Amphotericin B and Radanil as reference drugs. The compound F showed the greatest pesticidal activity at a concentration of 150 mg / mL. We conclude that in vitro, F compound kills the parasites under study at higher concentration than the reference drugs. We propose use other variants of the F compound to extend the studies.

Key words: isoniazid, *Leishmania mexicana, Trypanosoma cruzi.*

INTRODUCCIÓN

La tripanosomiasis americana es la enfermedad tropical transmisible de mayor prevalencia en América Latina. Se calcula que alrededor de 100 millones de personas en América viven en áreas de exposición y están en riesgo de contraer esta enfermedad (OPS, 2013b).

Para el año 2000 se registraron en México 100 casos, 17 agudos y 83 crónicos y en el año 2005 se registraron 361 casos, 14 agudos y 347 crónicos (17 con cardiopatía, 1 con megacolon y 329 indeterminados). En el 2008 hubo un incremento reportándose 679 casos nuevos, con una incidencia de 0.64 por cada 100,000 habitantes (OPS, 2011). Los reportes más actuales de la Secretaría de Salud y del Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE, 2011) indican que para el 2013 hubo una incidencia de 0.5 por cada 100,000 habitantes (Secretaría de Salud, 2013). Los estados con mayor prevalencia en la República Mexicana incluyen a Querétaro, Oaxaca, Chiapas, Nayarit, Jalisco, Morelos y Guerrero, debido a que las condiciones climatológicas permiten el desarrollo de los transmisores, y las condiciones de vida favorecen la transmisión de la enfermedad (Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006).

La leishmaniasis es una enfermedad de alta prevalencia en muchas regiones tropicales y subtropicales, se estiman 12 millones de afectados a nivel mundial. Su incidencia ha aumentado en los últimos años, calculándose 2 millones de casos nuevos anuales. El 75 % de los casos corresponden a leishmaniasis cutánea que se caracteriza por úlceras que ocasionan invalidez y cicatrices desfigurantes, el 25 % corresponde a la forma visceral, que es la más severa y sin tratamiento es mortal.

En nuestro país se registraron 797 casos para el año 2000 y 868 casos nuevos para el año 2005, En 2008 se reportaron 710 casos nuevos, con una incidencia de 0.67 por cada 100,000 habitantes (OPS, 2011) y para el 2013 incrementó la incidencia, reportándose 0.71 casos por cada 100,000 habitantes (SINAVE, 2011, Secretaría de salud, 2013).

Actualmente existen sólo 2 fármacos de primera línea recomendados por la OMS para el tratamiento de la Tripanosomiasis Americana y la Leishmaniasis respectivamente. En el caso de la Tripanosomiasis Americana, el tratamiento son el Nifurtimox (NFX) (figura 1a) y el Benznidazol (BNZ) (figura 1b), que son derivados de nitrocompuestos (Cercetto, 2012).

a) Nifurtimox b) Benznidazol

Figura 1. *Estructura química de los fármacos de primera línea para el tratamiento de la tripanosomiasis americana. Obtenido de: Cercetto, 2012.*

El tratamiento con NFX recomendado por la OMS (1991) y por el CDC (2010), tiene una duración de 90 días, actúa sobre el parásito formando radicales libres que producen daño por reducción de proteínas y ácidos nucleicos (Rodrigues y De castro, 2002). Logra una cura parasitológica del 76 % de los casos en la fase aguda y un porcentaje mucho menor en la etapa crónica de la enfermedad. En al menos el 30 % de los casos genera efectos secundarios como anorexia, pérdida de peso, manifestaciones gastrointestinales como náuseas, vómito, dolor abdominal, diarrea, dermatitis y compromiso del SNC como insomnio, alucinaciones, psicosis y en algunos casos convulsiones (OMS, 1991).

El tratamiento con Benznidazol (BNZ) tiene una duración de 60 días. Este fármaco actúa por medio de la unión covalente de los intermediarios de la nitroreducción a los componentes del parásito como DNA,

lípidos y proteínas. Se ha reportado que es efectivo durante la fase aguda de la enfermedad y en menor proporción durante la fase crónica. Los efectos secundarios pueden ser dermatológicos, incluyendo erupción cutánea, edema generalizado, fiebres, adenopatías mialgia y artralgia; también puede haber daño a nivel de médula ósea, lo que causa trombocitopenia, púrpura y agranulocitosis; y compromiso neurológico con polineuropatía, parestesia y polineuritis periférica (Rodrigues y De Cstro, 2002; Ministerio de Salud de Chile, 2010).

En el caso de la leishmaniasis, los fármacos utilizados para el tratamiento son 2 antimoniales pentavalentes, el Estibogluconato sódico (o gluconato de antimonio sódico) y el Antimoniato de meglumina, que se administran por vía parenteral únicamente. Los antimoniales inhiben la glicólisis y la oxidación de los ácidos grasos, induciendo la disminución de la biosíntesis energética de los amastigotes (Ramos y Segovia,1998). Entre los efectos secundarios de los antimoniales se encuentran el dolor abdominal, náuseas, vómitos, malestar general, cefalea, debilidad, mialgias, artralgias, fiebre o exantema; alteraciones electrocardiográficas y alteraciones de enzimas hepatocelulares y pancreáticas (Ramos y Segovia, 1998).

Debido a lo anterior, consideramos relevante contribuir a la búsqueda de nuevos compuestos contra estas entidades clínicas y por ello, el objetivo de este trabajo consistió en el ensayo *in vitro* de seis nuevos compuestos derivados de isoniazida sobre la viabilidad de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana* en búsqueda de una mayor efectividad comparada al tratamiento de elección para la tripanosomiasis americana y la leishmaniasis cutánea.

METODOLOGÍA

Los 6 compuestos objeto del estudio son derivados de isoniazida (figura 2) los cuales fueron sintetizados en el Departamento de Química Orgánica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas y por el Dr. Gonzalo Trujillo Chávez.

Para fines prácticos y en lo sucesivo serán referidos bajo la siguiente nomenclatura:

- Compuesto A → 4-fenil-3-hidroxi-5-piridin-1,2,4-triazol
- Compuesto B → 4-(4-clorofenil)-3-hidroxi-5-piridin-1,2,4-triazol
- Compuesto C → 4-(3-clorofenil)-3-hidroxi-5-piridin-1,2,4-triazol
- Compuesto D → 4-(2-tolil)-3-tiol-5-piridin-1,2,4-triazol
- Compuesto E → 4-(3-tolil)-3-tiol-5-piridin-1,2,4-triazol
- Compuesto F → 4-(4-tolil)-3-tiol-5-piridin-1,2,4-triazol

Para los ensayos *in vitro* se emplearon las cepas Ninoa de *T. cruzi* y la cepa Pro-1 de *L. mexicana mexicana* pertenecientes a la colección del Departamento de Parasitología de la ENCB. Ambas cepas se mantuvieron en medio bifásico de gelosa sangre a 28 °C (Cercetto, 2012). Previo a los ensayos in vitro, se estableció la fase log de crecimiento de ambos parásitos para lo que se obtuvo la curva de crecimiento en medio BHI-SFB (Infusión Cerebro Corazón-Suero Fetal Bovino) partiendo de una suspensión a una concentración final de $1x10^6$ parásitos/mL. Se incubaron a 28°C y cada 48 horas se tomó una alícuota y se realizaron conteo al microscopio. En el caso de *T. cruzi* se realizaron lecturas durante 10 días y durante 12 días para *L. mexicana*. El proceso se realizó por triplicado y se determinó la desviación estándar por medio del programa Graph Pad.

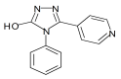
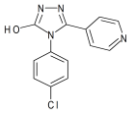
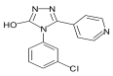
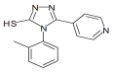
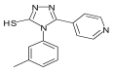
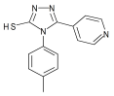
 4-fenil-3-hidroxi-5-piridin-1,2,4-triazol	 4-(4-clorofenil)-3hidroxi-5-piridin-1,2,4-triazol
 4-(3-clorofenil)-3-hidroxi-5-piridin-1,2,4-triazol	 4-(2-tolil)-3-tiol-5-piridin-1,3,4-triazol
 4-(3-tolil)-3-tiol-5-piridin-1,3,4-triazol	 4-(4-tolil)-3-tiol-5-piridin-1,2,4-triazol

Figura 2. *Estructura química de los compuestos derivados de isoniazida bajo estudio. En la figura se muestra la estructura química de los compuestos sintetizados al someter a reacción a la de isoniazida con diferentes arilisocianatos.*

Para la cuantificación de la viabilidad de los parásitos, se desarrolló una Curva de reducción del alamar azul (AA) el cual es un indicador colorimétrico/fluorométrico debido a la actividad REDOX metabólica; con crecimiento celular, el medio y el indicador se reducen y vira de color azul (resazurina) a color rosa (resorufina), que es fluorescente y se puede cuantificar a 530-560 nm de excitación y 590 nm de emisión (Lancaster & Field, 1996). Este ensayo se realizó para determinar la concentración de parásitos y el tiempo de incubación requeridos para la reducción del alamar azul en condiciones normales (Escobar y Aristizábal, 2010). En placas de 96 pozos se colocaron por cuadruplicado suspensiones de ambos parásitos a 6 concentraciones diferentes ($1x10^6$, $8x10^5$, $6x10^5$, $4x10^5$, $2x10^5$ y $1x10^5$ parásitos) en un volumen final de 200 µL (figura 3). Posteriormente a cada pozo se le adicionaron 30 µL de AA, y se hicieron lecturas en el fluorómetro (FLUOROSKAN ASCENT FL®) a una longitud de onda de excitación de 544 nm y a una longitud de onda de emisión de 590 nm a las 0, 2, 4, 10 y 24 horas.

Las pruebas *in vitro* del efecto de los compuestos sobre la viabilidad de los parásitos, se llevaron a cabo en microplacas de 96 pozos, se realizaron diluciones seriadas 1:2 a partir de la solución de trabajo de los 6 compuestos a evaluar, se agregaron 100 µL de suspensión parasitaria ajustada para obtener una concentración final de $1x10^6$ promastigotes/pozo en el caso de *L. mexicana* y una concentración final de $8x10^5$ epimastigotes/pozo en el caso de *T. cruzi*. Las concentraciones finales de los compuestos fueron 300, 150, 75, 37.5, 18.75, 9.375 y 4.6875 µg/mL (figura 3). La prueba se realizó por triplicado para cada compuesto. Se corrieron testigos positivos de reducción de AA (parásitos al 100%), un testigo negativo (parásitos al 10%) , el cuál consistió de 100 µL de solución salina isotónica y 100 µL de una suspensión parasitaria ajustada para obtener una concentración final de $8x10^4$ parásitos/pozo en el caso de *T. cruzi* y $1x10^5$ parásitos/pozo en el caso de *L. mexicana*. Cada microplaca se incubó durante 24 horas a 28 °C en atmósfera húmeda; una vez pasado este tiempo, a cada pozo se le adicionaron 30 µL de AA y se volvieron a incubar durante 4 horas en el caso de *T. cruzi* y durante 24 horas en el caso de *L. mexicana*. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se hicieron las lecturas en el fluorómetro a una longitud de onda de excitación de 544 nm y a una longitud de onda de emisión de 590 nm. Por medio del programa Graph pad se obtuvo la desviación estándar de las lecturas. A los datos fluorométricos se les aplicó la prueba estadística ANOVA de dos variables por medio del programa Sigma stat.

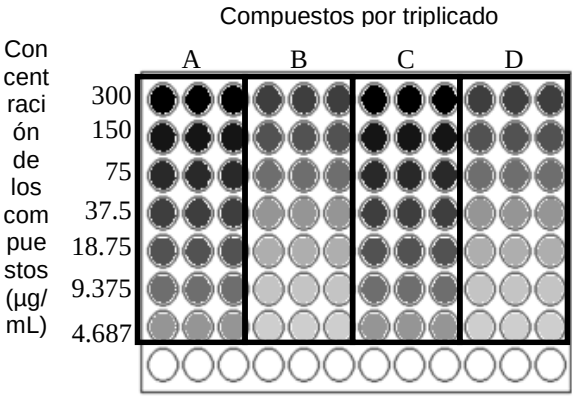


Figura 3. *Esquematización del montaje de las placas de evaluación del efecto de los compuestos derivados de isoniazida sobre la viabilidad de los parásitos. En la figura se presenta la esquematización de la placa para realizar el estudio del efecto de los compuestos en estudio sobre la viabilidad de ambos parásitos.*

Adicionalmente se corrieron testigos positivos de fármacos de referencia y testigos negativos de soluciones. De los testigos de fármacos para *T. cruzi,* se usó Radanil® (Benznidazol) y para *L. mexicana* Anfotericina B, una vez que se adicionaron los parásitos, se obtuvieron concentraciones finales de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.7812, 0.3906 y 0.1953 µg/mL de ambos fármacos.

Se corrieron testigos negativos de compuestos sin parásitos y de soluciones, estos últimos incluyeron solución salina, Dimetil Sulfóxido (DMSO) y medio BHI-SFB. Todos los testigos se sometieron a la prueba de reducción del almar azul con un tiempo de incubación de 24 horas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 4 muestra la cinética de crecimiento obtenida para *T. cruzi* y para *L. mexicana* en el medio BHI-SFB. *T. cruzi* presentó desarrollo exponencial durante los primeros 6 días de incubación, después de los cuales comenzó a declinar. *L. mexicana* se desarrolló de manera exponencial durante los primeros 4 días de incubación, después se mantuvo durante 4 días en una fase estacionaria (hasta el día 8 de incubación) y finalmente comenzó a declinar.

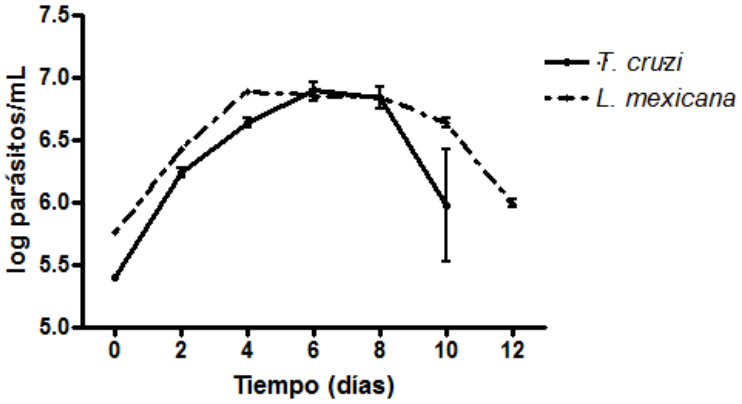


Figura 4. *Cinética de crecimiento de Trypanosoma cruzi y Leishmania mexicana en medio BHI-SFB. T. cruzi tiene una fase logarítmica de crecimiento durante los primeros 6 días de cultivo, mientras que L. mexicana se encuentra en fase logarítmica de crecimiento durante los primeros 4 días de cultivo en medio BHI-SFB.*

La curva de reducción del AA con *T. cruzi* mostró que tras 2 horas de incubación, el indicador comenzó a virar y por lo tanto aumentó su fluorescencia, la cual alcanzó su punto máximo a las 4 horas. De las diferentes concentraciones de parásitos probadas, la que generó la máxima fluorescencia (1300 Unidades Relativas de Fluorescencia (URF)) fue $8x10^5$ parásitos/pozo. Para *L. mexicana* la reducción del AA alcanzó su máximo a las 24 horas de incubación, y la concentración de $1x10^6$ parásitos/mL presentó el mayor nivel de fluorescencia (2000 URF).

Los testigos negativos de compuestos (sin parásitos), no redujeron el AA por si mismos (figura 5)

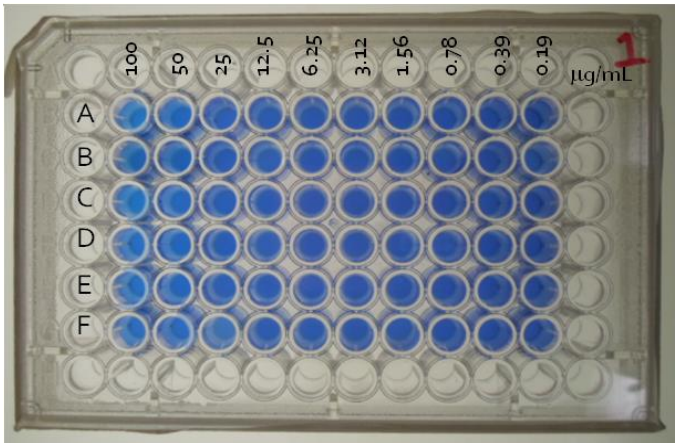


Figura 5. Testigo de compuestos. En *la imagen se muestra que los compuestos bajo estudio al aplicarse solos no reducen por sí mismos al alamar azul bajo las condiciones de incubación establecidas y por lo tanto no interfieren en la determinación.*

La solución salina, el DMSO y el medio BHI-SFB tampoco redujeron al AA bajo las condiciones establecidas en el protocolo de trabajo.

La tabla 1 muestra los datos obtenidos en el fluorómetro para los testigos negativos, los valores fueron menores a 250 Unidades Relativas de Fluorescencia (URF) tanto para los 6 compuestos derivados de isoniazida, así como para el DMSO y la SS. El BHI-SFB dio una lectura de más de 600 URF.

Tabla 1. *Valores de Fluorescencia de los testigos negativos empleadas en el estudio. Se presenta el promedio de 3 lecturas de URF de las soluciones y los compuestos testigo negativo.*

Solución	URF (promedio)	Compuesto	URF (promedio)	Compuesto	URF (promedio)
SS	171.32	A	133.934	D	148.877
DMSO	221.29	B	123.185	E	159.13
BHI-SFB	619.66	C	121.867	F	154.481

El análisis visual del viraje de color del alamar azul en los ensayos del efecto de los compuestos derivados de isoniazida sobre *T. cruzi* (figura 6), indica que el parásito fue susceptible a los compuestos A, B y C, a una concentración de 300 µg/mL, mientras que con los compuestos D, E y F, el parásito fue susceptible a una concentración de 150 µg/mL (concentraciones a las cuales no se registra variación en el color del AA). Por otro lado, el testigo al 100 % ($8x10^5$ parásitos/pozo), redujo al AA, el cual presentó un color rosado/lila, mientras que el testigo al 10 % ($8x10^4$ parásitos/pozo) no redujo al AA. En cuanto al

fármaco de referencia, *T. cruzi* fue susceptible al Radanil (Benznidazol) a una concentración de 50 µg/mL.

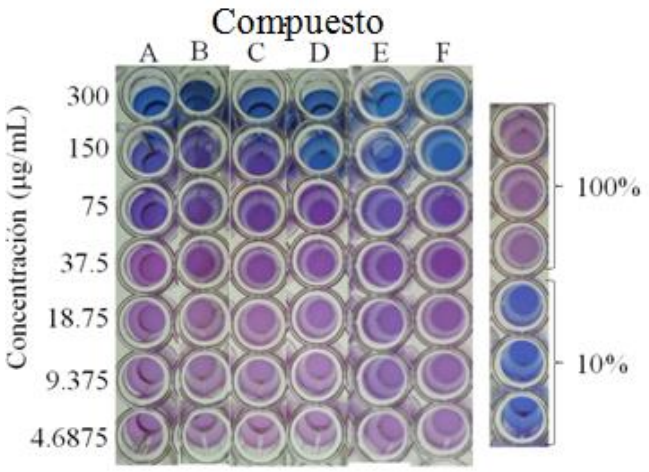


Figura 6. *Efecto de los 6 compuestos derivados de isoniazida sobre la viabilidad de Trypanosoma cruzi. En la figura se observa que no hay reducción del indicador AA a 300* µg*/mL para los compuestos A, B y C, y a 150* µg*/mL para los compuestos D, E y F. 100 %: concentración final de 8x10^5 parásitos/pozo. Testigo de reducción de AA.1 %: concentración final de 8x10^4 parásitos/pozo. Testigo de no reducción de AA.*

Los resultados de las lecturas en el fluorómetro se presentan en la figura 7, en donde se muestra el promedio de URF obtenidas de las 3 réplicas de las pruebas *in vitro*. El testigo al 100 % presentó en promedio 1635 URF, mientras que el testigo al 10 % presentó en promedio 474 URF. A 300 µg/mL todos los compuestos presentan menor fluorescencia que el testigo al 10 %, lo cual indica que el desarrollo parasitario se encuentra inhibido. A 150 µg/mL, los compuestos A, B, C y E ya no inhiben el desarrollo parasitario, pues presentaron valores promedio de 1267, 1545, 1223 y 937 URF respectivamente, los cuales son muy cercanos al valor obtenido con el testigo al 100 %; por el contrario, los compuestos E y F aún mantienen el desarrollo parasitario inhibido a ésta concentración, ya que presentaron en promedio 487 y 352 URF respectivamente. A menores concentraciones, la fluorescencia con los 6 compuestos es muy cercana o mayor a la obtenida con el estigo de parásitos al 100 %.

Al llevar a cabo el análisis estadístico (análisis de varianza de dos vías), se encontró diferencia significativa del compuesto F con respecto a los compuestos D y E a una concentración de 150 µg/mL,

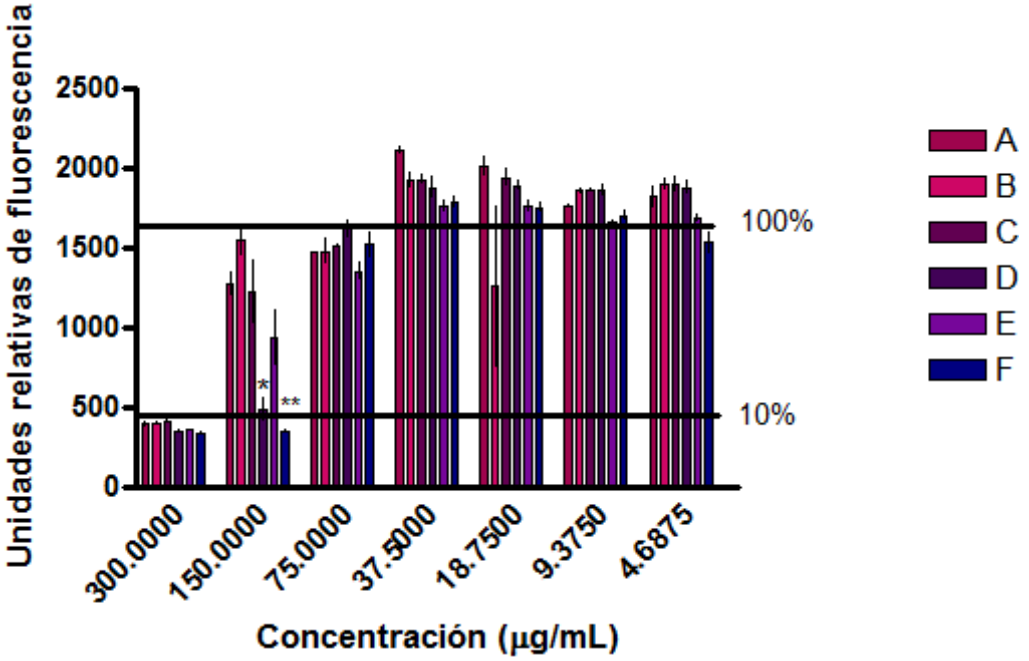


Figura 7. *Fluorescencia del Alamar Azul en el ensayo in vitro de la actividad de 6 compuestos derivados de isoniazida sobre Trypanosoma cruzi. Se presentan, incluidas las desviaciones estándar de 3 réplicas, las unidades relativas de fluorescencia del AA a las 7 concentraciones evaluadas con T. cruzi, el compuesto F mostró la menor fluorescencia a 150* µg/mL.

**: diferencia significativa (P<0.001) con respecto a los compuestos A, B y C*

***: diferencia significativa (P<0.001) con respecto a los compuestos D y E.*

En el caso de *L. mexicana*, los resultados de las lecturas en el fluorómetro mostraron que a 300 µg/mL los compuestos D, E y F inhiben el desarrollo parasitario, ya que la fluorescencia obtenida (514.9, 559 y 461.3 URF respectivamente) es muy cercana a la obtenida en el testigo de parásitos al 10 %. A 150 µg/mL los compuestos D y E ya no inhiben el desarrollo parasitario pues presentaron 1593 y 2009 URF respectivamente, que son valores mayores a la mitad del valor obtenido con el testigo al 100 %, y al correlacionarse con el análisis colorimétrico, se observa una reducción considerable del indicador. Por su parte, el compuesto F a esta concentración aún mantiene inhibido el desarrollo del parasito, ya que presentó 857 URF, que es un valor de fluorescencia menor a la mitad del testigo de parásitos al 100 %, y al correlacionarse con el análisis colorimétrico, se observa que el indicador permaneció oxidado. El análisis estadístico de los resultados de fluorescencia arrojó diferencia significativa a la concentración de 150 µg/mL entre el compuesto F y los compuestos D y E. La CMI de Anfotericina B para *L. mexicana* fue de 100 µg/mL.

En cuanto a su estructura, los compuestos A, B y C, que poseen un sustituyente –OH en posición 3 del anillo trizólico, así como el compuesto E que posee en sustituyente –SH en posición 3 del anillo triazólico , inhibieron a *T. cruzi* cuando se encontraban a una concentración de 300 µg/mL, mientras que los compuestos D y F, que poseen el mismo sustituyente, lo inhibieron cuando se encontraban a una concentración de 150 µg/mL.

Los compuestos derivados de isoniazida evaluados en este trabajo, no presentaron mayor actividad leishmanicida *in vitro* que el fármaco de referencia. Sin embargo, hay autores que afirman que debido a

las diferencias bioquímicas entre los estadios parasitarios, los amastigotes suelen ser más sensibles que los promastigotes, y por lo tanto, requieren menores concentraciones de fármaco en ensayos *in vivo* (Oliveira-Silva y col., 2008).

CONCLUSIONES

1. El compuesto "F" o 4-(4-tolil)-3-tiol-5-piridin-1,2,4-triazol presentó mayor actividad parasiticida *in vitro* contra *T. cruzi* sin superar la efectividad del fármaco de referencia "Radanil".

2. El compuesto "F" o 4-(4-tolil)-3-tiol-5-piridin-1,2,4-triazol presentó mayor actividad parasiticida *in vitro* contra *L. mexicana* sin superar la efectividad del fármaco de referencia Anfotereicina B.

3. El compuesto 4-(4-tolil)-3-tiol-5-piridin-1,2,4-triazol es un candidato viable para ampliar estudios con variantes en concentraciones y/o en posición del grupo tiol.

REFERENCIAS

CDC (2010). Center for Disease Control and Prevention. Parásitos – Enfermedad de Chagas. Consultado en febrero de 2015 en: http://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/hcp/tratamiento.html.

Cercetto, H. (coord.). (2012). *Enfermedad de Chagas: Estrategias en la búsqueda de nuevos medicamentos. Una visión Iberoamericana*. México : Documaster.

Cruz-Reyes A. & Pickering-López J.M. (2006). Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years – A review. *Meorias do instituto Owaldo Cruz*, 101(4): 345-354.

Escobar M., L & Aristizábal G., F. A. (2010). Aplicación de un método fluorométrico para evaluar la proliferación celular en líneas celulares tumorales [Versión electrónica]. *Vitae* 17(2): 173-180.

Lancaster, M. V & Fields, R. D. (1996).Antibiotic and Citotoxic drug susceptibility assays using resazurin and poising agents. *United States Patent*. Patent 5: 501-959.

Ministerio de Salud de Chile. (2010). *Guía Clínica "Guías de diagnóstico, Tratamiento y Prevención de la Enfermedad de Chagas"*. Santiago, Chile : MINSAL.

Oliveira-Silva, F., Morais-Teixeira, E. & Rabello, A. (2008). Antileishmanial activity of azithromycin against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(5): 745-749.

Organización Mundial de la Salud (1991). Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos. Medicamentos utilizados en las enfermedades parasitarias. Organización Mundial de la Salud, Ginebra. [Versión electrónica].

Organización Panamericana de la Salud. (2011). Vigilancia, prevención y control de enfermedades. Consultado en abril de 2013en: http://new.paho.org/mex/index.php?option=com_content&view=article&id=217

Organización Panamericana de la Salud.(2013). Notas descriptivas sobre la Enfermedad de Chagas. Consultado en abril de 2013 en: http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856&itemid=4196&lang=es

Ramos, J. M. & Segovia, M. (1998). Estado actual del tratamiento farmacológico de la leishmaniasis [Versión electrónica]. Revista Española de quimioterapia. 10(1): 26-36.

Rodrigues C., J & De Castro, S. L. (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(1): 3-24.

Secretaría de Salud (2013). Notificación semanal. Casos nuevos de enfermedades. México.

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (2011*).* Leishmaniasis: una enfermedad olvidada. *Boletín epidemiológico*. 50 (28).