



**Universidad Central  
de Venezuela  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Biología**

**Efecto de un derivado del benzofurano  
basado en la estructura de la  
amiodarona sobre *Trypanosoma cruzi*.**

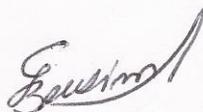
**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**  
Presentado ante la ilustre Universidad  
Central de Venezuela por la Br.  
Andrea Katherine Pinto Martinez  
como requisito parcial para optar al el  
título de Licenciada en Biología.

Tutor: Dr. Gustavo Benaim.

CARACAS, VENEZUELA  
OCTUBRE- 2015

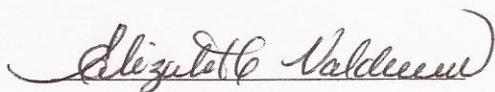
## ACTA DE VEREDICTO DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br: Andrea K. Pinto M., CI: 18.915.599 para optar por el título de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en el reglamento respectivo, lo consideramos aprobado con la calificación de veinte (20) puntos. Para dar fe de ello se levanta la presente acta en la ciudad de Caracas a los veintiún días del mes de Octubre de 2015.

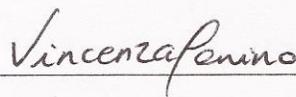


---

Dr. Gustavo Benaim  
C.I: 3.658.620  
Tutor Académico



Dra. Elizabeth Valdivieso  
C.I: 9.881.834  
Jurado Principal



---

Dra. Vincenza Cervino  
C.I: 9.936.931  
Jurado Principal

## **Reconocimientos**

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos del Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), y contó con los proyectos CDCH-UCV C-03-8728-2013 y FONACIT 2011000884.

El compuesto derivado de la amiodarona (D4), empleado en la realización del presente trabajo fue suministrado amablemente por Elżbieta Hejchman del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Warsaw, Polonia, con quien tenemos un convenio de colaboración.

A mi tutor el Dr. Gustavo Benaim quien me aceptó en su laboratorio y continuamente brindó la orientación fundamental en la realización de este trabajo.

A la licenciada Vanessa Hernández y a la licenciada Jessica Rodríguez quienes estuvieron atentas y dispuestas a brindar su apoyo experimental.

A la Dra. Elizabeth Valdivieso, miembro principal de mi jurado, quien permitió realizar experimentos fundamentales en su laboratorio y del mismo modo proporcionó herramientas intelectuales en el desarrollo de este trabajo.

Al licenciado Carlos Torrealba, la licenciada Fabiola Colmenares, y la Profesora Cristina Sanoja quienes activamente contribuyeron proporcionando herramientas experimentales para la realización de este trabajo.

A la Dra. Vincenza Cervino, miembro principal de mi jurado, quien fue una consejera y brindó su apoyo técnico.

## Índice General

CONTENIDO	Pag.
Lista de abreviaciones.....	1
<b>Resumen</b> .....	2
<b>1.0. Introducción</b> .....	3
<b>2.0. Objetivos</b> .....	29
<b>3.0. Materiales y métodos</b> .....	30
3.1. Mantenimiento de parásitos.....	30
3.2. Mantenimiento de células Vero.....	30
3.3. Estudio del efecto del D4 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	30
3.4. Estudio de citotoxicidad del D4 sobre células de mamífero mediante el ensayo de MTT.....	31
3.5. Determinación del efecto del D4 sobre amastigotes intracelulares de <i>T. cruzi</i> mediante una curva de infección.....	32
3.6. Experimentos de fluorescencia.....	32
3.6.1. Determinación del efecto del D4 sobre la homeostasis intracelular del Ca <sup>2+</sup> de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	32
3.6.2. Determinación del efecto del D4 sobre el potencial electroquímico mitocondrial de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	35
3.6.3. Determinación del efecto del D4 sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	36
<b>4.0. Resultados</b> .....	37

4.1. Efecto del D4 sobre sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	37
4.2. Estudio de citotoxicidad del D4 sobre células de mamífero.....	39
4.3. Efecto del D4 sobre amastigotes intracelulares de <i>T. cruzi</i> mediante una curva de infección.....	40
4.4. Efecto del D4 sobre la homeostasis intracelular del $Ca^{2+}$ en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	42
4.5. Efecto del D-4 sobre el potencial electroquímico mitocondrial de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	44
4.6. Efecto del D4 sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	47
<b>5.0. Discusión.....</b>	<b>50</b>
<b>6.0. Conclusiones.....</b>	<b>58</b>
<b>7.0. Bibliografía.....</b>	<b>59</b>
<b>8.0. Anexos.....</b>	<b>69</b>

## Lista de abreviaciones

- ADN** Ácido desoxirribonucleico
- Am** Amidina
- ATP** Adenin-nucleósido trifosfato
- [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>** Concentración intracelular de calcio
- CaM** Calmodulina
- CIM** Concentración inhibitoria mínima
- CI<sub>50</sub>** Concentración inhibitoria del 50% de la población de células
- Im** Imidazol
- I-PrAm** Isopropil amidina
- MP** Membrana plasmática
- OSC** Oxidoescualeno ciclasa
- PCR** Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés de “polimerase chain reaction”)
- PMCA** Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática (por sus siglas en inglés de “plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase”)
- SERCA** Ca<sup>2+</sup>-ATPasa del retículo sarco-endoplasmático (por sus siglas en inglés de “sarco-endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase”)

## Resumen

La enfermedad de Chagas afecta entre 6 y 7 millones de personas, fundamentalmente en Latinoamérica. Su agente causal, el *Trypanosoma cruzi*, es un protozoo flagelado transmitido vectorialmente por triatomíneos, mediante transfusión sanguínea, trasplante de órganos, de forma oral, congénitamente y mediante accidentes laborales. A pesar de haber sido identificada en 1909, las únicas drogas disponibles para el tratamiento de esta enfermedad son el benznidazol y el nifurtimox, las cuales han sido utilizadas en las últimas cuatro décadas, produciendo efectos adversos en humanos. Es más, el reciente estudio BENEFIT del 2015 demostró que el benznidazol no tiene un efecto discernible sobre la fase crónica de la enfermedad. Por esta razón, en los últimos años, se ha dirigido una gran cantidad de esfuerzos a la investigación de drogas, tanto nuevas como reposicionadas, contra *T. cruzi*. Considerando la importancia en la investigación de este tipo de drogas, en este trabajo nos propusimos evaluar el efecto de un derivado del benzofurano, ácido benzofurancarboxílico (denominado D4), el cual está basado en la estructura de la amiodarona, un conocido antiarrítmico con potente efecto tripanocida, sobre distintas funciones de *T. cruzi*. Se evaluó el efecto sobre los epimastigotes en presencia de diferentes concentraciones de D4, así como su efecto sobre células de mamífero. Se determinó el efecto de la droga sobre el porcentaje de células de mamífero infectadas con amastigotes de *T. cruzi*. Se evaluó el mecanismo de acción del D4 sobre los epimastigotes en relación a la concentración intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), empleando técnicas de fluorescencia. También se evaluó el efecto de la droga sobre el potencial electroquímico mitocondrial y el grado de alcalinización de los acidocalcisomas, demostrándose que esta droga afecta ambos organelos, lo cual conlleva a un notable incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Los resultados demuestran que esta droga tiene un importante efecto sobre este parásito, fundamentalmente sobre la fase amastigote, la cual representa la forma clínicamente relevante, lo que puede ser potencialmente explotado desde el punto de vista farmacológico.

## **1. Introducción**

### **1.1. La enfermedad de Chagas**

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es una zoonosis producida por el parásito *Trypanosoma cruzi*, cuya transmisión vectorial (por un insecto triatomino) está confinada a América Central y América del Sur, y de acuerdo a reportes de la OMS, 2013, ocurren alrededor de 11.000 muertes anuales por esta causa, entre 6 y 7 millones de personas están infectadas en todo el mundo y más de 80 millones están en riesgo de infección. Ésta enfermedad representa la infección parasítica más prevalente en el continente americano, especialmente en 21 países latinoamericanos incluyendo a Venezuela, en donde se reporta un promedio de 769 muertes anuales a causa de la enfermedad de Chagas, de las cuales el 99% ocurren en la fase crónica (Rísquez, 2009). A pesar de que la enfermedad fue identificada en 1909 por Carlos Chagas, permanece siendo una de las más desatendidas de todas las enfermedades tropicales y afecta principalmente a los estratos más pobres, en las zonas rurales de las regiones endémicas (Clayton, 2010).

### **1.2. Clasificación, ciclo de vida y biología de *Trypanosoma cruzi*.**

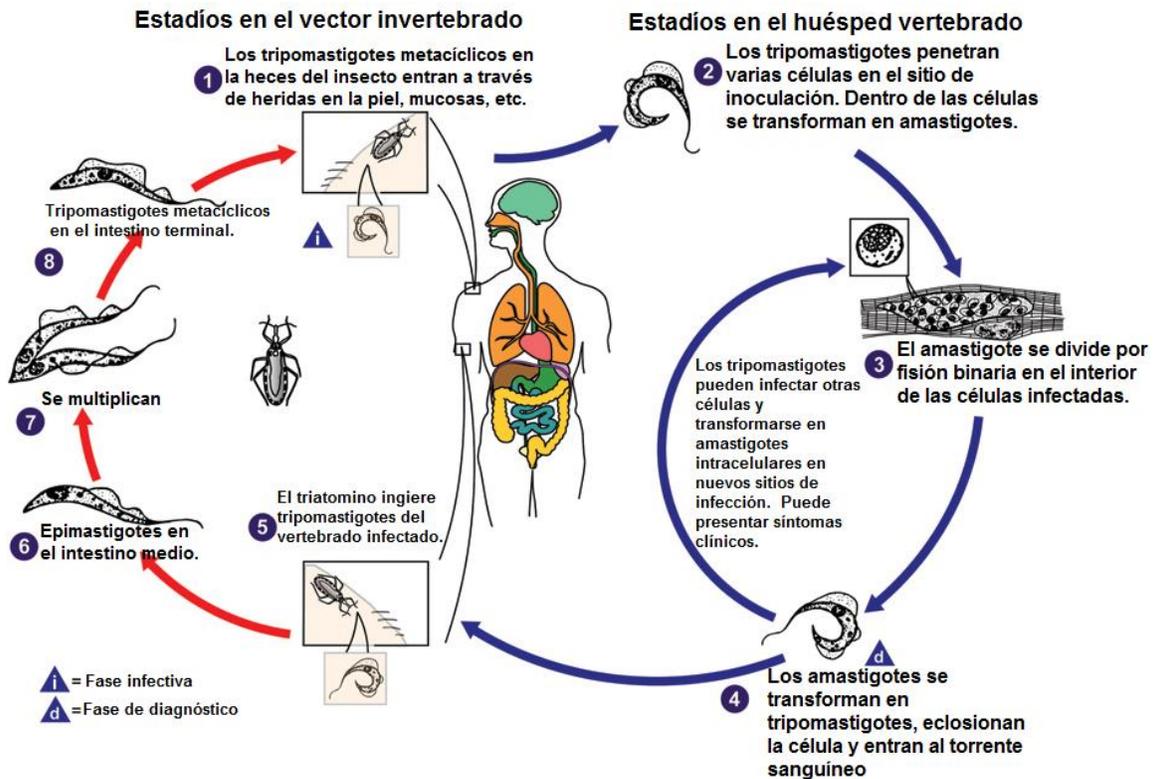
*Trypanosoma cruzi*, el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, es un protozooario flagelado perteneciente al filum Sarcomastigophora, subfilum Mastigophora, clase zoomastigofora, orden Kinetoplastida y familia Trypanosomatidae, género *Trypanosoma*, subgénero *Schizotrypanum*, especie *T. cruzi*.

*T. cruzi* es capaz de invadir una gran diversidad de células de mamífero, incluyendo células de corazón, timo, sistema nervioso central y de músculo esquelético (Marino y col., 2003). La población de *T. cruzi* existente es diversa, lo que ha llevado a utilizar criterios de

clasificación de la variedad de cepas encontradas en función a diferencias existentes, tanto genéticamente, como en cuanto a la sensibilidad a quimioterapias, virulencia, patogenicidad, formas clínicas y patológicas de la enfermedad, especies de huésped vertebrado y origen geográfico (Martins y col., 2012).

*T. cruzi* posee 3 estadios durante su ciclo de vida que difieren desde el punto de vista morfológico, metabólico y molecular, y se alternan entre el vector y el huésped vertebrado. Los epimastigotes (de 20-40  $\mu\text{m}$  de longitud) y amastigotes intracelulares (de alrededor de 3  $\mu\text{m}$  de longitud) son las formas proliferativas mientras que los tripomastigotes metacíclicos de alrededor de 20  $\mu\text{m}$  de longitud y 1,2  $\mu\text{m}$  de ancho presentes en el recto del vector, así como los tripomastigotes sanguíneos de alrededor de 13  $\mu\text{m}$  de longitud y 1,3  $\mu\text{m}$  de ancho presentes en el plasma del huésped, no son proliferativos (Navarro y col., 2003). Como se representa en figura 1, cuando el vector se alimenta de un mamífero infectado, ingiere los tripomastigotes sanguíneos y algunos amastigotes diferenciados extracelularmente (Tyler, 2001), los cuales se transforman en epimastigotes en el estómago del insecto y se dividen por fisión binaria en el intestino medio. Al agotarse los nutrientes en el intestino terminal, los epimastigotes se diferencian en tripomastigotes metacíclicos después de adherirse con el flagelo a la cutícula cerosa de las células del recto del insecto. Los tripomastigotes son forzados a salir en las heces y orina cuando el insecto se alimenta de nuevo y entran en el huésped a través de heridas en la piel (en general a través de la picadura del insecto) y las mucosas. Una vez que infectan las células en el sitio de inoculación, los tripomastigotes se diferencian en amastigotes en el interior celular, luego proliferan por fisión binaria y al llenar la célula comienzan un proceso continuo de diferenciación a tripomastigotes, los cuales rompen la membrana y son

liberados al intersticio o torrente sanguíneo donde pueden infectar nuevas células (de Souza, 2002).



**Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* mostrando los estadios morfológicos del parásito en el vector invertebrado y en el huésped mamífero (CDC, 2015).**

Dependiendo de la cepa de *T. cruzi* involucrada, le toma alrededor de 20 minutos entrar en la célula huésped, y después de la invasión, el parásito tarda entre 1 y 2 horas en romper la membrana vacuolar y entre 2 y 3 horas en diferenciarse a la forma amastigote y entrar en la fase replicativa del ciclo celular, sintetizando el ADN entre 24 y 44 horas. El tiempo generacional del amastigote dura entre 8 y 15 horas, y en un período que transcurre durante 4 a 5 días, pasa por 2-9 ciclos de replicación por fisión binaria hasta llenar la célula. Posteriormente se diferencian a tripomastigotes, los cuales rompen la membrana celular y son liberados (de Araujo, 1999).

Entre los rasgos distintivos de *T. cruzi*, algunos de los cuales comparte con miembros del orden Kinetoplastida y la familia Trypanosomatidae, están algunas estructuras que componen la superficie celular como los microtúbulos subpeliculares, presentes en la mayoría de los eucariotas. Sin embargo, en *T. cruzi* estos microtúbulos presentes en la superficie interna de la membrana celular están estrechamente asociados entre sí y con la membrana a través de filamentos cortos cuya naturaleza no es bien conocida.

El flagelo (figura 2) es una estructura presente en todos los tripanosomatideos incluyendo a *T. cruzi*, el cual se une al cuerpo celular y su tamaño varía dependiendo del estadio de desarrollo, midiendo 1  $\mu\text{M}$  de longitud en los amastigotes y cerca de 20  $\mu\text{M}$  en las formas elongadas del parásito.

*T. cruzi* posee una única mitocondria que ocupa hasta el 12% del volumen total de la célula y en este organelo se localiza un complejo arreglo de moléculas circulares de ADN (kinetoplasto).

Los peroxisomas presentes en los tripanosomatideos son llamados glicosomas debido a que contienen enzimas glicolíticas además de otras destinadas al metabolismo del peróxido,  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, síntesis de fosfolípidos, entre otras (de Souza, 2002).

Los acidocalcisomas son organelos conservados desde bacterias hasta el hombre (Docampo y col., 2005). En protistas como *T. cruzi* estos organelos tienen un diámetro promedio de 0,2-0,6  $\mu\text{m}$  y constituyen reservorios de aminoácidos básicos, ortofosfato, pirofosfato y polifosfato, éste último acompañado con cationes como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y especialmente  $\text{Ca}^{2+}$ . Los acidocalcisomas ocupan entre el 1-2% del volumen celular total, son electrodensos y ácidos por lo cual acumulan colorantes diamidínicos como la

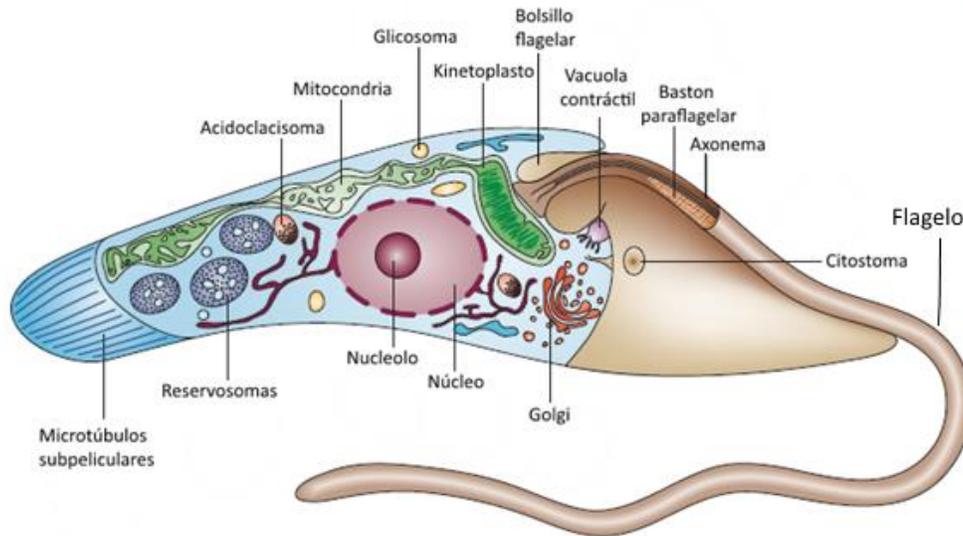
naranja de acridina. Además estos organelos poseen una serie de bombas y antiportadores involucrados en la regulación de iones (Docampo, 2011).

El bolsillo flagelar de los tripanosomatideos constituye una invaginación de la membrana plasmática en la región posterior de la célula, de la cual emerge el flagelo y representa una región altamente especializada en actividad endocítica y exocítica y en la que se localizan una gran cantidad de proteínas y enzimas.

Otras estructuras características en *T. cruzi*, la constituyen el citostoma y el reservosoma. El citostoma está presente sólo en los estadios replicativos de *T. cruzi* y se trata de una invaginación de la membrana del bolsillo flagelar que penetra profundamente hacia el citoplasma (Okuda y col., 1999). Esta estructura celular que se observa como una apertura en la membrana con forma de embudo, juega un rol importante en la nutrición del parásito y en este sitio ocurre la internalización de macromoléculas vía vesículas endocíticas, que subsecuentemente son procesadas en los reservosomas.

Por otra parte, los reservosomas son organelos esféricos que miden alrededor de 0,7  $\mu\text{m}$  de diámetro, están localizados principalmente en la región posterior de la célula y su función es acumular todas las macromoléculas que han sido ingeridas por el parásito a través de un proceso endocítico. Además, este compartimiento contiene grandes cantidades de la mayor cistein proteasa de *T. cruzi*, la cruzipaina.

El retículo endoplasmático en *T. cruzi* se encuentra en contacto con la membrana plasmática y los microtúbulos subpeliculares. El complejo de Golgi se ubica en la región anterior de la célula cerca del kinetoplasto y el bolsillo flagelar; el tamaño de sus cisternas varía dependiendo del estadio de desarrollo del parásito (de Souza, 2002).



**Figura 2. Componentes celulares del epimastigote de *T. cruzi*. (Docampo, 2005)**

Se identifican tres fases en el proceso de interacción de *T. cruzi* con una célula huésped: la adhesión y reconocimiento, la señalización y la invasión. La adhesión del parásito involucra una gran cantidad de moléculas y receptores en la superficie de la célula huésped y del parásito, así como algunas moléculas secretadas por éste (por ejemplo, cruzipaina y factores de crecimiento tumoral) que también intervienen en este proceso. Este conjunto de moléculas involucradas en la adhesión a la célula huésped generan en ésta una cascada de señalización con el consecuente incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), necesario para que ocurra la invasión. De igual forma, el proceso de invasión requiere la movilización del  $\text{Ca}^{2+}$  en el parásito (de Souza y col., 2010).

### **1.3. Epidemiología y patología de la enfermedad de Chagas**

*T. cruzi* es transmitido vectorialmente por insectos triatominos con régimen alimenticio hematofágico (Orden Hemiptera, Familia Reduviidae, subfamilia Triatominae) y tiene como huéspedes a roedores en el ciclo selvático. Sin embargo, el vector puede

invadir viviendas en el ciclo doméstico e infectar humanos (Yeo, 2003). Existen cerca de 140 especies reconocidas de triatominos y 22 de ellas en Venezuela, siendo las de mayor poder de transmisión, *Rhodnius prolixus* principalmente en América central y *Triatoma infestans* responsable del 85% de los casos en los países del Cono Sur (Soto, 2009).

Además de la transmisión vectorial, en la que el parásito presente en las heces del insecto gana entrada al organismo a través de heridas en la piel de las membranas mucosas, *T. cruzi* también puede ser transmitido mediante transfusiones sanguíneas, siendo esta la forma de transmisión principal en áreas urbanas y responsable del 10% de los casos reportados. La tercera forma de transmisión más importante es la forma congénita para la cual se reportan entre 5.000 y 18.000 casos anualmente.

Se han reportado microepidemias de Chagas agudo debido a la transmisión oral de *T. cruzi* después del consumo de alimentos contaminados con las heces del insecto vector (Prata, 2001). Entre las microepidemias documentadas de Chagas agudo está la producida en Caracas, Venezuela, en la que se reportaron 103 casos de infección por el consumo de un jugo de guayaba contaminado, de los cuales 44 fueron niños y uno murió por esta causa (Alarcón, 2010).

Otras formas de transmisión menos frecuentes es a través de accidentes durante trabajo en el laboratorio y mediante trasplante de órganos.

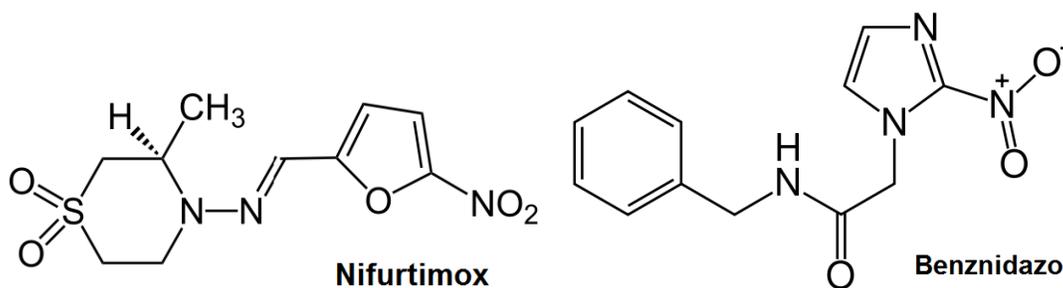
Existen diferencias geográficas en cuanto a la distribución de las cepas del parásito y una asociación con la frecuencia de los síntomas que producen, entre los cuales están mega-esófago u otras afecciones del esófago, mega-colon, denervación del sistema nervioso autónomo y cardiomiopatía. Las afecciones cardíacas representan las más frecuentes en Venezuela, ya que de las 4.630 muertes registradas de pacientes chagásicos entre 1997 y 2006, el 99.5% presentaron afecciones en éste órgano (Rísquez, 2009).

Aún en la actualidad la enfermedad de Chagas representa la principal enfermedad parasitaria en Latinoamérica y reportes de centros de control y prevención (CDC), 2013, indican que en México, Centro y Suramérica hay alrededor de 8 millones de personas que padecen esta enfermedad y se estiman en más 300.000 personas afectadas en los Estados Unidos. En Venezuela se reporta un número absoluto de 769 muertes anuales en promedio por ésta causa (Rísquez, 2009).

Desde el punto de vista clínico la enfermedad de Chagas puede dividirse en tres fases que varían en los síntomas que el paciente presenta. *T. cruzi* marca su entrada en el organismo durante la fase aguda que puede durar de 2 a 4 meses, período durante el cual una variedad de células parenquimales son parasitadas y en algunos casos presenta manifestaciones clínicas como inflamación de uno de los párpados (signo de Romana) y conjuntivitis, inflamación de los ganglios linfáticos, fiebre, taquicardia, edema y esplenomegalia. La mortalidad es de entre el 5 y 10% en los pacientes sintomáticos durante esta fase. Después de la fase aguda las manifestaciones clínicas desaparecen y el paciente entra en la fase crónica de la enfermedad, en la que no hay síntomas aparentes de infección, pasando por un período de latencia al que usualmente se llama fase indeterminada y el cual puede durar entre 10 y 30 años. Después de éste período, entre el 30 y 40% de los pacientes infectados presentan manifestaciones clínicas relacionadas con el compromiso de órganos clave como el corazón produciendo la cardiomiopatía chagásica (Prata, 2001). En este caso la patofisiología de daño al miocardio está basada en el daño directo causado por las formas intracelulares del parásito produciendo pérdida de la función contráctil y por ende cambios en los patrones electrocardiográficos (Benaim y Mondolfi, 2012).

#### 1.4. Tratamiento actual

Desde hace más de un siglo de su descubrimiento, todavía se enfrentan serios desafíos respecto a la enfermedad de Chagas, incluyendo la ausencia de inmunoprofilaxis y una terapia basada en sólo dos drogas disponibles (Figura 3) que son el nifurtimox (5-nitrofurano-[3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenamina) tetrahidro-4H-1,4- tiazina-1,1-dióxido]-Bayer 2502) y el benznidazol (2-nitroimidazol (N-benzil-2-nitroimidazol acetamida)-RO 7-1051). El nifurtimox actúa incrementando los radicales libres como  $O^{2-}$  y  $H_2O_2$ , así como acelerando la producción de metabolitos electrofílicos e incrementando el consumo de oxígeno en *T. cruzi*. Por otra parte, el benznidazol inhibe la enzima fumarato reductasa del parásito (Turrens y col., 1996) y los metabolitos resultantes de la reducción de éste compuesto producen una serie de efectos deletéreos en el parásito vía interacciones covalentes, incluyendo daño al ADN y agotamiento de tioles (Kryshchyshyn y col., 2014).



**Figura 3. Estructura del nifurtimox y el benznidazol.**

A pesar de que estas drogas fueron desarrolladas empíricamente hace más de cuatro décadas, resultan insatisfactorias como tratamiento por diversas razones: presentan resultados variables dependiendo de la fase de la enfermedad, poseen una eficacia limitada especialmente en pacientes crónicos (Soeiro y de Castro, 2009). De hecho, en un reciente estudio en 2.854 pacientes a los cuales se les administró Benznidazol o placebo durante 80

días, y fueron seguidos por 5.4 años (BENEFIT), se demostró que si bien la parasitemia disminuye en el tiempo, no se obtiene ninguna mejoría en la cardiomiopatías asociada a la enfermedad (Morillo y col., 2015). Otra desventaja de estos compuestos lo constituye la presencia de cepas del parásito que son naturalmente resistentes y los efectos adversos sobre el organismo que en muchos casos conllevan a la suspensión del tratamiento. Entre los efectos secundarios más importantes están la hipersensibilidad, depresión de la médula ósea y polineuropatía periférica o daño al sistema nervioso periférico (Prata, 2001).

### **1.5. Blancos quimioterapéuticos en *T. cruzi***

Investigaciones recientes proponen una gran variedad de blancos para el diseño de drogas incluyendo inhibidores de enzimas que participan de rutas biosintéticas como la síntesis de esteroides, la glicólisis, la ruta de las pentosas fosfato, enzimas del metabolismo redox dependiente de tioles, otras enzimas cruciales en el parásito como la cistein-proteasa cruzipaina, y drogas que se dirigen al ADN del kinetoplasto del parásito (Soeiro y de Castro, 2009).

Hay 20 pasos metabólicos involucrados en la síntesis de ergosterol, un esteroide de membrana exclusivo de tripanosomatidos y hongos, que no está presente en las membranas celulares de humanos (las cuales en su lugar presentan colesterol). Las enzimas involucradas en esta ruta constituyen el blanco de diferentes compuestos. La hidroximetilglutaril-CoA reductasa es inhibida por estatinas como la lovastatina (Florin y col., 1990) y la terbinafina, y por azoles como el ketoconazol (Urbina y col., 1993). La farnesil pirofosfato sintasa es inhibida por bisfosfonatos como el risedronato (Bouzahzah y col., 2005) y derivados del benzofurano como la amiodarona inhiben la oxidoescualeno

ciclasa (OSC) de *T. cruzi* (Benaim y col., 2006), y de forma similar, compuestos que mimetizan al sustrato oxidoescualeno constituyen inhibidores de esta enzima (Buckner y col., 2001). La quinuclidina BPQ-OH inhibe la actividad de la escualeno sintasa en *T. cruzi* y *L. mexicana* (Urbina y col., 2002). Los azoles son bien conocidos como inhibidores de la síntesis de ergosterol, como es el caso del itraconazol, posaconazol, ketoconazol y fluconazol que inhiben la enzima esterol 14- $\alpha$ -desmetilasa (Soeiro y de Castro, 2009). Sin embargo, tienen la desventaja de inducir resistencia *in vitro* e *in vivo* (Buckner y col., 1998).

La mayoría de las enzimas glicolíticas en *T. cruzi* se encuentran compartamentalizadas en los glicosomas y presentan diferencias respecto a sus análogos en humanos. Tal es el caso de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa que es inhibida por flavonoides (Tomazela y col., 2000). La hexoquinasa de *T. cruzi* responsable de la primera reacción glicolítica es inhibida por bisfosfonatos (Sanz y col., 2007).

Componentes de la cadena transportadora de electrones representan un blanco de interés ya que existen diferencias entre los citocromos presentes en *T. cruzi* y sus contrapartes en humanos (Stoppani y col., 1980) y se han reportado compuestos que inhiben el crecimiento de epimastigotes alterando su respiración celular. Tal es el caso del hidroxianisol BHA, que inhibe la cadena transportadora de electrones generando un cambio de NAD(P) a un estado más reducido y del citocromo b a un estado más oxidado (Maya y col., 2006).

Enzimas responsables del metabolismo redox dependiente de tioles en *T. cruzi* representan un blanco potencial para la quimioterapia ya que estos parásitos poseen un metabolismo de tioles completamente diferente del presente en humanos. Este sistema es dependiente de tripanotión, el cual es reducido por la enzima tripanotión reductasa y actúa

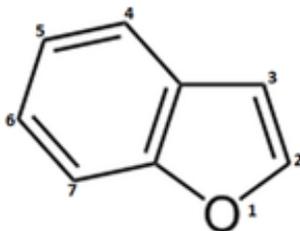
como donador de electrones en diversos procesos, especialmente en la defensa contra el estrés oxidativo y metabolización de radicales libres. Se han reportado diversos inhibidores reversibles e irreversibles de la tripanotión reductasa, tales como la mepacrina, un compuesto acridínico de tres anillos aromáticos que actúa como un inhibidor competitivo, nitrosoúreas, las cuales son inhibidores covalentes y diversas naftoquinonas y nitrofuranos, los cuales actúan como sustratos subversivos debido a que convierten a la enzima reductasa cuya función fisiológica es mantener altos niveles de tioles en la célula, en una enzima pro-oxidativa o productora de especies reactivas de oxígeno (Siegel y Schöneck, 1995).

Las proteinasas de *T. cruzi* están involucradas en múltiples procesos celulares, entre estas se encuentra la cruzipaina o cruzaina, que constituye el miembro más abundante de la familia de cisteín-proteasas en el parásito y la cual está presente en los cuatro estadios de desarrollo de *T. cruzi*. Esta enzima realiza funciones esenciales en la supervivencia, diferenciación y crecimiento del parásito. Tales características convierten a la cruzipaina en uno de los potenciales blancos más investigados en el diseño de drogas antichagásicas y en este sentido se han reportado una gran variedad de inhibidores tanto reversibles como irreversibles de origen peptídico, tales como compuestos basados en el peptidil diazometano, peptidil cetona, peptidil vinil sulfona, bis-acrilazidas, azepanona. Estructuras cíclicas basadas en cetonas y en nitrilos han exhibido potencia antiparasítica *in vitro*. También inhibidores no peptídicos como tiosemicarbazonas han sido aplicadas en evaluaciones clínicas. Aminoaciltiazolidonas, derivados de etnilbenzofuroxano, inhibidores reversibles basados en cetonas con constantes de inhibición en el rango nanomolar (Huang y col., 2003), entre otros, han mostrado eficacia inhibiendo cistein proteasas parasíticas y el crecimiento de parásitos en cultivo (Duschak, 2011).

El ADN del kinetoplasto presente en la mitocondria de los organismos pertenecientes a este orden taxonómico, constituye el blanco de diamidinas aromáticas como la pentamidina, la cual se une al surco menor en secuencias ricas en AT e impide la transcripción (Soeiro y De Castro, 2009). Otros compuestos como es megazol inhiben enzimas de reparación o acción sobre el ADN (Enanga y col., 2003).

### **1.6. Compuestos derivados del benzofurano como agentes tripanocidas.**

Desde inicios de los 60, los compuestos nitroheterocíclicos han estado disponibles para el tratamiento de protozoarios anaeróbicos (Mital, 2009). Entre estos se encuentran los compuestos usados actualmente para el tratamiento de la enfermedad de Chagas nifurtimox y benznidazol. Con el estudio de los compuestos nitroheterocíclicos, se han establecido estructuras químicas comunes en estos, que despliegan eficacia contra tripanosomatidios, tales como el benzofurano, que es la fusión de un benzil (ciclo aromático de 6 carbonos) y un furano (anillo aromático de 5 átomos: 1 oxígeno y 4 carbonos), presentando la siguiente estructura:



**Figura 4. Estructura general del benzofurano, enumerando los átomos del sistema que pueden sustituirse para generar derivados.**

En diversos trabajos llevados a cabo desde los años 70, se ha utilizado esta estructura básica dentro de los compuestos sintetizados, realizando sustituciones, con la consecuente generación de derivados que poseen actividad tripanocida. Dann y col., 1972, sintetizaron

unas diamidinas derivadas del benzofurano, las cuales evaluaron *in vivo* sobre modelos murinos de infección con *T. gambiense*, *T. rhodesiense* y *T. congolense*, mostrando una actividad moderada contra estos parásitos. Un año después el mismo grupo de investigadores sintetiza otra serie de diamidinas con tres anillos o dos sistemas de anillos que presentaban motivos benzofuranoides y del mismo modo mostraron actividad *in vivo* contra los parásitos mencionados (Dann y col., 1973).

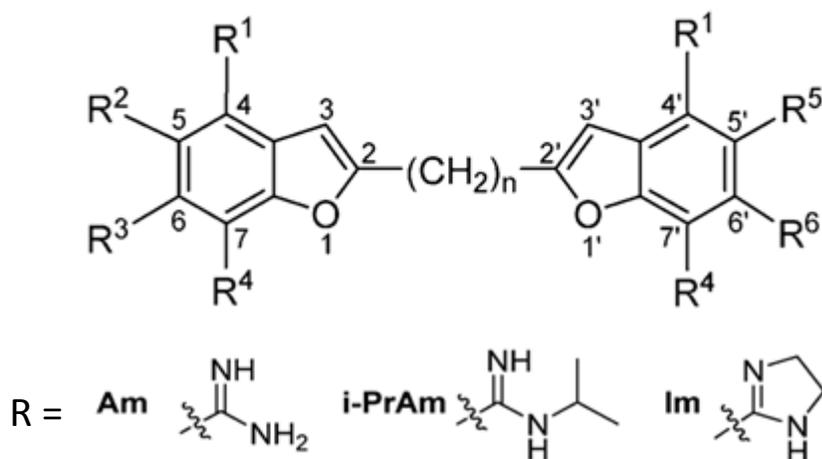
La amiodarona, un derivado del benzofurano, fue sintetizada por una empresa belga en 1961 y desde entonces se usó para tratar la angina de pecho y posteriormente arritmias cardíacas. Sin embargo, no se conocía el mecanismo de acción ni si podía tener actividad antimicrobiana hasta que en 1998 comprueban la eficacia *in vivo* de análogos sintetizados a partir de la amiodarona contra *T. cruzi* (Kinnamon y col., 1998). Courchense y col., 2002, reportaron el efecto antifúngico de amplio espectro de la amiodarona y evidencias de que este mecanismo estaba mediado por la alteración en los niveles de  $Ca^{2+}$  en *S. cerevisiae*, mecanismo que fue reportado en mayor detalle por Gupta y col., 2003, en donde además se demuestra la acción inhibitoria de la amiodarona sobre *C. albicans*.

La actividad directa de la amiodarona sobre *Trypanosoma cruzi* fue reportada por primera vez por Benaim y col., 2006, demostrando la actividad de esta droga contra *T. cruzi* tanto *in vitro* como *in vivo* y su efecto sinérgico con el posaconazol, un azol con potente efecto tripanocida. Aunque Urbina y Docampo, 2003, reportaron que el posaconazol es capaz de inducir una cura parasitológica radical en modelos murinos de Chagas agudo, reportándose por primera vez para la fase crónica, y que este efecto de la droga estaba mediado por inhibición de la biosíntesis de ergosterol en el parásito a nivel de la C14 $\alpha$  demetilasa de esteroides; En el trabajo de Benaim y col., 2006, se reporta la capacidad de la amiodarona de alterar la homeostasis intracelular del  $Ca^{2+}$  y de inhibir la síntesis de

ergosterol al nivel de la OSC en *T. cruzi*. En esta investigación, demuestran que la amiodarona tiene una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 20  $\mu\text{M}$  y un  $\text{CI}_{50}$  de 9  $\mu\text{M}$  sobre epimastigotes, mientras que los valores correspondientes para el posaconazol fueron de 20 y 14 nM. Por otro lado, las drogas resultaron más potentes sobre los amastigotes intracelulares de *T. cruzi* y el porcentaje de células Vero infectadas, con una CIM y  $\text{CI}_{50}$  de 8 y 2.7  $\mu\text{M}$  para la amiodarona, y las concentraciones correspondientes para el posaconazol fueron 3 y 0.25 nM. Por otra parte, al combinar ambas drogas obtuvieron un índice inhibitorio fraccional de 0.42, indicando una alta potenciación entre las drogas. En un tratamiento combinatorio aplicado a modelos murinos de Chagas, observaron un retraso en el desarrollo de la parasitemia y 100% de supervivencia con un resultado negativo en la prueba parasitológica (mediante PCR) en 8 de 10 ratones, a diferencia de lo obtenido para los ratones que fueron tratados con una sola droga, 6 de los 10 tratados con posaconazol dieron negativo mientras que ninguno de los tratados con amiodarona resultaron negativos. En parte, la base molecular de la actividad antiparasítica de la amiodarona fue demostrada mediante métodos fluorimétricos y microscopía confocal, determinando que la amiodarona incrementa considerablemente la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) en los epimastigotes y que este efecto es reforzado de forma importante por el posaconazol. Además comprobaron que el aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  era producto de la liberación del ion desde compartimientos intracelulares como la mitocondria.

Serrano y col., 2009a, reportan un efecto de la amiodarona contra *L. mexicana* similar al obtenido por Benaïm y col, 2006 sobre *T. cruzi*. Asimismo, se demostró que esta droga presenta un notable efecto sinérgico tanto *in vitro* como *in vivo*, con la miltefosina, droga de uso común contra la leishmaniasis (Serrano y col., 2009b).

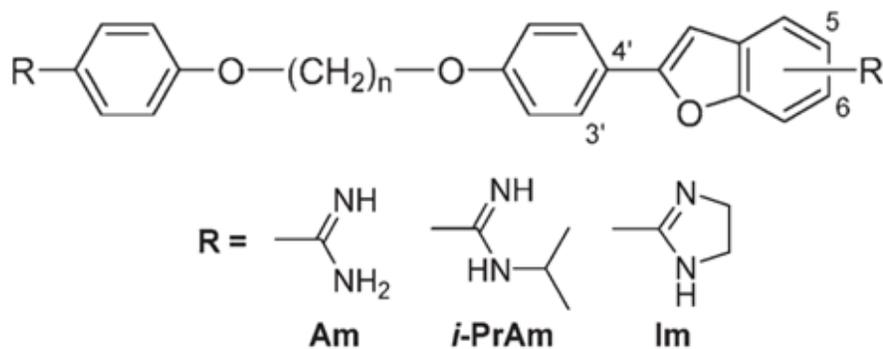
Por otra parte, Bakunova y col., 2007, sintetizaron 43 cationes bisbenzofuranos (Figura 5). Otra serie de compuestos con dos motivos benzofuranoides en su estructura que mostraron actividad *in vitro* contra tripomastigotes de *T. b. rhodesiense*, *P. falciparum* y amastigotes axénicos de *L. donovani*, con valores de  $CI_{50}$  que van desde 8 nM hasta 18.7  $\mu$ M. De los 43 bisbenzofuranos, 16 presentaron valores de  $CI_{50}$  menores a 100 nM. Entre estos compuestos, el que mostró mayor actividad anti- *T. b. rhodesiense*, con un  $CI_{50}$  de 8 nM fue el compuesto 8, que posee dos amidinas en la estructura básica mostrada en la figura 4, una en la posición  $R^2$  y otra en la  $R^5$  y 2 carbonos entre ambos benzofuranos. Los valores  $IC_{50}$  más bajos (3 nM en ambos casos) sobre *P. falciparum* fueron obtenidos para los compuestos 8 y 9; el compuesto 9 posee N-isopropilamidinas en las posiciones  $R^2$  y  $R^5$  y dos carbonos entre ambos benzofuranos. Sobre *L. donovani*, el  $CI_{50}$  más alto lo mostró el compuesto 14 que posee amidinas en las posiciones  $R^3$  y  $R^6$  y dos carbonos entre los dos motivos benzofuranoides, con un valor de 0.88  $\mu$ M.



**Figura 5. Estructura básica de los bisbenzofuranos reportados por Bakunova y col., 2007.** En la estructura superior, n representa el número de carbonos entre los dos motivos benzofuranoides y los grupos R pueden ser amidina (Am), N-isopropilamina (i-PrAm) o imidazol (Im).

Estos prometedores valores de  $CI_{50}$  son reforzados por los índices de selectividad (IS), calculados como el  $CI_{50}$  sobre mioblastos L6 de rata, entre el  $CI_{50}$  obtenido para el respectivo parásito, los cuales resultaron muy altos. En el caso de los compuestos 8 y 9, los valores de IS sobre *P. falciparum* fueron de 7.167 y 59.667, respectivamente. El IS del compuesto 8 sobre *T. b. rhodesiense* fue de 2.688, mientras que el valor correspondiente del compuesto 14 para *L. donovani* fue de 89. Los altos índices de selectividad indican que a las concentraciones requeridas para inducir una inhibición del parásito, las células de mamífero (en este caso mioblastos L6 de rata) no se ven afectadas, presentando la posibilidad de usar estos compuestos como terapia contra los respectivos parásitos.

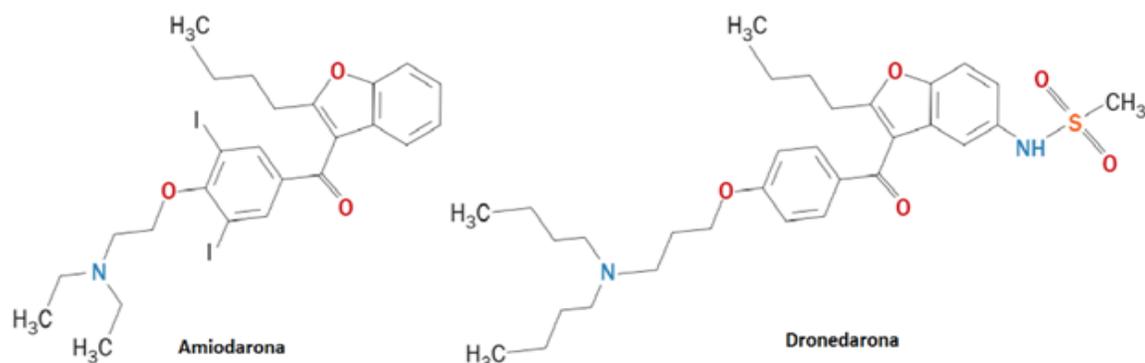
El mismo grupo de investigadores, reportó en 2008, la síntesis de 49 compuestos 2-penilbenzofuranos catiónicos y evaluaron actividad antiprotozoaria de cada uno, encontrando que dos de ellos, el 1 y el 45, poseían una potente acción anti-*T. b. rhodesiense* con valores de  $CI_{50}$  de 3 y 9 nM respectivamente (Bakunov, 2008). Nuevamente, Bakunov y col., 2009, reportan la síntesis de 48 derivados de pentamidina portando el benzofurano como motivo con propiedades antiprotozoarias, demostrando que tienen un efecto antitripanosomátidos, siendo los más potentes, los compuestos 26, 27, 37 y 38, con valores de  $CI_{50}$  sobre *T. b. rhodesiense* de 41, 61, 25 y 88 nM, respectivamente, mientras que los valores correspondientes sobre mioblastos L6 de rata fueron 45,6, 10,3, 8,6 y 49,9  $\mu$ M. Por otra parte los compuestos más potentes sobre *L. donovani* fueron el 12, 25, 26, 28, 32, 34, 37, 39 y 44 con valores de  $CI_{50}$  de 1.9, 0.78, 1.6, 0.61, 2.1, 0.65, 0.78, 0.48 y 1.4  $\mu$ M, respectivamente. Todos estos compuestos poseen en su estructura un trimetileno uniendo los dos grupos fenílicos y un benzofurano en la posición 4' (figura 6).



**Figura 6. Estructura básica de los derivados de pentamidina portando como motivo el benzofurano, sintetizados por Barkunov y col., 2009.**

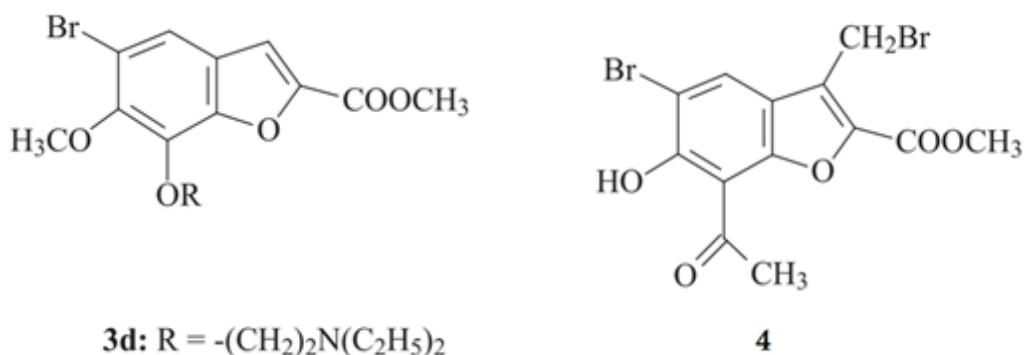
En julio de 2009, la dronedarona, un nuevo compuesto derivado de la amiodarona producido por Sanofi-Aventis fue aprobado por la FDA como antiarrítmico (Page y col., 2009). Este compuesto posee la misma estructura que la amiodarona, con la diferencia de que no presenta los dos átomos de yodo y tiene un menor carácter hidrofóbico (Figura 7), lo que le confiere un perfil de seguridad mejorado o menor toxicidad. Benaim y col., 2012, reportaron la actividad anti-*T. cruzi* de éste derivado del benzofurano, demostrando que tiene un efecto antiproliferativo sobre epimastigotes ( $CI_{50}$  de  $4.9 \mu M$ ) y amastigotes dentro de células Vero ( $CIM=2 \mu M$  y una  $CI_{50}= 0.75 \mu M$ ), y que la acción sobre epimastigotes está mediada en parte por la alteración de la homeostasis del  $Ca^{2+}$  intracelular, a través de la disipación del potencial electroquímico mitocondrial y de la alcalinización de los ácidocalcisomas. Benaim y col., 2014, reportan la actividad inhibitoria de la dronedarona sobre *L. mexicana* con una  $CI_{50}$  de  $115 nM$  sobre promastigotes y un valor correspondiente de  $0.65 nM$  sobre amastigotes. Este valor es 1000 veces menor que el encontrado para amastigotes de *T. cruzi*. Al igual que en *T. cruzi*, la actividad antiparasítica sobre promastigotes de *L. mexicana* está mediada por la alteración del nivel de  $Ca^{2+}$  citoplasmático, siendo liberado desde compartimientos intracelulares. Esto lo atribuyeron a

al menos dos organelos que sirven como almacenes de  $\text{Ca}^{2+}$ , la mitocondria, que resultaba desenergizada y los acidocalcisomas, que fueron alcalinizados tras la exposición de los promastigotes a 115 nM de dronedarona. Por otra parte, demostraron que la dronedarona tiene un efecto inhibitorio sobre la biosíntesis de ergosterol en *L. mexicana* a nivel de la OSC.



**Figura 7. Estructura química de los derivados del benzofurano, amiodarona y dronedarona (Benaim y Paniz-Mondolfi, 2012).**

Hejchman y col., 2012, sintetizan 12 compuestos derivados de los ácidos 2- y 3-benzofurancarboxílicos, de los cuales dos mostraron una marcada actividad antifúngica, los derivados 3d (metil 5-bromo-7-(*O*-etil-2'-dietilamino)-6-metoxi-2-benzofurancarboxilato) y 4 (Metil 7-acetil-5-bromo-6-hidroxi-3-bromometil-2-benzofurancarboxilato), los cuales se muestran en la Figura 8. Este segundo compuesto es el que utilizamos en el presente trabajo y se denominará D4 en menciones posteriores. Ambos compuestos inhibieron completamente el crecimiento de *Cryptococcus neoformans* a una concentración de 20  $\mu\text{M}$ .



**Figura 8. Estructura de los derivados 3d y 4 del benzofurano sintetizados por Hejchman y col., 2012.**

### **1.7. Mecanismos reguladores del $\text{Ca}^{2+}$ intracelular como blancos quimioterapéuticos en *T. cruzi*.**

La investigación creciente acerca de la biología celular ha generado evidencia convincente del rol esencial que tiene el  $\text{Ca}^{2+}$  en la señalización celular, y las transiciones en las concentraciones de este ion están implicadas en varios aspectos de la fisiología celular, incluyendo la transcripción genética, regulación del ciclo celular, proliferación celular, rearrreglo del citoesqueleto y exocitosis. Del mismo modo, el  $\text{Ca}^{2+}$  tiene una función primordial en los diversos tipos de muerte celular, y se ha establecido que perturbaciones en la homeostasis de este catión, ya sean incrementos considerables en la concentración intracelular o variaciones más sutiles que alteren su distribución entre compartimientos intracelulares, pueden resultar en muerte celular (Zhivotovsky y Orrenius, 2011).

Se ha reportado que en tripanosomatídeos, así como en otros eucariotas, el  $\text{Ca}^{2+}$  representa un mensajero intracelular fundamental (Benaim y García, 2011).

En el proceso de invasión, se ha demostrado que tras la asociación del tripomastigote de *T. cruzi* con la célula huésped, hay un incremento en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) en el parásito que es necesaria para que se complete la invasión (Moreno y col., 1994). También en este proceso son necesarias transiciones en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en la célula huésped como lo muestran investigaciones en las que un tratamiento previo de fibroblastos de riñón de rata con agentes quelantes de  $\text{Ca}^{2+}$  previenen la invasión por tripomastigotes. Estudios paralelos indican que factores de membrana en el tripomastigote generan el incremento en la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$  en la célula huésped vía una proteína G heterotrimérica. Los receptores activados por *T. cruzi* en la célula huésped están acoplados a proteínas G cuyas subunidades  $G_\alpha$  activan canales de  $\text{Ca}^{2+}$  o bien a la fosfolipasa-C, la cual cataliza la producción de  $\text{IP}_3$  y subsecuente liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde compartimientos intracelulares (Tardieux y col., 1994). En este proceso, el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular media la organización de los microfilamentos de actina, la exocitosis y fusión de los lisosomas con la membrana de célula huésped en el sitio de contacto con el parásito (Tardieux y col., 1992). Modelos más recientes sobre el mecanismo de invasión sugieren que no solo a través de rutas de señalización, sino además por lesiones transitorias en la membrana de la célula huésped se producen incrementos del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular que median la movilización de los lisosomas en la ruta de reparación de la membrana celular, con la consecuente liberación de la enzima esfingomielinasa ácida, la cual cliva esfingosina en la membrana lesionada produciendo segmentos ricos en ceramida, los cuales poseen la propiedad de agruparse y producir invaginaciones en la membrana, facilitando de este modo la internalización del parásito (Fernandes y Andrews, 2012).

Además de la importante función del  $\text{Ca}^{2+}$  durante la invasión celular por *T. cruzi*, este ion también es esencial en la supervivencia del parásito en los diversos ambientes

representados por el tracto digestivo del vector, el plasma sanguíneo en el que la  $[Ca^{2+}]_i$  es de 2mM y el citoplasma de la célula huésped donde la  $[Ca^{2+}]_i$  está entre 30-100 nM. En cada uno de estos ambientes *T. cruzi* es capaz de mantener una  $[Ca^{2+}]_i$  entre 20-50 nM (Benaim y García, 2011). *Leishmania sp.*, el organismo causante de la leishmaniasis, posee mecanismos reguladores de  $Ca^{2+}$  similares a *T. cruzi*, de manera que estos protozoarios han incorporado mecanismos eficientes de regulación de este ion en cada uno de los estadios de desarrollo y durante el proceso de diferenciación. Considerando el importante rol del  $Ca^{2+}$ , la alteración de su homeostasis tiene un efecto citotóxico sobre estos parásitos. Evidencias acerca de las diferencias entre los mecanismos reguladores del  $Ca^{2+}$  en tripanosomatídeos respecto a los de humanos, los proponen como blancos quimioterapéuticos en el tratamiento de la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis (Benaim y García, 2011).

El  $Ca^{2+}$  libre en el citoplasma es solo una pequeña fracción del ion presente en la célula pues está en su mayoría compartimentalizado en organelos o unido a proteínas, polifosfatos y otros componentes celulares. Los tripanosomatídeos mencionados controlan la  $[Ca^{2+}]_i$  mediante una variedad de sistemas de transporte y proteínas de unión a este catión, las cuales han sido identificadas (figura 7), y parcial o totalmente caracterizadas (Ulrich y col., 2010). Entre los organelos que sirven como compartimientos de  $Ca^{2+}$ , los tripanosomatídeos poseen una mitocondria que ocupa el 12% del volumen total del parásito y es capaz de acumular grandes cantidades de  $Ca^{2+}$ , un retículo endoplasmático y los acidocalcisomas (Benaim y García, 2011).

La mitocondria de *T. cruzi* es capaz de acumular cantidades de  $Ca^{2+}$  que en otros organismos eucariotas resultan deletéreas. Además, esta incorporación de  $Ca^{2+}$  ocurre en la mitocondria energizada, ya que cuando los parásitos son tratados con desacopladores de la fosforilación oxidativa como FCCP, se induce una liberación de  $Ca^{2+}$  desde este organelo

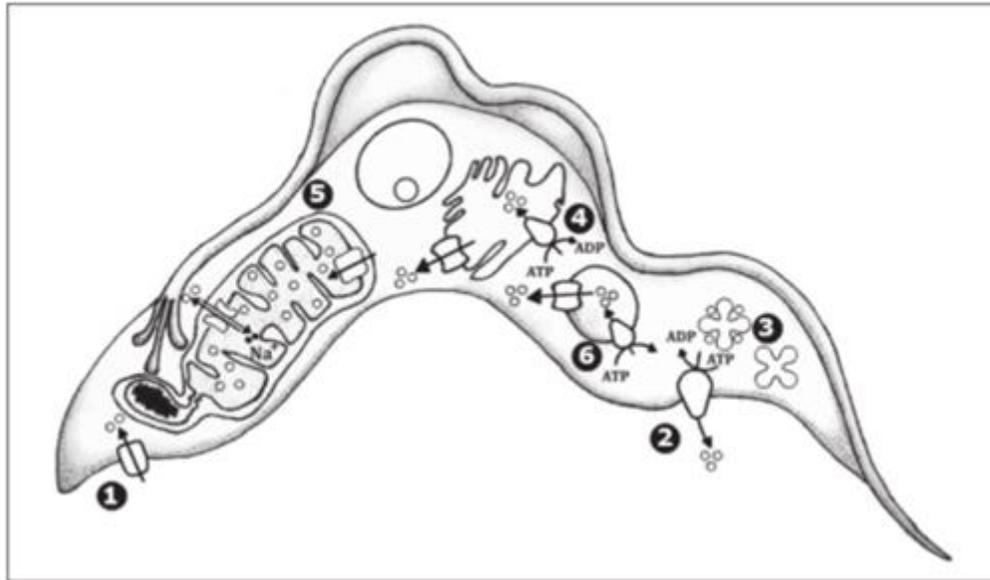
(Docampo y Vercesi, 1989). Un mecanismo similar de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  que depende del gradiente electroquímico de protones a través de la membrana mitocondrial se ha caracterizado parcialmente en mitocondrias aisladas de un cultivo de *Leishmania braziliensis* (Benaim y col., 1990). Este mecanismo de transporte se trata de un uniportador electroforético de  $\text{Ca}^{2+}$ , presente en la membrana mitocondrial interna muy similar a los que se encuentran en la mitocondrias de otros tipos de eucariotas. Este sistema ha sido recientemente caracterizado en humanos, recibiendo el nombre genérico de CMU (por sus siglas en ingles: Calcium Mitochondrial Uniporter) y resultando muy conservado entre especies (De Stefani y col., 2011). En este sistema la fuerza conductora para la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  es el gradiente electroquímico de  $\text{H}^+$  a través de la membrana mitocondrial interna y constituye un sistema de transporte de baja afinidad, de manera que opera con facilidad cuando hay grandes cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático (Benaim, 1996).

El retículo endoplasmático en la mayoría de los tripanosomatideos representa un compartimiento intracelular de alta afinidad por  $\text{Ca}^{2+}$  que posee una  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarco-endoplásmico (SERCA) similar a la que poseen otras eucariotas (Benaim y García, 2011).

Los acidocalcisomas representan organelos acídicos que aun cuando están presentes desde bacterias hasta humanos, son característicos de tripanosomatideos y apicomplexa (Docampo y col., 2005). Entre sus características principales está su acidez, su electrón-densidad y capacidad de acumular fosfato, pirofosfato, polifosfato,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  (Docampo y col., 2005). Estos organelos están bastante bien estudiados en tripanosomatideos y algunos de sus mecanismos de transporte han sido descritos en *T. cruzi*, los cuales incluyen una  $\text{H}^+$ -ATPasa vacuolar sensible a Bafilomicina  $\text{A}_1$ , un intercambiador  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  que introduce  $\text{Ca}^{2+}$  y extrae  $\text{H}^+$  (Docampo y col., 1995), una  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana

plasmática (PMCA), y una H<sup>+</sup>-pirofosfatasa vacuolar. Los acidocalcisomas, representan en *T. cruzi* los mayores reservorios de Ca<sup>2+</sup>, y acumulan este catión en asociación con polifosfatos (Ulrich y col., 2010).

Muchas de las enzimas presentes en los acidocalcisomas de protozoarios patógenos como *T. cruzi* difieren de sus contrapartes en mamíferos, por lo que representan potenciales blancos para la quimioterapia. Un ejemplo de dichas enzimas son la pirofosfatasa translocadora de protones y la pirofosfatasa soluble presente en los acidocalcisomas de varias especies de tripanosomatideos y que son inhibidas por bifosfonatos y diamidinas (Docampo y Moreno, 2008). La función de estos organelos es motivo de discusión. Así, el laboratorio de Docampo lo identifica como fundamental en la regulación del volumen y la osmoregulación del parásito (Docampo y col., 2005), mientras que otros autores lo vinculan directamente con la bioenergética del parásito, debido a la elevada concentración de pirofosfato, el cual es una moneda bioenergética alternativa al ATP, siendo su concentración en estos parásitos mayor a la de este nucleótido (Benaim y Garcia, 2011). Más aún, la energía libre de hidrólisis del pirofosfato es mayor que la del ATP.



**Figura 9. Mecanismos reguladores de  $\text{Ca}^{2+}$  en Tripanosomátidos.** 1. Canal de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmática, 2.  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa de la membrana plasmática (PMCA), 3. Calmodulina, 4. SERCA ( $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del Retículo sarcoendoplasmático), 5. Uniporte de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial (mitocondria), 6. PMCA (acidocalcisosomas) (Benaim y García, 2011).

Todos los mecanismos reguladores de  $\text{Ca}^{2+}$  mencionados hasta ahora están limitados en cuanto a su capacidad, por estar presentes en compartimentos intracelulares. En contraste, la membrana plasmática posee una  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa (PMCA) capaz de extraer el catión desde el interior celular sin ninguna limitación física. Esta enzima ha sido identificada y parcialmente caracterizada en *Leishmania braziliensis* (Benaim y Romero, 1990), *Leishmania mexicana*, (Benaim y col., 1993a), *T. brucei* (Benaim y col., 1993b) y *T. cruzi* (Benaim y col., 1991). En éste último parásito, la enzima comparte similitudes con sus contrapartes en otros organismos, ya que es una bomba tipo-P estimulada tanto por la calmodulina autóloga como la bovina (Benaim y col., 1995).

La calmodulina es una proteína ubicua soluble que se une a  $\text{Ca}^{2+}$ , siendo modulada por este catión y procesa señales generadas por el mismo (Carafoli, 1987). Se han encontrado una serie de diferencias entre la CaM presente en varios tripanosomatideos respecto a la de vertebrados, tales como diferencias en la secuencia de aminoácidos (Chung and Swindle, 1990), movilidad electroforética, sitios de fosforilación por CaM kinasas y reconocimiento por anticuerpos anti-CaM de humano (Benaim y col., 1998). Además la CaM clonada de *T. cruzi* ha mostrado una capacidad reducida de activar la PMCA de eritrocitos humanos (García-Marchan y col., 2009). Estas diferencias sugieren que la CaM de tripanosomatideos contribuye con rutas únicas en estos parásitos y la convierten en un objeto de estudio desde el punto de vista quimioterapéutico (Benaim y García, 2011).

## 2. Objetivos

### Objetivo General:

Estudiar el efecto del metil 7-acetil-5-bromo-6hidroxi-3-brometil-2-benzofurancarboxilato, un derivado (D4) del benzofurano, sobre la viabilidad celular de *Trypanosoma cruzi* tanto en su forma de epimastigote como en amastigotes en el interior de células de mamífero y el posible efecto del D4 sobre la homeóstasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de epimastigotes de *T. cruzi*.

### Objetivos específicos:

1. Estudiar el efecto del D4 sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*.
2. Estudiar el efecto del D4 sobre la viabilidad de células de mamífero.
3. Determinar el efecto del D4 sobre el porcentaje de células de mamífero infectadas por amastigotes de *T. cruzi*.
4. Determinar el efecto del D4 sobre la homeóstasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en epimastigotes de *T. cruzi*.
5. Determinar el efecto del D4 sobre el potencial electroquímico mitocondrial en epimastigotes de *T. cruzi*.
6. Determinar el efecto del D4 sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas en epimastigotes de *T. cruzi*.

### **3. Materiales y métodos**

#### **3.1. Mantenimiento de parásitos**

Los epimastigotes de *T. cruzi* (cepa CL Brener) se cultivaron en medio LIT (Liver Infusion Tryptose) a 29°C, pH 7.4, suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado y 1% de penicilina/estreptomicina, y fueron mantenidos en agitación constante. En los experimentos subsiguientes, el título del cultivo se determinó realizando un conteo directo en una cámara de Neubauer.

#### **3.2. Mantenimiento de células Vero**

Las células Vero (de riñón de mono verde africano) se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de L-glutamina y 1% de penicilina/estreptomicina. Estas células se mantuvieron incubadas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. En los experimentos subsiguientes, el título del cultivo se determinó mediante conteo directo en una cámara de Neubauer.

#### **3.3. Estudio del efecto del D4 sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*.**

El crecimiento de los epimastigotes de *T. cruzi* en presencia de concentraciones crecientes de D4 (de 0 a 50 µM) se determinó mediante conteo directo en una cámara de Neubauer. Partiendo de un cultivo de epimastigotes en fase exponencial, se sembraron en tubos de ensayo 2 mL de cultivo a una concentración inicial de 6x10<sup>6</sup> epimastigotes/mL en medio LIT, se añadió la droga a cada tubo incluyendo un control con el solvente DMSO. Cada condición se realizó por triplicado y los parásitos fueron incubados a 29°C en agitación constante. Se realizó el conteo diariamente durante 8 días. El IC<sub>50</sub> se determinó usando el programa Graph Pad 5.0. Para ello se emplearon los datos correspondientes a la

curva dosis-respuesta (número de células en función a la concentración de droga) a las 72 horas de tratamiento.

#### **3.4. Estudio de citotoxicidad del D4 sobre células de mamífero mediante el ensayo de MTT.**

Se sembraron 3.000 células Vero en cada pozo de una placa de microtitulación de 96 pozos y se incubaron durante 72 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en presencia de concentraciones crecientes de D4 y se utilizaron digitonina a 80 µM y Triton X 100 al 0,1% como controles negativos (con cuatro replicas en cada condición). Se centrifugó la placa por 20 min a 1.550 x g, se descartó el sobrenadante y a cada pozo se agregó una solución MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difenil tetrazolio) a una concentración de 0.3 mg/mL. La placa se incubó en oscuridad durante 5h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego se centrifugó de nuevo por 10 minutos 1.550 x g, se descartó el sobrenadante y se añadió DMSO (100 µL) en cada pozo. Se realizó la lectura de la densidad óptica a 570 nm en un lector de placas de ELISA y se determinó el IC<sub>50</sub> aplicando una regresión lineal a los datos de absorbancia normalizados (en porcentaje) con el programa Prisma GraphPad 5.0

El principio de éste método es la reducción de MTT (sal de color amarillo soluble en agua) a cristales de Formazan color azul oscuro e insolubles en agua. Esto es llevado a cabo por deshidrogenasas mitocondriales en las células vivas. Esto permite cuantificar las células viables en función de la densidad óptica después de la aplicación e incubación con el compuesto evaluado, de manera que mayor densidad óptica obtenida, mayor cantidad de células vivas, y menor citotoxicidad del compuesto.

### **3.5. Determinación del efecto del D4 sobre amastigotes intracelulares de *T. cruzi* mediante una curva de infección.**

Se sembraron 2.500 células Vero en medio DMEM (al 5% de SFB) sobre cubreobjetos de 1cmxcm dispuestos en los pozos de una placa de 24 pozos y se incubaron durante 24 horas permitiendo su adhesión a las láminas. Estas células fueron infectadas con tripomastigotes (derivados de una monocapa de células Vero) a una concentración de 10 parásitos por célula durante 24 horas, luego de lo cual cada pozo fue lavado 2 veces con PBS con el objeto de remover los parásitos no adheridos. A cada pozo se añadió medio DMEM al 2% de SFB con la concentración de D4 deseada (concentraciones entre 0 y 10  $\mu$ M, por triplicado) y la placa se incubó por 72 o 96 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se retiró el medio de cultivo de cada pozo, y cada cubreobjeto fue lavado con PBS. Las células se fijaron con metanol al 100% y se tiñeron con colorante Giemsa y se lavaron con ácido acético al 1%. Cada cubreobjetos se fijó a una lámina portaobjetos con aceite de inmersión y se contaron las células infectadas (200 células por cubreobjeto) en un microscopio óptico empleando a una magnificación de 100X. El IC<sub>50</sub> se determinó usando el programa Prisma GraphPad 5.0 el cual aplica una regresión no lineal a los datos normalizados de la respuesta obtenida en función al logaritmo de la concentración de la droga empleada.

### **3.6. Experimentos de fluorescencia.**

#### **3.6.1. Determinación del efecto del D4 sobre la homeostasis intracelular del Ca<sup>2+</sup> de epimastigotes de *T. cruzi*.**

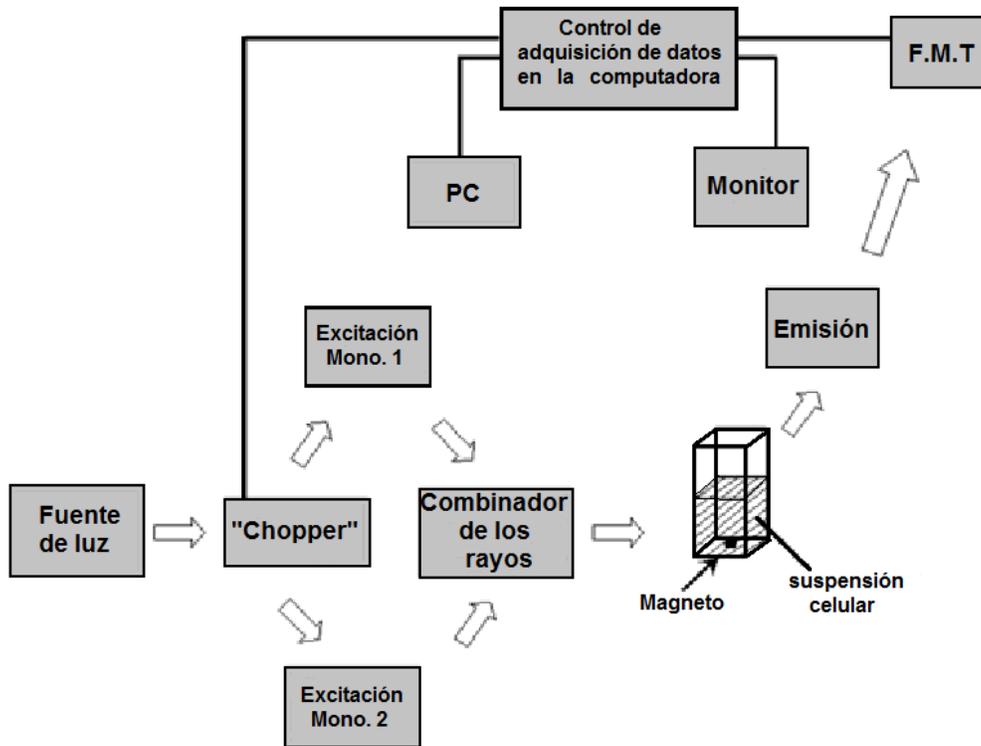
A fin de evaluar el efecto del D4 sobre la [Ca<sup>2+</sup>] intracelular de epimastigotes de *T. cruzi*, los parásitos fueron cargados con Fura-2, un indicador de Ca<sup>2+</sup> fluorescente que

presenta dos longitudes de onda de excitación diferentes cuando se encuentra unido o libre de  $\text{Ca}^{2+}$  (340 y 380 nm, respectivamente) mientras que la emisión se mantiene a 510 nm.

Con éste objetivo,  $2 \times 10^7$  epimastigotes/mL fueron recolectados de un cultivo en fase exponencial por centrifugación a  $600 \times g$  por 2 minutos, se lavaron 2 veces en un tampón fosfato salino glucosado (GPBS) e incubaron con  $2 \mu\text{M}$  de Fura 2 acetoximetilado (Fura 2-AM), por 6 horas, en oscuridad, agitación constante y a  $29^\circ\text{C}$ . Los epimastigotes de *T. cruzi* poseen bajos niveles de esterasas las cuales clivan el Fura 2 -AM liposoluble a la forma Fura-2 que es polar (y fluorescente), lo cual dificulta la acumulación del Fura 2 en el citoplasma. Para superar esta dificultad, a la muestra se añadió adicionalmente 0.1 % de ácido plurónico (un solvente suave) y 2.4 mM de probenicid (un inhibidor de transportadores aniónicos) de forma previa a la incubación.

Transcurrido el tiempo de incubación con el fluoróforo, los parásitos se lavaron 2 veces con tampón de carga y se resuspendieron en 500 uL en presencia de ácido plurónico al 0.1% y probenicid a 2.4 mM. La muestra se colocó en una cubeta de cuarzo, la cual se situó en un fluorímetro Perkin Elmer LS-55 que se encuentra acoplado a un agitador y a un baño a  $29^\circ\text{C}$ .

El fluorímetro Perkin Elmer LS-55 hace incidir 2 diferentes longitudes de onda de excitación sobre la cubeta. Este fluorímetro consta de una fuente de luz que incide en un “chopper” en el cual el haz de luz incidente se separa en las dos longitudes de onda de excitación del Fura 2 (figura 10), 340 nm para el Fura 2 unido a  $\text{Ca}^{2+}$  y 380 nm para el Fura libre. Las longitudes de onda son luego unidas mediante un combinador de rayos, que las hace incidir sobre la muestra en la cubeta de cuarzo. La muestra cargada con Fura-2 emite fluorescencia a 510 nm.



**Figura 10. Diagrama esquemático ordenador, muestra y fluorímetro programado a dos longitudes de excitación.**

Luego de iniciar la fluorimetría, se añadieron el D4 a 10  $\mu\text{M}$ , la digitonina a 30  $\mu\text{M}$  y el EGTA a 8 mM empleando volúmenes de alrededor de 1  $\mu\text{L}$  con la ayuda de una jeringa Hamilton. En los experimentos en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, se usó un tampón de carga con 2 mM  $\text{CaCl}_2$ . La relación de proporcionalidad entre la relación de las fluorescencias 340/380 nm y la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se plantea en la ecuación propuesta por Grynkiewicz y col., 1985.

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \cdot \frac{F_{\min}}{F_{\max}}$$

**Figura 11. Ecuación descrita por Grynkiewicz y col., 1985, para obtener la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en función a la fluorescencia del Fura-2 cuando éste es excitado con longitudes de onda de 340 y 380 nm.**

En la figura 11,  $K_d$  es la constante de afinidad del Fura 2 por  $Ca^{2+}$  (224 nm),  $R_{min}$  el valor más bajo del ratio de las fluorescencias de excitación 340 nm/380 nm en ausencia de  $Ca^{2+}$  (después de añadir el quelante de  $Ca^{2+}$  EGTA a una concentración de 8 mM),  $R_{max}$  el mayor valor de la relación de las fluorescencias de excitación 340 nm/380 nm en presencia de exceso de  $Ca^{2+}$  (después de añadir digitonina),  $F_{min(380)}$  es el mayor valor de fluorescencia del Fura-2 cuando es excitado a 380 nm luego de añadir EGTA (ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular),  $F_{max(380)}$  es el menor valor de fluorescencia del Fura-2 cuando es excitado a 380nm luego de añadir digitonina (la cual permeabiliza la membrana y permite la liberación del  $Ca^{2+}$  al exterior celular).

### **3.6.2. Determinación del efecto del D4 sobre el potencial electroquímico mitocondrial de epimastigotes de *T. cruzi*.**

Para estudiar el efecto del D4 sobre el potencial electroquímico mitocondrial se colectaron  $1,5 \times 10^6$  parásitos por centrifugación a  $600 \times g$  y se resuspendieron en tampón de carga (130 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 2 mM  $KH_2PO_4$ , 20 mM Tris-HCl) con 20  $\mu M$  del fluoróforo rodamina 123, se incubaron por 45 minutos a  $29^\circ C$  y en agitación continua. La rodamina 123 se acumula en la matriz mitocondrial siguiendo la diferencia de potencial electroquímico. Transcurrido el tiempo de carga con el fluoróforo la muestra se lavó dos veces en 500  $\mu L$  de tampón de carga. Posteriormente se añadió la suspensión de parásitos en una cubeta de cuarzo que se colocó en un fluorímetro HITACHI F-7000 con agitación continua a  $29^\circ C$ . La longitud de onda de excitación de la rodamina 123 corresponde a 488 nm, mientras que la emisión se monitorea a 530 nm. Se utilizó FCCP a 2  $\mu M$  (protonóforo, desacoplador de la cadena transportadora de electrones) como control.

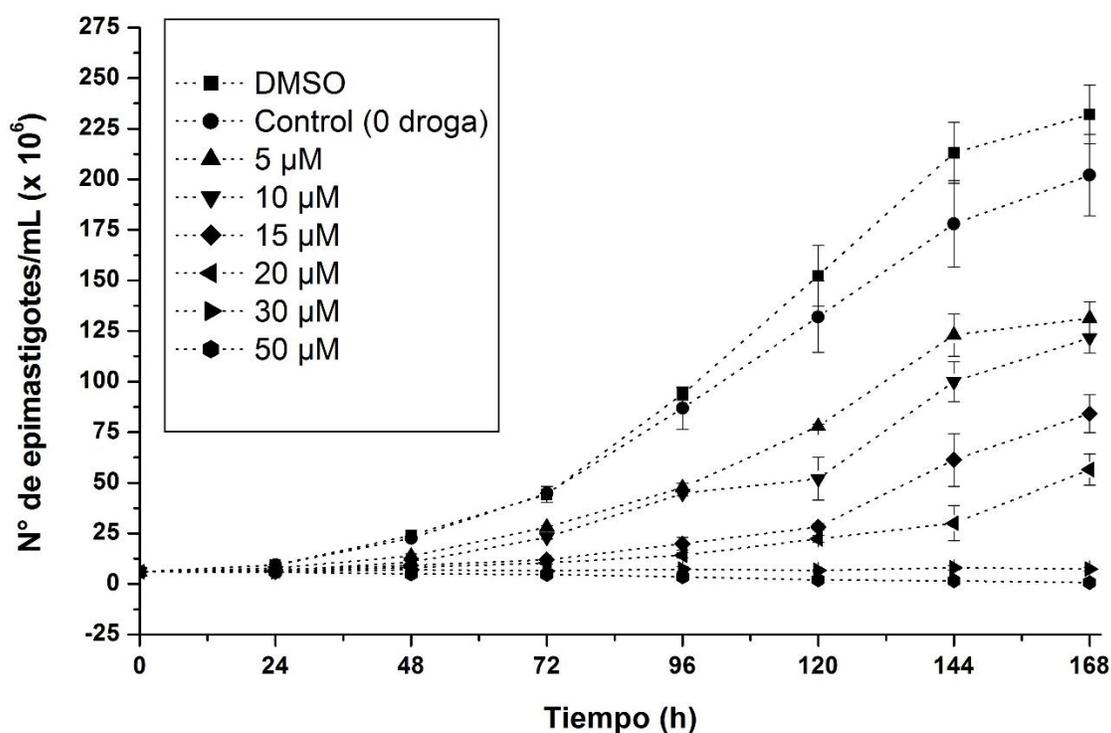
### **3.6.3. Determinación del efecto del D4 sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de *T. cruzi*.**

Para estudiar el efecto del D4 sobre los acidocalcisomas de *T. cruzi*, se procedió de la misma manera descrita para el estudio del efecto del D4 sobre el potencial electroquímico mitocondrial de *T. cruzi*, pero en este caso el fluoróforo empleado fue la naranja de acridina a una concentración final de 2  $\mu\text{M}$  y el tiempo de incubación con los parásitos fue de 5 minutos. La naranja de acridina es un fluoróforo diamidínico que se acumula en compartimientos ácidos como los acidocalcisomas. Transcurrido el tiempo de incubación se eliminó el fluoróforo excedente lavando dos veces en 500  $\mu\text{L}$  de tampón de carga. Los parásitos cargados se añadieron en una cubeta de cuarzo que se colocó en un fluorímetro HITACHI F-7000 con agitación continua y a una temperatura de 29°C. La longitud de onda de excitación del naranja de acridina corresponde a 488 nm, mientras que la emisión se monitorea a 530 nm. Se utilizó nigericina a una concentración de 2  $\mu\text{M}$  (ionóforo intercambiador de  $\text{H}^+$  por  $\text{K}^+$ ) como control.

## 4. Resultados

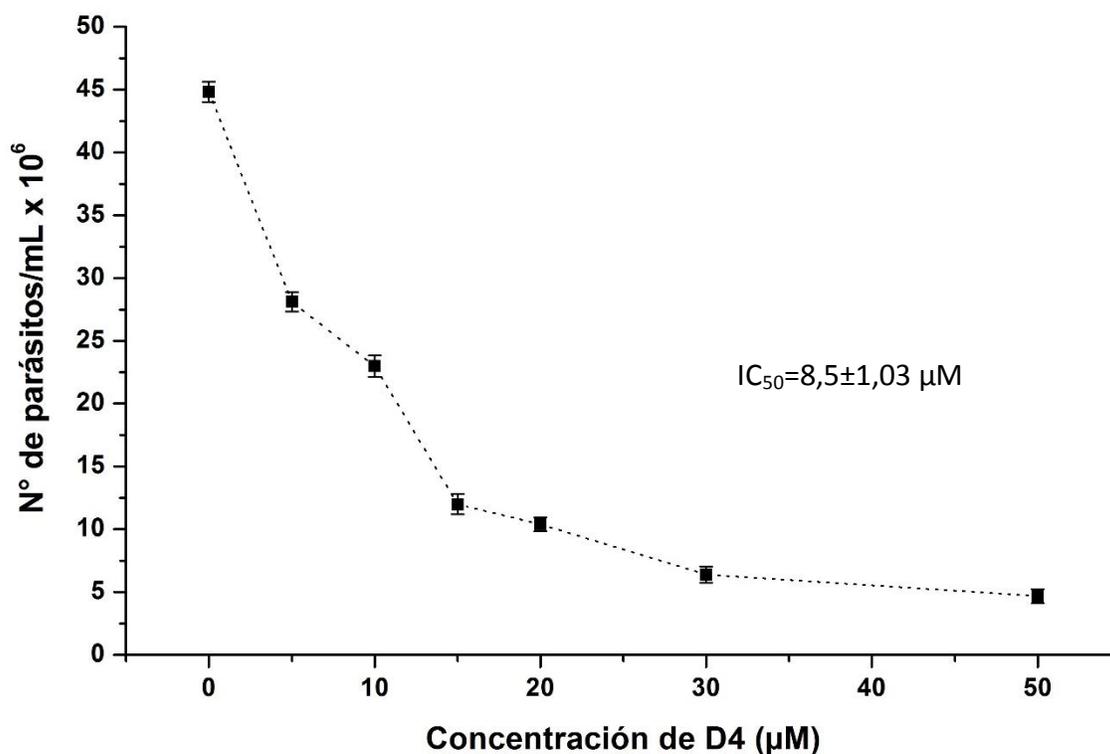
### 4.1. Estudio del efecto del D4 sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Con el objeto de determinar el efecto del D4 sobre el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*, se realizó una curva de crecimiento en presencia de concentraciones crecientes de D4 (de 5 a 50  $\mu\text{M}$ ) y el título celular se determinó diariamente mediante contaje directo en una cámara de Neubauer. Los resultados obtenidos demuestran que el D4 inhibe la proliferación de los epimastigotes de una forma dosis-dependiente, observándose la inhibición total de la proliferación a una concentración de 30  $\mu\text{M}$ .



**Figura 12.** Efecto del D4 sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*. Se representa el número de células en función al tiempo para cada concentración de droga empleada (línea con símbolo). Cada concentración fue evaluada por triplicado y cada barra representa la desviación estándar.

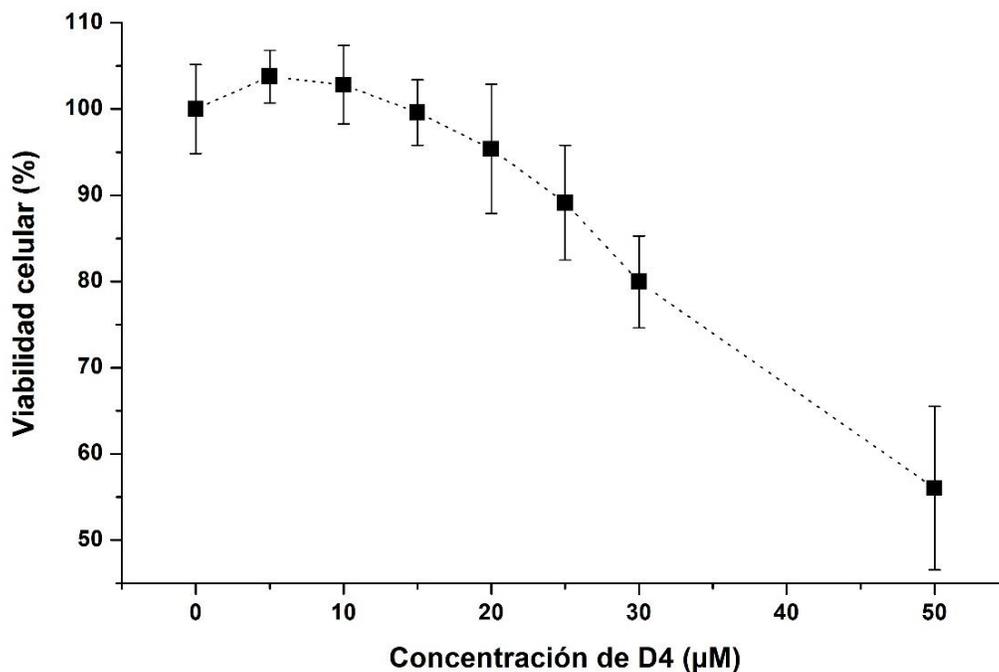
La curva dosis-respuesta, en la cual se representa el número de epimastigotes/mL en función de la concentración de D4 después de 72 horas de tratamiento, se graficó a partir de los datos de la curva de crecimiento representados en la figura anterior. El  $IC_{50}$  estimado del D4 sobre los epimastigotes de *T. cruzi* fue  $8,5 \mu\text{M}$ .



**Figura 13. Curva dosis-respuesta después de 72 h de tratamiento de epimastigotes de *T. cruzi* con diferentes concentraciones de D4 y el  $IC_{50}$  estimado.** Se representa el número de células en función a la concentración de D4 empleada (cuadros) después de 72 horas de tratamiento así como el  $IC_{50}$  estimado. Cada barra representa la desviación estándar.

#### 4.2. Estudio de citotoxicidad del D4 sobre células de mamífero.

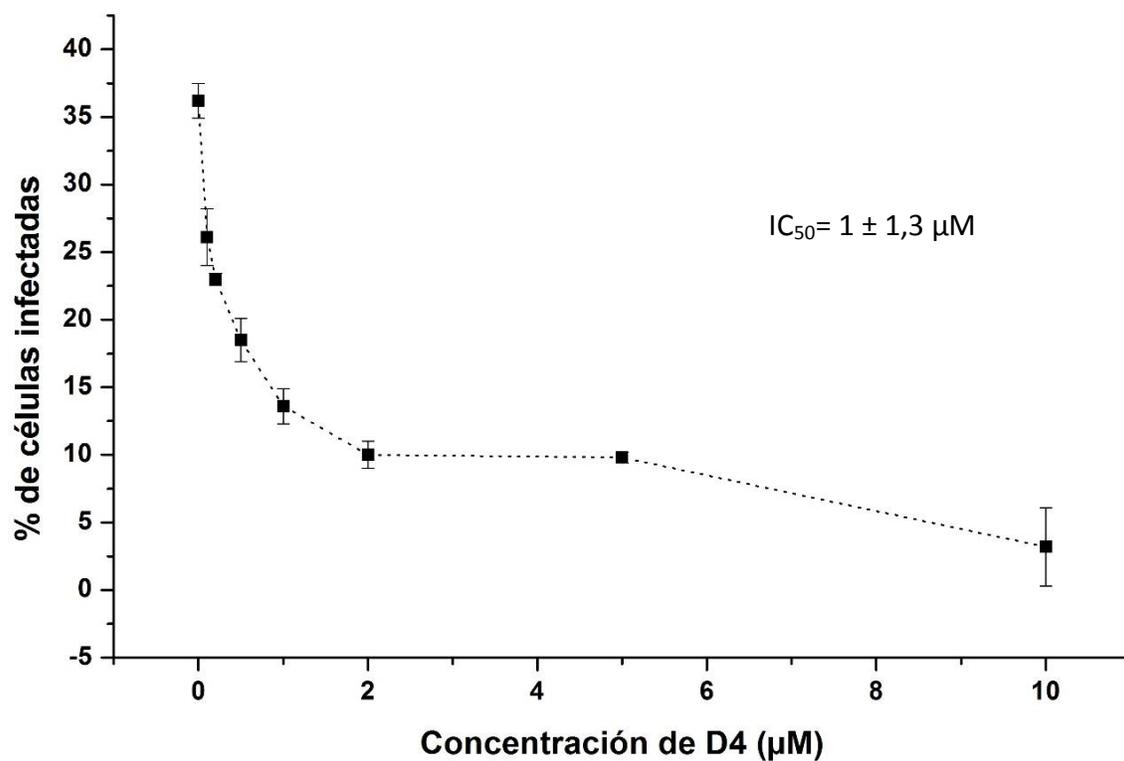
Con el objeto de determinar el efecto del D4 sobre la viabilidad de células de mamífero, se utilizaron células Vero (provenientes de riñón de mono verde africano) como modelo y se empleó el ensayo de MTT como método para determinar la citotoxicidad. Considerando la relación de proporcionalidad entre la absorbancia de los cristales de formazan generados y el número de células viables, no se observó un efecto citotóxico significativo respecto al control (0 droga) tras la exposición de las células durante 72h a concentraciones de D4 de 5 a 25  $\mu\text{M}$  ( $p > 0,05$ ).



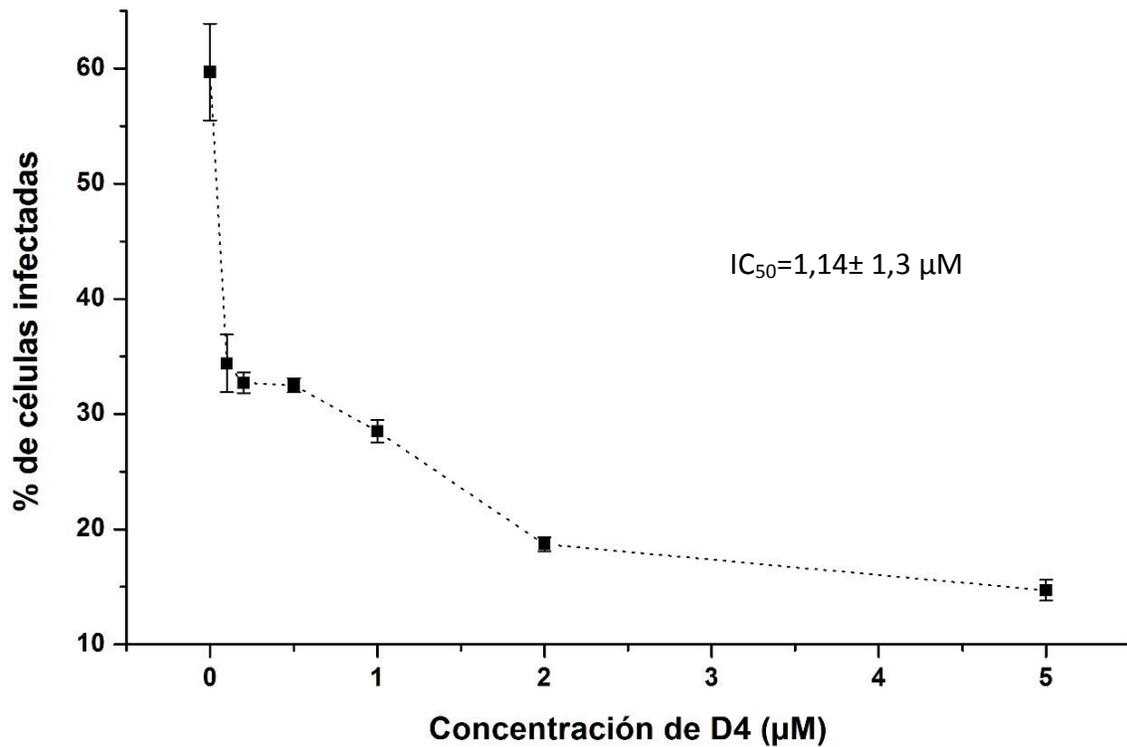
**Figura 14. Sensibilidad de las células Vero al D4.** Se representa el efecto del D4 sobre la viabilidad de células Vero expuestas a diferentes concentraciones de D4 (de 5 a 50  $\mu\text{M}$ ). 72 h después de la adición de la droga se realizó el ensayo de MTT y se determinó el porcentaje de células Vero viables en cada condición (cuadros). Las barras representan la desviación estándar ( $n=4$ ).

#### 4.3. Determinación del efecto del D4 sobre amastigotes intracelulares de *T. cruzi* mediante una curva de infección.

Con el objeto de determinar el efecto del D4 sobre la proliferación de amastigotes en el interior de células de mamífero se realizó una curva de infección empleando células Vero como células huésped en presencia de concentraciones crecientes de D4 (de 0,1 a 10  $\mu\text{M}$ ) y con 72 y 96 horas de exposición. Los resultados demuestran que esta droga produce la disminución del porcentaje de células infectadas de una forma dosis-dependiente. El  $\text{IC}_{50}$  estimado a las 72 horas fue  $1 \pm 1,3 \mu\text{M}$  y a las 96 horas  $1,14 \pm 1,3 \mu\text{M}$ .



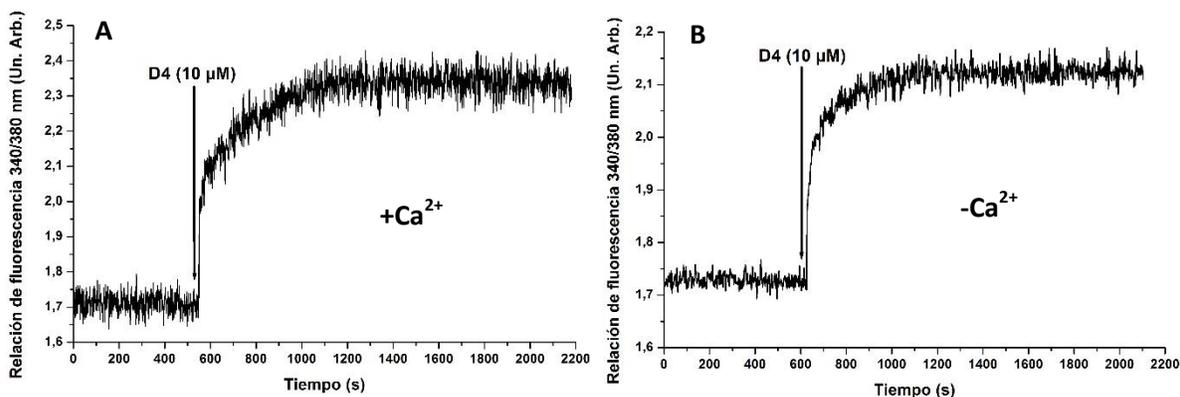
**Figura 15. Efecto del D4 sobre amastigotes intracelulares de *T. cruzi*.** Células Vero infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi* fueron expuestas a diferentes concentraciones de D4. El porcentaje de células Vero infectadas (cuadros) y el  $\text{IC}_{50}$  sobre amastigotes se determinó 72 h después de la adición de la droga. Cada barra representa la desviación estándar de tres réplicas en cada concentración.



**Figura 16. Efecto del D4 sobre amastigotes intracelulares de *T. cruzi*.** Células Vero infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi* fueron expuestas a diferentes concentraciones de D4. El porcentaje de células Vero infectadas (cuadros) y el  $IC_{50}$  sobre amastigotes se determinó 96 h después de la adición de la droga. Cada barra representa la desviación estándar de tres réplicas en cada concentración.

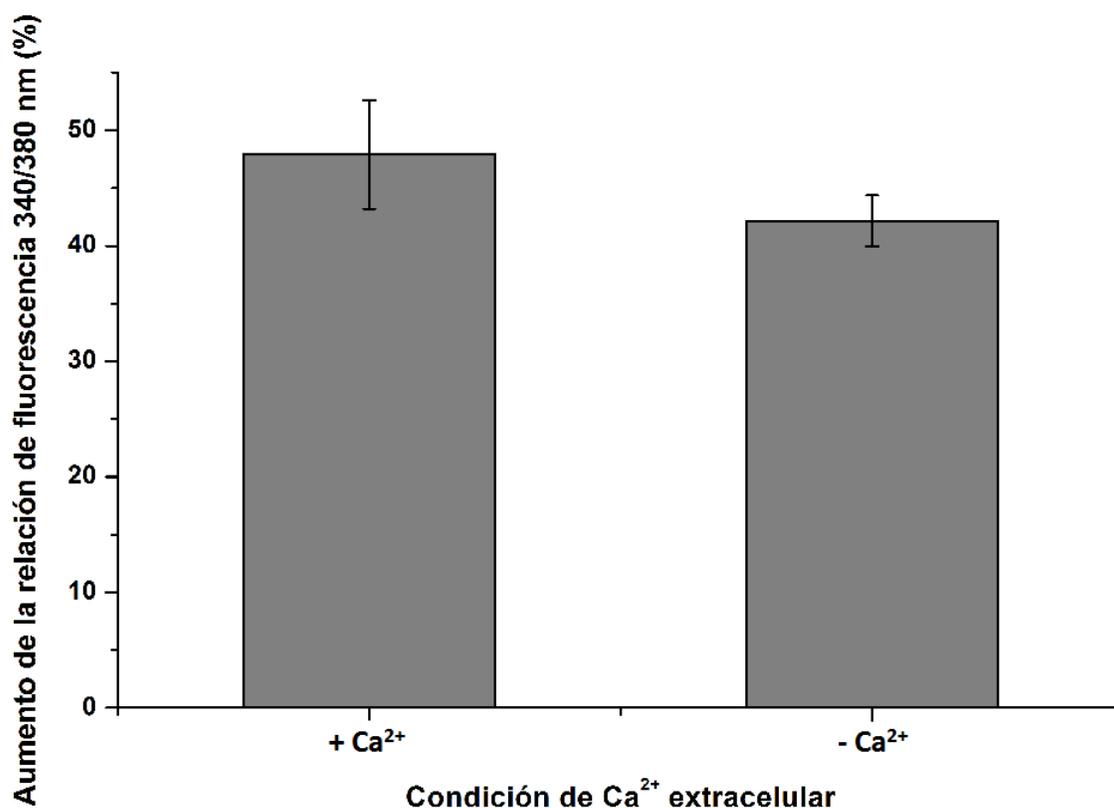
#### 4.4. Efecto del D4 sobre la homeostasis intracelular del $\text{Ca}^{2+}$ en epimastigotes de *T. cruzi*.

Con el objeto de evaluar el efecto del D4 sobre la homeóstasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en epimastigotes de *T. cruzi*, se empleó la fluorimetría como técnica que permitió cuantificar la fluorescencia del fura-2 cuando es excitado por longitudes de onda de 340 y a 380 nm, en respuesta a la adición del D4. Se observó que luego de añadir este análogo de la amiodarona a una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , éste produjo un incremento en la relación de fluorescencias a 340/380 nm. Tomando en cuenta la relación de proporcionalidad entre la relación 340/380 nm y la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular planteada en la ecuación de Grynkiewicz (figura 8), dicho aumento en la relación 340/380 se traduce en un aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .



**Figura 17. Efecto del D4 sobre la  $[\text{Ca}^{2+}]$  intracelular de epimastigotes de *T. cruzi*. (A)** Efecto de 10  $\mu\text{M}$  de D4 (flecha) sobre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en presencia de 2 mM de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. **(B)** Efecto de 10  $\mu\text{M}$  de D4 (flecha) sobre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (EGTA).

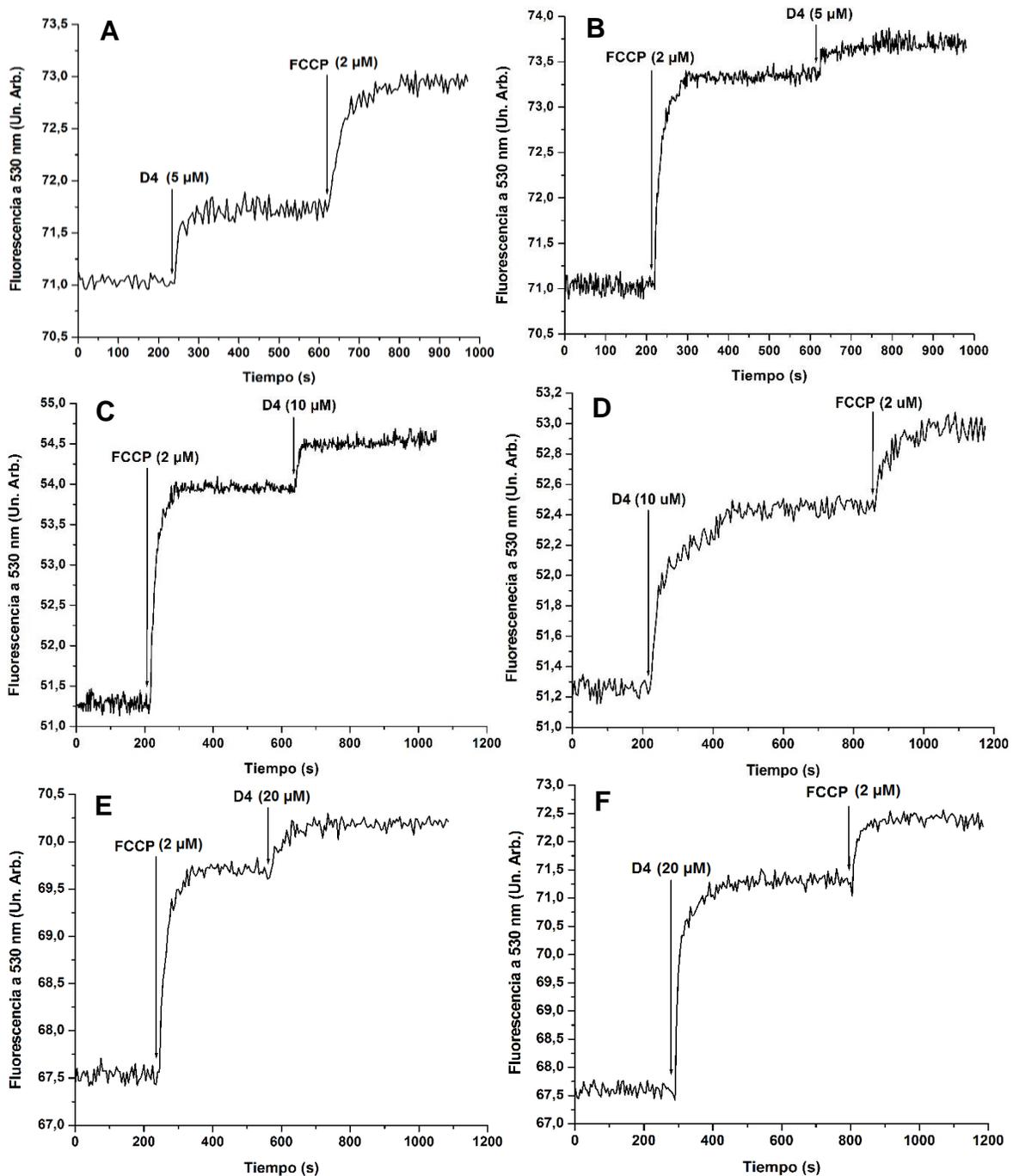
Se muestra el aumento porcentual de la relación de fluorescencia 340/380 al añadir 10  $\mu\text{M}$  de D4 a los epimastigotes de *T. cruzi* cargados con Fura-2, tanto en presencia como en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Se observa que en ambos casos el aumento de la relación de fluorescencia 340/380 respecto al nivel basal fue de más del 40%.



**Figura 18.** Aumento porcentual de la relación de fluorescencia 340/380 nm al añadir 10  $\mu\text{M}$  de D4 a epimastigotes de *T. cruzi* cargados con fura 2, luego de alcanzarse el *plateau*. Cada columna representa el resultado de tres experimentos independientes en presencia (izquierda) y ausencia (derecha) de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Las barras en la parte superior de cada columna representan la desviación estándar.

#### **4.5. Efecto del D4 sobre el potencial electroquímico mitocondrial de epimastigotes de *T. cruzi*.**

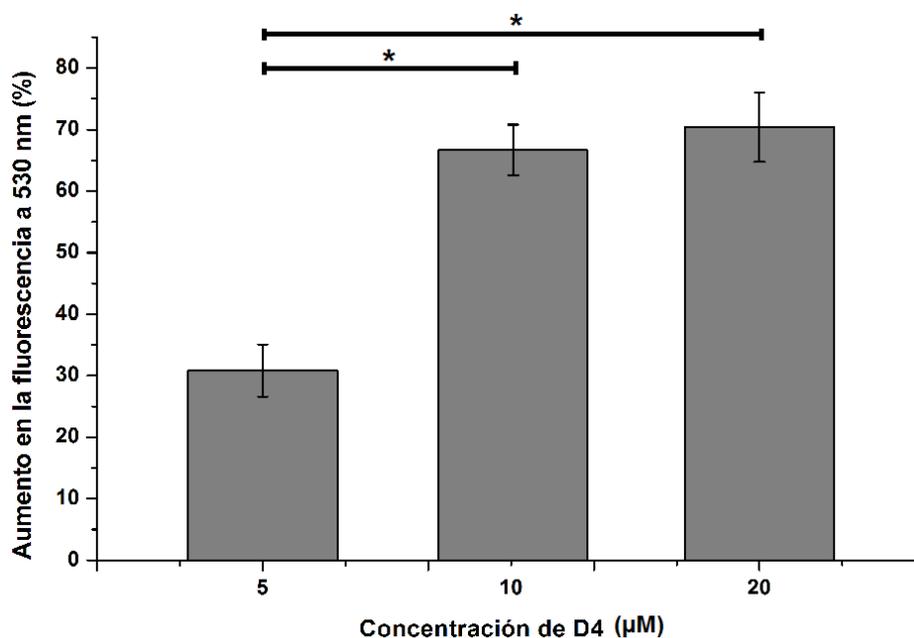
Con el objeto de evaluar el efecto del D4 sobre el potencial electroquímico mitocondrial de *T. cruzi*, se determinaron los cambios en la fluorescencia de la Rodamina-123 en respuesta a la adición de 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$  de D4. Se observó que al añadir la droga en todos los casos hubo un aumento en la fluorescencia de la Rodamina-123. Este efecto fue menor al emplear 5 $\mu\text{M}$  de D4 y la respuesta observada en la fluorescencia se incrementa al añadir 10 y 20  $\mu\text{M}$  de la droga. La adición posterior del desacoplante FCCP produjo una respuesta aún mayor en la fluorescencia después del D4, efecto que fue mayor después de 5  $\mu\text{M}$  de D4 y menor luego de la adición de 10 y 20  $\mu\text{M}$  de la droga. Invirtiendo el orden de adición de estos compuestos, se observó que el FCCP produce un aumento considerable en la fluorescencia que supera el efecto generado por el D4. Sin embargo, el FCCP no genera una respuesta máxima ya que la adición posterior de D4 genera un mayor aumento en la fluorescencia de la rodamina 123.



**Figura 19. Efecto del D4 sobre el potencial electroquímico mitocondrial de epimastigotes de *T. cruzi*.** (A) Efecto de 5  $\mu$ M de D4 seguido de la adición de FCCP (2  $\mu$ M) (B) Efecto de FCCP a 2  $\mu$ M y posterior adición de 5  $\mu$ M de D4 (C) Efecto de 10  $\mu$ M de D4 seguido de la adición de 2  $\mu$ M de FCCP. (D) Efecto de 2  $\mu$ M de FCCP seguido de la

adición de 10  $\mu\text{M}$  de D4. (E) Efecto de 20  $\mu\text{M}$  de D4 y posterior adición de FCCP a 2  $\mu\text{M}$ . (F) Efecto de 2  $\mu\text{M}$  de FCCP seguido del D4 a 20  $\mu\text{M}$ .

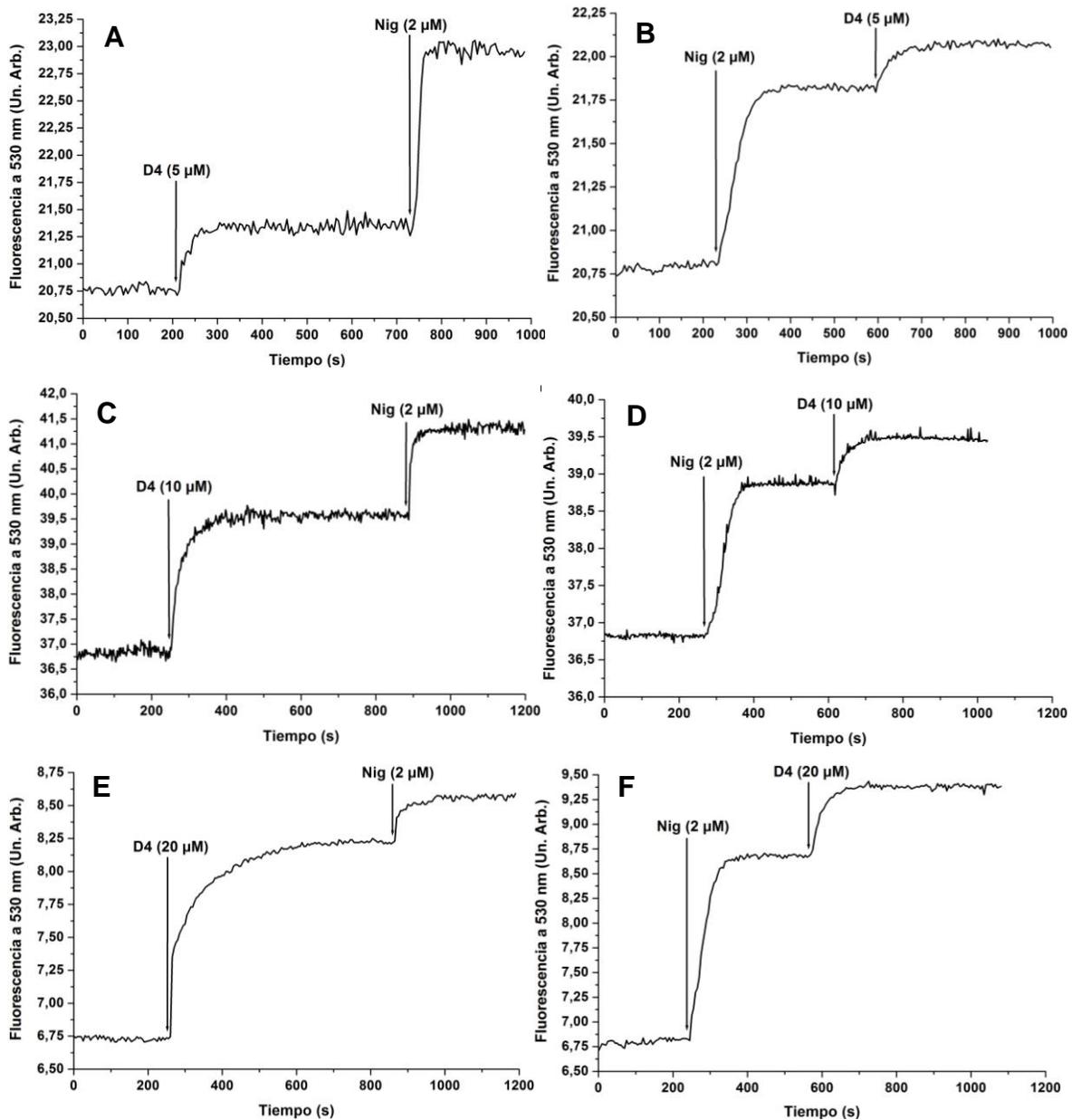
Con el objeto de visualizar el efecto dosis-dependiente del D4 sobre el potencial electroquímico mitocondrial, se graficó el aumento en la fluorescencia de la rodamina 123 respecto al nivel basal de epimastigotes tratados con 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$  de D4. Tomando en cuenta que la adición de los efectos generados por el D4 y el FCCP constituye el 100% de respuesta del sistema, se obtuvo que 5  $\mu\text{M}$  de D4 produce alrededor de 30% de respuesta, mientras que la adición del D4 a 10 y 20  $\mu\text{M}$  generan una respuesta similar y de aproximadamente 70%.



**Figura 20. Aumento porcentual de la fluorescencia respecto al nivel basal luego de la adición de D4 a epimastigotes de *T. cruzi* cargados con Rodamina 123.** Cada columna representa el resultado de tres experimentos independientes usando una concentración de D4 (5, 10 y 20  $\mu\text{M}$ ) con las respectivas barras de desviación estándar. Las barras horizontales con asterisco indican una diferencia significativa entre las medias ( $p < 0,05$ ).

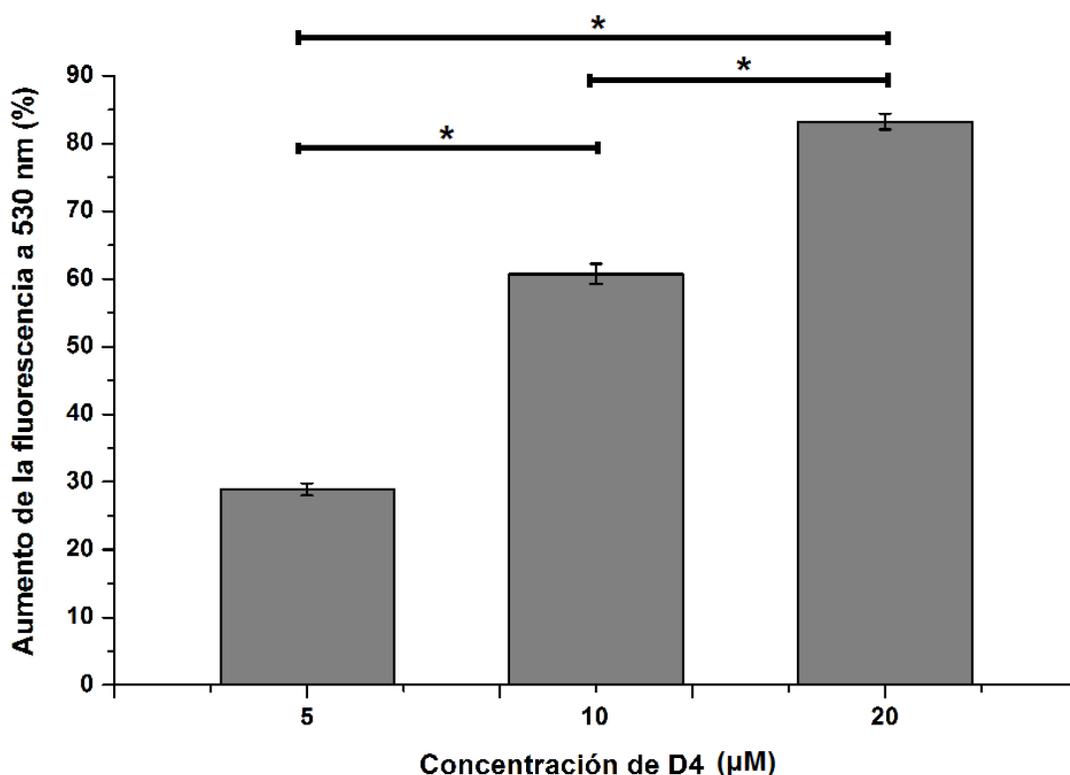
#### **4.6. Efecto del D4 sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de *T. cruzi*.**

Con el objeto de evaluar el efecto del D4 sobre la alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes, se empleó la fluorimetría como técnica que permitió cuantificar la fluorescencia de la naranja de acridina en respuesta a la adición de 5, 10 o 20  $\mu\text{M}$  de D4. Se observó que al añadir la droga hubo un aumento en la fluorescencia, producto de la liberación de la naranja de acridina. Además, el efecto observado fue dosis-dependiente, ya que un incremento en la concentración de la droga añadida generó un aumento proporcional en la fluorescencia. En este sentido, 5  $\mu\text{M}$  de D4 produjo una respuesta menor a la generada por 10  $\mu\text{M}$  y ésta concentración, a su vez, generó una respuesta menor a la producida por 20  $\mu\text{M}$  de D4. La adición posterior de nigericina produjo un mayor aumento en la fluorescencia después de la droga y la respuesta generada fue dependiente de la concentración de droga usada, siendo mayor después de 5  $\mu\text{M}$  de D4, y respectivamente menor luego de 10 y 20  $\mu\text{M}$  de D4. Invirtiendo el orden de adición de estos compuestos, se observó que la nigericina produce un aumento en la fluorescencia. Sin embargo no genera una respuesta máxima ya que la adición posterior de D4 genera todavía un incremento en la fluorescencia.



**Figura 21. Efecto del D4 sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de *T. cruzi*.** (A) Efecto de 5  $\mu\text{M}$  de D4 seguido de la adición de nigericina (2  $\mu\text{M}$ ) (B) Efecto de nigericina a 2  $\mu\text{M}$  y posterior adición de 5  $\mu\text{M}$  de D4 (C) Efecto de 10  $\mu\text{M}$  de D4 seguido de la adición de 2  $\mu\text{M}$  de nigericina. (D) Efecto de 2  $\mu\text{M}$  de nigericina seguido de la adición de 10  $\mu\text{M}$  de D4. (E) Efecto de 20  $\mu\text{M}$  de D4 y posterior adición de nigericina a 2  $\mu\text{M}$ . (F) Efecto de 2  $\mu\text{M}$  de nigericina seguido de D4 a 20  $\mu\text{M}$ .

Se muestra la relación entre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de los epimastigotes de *T. cruzi* y la concentración de D4 añadida, como el aumento porcentual de la fluorescencia respecto a la basal en función a la adición de 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$  de D4. Se obtuvo que el D4 a 5  $\mu\text{M}$  genera un 30% de respuesta, con 10  $\mu\text{M}$  se produjo un 60 % de respuesta y con 20  $\mu\text{M}$  de D4 la respuesta generada fue cerca del 85%.



**Figura 22.** Aumento porcentual de la fluorescencia respecto al nivel basal luego de la adición de D4 a epimastigotes de *T. cruzi* cargados con naranja de acridina. Cada columna representa el resultado de tres experimentos independientes usando una concentración de D4 (5, 10 y 20  $\mu\text{M}$ ). Las barras representan el error estándar. Las barras horizontales con asterisco indican una diferencia significativa entre las medias ( $p < 0,01$ ).

## 5. Discusión

En ausencia de un tratamiento eficaz y seguro en el tratamiento de la tripanosimiasis americana, el estudio de drogas de uso comercial para el tratamiento de diversas patologías es una de las estrategias investigativas empleadas en el descubrimiento de nuevas drogas con actividad tripanocida (Planer y col., 2014), pues permitiría disminuir notablemente los estudios en humanos, ya que los efectos secundarios habrían sido establecidos con antelación. Tal es el caso de la amiodarona, una droga usada como antiarrítmico cuyo efecto anti-*T. cruzi* (Benaim y col., 2006) y anti-*L. mexicana* (Serrano-Martín y col., 2009) han sido demostrados y en ambos casos, parte del mecanismo de acción de la droga involucra la alteración de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en estos parásitos. Otra estrategia en la investigación de drogas involucra la síntesis de compuestos *de novo*, con base en las estructuras químicas de diversos agentes que han mostrado especificidad contra blancos en microorganismos de interés clínico. En este sentido, la amiodarona fue empleada por Hejchman y col., 2012 como estructura base para la síntesis de diversos compuestos que puedan actuar contra especies de hongos patógenos, obteniendo que el derivado D4 actúa como antifúngico y altera la  $[\text{Ca}^{2+}]$  citoplasmática de *Saccharomyces cerevisiae*.

Con base en la similitud estructural entre el D4 y la amiodarona, y en la actividad comprobada de la amiodarona como agente anti-*T. cruzi* (Benaim y col., 2006; Benaim y Paniz-Mondolfi, 2012), en éste trabajo de investigación se evaluó el efecto del derivado D4 sobre la proliferación de epimastigotes y amastigotes intracelulares de *T. cruzi* y su posible mecanismo de acción en lo concerniente a la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en epimastigotes. Se obtuvo que el D4 es capaz de inhibir la proliferación de epimastigotes de

*T. cruzi* en cultivo y que dicho efecto antiproliferativo es dosis-dependiente como se muestra en la figura 12. De manera que el crecimiento del cultivo disminuye en el tiempo de una forma proporcional a la concentración de droga empleada. A 5 y 10  $\mu\text{M}$  de D4, el cultivo alcanza un título celular máximo de aproximadamente la mitad respecto al control sin tratar. Adicionalmente se observó la inhibición total del crecimiento de los epimastigotes expuestos a 30  $\mu\text{M}$  de D4 (concentración inhibitoria mínima, CIM) y la disminución del número de epimastigotes inicial o muerte celular a una concentración de 50  $\mu\text{M}$ . Cabe destacar que el tratamiento con 50  $\mu\text{M}$  de D4 a partir de las 24 horas de tratamiento, induce la aparición de formas redondeadas y condensadas del parásito y no se observó ningún parásito con forma elongada. Es interesante mencionar que un efecto morfológico parecido fue observado en presencia de esfingosina en promastigotes de *Leishmania mexicana* (Benaim y col., 2013).

En la figura 13 se representa la curva dosis-respuesta obtenida después de 72 horas de tratamiento de los epimastigotes de *T. cruzi* con las diferentes concentraciones de D4, a partir de la cual se obtuvo un  $\text{IC}_{50}$  de 8,5  $\mu\text{M}$ . En contraste, en la figura 14, se observa el efecto del D4 sobre las células Vero como células de mamífero modelo, y que además fueron utilizadas en los experimentos de infección con amastigotes. En este experimento no se cuantifica directamente el número de células viables sino la absorbancia del formazan producido por las células viables mediante el ensayo de MTT, el cual es ampliamente aceptado como un ensayo de viabilidad celular, tomando en cuenta que un cultivo de células eucariotas en fase exponencial de crecimiento, las células presentan una actividad metabólica constante, y en este sentido, la cantidad de cristales de formazan producidos es proporcional al número de células viables (Riss y col., 2013). Sin embargo, este método

podiera estar sobreestimando el efecto de esta droga sobre la viabilidad celular, ya que como se discutirá más adelante, el D4 afecta directamente la actividad mitocondrial. Una vez obtenido el valor de absorbancia en cada uno de los pozos con células Vero tratadas con diferentes concentraciones de D4, los datos fueron normalizados o expresados en el porcentaje de células viables tomando en cuenta que en el control (0 droga) hay un 100% de viabilidad celular. Se obtuvo que las células Vero no son afectadas por concentraciones de D4 hasta 25  $\mu\text{M}$ , concentración que tiene un potente efecto sobre epimastigotes de *T. cruzi*. Por otra parte al emplear concentraciones superiores a 25  $\mu\text{M}$  se observa un efecto citotóxico significativo del D4 sobre las células Vero ( $p < 0,05$ ).

Con el objeto de evaluar si el D4 tiene un efecto inhibitorio sobre *T. cruzi* en su forma de amastigote, el estadio clínicamente relevante del parásito, se realizó una curva de infección (Figuras 15 y 16), en la cual se emplearon células Vero como células huésped, las cuales fueron infectadas con tripomastigotes y tratadas con concentraciones de D4 entre 0 y 10  $\mu\text{M}$ . Los tripomastigotes utilizados en estos experimentos se derivaron de una monocapa de células Vero infectadas ya que se ha reportado que estos presentan una mayor tasa de interiorización en las células huésped en comparación con tripomastigotes derivados de otras fuentes (Zingales y Colli, 1985). En este trabajo también utilizamos como célula huésped alternativa macrófagos de origen murino J-774 (resultados no mostrados). Sin embargo decidimos realizar el estudio completo con células Vero, ya que estas presentan un citoplasma más grande, pudiendo albergar una mayor cantidad de amastigotes, siendo igualmente relativamente fáciles de infectar con tripomastigotes de forma similar a otras células. Los resultados en células Vero muestran una notable disminución en el porcentaje de células infectadas el cual es directamente proporcional al incremento en la concentración

de D4 empleada. Es importante destacar que la cantidad de amastigotes presentes en diferentes células fue independiente de la concentración y variaba desde 1 hasta más de 100 amastigotes por célula (ver fotos en “anexos”) en el rango de concentraciones desde 0,1 a 5  $\mu\text{M}$ , de manera que no fue posible determinar un promedio de amastigotes por célula en cada concentración en este rango. Cabe mencionar que en los casos de las células infectadas, tratadas con 10  $\mu\text{M}$  de D4 durante 72 horas, no se observó ninguna célula con más de 30 amastigotes intracelulares. Sin embargo, a las 96 horas de tratamiento se observó que la mayoría de las células Vero tratadas con 10  $\mu\text{M}$  de D4 se despegaron del cubreobjeto, indicando que a esta concentración y tiempo de tratamiento, estas células ya están muy afectadas. Por ello no se incluyó el dato correspondiente a 10  $\mu\text{M}$  en la figura 16 correspondiente a las 96 horas de tratamiento, a diferencia de la figura 15 que muestra los datos 72 horas post-tratamiento. Dvorak y Crane, 1981, reportan que el ciclo celular de vertebrados modula la infección por parásitos protozoarios y demuestran que las células HeLa en la fase S de ciclo celular son 14 veces más sensibles a ser infectadas por *T. cruzi* que en la fase G<sub>1</sub>, ya que en la progresión del ciclo celular hay cambios cuantitativos en la composición de antígenos de superficie requeridos por el parásito en el proceso de invasión. Este mismo resultado fue reportado por estos autores en células HeLa infectadas con *Toxoplasma gondii*. El hecho de que las células Vero empleadas en estos experimentos no están sincronizadas implica que cierto porcentaje de la población será más susceptible a ser infectadas que otra, dependiendo de el punto en que se encuentra en cuanto a la progresión en el ciclo celular. Además de no tener una población de células homogénea en cuanto a la susceptibilidad a ser infectadas, el tiempo de incubación con D4 empleado (72 y 96 horas) permite que los amastigotes cumplan suficientes ciclos replicativos como para llenar la célula hasta el punto en que ya no se pueden contar. Este fenómeno se exagera en las

células infectadas por más de un tripomastigote. Aunque el grado de infección de cada célula individual varió ampliamente, se observó una distribución aleatoria de las células infectadas a lo largo de la lámina y en este sentido fue posible cuantificar el porcentaje de células infectadas, seleccionando aleatoriamente campos visuales. Se obtuvo un efecto dosis-dependiente del D4 sobre el porcentaje de células infectadas después de 72 horas (Figura 15) y 96 horas (figura 16) de tratamiento con concentraciones crecientes de D4, con un  $IC_{50}$  de  $1,0 \pm 1,3$  y  $1,14 \pm 1,3 \mu M$ , respectivamente. Tomando en consideración estos valores de  $IC_{50}$  sobre amastigotes de *T. cruzi* y el leve efecto citotóxico del D4 sobre las células Vero a concentraciones de hasta  $25 \mu M$ , sugiere que esta droga tendría un alto índice de selectividad entre ambas células.

Con el objeto de elucidar el posible mecanismo de acción del D4 sobre los epimastigotes de *T. cruzi*, se estudió el efecto de esta droga sobre la  $[Ca^{2+}]_i$  de epimastigotes empleando técnicas de fluorescencia. Los epimastigotes fueron cargados con el fluoróforo Fura-2, el cual presenta diferentes espectros de absorción cuando está libre o unido a  $Ca^{2+}$ . Esta característica del indicador permite determinar la asociación en el equilibrio y la  $[Ca^{2+}]_i$  a través de la relación entre las emisiones a 510 nm cuando se excita alternativamente en fracciones de segundo a 340 y 380 nm. Esto confiere la gran ventaja de obtener una señal que es independiente del nivel de carga del fluoróforo (Barreto-Chang y Dolmetsch, 2009). La ecuación propuesta por Grynkiewicz y col., 1985, permite asumir una relación de proporcionalidad entre la relación entre las fluorescencias de excitación del Fura-2 a 340/380 y la  $[Ca^{2+}]_i$ . De manera que los resultados mostrados en la Figura 17, correspondientes al efecto del D4 sobre la relación de fluorescencias a 340/380 del Fura-2 en epimastigotes de *T. cruzi*, son proporcionales a la  $[Ca^{2+}]_i$  de los epimastigotes. La razón

por la cual estos resultados no se mostraron en función a  $[Ca^{2+}]_i$  es porque la concentración basal de este catión es muy variable entre réplicas y depende de múltiples factores incluyendo el estado metabólico de los epimastigotes en cultivo en el momento en que se usan y de las soluciones utilizadas para calibrar el método. Es por ello que en todos los trabajos recientes se tiende a reportar los resultados como los cambios en la relación 340/380, en lugar de los cambios en la  $[Ca^{2+}]_i$ . En estos experimentos, se obtuvo que la adición del D4 a una concentración de 10  $\mu$ M produce un incremento en la relación de fluorescencias 340/380, y este incremento se obtiene tanto en presencia (Figura 17A) como en ausencia (Figura 17B) de  $Ca^{2+}$  (EGTA) en el medio extracelular. La Figura 18 muestra que el incremento en esta relación (340/380) es de más del 40% respecto a la fluorescencia basal. El hecho de que este incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  se produzca tanto en presencia como en ausencia de  $Ca^{2+}$  extracelular, y que la pendiente del incremento sea similar en ambos casos indica que el incremento en la concentración intracelular de este catión es producto de su liberación desde reservorios intracelulares. Con el objeto de determinar cuáles compartimientos podrían estar involucrados en el incremento de la  $[Ca^{2+}]_i$  en los epimastigotes de *T. cruzi*, se evaluó el efecto que este compuesto tiene sobre el potencial electroquímico mitocondrial y el grado de alcalinización de los acidocalcisomas, como organelos clave en la regulación del  $Ca^{2+}$  en *T. cruzi* (Benaim y García, 2011).

Se obtuvo que el D4 a todas las concentraciones utilizadas en este trabajo, desde 5  $\mu$ M hasta 20  $\mu$ M disipa el potencial electroquímico mitocondrial, lo cual produce la liberación de la Rodamina 123 acumulada en la mitocondria energizada con el subsecuente aumento de la fluorescencia a 530 nm. Sin embargo, el D4 no produce la disipación total del potencial mitocondrial ya que una adición posterior de FCCP genera un mayor y rápido

incremento en la fluorescencia. Se observó que el efecto del D4 fue dosis-dependiente, obteniéndose a 10  $\mu\text{M}$  la respuesta máxima. En la figura 20 se muestra el aumento porcentual de la fluorescencia respecto al nivel basal al añadir el D4 a 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$ . En los experimentos control, en los que se invierte el orden de adición de los compuestos (FCCP y D4) se obtuvo que el FCCP supera el efecto del D4 (a 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$ ) pero no disipa por completo el potencial electroquímico mitocondrial, ya que la adición posterior del D4 a todas las concentraciones genera todavía cierto efecto sobre el potencial mitocondrial. Esta respuesta observada al añadir la droga después del FCCP es interesante ya que se conoce que el FCCP es un agente que causa una total disipación de potencial electroquímico mitocondrial, aunque un efecto similar fue obtenido por Benaim y col., 2012 en el que evalúan el efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre *T. cruzi* y sugieren que podría deberse a la acción de la droga sobre un compartimiento diferente de la mitocondria, el cual también acumula pequeñas cantidades de rodamina 123.

Adicionalmente se observó que este compuesto induce un incremento rápido en la fluorescencia de parásitos cargados con naranja de acridina, un colorante catiónico que a bajo pH se protona y se agrega por interacciones electrostáticas. Este fluoróforo se acumula en los acidocalcisomas, conocidos por ser organelos acidificados por la acción de una  $\text{H}^+$ -ATPasa vacuolar (Docampo y Moreno, 2001). Se observó que la adición del D4 produce la alcalinización de los acidocalcisomas con la consecuente liberación de la naranja de acridina, siendo el efecto de la droga sobre estos organelos dosis-dependiente. Sin embargo, a las concentraciones empleadas, el D4 no produce una alcalinización total de estos organelos ya que la adición posterior de nigericina produce un mayor efecto sobre el grado de alcalinización (Figuras 21. B, D y F). También se obtuvo que al añadir nigericina de

forma previa a la adición de D4, se produce una alcalinización de los acidocalcisomas, en la que éste efector (nigericina) sustituye y supera en efecto del D4 en cada caso. Sin embargo, la alcalinización de estos compartimientos no fue total, ya que al añadir D4 posteriormente a la nigericina hubo un mayor incremento en la fluorescencia de la naranja de acridina. Este efecto de la droga luego de añadir nigericina sugiere la existencia de otros compartimientos acídicos sobre los cuales el compuesto podría estar actuando, como ha sido reportado por otros compuestos en este mismo sistema por Benaim y col., 2012. También mostramos la relación entre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de los epimastigotes de *T. cruzi* y la concentración de D4 añadida (Figura 22), como el aumento porcentual de la fluorescencia respecto a la basal en función a la adición de 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$  de D4. Se obtuvo que el D4 a 5  $\mu\text{M}$  genera un 30% de respuesta, con 10  $\mu\text{M}$  se produjo un 60 % de respuesta y con 20  $\mu\text{M}$  de D4 la respuesta generada fue de 85% lo cual demuestra que a esta última concentración el sistema podría no haber reflejado el efecto máximo de esta droga. En conclusión, el incremento observado en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en presencia de D4 es con toda probabilidad producto de la acción de este fármaco sobre los acidocalcisomas y sobre las mitocondrias.

## 6. Conclusiones

- El D4 tiene un efecto inhibitorio sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* con un IC<sub>50</sub> de 8,5 μM y una CIM de 30 μM.
- Parte del mecanismo involucrado en el efecto del D4 sobre el crecimiento de los epimastigotes de *T. cruzi* es la alteración de la homeóstasis del Ca<sup>2+</sup> intracelular, produciendo un incremento en la concentración intracelular de este catión como producto de su liberación desde compartimientos intracelulares.
- El efecto adicional del D4 sobre el potencial mitocondrial y el grado de alcalinización de los acidocalcisomas indica que el Ca<sup>2+</sup> proviene al menos parcialmente de estos compartimientos.
- El D4 disminuye de forma significativa y dosis-dependiente, el porcentaje de células Vero infectadas por amastigotes de *T. cruzi*, la fase clínicamente relevante, con un IC<sub>50</sub> de alrededor de 1.0 μ M. En contraste, ésta droga no posee un efecto citotóxico significativo sobre las células Vero a concentraciones de hasta 25 μM.

## 7. Bibliografía

- Alarcón de Noya, B., Díaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Mauriello, L., Zavala-Jaspe, R., Suarez, J. A., Abate, T., Naranjo, L., Paiva, M., Rivas, L., Castro, L., Márques, Mendoza, I., Acquatella, H., Torres, J., and Noya, O. (2010). Large Urban Outbreak of Orally Acquired Acute Chagas Disease at a School in Caracas, Venezuela. *J infect Dis.* 201: 1308–1315.
- Bakunov, S. A., Bakunova, S. M., Bridges, A. S., Wenzler, T., Barszcz, T., Werbovetz, K. A., Brun, R. and Tidwell, R. R. (2009). Synthesis and antiprotozoal properties of pentamidine congeners bearing the benzofuran motif. *J Med Chem.* 52: 5763–5767.
- Bakunov, S. A., Bakunova, S. M., Wenzler, T., Barszcz, T., Werbovetz, K. A., Brun, R. and Tidwell, R. R. (2008). Synthesis and antiprotozoal activity of cationic 2-Phenylbenzofurans. *J Med Chem.* 51: 6927–6944.
- Bakunova, S. M., Bakunov, S. A., Wenzler, T., Barszcz, T., Werbovetz, K. A., Brun, R., Hall, J. E. and Tidwell, R. R. (2007). Synthesis and in Vitro Antiprotozoal Activity of Bisbenzofuran Cations. *J MedChem.* 50: 5807-5823.
- Barreto-Chang, O. L., Dolmetsch, R. E. (2009). Calcium Imaging of Cortical Neurons using Fura-2 AM. *J Vis Exp.* 23:1-3
- Benaim, G. (1996). Intracellular Calcium Signaling and Regulation in *Leishmania*. In: Tapia, F., Caceres-Dittmar, G., and Sanchez, M.A. (Eds.) Molecular and Immune Mechanism in the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis. R.G. Landes Co. Medical Intelligence Unit, Austin, Texas, Cap. 5. p. 89-106.
- Benaim, G., Bermudez, R., Urbina, J.A. (1990). Ca<sup>2+</sup> transport in isolated mitochondrial vesicles from *Leishmania braziliensis* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 39(1):61-8.

- Benaim, G., Casanova, P., Hernandez-Rodriguez, V., Mujica-González, Parra-Gimenez, N., Plaza-Rojas, L., Concepcion, J. L., Liu, Y.L., Oldfield, E., Paniz-Mondolfi, A., and Suarez, A. I. (2014). Dronedarone, an Amiodarone analog with improved anti-*Leishmania mexicana* efficacy. *Antimicrob Agents Chemother.* 58:1-8.
- Benaim, G., Cervino, V., Hermoso, T., Felibertt, P. and Laurentin, A. (1993a). Intracellular calcium homeostasis in *Leishmania mexicana*. Identification and characterization of a plasma membrane calmodulin-dependent Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Biol Res* 26: 141-150.
- Benaim, G., Cervino, V., and Villalobo, A. (1998). Comparative phosphorylation of calmodulin from trypanosomatids and bovine brain by calmodulin-binding protein kinases. *Comp Biochem Physiol. Part C, Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 120:57-65.
- Benaim, G., and García, C. R. S. (2011). Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishmaniasis – a review. *Trop Biomed.* 28:471-481.
- Benaim, G., García-Marchán, Y., Reyes, C., Uzcanga, G., Figarella, K. (2013). Identification of a sphingosine-sensitive Ca<sup>2+</sup> channel in the plasma membrane of *Leishmania mexicana*. *Biochem Biophys res Commun.* 430:1091-1096.
- Benaim, G., Hernández-Rodriguez, V., Mujica-González, S., Plaza-Rojas, L., Li Silva, M., Parra-Gimenez, N., García-Marchán, Y., Paniz-Mondolfi, A. y Uzcanga, G. (2012). *In Vitro* Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of Dronedarone, A novel Amiodarone Derivative with an Improved Safety Profile. *Antimicrob Agents Chemother.* 56:3120-3725.
- Benaim, G., Losada, S., Gadelha, F.R. and Docampo, R. (1991). A calmodulin-activated (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPase is involved in calcium transport by plasma membrane vesicles from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.* 280:715-720.

- Benaim, G., Lopez-Estraño, C., Docampo, R. and Moreno, S.N.J. (1993b). A calmodulin-stimulated Ca<sup>2+</sup> pump in plasma membrane vesicles from *Trypanosoma brucei*. Selective inhibition by pentamidine. *Biochem J.* 296: 759-763.
- Benaim, G., Moreno, S.N.J., Hutchinson, G., Cervino, V., Hermoso, T., Romero, P.J., Ruiz, F., De Souza, W., and Docampo, R. (1995). Characterization of the plasma membrane calcium pump from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.* 306: 299-303.
- Benaim, G., Paniz-Mondolfi, A. E. (2012). The emerging role of amiodarone and dronedarone in Chagas disease. *Nat Rev Cardiol.* 9:605-09.
- Benaim, G. and Romero, P.J. (1990b). A calcium pump in plasma membrane vesicles from *Leishmania braziliensis*. *Biochem Biophys Acta.* 1027: 79-84.
- Benaim, G., Sanders, J. M., Garcia-Marchan, Y., Colina, C., Lira, R., Caldera, A. R., Payares, G., Sanoja, C., Burgos, J. M., Leon-Rossell, A., Concepción, J. L., Schijman, A. G., Levin, M., Oldfield, E. and Urbina, J. A. 2006. Amiodarone has an intrinsic Anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J Med Chem.* 49: 892-899.
- Bouzahzah B, Jelicks LA, Morris SA, et al. (2005). Risedronate in the treatment of murine Chagas' disease. *Parasitol Res.* 96 : 184 -7
- Buckner, F. S., Griffin, J. H., Wison, A. J., Van Voorhis, W. C. (2001). Potent Anti-*Trypanosoma cruzi* Activities of Oxidosqualene Cyclase Inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1210-1215
- Buckner, F. S., Wison, A. J., White, T. C., and Van Voorhis, W. C. (1998). Induction of Resistance to Azole Drugs in *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 42:3245-3250.
- Carafoli, E. (1987). Intracellular Calcium homeostasis. *Ann Rev Biochem.* 56:395-433.

- Chung, S.H. and Swindle, J. (1990). Linkage of the calmodulin and ubiquitin loci in *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res.* 18: 4561-4569.
- Clayton, J. 2010. Chagas' disease 101. *Nature.* 465: S4-S5.
- Courcenge, W. E. 2001. Characterization of a Novel, Broad-Based Fungicidal Activity for the Antiarrhythmic Drug Amiodarone. *J Pharm Exp Ther.* 300:195-199.
- Dann, O., Fernbach, R., Pfeifer, W., Demunt, E., Berged, G., Lungs, S. und Liirding, G. (1972). Trypanocide Diamidine Mit drei Ringen In zwei isolierten Ringsystemen. *Liebigs AnnChem.* 760: 37-87.
- Dann, O., Volz, G., Demant, E., Pfeifer, W., Bergen, G., Fick, H. Und Walkenhorst, E. (1973). Trypanocide Diamidine Mit vier Ringen In einem oder zwei Ringsystemen. *Liebigs Ann Chem.* 761: 1112- 1140.
- de Araújo-Jorge, T. C. (1999). Biology and ultra-structure of *Trypanosoma cruzi*: a 90-years Old Challenge for Scientists. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94: 131-134.
- de Souza, W. (2002). Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des.* 8:269-285.
- de Souza, W., de Carvalho, T., Barrias, E. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. *Int J Cell. Biol.* 2010:1-18.
- De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I., Rizzuto, R. (2011). A 40 KDa protein in the inner membrane is de mitochondrial calcium uniporter. *Nature.* 476:336-340.
- Docampo, R. (2011). Acidocalcisomes. *Cell Calcium.* 50:113-119.
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., Moreno, S.N. (2005). Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol.* 3:251–61.

- Docampo, R., Moreno, S. N. J. (2008). The Acidocalcisome as a Target for Chemotherapeutic Agents in Protozoan Parasites. *Curr Pharm Des.* 14(9): 882–888.
- Docampo, R., Scott, D. A., Vercesi, A. E., and Moreno, S. N. J. (1995). Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.* 310:1005-1012
- Docampo, R., Vercesi, A. E. (1989).  $\text{Ca}^{2+}$  Transport by Coupled *Trypanosoma cruzi* Mitochondria in Situ. *J Biol Chem.* 264:108-111
- Duschak, V. G. (2011). A Decade of Targets and Patented Drugs for Chemotherapy of Chagas Disease. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 6:216-259.
- Dvorak, J., Crane, M. S. J. (1981). Vertebrate cell cycle modulates infection by protozoan parasites. *Science.* 214:1034-1036.
- Enanga, B., Ariyanayagam, M. R., Stewart, M. L., Barrett, M. P. (2003). Activity of Megazol, a Trypanocidal Nitroimidazole, Is Associated with DNA Damage. *Antimicrob Agents Chemother.* 47:3368-3370.
- Fernandes, M. C. and Andrews, N. W. (2012). Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*: A Unique Strategy that Promotes Persistence. *FEMS Microbiol Rev.* 36: 734–747.
- Florin-Christensen, M., Florin-Christensen, J., Garin, C., Isola, E., Brenner, R., Rasmussen, L. (1990). Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth and sterol biosynthesis by lovastatin. *Biochem Biophys Res Commun.* 166: 1441-1445.
- Garcia-Marchan, Y., Sojo, F., Rodriguez, E., Zerpa, N., Malave, C., Galindo-Castro, I., Salerno, M. and Benaim, G. (2009). *Trypanosoma cruzi* calmodulin: Cloning, expression and characterization. *Exp Parasitol.* 123:326-333.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y. (1985). A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescent properties. *J Biol Chem.* 260:3440-3450.

- Gupta, S. S., Van-Khue, T., Beaudry, V., Rulli, S., Cunningham, K., Rao, R. (2003). Antifungal Activity of Amiodarone Is Mediated by Disruption of Calcium Homeostasis. *J Biol Chem.* 278: 28831–28839.
- Hejchman, E., Ostrowska, K., Maciejewska, D., Kossakowski, J., Courchense, J. E. (2012). Synthesis and antifungal activity of derivatives of 2- and 3-benzofurancarboxylic acids. *J pharmacol Exp Ther.* 343:380-388
- Huang, L., Brinen, L. S., and Ellman, J. A. (2003). Crystal Structures of Reversible Ketone-Based Inhibitors of the Cysteine Protease Cruzain. *Bioorgan Med Chem.* 11:21-29.
- Kinnamon, K. E., Poon, B. T., Hanson, W. L. and Waits, V. B. (1998). Trypanosoma cruzi: A Novel Chemical Class (Nitrobenzofurans) Active against Infections of Mice (*Mus musculus*). *Exp Parasitol.* 89: 251-256.
- Krauth-Siegel, R. L., Schöneck, R. (1995). Flavoprotein structure and mechanism. 5. Trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase as targets for a structure-based drug design. *FASEB J.* 9:1138-1146.
- Kryshchshyn, A., Kaminsky, D., Grellier, P., Lesyk, R. (2014). Trends in research of antitrypanosomal agents among synthetic heterocycles. *Eur J Med Chem.* 85:51-64.
- Marino A.P. M. P., Silva, A. A., Pinho, R. T., and Lannes-Vieira, J. (2003). *Trypanosoma cruzi* infection: a continuous invader-host cell cross talk with participation of extracellular matrix and adhesion and chemoattractant molecules. *Braz J Med Biol Res.* 36: 1121-1133.
- Martins, A. V., Gomes, A. P., Gomes de Mendonça, E., Rangel Fietto, J. L., Santana, L. A., de Almeida, M. G, Geller, M., de Freitas Santos, R., Roger Vitorino, R., Siqueira-Batista, R. (2012). Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Infectio.* 16: 45-58.

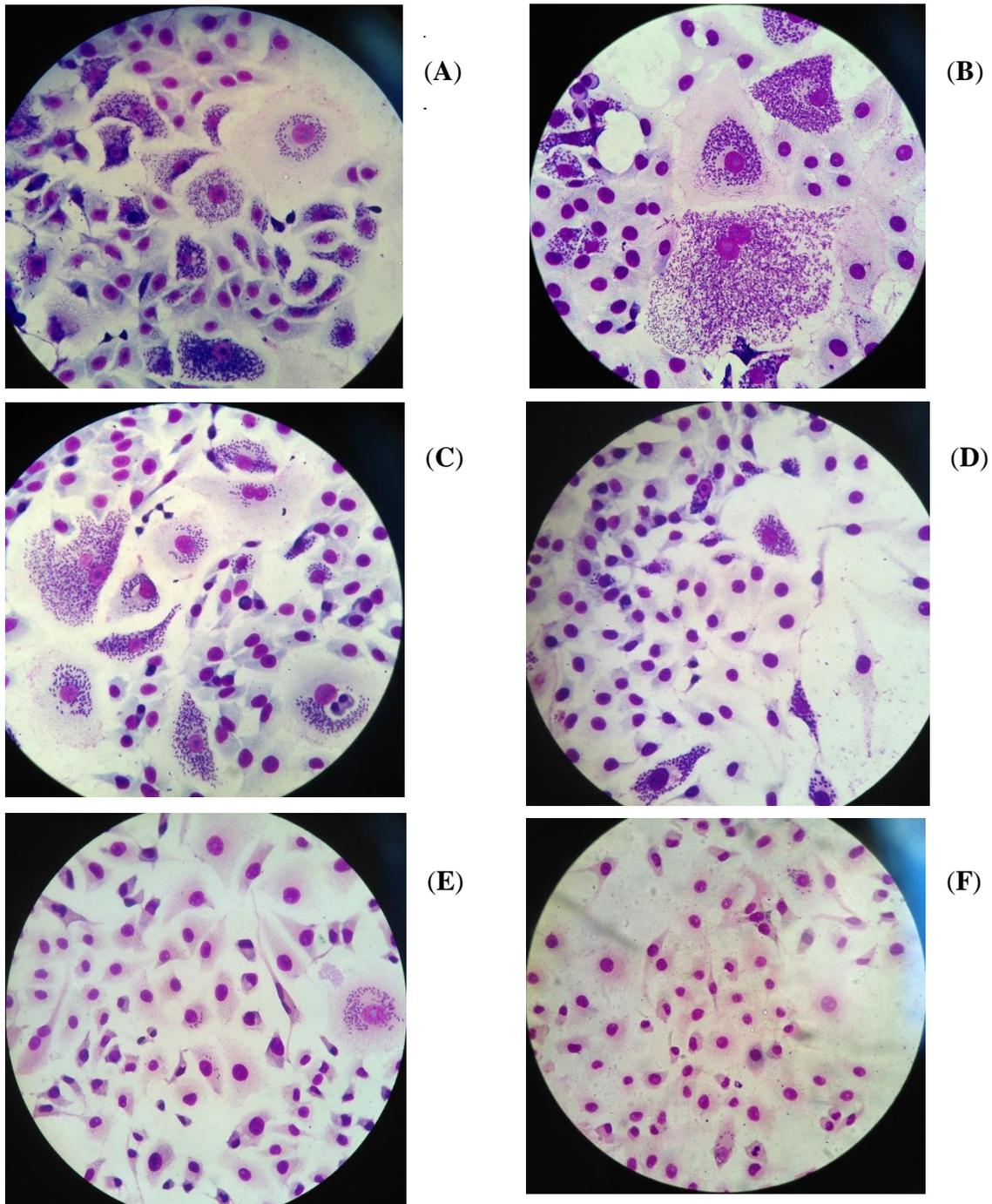
- Maya, J. D., Cassels, B. K., Iturriaga-Vásquez, P., Ferreira, J., Faúndez, M., Galanti, N., Ferreira, A., Morello, A. (2006). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol.* 146:601-620.
- Mital, A. (2009). Synthetic Nitroimidazoles: Biological Activities and Mutagenicity Relationships. *Sci Pharm.* 77:497-520.
- Moreno, S. N. J., Silva, J., Vercesi, A. E., and Docampo, R. (1994). Cytosolic-free Calcium Elevation in *Trypanosoma cruzi* isrequired for Cell Invasion. *J Exp Med.* 180:1535-1540.
- Morillo, C.A., Marin-Neto, J.A., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi, A. Jr., Rosas, F., Villena, E., Quiroz, R., Bonilla, R., Britto, C., Guhl, F., Velazquez, E., Bonilla, L., Meeks, B., Rao-Melacini, P., Pogue, J., Mattos, A., Lazdins, J., Rassi, A., Connolly, S. J., Yusuf. S., for de BENEFIT investigators (2015). Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2015 Sep 1; ([E-pub ahead of print]).
- Navarro, M. C., De Lima, A. R., Askue, J., Contreras, V. T. (2003). Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98:93-81.
- Okuda, K., Esteva, M., Segura, E., Bijovsky, A. (1999). The cytostome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is associated with the flagellar complex. *Exp Parasitol.* 92(4):223-31.
- Page, R. L., Hamad, B., Kirkpatrick, P. (2009). *Nature Rev.* 8:769-770.
- Prata, A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 1:92-100.

- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Benink, H.A., Worzella, T. J., Storts, D., Reid, Y. (2013). Minor L (Ed.), Cell Viability Assays. In: Sittampalam, G.S., Coussens, N.P., Nelson, H., et al. (Eds.). *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- Rísquez, A. (2009). Mortalidad por enfermedad de Chagas. A propósito de los brotes de Chagas agudo como enfermedad reemergente de transmisión alimentaria. *Gac Med Caracas*. 117: 319-321.
- Sanz-Rodríguez, C. E., Concepción, J. L., Pekerar, S., Oldfield, E., and Urbina, J. A. (2007). Bisphosphonates as Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Hexokinase. *J Biol Chem*. 282:12377-12387.
- Serrano-Martín, X., García-Marchan, Y., Fernandez, A., Rodriguez, N., Rojas, H., Visbal, G. y Benaim, G. (2009a). Amiodarone destabilizes intracellular  $Ca^{2+}$  homeostasis and biosynthesis of sterol in *Leishmania mexicana*. *Antimicrob Agents Chemother*. 53: 1403-1410.
- Serrano-Martín, X., Payares, G., De Lucca, M., Martinez, J.C., Mendoza-León, A., Benaim, G. (2009b). Amiodarone and miltefosine act synergistically against *Leishmania mexicana* and can induce parasitological cure in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 53:5108-13
- Soeiro, M. N. C., de Castro, L. 2009. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. *Expert Opin Ther. Targets*. 13: 105-121.
- Soto-Vivas, A., (2009). Clave pictórica de triatóminos (Hemiptera: Triatominae) de Venezuela. *Bol. Dir. Malariol San Amb*. 49:259 -274.

- Stoppani, A. O. M., Docampo, R., De Boiso, J. F. Frasch, A. C. C. (1980). Effect of inhibitors of electron transport and oxidative phosphorylation on *Trypanosoma cruzi* respiration and growth. *Mol Biochem Parasitol.* 2: 3-21.
- Tardieux, I., Nathanson, M. H., and Andrews, N. W. (1994). Role in Host Cell Invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced Cytosolic-free Ca<sup>2+</sup> Transients. *J Exp Med.* 179: 1017-1022
- Tardieux, I., Webster, P., Ravesloot, J., Boron, W., Lunn, J.A., Heuser, J.E., Andrews, N.W. (1992). Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell.* 71:1117–1130.
- Tomazela, D.M., Pupo, M.T., Passador, E.A., da Silva, M.F., Vieira, P.C., Fernandes, J.B., Fo, E.R., Oliva, G., Pirani, J.R. (2000). Pyrano chalcones and a flavone from *Neoraputia magnifica* and their *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-inhibitory activities. *Phytochem.* 55: 643 -51.
- Tyler, K. M., Engman, D. M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol.* 31:472-481.
- Ulrich, P.N., Cintron, R., Docampo, R. (2010). Calcium homeostasis and acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. *Microbiol Monograph.* 17:299–317.
- Urbina, J. A., Concepcion, J. L., Rangel, S., Visbal, G., Lira, R. (2002). Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol.* 125:35-45.
- Urbina J.A., Lazard K., Marchan E., et al. (1993). Mevinolin (lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of ketoconazole and terbinafine against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Antimicrob Agents Chemother.* 37: 580 -91.

- Yeo, M. (2004). The genetic diversity of *Trypanosoma cruzi*: multiclonality of natural populations, and characterisation of Paraguayan isolates and experimentally derived *T. cruzi* I hybrids. Doctoral thesis. University of London. United Kingdom.
- Zhivotovsky, B. and Orrenius, S. (2011). Calcium and cell death mechanisms: A perspective from the cell death. *Cell Calcium*. 50:211-221.
- Zingales, B., Colli, W. (1985). *Trypanosoma cruzi*: Interaction with host cells. En Hudson, L. (editor). Current topics in microbiology and immunology, Vol. 117: The biology of trypanosomes (pp. 130-147). Heidelberg: Springer-Verlag Berlin.
- World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>

## 8. Anexos



**Anexo 1. Células Vero infectadas con amastigotes de *T. cruzi* 96 horas post-tratamiento con concentraciones crecientes de D4. (A) Control (0 droga). (B) 0,1  $\mu\text{M}$  de D4. (C) 0,2  $\mu\text{M}$  de D4. (D). 2  $\mu\text{M}$  de D4. (E) 5  $\mu\text{M}$  de D4. (F) 10  $\mu\text{M}$  de D4 (72 horas).**