



Universidad Central de Venezuela.
Facultad de Ciencias.
Escuela de Biología.
Departamento de Biología Celular.



**Efecto de Tetrahydroquinolinas sustituidas sobre la regulación
intracelular de calcio en *Trypanosoma cruzi***

Bachiller: Alejandra C. Villarroel H.

Tutora: Dra. Vincenza Cervino.

Laboratorio de Biofísica
Instituto de Biología Experimental

Mayo, 2017.

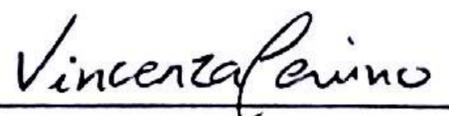
ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	4
RESUMEN.....	7
1. INTRODUCCIÓN:.....	9
1.1 Ciclo de Vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	13
1.2 El Calcio en humanos y tripanosomatidios.....	15
1.3 Homeóstasis de Ca^{2+} en los tripanosomatidios.....	17
1.4 La Ca^{2+} -ATP-asa de la membrana plasmática en los tripanosomatidios.....	20
1.5. Drogas utilizadas actualmente en la enfermedad de Chagas	21
1.6 Drogas que afectan la homeóstasis de Ca^{2+} en <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
1.7 Otras Drogas utilizadas en <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
1. 8 Compuestos derivados de productos naturales utilizados como agentes terapéuticos.....	27
2. ANTECEDENTES.....	32
3. OBJETIVO	42
3.1 Objetivo General	42
3.2 Objetivos Específicos.....	42
4. MATERIALES.....	43
4.1 Reactivos.....	43
4.2 Material Biológico	43
5. METODOLOGÍA	44
5.1 Cultivo de Parásitos:	44
5.2 Curva de Proliferación de <i>Trypanosoma cruzi</i> :	44
5.3 Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM6, DM7, DM8, DM9, DM12, DM13, DM15 y DM16 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> :	45
5.4 Obtención de vesículas de membrana plasmática de <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
5.5 Obtención de Fantasmas de eritrocitos humanos.....	47
5.6 Determinación del efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8 y DM12 sobre la actividad de la Ca^{2+} ATP-asa de fantasmas de eritrocitos humanos.....	47
5.7 Determinación del efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8 y DM12 sobre la actividad de la Ca^{2+} ATP-asa de membrana plasmática de <i>Trypanosoma cruzi</i>	48
5.8 Determinación de la concentración de proteínas.....	49
5.9 Determinación del efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8 y DM12, sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en poblaciones de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	50
6. RESULTADOS.....	52
6.1 Curva de Crecimiento de <i>Trypanosoma cruzi</i>	52
6.2 Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM6, DM7, DM8, DM9, DM12, DM13, DM15 y DM16 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	53
6.3 Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM5 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> y la determinación de su IC_{50}	58
6.4 Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM8 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> y la determinación de su IC_{50}	60

6.5 Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM12 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> y la determinación de su IC_{50}	62
6.6 Efecto de la droga de referencia benznidazol sobre la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> y la determinación de su IC_{50}	64
6.7 Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8 y DM12 sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATP-asa de membrana plasmática de <i>Trypanosoma cruzi</i>	66
6.8 Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8 y DM12 sobre la actividad de la Ca^{2+} ATP-asa de fantasmas de eritrocitos humanos.....	68
6.9 Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8, DM12 y el benznidazol sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	70
6.10 Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM5 sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	71
6.11 Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM8 sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	72
6.12 Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM12 sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	73
6.13 Efecto del Benznidazol sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	74
7. DISCUSIÓN.....	76
8. CONCLUSIONES.....	87
9. BIBLIOGRAFIA.....	88

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. Alejandra Carolina Villarroel Hernández, C.I.: V-17.751.986 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 dieciocho (18) puntos. Para dar fe de ello se levanta la presente acta en la ciudad de Caracas a los veinticinco días del mes de mayo de 2017.



Dra. Vincenza Cervino
C.I.: 9.963.931
Tutora Académica



Dr. Francisco Arvelo
C.I.: 2.890.017
Jurado Principal



Dra. María Valentina Salas
C.I.: 6.330.504
Jurado Principal

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Indicando países endémicos con transmisión por el vector, entre los cuales se encuentra Venezuela.....	10
Figura 2. Distribución geográfica de los principales vectores causantes de la enfermedad de Chagas. Incluyendo Venezuela. Destacando principalmente en Venezuela el vector <i>Rhodnius prolixus</i> . (Tomado de: http://4.bp.blogspot.com/8_qBj1kbbkD0/UyMrdfo9hGI/AAAAAAAAAB9g/Md2UOkN1Wml/s1600/Pples.jpg).....	11
Figura 3. Ciclo de Vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Se representan las diferentes formas de este parásito tanto en el vector como en el hospedador vertebrado, indicando las formas replicativas. (Tomado de http://www.dpd.cdc.gov).....	15
Figura 4. Mecanismos de Regulación de Ca ²⁺ en tripanosomatidios. 1) Canal de Ca ²⁺ , 2) Bomba de Ca ²⁺ de la membrana plasmática (PMCA), 3) Calmodulina, 4) Bomba de Ca ²⁺ del retículo endoplasmático (SERCA), 5) Uniporte de Ca ²⁺ mitocondrial y 6) Ca ²⁺ -ATPasa de los acidocalcisomas. (Tomado de: Benaim., 1996).....	18
Figura 5. Estructura química de la Quinolina (Tomado de: Kouznetsov y col., 2010).....	29
Figura 6. Proceso de Isomerización de Eugenol para la obtención de Isoeugenol.....	30
Figura 7. Estructura de la 1,2,3,4, Tetrahydroquinolinas (Tomado de: Kouznetsov y col., 2010).....	31
Figura 8. Estructuras de las tetrahydroquinolinas pertenecientes a la serie DM. Para cada uno de los compuestos se indica peso molecular. (Tomado de Kouznetsov y col., 2010).....	39
Figura 9. Curva de crecimiento de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> . El cultivo se inicio partiendo de una población de 5 x 10 ⁶ cel/ml, y se evaluó la proliferación celular cada 24 horas durante un total de 240 horas (10 días). Se observa el aumento en el número de células/ml en función del tiempo. Cada punto observado en la gráfica corresponde al promedio y su desviación estándar correspondiente a seis experimentos independientes.	53
Figura 10. Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas sobre la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> . Los cultivos se iniciaron a partir de una población de 5 x 10 ⁶ cél/ml y la proliferación fue seguida cada 24 horas durante 10 días, en ausencia (Control), en presencia de 30 µM de cada una de las tetrahydroquinolinas estudiadas, en presencia de 30 µM benznidazol y en presencia de 1% DMSO. Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (±) la desviación estándar de seis experimentos independientes.	54
Figura 11. Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas seleccionadas, sobre la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> El cultivo se inició a partir de una población de 5 x 10 ⁶ cel/ml y su proliferación fue seguida cada 24 horas durante 10 días, en ausencia (control), en presencia de 15 µM de cada una de las Tetrahydroquinolinas sustituidas (DM5, DM8 y DM12) y en presencia de 15 µM benznidazol. Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (±) la desviación estándar de seis experimentos independientes.	56
Figura 12. Estructura de las tetrahydroquinolinas sustituidas seleccionadas: DM5, DM8 y DM12.	58
Figura 13. Efecto dosis-dependiente de la tetrahydroquinolina sustituida DM5 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> . El cultivo se inició a partir de una población de 5 x 10 ⁶ cel/ml y su proliferación fue seguida cada 24 horas durante 10 días, en ausencia (control) y en presencia de concentraciones crecientes del compuesto (1 µM a 30 µM). Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (±) la desviación estándar de 6 experimentos independientes.....	59
Figura 14. Efecto dosis-respuesta del compuesto DM5 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> a las 144 horas de incubación con las diferentes concentraciones	

del compuesto. Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (\pm) la desviación estándar de seis experimentos independientes.....	59
Figura 15. Efecto dosis-dependiente de la tetrahydroquinolina sustituida DM8 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> . El cultivo se inició a partir de una población de 5×10^6 cel/ml y su proliferación fue seguida cada 24 horas durante 10 días, en ausencia (control) y en presencia de concentraciones crecientes del compuesto (1 μ M a 30 μ M). Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (\pm) la desviación estándar de 6 experimentos independientes.....	60
Figura 16. Efecto dosis-respuesta de la tetrahydroquinolina sustituida DM8 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> a las 144 horas de incubación con las diferentes concentraciones del compuesto. Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (\pm) la desviación estándar de seis experimentos independientes.	61
Figura 17. Efecto dosis-dependiente de la tetrahydroquinolina sustituida DM12 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> . El cultivo se inició a partir de una población de 5×10^6 cel/ml y su proliferación fue seguida cada 24 horas durante 10 días, en ausencia (control) y en presencia de concentraciones crecientes del compuesto (1 μ M a 30 μ M). Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (\pm) la desviación estándar de 6 experimentos independientes.....	62
Figura 18. Efecto dosis-respuesta de la tetrahydroquinolina DM12 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> a las 144 horas de incubación con las diferentes concentraciones del compuesto. Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (\pm) la desviación estándar de seis experimentos independientes.	63
Figura 19. Efecto dosis-dependiente del benznidazol sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> . El cultivo se inició a partir de una población de 5×10^6 cel/ml y su proliferación fue seguida cada 24 horas durante 10 días, en ausencia (control) y en presencia de concentraciones crecientes de la droga (1 μ M a 30 μ M). Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (\pm) la desviación estándar de 6 experimentos independientes.....	64
Figura 20. Efecto dosis-respuesta del benznidazol sobre la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> a las 144 horas de incubación con las diferentes concentraciones del compuesto. Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (\pm) la desviación estándar de seis experimentos independientes.	65
Figura 21. Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8, DM12 y del benznidazol sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> . La actividad fue determinada a una concentración de Ca^{2+} libre de 10 μ M. Se observa en cada grupo de barras la actividad control y la actividad en presencia de 5 μ M, 15 μ M y 30 μ M de cada compuesto. Las actividades reportadas corresponden al promedio (\pm) la desviación estándar de seis experimentos independientes, siendo los efectos inhibitorios de cada compuesto con respecto al control estadísticamente significativos con un $p \leq 0,05$	67
Figura 22. Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8, DM12 y del benznidazol sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática de eritrocitos humanos. Las barras representan la actividad enzimática en presencia de 0.2 μ M, 2 μ M y 10 μ M Ca^{2+} libre respectivamente. El grupo control representa la actividad de la enzima en ausencia de compuestos. El resto de los grupos representa la actividad de la enzima en presencia de 30 μ M Benznidazol, 30 μ M DM5, 30 μ M DM8 y 30 μ M DM12. Las actividades reportadas corresponden al promedio (\pm) la desviación estándar de seis experimentos independientes, no observándose diferencia significativas entre el efecto de cada compuesto y el control con un $p \leq 0,05$	69
Figura 23. Efecto del compuesto DM5 sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> . A. Efecto de 7 μ M DM5 (flecha) sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en presencia de 2 mM de Ca^{2+} extracelular. B. Efecto de	

7 μM DM5 sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en ausencia de Ca^{2+} extracelular (8 mM EGTA).	71
Figura 24. Efecto del compuesto DM8 sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> . A. Efecto de 5 μM DM8 (flecha) sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en presencia de 2 mM de Ca^{2+} extracelular. B. Efecto de 5 μM DM8 sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en ausencia de Ca^{2+} extracelular (8 mM EGTA).	72
Figura 25. Efecto del compuesto DM12 sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> . A. Efecto de 6 μM DM12 (flecha) sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en presencia de 2 mM de Ca^{2+} extracelular. B. Efecto de 6 μM DM12 sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en ausencia de Ca^{2+} extracelular (8 mM EGTA).	73
Figura 26. Efecto del Benznidazol sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> . A. Efecto de 2 μM Benznidazol (flecha) sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en presencia de 2 mM de Ca^{2+} extracelular. B. Efecto de 2 μM Benznidazol sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en ausencia de Ca^{2+} extracelular (8 mM EGTA).	74

RESUMEN

Los tripanosomatidios son organismos unicelulares, pertenecientes al Orden Kinetoplastida, los cuales pueden ser organismos patógenos o no patógenos. Entre los organismos patógenos se encuentra el *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas, la cual afecta cerca de 8 a 12 millones de personas en Latinoamérica, siendo considerada como un gran problema de salud pública.

Las únicas drogas que actualmente representan la línea de tratamiento para la enfermedad de Chagas (Nifurtimox y Benznidazol), utilizadas en las últimas cuatro décadas, tienen efectos secundarios, no actúan eficientemente durante la fase crónica de la enfermedad y han desarrollado resistencia. Por esta razón, en los últimos años distintos grupos de investigación han dirigido sus estudios hacia la búsqueda de productos naturales y/o sintéticos que pudieran ser utilizados como posibles agentes terapéuticos. Se ha reportado que derivados de productos naturales conocidos como Tetrahydroquinolinas sustituidas, tienen un efecto terapéutico sobre líneas de células tumorales y presentan una actividad antiproliferativa en los tripanosomatidios. Sin embargo, estos estudios han sido realizados determinando únicamente su efecto en la proliferación de los parásitos y su toxicidad en humanos, no reportándose un efecto en la homeóstasis intracelular de Ca^{2+} . Muchos estudios han demostrado que una alteración en los niveles intracelulares basales de Ca^{2+} en los tripanosomatidios puede conducir a la muerte de estos parásitos. En este sentido, existen evidencias que demuestran que drogas que afectan los mecanismos reguladores de Ca^{2+} tienen un efecto importante sobre la viabilidad del parásito. Considerando la importancia de la búsqueda de nuevos compuestos eficientes para el tratamiento de esta enfermedad, en este trabajo nos propusimos evaluar el efecto de nueve Tetrahydroquinolinas sustituidas pertenecientes a la serie DM, derivados de aceites esenciales de plantas de clavo y canela, sobre la proliferación de *T. cruzi* y su efecto sobre la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática, la principal enzima encargada del mantenimiento basal de la homeostasis de Calcio en estos

tripanosomatidios y la misma enzima de eritrocitos humanos. Los resultados demostraron que todas las tetrahydroquinolinas sustituidas ensayadas tuvieron un efecto importante en la inhibición de la proliferación celular, resaltando los compuestos DM5, DM8 y DM12 que inhibieron la proliferación de *T. cruzi* cerca de un 90 %. Asimismo, estos compuestos inhibieron significativamente la actividad enzimática de la Ca²⁺ ATP-asa de membrana plasmática de este parásito, sin afectar la misma enzima de los eritrocitos humanos, sugiriéndose que las tetrahydroquinolinas DM5, DM8 y DM12 pudieran ser selectivas sobre la PMCA de estos parásitos. Adicionalmente, se pudo observar que estos compuestos incrementaron los niveles intracelulares de Ca²⁺, a consecuencia de la liberación de este catión desde reservorios intracelulares, sugiriendo que los mismos afectan la homeostasis de Ca²⁺. Estos resultados apoyan el uso de estas tetrahydroquinolinas como prototipos para el diseño de nuevos compuestos a ser utilizados con fines terapéuticos de manera independientes o en terapias de combinación de drogas.

Palabras claves: Parásitos, *Trypanosoma cruzi*, Tetrahydroquinolinas, Homeostasis de calcio, Regulación.

1. INTRODUCCIÓN:

Los parásitos son microorganismos que habitan dentro de un hospedador y que dependen de éste para sus actividades metabólicas y de reproducción, llegando entre ellos a establecer una relación de simbiosis dinámica. En algunos casos el parásito puede llegar a ocasionar daño al hospedador, teniendo así organismos patógenos y no patógenos. Entre los organismos patógenos que afectan a la población humana se encuentran los tripanosomatidios, tales como los pertenecientes a los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania*. Los tripanosomatidios patógenos en humanos son transmisores de enfermedades tropicales como la Enfermedad de Chagas y la Leishmaniasis siendo esto un problema de salud pública en países del tercer mundo, entre ellos Venezuela.

La enfermedad de Chagas originalmente descrita por el médico brasileño Carlos Chagas en 1909, es una afección parasitaria, sistémica y crónica, transmitida por vectores y causada por *Trypanosoma cruzi*. Está fuertemente vinculada a aspectos socio-económicos y culturales deficitarios, en poblaciones de menores recursos, básicamente sectores rurales, considerándosele una enfermedad desatendida. La enfermedad de Chagas es una patología endémica en 21 países de América Latina, como se puede observar en la Figura 1, aunque las migraciones de personas infectadas pueden llevarla a países no endémicos como Canadá, Estados Unidos y Europa entre otros (OMS., 2014).

Entre algunos de los países endémicos de Latinoamérica se encuentra Argentina, México, Chile, Colombia, Brasil y Venezuela, como se observa en la Figura 1. Estos países poseen principalmente transmisión vectorial, mientras que países como España, Canadá, Estados Unidos entre otros, son países no endémicos con transmisión principalmente por migraciones de personas infectadas, transfusiones de sangre o de órganos. (OMS 2010).

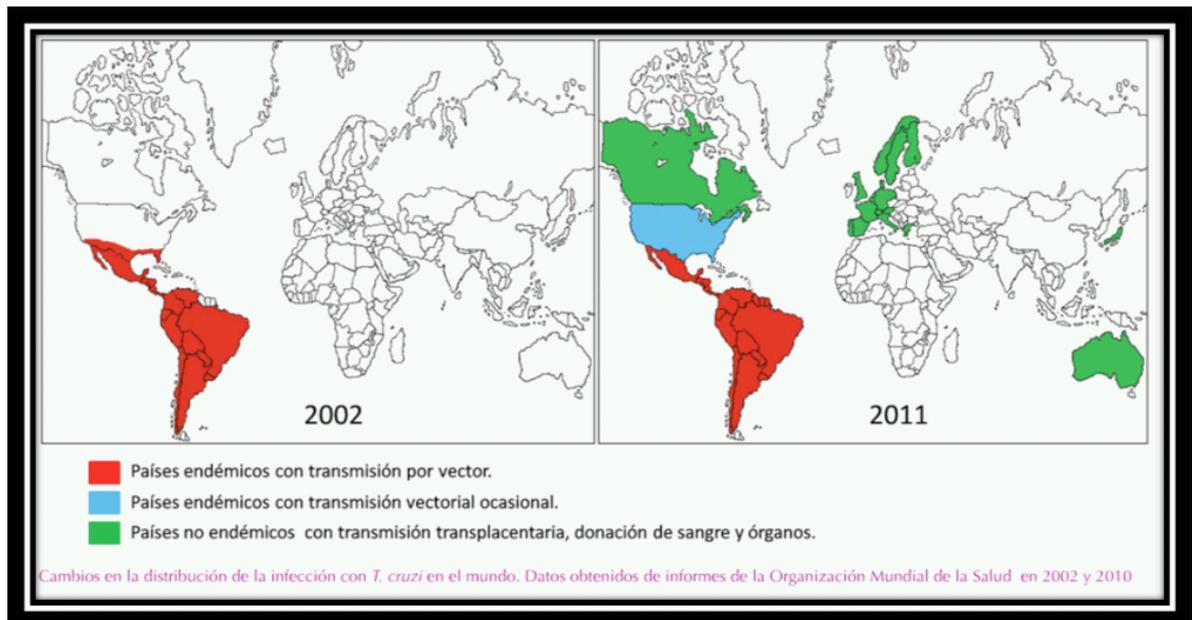


Figura 1. Distribución geográfica de *Trypanosoma cruzi*. Indicando países endémicos con transmisión por el vector, entre los cuales se encuentra Venezuela.

El principal mecanismo de transmisión es vectorial, por hemípteros de la Subfamilia Triatominae (con alimentación hematófaga), los cuales pueden infectar al humano sano de quien se alimentan al depositar sus heces infectadas en heridas de la piel o sobre mucosas. Otras modalidades de transmisión son mediante transfusiones, congénitas, trasplantes de órganos, transmisión oral y en menor escala accidentes de laboratorio. Se estima que a nivel mundial cerca de 100 millones de personas están en riesgo de infectarse, unos 8 a 12 millones están infectadas, con 56.000 nuevos casos anuales por todas las formas de transmisión, motivando 12.000 muertes anuales (OMS., 2016).

En Venezuela se estiman unas 700 muertes anuales a causa de esta enfermedad, de las cuales aproximadamente un 90 % ocurren durante la fase crónica (Rísquez., 2009). En la figura 2, se observa un mapa de la distribución en Latinoamérica de los distintos vectores transmisores de esta enfermedad.



Figura 2. Distribución geográfica de los principales vectores causantes de la enfermedad de Chagas. Incluyendo Venezuela. Destacando principalmente en Venezuela el vector *Rhodnius prolixus*. (Tomadode:http://4.bp.blogspot.com/8_qBj1kbbD0/UyMrdfo9hGI/AAAAAAAAAB9g/Md2UOkN1Wml/s1600/Pples.jpg).

Se conocen cerca de 140 especies de triatomos y 22 de ellas se encuentran en Venezuela, siendo las de mayor tasa de transmisión, *Rhodnius prolixus* principalmente en America Central y *Tryatoma infestans* responsable del 85 % de los casos en Suramérica. (Soto, 2009).

Carrasco y col., en el 2012, reporta la distribución de las diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* presentes en Venezuela tanto para hospedadores mamíferos como para los diferentes vectores encontrados en el territorio nacional. Reportando el número de casos para cada uno de ellas en algunos de los estados del país, destacando para el vector *Rhodnius prolixus* estados como Mérida y Barinas, con el mayor número de casos, aunque presente con focos activos en 5 estados mas del país y para *Panstrongylus geniculatus* 170 casos entre el estado Mérida y Miranda.

La enfermedad de Chagas, clínicamente puede dividirse en 3 fases que varían en los síntomas presentes en el paciente. La fase aguda, inicia con la entrada del parásito a las células huesped y tiene una duración aproximada de 2 a 4 meses, en algunos casos se

presentan síntomas como signo de Romaña (inflamación de uno de los párpados), fiebre, dolor de cabeza, palidez, dolores musculares, taquicardia, inflamación de los ganglios linfáticos, dificultad respiratoria y dolor abdominal o torácico, entre otros. La mortalidad durante esta fase es relativamente baja con un índice entre 5 % y 10 % en los pacientes sintomáticos. Después de esta fase las manifestaciones clínicas mencionadas desaparecen y el paciente entra en la fase crónica de la enfermedad, durante la cual no hay síntomas aparentes de infección, pasando por una fase indeterminada o período de latencia el cual tiene una duración que va de 10 a 30 años. Durante este período, los parásitos permanecen ocultos principalmente en el sistema digestivo o el músculo cardíaco. Posterior a este período entre el 30 % y 40 % de los pacientes infectados presentan fallas en órganos como el corazón produciendo la típica cardiomiopatía chagásica, con la destrucción del músculo cardíaco y sus inervaciones, que lleva a la muerte de dichos pacientes (Prata., 2001).

En Venezuela, el Ministerio de la Salud estableció un programa nacional de control de la enfermedad de Chagas en el año 1966, en el que se incluía el control del vector y de la sangre para transfusión. La aplicación de este programa logró la reducción del área endémica de 750.000 Km² a 360.000 Km², mientras que la seroprevalencia de la enfermedad en poblaciones rurales disminuyó de 44.5 % a 9.2 % (Ache y Matos., 2001). Sin embargo, según reportaron Añez y col. en el 2004, se produjo un repunte de la enfermedad de Chagas en Venezuela, reportándose un incremento en el número de casos incluso en regiones no catalogadas como endémicas de la enfermedad (Añez y col., 2004).

Recientemente se reportó un brote de enfermedad de Chagas agudo debido a la transmisión oral de *T. cruzi*, después de consumir alimentos contaminados con las heces del vector que contiene las formas tripomastigotes del parásito, forma infectante para el humano (Prata., 2001). En el 2010, se presentó un brote en Caracas, donde se reportaron 120 casos de infección por el consumo de jugo de guayaba contaminado con el parásito, en

una escuela del Municipio Chacao, entre estos casos 44 de ellos fueron niños y uno de ellos falleció (Alarcon., 2010).

1.1 Ciclo de Vida de *Trypanosoma cruzi*

Los tripanosomatidios patógenos para humanos desarrollan durante su ciclo de vida diferentes estadios morfológicos y funcionales que les favorecen en los diversos ambientes en que se encuentran, como son su hospedador vertebrado o el insecto vector.

Trypanosoma cruzi es un protozooario digenético, que alterna su ciclo de vida entre dos hospedadores en los cuales se desarrollan formas definidas y diferentes del parásito: un invertebrado, insectos triatomíneos (Chipo), donde se desarrollan las formas extracelulares epimastigotes (de 20-40 μm de longitud) y tripomastigotes metacíclicos (20 μm de longitud) y un hospedador vertebrado, donde se encuentran los morfotipos tripomastigote sanguíneo (13 μm de longitud) y amastigote intracelular (de aproximadamente 3 μm de longitud) (Navarro y col., 2003). Se sabe que *T. cruzi* es capaz de invadir una diversidad de células de mamíferos, cardíacas, del sistema nervioso central y del músculo esquelético (Marino y col., 2003). Se conocen tres fases durante el proceso de interacción de *T. cruzi* con una célula huésped: 1) la adhesión y reconocimiento, 2) la señalización y 3) la invasión. La adhesión del parásito involucra una gran cantidad de moléculas y receptores tanto en la superficie del huésped como en la del parásito, así como moléculas secretadas por éste como cruzipaina (cisteína proteasa) y factores de crecimiento. El conjunto de moléculas involucradas en la adhesión generan en la célula huésped una cascada de señalización que trae como consecuencia un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} , necesario para que ocurra el proceso de invasión. De igual manera, este último proceso requiere la movilización de Ca^{2+} en el parásito (De Souza y col., 2010). Se ha reportado, que dependiendo de la cepa de *T. cruzi* el tiempo de entrada a la célula huésped, el proceso de infección y su replicación dentro de las mismas varía; de esta forma el parásito puede tardar alrededor de 20 minutos para entrar a la célula y

aproximadamente 2 horas en romper la membrana vacuolar. El proceso de diferenciación hacia amastigote puede durar entre 2 y 3 horas y entrar en fase replicativa del ciclo celular, sintetizando ADN entre 24 y 44 horas aproximadamente. El tiempo generacional del amastigote dura entre 8 y 15 horas, pasando aproximadamente por 9 ciclos de replicación por fisión binaria, en un período que transcurre durante 4 a 5 días. Al llenarse la célula, posteriormente se diferencian a tripomastigotes, los cuales rompen la membrana celular y son liberados al exterior, pudiendo así invadir células cercanas o viajar hacia el sistema circulatorio (Araujo, 2000).

Cuando un triatomino infectado por *T. cruzi* se alimenta de sangre, su abdomen se llena y se estimula el reflejo de deyección; en las heces se puede encontrar tanto epimastigotes como tripomastigotes metacíclicos, estos últimos infecciosos para el mamífero (Fig. 3). Cuando las heces son depositadas cerca de una lesión en la piel, el tripomastigote metacíclico parasita a las células de la dermis o termina siendo fagocitado por una célula polimorfonucleada PMN o monocitos que se hayan infiltrado en el tejido. La adhesión del parásito a la célula que va a invadir, es el primer paso del desarrollo en el vertebrado. El mecanismo de invasión va a depender de la célula hospedadora involucrada: macrófagos o células no fagocíticas (Podlipaev., 2000).

Una vez dentro del hospedador mamífero, estos parásitos pueden invadir distintos tipos celulares transformándose en amastigotes. Estos amastigotes se dividen por fisión binaria, transformándose nuevamente a tripomastigotes los cuales se liberan al romperse la membrana celular pudiendo infectar así otras células en la cercanía o ser tomadas nuevamente por un triatomino iniciándose de nuevo el ciclo de vida. Cuando el insecto, conocido en Venezuela como Chipó, pica a un humano infectado adquiere la forma tripomastigote que esta presente en la sangre, ésta una vez dentro del vector se diferencia en epimastigotes en el intestino donde se reproducen por fisión binaria y viajan hacia la prosbosis donde se transforman nuevamente en tripomastigotes metacíclicos, al picar al humano se inicia el ciclo nuevamente (Fig. 3).

citoplasma como en los distintos organelos. El Ca^{2+} puede encontrarse dentro de las células unido a proteínas, fosfatos, polifosfatos, a la membranas, o bien estar acumulado dentro de los distintos organelos intracelulares que como veremos mas adelante participan en la regulación de la homeóstasis de este catión (Docampo y col., 2015).

El Ca^{2+} también es esencial para numerosas funciones celulares en los tripanosomatidios, siendo de gran importancia el mantenimiento de la homeóstasis de Ca^{2+} en los mismos. En organismos eucariotas inferiores, al igual que en mamíferos y células de eucariotas superiores, el calcio juega papeles importantes en distintas funciones y procesos celulares (Benaim., 1996).

El Ca^{2+} está involucrado en el movimiento flagelar en Crithidias (Holwill y McGregor., 1976), en la liberación de glicoproteínas de superficie en *T. brucei* (Bowles y Voorheis., 1982), en los procesos de diferenciación en *L. donovani* (Morrow y col., 1981), en la protección de los amastigotes dentro de los fagolisosomas en *L. major* (Eilam y col., 1985) y juega un papel importante en el proceso de invasión celular en *T. cruzi*, *L. donovani* y *P. falciparum* (Docampo y Moreno., 1996). El Ca^{2+} es también un componente importante de la maquinaria de señalización intracelular ya que regula varias enzimas involucradas en la vía de señalización que involucra al AMPc como segundo mensajero (Walter., 1981; Tellez-Iñon y col., 1985) y activa enzimas involucradas en la vía de señalización del inositolfosfato/diacilglicerol (Docampo y Pignataro., 1991).

Otra evidencia que demuestra la importancia del Ca^{2+} en estos parásitos es la presencia de Calmodulina (CaM) en todos los tripanosomatidios estudiados hasta el presente. Ha sido demostrada la presencia de CaM en *T. brucei* (Ruben y col., 1983), en *T. cruzi* (Benaim y col., 1991), en *L. donovani* (Mazumder y col., 1992), en *L. braziliensis* (Benaim y col., 1987) y en *L. mexicana* (Benaim y col., 1993a). La CaM es un regulador intracelular del Ca^{2+} , apoyando así que este catión juega papeles importantes en estos organismos (Benaim y col., 1993b).

En los tripanosomatidios, una de las variaciones más importantes en el medio ambiente en los cuales transcurre el ciclo de vida del parásito es la concentración de Ca^{2+} . Es importante mencionar en este sentido, que por ejemplo, *T. cruzi* en su estadio extracelular en el torrente sanguíneo humano, se encuentra sometido a concentraciones de Ca^{2+} alrededor de los 2 mM, mientras que en su estadio intracelular esta concentración disminuye a 30-100 nM (Moreno y col., 1991). Sin embargo, la concentración intracelular de Ca^{2+} de los parásitos se mantiene en el rango nanomolar independientemente del estadio en el cual se encuentren.

Ha sido demostrado que cualquier alteración en la homeostasis de Ca^{2+} en estos parásitos puede afectar su viabilidad (Moreno y col., 1991). Así, el efecto tripanocida de ciertas drogas se ha reportado que es actuando sobre las estructuras encargadas de la regulación de Ca^{2+} en estos tripanosomatidios, afectando así la homeóstasis de este catión y de esta forma la vida del parásito (Vercesi y Docampo., 1992, Docampo y col., 1993; Benaim y col., 1993b). Estas evidencias han llevado a que muchos grupos de investigación estén interesados en estudiar las posibles diferencias entre los mecanismos de regulación del Ca^{2+} en parásitos y células hospedadoras, ya que se plantea que los sistemas reguladores de Ca^{2+} podrían ser blancos para el desarrollo de drogas más eficientes contra la enfermedad de Chagas.

1.3 Homeóstasis de Ca^{2+} en los tripanosomatidios

Los tripanosomatidios, presentan un ciclo de vida complejo que involucra varios estadios morfológicos y funcionalmente diferentes. El *T. cruzi* por ejemplo, debe adaptarse a una variedad de condiciones impuestas por el insecto vector y el hospedador mamífero. Mientras el estadio intracelular o amastigote de *T. cruzi* prolifera en un medio donde la concentración de Ca^{2+} libre es del orden submicromolar, los estadios tripomastigotes y epimastigotes proliferan en un medio donde la concentración de Ca^{2+} libre es del orden milimolar. Estos cambios dramáticos en la concentración de Ca^{2+} durante el ciclo de vida del

parásito sugieren que la homeóstasis de Ca^{2+} pudiera ser diferente en las distintas formas de vida del parásito y que ellos deben poseer mecanismos muy eficientes para su regulación durante los distintos estadios y procesos de diferenciación.

Mediante el uso de indicadores fluorescentes de Ca^{2+} , ha sido demostrado que la concentración intracelular de este catión en promastigotes de *L. donovani* está entre 73 y 95 nM (Philosoph y Zilberstein., 1989), en promastigotes de *L. braziliensis* es de 50 nM (Benaim y col., 1990), en las formas sanguíneas de *T. brucei* es de 98 nM (Ruben y col., 1991), en epimastigotes de *T. cruzi* es de 100-200 nM (Vercesi y col., 1991; Oz y col., 1992) y en amastigotes de *T. cruzi* es alrededor de 20 nM (Moreno y col., 1991). Indicando esto, que independientemente del estadio del parásito y de la concentración externa de Ca^{2+} a la cual ellos están sometidos, los tripanosomatidios son capaces de mantener su concentración intracelular de Ca^{2+} en el orden submicromolar.

En los tripanosomatidios existen varios sistemas transportadores de Ca^{2+} encargados de mantener la homeóstasis de este catión (Fig.4).

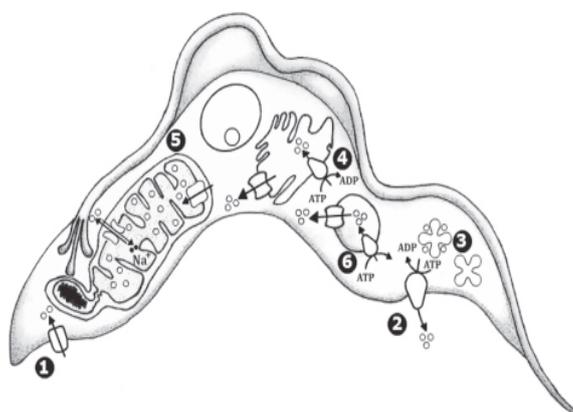


Figura 4. Mecanismos de Regulación de Ca^{2+} en tripanosomatidios. 1) Canal de Ca^{2+} , 2) Bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA), 3) Calmodulina, 4) Bomba de Ca^{2+} del retículo endoplasmático (SERCA), 5) Uniporte de Ca^{2+} mitocondrial y 6) Ca^{2+} -ATPasa de los acidocalcisomas. (Tomado de: Benaim., 1996)

Se ha reportado la presencia de un uniporte electroforético de Ca^{2+} con características similares al mismo sistema reportado en mamíferos (Carafoli., 1988), en el mitocondrion de *T. cruzi* (Docampo y Vercesi., 1989a.b), *T. brucei* (Ruben y col., 1991), *L.*

donovani (Philosoph y Zilberstein., 1989; Vercesi y Docampo., 1992), *L. braziliensis* (Benaim y col., 1990), *L. mexicana*, *L. agamae* y *Crithidia fasciculata* (Vercesi y col., 1990). Investigaciones recientes reportan que este uniporte electroforético de Ca^{2+} en humanos es una proteína de 40 KDa altamente conservada (De Stefani y col., 2011). Este mecanismo de transporte de Ca^{2+} tiene una alta capacidad para acumular el Ca^{2+} pero una muy baja afinidad por este catión (Benaim y col., 1990), lo cual sugiere que éste no puede ser el responsable de mantener los niveles intracelulares de Ca^{2+} en estos parásitos. No obstante, el mitocondrion podría actuar como un reservorio intracelular de Ca^{2+} que permita a los parásitos sobrevivir bajo condiciones limitantes de Ca^{2+} en el exterior celular, por ejemplo, cuando los mismos se encuentran en el estadio intracelular de su ciclo de vida (Benaim., 1996). También ha sido reportada la presencia de una Ca^{2+} -ATPasa sensible a Vanadato en el retículo endoplasmático, la cual presenta características similares a la Ca^{2+} -ATPasa de retículo endo(sarco)plasmático de células de eucariotas superiores (Carafoli., 1988), en *L. donovani* (Philosoph y Zilberstein., 1989; Vercesi y Docampo., 1992), *L. mexicana* y *L. agamae* (Vercesi y col., 1990), en *T. cruzi* (Docampo y Vercesi, 1989a,b) y en *T. brucei* (Nolan y col., 1994) y en *T. evansi* (Mendoza, 2001). Esta Ca^{2+} -ATPasa en el retículo endoplasmático de estos parásitos fue expresada y caracterizada en *T. brucei* (Nolan y col., 1994).

Por otra parte, se ha demostrado la existencia de reservorios intracelulares de Ca^{2+} diferente del retículo y la mitocondria en tripanosomatidios como en *T. brucei* (Vercesi y col., 1994) y *T. cruzi* (Docampo y col., 1995). Estos reservorios de Ca^{2+} están localizados en compartimientos ácidos, por lo que han sido llamados acidocalcisomas. Estos ocupan cerca del 2 % del volumen celular total, son electrondensos y ácidos por lo cual acumulan colorantes diamidínicos como la naranja de acridina. Constituyen reservorios de aminoácidos básicos, ortofosfato, pirofosfato y polifosfato, este último acoplado a cationes como Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} y especialmente Ca^{2+} (Docampo., 2011). Se ha demostrado que dichos acidocalcisomas existen en clones virulentos y no virulentos de *L. mexicana amazonensis* (Hong-Gang y col., 1997), donde se demostró que la virulencia de los

amastigotes de este tripanosomatidio está relacionada a los reservorios de Ca^{2+} intracelulares, a la señal del Ca^{2+} durante el proceso de invasión del parásito y a la expresión de una bomba de Ca^{2+} organelar, la cual se encuentra clonada y secuenciada, sugiriéndose que este reservorio podría tener algún papel importante en la virulencia de este tripanosomatidio. La función de estos organelos ha sido recientemente asociada también a la osmoregulación y a la regulación del pH en *Trypanosoma cruzi* (Ulrich y col., 2010).

Ahora bien, el sistema transportador localizado en la mitocondria de los tripanosomatidios tiene una alta capacidad de almacenar pero una baja afinidad por el Ca^{2+} , regulando así a este catión sólo cuando hay grandes fluctuaciones del mismo. Por otra parte, la Ca^{2+} -ATPasa de retículo endoplasmático de estos parásitos presenta una alta afinidad por el Ca^{2+} pudiendo regular los niveles intracelulares de este catión cuando el Ca^{2+} intracelular es menor de $1 \mu\text{M}$, pero tiene una baja capacidad transportadora limitada por el volumen del organelo. Siendo al igual que en eucariotas superiores, en los tripanosomatidios una Ca^{2+} -ATPasa en la membrana plasmática, la estructura mas importante encargada de la regulación fina a largo plazo del Ca^{2+} .

1.4 La Ca^{2+} -ATP-asa de la membrana plasmática en los tripanosomatidios

La identificación de una Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática en los tripanosomatidios resultó controversial en sus inicios, debido principalmente a la falta de una preparación altamente enriquecida en la membrana plasmática de estos parásitos y además a la presencia en los mismos de una actividad Mg^{2+} -ATPasa muy alta, la cual la mayoría de las veces no permitía observar la actividad Ca^{2+} -ATPasa. Utilizando una metodología que permitía obtener una fracción altamente enriquecida en la membrana plasmática de estos parásitos (Cohen y col., 1986; Urbina y col., 1988), se demostró la existencia de una Ca^{2+} -ATPasa con una alta afinidad por Ca^{2+} , dependiente de Mg^{2+} y estimulable por CaM en la membrana plasmática de *L. braziliensis* (Benaim y Romero.,

1990), *T. cruzi* (Benaim y col., 1991), *Leishmania mexicana* (Benaim y col., 1993a), *T. brucei* (Benaim y col., 1993b) y *T. evansi* (Mendoza, 2001). Siendo así esta estructura, al igual que en las células de eucariotas superiores, la principal encargada del control fino y del mantenimiento de los niveles basales de Ca^{2+} en estos parásitos. Esta bomba pertenece a la familia de las bombas tipo P, cuya característica principal es la formación de un intermediario fosforilado de alta energía durante su ciclo catalítico (Brini y col., 2011).

1.5. Drogas utilizadas actualmente en la enfermedad de Chagas

Como se ha referido en párrafos anteriores, la enfermedad de Chagas causada por el *Trypanosoma cruzi*, afecta de 8 a 12 millones de personas en el continente americano. Se conocen dos fases o etapas de esta enfermedad, catalogadas como fase aguda y fase crónica. La fase aguda consiste en una respuesta rápida del sistema inmune ante la agresión por el parásito y la fase crónica es donde el individuo desarrolla una serie de alteraciones en órganos como intestino, esófago y corazón que van disminuyendo su calidad de vida y generalmente culminan en una muerte súbita producto de alguna de las lesiones.

El tratamiento contra la enfermedad de Chagas se basa en dos drogas principales, el Nifurtimox, un derivado nitrofuránico (Lampit®, Laboratorio Bayer) y el Benznidazol, un derivado nitroimidazólico (Rochagan®, Radani®, Laboratorio Roche) cuyo mecanismos de acción sobre el parásito se basan en inducir estrés oxidativo o reductivo respectivamente. El nifurtimox reduce el grupo nitro de radicales nitroaniónicos, lo cual conlleva a la formación de radicales libres del tipo peróxido de hidrógeno o superóxidos; así como acelerando la producción de metabolitos electrofílicos e incrementando el consumo de oxígeno en *T. cruzi*. Mientras que el benznidazol inhibe la enzima fumarato reductasa del parásito (Turrens y col., 1996) y los metabolitos resultantes de la reducción de este compuesto producen una serie de efectos deletéreos en el parásito vía interacciones covalentes (Docampo, 1990), incluyendo daño al ADN y agotamiento de tioles (Kryshchyshyn y col., 2014). Sin embargo, ambas drogas presentan efectos tóxicos colaterales como vómitos, anorexia, polineuropatías

periféricas y alergias dermopáticas, por lo que los tratamientos tienden a ser abandonados por los pacientes.

El Nifurtimox y el Benznidazol son utilizados en la fase aguda de la enfermedad y su efectividad es variable dependiendo de la región, probablemente debido a variaciones de la cepa de los parásitos (Urbina y col., 1996). Esto conlleva a la ausencia de un tratamiento efectivo contra esta enfermedad en su fase crónica (Olivieri y col., 2010).

Aún no existe otra droga que haya sido desarrollada desde la comercialización del nifurtimox y el benznidazol (Coura., 2009), encontrándose que tanto el nifurtimox como el benznidazol tienen muy poco efecto en amastigotes de *Trypanosoma cruzi* (Olivieri y col., 2010), surgiendo así la necesidad de buscar nuevas moléculas activas contra este estadio. Adicionalmente, es importante resaltar que el nifurtimox desde hace algunos años ha sido discontinuado, por lo que el Benznidazol, al cual se le han atribuido menores efectos secundarios y en algunos de los casos estudiados, mayor eficacia que el nifurtimox, se está utilizando en la actualidad como la primera línea de tratamiento contra la enfermedad de Chagas aún no siendo eficiente en la fase crónica de la enfermedad (Bern., 2011). En este sentido, en un estudio reciente, donde se le administró Benznidazol durante 80 días a 2854 pacientes con cardiomiopatía chagásica y se realizó en éstos un seguimiento del curso de la enfermedad durante 5 años, se reportó que si bien la parasitemia disminuye en el tiempo no hay ninguna mejoría en la cardiomiopatía característica de la enfermedad (Morillo y col., 2015).

1.6 Drogas que afectan la homeóstasis de Ca^{2+} en *Trypanosoma cruzi*

El hecho que una perturbación en la homeóstasis de Ca^{2+} conduce a la muerte celular de los tripanosomatidios (Shanne y col., 1979; Orrenius y col., 1989) ha llevado a que los investigadores se interesaran en buscar drogas que actuaran sobre los mecanismos encargados de mantener la homeóstasis de este catión y de esta forma poder utilizarlas para el control y tratamiento de las enfermedades causadas por estos parásitos.

Se ha demostrado que la Pentamidina, una droga catiónica muy utilizada para la terapia y profilaxis de la tripanosomiasis africana y la leishmaniasis, inhibe la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de *T. brucei* afectando el transporte de Ca^{2+} de vesículas de membrana plasmática de estos parásitos (Benaim y col., 1993b). Esta droga, no afecta la actividad hidrolítica de ATP ni el transporte de Ca^{2+} de la Ca^{2+} -ATPasa de eritrocitos humanos. La pentamidina debe ser administrada por una ruta parental y causa serios e irreversibles efectos tóxicos (Croft y Coumbs., 2003) siendo el enfoque desviado hacia el uso de compuestos no parentales como los Aminoglicósidos y Aminocidina (Croft y Coumbs., 2003).

El cristal violeta, una droga utilizada en los bancos de sangre de zonas endémicas para evitar la transmisión a través de transfusiones de la enfermedad de Chagas, inhibe la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática y el transporte de Calcio en la mitocondria de *T. cruzi* sin afectar la misma enzima en humanos (Docampo y col., 1993).

Por otra parte, la amiodarona, un fármaco ampliamente usado en la restauración y el mantenimiento del ritmo sinusoidal en arritmias fibrilares, utilizada también en el tratamiento de miocardiopatías chagásicas, donde se conoce que bloquea los canales de K^+ , Na^+ y Ca^{2+} (Benaim y Paniz., 2012), se ha demostrado que tiene una amplia actividad fungicida, al abrir un canal de Ca^{2+} , inhibiendo el crecimiento y causando la muerte de los hongos (Courchesne, W., 2002). Se ha reportado también que la amiodarona es capaz de producir la disrupción de la regulación del Ca^{2+} en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, alterando el potencial electroquímico mitocondrial; este efecto también se observó en células VERO infectadas con amastigotes (Benaim y col., 2006). También se ha reportado, que esta droga produce la alcalinización de los acidocalcisomas de *Leishmania mexicana* (Benaim y col., 2014), inhibe la proliferación en *T. cruzi* y *L. mexicana* y es capaz de inhibir la síntesis de ergosterol afectando específicamente a la Oxidoescualeno ciclasa en estos parásitos (Serrano-Martin y col., 2009). La Amiodarona tiene un alto efecto sinérgico con

Posaconazole (Urbina, 2009). Sin embargo, la amiodarona, debido a la presencia de Yodo en su estructura, genera efectos secundarios importantes en el paciente.

La Dronedarona, un derivado de la amiodarona, con menos efectos secundarios ya que en su estructura no posee Yodo, afecta la homeóstasis del Ca^{2+} intracelular, a través de la disipación del potencial electroquímico mitocondrial y de la alcalinización de los acidocalcisomas e inhibe el porcentaje de infección de amastigotes de *L. mexicana* y de *T. cruzi* en las células huésped (Page y col., 2009 y Benaim y col., 2014). Igualmente es capaz de producir un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular de *L. mexicana* proveniente de organelos intracelulares e inhibe la oxidoescualeno ciclasa en este parásito, una enzima clave en la biosíntesis de ergosterol (Benaim y col., 2014).

1.7 Otras Drogas utilizadas en *Trypanosoma cruzi*

Además de la línea de investigación dirigida a la búsqueda de posibles agentes terapéuticos perturbadores de la homeóstasis de Ca^{2+} en los tripanosomatidios, existen en este momento 5 grandes líneas de investigación para el desarrollo de drogas que actúen a través de diferentes mecanismos de acción en estos parásitos como son: Inhibidores de la síntesis de esteroides, Inhibidores de cisteín-proteasas, Inhibidores de la síntesis y metabolismo del tripanotión, Inhibidores del transporte de purinas e Inhibidores del metabolismo del pirofosfato (Urbina, 2005).

Los posibles tratamientos contra la enfermedad de Chagas basados en inhibidores del metabolismo del pirofosfato, se basan principalmente en la presencia de enzimas claves en la actividad del parásito que utilizan como moneda energética al pirofosfato, aparte del ATP. Siendo importante aquí la presencia de los acidocalcisomas, reservorios de pirofosfato presentes en estos parásitos. En este sentido juegan un papel importante los bifosfonatos, análogos no metabolizables del pirofosfato, como posibles candidatos contra la enfermedad de Chagas y otras enfermedades en donde se encuentran involucrados los tripanosomatidios (Urbina y Docampo, 2003).

Los N-alkil-bifosfonatos, inhibidores específicos de la farnesil-difosfato sintetasa (FPPS), ampliamente utilizados en el tratamiento de la osteoporosis, presenta un actividad potente y selectiva *in vivo* e *in vitro* contra *T. cruzi* (Docampo y col., 2001; Garzoni y col., 2004). Sin embargo, no se ha podido lograr la cura parasitológica en modelos murinos infectados con *T. cruzi*. Estos compuestos presentan la ventaja de ser productos aprobados para su uso en humanos. Sin embargo, deben desarrollarse nuevas formulaciones con propiedades farmacocinéticas mas apropiadas para esta enfermedad (Urbina y col., 2005).

Por otra parte, se han utilizado compuestos inhibidores de la síntesis de esteroides, los cuales inhiben la ruta metabólica que produce los ergosteroides y esteroides. Estos esteroides son únicos en los tripanosomatidios y su función no puede ser suplida por el colesterol o fitosterol producido por los eucariotas superiores.

El estudio de los inhibidores de síntesis de esteroides sobre la proliferación de tripanosomatidios comenzó con compuestos derivados de imidazoles, observándose un efecto antiproliferativo importante en amastigotes de *Leishmania tropica* cultivados en macrófagos humanos (Berman., 1981). A partir de allí se comenzó la búsqueda de algún derivado triazol que pudiera detener la proliferación de los parásitos en su forma intracelular de manera inocua para el hospedador y así convertirse en candidato para posibles tratamiento contra las enfermedades producidas por los tripanosomatidios patógenos (Urbina y Docampo., 2003).

Se conoce que los Azoles, agentes antimicrobianos, poseen actividad tripanocida, inhibiendo la síntesis de ergosterol (Docampo R. y Schmunis G.A., 1997). Miconazol y Econazol fueron los primeros en ser probados en *T. cruzi* mostrando una inhibición en el crecimiento de los mismos (Docampo R., 1981). Ketoconazol, inhibe la síntesis de ergosterol en epimastigotes de *T. cruzi* al igual que inhibe la multiplicación intracelular de los parásitos protegiendo a los ratones contra infecciones letales (Urbina y col., 1988; Goad y col., 1989). *In vivo* ketoconazol lleva a la cura parasitológica en los ratones experimentales durante la fase aguda pero éste es inefectivo en la fase crónica de la enfermedad (De Castro.,

1993). Se observó un efecto sinérgico entre Ketoconazol y Beznidazol en algunos ratones infectados (Araujo y col., 2000). Itraconazol y Fluconazol mostraron un efecto similar al Ketoconazol al inhibir la replicación intracelular de los parásitos. Pacientes con cardiomiopatías chagásicas, fueron tratados en un ensayo clínico con 400 mg diarios de Itraconazol, durante 4 meses encontrándose que 53 % de los pacientes tratados se curaron parasitológicamente. En este caso, no se realizó una comparación con la droga de referencia Benznidazol (McCabe y col., 1986; Apt y col., 1998).

El Posaconazol (triazole) inhibe de 30 a 100 veces más la proliferación de epimastigotes y la síntesis de ergosterol que el Ketoconazol, inhibiendo la esterol 14 alfa dimetilasa. En infecciones en ratones este compuesto curó a 50% de los animales infectados con cepas que eran resistentes a Nifurtimox, Benznidazol y Ketoconazol (Molina y col., 2000).

Otro compuesto conocido como UR-9825, derivado de Azoles, mostró ser muy activo contra epimastigotes y amastigotes de *T. cruzi*. Se conoce que este compuesto induce la alteración de los fosfolípidos de este parásito (Urbina y col., 2000).

El Hidroxianisol BHA 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). Se conoce que componentes de la cadena transportadora de electrones son también un blanco de interés ya que existen diferencias entre los citocromos presentes en *T. cruzi* y su homólogo en humanos (Stoppani y col., 1980). Asimismo, se ha reportado que compuestos como la Atovacuona, tiene como blanco los citocromos de la cadena transportadora de electrones mitocondrial de parásitos como Plasmodium y *T. cruzi*. Este compuesto está siendo utilizado actualmente contra la malaria (López., L y col., 2011).

La cruzipaina, constituye la enzima más abundante de la familia de la cisteín-proteasas en *T. cruzi* y está presente en los cuatro estadios de su ciclo de vida. Estas proteasas están involucradas en diversos procesos celulares y presentan funciones esenciales en la supervivencia, diferenciación y crecimiento del parásito. Se han reportado

una gran cantidad de inhibidores de origen peptídico tales como peptidil cetona y azepanona para estas proteasas. Estructuras cíclicas basadas en cetonas han mostrado un efecto inhibiendo cistein proteasas y el crecimiento de parásitos en cultivo (Duschak, 2011).

1. 8 Compuestos derivados de productos naturales utilizados como agentes terapéuticos

Actualmente, dada la cantidad de efectos secundarios de las drogas comerciales hasta ahora conocidas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, la baja efectividad en algunos estadios y la resistencia que se ha generado a ellas, se ha profundizado en la búsqueda de nuevos compuestos, haciendo énfasis en compuestos sintéticos derivados de productos naturales, los cuales pudieran ser utilizados para el tratamiento de estas enfermedades, afectando al parásito y no a las células de su hospedador.

La mayoría de las drogas que lideran la quimioterapia de las infecciones parasitarias son compuestos heterocíclicos, a pesar de su relativa toxicidad y su potente mutagenicidad. Aceites vegetales de plantas aromáticas tropicales han resultado recientemente atractivos como nuevos materiales a utilizar en el tratamiento de enfermedades como la enfermedad de Chagas, debido principalmente a su abundancia en la naturaleza, su fácil extracción y que son ricos en componentes con grupos funcionales activos.

En este sentido, se ha demostrado que compuestos derivados de esponjas marinas como las Agelasinas poseen actividad antimicrobial y tripanocida. La agelasina B posee una gran actividad citotóxica sobre la línea tumoral de cáncer de mama humano MCF-7 (Pimentel y col., 2012). Este compuesto incrementa la concentración de Ca^{2+} intracelular en estas células, inhibiendo la Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplasmático e induciendo apoptosis.

Un gran numero de Alcaloides, como la Apomorfina, han sido probados en

epimastigotes de *T. cruzi*, donde afectaron la proliferación del parásito, asociándose su efecto a la inhibición de la respiración celular (Morello y col., 1994). Distintos Glicoalcaloides fueron también probados en epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi*, encontrándose que la A-chaconina y A-solamargina fueron más efectivos que Ketoconazol (Chataing y col., 1998). El tratamiento de infecciones agudas con Dapholine reduce significativamente la parasitemia en ratones, en comparación con Benznidazol (Fournet y col., 2000).

Compuestos de origen vegetal como el Taxol, obtenido de la conífera *Taxus brevifolia*, ha sido estudiado su efecto en líneas de células tumorales. En base a esto Duschak y col., en el 2007, probaron este compuesto y algunos de sus derivados sintéticos en *Trypanosoma cruzi* encontrándose que poseen un efecto alterando la morfología de este parásito, interrumpen la división nuclear y el proceso de citocinesis (Duschak y Cuoto, 2007). También se conocen los estilbenos, y derivados sintéticos de los mismos, provienen de polifenoles naturales extraídos de aceites de plantas. Estos han sido probados en *Trypanosoma cruzi* encontrándose un efecto similar al Benznidazol en epimastigotes de *T. cruzi* y muy similar al cristal violeta en tripomastigotes de *T. cruzi*. Ambos con respecto a la inhibición de las enzimas que participan en las vías bioquímicas y metabólicas del parásito (Duschak y Cuoto, 2007). De igual forma se conoce que los propóleos, provenientes de la resina de las abejas, y algunos flavonoides muestran un efecto en la proliferación y rutas enzimáticas en las diferentes formas de *Trypanosoma cruzi* (Duschak y Cuoto, 2007). El efecto inhibitorio de derivados de 1,4 naftoquinona solo ha sido observado en la proliferación de *Trypanosoma cruzi* (Duschak y Cuoto, 2007).

Los terpenos, también de origen vegetal, se conoce tiene efecto en algunos parásitos. El carvacrol, proveniente de la planta de orégano, se conoce actúa a nivel de la homeostasis de Calcio en *Saccharomyces cerevisiae* (Rao y col., 2010).

Alcaloides obtenidos de la planta herbácea *Vinca rosea* y algunos de sus derivados sintéticos han mostrado también un efecto inhibitorio en la proliferación de epimastigotes

de *T. cruzi*. Glicoalcaloides, fueron probados en epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi*, mostrando un mayor efecto que ketoconazol, azol que inhibe la síntesis de ergosterol en estos parásitos (Dushack y Cuoto, 2007).

Entre este ultimo grupo de compuestos derivados de aceites vegetales mencionados, algunos alcaloides tienen presente en su estructura química un anillo de benceno unido a un anillo de piridina, estos se denominan como quinolinas (Collado, 2014). Se conoce que éstas poseen actividad antimalarica, antibacterial, antiinflamatoria, antifúngica, antitumoral y antiparasitaria entre otras funciones biológicas. Las quinolinas (Fig. 5), son encontradas en la cocoa, el té negro y en plantas como *Peganum harmala* y *Rubus laciniata*, entre otras.

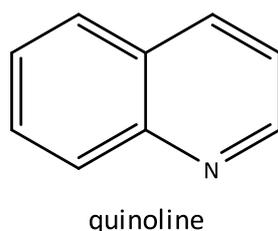


Figura 5. Estructura química de la Quinolina (Tomado de: Kouznetsov y col., 2010)

Diversas moléculas funcionales de quinolina son usadas como potenciales agentes anticancerígenos, entre ellas están la isovalina, valina, indanocina, eugenol y otros análogos que han sido reportados poseen un alto efecto citotóxico en células tumorales. Se conoce que las quinolinas tienen un efecto *in vivo* contra *Leishmania donovani* (Nakayama y col., 2005), concluyéndose que ellas inhiben la GDP-manosa pirofosforilasa, una enzima que produce glicoconjugados ricos en manosa, esenciales para la supervivencia del parásito y para la virulencia del mismo (Lackovic., 2010).

Otra quinolina, la Sitamaquina (8-amino-quinolina) induce alteraciones en la estructura fina de *L. tropica* en macrófagos humanos, observándose un efecto de este compuesto en el colapso del potencial de membrana de la mitocondria de promastigotes de

L. donovani (Vercesi y Docampo., 1992) y promoviendo una rápida alcalinización de los acidocalcisomas en *L. donovani* (Vercesi y col., 2000).

Las quinolinas son obtenidas de brotes florales de clavo y de canela por un proceso de hidrodestilación, donde se obtienen aceites esenciales ricos en eugenol, éste es sometido a un proceso de isomerización para la obtención del isoeugenol (Figura 6). Se ha propuesto que la actividad biológica del isoeugenol se debe a su grupo hidroxilo libre (-OH) y su posición en la cadena (Hyldgaard y col., 2015) y que su acción en organismos está relacionada a su papel protector en plantas, como los demás componentes de los aceites esenciales.

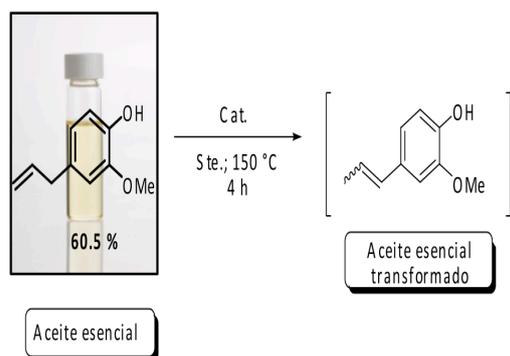
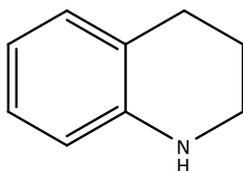


Figura 6. Proceso de Isomerización de Eugenol para la obtención de Isoeugenol.

Si el isoeugenol es sometido a reacciones de cicloadición imino Diels-Alder es posible generar quinolinas sustituidas denominadas tetrahydroquinolinas (Trans 2,4-diaryl-r-3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolinas) y por sustitución de los grupos radicales se sintetizan entonces series o familias de moléculas (Kouznetsov y col., 2010). Se ha reportado que las tetrahydroquinolinas también poseen actividades biológicas como antitumoral (Pimentel, A. 2012), antimalárica (Muñoz y col., 2010), antioxidante (Muñoz y col., 2010), antiinflamatoria (Muñoz y col., 2010), antifúngica (Lei y col., 2016) y antiviral (Bedoya y col., 2010).

En la figura 7, se observa la estructura química de las Tetrahydroquinolinas, sintetizadas a partir del isoeugenol, una molécula natural proveniente del eugenol extraído de plantas de clavos de olor (*Eugenia caryophyllata*) y canela (*Cinnamomum verum*) y actualmente son de gran interés como posibles compuestos a ser exploradas en los tripanosomatidios.



1,2,3,4-tetrahydroquinoline

Figura 7. Estructura de la 1,2,3,4, Tetrahydroquinolinas (Tomado de: Kouznetsov y col., 2010)

Se ha observado que estas modificaciones afectan su actividad citotóxica en células tumorales, encontrándose que las tetrahydroquinolinas sintetizadas tienen una mayor actividad citotóxica que sus precursores Eugenol e Isoeugenol (Kouznetsov y col., 2010). Estos compuestos también tienen una variedad de efectos en protozoarios de distintas especies, como Plasmodium (Gantier y col., 1996) y *Trypanosoma cruzi* (Nakayama y col., 2001), mostrando también actividad antiviral en células infectadas con VIH (Mouscadet y Desmaele., 2010) por lo que podrían ser utilizados en combinación con drogas tripanocidas para prevenir o minimizar el desarrollo de resistencia a las drogas.

2. ANTECEDENTES

Los Eugenoles (eugenol, isoeugenol, dihidroeuogenol y metileugenol) son compuestos sintetizados por algunas especies de plantas tropicales, encontrados en la naturaleza en forma de aceites y extractos vegetales que contribuyen a la interacción entre los insectos y el fruto de las plantas. *Eugenia caryophyllus* (Clavo) y *Cinnamomun verum* (Canela), contienen en su aceite una alta proporción de Eugenol (Merchan., 2007). Estos aceites esenciales se pueden clasificar como quimiotipos definidos gracias a la presencia de componentes fenilpropanos C6-C3. Además de sus características estructurales y la alta cantidad presente en la naturaleza, a nivel químico y farmacéutico se ha observado que la adición de nitrógeno, azufre y oxígeno en el esqueleto de estos compuestos forman nuevas estructuras menos tóxicas que las ya conocidas (Merchan., 2010), en la búsqueda de nuevos compuestos para tratar enfermedades, lo cual ha generado un gran interés industrial en la búsqueda de productos naturales para su aplicación en campos medicinales. Es por eso que las recientes investigaciones están dedicadas al estudio del efecto de estos compuestos en sistemas biológicos como células tumorales y parásitos.

En este sentido, se han reportado varios trabajos donde se utilizaron diferentes derivados de quinolinas en tripanosomatidios. Primaquina, un derivado de aminoquinolinas, se reportó que tiene un efecto sobre la inhibición de la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi* siendo su efecto sinérgico con Ketoconazole, disminuyendo la parasitemia en ratones infectados (De Castro., 1993). Derivados de este compuesto fueron sintetizados y se encontró que inhiben la infección de células LLC-MK2 con tripomastigotes de *T. cruzi* (Chung y col., 1997).

Fournet y col., en 1994, encontraron que quinolinas sustituidas aisladas de la planta *G. longiflora* mostraban actividad anti-leishmanicida *in vivo* en ratones infectados con *L. amazonensis* y *L. venezuelensis* al evaluar el desarrollo de las lesiones producidas por la infección en ratones, durante dos semanas.

En el año 1997, Kinnamon y col., probaron 77 análogos de Primaquina encontrándose que uno de estos análogos reduce la parasitemia en ratones infectados con *T. cruzi* en niveles superiores al observado con primaquina. Resultando ser mucho mas efectiva que la droga de referencia nifurtimox (Kinnamon y col., 1996, 1997).

Posteriormente, Fakhfakh y col. en el 2003, estudiaron cuarenta y nueve quinolinas sustituidas (quinolinas-2-sustituidas, quinolinas-3-sustituidas y 2-alquenilquinolinas) sobre la proliferación *in vitro* de cepas de Leishmania (*L. amazonensis* y *L. infantum*) y Trypanosoma (*T. brucei* y *T. cruzi*) y en células infectadas con el virus del VIH, encontrándose una disminución en la proliferación de *T. cruzi* y una inhibición en la replicación del virus. Uno de los compuestos estudiados, el compuesto 42 (Quinolina sustituida con bromo), mostró tener un mayor efecto en amastigotes de *T. cruzi* (IC₅₀ de 0, 15 µM). Los autores propusieron estos compuestos como posibles agentes que pudieran ser utilizados para tratamientos de coinfección.

Franck y col, en el 2004, evaluaron 18 derivados de quinolinas (quinolinas sustituidas en el carbono 2) sobre la proliferación *in vitro* de *Trypanosoma brucei*, *T. cruzi*, *Leishmania infantum*, *L. Amazonensis* y *Plasmodium falciparum*. Asimismo, evaluaron el efecto de estos compuestos sobre células infectadas con el retrovirus HTLV-1. Encontrando que el compuesto 16 inhibía en un 76 % la replicación del virus a una concentración de 10 µM. Por su parte, el compuesto 18 afectó la proliferación de *T. cruzi* con un IC₅₀ de 0.15 µM menor que el reportado para la droga de referencia nifurtimox (IC₅₀ = 0.45 µM).

Posteriormente Nakayama y col, en el 2005, reportaron un estudio *in vivo* del efecto de las quinolinas 2-sustituidas administradas oralmente en ratones infectados con *Leishmania infantum*, *Leishmania amazonensis* y *Leishmania donovani*. Este grupo trabajó con 9 quinolinas, utilizando como drogas de referencia el glucantime y la miltefosina. Varias de las quinolinas tuvieron un efecto positivo en la reducción de la lesión en la pata del ratón. La quinolina 5 fue la mas activa, mostrando una significativa actividad *in vitro*

contra amastigotes intracelulares de *L. amazonensis*, *L. infantum* y *L. donovani*. En este trabajo se pudo determinar también que para una mayor efectividad, es esencial que el compuesto químico tenga una estructura no saturada, permitiendo así reacciones con posibles blancos. Asimismo, se estableció que la longitud óptima de la cadena alquil no debe exceder de 5 carbonos, para obtener la máxima actividad leishmanicida y que la naturaleza de los grupos químicos en el C2 podrían tener un efecto importante en la actividad leishmanicida *in vitro*.

En el año 2007, Van Voorhis y col., ensayaron el efecto de una serie de compuestos que fueron sintetizados basados en la estructura de las tetrahydroquinolinas, sobre la proteína feniltransferasa en *Plasmodium falciparum*. Estos investigadores encontraron que estos compuestos afectaban la proliferación de parásito *in vitro* e inhibían dicha enzima en el parásito de una manera mas eficiente que en la enzima homóloga de mamíferos. Este grupo reportó que estas tetrahydroquinolinas sustituidas fueron selectivas para el parásito, observándose que tres de los compuestos (17, 18 y 20) a una concentración de 5 nM, inhibían la enzima del parásito un 32%, 80% y 71% respectivamente, en comparación a la inhibición de la misma enzima de humanos que sólo fue del 7 %.

En el mismo año Worthen y col., estudiaron 6 compuestos junto a 6 marcadores genéticos del ciclo celular. Probaron Pentamidina, Prostaglandina D₂ Quercetina, Etoposido, Camptotecina y una tetrahydroquinolina THQ4G, que es un inhibidor de la farnesiltransferasa. Este grupo de investigación encontró que camptotecina, inhibidor de la topoisomerasa I, y quercetina tuvieron un bajo impacto en la viabilidad celular de las formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei*. Etoposido y PD₂ mostraron un efecto sobre la viabilidad celular con un 25% de células capaces de recuperarse luego del tratamiento con los mismos. Para la tetrahydroquinolina THQ4G se observó un efecto en la inhibición de la proliferación celular mientras que con pentamidina el efecto en la inhibición de la proliferación es total y las células quedan inviables luego del tratamiento con la misma. Además PD₂, quercetina y la pentamidina inducen una pérdida del potencial

electroquímico mitocondrial en estos parásitos. Todos los compuestos ensayados fueron ineficientes a bajas concentraciones, mientras que al aumentar la misma se observa una inhibición en la proliferación celular a las 24 horas de tratamiento. Este grupo sugiere que un mayor conocimiento de cómo son los acontecimientos que se inician una vez que estos compuestos entran en contacto con el parásito proporcionaría las herramientas necesarias para el diseño de nuevos fármacos que pudieran ser utilizados en estas enfermedades.

Loiseau y col. en el 2011, trabajaron con una serie de 9 quinolinas y 18 esterilquinolinas, estudiando sus efectos sobre la proliferación de promastigotes y amastigotes de *Leishmania donovani*. Uno de los compuestos estudiados, resultó tener un efecto inhibitorio de la proliferación de promastigotes con un IC_{50} de 1,2 μ M, mostrando ser diez veces más activo que la droga de referencia utilizada (miltefosina) y observándose una baja toxicidad en las células humanas. El sistema utilizado por este grupo, de macrófagos infectados con amastigotes, tiene mucha relevancia ya que representaría la barrera farmacocinética que un compuesto debe pasar para entrar al parásito. Estos investigadores, relacionaron la estructura de los compuestos utilizados y los efectos observados, concluyendo que la introducción de un grupo carboxilo en cualquier posición de la quinolina disminuía su actividad leishmanicida, quizás limitando la interacción entre la membrana del parásito y la droga, o debido a la reacción de estos grupos con componentes del medio de cultivo impidiéndose así la entrada del compuesto al parásito. Asimismo, plantearon que la presencia de un grupo nitro en la posición meta de la quinolina aumentaba su índice de selectividad.

Posteriormente Castillo-Garit J., Kouznetsov V. y col., en el año 2012, realizaron mediante el uso del software Topological Molecular Computer Desing, un screening *in silico* de más de 200 compuestos de Tetrahydroquinolinas sustituidas para seleccionar aquellos con posible actividad tripanocida. Entre estos 18 compuestos orgánicos sintetizados fueron seleccionados para ser evaluados posteriormente en estudios *in vitro*

en epimastigotes de *T. cruzi* y su citotoxicidad en macrófagos de la línea J774. De todos ellos 16 mostraron mas de un 70% de inhibición en la proliferación de epimastigotes a una concentración de 100 ug/ml. Encontraron que CRIS 112, CRIS 140 Y CRIS147 tienen valores de 79,95%, 73,97% y 78,13% respectivamente en la inhibición de la proliferación de epimastigotes además de bajos valores de citotoxicidad con 19,7%, 7, 44% y 20,63% respectivamente. Basados en estos resultados este grupo sugiere al compuesto CRIS 140 como el mejor candidato para el tratamiento contra la enfermedad de Chagas, faltando realizar ensayos con amastigotes de *T. cruzi* para profundizar y complementar estos estudios. Estos autores señalan, al realizar un análisis previo estructura-función, que la hibridación Sp3 en el carbono al cual esta unido el anillo de pirimidina parece tener un mayor efecto en el porcentaje de inhibición de la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* que la hibridación Sp2 comparando los compuestos CRIS 140, CRIS149 y CRIS 153. Finalmente reportan que pese a que ninguno de los compuestos ensayados fue más activo que nifurtimox, estos representan un gran paso en la búsqueda de nuevas drogas para el tratamiento de esta enfermedad.

Romero-Bohórquez y col. en el 2012, probaron diversos productos derivados de tetrahidroquinolinas *in vitro* para determinar su actividad en *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi*, y su citotoxicidad en células VERO, reportando que uno de los compuestos (7h) afectó la proliferación de epimastigotes con un IC₅₀ de 5.77 µM en *T. cruzi* y 0.27 µM en *L. chagasi*. Además este compuesto no mostró ser citotóxico para la línea de células mamíferas y mostro un mayor índice de selectividad que las drogas de referencia.

Rashad y col., en el 2014, estudiaron 26 derivados de la 7- nitro tetrahidroquinolina sobre la proliferación de *Trypanosoma brucei* y su citotoxicidad en la línea celular HEK293, reportando que algunos de estos compuestos inhibían el crecimiento del parásito con una buena selectividad. Encontraron un 80% de actividad tripanocida a la concentración de 10 uM. De esta forma, se reportó que la presencia de un -F en la posición orto de la tetrahidroquinolina así como la adición de grupos metilos,

favorecía su efecto inhibitorio sobre la proliferación celular, mientras que sustituciones con Br o -Cl en posición *para* aumentaban la citotoxicidad en la línea celular HEK293. Este grupo demostró también que al reemplazar el anillo aromático del compuesto con cadenas lineales se eliminaba totalmente el efecto en la inhibición de la proliferación del parásito lo que ratifica la importancia del anillo aromático para el efecto tripanocida de estos compuestos.

Hernández-Chinea y col. en el 2015, estudiaron 7 derivados sintéticos de tetrahydroquinolinas en promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana in vitro*. Todos los compuestos mostraron actividad antiproliferativa en los promastigotes con un efecto dosis-dependiente. Dos de los compuestos (1 y 3) fueron reportados como los mas activos, con un IC_{50} = 1 ug/ml, comparado con las drogas Anfotericina B (IC_{50} =0,036 ug/ml) y Miltefosina (IC_{50} =2,18 ug/ml) seleccionándose para evaluar su efecto en la morfología del promastigote, en el potencial transmembrana mitocondrial y en la capacidad del amastigote de sobrevivir en macrófagos de la línea celular J774. El compuesto 3 induce cambios morfológicos y el colapso total del potencial mitocondrial transmembrana, un marcador de la apoptosis. El compuesto 1 no afecta la morfología pero induce células multinucleadas. Ambos disminuyen la supervivencia del amastigote en los macrófagos, pero debido a que el compuesto 3 presenta un mayor Índice de Selectividad (SI=183 ug/ml comparado a SI= 28 ug/ml del compuesto 1), es un aparente inductor apoptótico e inhibe la replicación intracelular del amastigote que este grupo de investigación sugiere al compuesto 3 como el mejor candidato para ser probado en ensayos *in vivo* y ser sugerido para el desarrollo de nuevas drogas antileishmania. La incorporación de un grupo metil hace al componente 3 más selectivo hacia *Leishmania mexicana*.

Lechuga y col en el año 2016, evaluaron la actividad de una serie de 4 compuestos (1a-1g) de 3 carbonitrina-arilaminoquinolinas en epimastigotes, amastigotes intracelulares y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi in vitro* y sus efectos citotóxicos en células Vero. El compuesto 1g afectó la proliferación tanto de epimastigotes de *T. cruzi* con

un $IC_{50} < 1 \mu M$, como en tripomastigotes con un $IC_{50} = 11.7 \mu M$, en relación a la droga comercial benznidazol que en epimastigotes tuvo un $IC_{50} = 9.5 \mu M$ y en tripomastigotes un $IC_{50} = 12 \mu M$. Sin embargo, en amastigotes el efecto antiproliferativo del compuesto 1g fue menor ($IC_{50} = 6.3 \mu M$) con respecto al benznidazol ($IC_{50} = 2.5 \mu M$). Estos compuestos no mostraron ser citotóxicos en las células hospedadoras.

Las tetrahydroquinolinas han sido una fuente de estudio importante en la búsqueda de nuevas posibles drogas con actividad biológica y farmacológica para el tratamiento de numerosas enfermedades. Por tales motivos, en este trabajo se propone estudiar el efecto de 9 tetrahydroquinolinas sustituidas de la serie DM (DM5, DM6, DM7, DM8, DM9, DM12, DM13, DM15 y DM16) que se observan en la figura 8, que fueron sintetizadas en el Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, Escuela de Química, Universidad de Santander, A.A. 678, Bucaramanga, Colombia por el Dr. Diego Merchán (Merchán, 2007; Kouznetsov y col., 2010) y donadas por el Profesor Francisco Arvelo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores, Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela, sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y el funcionamiento de diferentes sistemas reguladores de Ca^{2+} encargados de mantener la homeóstasis de este catión en el parásito.

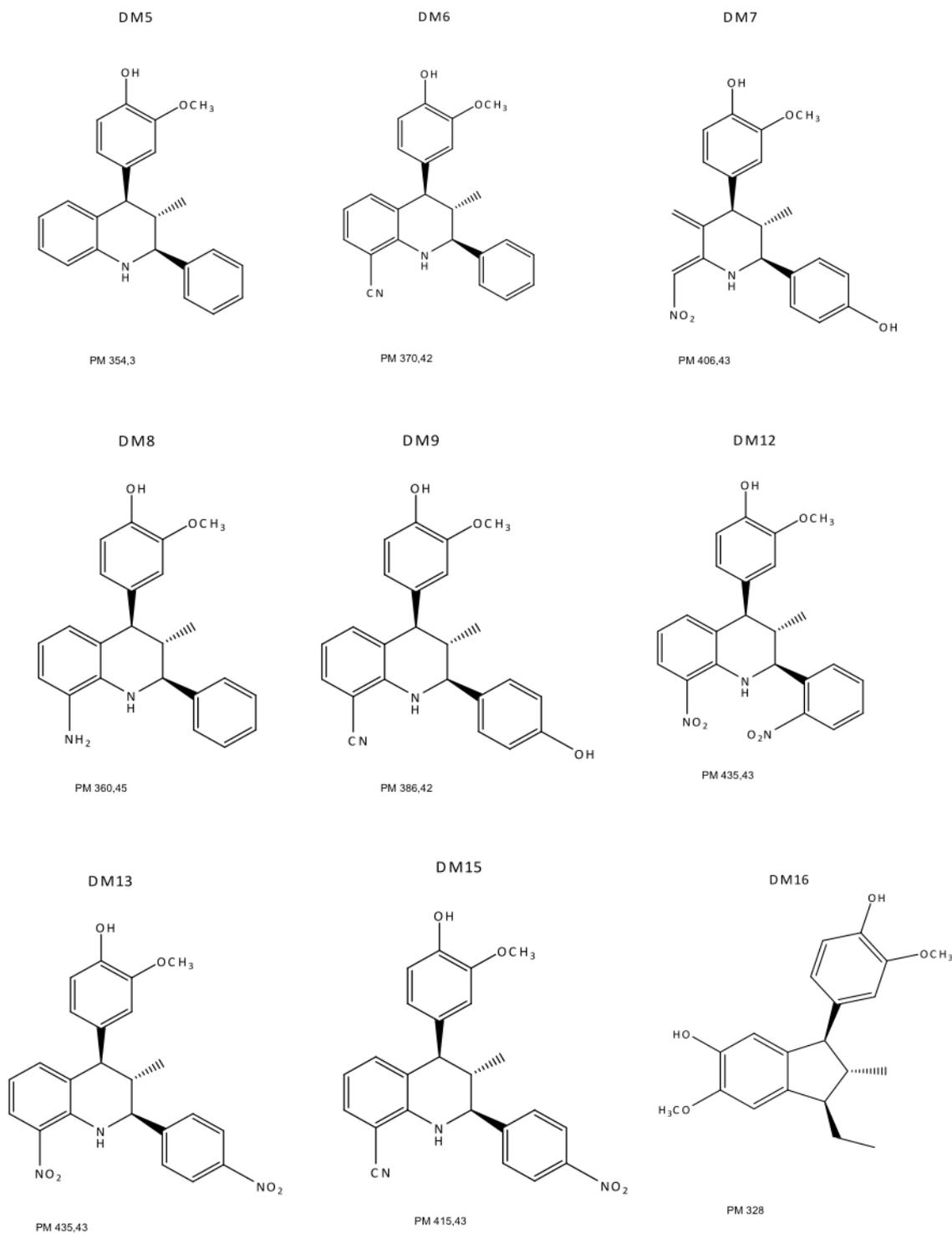


Figura 8. Estructuras de las tetrahidroquinolinas pertenecientes a la serie DM. Para cada uno de los compuestos se indica peso molecular. (Tomado de Kouznetsov y col., 2010).

Ciertos compuestos de la serie DM han sido estudiados por Muñoz y col., en el 2010, quienes evaluaron la citotoxicidad de las trans-2,4-diaril-r-3-metil-1,2,3,4-

tetrahydroquinolinas (DMs) en líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y SKBR3) y su interacción con las drogas gemcitabine y paclitaxel. Seleccionándose dentro de la serie DM, a dos de los compuestos: DM8 y DM12, los cuales inducían individualmente una inhibición en el crecimiento de células tumorales MCF-7 y SKBR3. La adición de paclitaxel y gemcitabine intensificaron la actividad citotóxica de estos compuestos en ambas líneas celulares a concentraciones inferiores a 1 µg/ml. Por otra parte, algunos de los compuestos ensayados por este grupo de investigación se conoce son capaces de liberar el calcio intracelular e inducir la apoptosis específicamente en la línea de cáncer de mama (MCF-7 y SKBr3), cáncer de próstata (PC3) y queratinocitos de ratón (CarC). El compuesto DM12 fue sugerido por los autores como un agente nuevo y seguro para explorar en la terapia contra el cáncer.

Asimismo, Fonseca-Berzal y col. en el 2013, estudiaron el efecto inhibitorio en la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y la citotoxicidad en fibroblastos de un grupo de 22 tetrahydroquinolinas, previamente probadas en *Plasmodium falciparum*, definidas como tetrahydroquinolinas pertenecientes a la serie AR (AR 39-45, AR45F2, AR47, AR89, AR91 y AR92) y DM (DM1, DM5, DM6, DM7, DM8, DM9, DM12, DM13 Y DM15). Desde hace dos décadas, este grupo ha venido trabajando en el diseño y evaluación biológica de nuevas drogas antichagásicas así como también en la quimioterapia contra la malaria. Los estudios realizados con estos compuestos demostraron que el AR40 (SI = 71.11), AR41 (SI = 32), AR91 (SI = 33.37) y DM15 (SI = 48.62), tenían un mayor índice de selectividad (SI) en epimastigotes de *T. cruzi* que la droga de referencial benznidazol (SI > 9.44), mostrando una prometedora actividad tripanocida. Estos compuestos fueron probados en la forma intracelular (amastigotes), mostrando que en este estadio la selectividad era menor que la mostrada con la droga de referencia benznidazol. De estos compuestos, el DM15 fue el único que además de tener una interesante actividad contra *T. cruzi* no mostró efectos tóxicos en fibroblastos. Estos autores propusieron al DM15 y a las Tetrahydroquinolinas AR 39, AR 40, AR 41, AR91

como prototipos potenciales de drogas antichagásicas, fantando experimentos *in vivo* para determinar si estas son capaces de curar las lesiones en ratones.

Por otra parte, al estudiar la relación estructura-función de las diferentes tetrahydroquinolinas sustituidas utilizadas en este trabajo, los autores pudieron determinar que las sustituciones con grupos alquil o metoxi en la posición C-6 aumentaban el índice de selectividad del compuesto mostrando una influencia importante en el efecto tripanocida, mientras que sustituciones con -Cl, grupos aceptores de electrones como el grupo nitro o grupos amino en la estructura de la tetrahydroquinolina, mostraban efectos citotóxicos en fibroblastos. Asimismo, observaron que la presencia de un grupo nitro en un sustituyente fenil aromático, así como la adición de sustituyentes aceptores de electrones como el grupo nitrilo en la molécula, también incrementaba la actividad tripanocida del compuesto. Resultados similares fueron reportados por Pagliero y col. en el 2010, quienes demostraron que la presencia de grupos hidroxilos fenólicos en estos derivados tiene una influencia negativa ya que causan daño a la célula hospedadora.

Las tetrahydroquinolinas sustituidas pertenecientes a la serie DM, fueron probadas previamente por Muñoz y col., en líneas de células tumorales, MCF7 y SKBR3, es de gran importancia destacar acá que este grupo de investigación sugiere al compuesto DM12 como un agente seguro para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama y prostático respectivamente.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo General

Estudiar el efecto de distintas Tetrahydroquinolinas sustituidas sobre la regulación intracelular de Calcio en *Trypanosoma cruzi*.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Estudiar el efecto de nueve tetrahydroquinolinas sustituidas sobre el crecimiento de cultivos de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
- ✓ Seleccionar las tetrahydroquinolinas sustituidas con mayor efecto sobre la proliferación de cultivos de *Trypanosoma cruzi*.
- ✓ Determinar el IC₅₀ de las tetrahydroquinolinas sustituidas con mayor efecto, sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
- ✓ Determinar el efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas seleccionadas sobre la actividad de la Ca²⁺-ATPasa de membrana plasmática de *Trypanosoma cruzi* y la misma enzima de eritrocitos humanos.

4. MATERIALES

4.1 Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron adquiridos con el mayor grado de pureza posible. Los inhibidores de proteasas: inhibidor de tripsina, leupeptina y fenil-metilsulfonyl-fluoruro (PMSF), se obtuvieron a través de Sigma. Los antibióticos y el suero fetal de bovino fueron adquiridos de GIBCO-BRL. El fluoróforo (Fura -2AM), se obtuvo de Molecular Probes.

Las tetrahydroquinolinas sustituidas (DM5, DM6, DM7, DM8, DM9, DM12, DM13, DM15 y DM16) fueron sintetizadas en el Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, Escuela de Química, Universidad de Santander, A.A. 678, Bucaramanga, Colombia (Kouznetsov y col. 2010) y fueron donadas por el Dr. Francisco Arvelo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela. Se prepararon soluciones “stock” de cada compuesto a una concentración de 6 mM disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO), a partir del cual se tomaron alícuotas para obtener las concentraciones a estudiar en los cultivos celulares y ensayos de viabilidad.

El benzimidazol fue donado por el Dr. Xenón Serrano-Martín del Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos del Instituto de Estudios Avanzados (IDEA).

4.2 Material Biológico

Los parásitos que se utilizaron en este trabajo fueron epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (cepa IRHO/BR/63/CL Brenner), donados por la Prof. Juana Vitelli-Flores del Laboratorio de Plásmidos Bacterianos del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela, los cuales se mantuvieron *in vitro* a través de repiques semanales en medio LIT modificado con hemina. La sangre humana fue donada por el

Banco de Sangre del Hospital Clínico Universitario, la Clínica Santa Sofía y la Policlínica Metropolitana de Caracas

5. METODOLOGÍA

5.1 Cultivo de Parásitos:

Se cultivaron epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (cepa IRHO/BR/63/CL Brenner) en un medio LIT modificado el cual contiene: triptosa (15 g/l), extracto de levadura (5 g/l), extracto de hígado (2 g/l), hemina (20 mg/l disuelta en 50% trietanolamina), glucosa (4 g/l), NaCl (9 g/l), KCl (0.4 g/l) y Na₂HPO₄ (7.5 g/l) suplementado con 5 % Suero Fetal de Bovino inactivado a 47°C y 1% Penicilina/Estreptomocina incubándolos a 28 °C y en agitación constante.

5.2 Curva de Proliferación de *Trypanosoma cruzi*:

Partiendo de un cultivo inicial de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en fase exponencial, previamente visualizado en un microscopio de luz Olympus CK40 a 40X para verificar que se encontraran en buenas condiciones y libres de contaminación, se montaron cultivos en értulas estériles de 125 ml, con un número inicial de parásitos de 7 x 10⁶ células/ml en un volumen final de 10 ml de medio LIT suplementado con 5% SFB y 1% Penicilina/Estreptomocina. El número inicial de células del cultivo fue determinado mediante el conteo directo en cámara de Neubauer.

La proliferación celular en las értulas se siguió determinando la turbidez del cultivo, realizando mediciones de transmitancia a una longitud de onda de 560 nm en un Fotocolorímetro Spectronic 20, durante 10 días, y simultáneamente en cada medición se realizó el conteo de células utilizando la cámara de Neubauer. Se relacionó el porcentaje de transmitancia medido con el número de células/ml contadas en el cultivo mediante una regresión lineal, obteniéndose así una tabla donde se relaciona el porcentaje de transmitancia con el número de células/ml a partir de la cual se estableció en los siguientes

experimentos, la relación transmitancia a N° de células/ml. Las curvas de proliferación fueron realizadas por sextuplicado.

5.3 Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM6, DM7, DM8, DM9, DM12, DM13, DM15 y DM16 sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*:

Para determinar el efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, los parásitos fueron cultivados en presencia de cada una de los compuestos (DM5, DM6, DM7, DM8, DM9, DM12, DM13, DM15 y DM16) partiendo de una densidad celular de 7×10^6 cel/ml en 10 ml de medio Lit suplementado con 5% SFB. Las concentraciones ensayadas de cada compuesto fueron 1 μ M, 3 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M y 30 μ M. Se realizaron mediciones de transmitancia a 560 nm en el Fotocolorímetro Spectronic cada 24 horas durante 10 días consecutivos para determinar la proliferación celular, observando los parásitos en el cultivo mediante un microscopio de luz Olympus CK40 a 40x. Los valores de transmitancia fueron relacionados con el número de células/ml según la tabla obtenida en el punto 5.2. Cada experimento fue realizado por sextuplicado.

El efecto de cada una de las tetrahydroquinolinas estudiadas sobre la proliferación del cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* fue comparado con dos controles, uno un cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* crecidos en las mismas condiciones previamente mencionadas en ausencia de droga (crecimiento control) y otro cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* crecido bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente en presencia de 1% DMSO (máxima concentración del vehículo en el cual fueron disueltas las drogas). Adicionalmente, se realizó un control donde los epimastigotes de *T. cruzi* fueron crecidos bajo las mismas condiciones, en presencia de la droga de referencia benznidazol (droga comercial actualmente utilizada para el tratamiento terapéutico de la enfermedad de Chagas y que se ha reportado afecta la proliferación de *T. cruzi*), a las mismas concentraciones utilizadas de las tetrahydroquinolinas estudiadas.

Una vez obtenidos los datos, se generaron las curvas dosis-respuesta para cada compuesto, de las cuales se determinó el valor del IC₅₀ (la concentración del compuesto requerido para inhibir en un 50% la población parasitaria *in vitro*) mediante una regresión no lineal y utilizando el software Prisma Graphpad 5.0 para obtener la función dosis-respuesta de inhibición.

5.4 Obtención de vesículas de membrana plasmática de *Trypanosoma cruzi*

Las vesículas de membrana plasmática de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* se prepararon siguiendo la metodología reportada para el aislamiento de vesículas de *Leishmania mexicana* (Cohen y col., 1986), *T.cruzi* (Urbina y col., 1988) y *Leishmania braziliensis* (Benaim y Romero., 1990) con las modificaciones introducidas por Benaim y col., 1991.

Los parásitos fueron lavados dos veces por centrifugación a 1000 x g durante 10 min y a 4°C con un medio que contenía: 11 mM KCl, 140 mM NaCl y 75 mM Tris-HCl, pH 7.4 y una vez con un medio que contenía: 400 mM manitol, 10 mM KCl, 2mM EDTA, 1mM PMSF (disuelto en 1% DMSO), 0.15 mg/ml inhibidor de tripsina de soya, 10 µg/ml leupeptina y 20 mM Hepes-KOH pH 7.6. Posteriormente el “pellet” de células obtenido fue mezclado con perlas de vidrio de 100-200 µm de diámetro, a una relación 1:4 (peso húmedo de parásitos/peso perlas de vidrio) y las células fueron rotas por abrasión en un mortero a 4°C entre 5-7 minutos. Los parásitos rotos mecánicamente fueron colectados utilizando el mismo buffer anterior y las perlas de vidrio, las células no rotas y restos de gran tamaño se removieron por centrifugación a 1000 x g durante 15 min a 4°C. El sobrenadante obtenido fue sometido a una centrifugación diferencial, primero a 16000 x g durante 30 min a 4°C y luego a 105000 x g durante 1 hora y a 4°C. El “pellet” obtenido fue resuspendido en un medio que contenía: 150 mM KCl, 1 mM DTT, 50 µM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 0.15 mg/ml inhibidor de tripsina de soya, 10 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml E64 y 75 mM Hepes-KOH, pH 6.8. La suspensión resultante fue

homogeneizada pasándola 3 veces a través de un homogeneizador "Dounce AA" inmerso en hielo y guardadas a -70°C hasta su utilización.

5.5 Obtención de Fantasmas de eritrocitos humanos

Los fantasmas de eritrocitos humanos se obtuvieron siguiendo la metodología descrita por Niggli y col., en 1987. Un litro de sangre humana fue lavada 2 veces con un medio isotónico que contenía: 10 mM Tris-HCl (pH=7.4) y 130 mM KCl, centrifugando a 5800 x g durante 10 min y a 4°C. El plasma y los glóbulos blancos se removieron por succión y los eritrocitos resultantes se hemolizaron en 10 volúmenes de una solución hipotónica que contenía: 1 mM EDTA y 10 mM Tris-HCl (pH=7.4), centrifugando 2 veces a 21000 x g a 4°C durante 50 y 40 min respectivamente. Los fantasmas de eritrocitos obtenidos en este paso, fueron lavados con 10 mM Hepes (pH=7.4) centrifugando a 21000 x g durante 40 min y a 4°C, 2 ó 3 veces o hasta eliminar la mayor cantidad de hemoglobina. Finalmente los fantasmas fueron lavados 2 veces con un medio isotónico que contenía: 10 mM Hepes (pH=7.4), 130 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂ y 50 µM CaCl₂ centrifugando bajo las mismas condiciones anteriores. Los fantasmas resultantes fueron resuspendidos en la mínima cantidad posible de la solución isotónica anterior y guardados a -70 °C hasta su utilización.

5.6 Determinación del efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8 y DM12 sobre la actividad de la Ca²⁺-ATP-asa de fantasmas de eritrocitos humanos.

La actividad hidrolítica de la Ca²⁺-ATPasa de fantasmas de eritrocitos humanos se determinó mediante la cuantificación de Pi, siguiendo el procedimiento descrito por Fiske y Subbarow, en 1925, utilizando sulfato ferroso como agente reductor.

Aproximadamente 0.4 mg/ml de fantasmas de eritrocitos humanos se incubaron durante 40 min a 37°C en un volumen final de 250 µl de un buffer que contenía: 10 mM

MgCl₂, 1 mM EGTA, 100 mM KCl, 1 mM ATP, 50 mM Mops-Tris (pH=7.4) y diferentes concentraciones de CaCl₂ que nos permitirá obtener entre 0 y 10 μM Ca²⁺ libre en el medio. La concentración de Ca²⁺ libre fue calculada utilizando un programa computarizado originalmente descrito por Fabiato y Fabiato, en 1979, el cual utiliza un cálculo iterativo (Benaim y col., 1991). La actividad de la Ca²⁺-ATPasa fue determinada en ausencia de las tetrahydroquinolinas (actividad basal o control), en presencia de las diferentes tetrahydroquinolinas seleccionadas (DM5, DM8 y DM12) a una concentración de 30 μM y en presencia de la droga de referencia benznidazol también a una concentración de 30 μM. La reacción se detuvo con 250 μl de ácido tricloroacético (TCA) al 16% v/v y la cantidad de Pi liberado producto de la hidrólisis de ATP por la enzima, fue determinada siguiendo el método de Fiske y Subbarow, 1925. Para ello, se tomaron 200 μl de cada muestra y se le añadieron 700 μl de una solución de molibdato de amonio al 0.57%. Este compuesto, forma ácido fosfomolibdico a partir del fósforo inorgánico presente, el cual se reduce al añadir 100 μl de sulfato ferroso (40% p/v), produciendo un color azul, el cual fué medido a 830 nm, proporcional al contenido de fósforo inorgánico y por lo tanto a la actividad de la enzima. La concentración de Pi se calculó a partir de una curva de calibración obtenida utilizando estándares de Pi de concentraciones conocidas. La actividad fue expresada como μmoles de Pi liberado por minuto por mg de proteína. Todos los resultados corresponden al promedio ± desviación estándar de al menos 6 experimentos independientes.

5.7 Determinación del efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8 y DM12 sobre la actividad de la Ca²⁺-ATP-asa de membrana plasmática de *Trypanosoma cruzi*

La actividad hidrolítica de la Ca²⁺-ATPasa de vesículas de membrana plasmática de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* fue determinada siguiendo el procedimiento descrito por Fiske y Subbarow en 1925, utilizando sulfato ferroso como agente reductor. Aproximadamente 0.5 mg/ml de proteína fueron incubadas durante 40 minutos a 28°C en

un volumen final de 250 μL de un medio que contenía: 50 mM Hepes-KOH (pH=7.4), 200 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 2 mM ATP, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1.8 mM CaCl_2 (10 μM Ca^{2+} libre), 2 mM DTT, 1 μM A23187, 0.5 mM Ouabaina y 4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Oligomicina. La actividad de la Ca^{2+} -ATPasa fue determinada en ausencia de las tetrahydroquinolinas (actividad basal o control), en presencia de las diferentes tetrahydroquinolinas estudiadas (DM5, DM8 y DM12) a concentraciones de 5 μM , 10 μM , 15 μM y 30 μM y en presencia de la droga de referencia benznidazol también a concentraciones de 5 μM , 10 μM , 15 μM y 30 μM .

La reacción se detuvo añadiendo 250 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 16% v/v y se determinó la cantidad de Pi liberado, producto de la hidrólisis de ATP por la bomba, según el método de Fiske & Subbarow, 1925 como fue descrito en la sección anterior. La actividad Ca^{2+} -ATPasa de las vesículas de membrana plasmática de *T. cruzi* fue expresada como la diferencia entre la actividad Mg^{2+} -ATPasa en presencia de EGTA (sin calcio) y la actividad Ca^{2+} -ATPasa en presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} (actividad total). La actividad fue expresada como nmoles de Pi liberado por minuto por mg de proteína. Todos los resultados corresponden al promedio \pm desviación estándar de al menos 6 experimentos independientes.

La significancia estadística entre los resultados se determinó mediante una prueba paramétrica t de Student, donde $p \leq 0,05$ reflejó resultados estadísticamente significativos. Fue utilizado el programa estadístico PAST 3.0.1.

5.8 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada mediante el método de Lowry (Lowry y col., 1951) con las modificaciones introducidas por Bensadoun y Weinstein (1976), para evitar la interferencia por el detergente y el Hepes. Se utilizó albúmina de suero bovino como patrón.

5.9 Determinación del efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8 y DM12, sobre los niveles intracelulares de Ca²⁺ en poblaciones de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Para realizar las mediciones de los niveles de Ca²⁺ intracelular en poblaciones de epimastigotes de *T. cruzi* fue utilizado el indicador fluorescente “radiométrico” Fura-2/AM. El Fura-2 cambia su espectro de absorción o excitación en función de la concentración de Ca²⁺, mientras que la emisión se mantiene invariable, presentando una longitud de emisión a 510 nm y dos longitudes de excitación, a 340 nm cuando se encuentra unido al calcio y a 380 nm cuando está libre de Ca²⁺. Para las mediciones de fluorescencia fue utilizado un espectrofluorímetro HITACHI F-2000 acoplado a un PC (IBM compatible) con un sistema de adquisición de datos. Para realizar las mediciones de Ca²⁺ intracelular, una suspensión de 500 µL (7 x 10⁶ cel/ml) de cultivos de epimastigotes de *T. cruzi*, en fase exponencial y previamente visualizados al microscopio para asegurarnos de la viabilidad y óptima condición del parásito, fueron cargados con Fura-2AM siguiendo el método propuesto por Mendoza y col., en el 2001. Para ello, los parásitos fueron lavados dos veces con solución PBS-G (57 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, 43.8 mM NaCl y 1% Glucosa), e incubados en esta misma solución con 6 µM Fura 2/AM, en presencia de 0.1% ácido plurónico y 2.4 µM probenecid para aumentar la eficiencia de acumulación del Fura-2 en el citoplasma, durante 3 horas a 29°C, agitación suave y oscuridad.

Las determinaciones de los niveles de Ca²⁺ intracelular fueron realizadas en presencia o en ausencia de Ca²⁺ extracelular. Para la determinación en presencia de Ca²⁺ extracelular, los parásitos cargados con Fura 2/AM, fueron lavados una vez con 500 µL de PBS-G y luego con 500 µL de solución Tyrode Ca²⁺ (145 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 10 mM Hepes, 11 mM Glucosa). Posteriormente fueron resuspendidos en 500 µL de este último medio y colocados en una cubeta de cuarzo de 1 ml de capacidad y 4 mm de diámetro. La cubeta fue colocada dentro de un sistema de láminas acopladas a un baño termocontrolado donde se mantuvo la temperatura en 29°C. El sistema tenía acoplado un dispositivo para agitación constante, a través de un minimagneto, garantizando así que los

parásitos no sedimentaran y los reactivos añadidos se distribuyeran homogéneamente. Para la determinación en ausencia de Ca^{2+} extracelular se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente utilizando en la cubeta una solución Tyrode sin Ca^{2+} en presencia de 8 mM EGTA. Utilizando este procedimiento experimental se pudo determinar los niveles intracelulares basales de Ca^{2+} en epimastigotes de *T. cruzi* y evaluar el efecto de las tetrahydroquinolinas DM5, DM8 y DM12 y de la droga de referencia benznidazol sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en estos parásitos. Las concentraciones utilizadas de estos compuestos fueron las correspondientes al IC_{50} estimado para cada compuesto. Todos los compuestos ensayados fueron añadidos utilizando una jeringa Hamilton, en los puntos señalados con la flecha en cada gráfico, a partir de soluciones concentradas para no afectar el volumen final en la cubeta. Para conocer la concentración intracelular de Ca^{2+} fue necesario calibrar el sistema, para ello se utilizó el método de Grynkiewicz y col. (1985), aplicando la siguiente ecuación:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times (R - R_{\min} / R_{\max} - R) / F_{\min}(380) / F_{\max}(380)$$

Donde el K_d es la constante de disociación del Fura-2 (224 nM), R es la relación de fluorescencia de excitación a 340/380 nm, R_{\min} es la relación de fluorescencia de excitación 340/380 nm en ausencia de Ca^{2+} (en presencia de EGTA 8 mM), R_{\max} es la relación de fluorescencia de excitación a 340/380 nm a concentraciones saturantes de Ca^{2+} (en presencia de digitonina 30 μM), F_{\min} es la fluorescencia del Fura-2 cuando es excitado a 380 nm, en ausencia de Ca^{2+} y F_{\max} es la fluorescencia de Fura-2 cuando es excitado a 380 nm a concentraciones de Ca^{2+} saturantes.

6. RESULTADOS

6.1 Curva de Crecimiento de *Trypanosoma cruzi*

Con la finalidad de estandarizar los cultivos *in vitro* de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, lo cual es esencial para estudios donde se desee analizar los efectos de compuestos que pudieran afectar su viabilidad, para la posterior determinación del efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas sobre la proliferación de estos parásitos, se realizaron curvas de crecimiento de este tripanosomatidio durante 10 días. Para ello, se inició la curva con una población de parásitos de 5×10^6 cel/ml inoculados a partir de un cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial, previamente observado al microscopio óptico para garantizar que los parásitos se encontraban en buenas condiciones y libres de contaminación. La proliferación fue seguida determinando la turbidez del cultivo, mediante mediciones de transmitancia a una longitud de onda de 560 nm en un fotocolorímetro, cada 24 horas durante 10 días, realizando adicionalmente en cada medición un conteo directo de los parásitos en la cámara de Neubauer. Los valores obtenidos fueron relacionados en una curva exponencial y utilizando la ecuación de la recta se obtuvo una tabla en donde se relacionaba directamente la transmitancia con la densidad poblacional (resultados no mostrados). A partir de esta tabla, se estableció la población de parásitos en los cultivos para los experimentos sucesivos.

Como se observa en la figura 9, la proliferación del parásito se evidencia como un aumento en el número de células/ml en el tiempo, observándose una fase exponencial a partir de las 100 horas y alcanzándose la fase estacionaria a los diez días. Esta curva es de gran importancia ya que permitió conocer el comportamiento de *T. cruzi* bajo nuestras condiciones de cultivo y establecer el período donde el parásito se encuentra creciendo de manera exponencial, fase durante la cual éstos presentan una mayor actividad metabólica y

de reproducción. A partir de un cultivo en fase exponencial, fueron obtenidos los parásitos para los ensayos con las tetrahydroquinolinas sustituidas a estudiar y los cálculos de IC₅₀.

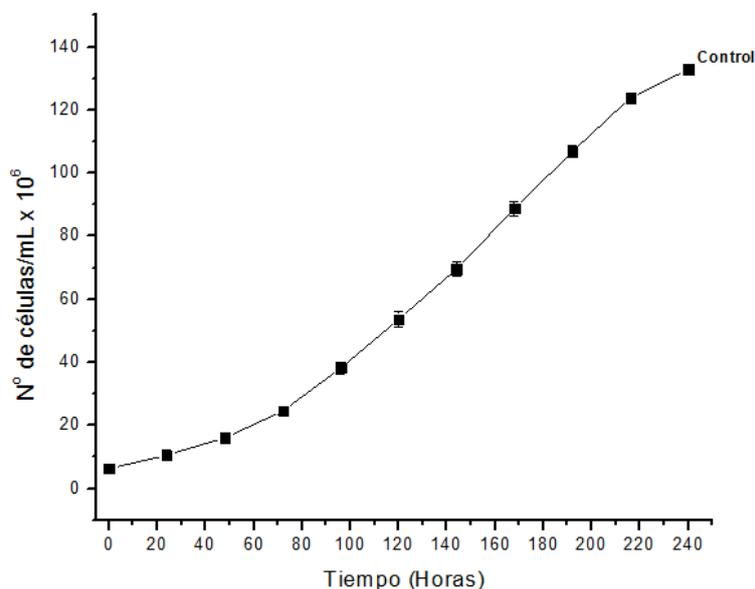


Figura 9. Curva de crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. El cultivo se inició partiendo de una población de 5×10^6 cel/ml, y se evaluó la proliferación celular cada 24 horas durante un total de 240 horas (10 días). Se observa el aumento en el número de células/ml en función del tiempo. Cada punto observado en la gráfica corresponde al promedio y su desviación estándar correspondiente a seis experimentos independientes.

6.2 Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM6, DM7, DM8, DM9, DM12, DM13, DM15 y DM16 sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Con la finalidad de estudiar el efecto de las 9 tetrahydroquinolinas sustituidas de la serie DM (DM5, DM6, DM7, DM8, DM9, DM12, DM13, DM15 y DM16), sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* y seleccionar aquellos compuestos que mostraran un mayor efecto, se realizaron cultivos independientes en értulas, partiendo de una densidad poblacional de 5×10^6 cel/ml de epimastigotes de *T. cruzi*, en presencia de las distintas tetrahydroquinolinas a una concentración de $30 \mu\text{M}$ (Fig. 10), siguiendo la proliferación del parásito durante 10 días. Adicionalmente, se realizaron tres controles: 1) Un cultivo

donde se siguió la proliferación de *T. cruzi* en ausencia de tetrahydroquinolinas (crecimiento control, Fig. 10), 2) Un cultivo donde se siguió la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi* en presencia de 30 μM de benznidazol y 3) un control donde se siguió la proliferación de *T. cruzi* en presencia de la máxima concentración de DMSO (1%) utilizada como vehículo para disolver las tetrahydroquinolinas sustituidas.

Como puede observarse en la figura 10, todas las tetrahydroquinolinas sustituidas ensayadas y el benznidazol tuvieron un efecto inhibitorio sobre la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi* con respecto al crecimiento control, a una concentración de 30 μM . Es importante resaltar que el DMSO a una concentración de 1% no afectó la proliferación de parásitos con respecto al crecimiento control en ausencia de los compuestos (Ver Fig. 10), demostrando que el efecto inhibitorio de la proliferación de *T. cruzi* observado con las distintas tetrahydroquinolinas sustituidas fue debido a la acción de los compuestos y no a algún efecto ocasionado por el DMSO utilizado como vehículo para disolver los mismos.

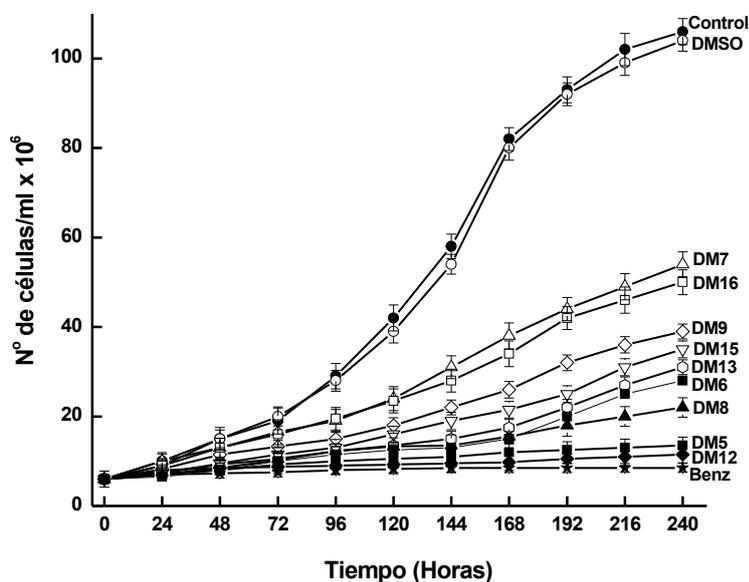


Figura 10. Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*. Los cultivos se iniciaron a partir de una población de 5×10^6 cél/ml y la proliferación fue seguida cada 24 horas durante 10 días, en ausencia (Control), en presencia de 30 μM de cada una de las tetrahydroquinolinas estudiadas, en presencia de 30 μM benznidazol y en presencia de 1% DMSO. Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (\pm) la desviación estándar de seis experimentos independientes.

De los resultados obtenidos se pueden resaltar la acción de tres de estos compuestos, las tetrahydroquinolinas DM5, DM8 y DM12, las cuales a una concentración de 25 μ M tuvieron un importante efecto inhibitorio sobre la proliferación de epimastigotes de este parásito (Fig. 10), con porcentajes de inhibición de 87,26 %, 79,25 % y 89,15 % respectivamente (Ver tabla 1). La droga de referencia benznidazol a esta concentración inhibió la proliferación de *T. cruzi* en 91,98 % (Tabla 1).

Compuestos (25 μM)	Inhibición de la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> (%)
DM5	87,26 %
DM6	73,58 %
DM7	49,06 %
DM8	79,25 %
DM9	63,21 %
DM12	89,15 %
DM13	71,69 %
DM15	66,98 %
DM16	52,83 %
Benz	91,98 %

Tabla 1. Porcentaje de inhibición de la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* en presencia de las tetrahydroquinolinas ensayadas y de la droga de referencia benznidazol a una concentración de cada compuesto de 25 μ M.

De las nueve tetrahydroquinolinas estudiadas pudimos observar que las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8 y DM12, afectaban la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* en una mayor proporción que el resto de las tetrahydroquinolinas, mostrando una prometedora actividad tripanocida. Estos compuestos mostraron un importante efecto aún cuando fueron ensayados a una menor concentración (15 μ M) (Figura 11).

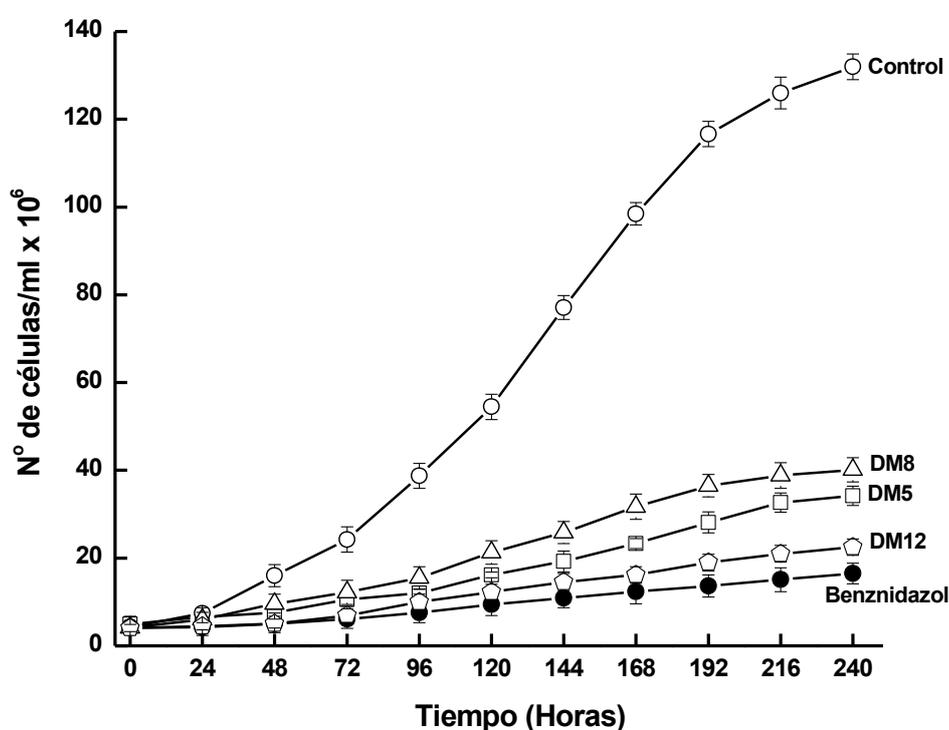


Figura 11. Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas seleccionadas, sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*. El cultivo se inició a partir de una población de 5×10^6 cel/ml y su proliferación fue seguida cada 24 horas durante 10 días, en ausencia (control), en presencia de 15 μ M de cada una de las Tetrahydroquinolinas sustituidas (DM5, DM8 y DM12) y en presencia de 15 μ M benznidazol. Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (\pm) la desviación estándar de seis experimentos independientes.

Como puede observarse en la Fig.11, los compuestos DM5, DM8 y DM12 mostraron un marcado efecto inhibitorio de la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* a una concentración de 15 μ M, observándose un porcentaje de inhibición de 74,10 %, 69,61 % y 82,94 % respectivamente. El benznidazol a esta misma concentración mostró una inhibición de la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* del 87,50 % (Tabla 2).

Compuestos ensayados (15 μM)	Inhibición de la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> (%)
DM5	74,10 %
DM8	69.61 %
DM12	82,94 %
Benznidazol	87.50 %

Tabla 2. Porcentaje de inhibición de la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en presencia de las tetrahydroquinolinas sustituida DM5, DM8 y DM12 y de benznidazol a una concentración de cada compuesto de 15 μ M.

Tomando en cuenta estos resultados, fueron seleccionadas las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8 y DM12 para posteriores estudios donde se evaluaron los efectos dosis-respuesta de estos compuestos sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* con la finalidad de determinar su IC₅₀.

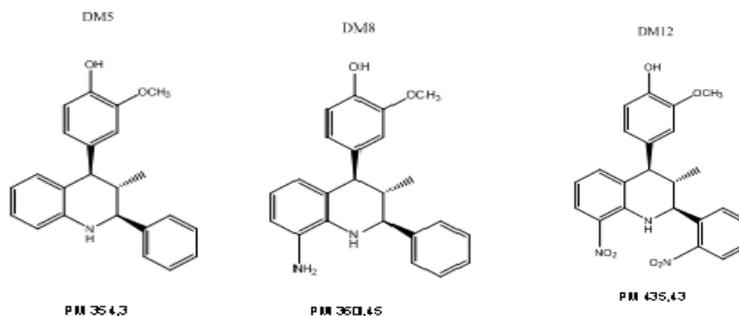


Figura 12. Estructura de las tetrahydroquinolinas sustituidas seleccionadas: DM5, DM8 y DM12.

6.3 Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM5 sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* y la determinación de su IC₅₀.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM5 sobre la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi* y posteriormente determinar su IC₅₀, se realizaron curvas de crecimiento del parásito partiendo de una población inicial de 5×10^6 cel/ml en presencia de diferentes concentraciones del compuesto, manteniendo un grupo control (sin droga). Las concentraciones utilizadas fueron 1 μ M, 3 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M y 30 μ M. Como puede observarse en la figura 12, la tetrahydroquinolina DM5 tuvo un efecto inhibitorio dosis-dependiente sobre la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi*.

El IC₅₀ estimado de la compuesto DM5 fue de $7,059 \pm 0,821 \mu$ M a las 144 horas de crecimiento, tiempo en el cual el cultivo se encontraba en fase exponencial (Ver Fig. 9). Es importante resaltar que con este compuesto se observo cerca del 90% de inhibición de la proliferación celular a una concentración de 30 μ M.

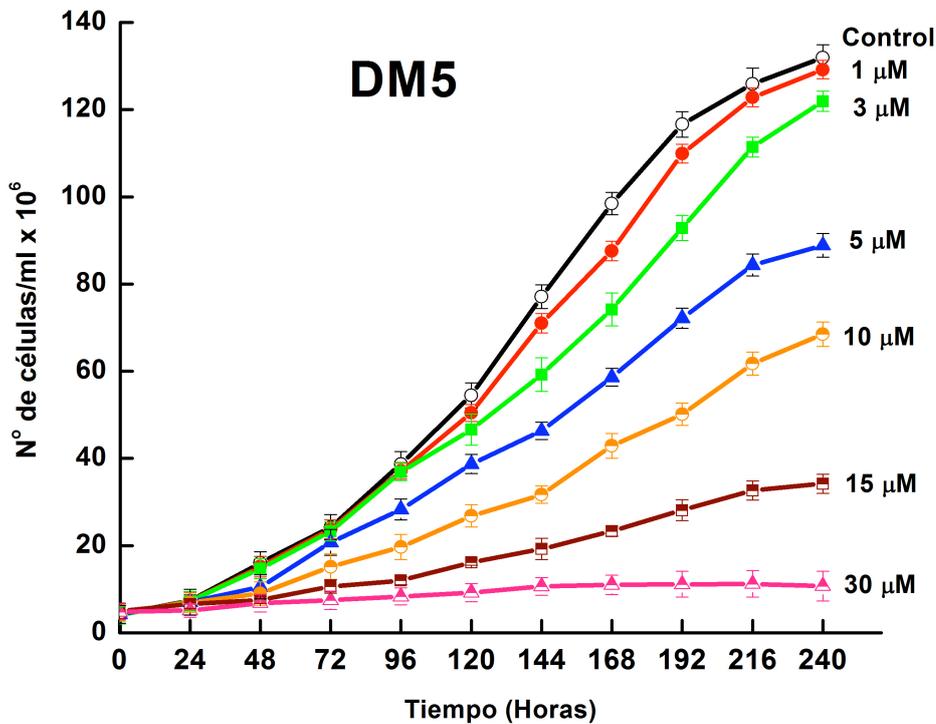


Figura13. Efecto dosis-dependiente de la tetrahydroquinolina sustituida DM5 sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. El cultivo se inició a partir de una población de 5×10^6 cel/ml y su proliferación fue seguida cada 24 horas durante 10 días, en ausencia (control) y en presencia de concentraciones crecientes del compuesto ($1 \mu\text{M}$ a $30 \mu\text{M}$). Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (\pm) la desviación estándar de 6 experimentos independientes.

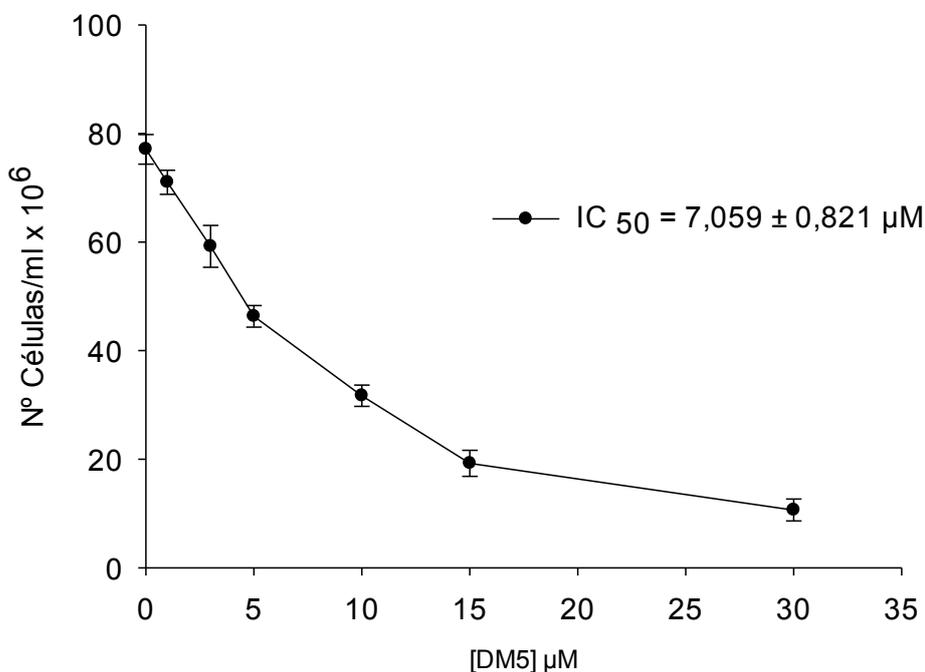


Figura 14. Efecto dosis-respuesta del compuesto DM5 sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* a las 144 horas de incubación con las diferentes concentraciones del compuesto. Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (\pm) la desviación estándar de seis experimentos independientes.

6.4 Efecto de la tetrahidroquinolina sustituida DM8 sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* y la determinación de su IC₅₀.

Con la finalidad de evaluar el efecto del compuesto DM8 sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* y posteriormente determinar su IC₅₀, se realizaron curvas de crecimiento del parásito partiendo de un inoculo inicial de 5×10^6 cel/ml en presencia de diferentes concentraciones de esta tetrahidroquinolina sustituida (1 μ M, 3 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M y 30 μ M) manteniendo un grupo control (sin droga). Los resultados obtenidos demuestran que el DM8 inhibe la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi* de una manera dosis dependiente (Fig. 15).

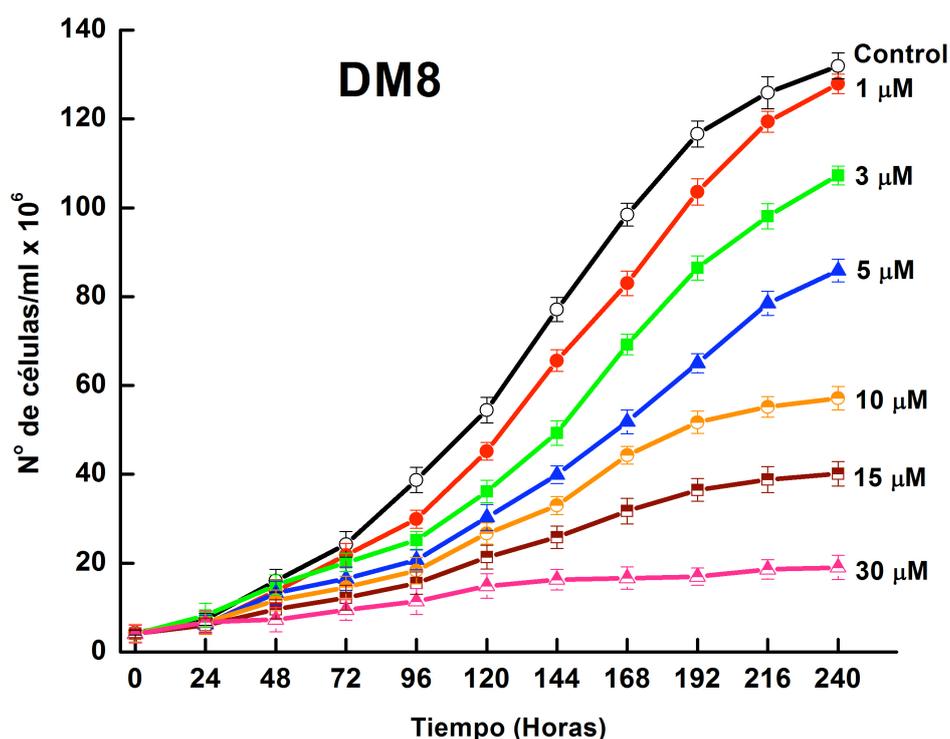


Figura 15. Efecto dosis-dependiente de la tetrahidroquinolina sustituida DM8 sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. El cultivo se inició a partir de una población de 5×10^6 cel/ml y su proliferación fue seguida cada 24 horas durante 10 días, en ausencia (control) y en presencia de concentraciones crecientes del compuesto (1 μ M a 30 μ M). Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (\pm) la desviación estándar de 6 experimentos independientes.

El IC₅₀ estimado de la tetrahydroquinolina sustituida DM8 fue de $5,24 \pm 1,54 \mu\text{M}$ a las 144 horas de crecimiento, tiempo en el cual el cultivo se encontraba en fase exponencial (Ver Fig. 9). Con este compuesto a una concentración de $30 \mu\text{M}$, se observó una inhibición cerca del 80% de la proliferación celular.

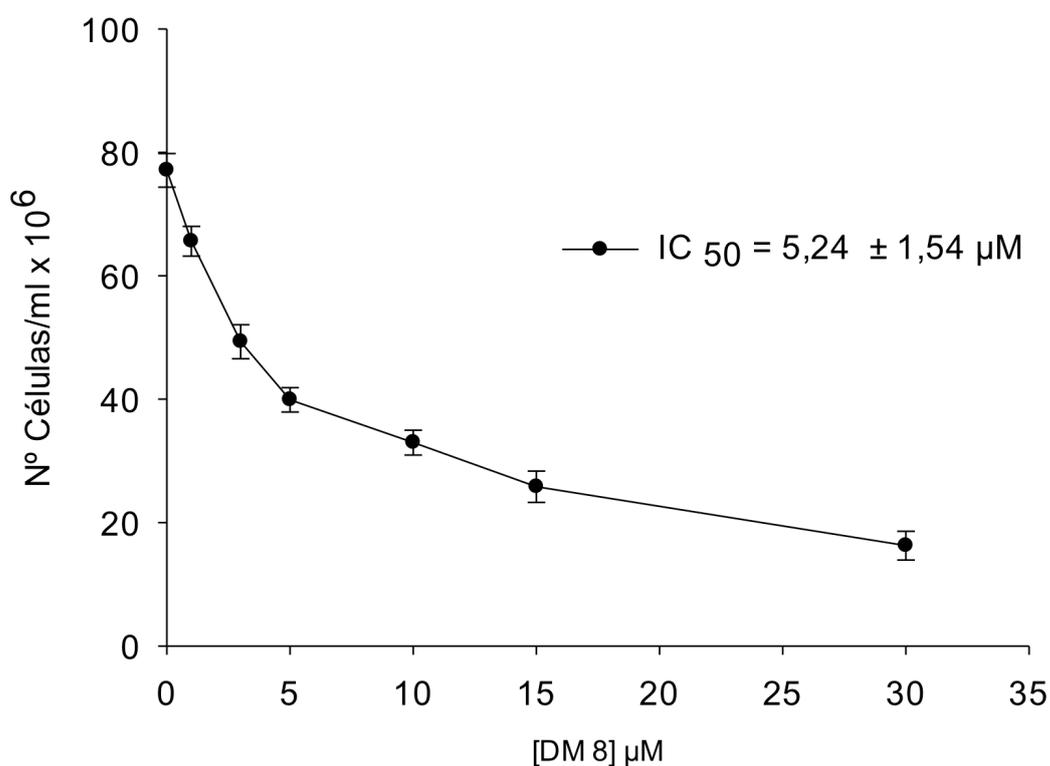


Figura 16. Efecto dosis-respuesta de la tetrahydroquinolina sustituida DM8 sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* a las 144 horas de incubación con las diferentes concentraciones del compuesto. Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (\pm) la desviación estándar de seis experimentos independientes.

6.5 Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM12 sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* y la determinación de su IC₅₀.

Con la finalidad de determinar el efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM12 sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*, se realizó una curva de crecimiento del parásito partiendo de una población inicial de 5×10^6 cel/ml en presencia de diferentes concentraciones del compuesto (1 μ M, 3 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M y 30 μ M) manteniendo un grupo control (sin droga). Los resultados obtenidos demostraron que el DM12 inhibe la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi* de una manera dosis dependiente, ya que al aumentar la concentración de este compuesto, aumenta el efecto inhibitorio sobre la proliferación del parásito (Fig. 17).

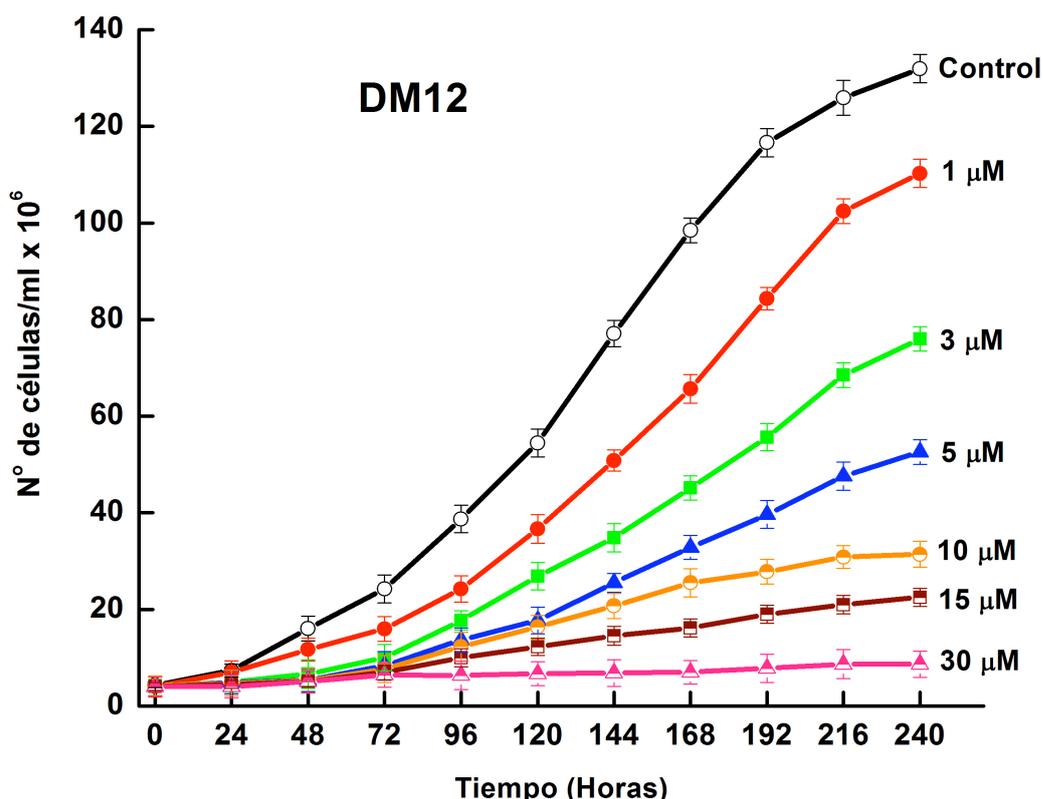


Figura 17. Efecto dosis-dependiente de la tetrahydroquinolina sustituida DM12 sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. El cultivo se inició a partir de una población de 5×10^6 cel/ml y su proliferación fue seguida cada 24 horas durante 10 días, en ausencia (control) y en presencia de concentraciones crecientes del compuesto (1 μ M a 30 μ M). Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (\pm) la desviación estándar de 6 experimentos independientes.

El IC_{50} estimado del compuesto DM12 fue de $2,80 \pm 0,86 \mu M$ (Figura 18) a las 144 horas de crecimiento, tiempo en el cual el cultivo se encontraba en fase exponencial. Es importante resaltar que con este compuesto se observó más del 90% de inhibición de la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* a una concentración de $30 \mu M$.

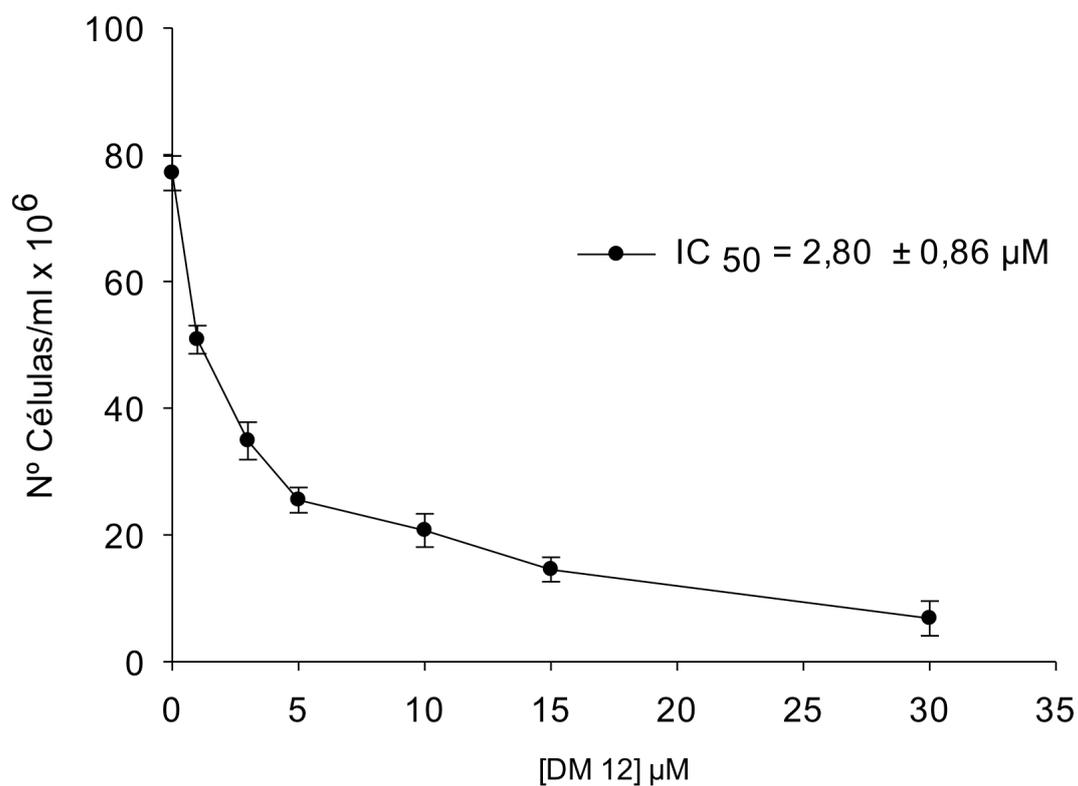


Figura 18. Efecto dosis-respuesta de la tetrahydroquinolina DM12 sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* a las 144 horas de incubación con las diferentes concentraciones del compuesto. Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (\pm) la desviación estándar de seis experimentos independientes.

6.6 Efecto de la droga de referencia benznidazol sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* y la determinación de su IC₅₀.

Con la finalidad de evaluar el efecto del benznidazol, droga de referencia actualmente utilizada en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, sobre la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi* y determinar su IC₅₀, se realizaron curvas de crecimiento partiendo de una población inicial de 5×10^6 cel/ml en presencia de concentraciones crecientes de la droga (1 μ M, 3 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M y 30 μ M) manteniendo un grupo control (sin droga). Los resultados mostraron una inhibición dosis-dependiente de la proliferación celular (Fig. 19).

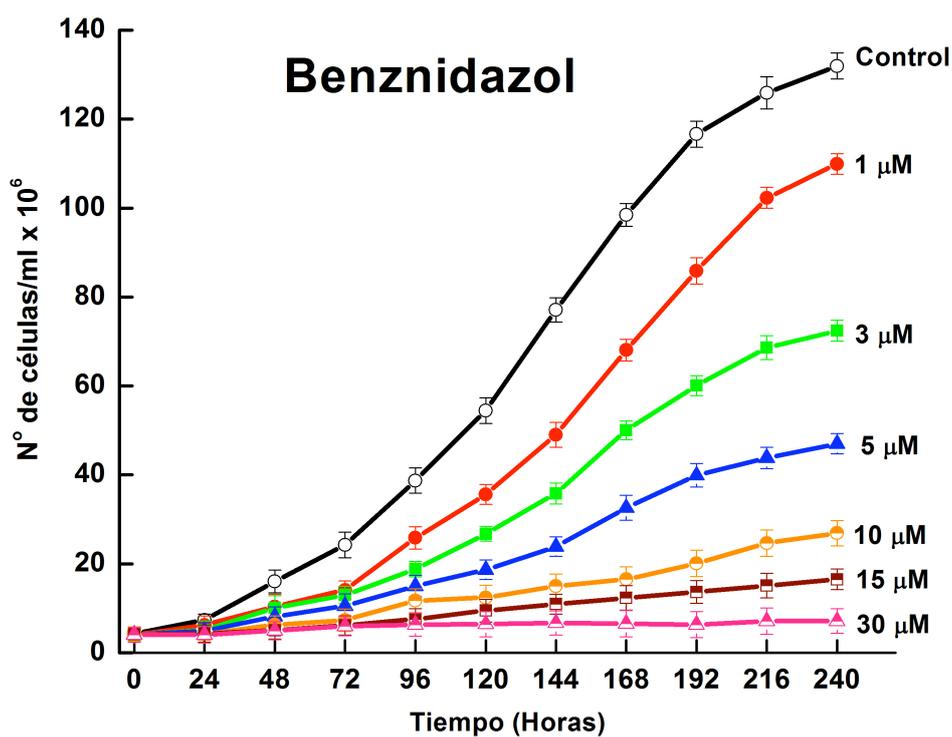


Figura 19. Efecto dosis-dependiente del benznidazol sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. El cultivo se inició a partir de una población de 5×10^6 cel/ml y su proliferación fue seguida cada 24 horas durante 10 días, en ausencia (control) y en presencia de concentraciones crecientes de la droga (1 μ M a 30 μ M). Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (\pm) la desviación estándar de 6 experimentos independientes.

El IC₅₀ estimado del benznidazol fue de $2,395 \pm 0,515 \mu\text{M}$ a las 144 horas de crecimiento, tiempo en el cual el cultivo se encontraba en fase exponencial. Es importante resaltar que con este compuesto se observó cerca del 90% de inhibición de la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*, pero a diferencia de los DMs, este porcentaje se observó a partir de una concentración de $15 \mu\text{M}$.

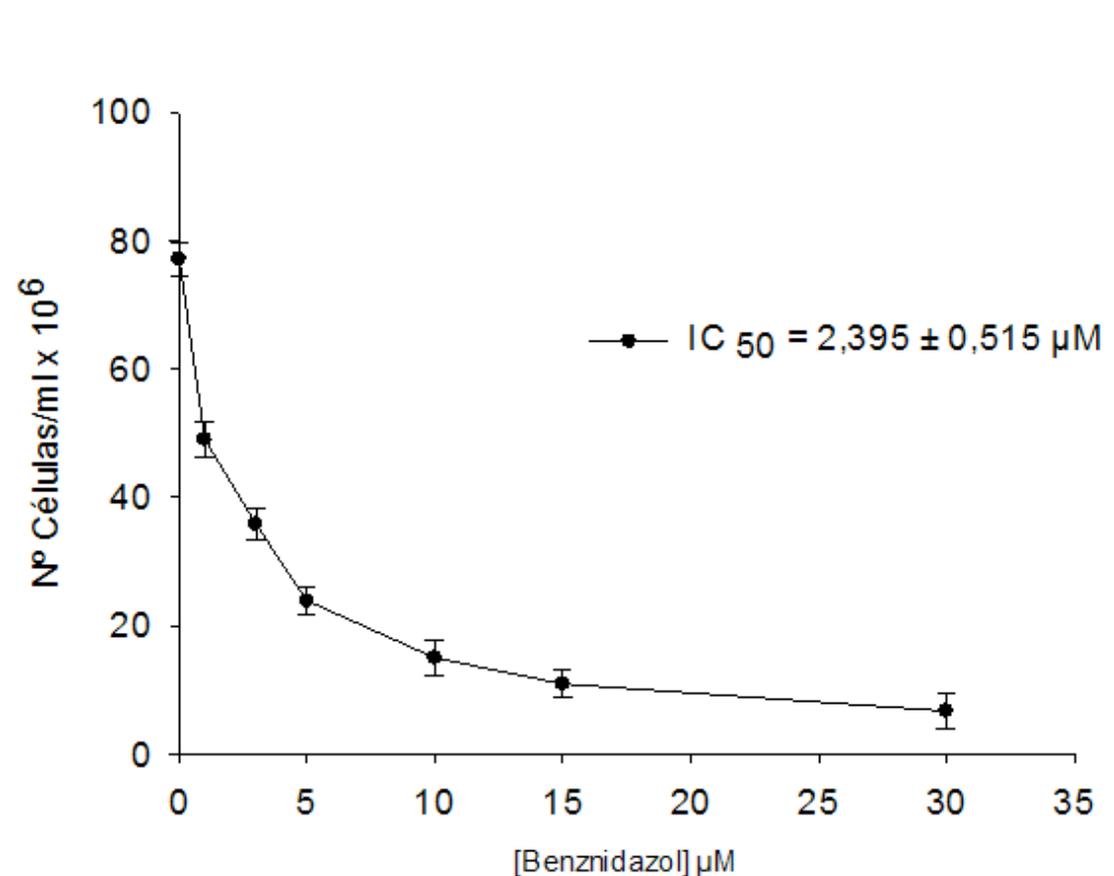


Figura 20. Efecto dosis-respuesta del benznidazol sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* a las 144 horas de incubación con las diferentes concentraciones del compuesto. Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (\pm) la desviación estándar de seis experimentos independientes.

Una vez demostrado el efecto inhibitorio de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8 y DM12 sobre la proliferación celular de epimastigotes de *T. cruzi*, se procedió a estudiar el efecto de estos compuestos sobre la regulación intracelular de calcio en *Trypanosoma cruzi*. Para ello, estudiamos el efecto de estas tetrahydroquinolinas

sustituidas y del benznidazol sobre una de las estructuras más importantes involucradas en el mantenimiento de la homeostasis de Ca^{2+} en estos parásitos, como es la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA).

6.7 Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8 y DM12 sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATP-asa de membrana plasmática de *Trypanosoma cruzi*.

La Ca^{2+} ATP-asa de membrana plasmática (PMCA) es el principal mecanismo encargado de la regulación fina de los niveles intracelulares basales de Ca^{2+} , tanto en células de mamífero como en los tripanosomatidios. Con el objeto de evaluar si esta enzima pudiera ser un posible blanco de la acción de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8 y DM12, se incubaron preparaciones de membrana plasmática de *Trypanosoma cruzi*, en ausencia (actividad control) y en presencia de diferentes concentraciones de cada uno de estos compuestos (5 μM , 15 μM y 30 μM). Posteriormente se determinó la actividad de hidrólisis de ATP por la PMCA a una concentración de Ca^{2+} libre de 10 μM . De igual forma, se evaluó el efecto del benznidazol sobre la actividad de esta enzima, la cual no ha sido reportada, pues si bien es conocido el efecto antiproliferativo de esta droga en *T. cruzi* (Fonseca-Berzal y col., 2013), no se ha realizado ningún estudio sobre el efecto de la misma en la regulación intracelular de Ca^{2+} .

Como puede observarse en la Figura 21, todas las tetrahydroquinolinas sustituidas seleccionadas (DM5, DM8 y DM12) mostraron un efecto inhibitorio sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática de *Trypanosoma cruzi*. Este efecto inhibitorio fue dosis-dependiente, ya que a medida que se aumentaba la concentración de cada tetrahydroquinolina se inhibía la actividad de la enzima en un mayor porcentaje. Sin embargo, es de hacer notar que la tetrahydroquinolina DM5 tuvo un efecto inhibitorio menos marcado sobre la actividad de la PMCA de *T. cruzi* que las tetrahydroquinolinas DM8 y DM12. Siendo el efecto inhibitorio más marcado el observado con el DM12 (Fig.

21). El benznidazol, también inhibió la actividad de esta enzima de manera similar al compuesto DM5. Estos resultados fueron analizados mediante una prueba t de Student resultando en que las inhibiciones de cada compuesto con respecto al control fueron significativas con un $p \leq 0,05$.

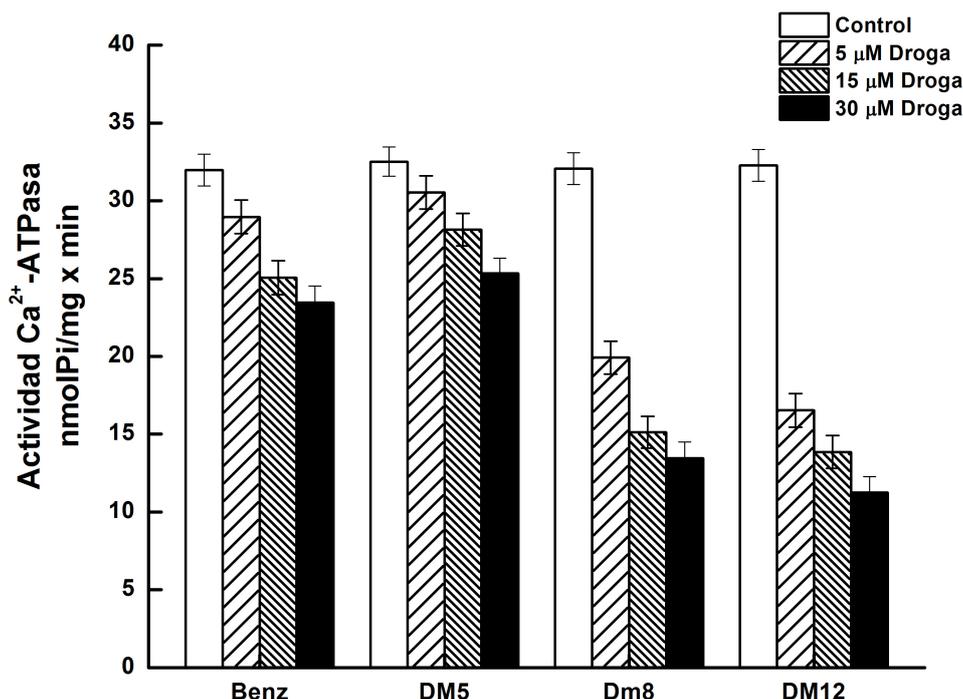


Figura 21. Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8, DM12 y del benznidazol sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. La actividad fue determinada a una concentración de Ca^{2+} libre de $10 \mu\text{M}$. Se observa en cada grupo de barras la actividad control y la actividad en presencia de $5 \mu\text{M}$, $15 \mu\text{M}$ y $30 \mu\text{M}$ de cada compuesto. Las actividades reportadas corresponden al promedio (\pm) la desviación estándar de seis experimentos independientes, siendo los efectos inhibitorios de cada compuesto con respecto al control estadísticamente significativos con un $p \leq 0,05$.

En la tabla 3, se muestran los porcentajes de inhibición para cada una de las tetrahydroquinolinas sustituidas seleccionadas (DM5, DM8 y DM12) sobre la actividad de la PMCA de *Trypanosoma cruzi* con respecto al control (Actividad basal de la enzima). Como se puede observar, las tetrahydroquinolinas DM5, DM8 y DM12 inhibieron la actividad de la

enzima en un 22,08 %, 58,06 % y 64,92 % respectivamente a una concentración de 30 μM . Se obtuvo que para el benznidazol a esta misma concentración se inhibió a la enzima en un 26,65%. Es importante resaltar que los compuestos DM8 y DM12, inhibieron de una manera significativa la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de *T. cruzi* a una concentración de 5 μM , concentración cercana al IC_{50} estimado para estos compuestos, disminuyendo la actividad de la misma en aproximadamente un 40% (Tabla 3).

% de Inhibición de la Actividad de la Ca^{2+} ATP-asa de membrana plasmática de <i>T. cruzi</i>.			
Compuesto	5 μM	15 μM	30 μM
DM 5	6,09%	13,44%	22,08%
DM 8	37,89%	52,85%	58,06%
DM 12	48,42%	56,78%	64,92%
Benz.	9,41%	21,61%	26,65%

Tabla 3. Porcentaje de inhibición de las Tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8, DM12 y del benznidazol sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, a concentraciones de 5 μM , 15 μM y 30 μM .

Los resultados obtenidos sugieren a la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de estos parásitos, como un posible blanco de las Tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8, DM12 y de la droga de referencia benznidazol.

6.8 Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8 y DM12 sobre la actividad de la Ca^{2+} ATP-asa de fantasmas de eritrocitos humanos

Una vez conocido el efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATP-asa de membrana plasmática de epimastigotes de *T. cruzi* se evaluó si estos compuestos afectaban la PMCA de eritrocitos humanos. Para esto, se estudió el efecto de

cada una de las tetrahydroquinolinas sustituidas a una concentración de 30 μM sobre la actividad de hidrólisis de ATP de la Ca^{2+} -ATP-asa presente en la membrana de eritrocitos humanos a diferentes concentraciones de calcio libre (0,1 μM ; 0,2 μM ; 0,4 μM ; 0,5 μM ; 1 μM ; 2 μM ; 5 μM y 10 μM). Como puede observarse en la Fig. 22, en ausencia de los compuestos la enzima presentó una actividad basal la cual incrementaba a medida que se aumentaba la concentración de Ca^{2+} libre, observándose una actividad basal máxima a 10 μM Ca^{2+} libre donde la enzima se encuentra trabajando a su máxima velocidad (Fig.22). Ninguna de las Tetrahydroquinolinas sustituidas estudiadas, ni el benznidazol, afectaron de manera significativa la actividad de la Ca^{2+} -ATP-asa de eritrocitos humanos (Fig22).

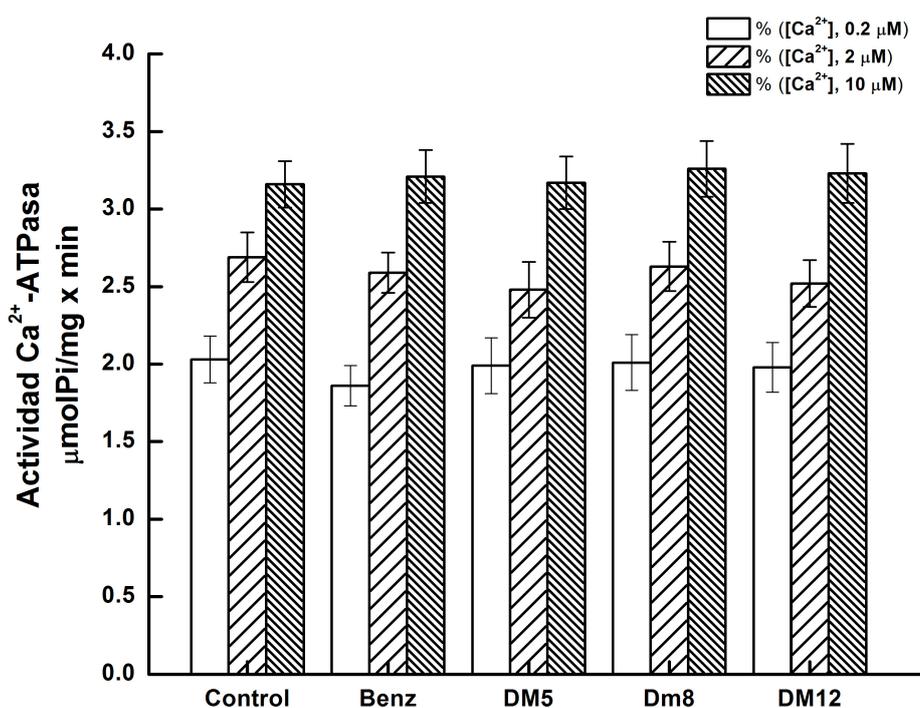


Figura 22. Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8, DM12 y del benznidazol sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática de eritrocitos humanos. Las barras representan la actividad enzimática en presencia de 0.2 μM , 2 μM y 10 μM Ca^{2+} libre respectivamente. El grupo control representa la actividad de la enzima en ausencia de compuestos. El resto de los grupos representa la actividad de la enzima en presencia de 30 μM Benznidazol, 30 μM DM5, 30 μM DM8 y 30 μM DM12. Las actividades reportadas corresponden al promedio (\pm) la desviación estándar de seis experimentos independientes, no observándose diferencias significativas entre el efecto de cada compuesto y el control con un $p \leq 0,05$.

Estos resultados son interesantes ya que las tetrahydroquinolinas sustituidas estudiadas y el benznidazol afectan la actividad de la PMCA de *T. cruzi* sin afectar la misma enzima en eritrocitos humanos, apoyando de esta manera la posibilidad de que esta enzima pudiera ser considerada como posible blanco de acción de drogas contra estos parásitos. La inhibición de esta enzima pudiera afectar la homeostasis del Ca^{2+} del parásito y por lo tanto su viabilidad (Moreno, 1991).

6.9 Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8, DM12 y el benznidazol sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Con el objeto de evaluar el efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8, DM12 y del benznidazol sobre la homeóstasis intracelular de Ca^{2+} en epimastigotes de *T. cruzi*, se incubaron los parásitos con el fluoróforo Fura-2AM y mediante la técnica de fluorimetría se observaron los cambios ocasionados por los compuestos sobre la relación de fluorescencia 340/380, en presencia y ausencia de Ca^{2+} extracelular. Tomando en cuenta la relación de proporcionalidad entre la relación 340/380 nm y la concentración de Ca^{2+} intracelular planteada en la ecuación de Grynkiewicz, el incremento en la relación 340/380 nm puede traducirse como un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} en el parásito. Una vez obtenidos los niveles intracelulares basales de Ca^{2+} , se agregaron en los tiempos señalados con las flechas en cada gráfico, los diferentes compuestos a las concentraciones de los IC_{50} estimados para cada uno de ellos en la sección 6.

6.10 Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM5 sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

En la Figura 23 puede observarse el efecto del compuesto DM5 sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en *T. cruzi*, en presencia (A) y ausencia (B) de Ca^{2+} extracelular. En la Figura 23 se observa que luego de añadir este compuesto a una concentración de $7 \mu\text{M}$, concentración correspondiente al IC_{50} estimado ($7,059 \pm 0,821 \mu\text{M}$) del DM5 sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*, se produjo un incremento en la relación de fluorescencia 340/380 nm. El incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} se mantuvo en el tiempo, no se observó la recuperación de los niveles basales del ión, sino que éste permaneció elevado dentro del parásito. Estos resultados fueron similares tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} extracelular lo cual demuestra que el incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} inducido por este compuesto es debido a la liberación de este ión desde reservorios intracelulares y no a la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular.

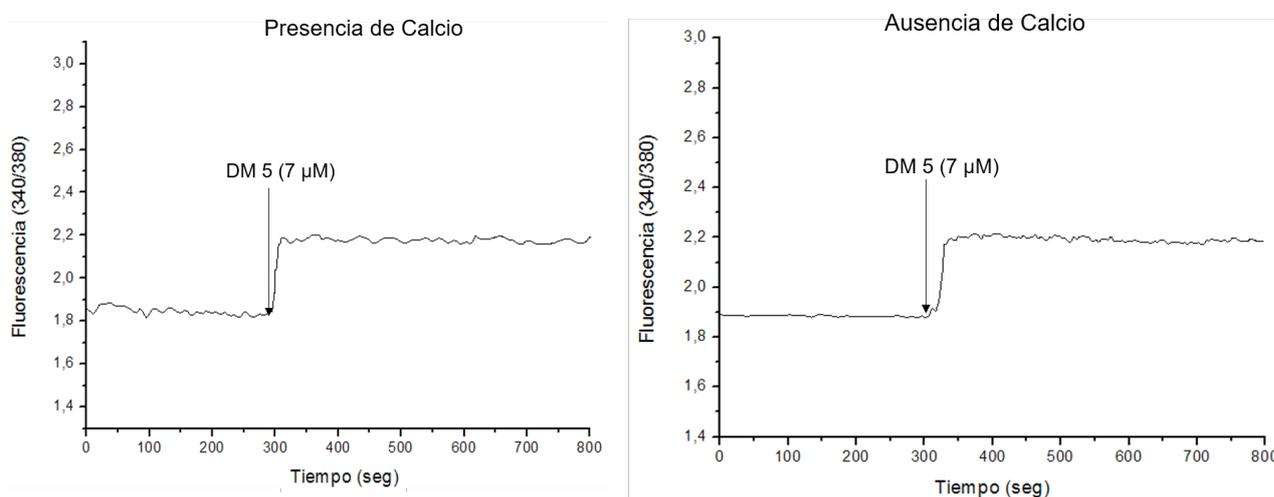


Figura 23. Efecto del compuesto DM5 sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. A. Efecto de $7 \mu\text{M}$ DM5 (flecha) sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en presencia de 2 mM de Ca^{2+} extracelular. B. Efecto de $7 \mu\text{M}$ DM5 sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en ausencia de Ca^{2+} extracelular (8 mM EGTA).

6.11 Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM8 sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

El efecto del compuesto DM8 sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en *T. cruzi*, en presencia (A) y ausencia (B) de Ca^{2+} extracelular, puede ser observado en la Fig. 24. Como se muestra en la figura, luego de añadir el compuesto DM8 a una concentración de $5 \mu\text{M}$, concentración cercana al IC_{50} estimado ($5,24 \pm 1,54 \mu\text{M}$) para su efecto sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} extracelular, se produjo un incremento en la relación de fluorescencia a 340/380 nm.. La magnitud del incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} fue similar al observado con el compuesto DM5 y de igual forma no se observó la recuperación de los niveles basales del ión, sino que éste permaneció elevado dentro del parásito. Al igual que con la tetrahydroquinolina DM5, no se observaron diferencias entre los ensayos realizados en ausencia (Fig. 24 B) o en presencia de Ca^{2+} extracelular (Fig. 24 A), este resultado indicó que el DM8 está induciendo el incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} mediante la liberación de este ión desde compartimientos intracelulares.

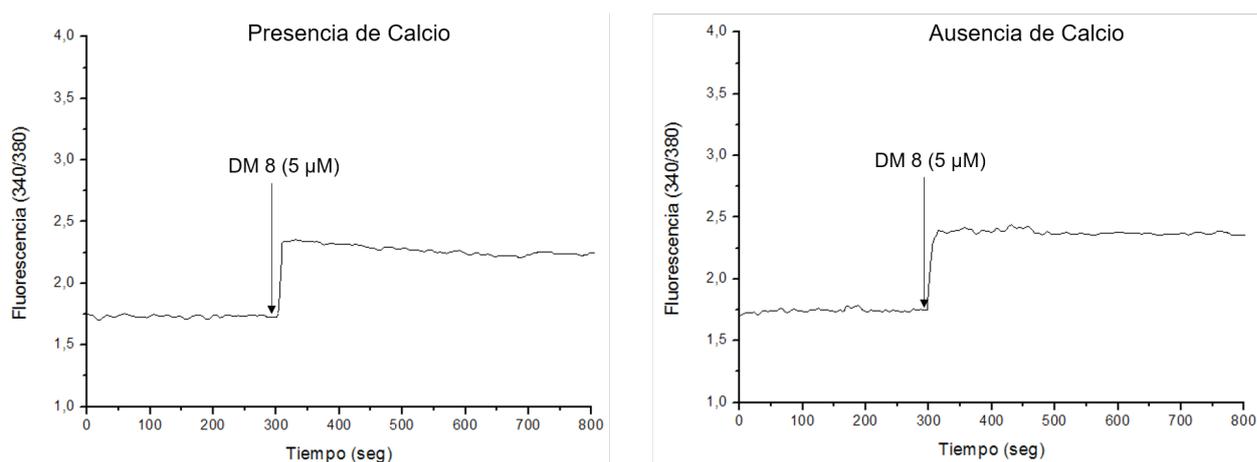


Figura 24. Efecto del compuesto DM8 sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. A. Efecto de $5 \mu\text{M}$ DM8 (flecha) sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en presencia de 2 mM de Ca^{2+} extracelular. B. Efecto de $5 \mu\text{M}$ DM8 sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en ausencia de Ca^{2+} extracelular (8 mM EGTA).

6.12 Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM12 sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

El efecto del compuesto DM12 sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en *T. cruzi*, en presencia y ausencia de Ca^{2+} extracelular, puede ser observado en la Fig. 25 (A y B respectivamente). Cuando este compuesto fue añadido a una concentración de 3 μM , concentración cercana al IC_{50} estimado ($2,80 \pm 0,86 \mu\text{M}$) para su efecto sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} extracelular no se observó ningún efecto en la relación de fluorescencia 340/380. Sin embargo, al añadir 6 μM del compuesto pudo observarse un incremento en la relación de fluorescencia a 340/380 nm de magnitud similar a la observada con los compuestos DM5 y DM8. De igual manera tampoco se observó la recuperación de los niveles basales de Ca^{2+} sino que éste permaneció elevado dentro del parásito. Al igual que con las tetrahydroquinolinas DM5 y DM8, no se observaron diferencias entre los ensayos realizados en ausencia (Fig. 25 B) o presencia de Ca^{2+} extracelular (Fig. 25 A), lo cual indica que el DM12 está induciendo el incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} mediante la liberación de este ión desde compartimientos intracelulares.

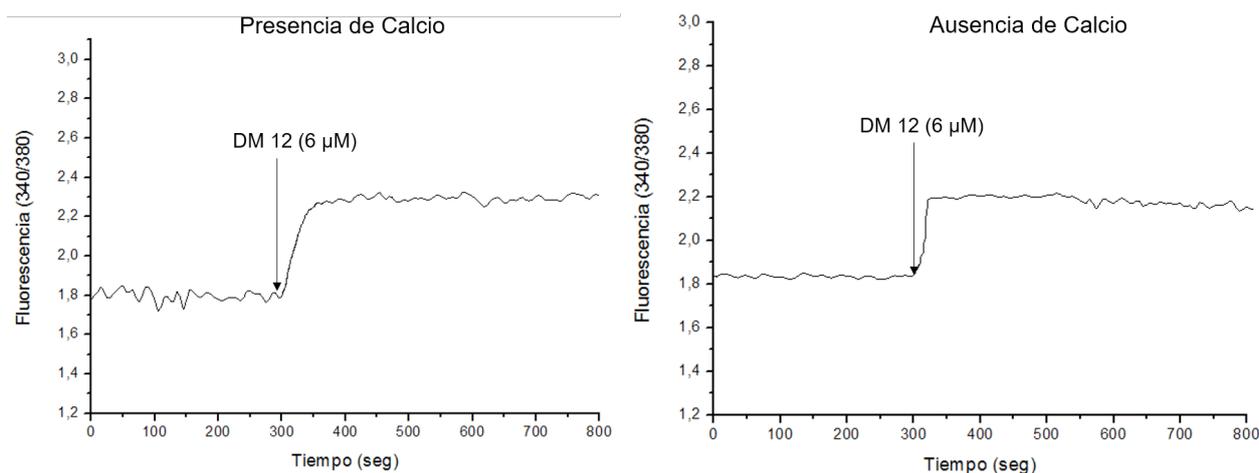


Figura 25. Efecto del compuesto DM12 sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. A. Efecto de 6 μM DM12 (flecha) sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en presencia de 2 mM de Ca^{2+} extracelular. B. Efecto de 6 μM DM12 sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en ausencia de Ca^{2+} extracelular (8 mM EGTA).

6.13 Efecto del Benznidazol sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Al igual que con las tetrahydroquinolinas DM5, DM8 y DM12, se estudió el efecto de la droga de referencia benznidazol sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en *T. cruzi*, en presencia y ausencia de Ca^{2+} extracelular (Fig. , A y B respectivamente). Con el benznidazol, a una concentración de 2 μM , cercana al IC_{50} estimado ($2,395 \pm 0,515 \mu\text{M}$) para este compuesto sobre la proliferación de *T. cruzi*, se observó un incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} similar al observado con las Tetrahydroquinolinas DM5, DM 8 y DM 12. Asimismo, no se observó la recuperación de los niveles basales del ión, sino que éste permaneció elevado dentro del parásito. Al igual que con las tetrahydroquinolinas no se observaron diferencias entre los ensayos realizados en ausencia Fig 26 B o en presencia de Ca^{2+} extracelular (Fig. 26 A), este resultado indicó que el incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} inducido por esta droga fue debido a su liberación desde reservorios intracelulares y no a la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular.

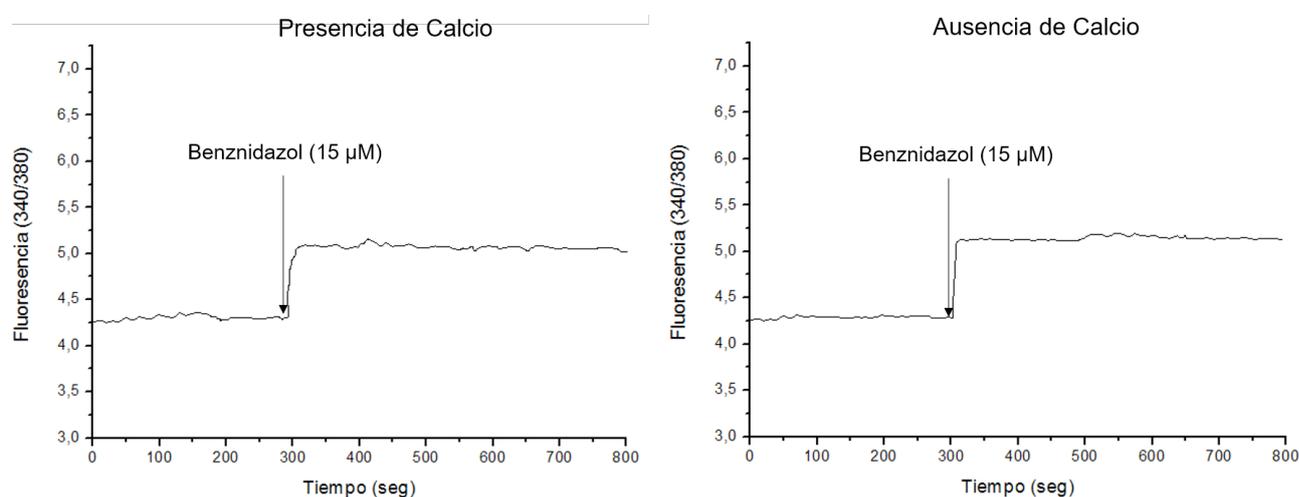


Figura 26. Efecto del Benznidazol sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. A. Efecto de 2 μM Benznidazol (flecha) sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en presencia de 2 mM de Ca^{2+} extracelular. B. Efecto de 2 μM Benznidazol sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en ausencia de Ca^{2+} extracelular (8 mM EGTA).

Los resultados obtenidos demostraron que las tetrahydroquinolinas y el benznidazol incrementan los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de *T. cruzi*, producto de la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares, afectándose así la homeostasis de Ca^{2+} en estos parásitos.

7. DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas afecta en la actualidad cerca de 8 millones de personas en el continente Americano, sin contar los casos existentes en zonas no endémicas debido a la migración de personas y a los diferentes mecanismos de transmisión. El tratamiento actual se basa en dos drogas principales, Nifurtimox y Benznidazol. Sin embargo, ambas drogas presentan efectos tóxicos en los pacientes, son efectivas solo durante la fase aguda de la enfermedad y en los últimos años se ha desarrollado resistencia a las mismas. Adicionalmente, el nifurtimox ha sido discontinuado quedando únicamente el Benznidazol como el tratamiento de primera línea para la enfermedad de Chagas (Berns y col., 2011).

Uno de los principales intereses en las investigaciones actuales sobre el mejoramiento de los tratamientos y la profilaxis de la enfermedad de Chagas, ha sido el estudio dirigido hacia la búsqueda de nuevos fármacos más efectivos y con menos efectos secundarios que los utilizados en la actualidad. El estudio de drogas de uso comercial utilizadas para el tratamiento de otras enfermedades sobre los tripanosomatidios, ha sido una estrategia utilizada por algunos investigadores con la finalidad de poder descubrir nuevos compuestos con actividad tripanocida, que ya hayan sido utilizadas en humanos y de las cuales se conocen sus efectos secundarios. Estos compuestos de ser efectivos en el parásito, serían de fácil aprobación para su utilización con fines terapéuticos (Prata, 2001). Se ha profundizado también en los estudios de terapias combinadas, cuya finalidad es utilizar compuestos con blancos diferentes de manera tal de aumentar su eficacia terapéutica disminuyendo la resistencia a los fármacos (Alvar y col., 2008; Fonseca y col., 2013), así como en la búsqueda de nuevos compuestos basados en productos naturales que se espera sean perjudiciales para el parásito sin comprometer la salud del hospedador mamífero. De igual manera, recientemente se ha profundizado en el estudio sobre nuevos posibles blancos de la acción de drogas en los tripanosomatidios, con la finalidad de generar compuestos que puedan afectar mecanismos del parásito esenciales para su viabilidad, sin afectar al

hospedador mamífero (Field y col., 2015). Todas estas investigaciones se realizan con el fin de encontrar tratamientos alternos, a los conocidos actualmente, que minimicen los efectos secundarios, disminuyan la resistencia generada frente a las drogas comerciales y que sean eficaces durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

Los productos naturales constituyen una fuente esencial de grupos funcionales activos, que son utilizados para el desarrollo de medicamentos (Schwikkard y col., 2002). Entre los productos naturales, extractos de aceites de origen vegetal, que han sido más recientemente estudiados y se ha demostrado presentan una actividad tripanocida están: el eugenol, isoeugenol, valina, isovalina, las quinolinas, derivados de quinolinas y quinolinas sustituidas denominadas tetrahydroquinolinas (Nakayama y col., 2005, Merchan y col., 2011, Lei y col., 2016).

Las quinolinas y tetrahydroquinolinas han sido estudiadas en células tumorales, reportándose que las tetrahydroquinolinas sustituidas tienen una mayor actividad citotóxica que sus precursores Eugenol e Isoeugenol (Koutznetsov y col., 2010). Sin embargo, sus mecanismos de acción aún son desconocidos. Estas tetrahydroquinolinas sustituidas son obtenidas mediante reacciones de cicloadición imino Diels-Alder a partir del isoeugenol, encontrado en plantas de nuez moscada, de clavos de olor y de canela (Hyldgaard y col., 2015). Al sustituirse radicales de estas tetrahydroquinolinas, se generan series o familias de moléculas, una de ellas la serie DM, entre las cuales se encuentran las tetrahydroquinolinas sustituidas objetos de estudio de esta investigación (DM5, DM6, DM7, DM8, DM9, DM12, DM13, DM15, DM16) (Kouznetsov y col., 2010).

En este trabajo evaluamos el efecto de estas nueve tetrahydroquinolinas sustituidas sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Utilizando como droga de referencia en todos los ensayos Benznidazol, cuyo efecto tripanocida ha sido previamente reportado (Bern, 2011). El benznidazol ha sido considerado como el tratamiento de primera línea contra la enfermedad de Chagas, por presentar menores efectos secundarios que el nifurtimox y una mayor eficacia (Bern, 2011).

Todas las tetrahydroquinolinas ensayadas mostraron un efecto inhibitorio sobre la proliferación de *T. cruzi* a una concentración de 25 μM (Fig. 10) y a 15 μM (Fig. 11). Resaltando los efectos observados con los compuestos DM5, DM8 y DM12, los cuales a una concentración de 25 μM inhibieron la proliferación del parásito en un 87,26%, 79,25% y 89,15 % respectivamente, en relación al porcentaje de inhibición obtenido en presencia de la misma concentración de Benznidazol que fue de 91,98 %. (Fig. 10 y Tabla 1). Al elaborar curvas dosis respuesta con concentraciones desde 1 μM a 30 μM , se obtuvo para cada una de las tetrahydroquinolinas seleccionadas un efecto inhibitorio de la proliferación celular aumentando el mismo a medida que aumenta la concentración del compuesto. De esta forma el mayor efecto se observa a 30 μM para cada uno de ellos. Estos compuestos mostraron una inhibición con un efecto dosis dependiente de la proliferación del parásito, estimándose sus IC_{50} , la concentración del compuesto requerido para inhibir en un 50 % la población parasitaria *in vitro*.

Así, fue estimado para el DM5 un IC_{50} de $7,059 \pm 0,821 \mu\text{M}$ (Fig.14), para el DM8 un IC_{50} de $5,24 \pm 1,54 \mu\text{M}$ (Ver Fig. 16) y para el DM12 un IC_{50} de $2,80 \pm 0,86 \mu\text{M}$ (Fig. 18). Resultados similares fueron obtenidos por Fonseca-Berzal y col., en el 2013 quienes también utilizando epimastigotes de *T. cruzi* estimaron valores de IC_{50} menores de 8 μM para tetrahydroquinolinas sustituidas de la serie DM, entre ellas las tetrahydroquinolinas DM5, DM8 y DM12, utilizadas en nuestro estudio. De igual manera, pudimos estimar el IC_{50} del Benznidazol que fue de $2,395 \pm 0,515 \mu\text{M}$ (Fig. 20). Los IC_{50} más bajos reportados en la literatura para esta droga en la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*, están entre los 5 μM y 7 μM (Moreno y col., 2010 y Lechuga y col, 2016). Es importante resaltar, que la efectividad del Benznidazol, puede variar según el área geográfica, debido a una susceptibilidad diferencial de las distintas cepas existentes de *T. cruzi* (Pinazo y col., 2010) y por las condiciones específicas del experimento (Neubig y col., 2003), razones por las cuales se pueden explicar las diferencias obtenidas entre el IC_{50} estimado en este trabajo para el Benznidazol y los valores de IC_{50} que han sido reportados para esta droga. De igual

forma esto podría explicar las diferencias obtenidas, en los valores de IC_{50} , para los DM utilizados con respecto a los reportados por Fonseca-Berzal y col., en el 2013.

De estos resultados podríamos sugerir que las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8 y DM12 tienen un importante efecto antiproliferativo en epimastigotes de *T. cruzi*. Resaltando el efecto observado con el compuesto DM12, el cual afectó la proliferación de estos parásitos de una manera similar a la droga de referencia Benznidazol, observándose que los IC_{50} estimados para ambos fueron similares. Apoyando nuestros resultados, se encuentran los estudios realizados con las tetrahydroquinolinas DM8 y DM12 sobre células tumorales por Muñoz y col., en el 2010. Los cuales reportaron que estos compuestos tenían un importante efecto citotóxico en líneas celulares tumorales MCF7 y SKBR3 a bajas concentraciones (1 $\mu\text{g/ml}$), observándose un efecto sinérgico cuando se combinaban con Gemcitabina y Paclitaxel. De igual manera, estos investigadores reportan que dos compuestos de este grupo de tetrahydroquinolinas (AR99 y JS86) de la serie 2,4-diaril-tetrahydroquinolinas sustituidas, mostraron una liberación de Ca^{2+} intracelular por inhibición de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplasmático, y provocando una fragmentación del ADN nuclear por efecto, induciendo a la apoptosis sobre la línea CarC de queratinocitos de ratón. Asimismo, este grupo reportó que las tetrahydroquinolinas de la serie DM no eran citotóxicas para las células controles (fibroblastos), sugiriéndose a los compuestos DM8 y DM12 como posibles agentes para el tratamiento de células tumorales. En este sentido, es importante resaltar que los estudios realizados en este trabajo fueron sobre el estadio epimastigote, quedando por estudiar si las tetrahydroquinolinas DM5, DM8 y DM12 puedan ser también activas como tripanocidas en el estadio intracelular (amastigote) de *T. cruzi*, estadio clínicamente relevante

Datos suministrados por el profesor Francisco Arvelo y colaboradores, del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del Instituto de Biología Experimental, sobre el IC_{50} obtenido en células de cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos, mediante el método del MTT, para cada una de las tetrahydroquinolinas sustituidas seleccionadas en el

presente trabajo, se conoce este valor (IC_{50}) es mucho mayor que el obtenido sobre los epimastigotes de *T. cruzi*, esto sugiere que se requieren concentraciones aun mayores a la utilizadas en este proyecto para afectar la viabilidad de células de cultivo primario de fibroblastos dérmicos humanos en un 50 %.

COMPUESTO	Efecto en la proliferación de <i>T. cruzi</i> . (% de Inhibición).		IC_{50} en epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	IC_{50} en fibroblastos.	Efecto sobre la PMCA en eritrocitos humanos	Efecto sobre la PMCA de <i>T. cruzi</i>	Efecto en la $[Ca^{2+}]_i$
	15 μ M	25 μ M					
DM 5	74,10 %	87,26 %	7,05 μ M	46,3 μ M	No se observo	Inhibicion	Incrementa la $[Ca^{2+}]_i$
DM 8	69,61 %	79,25 %	5,24 μ M	52,50 μ M	No se observo	Inhibicion	Incrementa la $[Ca^{2+}]_i$
DM 12	82,94 %	89,15 %	2,80 μ M	35,11 μ M	No se observo	Inhibicion	Incrementa la $[Ca^{2+}]_i$
Benznidazol	87,50 %	91,98 %	2,40 μ M		No se observo	Inhibicion	Incrementa la $[Ca^{2+}]_i$

Los compuestos DM 5, DM 8 y DM 12 mostraron un IC_{50} de 46,3 μ M, de 52,50 μ M y de 35,11 μ M respectivamente en cultivos primario de fibroblastos dérmicos humanos (células control). Al comparar estos valores con los obtenidos en la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*, se observa que estos últimos son mucho menores que los obtenidos para los fibroblastos, pudiendo de esta manera sugerir que estas tetrahydroquinolinas sustituidas parecieran ser mas efectivas para el parásito que para las células normales de humanos. Estos compuestos también parecieran ser mas selectivos para las células tumorales pertenecientes a la línea MCF7 que para los fibroblastos (Muñoz y col., 2010).

Los resultados descritos sobre las líneas de células tumorales MCF7 y SKBR3 logran evidenciar el potencial que tiene esta familia de tetrahydroquinolinas sustituidas

pertenecientes a la serie DM en diferentes patologías, pudiendo sugerir a las mismas para el tratamiento de estas.

Se conoce que la adición de nitrógeno, azufre y oxígeno en el esqueleto de estos compuestos forman nuevas estructuras menos tóxicas que las ya conocidas (Merchan, 2010). Es esencial que el compuesto químico tenga una estructura no saturada, permitiendo así reacciones con posibles blancos (Nakayama y col., 2005). Se conoce también que sustituciones alquil en el carbono 6, tienen una importante influencia en el efecto tripanocida de estos compuestos (Fonseca-Berzal y col., 2013), de igual manera este grupo sugiere que la introducción de grupos NO_2 y NH_2 en el esqueleto tienen un mayor efecto en el metabolismo de estos tripanosomatidios que otros grupos funcionales. Es importante aquí señalar que el compuesto DM 5 es el compuesto madre de esta serie DM, cuyos grupos funcionales son el hidroxilo y un grupo metil, sin sustituciones en la estructura base, el compuesto DM 8 presenta una sustitución en su estructura química de la adición de un grupo amino NH_2 en el anillo bencénico y por último el compuesto DM 12 presenta la adición de dos grupos nitro NO_2 en su estructura en comparación el DM 5. Conociendo la importancia de los grupos funcionales y su efecto en la proliferación de este tripanosomatidio, pudiéramos sugerir que aquellos compuestos cuya sustitución sea de un grupo nitro pareciera favorecer el efecto inhibitorio de la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* como pudimos observar con el compuesto DM 12, que además presenta el menor valor de IC_{50} (2,8 μM) en la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*. La adición de un grupo amino en la estructura química base de estas tetrahydroquinolinas sustituidas pareciera de igual manera incrementar el efecto inhibitorio en la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*, pudiendo concluir que ambas sustituciones favorecen el efecto inhibitorio en la proliferación de estos parásitos en comparación al compuesto madre DM 5 de esta serie.

Dado el interesante efecto antiproliferativo observado de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8 y DM12 fue de nuestro interés en este trabajo, tratar de establecer

un posible mecanismo de acción para estos compuestos en *T. cruzi*. En este sentido, existen diferentes estudios donde se ha relacionado el efecto tripanocida de diversas drogas y fármacos como: la pentamidina, el cristal violeta, la amiodarona, dronedarona y mitelfosina, con una alteración de la homeostasis intracelular de Ca^{2+} en los tripanosomatidios, afectándose así la viabilidad del parásito (Shanne y col., 1979; Orrenius y col., 1989; Benaim y col., 2014). Estos estudios han propuesto a los sistemas reguladores de Ca^{2+} encontrados en el mitocondrion, el retículo endoplasmático, los acidocalcisomas y la membrana plasmática como posibles blancos de la acción de ciertas drogas (Benaim y García, 2011).

Uno de los sistemas reguladores de Ca^{2+} más importantes reportados en los tripanosomatidios es la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA), enzima encargada del movimiento del Ca^{2+} desde el citoplasma hacia el exterior celular, con alta afinidad por este cation, siendo la responsable del control fino y mantenimiento de los niveles basales de calcio en estos parásitos. Esta enzima ha sido considerada como un posible blanco de acción de compuestos que pudieran ser explotados con fines terapéuticos (Cervino y Benaim, 2014).

En este trabajo evaluamos el efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8 y DM12 y de la droga de referencia Benznidazol sobre la actividad de la PMCA de epimastigotes de *T. cruzi*. Los resultados mostraron que las tres tetrahydroquinolinas, DM5, DM8 y DM12 tuvieron un efecto inhibitorio significativo sobre la actividad de hidrólisis de ATP de la PMCA de epimastigotes de *T. cruzi*, observándose un porcentaje de inhibición de 22,08%, 58,06% y 64,92%, respectivamente, sobre la actividad basal de esta enzima (Fig. 21). Asimismo, el Benznidazol, también mostró un efecto inhibitorio sobre esta enzima del 26,65% (Fig 21). Al igual que lo observado sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*, los compuestos DM8 y DM12 tuvieron un efecto inhibitorio mucho mayor al observado con el DM5. Sugiriendo esto, que las tetrahydroquinolinas DM8 y DM12 pudieran afectar de manera importante la actividad de la PMCA de *T. cruzi*, perturbando así la salida

de Ca^{2+} del parásito y alterando la homeóstasis intracelular de Ca^{2+} en los mismos. El efecto inhibitorio observado del benznidazol sobre la actividad de la PMCA, aunque menos marcado comparado al obtenido con los DMs, resulta interesante pues hasta el momento, no ha sido reportado ningún estudio donde se relacione el efecto tripanocida de la droga con la homeostasis de Ca^{2+} intracelular en *T. cruzi*.

Ahora bien, para que la PMCA pueda ser considerada un posible blanco de acción de estas tetrahydroquinolinas, es necesario estudiar si estos compuestos afectan el funcionamiento normal de la misma enzima en células de humano, ya que para que un compuesto pueda ser utilizado con fines terapéuticos, éste debe tener una mayor selectividad sobre el parásito y causar el menor efecto secundario en el hospedador. Como pudo ser observado, ninguna de las tetrahydroquinolinas estudiadas tuvo efecto sobre la actividad de hidrólisis de ATP de la PMCA de eritrocitos humanos (Fig. 22), apoyando así el hecho de que los compuestos DM5, DM8 y DM12 así como el Benznidazol podrían estar teniendo un efecto selectivo sobre la PMCA de *T. cruzi*. En este sentido, se ha reportado que la PMCA de tripanosomatidios y humanos presentan diferencias estructurales importantes que pudieran explicar la mayor especificidad de estos compuestos sobre la PMCA de *T. cruzi* (Benaim y Cervino, 2004). Un efecto inhibitorio de estos compuestos sobre esta enzima en el parásito, afectaría la homeostasis de Ca^{2+} , afectándose así procesos celulares que pudieran conducir a la muerte de los mismos. Por esta razón, se propone a la Ca^{2+} -ATPasa de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* como posible blanco terapéutico para los DM5, DM8, DM12 y el Benznidazol, además de esto para el diseño de nuevos compuestos que pudieran ser evaluados en investigaciones posteriores, bien sea individualmente o en combinación con drogas de referencia.

Conociendo la importancia del mantenimiento de la homeostasis de Calcio en los tripanosomatidios, en el presente estudio para determinar si las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8 y DM12 tenían algún efecto sobre la homeóstasis intracelular de Ca^{2+} en epimastigotes de *T. cruzi*, se determinó mediante técnicas de fluorescencia, si estos

compuestos provocaban un incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} en estos parásitos. Para ello, los parásitos se cargaron con el fluoróforo Fura-2AM específico para Ca^{2+} y se siguieron los cambios en la relación de fluorescencia 340/380 en el tiempo en presencia de las Tetrahydroquinolinas sustituidas seleccionadas previamente. En las gráficas podemos observar los cambios en la relación de fluorescencia 340/380, los cuales tomando en cuenta la relación de proporcionalidad entre la relación 340/380 nm y el cálculo de la concentración de Ca^{2+} intracelular planteada en la ecuación de Grynkiewicz, puede traducirse como un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} en el parásito (Grynkiewicz, 1985).

Como pudo observarse en los resultados, los compuestos DM5 y DM8 indujeron un incremento en la relación de fluorescencia a 340/380 nm a concentraciones de 7 μM y 5 μM respectivamente, concentraciones cercanas al IC_{50} estimado para cada uno de estos compuestos (Fig. 23 y 24 respectivamente). Por otra parte, el compuesto DM12 no afectó el nivel intracelular de Ca^{2+} en *T. cruzi* a concentraciones cercanas al IC_{50} estimado (3 μM , data no mostrada), sin embargo al duplicar su concentración (6 μM), se observó un incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} similar al observado con los compuestos DM5 y DM8 (Fig. 25). El incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} inducido por las 3 tetrahydroquinolinas, fue similar tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} extracelular (Fig 23, 24 y 25 A y B), indicando esto que ese incremento era debido a la salida de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares como el mitocondrión, el retículo endoplasmático y los acidocalcisomas y no a la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular.

Como puede observarse para todas las tetrahydroquinolinas, una vez que se ha inducido el incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} , no se observa la recuperación de los niveles basales de este catión sino que el Ca^{2+} permanece elevado en el citoplasma del parásito. Es importante resaltar, que una vez incrementados los niveles intracelulares de Ca^{2+} en respuesta a alguna señal, la célula recupera sus niveles basales de Ca^{2+} gracias a la acción combinada de diferentes sistemas transportadores tales como el uniporte de Ca^{2+}

mitocondrial y la Ca^{2+} -ATPasa del retículo endo(sarco)plasmático (SERCA), los cuales introducen el Ca^{2+} desde el citoplasma hacia el interior de la mitocondria y el retículo endoplasmático respectivamente, indicándonos esto que posiblemente el funcionamiento de estos sistemas reguladores de Ca^{2+} podrían estar siendo afectados por los compuestos, quedando por ensayar el efecto de los mismos sobre dichos compartimientos intracelulares. Asimismo, si tomamos en cuenta el hecho de que estos compuestos inhibieron la actividad de la PMCA de *T. cruzi*, y que esta enzima es la responsable de transportar el Ca^{2+} desde el citoplasma del parásito hacia el medio extracelular, es posible que el Ca^{2+} al no poder ser eliminado de la célula, se mantenga en niveles más elevados en el citoplasma del parásito.

Estos estudios fueron realizados también con el Benznidazol, observándose que éste provocó un incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} a una concentración de 2 μM , concentración cercana al IC_{50} estimado sobre la proliferación de *T. cruzi* (Fig. 26). El incremento observado fue similar al inducido por las tetrahydroquinolinas, no observándose de igual manera la recuperación de los niveles basales de Ca^{2+} en el parásito. Los resultados obtenidos fueron similares cuando los experimentos se hicieron en ausencia (EGTA) o en presencia de Ca^{2+} extracelular, lo cual nos indicó que el incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} inducidos por esta droga en los epimastigotes de *T. cruzi*, viene dado por la liberación de este ión desde organelos intracelulares y no debido a la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular (Benaim y col., 2006).

Todos los resultados tomados en conjunto, permiten sugerir que las tetrahydroquinolinas DM5, DM8 y DM12 así como el Benznidazol, tienen un efecto inhibitorio en la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* y que éstos compuestos pudieran afectar la homeóstasis de Ca^{2+} en el parásito al afectar la actividad de la PMCA, proponiéndose a la PMCA como un posible blanco para la acción de drogas y compuestos a ser utilizados como agentes terapéuticos en *T. cruzi*. Asimismo, se puede sugerir que las tetrahydroquinolinas DM5, DM8 y DM12 pudieran ser utilizadas como prototipos

potenciales para el desarrollo de drogas antichagásicas o para estudios de terapias combinadas con otras drogas como por ejemplo el Benznidazol, con la finalidad de minimizar los efectos secundarios de ésta.

8. CONCLUSIONES

- Las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM6, DM7, DM8, DM9, DM12, DM13, DM15 y DM16 pertenecientes a la serie DM, presentan un efecto inhibitorio sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*.
- Las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8 y DM12 seleccionadas tuvieron un importante efecto inhibitorio de la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*, comparable a la encontrada con la droga de referencia Benznidazol.
- Las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8 y DM12 tienen un efecto inhibitorio dosis dependiente en la proliferación de *T. cruzi* estimándose un IC₅₀ de 7 µM, 5 µM y 2,8 µM respectivamente.
- La droga de referencia Benznidazol mostró un efecto antiproliferativo dosis-dependiente en los epimastigotes de *T. cruzi*, con un IC₅ de 2,4 µM.
- El DM5, DM8 y DM12 inhiben la actividad de la Ca²⁺ ATP-asa de membrana plasmática de *T. cruzi*.
- Las Tetrahydroquinolinas sustituidas seleccionadas no afectan la Ca²⁺ ATP-asa de los eritrocitos humanos.
- Las tetrahydroquinolinas sustituidas DM5, DM8 y DM12 tienen un efecto sobre la homeostasis del calcio intracelular de epimastigotes de *T. cruzi*.

9. BIBLIOGRAFIA

Ache, A. y Matos, A. 2001. Interrupting Chagas disease in Venezuela. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*.**43**: 37-43.

Alarcon de Noya, B., Diaz-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., Marques-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.

Alvar, J., Bern, C., Maguire, J. 2008. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2**: 10-13.

Añez, N., Crisante, G., Rojas, A. 2004. Update of Chagas disease in Venezuela-a review. *Mem Inst. Osw. Cruz.* **99**: 787-787.

Apt, W., Aguilera, X., Arribada, A., Perez, C., Miranda, C., Sanchez, G., Zulantay, I., Cortés, P., Rodriguez, J., Juri, D. 1998. Treatment of chronic Chagas' disease with itraconazole and allopurinol. *Am. J. Trop. Med. Hyg.***59**:133-138.

Araújo, M. S., Martins-Filho, O. A., Pereira, M. E., Brener, Z. 2000. A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas disease. *J Antimicrob Chemother* **45**: 819-824.

Bading, H., Ginty, D.D., Greenberg, M.E. 1993. Regulation of gene expression in hippocampal neurons by distinct calcium signalling pathways. *Science.* **260**: 181-186.

Bedoya, L., Abad, M., Calonge, E., Saavedra, L., Gutierrez C., Kouznetsov W., Bermejo, P. 2010. Quinoline-based compounds as modulators of HIV transcription through NF-kappaB and Sp1 inhibition. *Antiviral Res.* **87**: 338-344.

Benaim, G., Zurini, M., Carafoli, E. 1984. Different Conformational States of the Purified Ca²⁺ ATPase of the Erythrocyte Plasma Membrane Revealed by Controlled Trypsin Proteolysis. *J. Biol. Chem.* **259**: 8471-8477.

Benaim, G., Szabo, V., Cornivelli, L. 1987. Isolation and Characterization of Calmodulin from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana*. *Acta. Cient. Venezol.* **38**: 289-291.

Benaim, G., Bermudez, R., Urbina, J.A., 1990. Ca²⁺ transport in isolated mitochondrial vesicles from *Leishmania braziliensis* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **38**:61-68.

Benaim, G. y Romero, P. 1990. A Calcium Pump in Plasma Membrane Vesicles from *Leishmania braziliensis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1027**: 79-84.

Benaim, G., Losada, S., Gadelha, F.R., Docampo, R. 1991. A Calmodulin-Activated (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase is Involved in Ca²⁺ Transport by Plasma Membrane Vesicles from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* **280**: 715-720.

Benaim, G., Cervino, V., Hermoso, T., Felibert, P., Laurentin, A. 1993a. Intracellular calcium homeostasis in *Leishmania mexicana*. Identification and characterization of a plasma membrane calmodulin-dependent Ca²⁺-ATPase. *Biol. Res.* **26**: 141-150.

Benaim, G., Lopez-Estraño, C., Docampo, R., Moreno, S.N.J. 1993b. A calmodulin-stimulated Ca²⁺ pump in plasma-membrane vesicles from *Trypanosoma brucei*; selective inhibition by pentamidine. *Biochem. J.***296**: 759-763.

Benaim, G. 1996. Intracellular Calcium Regulation and Signaling in *Leishmania*. In Molecular and Immune Mechanisms in the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis. Editor: Felix Tapia. pp: 89-106.

Benaim G., Sanders J., Garcia-Marchan Y., Colina C., Lira R., Caldera A., Payares G., Sanoja C., Burgos J., Leon-Rossel A., Concepcion J.L., Schijman A., Levin M., Oldfield E., Urbina J.A. 2006. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J. Med. Chem.***49**: 892-899.

Benaim, G. y Paniz-Mondolfi, A. 2012. The emerging role of amiodarone and dronedarone in Chagas disease. *E. Nat. Rev. Cardiol.* **9**: 605–609.

Benaim, G., Casanova, P., Hernandez-Rodriguez, V., Mujica-Gonzalez, S., Parra-Gimenez, N., Plaza-Rojas, L., Concepcion, J.L., Liu, Y.L., Oldfield, E., Paniz-Mondolfi, A., Suarez, A.I. 2014. Dronedarone, an Amiodarone Analog with an Improved Anti-*Leishmania mexicana* Efficacy. *Antimicrob. Agents Chemother* (en prensa)

Bensadoun, A., Weinstein, D. 1976. Assay of Proteins in the Presence of Interfering Materials. *Anal. Biochem.* **70**: 241-250.

Berman, J. D. 1981. Activity of imidazoles against *Leishmania tropica* in human macrophages cultures. *Am. J. Trop. Med. Hyg.***30**: 566-569.

Berridge, M. V. y Tan, A. S. 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archiv. Biochem. Biophys.* **303**: 474-82.

Bowles, D.J., Voorheis, H.P. 1982. Release of the surface coat from the plasma membrane of intact bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* requires Ca^{2+} . *FEBS Lett.* **139**: 17-21.

Campbell, A.K. 1983. Intracellular calcium, its universal role as regulator (Chichester:John Wiley).

Carafoli, E. 1988. Intracellular Calcium Homeostasis, with Special Attention to the Role of the Plasma Membrane Calcium Pump. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **12**: S77-S84.

Carrasco, H., Zumaya- Estrada, F., Messenger, L., Lopez-Ordóñez, T., Lewis, M., Flores-Lopez, C., Martínez- Ibarra, A., Penninton, D., Cordon- Rosales, C., Segovia, M., Miles, M. 2012. North American import? Charting the origins of an enigmatic *Trypanosoma cruzi* domestic genotype. *Parasite Vectors.* **5**:226-232.

Castillo- Garit, J., Del Toro- Cortes, O., Kouznetsov, W., Puentes, C., Vega, M., Rolon, M., Escario, J., Gomez- Carrio, A., Marrero- Ponce, Y., Torrens, F. Abad, C. 2012. Identification in silico and in vitro of novel trypanosomicidal drug-like compounds. *Chem. Biol. Drugs.* **80**: 38-45.

Chataing, B., Concepción, J.L., Lobaton, R., Usubillaga, A. 1998. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth *in vitro* by *Solanum alkaloids*: a comparison with ketoconazole. *Planta Med.* **64**: 31-36.

Chung, M.C., Gonçalves, M.F., Colli, W., Ferreira, E.I., Miranda, M.T. 1997. Synthesis and *in vitro* evaluation of potential antichagasic dipeptide prodrugs of primaquine. *J Pharm Sci* **86**: 1127-1131.

Cohen, B.E., Ramos, H., Gamargo, M., Urbina, J.A. 1986. The water and ionic permeability by polyene antibiotics across plasma membrane vesicles from *Leishmania sp.* *Biochem. Biophys. Acta.* **260**: 57-65.

Collado, D. 2014. Química de Heterociclos. Quinolina e Isoquinolina. Capítulo sexto de temario de la Asignatura Ampliación de Química Orgánica Avanzada. Quinolina e isoquinolina.

Coura, J.R. 2009. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **104(4)**: 549-554

Courchesne, W.E. 2002. Characterization of a novel, broad-based fungicidal activity for the antiarrhythmic drug amiodarone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**:195-199.

Croft, S.L., Coumbs, G.H. 2003. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* **19**: 502-508.

De Castro, S. L. 1993. The challenge of Chagas disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta. Trop.* **53**: 83-98.

De Sousa, W., de Carvalho, T., Barrias, E. 2010. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. *Int J Cell Biol.* **210**:1-18.

De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabo, I., Rizzuto, R. 2011. A forty-kilodalton proteon of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. 476: 108-111.

Docampo, R. (1981). Biochemical and ultrastructural alterations produced by miconazole and econazole in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **3**: 169-180.

Docampo, R., Vercesi, A.E. 1989a. Ca²⁺ transport by coupled *Trypanosoma cruzi* mitochondria *in situ*. *J. Biol. Chem.* **264**: 108-111.

Docampo, R., Vercesi, A.E. 1989b. Characteristics of Ca²⁺ transport by *Trypanosoma cruzi* mitochondria *in situ*. *Arch. Biochem. Biophys.* **272**: 122-129.

Docampo, R., 1990. Sensitivity of parasites to free radical damage by parasitic drugs. *Chem. Biol. Interact.* **73**: 1-27.

Docampo, R., Pignataro, O.P. 1991. The inositol phosphate/diacylglycerol signalling pathway in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* **275**: 407-411.

Docampo, R., Gadelha, F.R., Moreno, S.N.J., Benaim, G., Hoffmann, M.E., Vercesi, A.E. 1993. Disruption of Ca²⁺ homeostasis in *Trypanosoma cruzi* by cristal violet. *J. Euk. Microbiol.* **40**: 311-316.

Docampo, R., Scott, D.A., Vercesi, A.E., Moreno, S.N.J. 1995. Intracellular Ca²⁺ Storage in Acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* **310**: 1005-1012.

Docampo, R., Moreno, S.N.J. 1996. The role of Ca²⁺ in the process of cell invasion by intracellular parasites. *Parasitol Today*. **12**: 615-619.

Docampo, R., Schmunis, G. A. 1997. Sterol biosynthesis inhibitors: potencial chemotherapeutics against Chagas disease. *Parasitol Today***13**: 129-130.

Docampo, R., Moreno, S. 2001. Biphosphonates as chemotherapeutic agents against Trypanosomatids and Apicomplexas parasites. *Curr. Drug Targets. Infec. Disord.***1**: 51-61.

Eilam, Y., El-On, J., Spira, D.T. 1985. *Leishmania major*: Excreted factor, calcium ions, and the survival of amastigotes. *Exp. Parasitol.***59**: 161-168.

Fabiato, A., Fabiato, F.J. 1979. Calculator Programs for Computing the Composition of the Solutions Containing Multiple Metals and Ligands Used for Experiments in Skinned Muscle Cells. *J. Physiol. (Paris)*.**75**: 463-505.

Fakhfakh, M., Fournet, A., Prina, E., Mouscadet, J.F., Franck, X., Hocque-miller, R., Figadere, B. 2003. Synthesis and biological evaluation of substituted quinolines: potential treatment of protozoal and retroviral coinfections. *Bioorg. Med. Chem.***11**: 5013-5023.

Fiske, C.H., Subbarow, Y. 1925. The Colorimetric Determination of Phosphorus. *J. Biol. Chem.***66**: 375-400.

Fonseca-Berzal, C., Merchán Arenas, D., Romero Bohórquez, A.R., Escario, J.A., Kouznetsov, V., Gómez-Barrio, A. 2013. Selective activity of 2,4-diaryl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and amastigotes expressing b-galactosidase. *Bioorganic. Medicinal. Chemistry Letters*.**23**:4851-4856.

Fournet, A., Gantier, J.C., Gautheret, A., Leysalles, L., Munos, M.H., Mayrargue, J., Moskowitz, H., Cave, A., Hoequemiller, R. 1994. The activity of 2-substituted quinoline alkaloids in BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chemother.* **33**:537-544.

Fournet, A., Rojas De Arias, A., Ferreira, M.E., Nakayama, H., Torres de Ortiz, S., Schinini, A., Samudio, M., Vera de Bilbao, N., Lavault, M., Bonte, F. 2000. Efficacy of the bisbenzylisoquinoline alkaloids in acute and chronic *Trypanosoma cruzi* murine model. *Int J Antimicrob Agents* **13**: 189-195.

Franck, X., Fournet, A., Prina, E., Mahieux, R., Hocquemiller, R., Figadere B. 2004. Biological evaluation of substituted quinolines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14**: 3635-3638.

Gantier, J.C., Fournet, A., Munoz, M.H., Hoequemiller, R. 1996. The effect of some 2-substituted quinolines isolated from *Galipea longiflora* on *Plasmodium vinckei petteri* infected mice. *Planta Med.* **62**:285-286.

Garzoni, L. R., Caldera, A., Meirelles, M. N. L., de Castro, S., Docampo, R., Meints, G., Oldfield, E., Urbina, J. 2004. Selective *in vitro* effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Antimicrob. Agents.***23**: 273-285.

Goad, L. J., Berens, R. L., Marr, J. J., Beach, D. H., Holz, G. G. 1989. The activity of Ketoconazole and other azoles against *Trypanosoma cruzi*: biochemistry and chemotherapeutic action *in vitro*. *Mol. Biochem. Parasitol.***32**: 179-190.

Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescent properties. *J. Biol. Chem.* **260**:3440-3450.

Heilbrunn, L.V., Wiercinski, F.J. 1947. The action of various cations on muscle protoplasm. *J. Cell Comp. Physiol.* **29**: 15-32.

Hernandez-Chinea, C., Carbajo, E., Sojo, F., Arvelo, F., Kouznetsov, VV., Romero-Bohórquez AR., Romero, PJ. 2015. In vitro activity of synthetic tetrahydroindeno[2,1-c]quinolines on *Leishmania mexicana*. *Parasitol Int.* **64**: 479-483.

Holwill, M.E.J., McGregor, J.L. 1976. Effects of Calcium on Flagellar Movement in the Trypanosome *Crithidia oncopelti*. *J. exp. Biol.* **65**: 229-242.

Hong-Gang, L., Zhong, L., Chang, K.P., Docampo, R. 1997. Intracellular Ca²⁺ pool content and signaling and expression of a calcium pump are linked to virulence in *Leishmania mexicanaamazonensis* amastigotes. *J. Biol. Chem.* **272**: 9464-9473.

Hyltdgaard, M., Mygind, T., Piotrowska, R., Foss, M., Meyer, R. 2015. Isoeugenol has a non-disruptive detergent-like mechanism of action. *Front. Microbiol.* **6**: 754-757.

Khraiweh, M.H., Lee, C.M., Brandy, Y., Akinboye, E. S., Berhe, S., Gittens, G., Abbas, M.M., Ampy, F.R., Ashraf, M., Bakare, O. 2012. Antitrypanosomal activities and cytotoxicity of some novel imido-substituted 1,4-naphthoquinone derivatives. *Arch. Pharm. Res.* **35**: 27-33

Kinnamon, K.E., Poon, B.T., Hanson, W.L., Waits, V.B. 1996. Primaquine analogues that are potent anti-*Trypanosoma cruzi* agents in a mouse model. *Ann Trop Med Parasitol* **90**: 467-474

Kinnamon, K.E., Poon, B.T., Hanson, W.L., Waits, V.B. 1997. Evidence that certain 8-aminoquinolines are potentially effective drugs against Chagas disease. *Ann Trop Med*

Parasitol **91**: 147-52.

Kouznetsov, V., Merchan, D.R., Arvelo, F., Forero, J.S., Sojo, F., Muñoz, A. 2010. 4-Hydroxy-3-methoxyphenyl Substituted 3-methyl-tetrahydroquinoline Derivatives obtained through Imino Diels-Alder reactions as potential antitumoral agents. *Drug Design. discovery.* **7**:632-639.

Kryshchshyn, A., Kaminsky, D., grellier, P., Lesyk, R. 2014. Trends in research of antitrypanosomal agents among synthetic heterocycles. *Eur J Med Chem.***85**:

Lackovic, K. 2010. Inhibitors of Leishmania GDP-mannose pyrophosphorylase identified by high-throughput screening of small-molecule chemical library. *Antimicro. Agents Chemother.* **54**: 1712-1719.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.***227**: 680-685.

Lechuga, G., Borges, J., Calvet, C., de Araujo, H., Zuma, A., do Nascimento, S., Motta, M., Bernardino, A., Prereira, M., Bouruignon, S. 2016. Interactions between 4-aminoquinoline and heme: Promising mechanism against *Trypanosoma cruzi*. *Inst. J. Parasitol Drugs Resist.* **6**: 154-164.

Lei, P., Ling, Y., Zhang, X., Wang, Q., Liu, X., Jiang, B., Yang, X., Xu, G. 2016. Synthesis and bioactivities of novel piperazine-containing 1,5-Diphenyl-2-penten-1-one analogues from natural product lead. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **26**: 1849-1853.

Loiseau, P.M., Cojean, S., Schrevel, J. 2011. Sitamaquine as a putative antileishmanial drug

candidate: from the mechanism of action to the risk of drug resistance. *Parasite*. **18**: 115–119.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.

Marino, A.P., Silva, A., Pinho, R., 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.

Mazumder, S., Mukherjee, T., Ghosh, J., Ray, M., Bhaduri, A. 1992. Allosteric modulation of *Leishmania donovani* plasma membrane Ca²⁺ATPase by endogenous calmodulin. *J Biol. Chem.* **267**:18440-18446.

McCabe, R. E., Remington, J. S., Araujo, F. G. 1986. *In vitro* and *in vivo* effects of itraconazole against *Trypanosoma cruzi*. *Am J. Trop. Med Hyg.* **35**: 280-284.

Mendoza, M., Mijares, A., Rojas, H., Ramos, M., DiPolo, R. 2001. *Trypanosoma evansi*: a convenient model for studying intracellular Ca²⁺ homeostasis using fluorometric ratio imaging from single parasites. *Exp Parasitol.* **99**(4):213-9.

Merchan, D. 2007. Eugenol, Precursor natural en la síntesis tetrahydroquinolina 2,4-diaril sustituidas. Tesis de Licenciatura. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.

Merchan, D. 2010. Fenilpropanos C6-C3 en la síntesis sostenible de nuevas moléculas tipo (neo) lignanos, agentes con potencial actividad antioxidante y antitumoral. Tesis de Maestria. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.

Molina, J., Martins-Filho, O., Brener, Z., Romanha, A.J., Loebenberg, D., Urbina, J.A. 2000. Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 150-155.

Moreno, S.N.J., Vercesi, A.E., Pignataro, O.P., Docampo, R. 1991. Calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes: presence of inositol phosphates and lack of an inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive calcium pool. *Mol. Biochem. Parasitol.* **52**: 251-262.

Morello, A., Lipchenca, I., Cassels, B.K., Speisky, H., Aldunate, J., Repetto, Y. 1994. Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol Pharmacol Toxicol Endocrinol* **107**: 367-371.

Morillo, C., Marin-Neto, J., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi, A., 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., Yusuf, S. 2015. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas Cardiomyopathy. *N.Engl. J. Med.* **3**: 72-79.

Morrow, C.D., Flory-Granger, B., Krassner, S.M. 1981. Effect of the ionophores A₂₃₁₈₇ and X-537A (Lasalocid) and of the divalent cations Ca²⁺, Mg²⁺, Ba²⁺ y Mn²⁺ on transformation in *Leishmania donovani*. *Comp. Biochem. Physiol.* **69A**: 65-72.

Mosman, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. *J. Immunol. Methods.* **65**: 55-63.

Mouscadet, J.F. Desmaele, D. 2010. Chemistry and structure-activity relationship of the styrylquinoline-type HIV integrase inhibitors. *Molecules*. **15**: 3048-3078.

Muñoz, A., Sojo, F., Merchan, D., Kouznetsov, V., Arvelo, F. 2010. Cytotoxic effects of new trans-2,4-diaryl-r-3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines and their interaction with antitumoral drugs gemcitabine and paclitaxel on cellular lines of human breast cancer. *Chem. Bio. Interactions*. **189**: 215-221.

Nakayama, H., Ferreira, M.E., Rojas, A., de Bilbao, N.V., Schinini, A., Fournet, A. 2001. Experimental treatment of chronic *Trypanosoma cruzi* infection in mice with 2-n-propylquinoline. *Phytother. Res*. **15**: 630-632.

Nakayama, H., Loiseau, P.M., Fournet, A. 2005. Efficacy of Orally Administered 2-Substituted Quinolines in Experimental Murine Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. **49**(12): 4950-4956.

Navarro, M.C., De Lima, A., Askue, J., Contreras, V. 2003. Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **98**: 81-93.

Nicotera, P., Zhivotovsky, B., Orrenius, S. 1994. Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium*. **16**: 279-288.

Niggli, V., Zurini, M., Carafoli, E. 1987. Purification, Reconstitution and Molecular Characterization of the Ca²⁺ Pump of Plasma Membranes. *Methods in Enzymology*. **139**: 791-808.

Nolan, D.P., Revelard, P., Pays, E. 1994. Overexpression and characterization of a gene for a Ca²⁺-ATPase of the endoplasmic reticulum in *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.***269**: 26045-26051.

Olivieri, B.P., Molina, J.T., de Castro, S.L., Pereira, M.C., Calvet, C.M., Urbina, J.A., Araujo-Jorge, T.C. 2010. A comparative study of posaconazole and benznidazole in the prevention of heart damage and promotion of trypanocidal immune response in a murine model of Chagas disease. *Int. J. Antimicrob. Agents***36(1)**: 79-83

OMS, 2010. 2014. Enfermedad de Chagas. Organización Mundial de la Salud

OMS.2016. Ultimos reportes de la Enfermedad de Chagas, Organización Mundial de la Salud.

Orrenius, S., McConckey, D.J., Bellomo, G., Nicotera, P. 1989. Role of Ca²⁺ in toxic cell Killing. *Trends Pharmacol. Sci.***10**: 281-285.

Oz, H.S., Wittner, M., Tanowitz, H.B., Bilezikian, J.P., Saxon, M., Morris, S.A. 1992. *Trypanosoma cruzi*: mechanisms of intracellular calcium homeostasis. *Exp. Parasitol.***74**: 390-399.

Page, R., Hamad, B., Kirkpatrick, P.2009.Dronedarone.*Nat. Rev. Drug. Discov.* **8**: 769-770.

Pagliero, R.J., Lusvarghi, S., Pierini, A.B., Bron, R., Mazzieri, M.R. 2010. Synthesis, stereoelectronic characterization and antiparasitic activity of new 1-benzenesulfonyl-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines. *Bioorg. Med. Chem.* **18(1)**: 142-150.

Philosoph, H., Zilberstein, D. 1989. Regulation of intracellular calcium in promastigotes of the human protozoan parasite *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.***264**: 10420-10424.

Pimentel, A.A., Felibertt, P., Sojo, F., Colman, L., Mayora, A., Silva, M.L., Rojas, H., Dipolo, R., Suarez, A.I., Compagnon, R.S., Arvelo, F., Galindo-Castro, I., De Sanctis, J.B., Chirino, P., Benaim, G. 2012. The marine sponge toxin agelasine B increases the intracellular Ca²⁺ concentration and induces apoptosis in human breast cancer cells (MCF-7). *Cancer. Chemother. Pharmacol.* **69**(1):71-83.

Podlipaev, S.A. 2000. Insect trypanosomatids: the need to know more. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **95**:517-522.

Prata, A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect. Dis.* **2**:92-100.

Rashad, A., Jones, A., Avery, V., Baell, J., Keller, P. 2014. Facile Synthesis and Preliminary Structure-Activity Analysis of New Sulfonamides Against *Trypanosoma brucei*. *ACS Med. Chem. Lett.* **5**: 496-500.

Ringer, S., Sainsbury, H. 1984. The action of potassium, sodium and calcium salts on *Tubifex rivulorum*. *J. Physiol. (London).* **16**: 1-9.

Rísquez, A., Rodriguez-Morales, A. 2009. Morbidity Related to Urban Summer Camp Activities in Scholars, Caracas, Venezuela. *Wilderness Environ. Med.* **21**: 174-176.

Romero-Bohorquez, A., Castillo-Garit, JA., Del Toro-Cortés, O., Kouznetsov, VV., Puentes, CO., Vega, MC., Rolón, M., Escario, JA., Gómez-Barrio, A., Marrero-Ponce, Y., Torrens, F., Abad, C. 2012. Identification in silico and in vitro of novel trypanosomicidal drug-like compounds. *Chem. Biol. Drug Des.* **80**: 38- 45.

Ruben, L., Egwuagu, C., Patton, C.L. 1983. African trypanosomes contain calmodulin which is distinct from host calmodulin. *Biochim. Biophys. Acta.***758**: 104-113.

Ruben, L., Hutchinson, A., Moehlman, J. 1991. Calcium homeostasis in *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.***266**: 24351-24358.

Serrano-Martín, X., García-Marchan, Y., Fernandez, A., Rodriguez, N. Rojas, H., Visbal, G., Benaim, G. 2009. Amiodarone destabilizes the intracellular Ca²⁺ homeostasis and the biosynthesis of sterols in *Leishmania mexicana*. *Antimicrob. Agents Chemother.***53**: 1403-1410.

Shanne, F.A.X., Kane, A.B., Young, E.E., Farber, J.L. 1979. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science.* **206**: 700-702.

Soto, SM. 2009. Human migration and infectious diseases. *Clinical Microbiol. Infect.* **1**:26-28.

Téllez-Iñon, M.T., Ulloa, R.M., Torruela, M., Torres, H.N. 1985. Calmodulin and Ca²⁺-dependent cyclic AMP phosphodiesterase activity in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.***17**: 143-153.

Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.***76**: 4350-4354.

Tsien, R.W., Tsien, R.Y. 1990. Calcium channels, stores and oscillations. *Ann. Rev. Cell Biol.* **6**: 715-760.

Urbina, J.A., Vivas, J., Ramos, H., Larralde, G., Aguilar, Z., Avian, L. 1988. Alteration of lipids order profile and permeability of plasma membrane from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes grow in the presence of ketoconazole. *Mol. Biochem. Parasitol.***30**: 185-196.

Urbina, J., Payares, G., Molina, J., Sanoja, C., Liendo, A., Lazard, K., Piras, M., Piras, R., Perez, N., Winckler, P., Ryley, J. 1996. Cure of short- and long- term experimental Chagas disease using D0870. *Science.***273**: 969-971.

Urbina, J.A., Lira, R., Visbal, G., Bartoli, J. 2000. *In vitro* antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 2498-2502.

Urbina, J., Docampo, R. 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *TRENDS Parasitol.***19**: 495-501.

Urbina, J. 2005. Nuevos avances en el desarrollo del tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas. Grupo Científico de Trabajo sobre Enfermedad de Chagas del Programa de Investigación y Docencia en Enfermedades Tropicales (TDR) de la Organización Mundial de la salud/Oficina Panamericana de la Salud, Buenos Aires, Argentina.

Urbina, J. A. 2009. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **104**: 311-318.

Ulrich, P., Cintron, R., Docampo, R. 2010. Calcium homeostasis and acidocalcisomes en *Trypanosoma cruzi*. In: De Souza W. (Ed.), Structures and organelles in pathogenic protists microbiology monographs 17, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 299-318

Van Voorhis, W., Gelb, M., Olepu, S., Suryadevara, P., Rivas, K., Yokoyama, K., Verlimde, C., Chakrabarti, D. 2007. 2-Oxo-tetrahydro-1,8-naphthyridines as selective inhibitors of malarial protein farnesyltransferase and as anti-malarials. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**: 494-497.

Vercesi, A.E., Macedo, D.V., Lima, S.A., Gadelha, F.R., Docampo, R. 1990. Ca²⁺ transport in digitonin-permeabilized trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* **42**: 119-124.

Vercesi, A.E., Bernardes, C.F., Hoffmann, M.E., Gadelha, F.R., Docampo, R. 1991. Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ. *J. Biol. Chem.* **266**: 14431-14434.

Vercesi, A.E., Docampo, R. 1992. Ca²⁺ transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca²⁺ pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. *Biochem. J.* **284**: 463-467.

Vercesi, A.E., Moreno, S.N.J., Docampo, R. 1994. Ca²⁺/H⁺ Exchange in Acidic Vacuoles of *Trypanosoma brucei*. *Biochem. J.* **304**: 227-233.

Vercesi, A.E., Rodrigues, C.O., Catisti, R., Docampo, R. 2000. Presence of a Na⁺/H⁺ exchanger in acidocalcisomes of *Leishmania donovani* and their alkalization by anti-leishmanial drugs. *FEBS. Lett.* **473**: 203-206.

Walter, M.F., Schultz, J.E. 1981. Calcium receptor protein calmodulin isolated from cilia and cells of *Paramecium tetraurelia*. *J. Cell.Biol.***24**: 97-100.

Worthen,