



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

EFECTO DE COMBINACIONES DE BENZNIDAZOL Y
TETRAHIDROQUINOLINAS SUSTITUIDAS SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE
***Trypanosoma cruzi* Y SU Ca^{2+} -ATPasa DE MEMBRANA PLASMÁTICA**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller **Daniela Al'Nair José Plasencia De Freitas** como requisito parcial para optar al título de Licenciada en Biología.

Tutor: Dra. Vincenza Cervino

CARACAS, VENEZUELA

Julio – 2018

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, Graciela, y a mi padre, Víctor,
Por procurar darme una buena educación y calidad de vida, así como enseñarme el sentido
de la responsabilidad y del trabajo bien hecho. Y por soportarme. Los amo.

A mi novio, Roosevelt,
Eres mi persona y compañero de vida, gracias por enseñarme a ser verdaderamente
auténtica en lo que hago y quiero. Espero poder compartir contigo más eternidades. Te amo.

A mi tutora, Dra. Vincenza Cervino,
Por la(s) oportunidad(es) de trabajar en su Laboratorio, por las enseñanzas, consejos y su
infinita paciencia.

A mis jurados, Dr. Francisco Arvelo y Dra. Valentina Salas,
Por sus aportes y apoyo continuo.

Al Lic. Felipe Sojo,
Por el inmenso apoyo en el desarrollo de este TEG, tanto en el diseño experimental como al
aclarar mis dudas.

A la Dra. María Carolina Pérez y el Lab. De Fisiología de Membranas (IBE),
Por sus consejos y enseñanzas, así como por permitirme utilizar las instalaciones del
Laboratorio para desarrollar parte de mi TEG.

A la MSc. Fabiola Mejías y a la Dra. Francehulli Dagger en el Lab. De Bioquímica de Parásitos
(IBE),
Por el apoyo brindado, así como reactivos e instalaciones que amablemente me cedieron.

A la Dra. Cristina Sanoja,
Por sus recomendaciones, apoyo e interés continuo en el desarrollo de mi TEG.

Al Dr. Alexander Laurentín, al Lic. José Sánchez y a Esthefany Souquett, en el Lab. De
Polisacáridos Vegetales (IBE),
Por prestarme sus equipos e instalaciones.

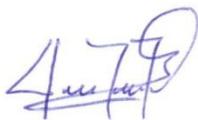
A la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, particularmente a los
excelentes docentes que me formaron como bióloga y científica.

Gracias a todos.

DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DEL (LA) BACHILLER Br. Daniela Al’Nair José Plasencia De Freitas

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 del (la) Br. Daniela Al’Nair José Plasencia De Freitas, C.I.: 23.947.179, titulado “**Efecto de combinaciones de Benznidazol y tetrahydroquinolinas sustituidas sobre la proliferación de *Trypanosoma cruzi* y su Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática**”, para optar al título de Licenciado(a) en Biología, considerando que el trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos APROBADO.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en la ciudad de Caracas, a los veinte días del mes de julio del año dos mil dieciocho, dejando constar que la profesora Vincenza Cervino actuó como Coordinador del jurado examinador.



Prof. Francisco Arvelo

Jurado



Prof. Valentina Salas

Jurado



Prof. Vincenza Cervino

Tutor

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. La Enfermedad de Chagas.....	1
2. <i>Trypanosoma cruzi</i> : agente causal	3
3. Tratamiento actual para la enfermedad de Chagas	5
4. El calcio en humanos y tripanosomatidios	11
5. Compuestos naturales como fuente de posibles drogas	15
6. Terapias combinadas como estrategia de tratamiento	16
7. Análisis bioinformático para predecir acoplamientos	18
II. ANTECEDENTES	19
III. OBJETIVOS.....	28
1. Objetivo General.....	28
2. Objetivos Específicos.....	28
IV. MATERIALES.....	29
1. Reactivos	29
2. Material biológico	29
V. METODOLOGÍA.....	30
1. Cultivo de parásitos	30
2. Curva de proliferación de <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
3. Evaluación del efecto del Benznidazol y de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM191 y DM231, sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
4. Evaluación del efecto de las combinaciones de Benznidazol y las tetrahydroquinolinas sustituidas DM191 y DM231 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
5. Obtención de vesículas de membrana plasmática de <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
6. Determinación del efecto del Benznidazol y de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM191 y DM231, solos y combinados, sobre la actividad de la Ca ²⁺ -ATPasa de membrana plasmática de <i>Trypanosoma cruzi</i>	35
7. Determinación de la concentración de proteínas.....	37
8. Análisis de acoplamiento molecular	37
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
1. Curva de crecimiento de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
2. Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM191, DM231 y Benznidazol sobre la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	39
2.1. Efectos de la combinación de Benznidazol y la tetrahydroquinolina sustituida DM231 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	41
2.2. Efectos de las combinaciones de Benznidazol y la tetrahydroquinolina sustituida DM191 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	46
2.3. Efectos de la combinación de las tetrahydroquinolinas DM231 y DM191 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	51
3. Efectos de las combinaciones de Benznidazol y tetrahydroquinolinas sustituidas sobre la actividad Ca ²⁺ -ATPasa de epimastigotes <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
4. Análisis de acoplamiento molecular	68
VII. CONCLUSIONES.....	76

VIII.RECOMENDACIONES.....	78
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la enfermedad de Chagas en Venezuela.	2
Figura 2. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> en chipos y humanos.	5
Figura 3. Benznidazol. Fuente: PubChem (CID: 31593).....	7
Figura 4. Reacciones de reducción secuenciales para el grupo nitro, presente en el Benznidazol. Tomado de: Docampo y Moreno, 1984.	9
Figura 5. Modelo estructural de la Ca ²⁺ -ATPasa de membrana plasmática.	13
Figura 6. Ciclo catalítico de la Ca-ATPasa de membrana plasmática.....	14
Figura 7. Síntesis de 1,2,3,4-tetrahidroquinolinas según reacción de cicloadición imino Diels-Adler.	16
Figura 8. Tetrahidroquinolinas sustituidas DM191 y DM231.	24
Figura 9. Curva de crecimiento de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
Figura 10. Efecto de la combinación del Benznidazol con la tetrahidroquinolina DM231 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> : efecto del Benznidazol sobre DM231.....	43
Figura 11. Efecto de la combinación de la tetrahidroquinolina DM231 con el Benznidazol sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> : efecto de DM231 sobre el Benznidazol.	45
Figura 12. Efecto de la combinación del Benznidazol con la tetrahidroquinolina DM191 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> : efecto del Benznidazol sobre DM191.....	48
Figura 13. Efecto de la combinación de la tetrahidroquinolina DM191 con el Benznidazol sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> : efecto de DM191 sobre el Benznidazol.	50
Figura 14. Efecto de la combinación de las tetrahidroquinolinas DM231 y DM191 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> : efecto de DM231 sobre DM191.....	53
Figura 15. Efecto de la combinación de las tetrahidroquinolinas DM231 y DM191 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> : efecto de DM191 sobre DM231.....	55
Figura 16. Efecto del Benznidazol y de la tetrahidroquinolina DM231, de manera individual y combinados, sobre la actividad de la Ca ²⁺ -ATPasa de membrana plasmática de <i>Trypanosoma cruzi</i>	63
Figura 17. Efecto del Benznidazol y de la tetrahidroquinolina DM191, de manera individual y combinados, sobre la actividad de la Ca ²⁺ -ATPasa de membrana plasmática de <i>Trypanosoma cruzi</i>	65
Figura 18. Efecto de las tetrahidroquinolinas DM231 y DM191, de manera individual y combinadas, sobre la actividad de la Ca ²⁺ -ATPasa de membrana plasmática de <i>Trypanosoma cruzi</i>	66
Figura 19. Estructura 3D de la Ca ²⁺ -ATPasa de membrana plasmática de <i>Trypanosoma cruzi</i>	69
Figura 20. Modelos esturcturales 3D para el Benznidazol, DM231 y DM191, y clasificación de sus posibles receptores.....	70
Figura 21. Predicciones topológicas para la Ca ²⁺ -ATPasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>	71

Figura 22. Estructuras 3D de los mejores acoplamientos de los compuestos sobre la PMCA de *T. cruzi*. 73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos que ejercen efectos sobre la homeóstasis de calcio en <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
Tabla 2. Resultados obtenidos por Villarroel, 2017, al ensayar diferentes tetrahydroquinolinas sustituidas y Benznidazol, sobre la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> y su PMCA.	23
Tabla 3. Resultados obtenidos por García, 2017, al ensayar diferentes tetrahydroquinolinas sustituidas y Benznidazol, sobre la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> y su PMCA... ..	24
Tabla 4. Inhibición de la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> por las Tetrahydroquinolinas DM191 y 231 y el Benznidazol a una concentración de 30 μ M.	40
Tabla 5. Valores para el 50% de inhibición de la proliferación teórico (IC_{50CT}) y experimentales (IC_{50CE}), e índices de combinación (CI) obtenidos para la combinación Benznidazol–DM231.	46
Tabla 6. Valores para el 50% de inhibición de la proliferación teórico (IC_{50CT}) y experimentales (IC_{50CE}), e índices de combinación (CI) obtenidos para la combinación Benznidazol–DM191.	51
Tabla 7. Valores para el 50% de inhibición de la proliferación teórico (IC_{50CT}) y experimentales (IC_{50CE}), e índices de combinación (CI) obtenidos para la combinación DM231–DM191.	56
Tabla 8. Actividad Ca^{2+} -ATPasa obtenida al ensayar los compuestos, solos y combinados, respecto a la actividad control.	67
Tabla 9. Valores de energía de acoplamiento obtenidos para los compuestos con la PMCA.	72
Tabla 10. Resultados <i>in vitro</i> sobre epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> y su PMCA.....	76

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una parasitosis endémica de América, potencialmente mortal, que afecta a más de 8 millones de personas, causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*. Actualmente existen dos tratamientos: el Nifurtimox y el Benznidazol, que aunque eficaces como tripanocidas en la fase aguda de la enfermedad, son deficientes en la fase crónica, generando efectos secundarios perjudiciales en el paciente y resistencia en el parásito, por lo que las investigaciones han avanzado hacia el desarrollo de nuevas clases de tripanocidas derivados de productos naturales, que pudiesen minimizar los problemas antes mencionados. Muchos de los efectos de drogas tripanocidas han sido relacionados con la alteración de la homeostasis intracelular de Ca^{2+} , lo cual conlleva a la pérdida de viabilidad del parásito, describiéndose así como posibles blancos a los distintos sistemas encargados de la regulación del Ca^{2+} intracelular, entre ellos la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA), la cual está siendo considerada como un posible blanco de acción de drogas. En este sentido, dos tetrahydroquinolinas sustituidas derivadas de plantas de clavo y canela (DM191 y DM231), tienen un importante efecto antiproliferativo en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, observándose que las mismas provocan la alteración de la homeostasis de Ca^{2+} . Considerando las ventajas de las terapias combinadas, las cuales permiten disminuir la dosis de los medicamentos usados potenciando sus efectos y minimizando el riesgo de generar resistencia, en este proyecto se evaluó el efecto de las combinaciones del Benznidazol y las tetrahydroquinolinas DM231 y DM191 sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*, obteniéndose un efecto sinérgico en todos los casos, observándose además un efecto importante de las mismas sobre la actividad de la PMCA del parásito sin afectar la PMCA de humanos. Estudios *in silico* de acoplamiento molecular evidenciaron también la posibilidad de interacción de estos compuestos con la proteína, sugiriéndose así la posibilidad de que esta enzima sea blanco de acción de compuestos tripanocidas que afecten la homeostasis de Ca^{2+} en este parásito.

Palabras clave:

Trypanosoma cruzi, Benznidazol, tetrahydroquinolina, PMCA, sinergismo

I. INTRODUCCIÓN

1. La Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, también conocida como Mal de Chagas o Trypanosomiasis americana, es una parasitosis endémica de América, potencialmente mortal, causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi* (OMS, 2017). Está categorizada como una de las 17 enfermedades tropicales desatendidas, las cuales tienen en común el hecho que se desarrollan principalmente en zonas tropicales y empobrecidas, siendo padecimientos ignorados al afectar sobre todo a personas de escasos recursos en países en vías de desarrollo (Savioli y Daumeri, 2010). Actualmente, se estima que mundialmente existen de 8 a 15 millones de personas infectadas (Armada y col., 2015). La mayor parte de estas personas se localizan en América Latina, distribuidas desde México hasta Argentina (Armada y col., 2015), no obstante, dado a los cambios en patrones migratorios, ha progresado hacia áreas más urbanizadas y continentes donde previamente no estaba presente (WHO, 2015).

En Venezuela, *T. cruzi* se encontró por primera vez en el triatomino *Rhodnius prolixus* (Tejera, 1919). Inicialmente, se categorizaron a 16 estados del país como zonas endémicas (Carrasco y col., 2012) (Figura 1). Sin embargo, desde hace algunos años ha existido un repunte en los casos, con focos agudos recientes en la región capital, los estados Vargas, Cojedes, Lara y el oriente-sur del país (Alarcón de Noya y col., 2010; Berrizbeitia y col., 2010; Morocoima y col., 2008; Noya-Alarcón y col., 2011) (Figura 1).

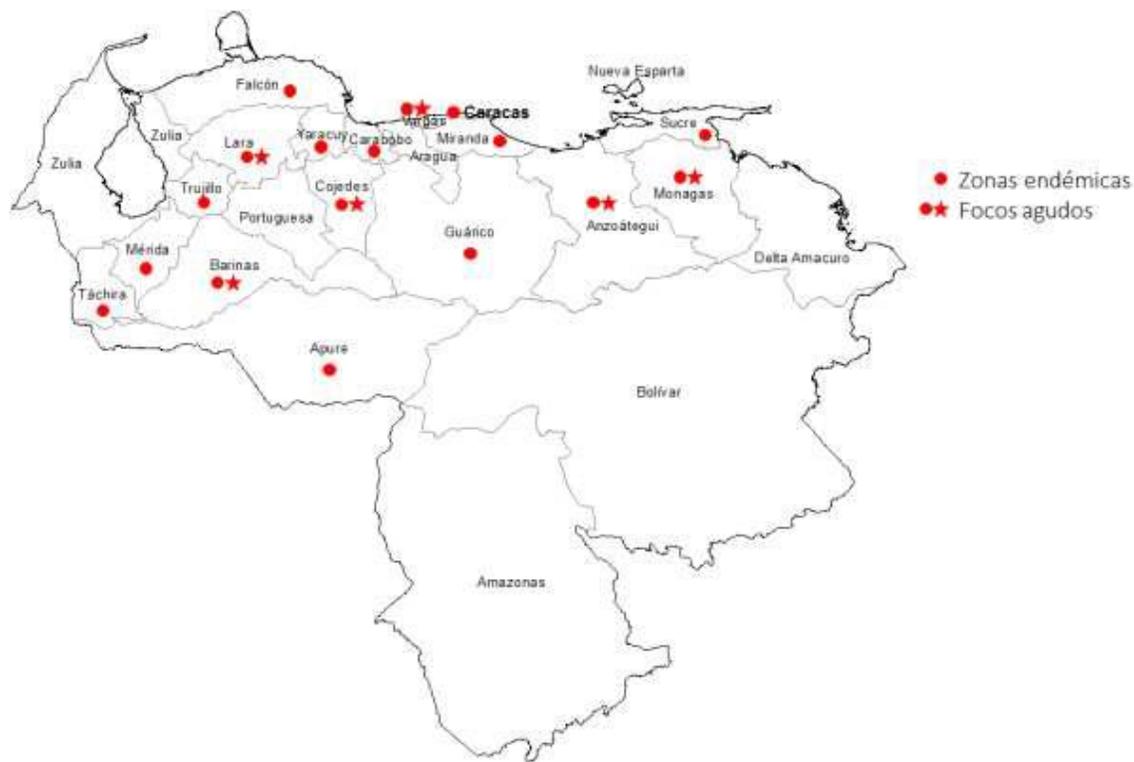


Figura 1. Distribución de la enfermedad de Chagas en Venezuela.
Tomada de García, 2017.

La enfermedad de Chagas se transmite principalmente por cuatro vías: vectorial, por transfusión sanguínea, transplacentaria y oral (Armada y col., 2015). De éstas, la más común es la transmisión vectorial, causante de hasta un 80% de las infecciones (Pinto-Días, 2000). Los vectores transmisores son principalmente de hábitos hematofágicos, como insectos hematófagos (Hemíptera, Reduviidae, Triatominae), conocidos comúnmente en Venezuela como chipos (Armada y col., 2015). Otras formas de transmisión menos comunes son los accidentes de laboratorio, el manejo de animales infectados, trasplante de órganos, y a través de la leche materna (Armada y col, 2015, Toso y col., 2011).

La enfermedad evoluciona en dos fases: aguda y crónica (Avedaño-Rangel y Rey, 2016). La fase aguda es la primera etapa de la enfermedad, pudiendo ser asintomática,

presentar síntomas inespecíficos o un cuadro clínico severo (Toso y col., 2011). En esta fase, los parásitos se pueden encontrar en el torrente sanguíneo, y si existen síntomas, se presentan como: malestar general, vómitos, diarrea, y hepato, adeno y esplenomegalia (Toso y col., 2011). A esta fase generalmente le sigue un período de duración variable, donde el individuo es asintomático (Landaeta, 2016). Por su parte, en la fase crónica, del 20 al 30% de los infectados, evolucionan a un grado de daño en 10 a 30 años, particularmente desarrollando alguna cardiopatía, mientras el resto se mantiene asintomático en una especie de balance inmunológico parásito–hospedador (Armada y col., 2015). En esta etapa, los parásitos se han alojado en el tracto digestivo, sistema nervioso y principalmente en el corazón, causando lesiones y pudiendo desencadenar en la incapacidad y muerte del afectado (Avedaño–Rangel y Rey, 2016).

2. *Trypanosoma cruzi*: agente causal

El *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la Enfermedad de Chagas, pertenece al filo Euglenozoa, clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastida, y familia Trypanosomatidae, cuya característica distintiva es la presencia del kinetoplasto, un organelo consistente en una red de ADN extranuclear, localizada en un punto específico de la mitocondria (ASP, 2017). Dependiendo del hospedero en que se encuentre, *T. cruzi* adopta diferentes formas celulares: epimastigote, tripomastigote y amastigote (Toso y col., 2011). El epimastigote es un estadio extracelular y replicativo del parásito, presente en el tracto digestivo del triatomino vector. Por su parte, el tripomastigote es un estadio extracelular no replicativo más sí infectivo, localizado en la sangre de los mamíferos (tripomastigote sanguíneo), en el intestino posterior de los vectores y en sus deyecciones (tripomastigote metacíclico). Por

último, el amastigote es la forma intracelular replicativa del parásito encontrado en las células de mamífero (Toso y col., 2011).

Su ciclo biológico consta de dos etapas generales, según su huésped: una en el vector y otra en el mamífero. Partiendo desde un mamífero infectado, estarán como amastigotes replicándose en sus tejidos; éstos romperán la célula que habitan quedando libres en el torrente sanguíneo, donde se transforman a tripomastigotes, pudiendo alcanzar nuevas células e infectarlas. Si un triatomino pica y succiona la sangre del mamífero, queda infectado. En él, los parásitos se transforman a su estadio epimastigote, recorriendo el tracto digestivo del invertebrado hasta alcanzar el intestino posterior, donde pasan a ser tripomastigotes metacíclicos. Cuando el invertebrado pica a otro mamífero para alimentarse, defeca simultáneamente, expulsando así el contenido de su tracto digestivo sobre la herida que realizó su probócido, permitiéndole al parásito ingresar al mamífero como tripomastigote metacíclico, que al penetrar las células adyacentes o ser fagocitado por los macrófagos, se convierte en amastigote, replicándose e iniciando el ciclo nuevamente (Romero, 2007) (Fig.2).

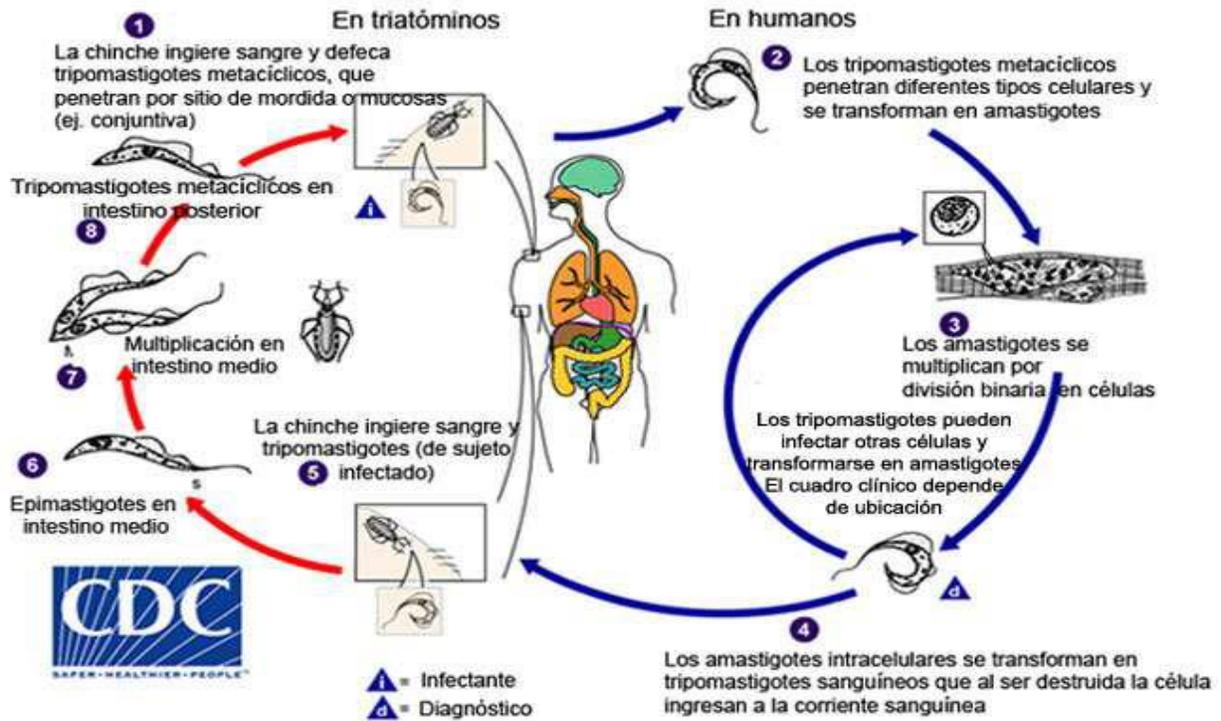


Figura 2. Ciclo de vida de *T. cruzi* en chipos y humanos.
 Modificado de: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>.

3. Tratamiento actual para la enfermedad de Chagas

Hasta ahora, no se visualiza el desarrollo de una vacuna contra la enfermedad, por lo que la investigación se ha centrado en la formulación de drogas como posibles tratamientos (Hall y Wilkinson, 2012), y en la comprensión de los mecanismos de acción de los fármacos actuales y las resistencias a ellos (González y col., 2017). Se ha propuesto que existe una correlación directa entre la parasitemia y el desarrollo de la infección (Bonney y Engman, 2015), por ello, el desarrollo de fármacos se ha enfocado hacia la eliminación del parásito,

para así disminuir la probabilidad del desarrollo de patologías y, además, cortar la cadena de transmisión (Armada y col., 2015).

Los fármacos tripanocidas clásicos aprobados hasta ahora para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son Nifurtimox (3-metil-4-(nitrofurfurilidenamina)-tetrahidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido), un derivado nitrofuránico (Lampit®, Laboratorio Bayer); y el Benznidazol (N-benzil-2-nitroimidazol acetamida) (Figura 3), un derivado nitroimidazólico (Apt y col., 2008; Viotti y col., 2009). Entre ambos, el Benznidazol es el más utilizado, dado que es mejor tolerado por los pacientes (Rajão y col., 2014). Se considera que ambos actúan mediante la formación de radicales libres y metabolitos electrofílicos tóxicos para el parásito, que pueden unirse covalentemente a macromoléculas como proteínas, lípidos y DNA, pudiendo inactivarlas (Viotti y col., 2009, Vinaud y De Souza, 2017). A pesar de ser eficaces en la fase aguda de la enfermedad, no existe efectividad comprobada para la fase crónica (Castro, 2014), y tanto el Benznidazol como el Nifurtimox generan efectos adversos en las personas medicadas. En el caso del Benznidazol, pueden presentarse síntomas de hipersensibilidad, como dermatitis, erupciones, edemas generalizados y fiebre, pudiendo desarrollarse cuadros más severos que involucren depresión de la médula ósea y agranulocitosis, existiendo incluso riesgo de mutagénesis si se utiliza en terapias a largo plazo (Castro, 2014).

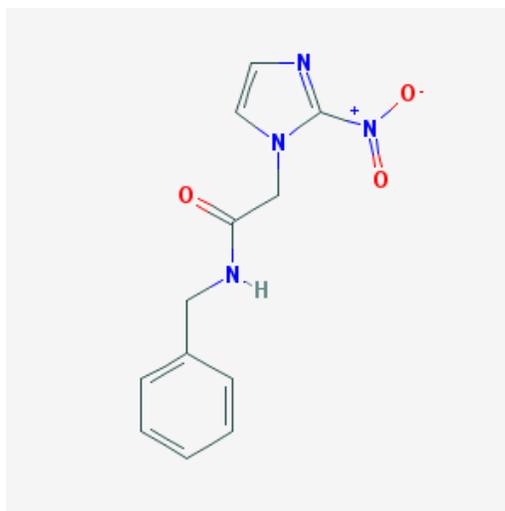


Figura 3. Benznidazol. Fuente: PubChem (CID: 31593).

Hasta los momentos, no se ha definido un mecanismo de acción concreto para el Benznidazol. Este compuesto es una pro-droga, que requiere ser activada por reducción dentro del parásito para ejercer su actividad (Vinaud y De Souza, 2017), siendo posible que entre a la célula por difusión pasiva favorecida por su velocidad de reducción intracelular (Ings y col., 1974). Dentro de la célula, una nitroreductasa tipo I dependiente de NADH, lo reduce (Hall y col., 2011; Hall y Wilkinson, 2012), generándose una serie de reacciones que inician con la formación del radical aniónico nitro (Figura 4), pudiendo ser éste o cualquiera de los productos subsiguientes el responsable de la citotoxicidad del compuesto (Docampo y Moreno, 1984). Por una parte, en condiciones aerobias, el grupo nitro es oxidado rápidamente por oxígeno molecular, regenerándose el grupo nitro y produciéndose el ión superóxido (O_2^-), cuya dismutación resulta en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Docampo y Moreno, 1984), siendo ambas especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés). Estas especies son tóxicas para el parásito, al generarle estrés oxidativo intenso (Vinaud y De Souza, 2017), pudiendo ser efectivas contra él ya que *T.*

cruzi posee mecanismos de defensa insuficientes contra hidroperóxidos: aunque tiene superóxido dismutasas, no posee catalasas (Docampo y col., 1976) ni glutatión-peroxidasa (Boveris y col., 1980). Sin embargo, se ha evidenciado que el Benznidazol (a diferencia del Nifurtimox) no genera ROS en concentraciones tales que puedan inhibir el crecimiento de *T. cruzi*, por lo que no se considera que su mecanismo de acción sea dependiente de éstas (Moreno y col., 1982).

En este sentido, se propone más bien que los metabolitos reactivos del Benznidazol actúan por unión a macromoléculas como lípidos, DNA (del kinetoplástido y del núcleo), RNA y proteínas, pudiendo inhibir su síntesis (Polak y Richle, 1978), promover daño y rupturas al DNA (Rajão y col., 2013; Goijman y col., 1985), y fomentar la degradación macromolecular (Goijman y col., 1985; Goijman y Stoppani, 1985). Asimismo, se ha evidenciado que el Benznidazol inhibe la NADH-fumarato reductasa de *T. cruzi* (Turrens y col., 1996), por lo que podría estar ejerciendo una acción directa sobre dicha molécula. Se plantea además la conjugación del Benznidazol a tioles macromoleculares (como las cisteínas en las proteínas), como parte del mecanismo de acción del compuesto (Maya y col., 2004). Adicionalmente, algunas reacciones no enzimáticas con el Benznidazol, generan glioxal, un compuesto altamente tóxico que puede influir en la muerte celular del parásito (Hall y Wilkinson, 2012). En general, el Benznidazol ejerce efectos pleiotrópicos aparentemente derivados de un mecanismo de acción basado en la actividad de sus metabolitos reducidos sobre macromoléculas del parásito (Díaz de Toranzo y col., 1988).

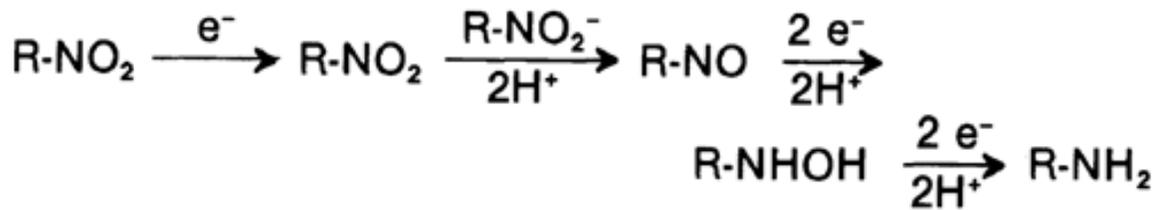


Figura 4. Reacciones de reducción secuenciales para el grupo nitro, presente en el Benznidazol. Tomado de: Docampo y Moreno, 1984.

Los posibles efectos adversos generados por las especies reactivas de oxígeno que pudiesen presentarse por la reducción del Benznidazol en humanos no se consideran relevantes, dado que existen suficientes mecanismos de defensa contra ellos en mamíferos (Docampo y Moreno, 1984), Por otra parte, la ausencia de un homólogo de la enzima nitroreductasa tipo I en mamíferos pudiese explicar la toxicidad selectiva del Benznidazol (Patterson y Wyllie, 2014). A pesar de ello, aún se presentan efectos secundarios adversos, y ésto aunado a la falta de efectividad en la fase crónica de la enfermedad han propiciado la búsqueda de nuevos posibles fármacos y/o blancos en el parásito.

En este sentido, diferentes investigadores reportaron otros posibles fármacos con una importante actividad antiproliferativa en *T. cruzi*, observándose que los mismos ejercían su efecto a través de distintos mecanismos de acción. Entre ellos, se encuentran los derivados triazólicos (como el posaconazol y ketoconazol) que actúan como inhibidores de la síntesis del ergosterol, un esteroles esencial para *T. cruzi*, y la homeostasis de calcio (Apt y Zulantay, 2011, Urbina, 2010). Asimismo, los inhibidores de cisteín-proteasas bloquean la cruzipaina, una proteasa esencial del parásito. Además, ciertos derivados del benzimidazol ejercen un efecto sobre el metabolismo de la glucosa (Velázquez-López y col., 2016),

mientras que el cristal violeta, la amiodarona y dronedarona (ambos antiarrítmicos) y la miltefosina, tienen un efecto sobre la homeostasis de calcio del parásito (Benaim y col., 1993, 2006, 2012; Benaim y Paniz-Mondolfi, 2012). Entre estos mecanismos, es de interés destacar la disrupción de la homeóstasis de calcio en el tripanosomatidio, que se posiciona como un blanco atractivo para fármacos tripanocidas al ser el calcio un regulador biológico universal. En la Tabla 1 se resumen los efectos ejercidos por diversos compuestos sobre distintos mecanismos involucrados en el mantenimiento de la homeóstasis de calcio en *T. cruzi*.

Tabla 1. Compuestos que ejercen efectos sobre la homeóstasis de calcio en *Trypanosoma cruzi*.

Compuesto	Efecto sobre <i>T. cruzi</i>	Referencia
	- Inhibe la PMCA,	
Cristal violeta	-Induce un colapso del potencial de membrana mitocondrial y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa en epimastigotes.	Benaím y García, 2011
Amiodarona	- Induce la liberación de Ca ²⁺ del mitocondrion y de los acidocalcisomas,	
	- Inhibe la oxidoescualeno ciclasa (enzima clave en la biosíntesis del ergosterol),	Benaím y col., 2012
	- Inhibe la proliferación del parásito.	
Dronedarona	- Altera la homeóstasis del calcio mediante la alcalinización de los acidocalcisomas,	Benaím y col., 2012
	- Disipa el potencial mitocondrial.	
Miltefosina	- Induce el colapso del potencial mitocondrial	
	- Promueve la salida de Ca ²⁺ desde los acidocalcisomas	Benaím y col., 2012

4. El calcio en humanos y tripanosomatidios

El Ca^{2+} es un catión que actúa como un segundo mensajero y regulador enzimático, involucrado en procesos tales como la fosforilación oxidativa, la digestión, la división celular y la apoptosis (Carafoli y Klee, 1999), estando así relacionado con el control de funciones celulares que abarcan desde su generación y diferenciación, hasta su muerte programada. En eucariotas inferiores, como los tripanosomatidios, el Ca^{2+} ejerce un papel importante al estar implicado en funciones vitales como el movimiento flagelar, la diferenciación, la despolarización de los microtúbulos y liberación de glicoproteínas (Benaim y Cervino, 2000; Pérez-Gordones, 2011).

En la mayor parte de los eucariotas superiores, la concentración extracelular de Ca^{2+} es $\leq 2\text{mM}$, mientras que su concentración intracelular oscila entre 50 y 100 nM (Carafoli, 1987), generándose así un marcado gradiente de concentración de cuatro órdenes de magnitud. El hecho de que el gradiente de concentración intracelular-extracelular de este ión sea tan amplio y que, en consecuencia, se genere una fuerza electroquímica de gran magnitud, son aspectos convenientes para su papel como regulador, dado que cualquier cambio en la permeabilidad de la membrana al Ca^{2+} inducido por un estímulo fisiológico producirá fluctuaciones importantes en su concentración citosólica (Carafoli, 1987). Teniendo esto en cuenta, interrumpir de alguna forma su homeostasis tendría consecuencias importantes en el ser vivo.

Este gradiente es mantenido por un conjunto de sistemas reguladores del Ca^{2+} localizados en organelos intracelulares y en la membrana plasmática. Adicionalmente, en las células se encuentran canales dependientes de voltaje e intercambiadores, que también

juegan un papel importante en el proceso de señalización, así como proteínas citosólicas sensoras de Ca^{2+} que modulan temporal y espacialmente su acción señalizadora (Brini y col., 2013). En este sentido, también se ha evidenciado que los tripanosomatidios mantienen igualmente un marcado gradiente entre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y la de su entorno extracelular (Pérez-Gordones, 2011).

En mamíferos se han descrito principalmente tres sistemas reguladores de Ca^{2+} : un uniporte electroforético de Ca^{2+} mitocondrial, una Ca^{2+} -ATPasa de retículo endo(sarco)plasmático (SERCA) y una Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA). La PMCA y SERCA son clasificadas dentro del grupo de bombas iónicas tipo P, ya que durante su ciclo catalítico forman un intermediario fosforilado de alta energía (Figura 6) (Brini y col., 2013; Docampo y Huang, 2015). Asimismo, en tripanosomatidios se han descrito los mismos sistemas transportadores reportados en eucariota superiores, resaltando una PMCA, dependiente de Mg^{2+} y estimulable por calmodulina, que representa la única enzima encargada de expulsar Ca^{2+} desde el interior celular, siendo ésta la responsable de la regulación fina de este ión. Además, en estos parásitos se ha reportado también la presencia de una Ca^{2+} -ATPasa vacuolar en reservorios acídicos de estos organismos, denominados acidocalcisomas (Cervino y Benaim, 2014; Carafoli y Krebs, 2016)

La PMCA (Figura 5) está constituida por diez segmentos de membrana tipo hélice (1 a 10 en la Figura 5), estando cerca del 80% de la proteína expuesta hacia el lado citosólico de la membrana (Carafoli, 1994). Su sitio activo se localiza en el dominio que abarca las regiones M3 y M5, y comprende un ácido aspártico, que es fosforilado por el ATP, y una lisina, a la cual se une el ATP (Carafoli, 1992). Adicionalmente, posee numerosas regiones

reguladoras, destacando la zona entre M2 y M3, donde ocurre la regulación por fosfolípidos, y el dominio C-terminal, rico en zonas reguladoras, por ejemplo, por fosfolípidos (Zvaritch y col., 1990), el sitio de fosforilación mediado por proteínas quinasas dependiente de AMPc (James y col., 1989) y el sitio de fosforilación mediado por proteínas quinasas C (Wang y col., 1991). Además, se encuentra la región de regulación por Calmodulina, principal modulador proteico de la enzima (Hofmann y col., 1993).

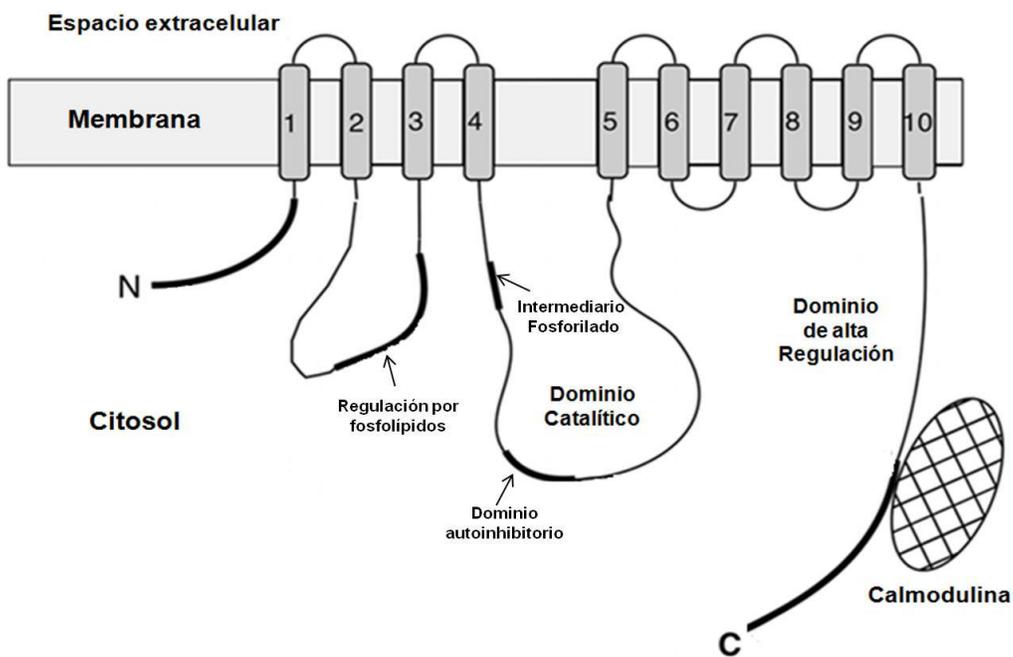


Figura 5. Modelo estructural de la Ca²⁺-ATPasa de membrana plasmática.

El esquema representa una PMCA estimulada por calmodulina. N: región N-terminal; C: región C-terminal. Los rectángulos del 1 al 10 corresponden a las regiones transmembrana. El dominio catalítico representa la zona donde se ubica el sitio activo, en el cual se forma el intermediario fosforilado. Tomada de Strehler y col., 2007, y modificada por Pérez-Gordones, 2011.

Su ciclo catalítico comprende cambios en su estructura secundaria con aparición de dos principales estados conformacionales intermedios, E₁ y E₂ (Figura 6). En su conformación E₁, la enzima tiene alta afinidad por Ca²⁺ e interactúa con éste en el lado

citoplasmático. En este estado, ocurre la fosforilación del ácido aspártico por ATP, pasando al estado $E_1\text{-P}$, un intermediario fosforilado de alta energía. Seguidamente, ocurre un nuevo cambio conformacional que lleva a la enzima a su estado $E_2\text{-P}$, de baja energía y menor afinidad por el catión, por lo que el Ca^{2+} se disocia y puede ser liberado en el lado extracelular. Posterior a la traslocación la enzima es desfosforilada volviendo a su estado E_2 , para luego sufrir un nuevo cambio conformacional regresando a su estado E_1 , completándose así el ciclo (Pérez-Gordones, 2011; Brini y Carafoli, 2009).

En *T. cruzi*, Benaim y col., en 1991 demostraron la existencia de una PMCA de 140 kDa, funcionalmente similar a la PMCA de eucariotas superiores (Benaim y col., 1995). Esta enzima también se demostró es estimulada por calmodulina, aunque probablemente en un sitio de unión no clásico (Pérez-Gordones, 2011).

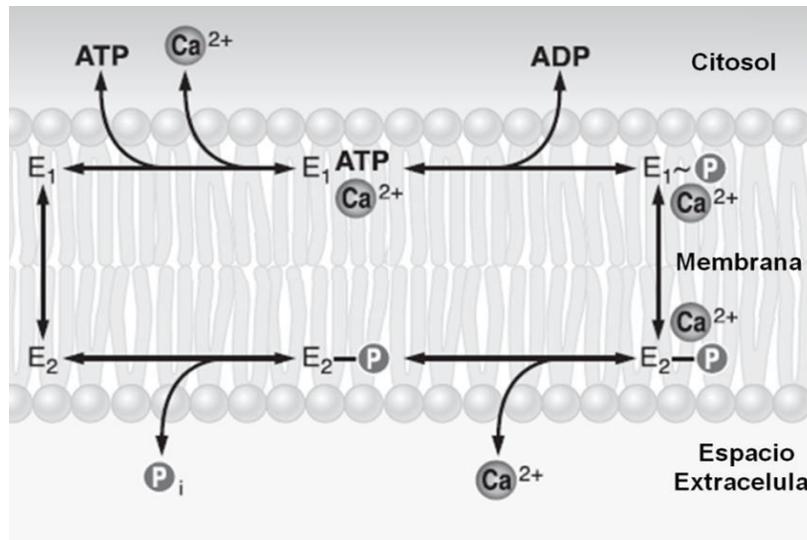


Figura 6. Ciclo catalítico de la Ca-ATPasa de membrana plasmática.

E_1 y E_2 son las dos conformaciones de la enzima, $E_1\sim P$ y $E_2\sim P$ son las formas fosforiladas de la misma. En su conformación E_1 es fosforilada por ATP y enlaza Ca^{2+} . Tomado de Brini y Carafoli, 2009 y modificado por Pérez-Gordones, 2011.

5. Compuestos naturales como fuente de posibles drogas

Históricamente, la mayor parte de los compuestos utilizados como fármacos han provenido directamente de fuentes naturales, o bien de derivados de compuestos encontrados de forma natural (Días y col., 2012). Los alcaloides, compuestos generalmente básicos con uno o más átomos de nitrógeno en su estructura, representan uno de los mayores grupos de productos naturales, provenientes en su mayoría de plantas superiores (Charles, 2009). Estos compuestos son especialmente interesantes al servir como un rico reservorio para el descubrimiento de nuevas drogas, teniendo en cuenta que varios de ellos exhiben actividad biológica significativa como la morfina y la efedrina (Lu y col, 2012). En particular, los compuestos heterocíclicos nitrogenados como las quinolinas (unión de un anillo de benceno y uno de piridina) y las tetrahydroquinolinas, tanto naturales como sintéticas, han mostrado un amplio rango de efectos biológicos, del tipo antimaláricos (Jacquemond-Collet y col, 2002) antioxidantes (Dorey y col, 2000), antimicobacterianos (Monga y col, 2005), antitumorales (Mayora y col, 2014), antiinflamatorios (Baba y col, 1996) y antiparasitarios (Fournet y col, 1993, García, 2017; Villarroel, 2017), siendo este último de interés para esta investigación.

Una forma de generar las tetrahydroquinolinas en el laboratorio consiste en permitir la interacción entre aldiminas y alquenos ricos en electrones mediante una reacción de cicloadición imino Diels-Adler, de manera que mediante una condensación entre trans-anetol o cis/trans-isoeugenol, anilinas y benzaldehídos sustituidos, en presencia de catalizadores ácidos, es posible obtener nuevas tetrahydroquinolinas sustituidas (Romero y col, 2007). El isoeugenol en particular, es un fenilpropeno constituyente de los aceites

esenciales de la nuez moscada del género *Myristica*, de los clavos de olor (*Eugenia caryophyllata*) y de la canela (*Cinnamomun verum*) (Hyldgaard y col, 2015), que ha mostrado una importante actividad antimicrobiana (Dal Pozzo y col, 2012) y antifúngica (Bhatia y col, 2012).

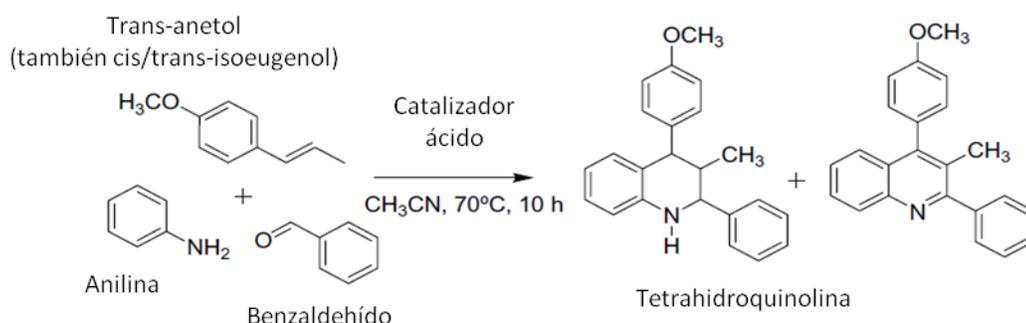


Figura 7. Síntesis de 1,2,3,4-tetrahidroquinolinas según reacción de cicloadición imino Diels-Adler.

6. Terapias combinadas como estrategia de tratamiento

Desde que se posee documentación histórica, se han utilizado combinaciones de drogas para tratar enfermedades y disminuir los padecimientos; actualmente son más sofisticadas y mejor definidas, siendo aplicadas en numerosas situaciones médicas (Chou, 2006). Estas terapias son ventajosas, dado que posibilita utilizar dos compuestos que podrían actuar sobre diferentes elementos en una ruta metabólica, y permite disminuir el número de dosis y las concentraciones de los compuestos utilizados, (Da Gama y col., 2011), con lo que se puede lograr una mayor eficacia, acompañada de menor toxicidad y

menores probabilidades del desarrollo de resistencias, siendo así un estándar para el tratamiento de enfermedades (Foucquier y Guedj, 2015). Efectivamente, las terapias combinadas son utilizadas como tratamiento para enfermedades como el cáncer (Humphrey y col., 2011), SIDA (Oversteegen y col., 2007), hipertensión (Glass, 2004), entre muchas otras. Además, considerando la dificultad para descubrir nuevas moléculas de interés farmacológico y lograr la aprobación para su uso, es ideal reformular las drogas existentes como nuevos productos en combinación, particularmente en enfermedades cuya cura no sea aún eficiente (Foucquier y Guedj, 2015).

Dada la amplitud de sistemas de estudio, existen numerosos métodos para determinar la efectividad de la terapia. Sin embargo, se acepta que la mejor estrategia es evaluar las concentraciones de cada compuesto a usar, que producen el mismo efecto cuantitativo, lo cual permite concluir si existe sinergismo, aditividad o antagonismo entre los compuestos para el efecto deseado (Foucquier y Guedj, 2015).

Las combinaciones de drogas han sido probadas en enfermedades infecciosas como el VIH, la malaria y la tuberculosis (Bustamante y col., 2014). Contra *T. cruzi*, se han ensayado combinaciones sobre todo para mejorar la eficacia de drogas ya establecidas para la enfermedad, buscando un posible efecto aditivo o sinérgico, encontrándose resultados favorables *in vitro* e *in vivo*, por ejemplo, al combinar amlodipina, clemastina (Planer y col., 2014), amiodarona (Benaim y col., 2006), y Benznidazol (De Figueireido y col., 2013), así como posaconazol, y ketaconazol con Benznidazol (Araujo y col., 2000). Asimismo, se han estudiado combinaciones de nuevos productos, de fuentes sintéticas o naturales, con el Benznidazol (Pelizzaro-Rocha y col., 2010; Hinojosa y col., 2012; Rodrigues y col., 2014),

con resultados promisorios. Así, por sus ventajas tanto biológicas como económicas, las terapias combinadas son atractivas para el desarrollo de nuevos tratamientos contra la enfermedad de Chagas.

7. Análisis bioinformático para predecir acoplamientos

Los métodos computacionales se han vuelto una parte fundamental en el descubrimiento de nuevos fármacos (Mobley y Dill, 2009), estando involucrados en la generación de drogas comercializadas como zanamivir (von Itzstein y col., 1993), en el desarrollo de nuevos candidatos a drogas, como inhibidores de la proteasa de la hepatitis C (Liverton y col., 2008) y de beta-secretasas (Stauffer y col., 2007), así como la evaluación de nuevos posibles candidatos, como derivados de naftoquinonas para el tratamiento de la tuberculosis (Halicki y col., 2018). Asimismo, se ha utilizado para el estudio de rutas metabólicas (Khan y col., 2018), para el análisis de la distribución y toxicidad de compuestos en un organismo (Han y col., 2018), y para dilucidar posibles mecanismos de acción de diversos ligando sobre receptores de interés (Ariyani y col., 2018)

Entre las diferentes técnicas bioinformáticas existentes, las metodologías de acoplamiento molecular exploran el comportamiento de pequeñas moléculas en el sitio de unión de una proteína blanco, prediciendo la estructura de los complejos intermoleculares que se establecen entre dos o más compuestos, pudiendo evaluar con ello la capacidad de una molécula para actuar como fármaco, y su especificidad frente al blanco seleccionado (Pagadala y col., 2017, Velásquez y col., 2013). En la última década se han desarrollado más de 60 programas para evaluar acoplamientos moleculares, teniendo cada uno diferentes estrategias para la colocación del ligando, y distintos algoritmos para calcular el *docking*

score, valor que ilustra cuán plausible es un acoplamiento (Pagadala y col., 2017). En general, se considera la mejor pose de acoplamiento aquella que genera la menor energía de unión (Velásquez y col., 2013). En este sentido, el *docking molecular* ofrece una alternativa relativamente rápida y económica a las técnicas experimentales usuales, siendo el *docking* del tipo proteína–ligando una metodología particularmente importante y bien establecida, así como una parte relevante del proceso de descubrimiento de nuevas drogas (Sousa y col., 2013).

Con el aumento de estructuras proteicas determinadas experimentalmente por cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear, junto al crecimiento de los conocimientos en proteómica, genómica e informática estructural, los análisis computacionales para el desarrollo de drogas, tal como el acoplamiento molecular, son cada vez más utilizados como herramienta para el descubrimiento de nuevos fármacos (Pagadala y col., 2017; Kumar y Mishra, 2016).

II. ANTECEDENTES

Las evidencias de efectos antiparasitarios generados por quinolinas y sus derivados, en particular contra tripanosomatidios, se ha acumulado progresivamente desde la década de 1980. En 1988, Fournet y col., trabajando principalmente con alcaloides bisbenzilisquinolinos extraídos de Annonaceae, Berberidaceae, Hernandiaceae y Menispermaceae, encontraron que 14 de ellos poseían una actividad altamente efectiva ante *Leishmania donovani*, *L. braziliensis* y *L. mexicana amazoniensis*, particularmente girocarpine, daphnandrina y obaberina. En el mismo año, dicho grupo de investigación

encontró efectos similares sobre *T. cruzi* (cepas Tulahuen, C8C11, y 1979 CL1). Asimismo, en 1993, demostraron el efecto leishmanicida de quinolinas aisladas de *G. longiflora*: al evaluar el efecto de dichas quinolinas sobre el desarrollo de lesiones en ratones infectados con *L. amazonensis* y *L. venezuelensis* y compararlo con el de la droga de referencia Glucantime, encontrando que dos de las quinolinas (con cadenas de tres carbonos) fueron más potentes que la droga de referencia, y cinco fueron igual de efectivas para el caso de *L. amazonensis*, mientras que la 2-*n*-propilquinolina mostró actividad significativa contra *L. venezuelensis*.

Por su parte, en 1997, Kinnamon y col., evaluaron 77 análogos de Primaquina, un fármaco perteneciente al grupo de las 8-aminoquinolinas, en ratones infectados con una cepa brasileña de *T. cruzi*, encontrando que 23 presentaron mayor efectividad que la droga de referencia (Nifurtimox), destacando uno de ellos con una actividad 14 veces más efectiva que dicha droga, y 4 veces más efectiva que la primaquina (Kinnamon y col., 1996, 1997).

Fakhfakh y col., en el 2003, sintetizaron una serie de quinolinas sustituidas (quinolinas 2-sustituidas, 3-sustituidas, 2-alquenilquinolinas y quinolinas disustituidas) y probaron su actividad sobre amastigotes de *L. amazonensis*, *L. infantum*, *T. cruzi*, y tripomastigotes extracelulares de *T. brucei*, evaluando además su citotoxicidad en macrófagos del hospedador. Se evidenció una actividad tripanocida contra los amastigotes de *T. cruzi* por parte de los compuestos 1 (2-etinilquinolina) y 2 (2-trimetilsililetilnilquinolina) con un $IC_{50}=8\mu M$ para ambos, aunque mayor que el obtenido para el Nifurtimox $IC_{50}=0,4\mu M$, concluyendo que un aumento en la cadena carbonada no

implicaba una mayor actividad antiparasitaria. Sin embargo, el compuesto halogenado 42 (1-bromo-2-(2-quinolil)etileno) fue más activo, teniendo un $IC_{50}=0,15\mu M$. Los investigadores enfatizan en la importancia de la cadena lateral para la actividad tripanocida y leishmanicida del compuesto.

Posteriormente, Franck y col en el 2004, sintetizaron 18 quinolinas 2-sustituídas y evaluaron su actividad antiprotozoaria, contra *T. brucei*, *T. cruzi*, *Leishmania infantum*, *L. amazonensis* y *Plasmodium falciparum*, y ante células infectadas por el virus HTLV-1. Ante *T. cruzi*, el compuesto 18, halogenado (Br), tuvo mayor actividad ($IC_{50}= 0.15 \mu M$) que la droga de referencia, nifurtimox ($IC_{50}= 0.45 \mu M$), mostrando sin embargo una alta toxicidad en los macrófagos. El compuesto 16 (con un grupo nitro), por su parte, no presentó actividad citotóxica en los macrófagos y mostró una importante actividad tripanocida ($IC_{50}=1\mu M$), aunque menor que la droga de referencia.

Más recientemente, en 2016, Lechuga y col. evaluaron el efecto de derivados de 4-amilaminoquinolina-3-carbonitrilo sobre todas las formas de *T. cruzi*, encontrando que el compuesto 1g mostró una actividad tripanocida importante con un $IC_{50}<1\mu M$ contra epimastigotes, mejor que el del Benznidazol. También inhibió la viabilidad de los tripomastigotes y amastigotes intracelulares, observándose que la actividad tripanocida se veía aumentada al añadir grupos hemo.

A partir del isoeugenol, Kouznetsov y col, en el 2010 generaron series de derivados sustituidos de 1,2,3,4-tetrahidroquinolinas, que han demostrado poseer actividad antitumoral (Mayora y col, 2014) y antiparasitaria (García, 2017; Villarroel, 2017), siendo esta última de particular interés para esta investigación.

De estas series, la serie DM ha generado compuestos que han presentado actividad tripanocida importante. Fonseca–Berzal y col., 2013, demostraron que el compuesto DM15 presenta una interesante actividad antiproliferativa en *T. cruzi*, aunque menor que lo obtenido para el Benznidazol (su droga de referencia), proponiendo al DM15 y a las tetrahydroquinolinas como prototipos potenciales de drogas antichagásicas. Acotan adicionalmente, que las sustituciones con grupos alquilo o metoxi en la posición C-6 aumentan el índice de selectividad del compuesto mostrando una influencia importante en el efecto tripanocida, al igual que la presencia de un grupo nitro en un sustituyente fenil y la adición de sustituyentes aceptores de electrones como el grupo nitrilo. Por su parte, sustituciones con cloro, grupos aceptores de electrones como el grupo nitro o grupos amino en la estructura de la tetrahydroquinolina, presentan efectos citotóxicos en fibroblastos.

En el 2017, Villarroel evaluó el efecto de las tetrahydroquinolinas DM5, DM6, DM7, DM8, DM9, DM12, DM13, DM15 y DM16 sobre la proliferación y homeostasis de calcio de epimastigotes de *T. cruzi*, encontrándose que los compuestos DM5, DM8 y DM12, presentaban un efecto inhibitorio sobre la proliferación de los epimastigotes, siendo comparable con el del Benznidazol (Tabla 2). Estas tres tetrahydroquinolinas inhibieron además la actividad de la PMCA de *T. cruzi* (Tabla 2) afectando la homeóstasis de calcio del parásito sin afectar la PMCA de eritrocitos humanos, estableciéndose a la PMCA de este tripanosomatidio como un posible blanco de acción de estos compuestos.

Tabla 2. Resultados obtenidos por Villarroel, 2017, al ensayar diferentes tetrahydroquinolinas sustituidas y Benznidazol, sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* y su PMCA.

COMPUESTO	IC ₅₀ ± D.E.	Inhibición de la proliferación a 25µM (%)	Inhibición de la actividad de la PMCA a 30 µM (%)
Benznidazol	2,395±0,515 µM	91,98	26,65
DM5	7,059±0,821 µM	87,26	22,08
DM8	5,24± 1,54 µM	79,25	58,06
DM12	2,80±0,86 µM	89,15	64,92

El efecto de otras tetrahydroquinolinas sustituidas de la misma serie: DM117, DM180, DM191, DM223, DM231 y DM234 también fueron estudiadas por García en el 2017. El efecto de estos compuestos fueron evaluados sobre la proliferación de *T. cruzi*, evidenciándose también su papel sobre la alteración de los mecanismos involucrados en la regulación de Ca²⁺ intracelular en estos parásitos. Se pudo observar que los compuestos DM117, DM191 y DM231 (Tabla 3) ejercen un efecto inhibitorio dosis-dependiente en la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* (Tabla 3). Éstas y la droga de referencia Benznidazol, indujeron además la alcalinización de los acidocalcisomas, colapsaron el potencial de membrana mitocondrial e inhibieron la actividad de la PMCA de los epimastigotes de *T. cruzi* (Tabla 3), sin afectar la PMCA de eritrocitos humanos. En este trabajo se propusieron, a los sistemas transportadores de Ca²⁺ como posibles blancos de la acción de estos compuestos, siendo estas tetrahydroquinolinas sustituidas prototipos potenciales para el desarrollo de drogas antichagásicas o para estudios de terapias combinadas con otras drogas, a fin de disminuir los efectos secundarios de los fármacos antichagásicos actuales.

Tabla 3. Resultados obtenidos por García, 2017, al ensayar diferentes tetrahydroquinolinas sustituidas y Benznidazol, sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* y su PMCA.

COMPUESTO	IC ₅₀ ± D.E.	Inhibición de la proliferación a 30μM (%)	Inhibición de la actividad de la PMCA a 30 μM (%)
Benznidazol	2,45 ± 1,02 μM	94,66	26,65
DM117	5,25 ± 1,03 μM	74,14	1,32
DM191	6,25 ± 1,04 μM	92,02	55,22
DM231	7,85 ± 1,02 μM	81,55	58,55

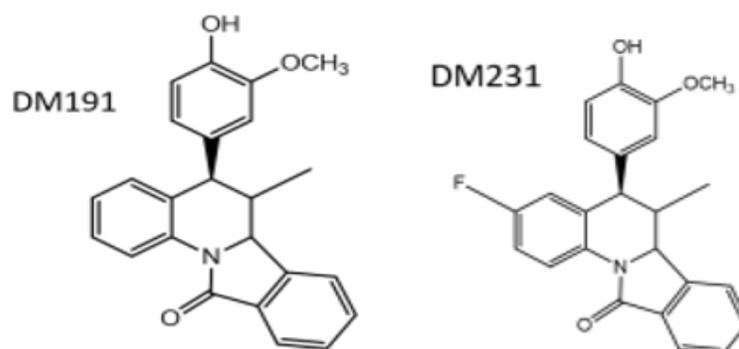


Figura 8. Tetrahydroquinolinas sustituidas DM191 y DM231. (Merchán, 2007; Kouznetsov y col., 2010)

Las terapias de drogas combinadas son muy utilizadas como métodos atractivos ya que pueden aumentar la eficacia de las drogas si éstas actúan contra objetivos diferentes, pudiendo reducir así, tanto la toxicidad como la resistencia ante la droga (Da Gama y col., 2011).

Sobre *T. cruzi*, se han encontrado diversas combinaciones de compuestos que poseen un efecto beneficioso, sea sinérgico o aditivo. López–Muñoz y col., en 2010, al

probar las combinaciones de aspirina con nifurtimox y Benznidazol sobre macrófagos infectados con *T. cruzi*, encontraron un efecto sinérgico, probablemente dado por la inducción de actividad antiparasitaria de la aspirina sobre los macrófagos. Por su parte, Pelizzaro-Rocha y col., 2010, demostraron el efecto sinérgico del Benznidazol combinado con partenólido, un metabolito terpenoide secundario de la planta *Tanacetum parthenium*, sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*, logrando reducir 23 veces el IC₅₀ del Benznidazol (de 1,6 µg/mL a 0,07 µg/mL). Además, encontraron un efecto aditivo sobre la proliferación de tripomastigotes, y un efecto antagonista respecto a la citotoxicidad.

Asimismo, Hinojosa y col., 2012, evaluaron *in vitro* e *in vivo* el efecto de la combinación de N-Butil-1-(4-Dimetilamino)Fenil-1,2,3,4-Tetrahydro-β-Carbolina-3-Carboxamida (C4) con Benznidazol, ketoconazol y anfotericina B, encontrando un efecto sinérgico al combinar C4 con Benznidazol. Adicionalmente, Da Gama y col., en 2011, al combinar análogos heterocíclicos DB289 y DB766 con Benznidazol en ratones encontraron un efecto sinérgico antiparasítico. Más recientemente, Aguilera y col., en 2018, evaluaron el efecto de la combinación del Benznidazol con inhibidores sintéticos de la triosafosfato isomerasa (llamados tiazoles 2, 3, y 4), *in vitro* sobre epimastigotes, e *in vivo* sobre ratones de laboratorio. Encontraron que, para los ensayos *in vitro*, las combinaciones con 2 y 3 resultaron sinérgicas o aditivas, mientras que con 4 resultó antagónica. Por su parte, para los ensayos *in vivo*, las combinaciones de 2 o 3 con el equivalente a la quinta parte de Benznidazol, demostraron que el Benznidazol era capaz de potenciar los efectos *in vivo*.

Es en base a estas evidencias y aunado al historial de efectividad tripanocida que han presentado las tetrahydroquinolinas y sus derivados, y a los efectos secundarios perjudiciales que presenta el Benznidazol, que en este trabajo nos propusimos estudiar el efecto de las combinaciones de DM191 y DM231 entre sí y con la droga comercial de referencia Benznidazol sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* y sobre la actividad de la PMCA de este parásito, enzima clave en el mantenimiento de la homeostasis de Ca^{2+} . Estableciendo a esta enzima como posible blanco de la acción de estos compuestos, a fin de determinar si existe un efecto sinérgico o aditivo tripanocida que permita disminuir las dosis de Benznidazol utilizadas, y con ello sus efectos secundarios perjudiciales.

Las tetrahydroquinolinas DM191 y DM231 a estudiar 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 del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela. En este último laboratorio fue ensayado su efecto sobre fibroblastos, resultando no ser tóxicas aún a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Los fibroblastos son un tipo de célula residente del tejido conectivo que se sugiere son las primeras en ser infectadas una vez el parásito ingresa al hospedador (Lieke y col., 2006), lo cual es de suma importancia dada la necesidad de obtener compuestos no perjudiciales para el humano.

Adicionalmente, considerando que los mecanismos de acción de las tetrahydroquinolinas no están del todo dilucidados, en este trabajo se evaluó la posible interacción de estos compuestos con la PMCA de *T. cruzi*, mediante análisis de acoplamiento molecular proteína-ligando.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Evaluar el efecto de combinaciones de Benznidazol con dos tetrahydroquinolinas sustituidas, DM191 y DM231, sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y sobre la actividad de la PMCA de *Trypanosoma cruzi*.

2. Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de las combinaciones de DM191-Benznidazol, DM231-Benznidazol y DM191-DM231, sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
- Estudiar el efecto de las combinaciones de DM191-Benznidazol, DM231-Benznidazol y DM191-DM231, sobre la actividad de la PMCA de *Trypanosoma cruzi*.
- Determinar una posible interacción del benznidazol y de las tetrahydroquinolinas sustituidas sobre la PMCA de *Trypanosoma cruzi* mediante análisis bioinformático.

IV. MATERIALES

1. Reactivos

Todos los reactivos se obtuvieron con el mayor grado de pureza. Los inhibidores de proteasas: inhibidor de tripsina, leupeptina y fenil–metilsulfonil–fluoruro (PMSF), así como los antibióticos penicilina y estreptomina, fueron obtenidos a través de Sigma. Por su parte, el suero fetal bovino (SFB), fue adquirido de GIBCO–BRL.

Respecto a las drogas y productos utilizados, el Benznidazol, droga de referencia, fue donado por el Dr. Xenón Serrano–Martín del Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos del Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Asimismo, las tetrahydroquinolinas sustituidas (DM191 y DM231) 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 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. De éstas, se prepararon soluciones *stock* de cada compuesto a una concentración de 6 mM disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO), a partir de las cuales se prepararon las soluciones de trabajo en las concentraciones requeridas para los ensayos.

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. Estos se mantuvieron *in vitro* mediante repiques semanales en medio LIT modificado con hemina.

V. METODOLOGÍA

1. Cultivo de parásitos

Los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (cepa IRHO/BR/63/CL Brenner) se cultivaron en medio LIT modificado constituido por: 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 % de Suero Fetal Bovino (SFB), previamente inactivado a 56 °C por 45 minutos, y Penicilina/Estreptomicina 100u/mL / 100µg/mL, siendo incubados a 28°C en agitación constante en envases de vidrio (értulas) adecuados para su cultivo.

2. Curva de proliferación de *Trypanosoma cruzi*

Para preparar los cultivos a evaluar, se partió de un cultivo de *T. cruzi* en fase exponencial, previamente visualizado en un microscopio de luz Olympus CK40 a 40X para verificar que los parásitos se encontraban en buenas condiciones. A continuación, se prepararon cultivos en értulas estériles, con un inóculo de parásitos necesario para alcanzar una concentración de 7×10^6 parásitos/mL, determinado mediante conteo por cámara de Neubauer, en un volumen final de 10mL de LIT modificado con hemina, suplementado con 5% de SFB y 0.02 % de penicilina/estreptomicina. Esto se realizó por triplicado.

A continuación, se evaluó la proliferación celular en cada cultivo. Esto se realizó de forma indirecta al determinar 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 de forma directa, al efectuar en cada medición el conteo de células utilizando la cámara de Neubauer. Ambos datos se relacionaron mediante una gráfica de parásitos/mL vs. Transmitancia (%), de la cual se obtuvo una ecuación mediante regresión exponencial, que permitió relacionar la transmitancia obtenida con la concentración de parásitos, en los ensayos posteriores.

3. Evaluación del efecto del Benznidazol y de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM191 y DM231, sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Para comprobar el efecto inhibitorio de los compuestos mencionados sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*, se cultivaron los parásitos en presencia de cada uno de los compuestos (DM191, DM231 y Benznidazol) partiendo de una densidad celular de 7×10^6 cel/ml en 10 ml de medio LIT suplementado con 5 % SFB y 0,02% penicilina/estreptomicina. Cada compuesto se ensayó a una concentración de 30 μ M del compuesto. Cada condición se evaluó por triplicado junto a un control sin ningún compuesto, determinándose a los 10 días el porcentaje de inhibición de la proliferación, respecto al control, según la fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\# \frac{\text{parásitos}}{\text{mL}} \text{ promedio con el compuesto a los 10 días}}{\# \frac{\text{parásitos}}{\text{mL}} \text{ promedio control a los 10 días}} \times 100$$

4. Evaluación del efecto de las combinaciones de Benznidazol y las tetrahydroquinolinas sustituidas DM191 y DM231 sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Para determinar el efecto de las combinaciones, primeramente se evaluó la posibilidad de potenciación o inhibición de un compuesto sobre otro. Para ello, se plantearon dos ensayos paralelos para cada combinación. En un ensayo, uno de los compuestos se mantuvo a una concentración fija, mientras que el otro se ensayó a concentraciones variables. De esta manera podría evaluarse el efecto del compuesto en concentración fija, sobre el compuesto en concentraciones variables. En este sentido, los ensayos se establecieron según lo siguiente:

Benznidazol-DM231: para evaluar el efecto de DM231 sobre el Benznidazol, se ensayaron concentraciones de 0,5 μM , 3 μM , 7 μM y 15 μM del Benznidazol combinados con 7,85 μM de DM231 (IC_{50} reportado por García, 2017 y comprobado en el presente estudio). Por su parte, para evaluar el efecto del Benznidazol sobre DM191, se ensayaron concentraciones de 0,5 μM , 3 μM , 7 μM y 15 μM de DM191 combinadas con 2,45 μM del Benznidazol (IC_{50} , reportado por García, 2017 y Villarroel, 2017, y comprobado en el presente estudio).

Benznidazol-DM191: para evaluar el efecto de DM191 sobre el Benznidazol, se ensayaron concentraciones de 0,5 μM , 3 μM , 7 μM y 15 μM del Benznidazol combinados con 6,25 μM de DM191 (IC_{50} reportado por García, 2017 y comprobado en el presente estudio). Por su parte, para evaluar el efecto del Benznidazol sobre DM191, se ensayaron concentraciones de 0,5 μM , 3 μM , 7 μM y 15 μM de DM191 combinadas con 2,45 μM del Benznidazol (IC_{50} , reportado por García, 2017 y Villarroel, 2017, y comprobado en el presente estudio).

DM191–DM231: para evaluar el efecto de DM191 sobre DM231, se ensayaron concentraciones de 0,5µM, 3µM, 7µM y 15µM de DM231 combinados con 6,25µM de DM191 (IC₅₀ reportado por García, 2017 y comprobado en el presente estudio). Por su parte, para evaluar el efecto de DM231 sobre DM191, se ensayaron concentraciones de 0,5µM, 3µM, 7µM y 15µM de DM191 combinadas con 7,85µM de DM231 (IC₅₀ reportado por García, 2017 y comprobado en el presente estudio).

Adicionalmente, en cada caso se evaluó el crecimiento control (sin ningún producto). Todas las condiciones se evaluaron por triplicado.

Para cada ensayo se obtuvo una curva dosis–respuesta, graficando la proliferación celular (# cél/mL) vs. la dosis del compuesto de concentración variable. Para cada curva dosis–respuesta, se calculó el IC₅₀ experimental de la combinación (IC_{50CE}), equivalente a la dosis combinada de los compuestos con la cual se logró alcanzar el 50% de inhibición de la proliferación, utilizando el software GraphPad Prism 7.00 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California, E.U.A.), con un $p \leq 0,05$. Asimismo, se calculó el IC₅₀ teórico de la combinación (IC_{50CT}), equivalente a la dosis combinada de los compuestos que teóricamente inhiben el 50% de la proliferación si su acción conjunta fuese aditiva; igual a la suma de la mitad de los IC₅₀ individuales de cada compuesto. Con este valor y según el IC_{50CE}, se determinó la proporción en la cual contribuía cada compuesto en la combinación. Asimismo, se calculó el índice de combinación (CI):

$$CI = \frac{a}{A} + \frac{b}{B}$$

donde a y b son las proporciones de las drogas en combinación, y A y B son los IC₅₀ individuales de cada droga. Dependiendo del resultado del CI, se indica un efecto mayor

(CI<1), igual (CI=1) o menor (CI>1) de lo esperado para un efecto aditivo (Fouquier y Guedj, 2015).

Adicionalmente, se comprobó si cada combinación es sinérgica, aditiva o antagónica, generando isobogramas. Para ello, para cada combinación, se graficaron en cada eje los IC₅₀ de cada compuesto, generándose una recta de aditividad. Asimismo, se graficaron los puntos correspondientes al IC_{50CT} y al IC_{50CE}, para cada caso. Dependiendo de la ubicación de este último, se clasificó la combinación como sinérgica, si se encontró bajo la recta; aditiva, si se encontró en la recta; o antagónica, si se encontró sobre la recta.

5. Obtención de vesículas de membrana plasmática de *Trypanosoma cruzi*

Las vesículas de membrana plasmática de epimastigotes de *T. cruzi* se prepararon siguiendo la metodología reportada para el aislamiento de vesículas de *L. mexicana* (Cohen y col., 1986), *T. cruzi* (Urbina y col., 1988) y *L. braziliensis* (Benaim y Romero, 1990) con las modificaciones introducidas por Benaim y col. en 1991. Un cultivo de 3 L de parásitos en fase exponencial tardía, se centrifugó inicialmente a 1000xg durante 10 min a 4 °C. Los parásitos obtenidos se lavaron dos veces con un buffer que contiene 11 mM KCl y 140 mM NaCl en Tris-HCl 75 mM a pH 7.4, y una vez con un buffer conformado por 400 mM manitol, 10 mM KCl, 2 mM EDTA, 1 mM 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, centrifugando por segunda vez a 1000xg durante 10 min a 4°C. Posteriormente el “pellet” de células obtenido se mezcló con perlas de vidrio de 100–200 µm de diámetro, a una relación 1:4 peso húmedo de parásitos:peso perlas de vidrio. Las células se fraccionaron por abrasión en un mortero a 4°C entre 5–7 minutos. Los parásitos rotos mecánicamente se

colectaron utilizando el mismo buffer anterior, y las perlas de vidrio, las células no rotas y restos de gran tamaño se removieron por centrifugación a 1000xg durante 15 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se sometió a una centrifugación diferencial, primero a 16000xg durante 30 min a 4°C y luego a 105000xg durante 1h a 4°C. El "pellet" obtenido se resuspendió en un buffer conteniendo 150 mM KCl, 1 mM DTT, 50 μ M CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 0.15 mg/ml inhibidor de tripsina de soya, 10 μ g/ml leupeptina, 5 μ g/ml E64 y 75 mM Hepes-KOH, a pH=6.8. La suspensión resultante se homogeneizó pasándola 3 veces a través de un homogeneizador "Dounce AA" inmerso en hielo, siendo guardada a -70°C hasta su uso.

6. Determinación del efecto del Benznidazol y de las tetrahidroquinolinas sustituidas DM191 y DM231, solos y combinados, sobre la actividad de la Ca²⁺-ATPasa de membrana plasmática de *Trypanosoma cruzi*

La actividad hidrolítica de la Ca²⁺-ATPasa de vesículas de membrana plasmática de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* se determinó siguiendo el procedimiento descrito por Fiske y Subbarow en 1925, utilizando sulfato ferroso como agente reductor. Aproximadamente 0.5 mg/ml de proteína fueron incubados durante 40 minutos a 28°C en un volumen final de 250 μ L de un buffer compuesto por 50 mM Hepes-KOH (pH=7.4), 200 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1.8 mM CaCl₂ (10 μ M Ca²⁺ libre), 2 mM DTT, 1 μ M A23187, 0.5 mM ouabaina y 4 μ g/ μ l oligomicina. La actividad de la Ca²⁺-ATPasa se determinó en presencia de los diferentes compuestos (DM191, DM231 y BZN) a concentraciones de 5 μ M y 15 μ M. Asimismo, dicha actividad fue evaluada en presencia de las combinaciones (BZN-DM191, BZN-DM231, DM191-DM231), en tres condiciones: 1)

ambos compuestos en su IC_{50} ; 2) compuesto A a la mitad de su IC_{50} más compuesto B al doble de su IC_{50} ; 3) compuesto B a la mitad de su IC_{50} más compuesto A al doble de su IC_{50} , para evaluar si se encontraban diferencias al modificar las proporciones a las cuales se encontraban los compuestos. Adicionalmente, se realizaron dos controles: un control sin ningún compuesto (actividad basal) y un control con EGTA, correspondiente a la actividad Mg^{2+} -ATPasa.

La reacción se detuvo añadiendo 250 μ L de ácido tricloroacético (TCA) al 16% v/v y se determinó la cantidad de P_i liberado, producto de la hidrólisis de ATP por la bomba, según el método de Fiske y Subbarow. Para ello, se tomaron 200 μ L de cada muestra y se le añadieron 700 μ L de una solución de molibdato de amonio al 0.57%. Este compuesto forma ácido fosfomolibdico a partir del fósforo inorgánico presente, el cual se redujo al añadir 100 μ L de sulfato ferroso (40% p/v), produciendo un color azul proporcional al contenido de fósforo inorgánico y por lo tanto a la actividad de la enzima. Teniendo esto en cuenta, se midió su intensidad a 830 nm, y se relacionó con la concentración de P_i utilizando una curva de calibración previamente preparada con estándares de P_i de concentraciones conocidas. La actividad Ca^{2+} -ATPasa se determinó como la diferencia entre la actividad en presencia de calcio y en ausencia de calcio; y se expresó como el porcentaje de actividad respecto al control. Adicionalmente, se realizó un análisis estadístico mediante una prueba T de Student con el software PAST 3.20, a fin de evaluar si las diferencias obtenidas entre las condiciones ensayadas fueron estadísticamente significativas.

7. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se determinará 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 realizará una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina como proteína patrón.

8. Análisis de acoplamiento molecular

Se buscó determinar una posible interacción entre los compuestos analizados sobre la PMCA de *T. cruzi*, evaluando el acoplamiento molecular o *docking* entre los compuestos y la proteína. Para ello, se utilizó el software AutoDock 4.2 (Morris y col., 2009), mediante la interfaz AutoDockTools4 (ADT), usando el algoritmo genético Lamarckiano (Morris y col., 1998). La estructura en 3D de la proteína se obtuvo del portal web Phyre2 (Kelley y col., 2015), usando como secuencia base en formato FASTA la secuencia para la PMCA de *T. cruzi*, cepa CL Brenner, código Q4DSJ2 en UniProt (El-Sayed y col., 2005), visualizada además con Jmol. La estructura 3D del Benznidazol se obtuvo de la base de datos PubChem (CID: 31593), mientras que las de ambas tetrahydroquinolinas se obtuvieron mediante el software DataWarrior (Sander y col., 2015) y Avogadro (Hanwell y col., 2012). Los ligandos se optimizaron con ayuda del software Avogadro (Hanwell y col., 2012). Adicionalmente, se realizó una predicción de posibles regiones helicoidales transmembranas de esta PMCA, con el servidor TMHMM v 2.0 (Krogh y col., 2001; Sonnhammer y col., 1998), y se evaluaron los posibles receptores para cada ligando con el servidor SwissTargetPrediction (Gfeller y col., 2014) para *Homo sapiens*.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Curva de crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Con la finalidad de estandarizar los cultivos *in vitro* de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, y así obtener la relación entre número de células/mL y tramitancia (%), se realizaron curvas de crecimiento de estos parásitos por 10 días (240 h). Para ello se establecieron cultivos de 7×10^6 parásitos/mL en medio LIT suplementado, con las consideraciones mencionadas en la sección previa, realizando mediciones simultáneas de tramitancia (%) con ayuda de un espectrofotómetro, y del número de células/mL, por contaje en cámara de Neubauer, cada 24 h. Mediante ajuste por regresión exponencial, se obtuvo la ecuación (resultado no mostrado) que relacionó la tramitancia (%) con la densidad celular (cél/mL), utilizada para el resto de los experimentos.

En la Figura 9, se presentan los resultados correspondientes a la curva de crecimiento para epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Esta curva permitió evaluar el comportamiento del parásito bajo las condiciones de cultivo aplicadas, lo cual es relevante al ser la condición control frente a la cual se evalúan los posibles efectos de los compuestos estudiados. En la curva, se observa un crecimiento parasitario continuo, que aparenta ser más acelerado al inicio (24–48h), disminuyendo su rapidez de crecimiento posteriormente. Aunque este es un comportamiento usual para cultivos de microorganismos *in vitro*, cabe destacar que en general el crecimiento fue más lento de lo esperado. Sin embargo, los parásitos no mostraron ningún cambio en su morfología durante los 10 días de crecimiento pudiendo ser utilizados para los siguientes experimentos.

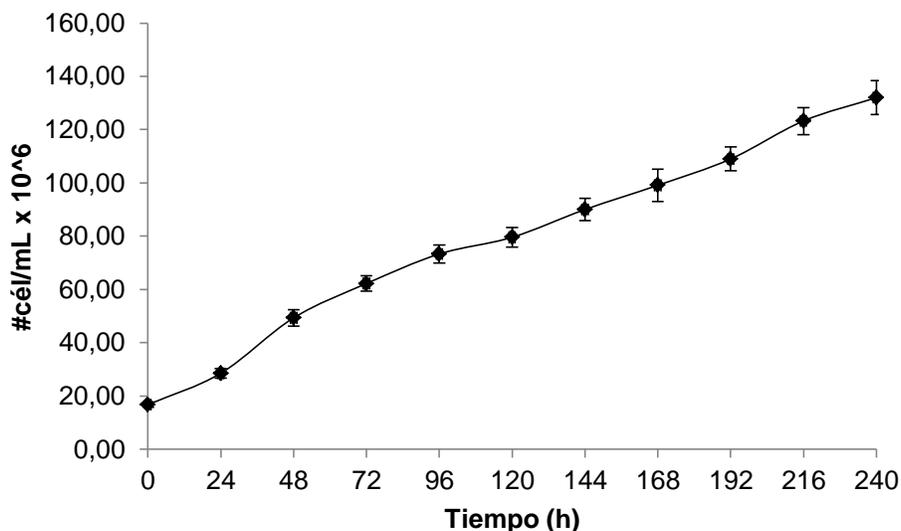


Figura 9. Curva de crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. El cultivo se inició a partir de una población de 7×10^6 cel/ml y su proliferación fue seguida cada 24 horas durante 10 días (240 horas), representándose como el número de células/ml en función del tiempo. Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (\pm) la desviación estándar de tres experimentos independientes.

2. Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM191, DM231 y Benznidazol sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*

Antes de proceder a realizar los experimentos de combinación de las tetrahydroquinolinas sustituidas con el Benznidazol, quisimos confirmar la acción inhibitoria individual de las Tetrahydroquinolinas (DM231 y DM191) y del Benznidazol sobre la proliferación de *T. cruzi* previamente reportada por Garcia, M. en el 2017. De esta forma, se determinó el porcentaje de inhibición de la proliferación de cultivos de epimastigotes de *T. cruzi*, a una concentración de 30 μ M de cada uno de los compuestos mencionados, encontrándose los resultados que se indican en la Tabla 4.

Tabla 4. Inhibición de la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* por las Tetrahydroquinolinas DM191 y 231 y el Benznidazol a una concentración de 30 μM .

COMPUESTO	INHIBICIÓN OBTENIDA (%)	INHIBICIÓN REPORTADA (%)	IC₅₀ REPORTADO (μM) por García, 2017
Benznidazol	92,02	94,66	2,45 \pm 1,02
DM231	82,84	81,55	7,85 \pm 1,02
DM191	91,45	92,02	6,25 \pm 1,04

Los resultados obtenidos mostraron que las tetrahydroquinolinas DM191 y DM231 y el Benznidazol a una concentración de 30 μM tuvieron un efecto inhibitorio sobre la proliferación de este parásito, con porcentajes de inhibición de 91.45 %, 82.84 % y 92.02 % respectivamente (Ver Tabla 4), similar al observado por García en el 2017.

El efecto antiproliferativo observado con el Benznidazol fue también reportado previamente para la cepa CL Brener por Fonseca–Berzal y col., en el 2013, quienes reportaron un IC₅₀ de 27,12 μM y por Moreno y col., en el 2010 quienes reportaron un IC₅₀ de 7,6 μM . Por su parte, el efecto antiproliferativo sobre epimastigotes de *T. cruzi* por las tetrahydroquinolinas estudiadas, es apoyado por efectos similares reportados previamente para otros compuestos derivados de productos naturales tales como las quinolinas 2-sustituidas (Franck y col., 2004), derivados de 4-amilaminoquinolina-3-carbonitrilos (Lechuga y col., en el 2016) y tetrahydroquinolinas de la misma serie (DM5, DM8 y DM12) (Villarroel, 2017).

Como puede observarse para los 3 compuestos, los porcentajes de inhibición fueron muy similares a los previamente reportados (Ver Tabla 4) confirmándose el efecto ejercido por estos compuestos sobre epimastigotes de *T. cruzi*. Partiendo de esta observación, para los estudios de combinación de drogas serán considerados los valores de IC₅₀ reportados por esta autora (Tabla 4).

2.1. Efectos de la combinación de Benznidazol y la tetrahydroquinolina sustituida DM231 sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*

Para evaluar el efecto de las combinaciones de las tetrahydroquinolinas DM231, DM191 y el Benznidazol, para cada combinación, se realizaron dos ensayos paralelos: en un ensayo, se plantearon combinaciones de forma tal que uno de los compuestos fue suministrado a una concentración fija mientras que el otro fue administrado a concentraciones variables; en un segundo ensayo, se intercambiaron los compuestos. El objetivo de este esquema experimental fue determinar si existía un efecto potenciador, inhibitorio, o nulo, de un compuesto sobre el otro.

Para evaluar el efecto de la combinación de la tetrahydroquinolina DM231 con el Benznidazol sobre la proliferación, se ensayaron por una parte concentraciones variables del DM231 (0.5 μ M, 3 μ M, 7 μ M y 15 μ M) con una concentración fija de Benznidazol correspondiente a su IC₅₀ (2.45 μ M) (Figura 10A). En la gráfica se observa una inhibición dosis dependiente de la proliferación del parásito a medida que incrementamos la concentración del DM231. A partir de estos datos se obtuvo el valor del IC₅₀ experimental para la combinación (IC_{50CE}), utilizando el software GraphPad Prism 7, con un $p \leq 0,05$. Este valor representa la combinación de los compuestos que permitió alcanzar el 50 % de

inhibición de la proliferación. Asimismo, se realizó el cálculo del IC₅₀ teórico para la combinación (IC_{50CT}), como la suma de la mitad de los IC₅₀ individuales de cada compuesto (1,225 μM para el Benznidazol, y 3,925 μM para DM231), es decir:

$$IC_{50CT} = 1,225\mu M + 3,925\mu M = 5,15 \mu M$$

Este valor representa la combinación que teóricamente expresa un comportamiento aditivo. De acuerdo a esto, se calculó en cuánto contribuye cada compuesto a la combinación obtenida experimentalmente, de acuerdo a la proporción de cada uno para la combinación teórica. De esta manera, considerando que para una combinación teórica de 5,15 μM (IC_{50CT}), el Benznidazol contribuye en 1,225 μM; para la combinación obtenida experimentalmente de 0,6618 μM (IC_{50CE}), el Benznidazol contribuye con 0,157 μM, tal como resulta de esta ecuación de proporcionalidad:

$$\text{Benznidazol (experimental)} = \frac{IC_{50CE} \times \text{proporción del BZ en el } IC_{50CT}}{IC_{50CT}} = \frac{0,6618 \mu M \times 1,225 \mu M}{5,15 \mu M} = 0,157 \mu M$$

Calculando las proporciones de ambos compuestos, pudo construirse el isoblograma correspondiente (Figura 10B), donde se graficaron los puntos del IC_{50CT}, IC_{50CE}, y la curva de aditividad teórica, generada utilizando los valores de IC₅₀ individuales para cada compuesto, 2.45 μM para el Benznidazol y 7.85 μM para el DM231, y uniendo sus puntos tal como se observa en la Figura 10B. En este caso, el IC₅₀ de la combinación obtenido experimentalmente (0,6618 ± 0,6499 μM) al evaluar el efecto de DM231 sobre el Benznidazol, resultó menor al IC₅₀ de combinación teórica (5,15 μM), ubicándose bajo la recta de aditividad teórica, lo cual evidencia un efecto sinérgico.

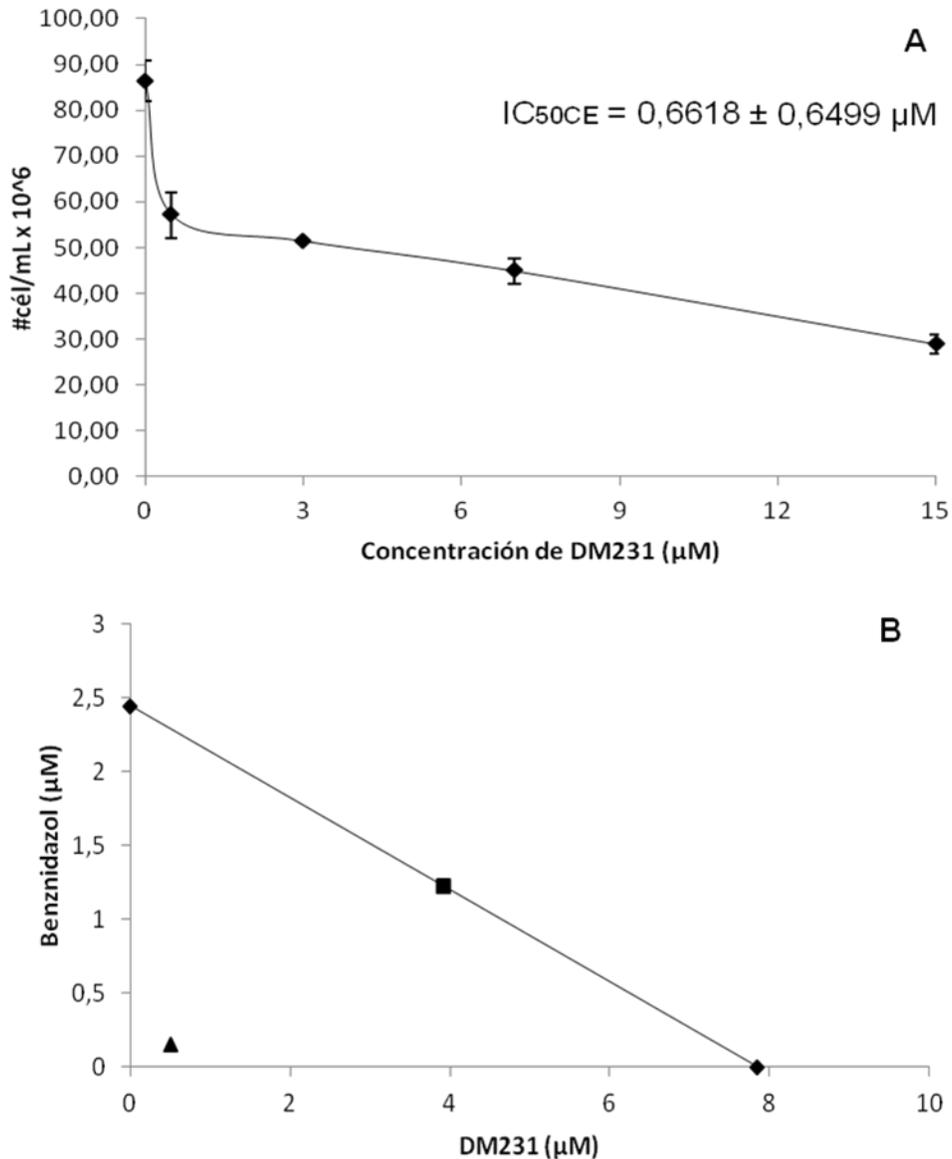


Figura 10. Efecto de la combinación del Benznidazol con la tetrahydroquinolina DM231 sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*: efecto del Benznidazol sobre DM231.

Los cultivos se iniciaron con una población de 7×10^6 parásitos/mL, siguiendo su proliferación cada 24 horas por 10 días. El Benznidazol se mantuvo a una concentración fija de $2,45 \mu\text{M}$ y el DM231 fue variado en concentraciones de $0,5 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$, $7 \mu\text{M}$, y $15 \mu\text{M}$. Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (\pm) la desviación estándar de tres experimentos independientes. **(A)**. Isoblograma. Se muestra el IC₅₀ teórico de la combinación, IC_{CT} (■) y el IC₅₀ experimental de la combinación, IC_{CE} (▲) **(B)**.

Por otra parte, el estudio fue realizado también manteniendo fija la concentración del DM231 (7.85 μM) y variando la concentración del Benznidazol (0.5 μM , 3 μM , 7 μM y 15 μM) (Figura 11A). En la gráfica se observa una inhibición dosis dependiente de la proliferación del parásito a medida que incrementamos la concentración del Benznidazol. A partir de estos datos se obtuvo el isoblograma correspondiente (Figura 11B), donde la curva de aditividad teórica fue construida utilizando los valores de IC_{50} individuales para cada compuesto, 2.45 μM para el Benznidazol y 7.85 μM para el DM231 y uniendo sus puntos tal como se observa en la Figura 11B. El IC_{50} obtenido experimentalmente ($\text{IC}_{50\text{CE}}$) al evaluar el efecto de DM231 sobre el Benznidazol fue graficado tal como se indicó en el primer ejemplo, y se ubicó nuevamente en el área bajo la recta de aditividad, lo cual evidencia una potenciación, clasificándose al efecto como sinérgico.

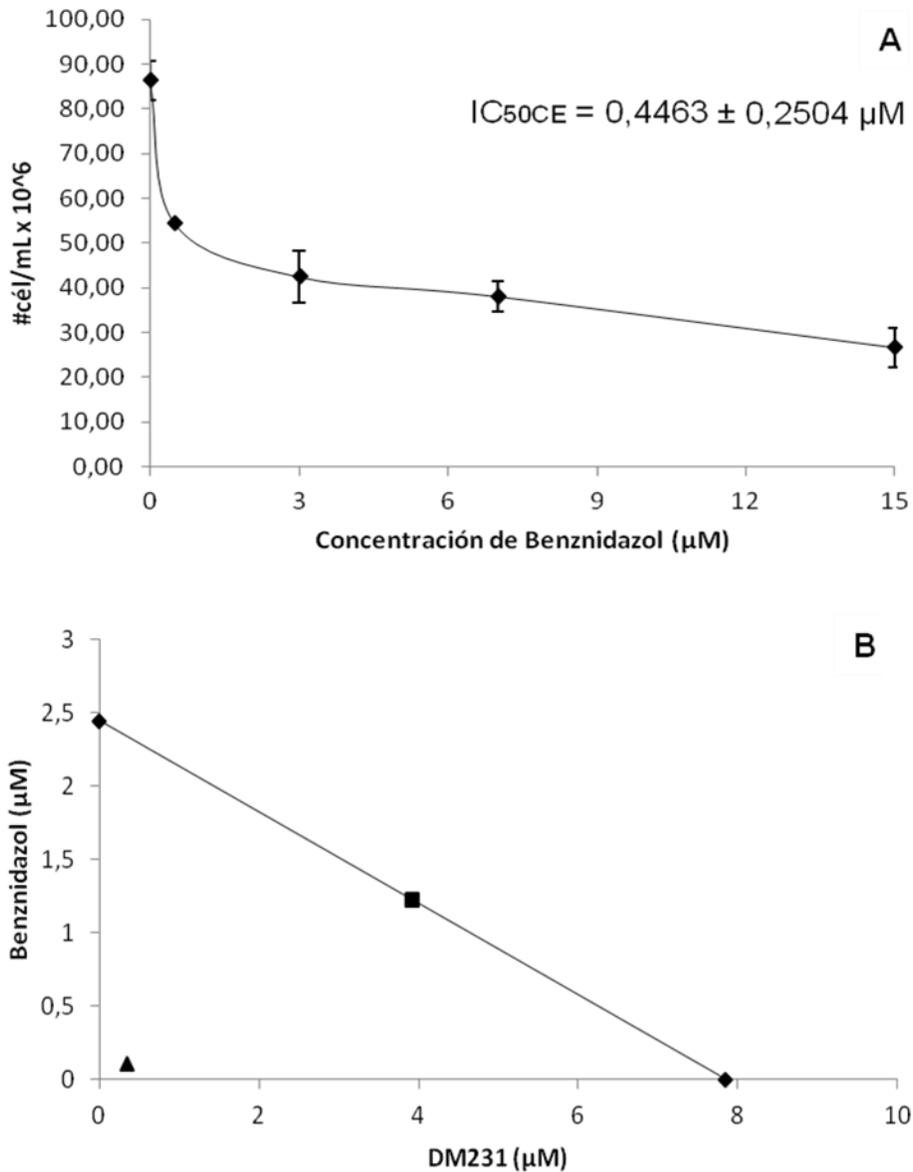


Figura 11. Efecto de la combinación de la tetrahydroquinolina DM231 con el Benznidazol sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*: efecto de DM231 sobre el Benznidazol.

Los cultivos se iniciaron con una población de 7×10^6 parásitos/mL, siguiendo su proliferación cada 24 horas por 10 días. El DM231 se mantuvo a una concentración fija de $7,85 \mu M$ y el Benznidazol fue variado en concentraciones de $0,5 \mu M$, $3 \mu M$, $7 \mu M$, y $15 \mu M$. Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (\pm) la desviación estándar de tres experimentos independientes. **(A)**. Isoblograma. Se muestra el IC_{50} teórico de la combinación, IC_{CT} (■) y el IC_{50} experimental de la combinación, IC_{CE} (▲) **(B)**.

Por su parte, en la Tabla 5 se detallan los valores obtenidos para el IC₅₀ de combinación teórico, y los IC₅₀ de combinación experimentales de ambos ensayos, así como sus índices de combinación (CI) y la clasificación del efecto obtenido según Tallarida, en el 2001. Como se evidenció, en ambos casos ocurrió un sinergismo, lo cual posiciona a la combinación Benznidazol – DM231 como una opción tripanocida atractiva. Cabe destacar la potenciación ejercida por la tetrahydroquinolina sobre el Benznidazol, efecto de interés ya que se busca obtener combinaciones que permitan reutilizar al Benznidazol, mejorando su eficacia y posiblemente disminuyendo sus efectos secundarios perjudiciales.

Tabla 5. Valores para el 50% de inhibición de la proliferación teórico (IC_{50CT}) y experimentales (IC_{50CE}), e índices de combinación (CI) obtenidos para la combinación Benznidazol-DM231.

Ensayo	IC _{50CT} (μM)	IC _{50CE} (μM)	CI	Clasificación
DM231 sobre Benznidazol	5,15	0,4463 ± 0,2504	0,087	Sinergística
Benznidazol sobre DM231	5,15	0,6618 ± 0,6499	0,129	Sinergística

Los valores de IC_{50CE} fueron obtenidos con el software GraphPad Prism 7, con un p ≤ 0,05.

Los CI se calcularon como la suma de las relaciones de cada compuesto en la combinación entre sus IC₅₀ individuales. Se clasifica una combinación como sinérgica cuando CI < 1, aditiva cuando CI = 1, y antagónica cuando CI > 1

2.2. Efectos de las combinaciones de Benznidazol y la tetrahydroquinolina sustituida DM191 sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*

Por su parte, para evaluar el efecto de la combinación de la tetrahydroquinolina DM191 con el Benznidazol, se ensayaron por una parte concentraciones variables del DM191 (0.5 μM, 3 μM, 7 μM y 15 μM) con una concentración fija de Benznidazol correspondiente a su IC₅₀ (2.45 μM) (Figura 12A). En la gráfica se observa una inhibición dosis dependiente de la proliferación del parásito a medida que incrementamos la concentración del DM191. A partir de estos datos se obtuvo el isoblograma correspondiente (Figura 12B), la curva de

aditividad teórica fue construida utilizando los valores de IC_{50} individuales para cada compuesto, en este caso $2.45 \mu\text{M}$ para el Benznidazol y $6.25 \mu\text{M}$ para el DM191, uniendo sus puntos tal como se observa en la Figura 12B. Como puede observarse, el IC_{50CE} , al evaluar el efecto de DM191 sobre el Benznidazol, se ubicó bajo la recta de aditividad teórica, siendo por ende menor al IC_{50CT} , lo cual evidencia efecto sinérgico.

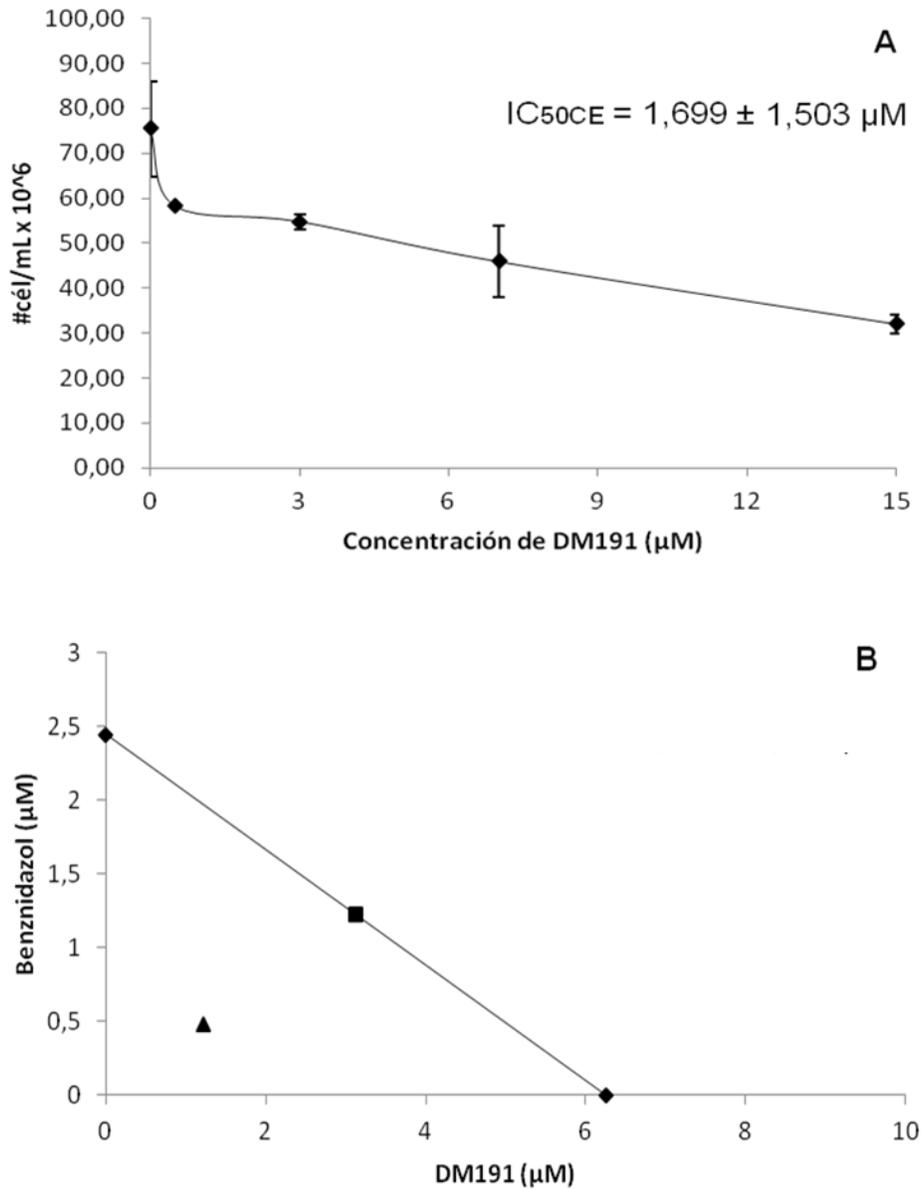


Figura 12. Efecto de la combinación del Benznidazol con la tetrahydroquinolina DM191 sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*: efecto del Benznidazol sobre DM191.

Los cultivos se iniciaron con una población de 7×10^6 parásitos/mL, siguiendo su proliferación cada 24 horas por 10 días. El Benznidazol se mantuvo a una concentración fija de $2,45 \mu\text{M}$ y el DM191 fue variado en concentraciones de $0,5 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$, $7 \mu\text{M}$, y $15 \mu\text{M}$. Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (\pm) la desviación estándar de tres experimentos independientes. **(A)**. Isobolograma. Se muestra el IC₅₀ teórico de la combinación, IC_{CT} (■) y el IC₅₀ experimental de la combinación, IC_{CE} (▲) **(B)**.

De igual manera, el estudio fue realizado manteniendo ahora fija la concentración del DM191 (6.25 μM) y variando la concentración del Benznidazol (0.5 μM , 3 μM , 7 μM y 15 μM) (Figura 13A). En la gráfica se observa igualmente una inhibición dosis dependiente de la proliferación del parásito a medida que incrementamos la concentración del Benznidazol. El isoblograma obtenido a partir de estos datos se muestra en la Fig. 13B, donde se observa la curva teórica construida utilizando los valores de IC_{50} individuales para cada compuesto, 2.45 μM para el Benznidazol y 6.25 μM para el DM191, y uniendo sus puntos. Asimismo, el IC_{50} experimental ($\text{IC}_{50\text{CE}}$) al evaluar el efecto del Benznidazol sobre el DM191, resultó inferior a la recta de aditividad teórica y por ende al $\text{IC}_{50\text{CT}}$, lo cual evidencia un efecto sinérgico

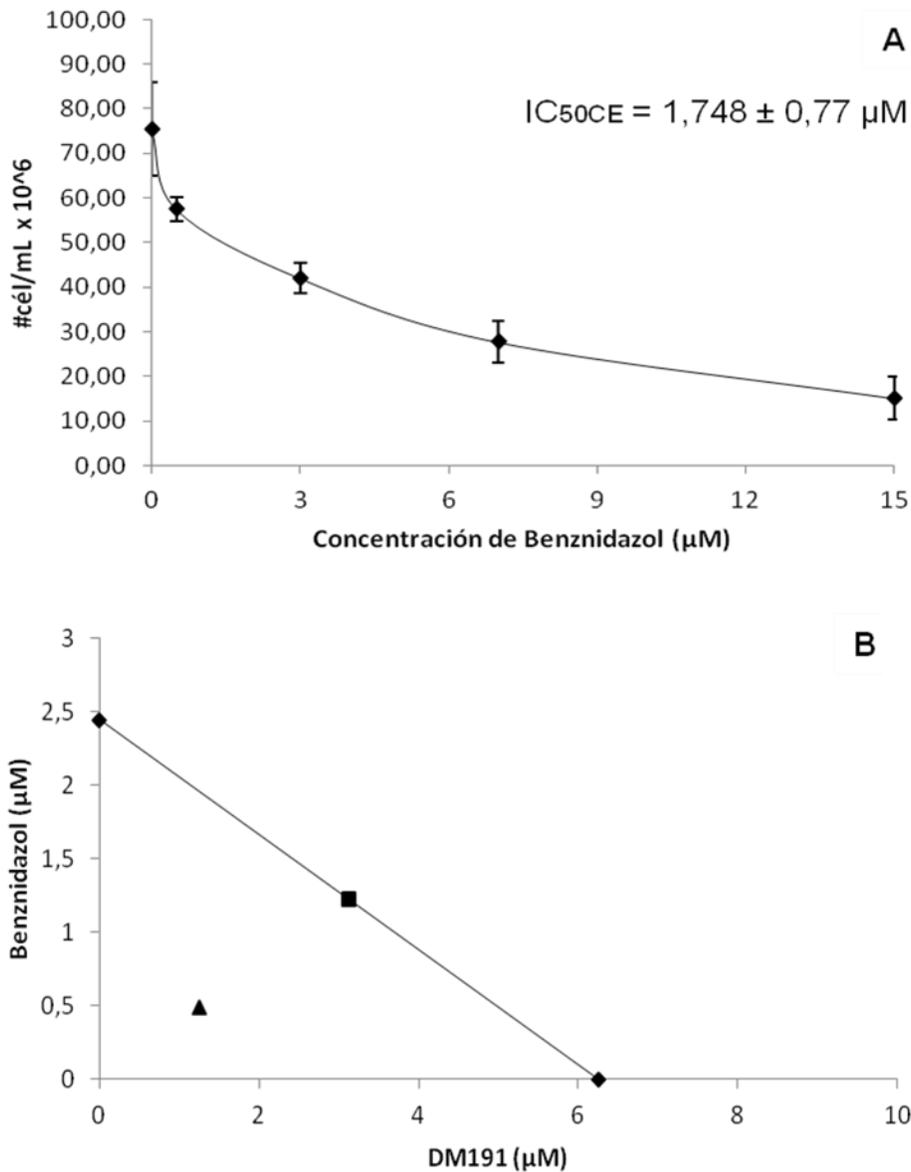


Figura 13. Efecto de la combinación de la tetrahydroquinolina DM191 con el Benznidazol sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*: efecto de DM191 sobre el Benznidazol.

Los cultivos se iniciaron con una población de 7×10^6 parásitos/mL, siguiendo su proliferación cada 24 horas por 10 días. El DM191 se mantuvo a una concentración fija de $6,25 \mu\text{M}$ y el Benznidazol fue variado en concentraciones de $0,5 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$, $7 \mu\text{M}$, y $15 \mu\text{M}$. Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (\pm) la desviación estándar de tres experimentos independientes. **(A)**. Isoblograma. Se muestra el IC₅₀ teórico de la combinación, IC_{CT} (■) y el IC₅₀ experimental de la combinación, IC_{CE} (▲) **(B)**.

En la Tabla 6 se pueden observar los valores obtenidos para el IC₅₀ teórico para esta combinación, de ser aditiva (IC_{50CT}) y los IC₅₀ obtenidos experimentalmente para la combinación (IC_{50CE}) en cada caso, así como el valor del índice de combinación (CI), junto al efecto alcanzado. Los IC_{50CE} tanto al evaluar el efecto del Benznidazol sobre el DM191, como al evaluar el efecto de DM191 sobre el Benznidazol, resultaron menores al IC_{50CT}, siendo por ende una combinación sinérgica. En este sentido, la combinación entre Benznidazol y la tetrahydroquinolina DM191 puede considerarse también como un posible tratamiento tripanocida alternativo. Nuevamente, cabe destacar el efecto potenciador ejercido por la tetrahydroquinolina sobre el Benznidazol, aspecto atractivo para un nuevo tratamiento al permitir reutilizar este fármaco.

Tabla 6. Valores para el 50% de inhibición de la proliferación teórico (IC_{50CT}) y experimentales (IC_{50CE}), e índices de combinación (CI) obtenidos para la combinación Benznidazol-DM191.

Ensayo	IC _{50CT} (μM)	IC _{50CE} (μM)	CI	Clasificación
DM191 sobre Benznidazol	4,35	1,748 ± 0,77	0,402	Sinérgica
Benznidazol sobre DM191	4,35	1,699 ± 1,503	0,391	Sinérgica

Los valores de IC_{50CE} fueron obtenidos con el software GraphPad Prism 7, con un p ≤ 0,05.

Los CI se calcularon como la suma de las relaciones de cada compuesto en la combinación entre sus IC₅₀ individuales. Se clasifica una combinación como sinérgica cuando CI < 1, aditiva cuando CI = 1, y antagónica cuando CI > 1

2.3. Efectos de la combinación de las tetrahydroquinolinas DM231 y DM191 sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*

Por último, en las Figuras Figura 14 y Figura 15 se muestran los resultados obtenidos para la combinación de las tetrahydroquinolinas DM231 y DM191. En la Figura 14A, se observa la acción de la combinación sobre la proliferación de epimastigotes de

Trypanosoma cruzi, al evaluar el efecto de DM231 sobre DM191, donde se encontró un comportamiento dosis-dependiente. Por su parte, en la Figura 14B se muestra el isoblograma obtenido para este ensayo, cuya recta de aditividad resulta de la unión de los IC_{50} de ambos compuestos ($7,85\mu M$ para DM231 y $6,25\mu M$ para DM191), donde se evidencia que el IC_{50CE} resultó menor al valor esperado teóricamente para una combinación aditiva, observándose igualmente un efecto sinérgico.

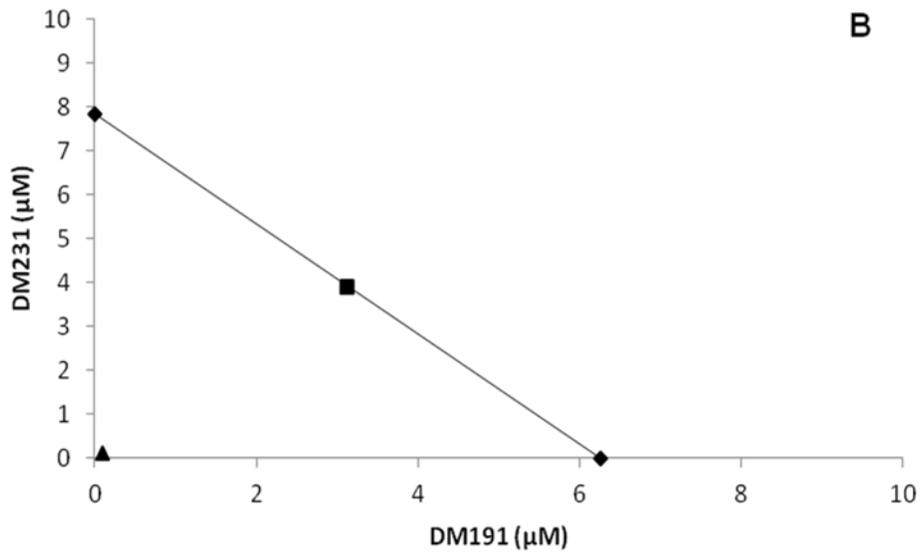
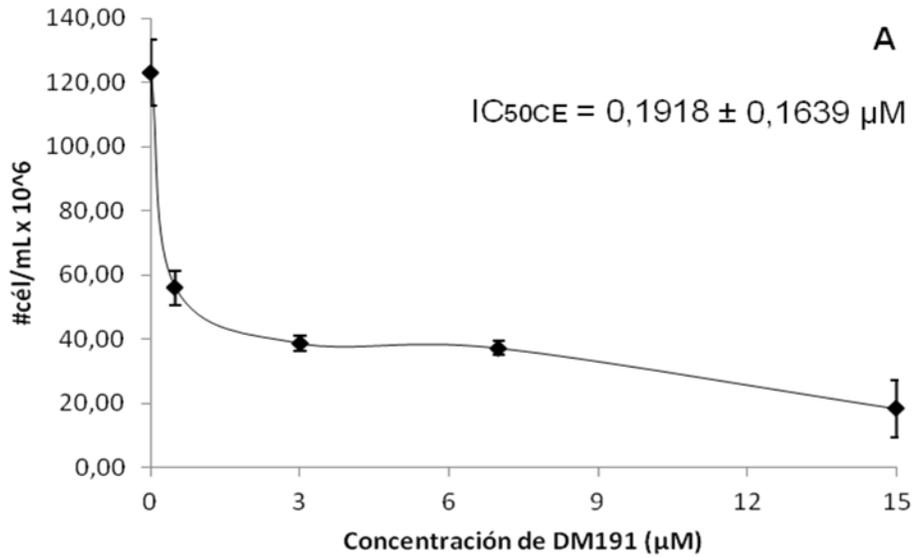


Figura 14. Efecto de la combinación de las tetrahydroquinolinas DM231 y DM191 sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*: efecto de DM231 sobre DM191.

Los cultivos se iniciaron con una población de 7×10^6 parásitos/mL, siguiendo su proliferación cada 24 horas por 10 días. El DM231 se mantuvo a una concentración fija de $7,85 \mu\text{M}$ y el DM191 fue variado en concentraciones de $0,5 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$, $7 \mu\text{M}$, y $15 \mu\text{M}$. Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (\pm) la desviación estándar de tres experimentos independientes. **(A)**. Isobolograma. Se muestra el IC_{50} teórico de la combinación, IC_{CT} (■) y el IC_{50} experimental de la combinación, IC_{CE} (▲) **(B)**.

Por su parte, en la Figura 15A se observa la acción de la combinación sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*, cuando se evalúa el efecto de DM191 sobre DM231, evidenciándose un comportamiento dosis-dependiente, donde la proliferación disminuye a medida que aumenta la dosis. Asimismo, en la Figura 15B se muestra el isoblograma generado para esta combinación. En él, se evidencia que el valor de IC_{50} para la combinación obtenido experimentalmente, se sitúa bajo la recta de aditividad teórica, y por ende al IC_{50} esperado teóricamente, resultando en una combinación sinérgica.

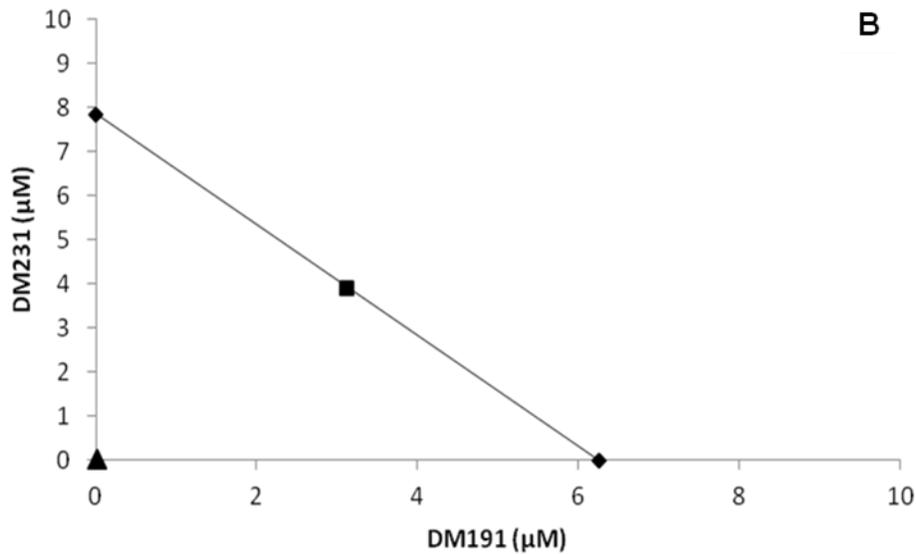
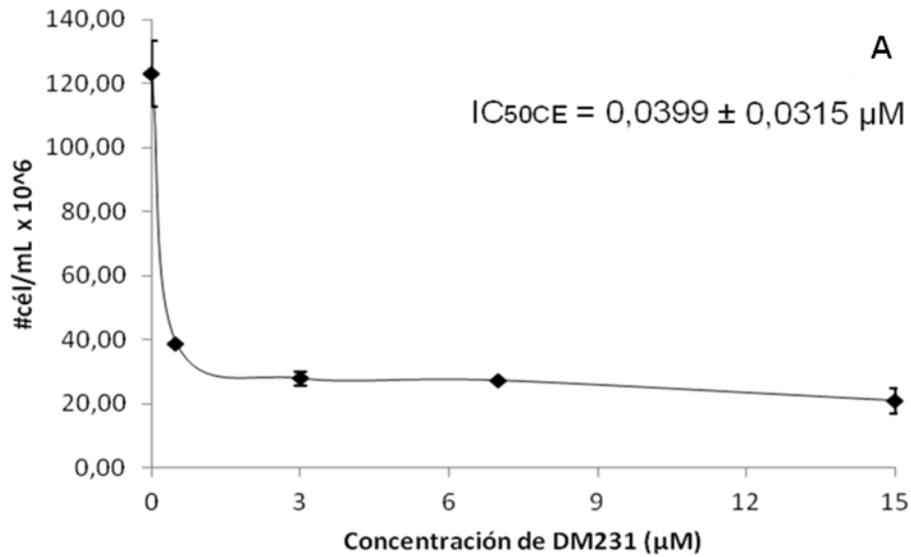


Figura 15. Efecto de la combinación de las tetrahydroquinolinas DM231 y DM191 sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*: efecto de DM191 sobre DM231.

Los cultivos se iniciaron con una población de 7×10^6 parásitos/mL, siguiendo su proliferación cada 24 horas por 10 días. El DM191 se mantuvo a una concentración fija de $6,25 \mu\text{M}$ y el DM231 fue variado en concentraciones de $0,5 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$, $7 \mu\text{M}$, y $15 \mu\text{M}$. Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio (\pm) la desviación estándar de tres experimentos independientes. **(A)**. Isoblograma. Se muestra el IC_{50} teórico de la combinación, IC_{CT} (■) y el IC_{50} experimental de la combinación, IC_{CE} (▲) **(B)**.

En la Tabla 7 se pueden observar los valores obtenidos para el IC₅₀ teórico para esta combinación, de ser aditiva (IC_{50CT}) y los IC₅₀ obtenidos experimentalmente para la combinación (IC_{50CE}) en cada caso, así como el valor del índice de combinación (CI), junto a la clasificación del efecto alcanzado. Los IC_{50CE} tanto al evaluar el efecto de DM231 sobre el DM191, como al evaluar el efecto de DM191 sobre el DM231, resultaron menores al IC_{50CT}, lo cual evidencia una potenciación mutua, donde ambas combinaciones resultan en sinergismo. En este sentido, la combinación entre estos compuestos también puede considerarse como una opción antiproliferativa contra *T. cruzi*.

Tabla 7. Valores para el 50% de inhibición de la proliferación teórico (IC_{50CT}) y experimentales (IC_{50CE}), e índices de combinación (CI) obtenidos para la combinación DM231–DM191.

Ensayo	IC _{50CT} (μM)	IC _{50CE} (μM)	CI	Clasificación
DM231 sobre DM191	7,05	0,1918 ± 0,1639	0,027	Sinergística
DM191 sobre DM231	7,05	0,03988 ± 0,03147	0,006	Sinergística

Los valores de IC_{50CE} fueron obtenidos con el software GraphPad Prism 7, con un p < 0,05.

Los CI se calcularon como la suma de las relaciones de cada compuesto en la combinación entre sus IC₅₀ individuales. Se clasifica una combinación como sinérgica cuando CI < 1, aditiva cuando CI = 1, y antagónica cuando CI > 1.

En base a estos resultados, las combinaciones del Benznidazol con DM231, Benznidazol con DM191, y de las dos tetrahydroquinolinas, resultan interesantes desde el punto de vista de pares tripanocidas. Como puede observarse, las tetrahydroquinolinas estudiadas permiten potenciar el efecto del Benznidazol, pudiendo ser utilizada en combinación con éste disminuyendo la concentración del Benznidazol a utilizar y con ello probablemente los efectos secundarios generados por esta droga, lo cual hace atractivo a

estos compuestos para un posible uso combinado con el Benznidazol en posibles tratamientos antichagásicos.

Es importante hacer énfasis en las ventajas que conllevan de por sí las terapias de combinaciones: por una parte, permiten disminuir las dosis requeridas de los compuestos involucrados, lo cual es relevante si uno de ellos genera efectos secundarios perjudiciales al hospedador; y, por otra, reducen el riesgo de generación de resistencia en los parásitos (Foucquier y Guedj, 2015; Da Gama y col., 2011). En este sentido en la literatura, existen evidencias de la efectividad del uso de estas estrategias sobre diversas enfermedades y específicamente contra el *Trypanosoma cruzi*, utilizando como uno de los compuestos combinados la droga de referencia Benznidazol (Aguilera y col., 2018; Da Gama y col., 2011; Hinojosa y col., 2012; López-Muñoz y col., 2010; Pelizzaro-Rocha y col., 2010).

Asimismo, es importante resaltar el hecho de que las tetrahydroquinolinas ya se han utilizado como agentes en combinación con otras drogas para terapias anticancerígenas obteniéndose resultados exitosos (Muñoz y col., 2011). También se ha utilizado el compuesto oxamniquina (6-hidroximetil-2-isopropil-aminometil-7-nitro-1,2,3,4-tetrahydroquinolina) en ensayos de combinaciones contra el parásito *Schistosoma mansoni*, obteniéndose en este caso resultados variables (Utzinger y col., 2003)

En estudios donde se ensayan combinaciones de compuestos, hay que tomar en cuenta que los compuestos involucrados pueden interactuar entre sí y con el sistema de numerosas formas, generando efectos comunes de diversa índole (Yeh y col., 2009). Entre ellos, los efectos sinérgicos y antagónicos, los cuales son de interés en la búsqueda de posibles tratamientos (Yin y col., 2014), teniendo en este caso como objetivo alcanzar un

sinergismo. Aunque en general al ensayar combinaciones no se evalúan a su vez los posibles mecanismos de acción involucrados, se considera que los modelos sinérgicos resultan de compuestos que individualmente, pueden por una parte actuar en dos rutas metabólicas diferentes que generan un efecto combinado mayor; pueden presentar acciones complementarias que regulan un blanco o un proceso, al interactuar con múltiples sitios del blanco, de la ruta metabólica, distintos estados y diferentes subtipos del blanco; o bien, compuestos que involucran acciones facilitadoras donde los efectos secundarios de uno de ellos puede aumentar la actividad del otro (Jia y col., 2009). En el caso del presente estudio, podría sugerirse con cautela, que las combinaciones sinérgicas obtenidas para el Benznidazol y las tetrahydroquinolinas, considerando las acciones comprobadas del Benznidazol sobre el DNA y otras moléculas como lípidos (Viotti y col., 2009, Vinaud y De Souza, 2017), desconocidas hasta ahora para las tetrahydroquinolinas, resultan en un efecto antiproliferativo mayor por la suma de efectos perjudiciales para el parásito no relacionados entre sí.

Tomando en cuenta lo anterior, las combinaciones sinérgicas entre el Benznidazol y las tetrahydroquinolinas podrían resultar atractivas, si se consideran además las ventajas de seguir utilizando al Benznidazol en una terapia, al ser una droga ya establecida como tratamiento para la enfermedad. El uso en la combinaciones de este fármaco, el cual no requiere de las fases de estudio investigativo y clínico, representa un ahorro en inversión considerable, aspecto importante a tener en cuenta por el bajo interés de la industria farmacéutica, debido al tiempo que conllevaría el estudio de un nuevo compuesto así como por el bajo retorno de la inversión que representa el generar un tratamiento completamente nuevo para esta enfermedad (Shim y Liu, 2014).

Por su parte, la combinación sinérgica entre las tetrahydroquinolinas, podría ser igualmente atractiva ya que, aunque son dos compuestos nuevos que requerirían mayor estudio e inversión en su investigación para un posterior uso farmacológico, tienen como ventaja al ser compuestos activos derivados de productos naturales, su aparente inocuidad en células humanas: tal como ha sido demostrado, éstos no ejercen un efecto perjudicial en fibroblastos (ver ANTECEDENTES). Sin embargo, al ser compuestos nuevos desde el punto de vista farmacológico, su posible uso como fármacos implicaría su estudio farmacológico completo, que al conllevar tiempo e inversión monetaria, además de requerir estudios adicionales *in vivo* que demostraran la efectividad de los mismos, la convierte en la opción menos viable a corto o mediano plazo.

Es importante también destacar que las terapias de combinaciones, aunque altamente ventajosas, poseen ciertos inconvenientes sobre los cuales es recomendable prestar atención, entre ellos, la posible interacción entre los compuestos, que contrario a lo esperado, aumenten los efectos tóxicos o efectos secundarios perjudiciales; y la mayor complejidad en la formulación de drogas múltiples (Sun y col., 2016), aspecto que en el caso de la enfermedad de Chagas, tiene la limitante adicional de que los tratamientos deben ser administrados por vía oral a fin de facilitar su distribución en las zonas mayormente afectadas (Johnston y col., 2013).

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, si bien la combinación de las drogas analizadas tienen un importante efecto sobre la proliferación de *T. cruzi*, mostrando un sinergismo fuerte de las tetrahydroquinolinas con la droga de referencia Benznidazol y entre ambas tetrahydroquinolinas, es necesario continuar investigando el efecto de estas

combinaciones, tanto en el estadio tripomastigote del parásito, al ser la principal fase del parásito que permanece en el humano; en células infectadas con amastigotes, así como en modelos murinos *in vivo*, para así evaluar sus comportamientos farmacocinéticos y farmacodinámicos, así como determinar si el efecto sinérgico observado se mantiene, mejora, o desaparece, al trabajar con un sistema animal complejo. Es importante resaltar, que la limitada eficacia mostrada por la droga antichagásica Benznidazol en la fase crónica de la enfermedad (Castro, 2014) y la severidad de los síntomas asociados a esta fase de la infección (Avedaño-Rangel y Rey, 2016), amerita la necesidad de encontrar moléculas activas contra el estadio intracelular, amastigote, de *T. cruzi*. Los estudios realizados en este trabajo únicamente fueron sobre el estadio epimastigote, quedando por estudiar si las tetrahydroquinolinas sustituidas DM191 y DM231, que mostraron un importante efecto sobre la proliferación de los epimastigotes sean también activas como tripanocidas en el estadio intracelular de este parásito

3. Efectos de las combinaciones de Benznidazol y tetrahydroquinolinas sustituidas sobre la actividad Ca^{2+} -ATPasa de epimastigotes *Trypanosoma cruzi*

El mantenimiento de la homeóstasis de calcio en los tripanosomatidios es esencial para su supervivencia. Uno de los sistemas reguladores de los niveles intracelulares de Ca^{2+} más importante en estos parásitos es la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática, la cual se encarga de la regulación fina de los niveles intracelulares basales de Ca^{2+} en los mismos. Esta enzima se ha planteado como posible blanco de la acción de drogas (García, 2017; Villarroel, 2017; Benaím y col., 2012; Benaím y García, 2011), al considerar que un efecto sobre ésta implicaría una pérdida de la regulación de Ca^{2+} , que tomando en cuenta el papel de este catión en la célula del tripanosomatidio (Benaím y Cervino, 2000; Pérez-Gordones,

2011), podría llevar o bien a su muerte celular, o bien a cambios en los patrones de señalización de diferentes procesos.

En este sentido, con la finalidad de estudiar si esta enzima pudiera ser un posible blanco de la acción de los compuestos en estudio, se evaluaron los efectos de estos compuestos de manera individual y combinados sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Para ello, se incubaron preparaciones de membrana plasmática de estos parásitos en ausencia (actividad control o basal), en presencia de diferentes concentraciones de las tetrahydroquinolinas DM191 o DM231 (5 μM y 15 μM) de manera individual, en presencia de Benznidazol (5 μM y 15 μM) y en presencia de diferentes combinaciones de estos compuestos (Benznidazol-DM191, Benznidazol-DM231 y DM191-DM231) y se determinó la actividad de hidrólisis de ATP por la Ca^{2+} -ATPasa presente en dichas membranas a una concentración de Ca^{2+} libre de 10 μM .

Como puede observarse en las figuras Figura 16, Figura 17 y Figura 18, donde se representa el porcentaje de actividad Ca^{2+} -ATPasa obtenido respecto al control, y en la Tabla 8, en la cual se detallan los porcentajes de actividad respecto al control, y de inhibición para cada condición, los diferentes compuestos de manera independientes y combinados tuvieron un efecto inhibitorio sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática de *T. cruzi*. Este efecto fue dosis dependiente, excepto para el caso del DM191, el cual a las concentraciones ensayadas (5 μM y 15 μM) mostró un efecto inhibitorio similar (Figura 17), aunque más fuerte que el DM231 y el Benznidazol (Figura 16). Como puede observarse, la inhibición por el DM191 para 5 μM y 15 μM fue de 59,30 %

y 61,24 %, respectivamente, mientras que la máxima inhibición para DM231 (a 15 μM) fue de 42,67 %, y para el Benznidazol (a 15 μM) fue de 40,25 %. Asimismo, ambos compuestos (DM191 y DM231) mostraron un efecto inhibitorio mayor al observado con el Benznidazol (Figuras 16 y 17; Tabla 8).

Asimismo, pudo observarse el efecto inhibitorio de la combinación de los compuestos bajo estudio (Benznidazol-DM231; Benznidazol-DM191 y DM191-DM231) sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de *T. cruzi* (Fig. Figura 16, Figura 17, Figura 18). Los ensayos se realizaron tomando en cuenta la combinación de ambos compuestos en 3 proporciones diferentes: 1) ambos compuestos en las concentraciones correspondientes a su IC_{50} ; 2) Uno de los compuestos (A) a una concentración correspondiente a la mitad de su IC_{50} y el otro compuesto (B) al doble de su IC_{50} y 3) el compuesto (A) al doble de su IC_{50} y el compuesto (B) a la mitad de su IC_{50} . Estos valores fueron escogidos arbitrariamente, a fin de evaluar si existía alguna variación del efecto observado dependiente de la proporción de cada compuesto en la combinación.

Así, al combinar el Benznidazol con la tetrahydroquinolina DM231, en cualquiera de las proporciones analizadas: 1) Benznidazol (2,45 μM)-DM231 (7,85 μM); 2) Benznidazol (1,23 μM)-DM231 (15,7 μM) y 3) Benznidazol (4,9 μM)-DM231 (3,93 μM), se observó una inhibición similar en cualquiera de las combinaciones ensayadas, siendo el efecto inhibitorio mayor al observado con el Benznidazol y el DM231 de manera independiente (Fig. 16). Esto sugiere una potenciación entre estos compuestos respecto a la actividad inhibitoria que ejercen sobre esta enzima. Este efecto puede observarse de forma más directa en el caso de la combinación de ambos compuestos a concentraciones iguales a sus IC_{50} individuales (caso 1), donde la inhibición observada (56,40 %) fue mayor que la

obtenida para los compuestos solos a concentraciones similares (9,88 % a 5 μM y 40,25 % a 15 μM para el Benznidazol, y 34,43 % a 5 μM y 42,67 % a 15 μM para DM231).

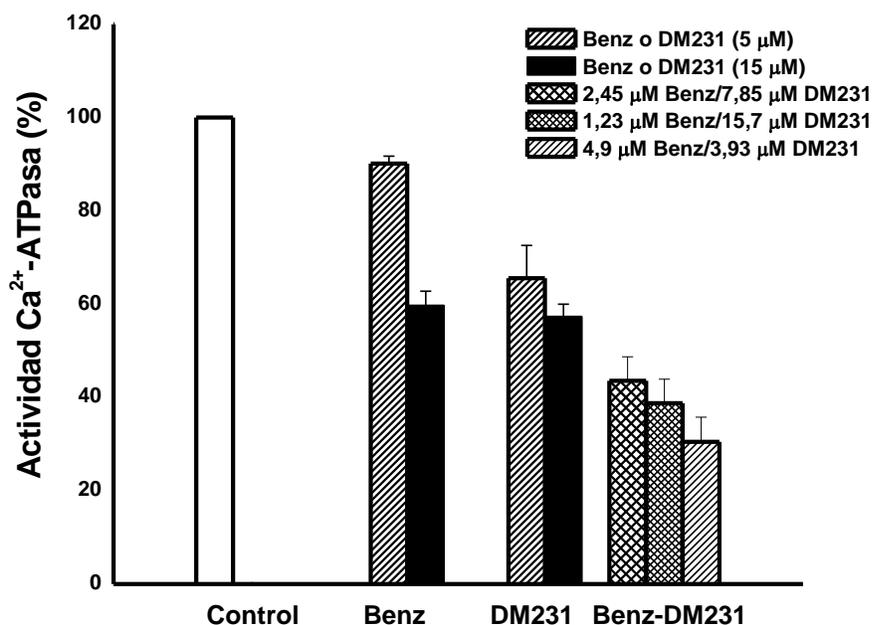


Figura 16. Efecto del Benznidazol y de la tetrahydroquinolina DM231, de manera individual y combinados, sobre la actividad de la Ca²⁺-ATPasa de membrana plasmática de *Trypanosoma cruzi*.

La actividad fue determinada a una concentración de Ca²⁺ libre de 10 μM . Se muestran en las barras la actividad enzimática (%) respecto al control (100%), de cada compuesto individualmente (a 5 μM y 15 μM), y de la combinación de ambos compuestos al administrarlos en concentraciones iguales (IC₅₀), dobles (2xIC₅₀) o medias (1/2IC₅₀) a su IC₅₀, según se indica en la leyenda inferior al gráfico. Las actividades reportadas corresponden al promedio (\pm) la desviación estándar de cinco experimentos independientes, siendo los efectos inhibitorios de cada compuesto con respecto al control estadísticamente significativos con un $p \leq 0,05$.

Por otra parte, al combinar el Benznidazol con la tetrahydroquinolina DM191, en cualquiera de las tres proporciones analizadas: 1) Benznidazol (2,45 μM)–DM191 (6,25 μM); 2) Benznidazol (1,23 μM)–DM191 (12,5 μM) y 3) Benznidazol (4,9 μM)–DM191 (3,13 μM), se observó una inhibición mayor a la observada con 5 μM Benznidazol en cualquiera

de las combinaciones ensayadas (Figura 17, Tabla 8). Sin embargo, con respecto a la inhibición observada con el compuesto DM191 de manera independiente (alrededor de 60 %), sólo una de las combinaciones: Benznidazol (4,9 μM) – DM191 (3,13 μM), mostró un importante efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima, llegando a inhibirla en aproximadamente un 90% (Tabla 8). El resto de las combinaciones tuvieron menor efecto sobre la enzima (38,47 % y 45,41 % de inhibición) que el observado con el DM191 de manera individual (cerca del 60 %) y similar a la observada con 15 μM de Benznidazol (40,25 %). Desde el punto de vista del Benznidazol, existe una potenciación aparente de DM191 sobre él, más desde el punto de vista del DM191, la tetrahydroquinolina está siendo inhibida por la presencia del Benznidazol para ejercer su efecto sobre la enzima, excepto cuando el Benznidazol se encuentra a una concentración el doble de su IC_{50} y el DM191 a la mitad de su IC_{50} , resultando en este caso el efecto inhibitorio sobre la Ca^{2+} -ATPasa mayor respecto a cualquiera de las otras condiciones, incluidos los compuestos individuales. En este sentido, pareciera que la presencia de Benznidazol a bajas concentraciones impide la acción inhibitoria de DM191 sobre la enzima, pero a concentraciones mayores la favorece.

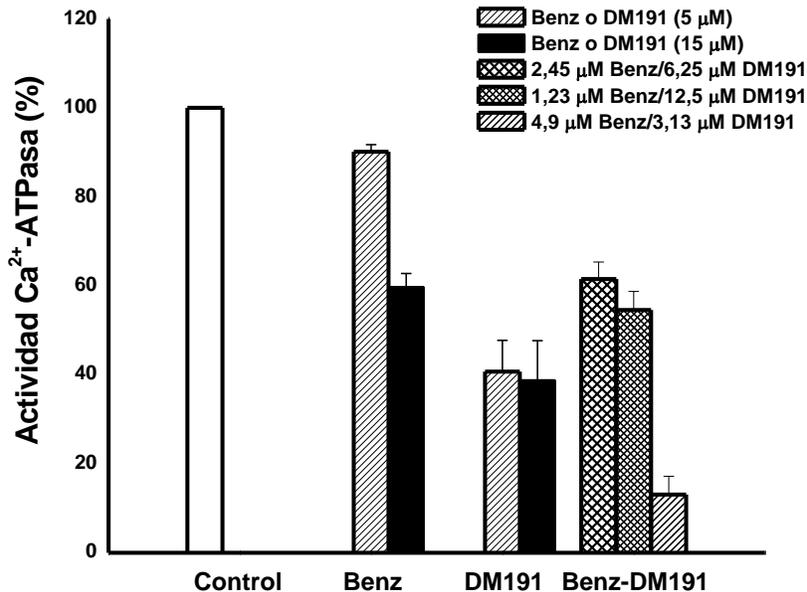


Figura 17. Efecto del Benznidazol y de la tetrahydroquinolina DM191, de manera individual y combinados, sobre la actividad de la Ca²⁺-ATPasa de membrana plasmática de *Trypanosoma cruzi*.

La actividad fue determinada a una concentración de Ca²⁺ libre de 10 μM. Se muestran en las barras la actividad enzimática (%) respecto al control (100%), de cada compuesto individualmente (a 5 μM y 15 μM), y de la combinación de ambos compuestos al administrarlos en concentraciones iguales (IC₅₀), dobles (2xIC₅₀) o medias (1/2IC₅₀) a su IC₅₀, según se indica en la leyenda inferior al gráfico. Las actividades reportadas corresponden al promedio (±) la desviación estándar de cinco experimentos independientes, siendo los efectos inhibitorios de cada compuesto con respecto al control estadísticamente significativos con un p ≤ 0,05.

Por último, en la se observa el efecto ejercido por las tetrahydroquinolinas sustituidas DM191 y DM231 solas y combinadas, sobre la actividad de la Ca²⁺-ATPasa de membrana plasmática de *Trypanosoma cruzi*. Como puede observarse ambas tetrahydroquinolinas inhibieron la actividad de esta enzima individualmente: para DM231, la inhibición fue de 34,43 % y 42,67 % (a 5 μM y 15 μM, respectivamente), y para DM191, la inhibición fue de 59,30 % y 61,24 % (a 5 μM y 15 μM, respectivamente). Sin embargo, al observar las actividades obtenidas al combinar ambos compuestos en cualquiera de las

tres proporciones analizadas: 1) DM231 (7,85 μM)–DM191 (6,25 μM); 2) DM231 (3,93 μM)–DM191 (12,5 μM) y 3) DM231 (15,7 μM)–DM191 (3,13 μM), se evidencia una pérdida del efecto inhibitorio en comparación a la obtenida por ambas tetrahydroquinolinas de manera individual (Figura 18, Tabla 8), con inhibiciones entre 14 % y 62 %, frente a las inhibiciones de 40–60% que presentaron los compuestos de forma individual, lo cual sugiere un posible efecto antagónico entre ellas, respecto a su acción sobre esta enzima.

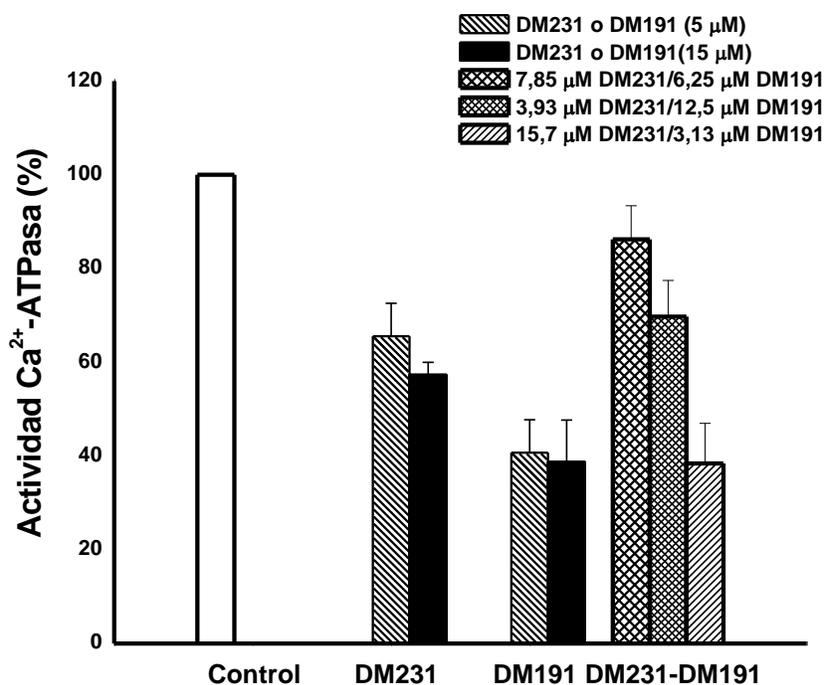


Figura 18. Efecto de las tetrahydroquinolinas DM231 y DM191, de manera individual y combinadas, sobre la actividad de la Ca²⁺-ATPasa de membrana plasmática de *Trypanosoma cruzi*.

La actividad fue determinada a una concentración de Ca²⁺ libre de 10 μM . Se muestran en las barras la actividad enzimática (%) respecto al control (100%), de cada compuesto individualmente (a 5 μM y 15 μM), y de la combinación de ambos compuestos al administrarlos en concentraciones iguales (IC₅₀), dobles (2xIC₅₀) o medias (1/2IC₅₀) a su IC₅₀, según se indica en la leyenda inferior al gráfico. Las actividades reportadas corresponden al promedio (\pm) la desviación estándar de cinco experimentos independientes, siendo los efectos inhibitorios de cada compuesto con respecto al control estadísticamente significativos con un $p \leq 0,05$.

Tabla 8. Actividad Ca²⁺-ATPasa obtenida al ensayar los compuestos, solos y combinados, respecto a la actividad control.

CONDICIÓN	Actividad Ca²⁺-ATPasa (% respecto al control ± D.E.)	Inhibición (%)
CONTROL	100,00	0,00
BZ 5	90,12 ± 1,59	9,88
BZ 15	59,75 ± 3,60	40,25
DM231 5	65,57 ± 7,00	34,43
DM231 15	57,33 ± 2,69	42,67
DM191 5	40,70 ± 7,06	59,30
DM191 15	38,76 ± 8,93	61,24
2,45 µM BZ - 7,85 µM DM231	43,60 ± 5,11	56,40
1,23 µM BZ- 15,7 µM DM231	38,76 ± 5,14	61,24
4,9 µM BZ - 3,13 µM DM231	30,52 ± 5,25	69,48
2,45 µM BZ - 6,25 µM DM191	61,53 ± 3,86	38,47
1,23 µM BZ- 12,5 µM DM191	54,59 ± 4,14	45,41
4,9 µM BZ - 3,13 µM DM191	13,08 ± 4,13	86,92
7,85 µM DM231 - 6,25 µM DM191	86,24 ± 7,14	13,76
3,93 µM DM231- 12,5 µM DM191	69,77 ± 7,72	30,23
15,7 µM DM231 - 3,13 µM DM191	38,44 ± 8,54	61,56

Estos resultados son interesantes, por una parte, en los ensayos *in vitro* sobre la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi*, las combinaciones de Benznidazol-DM231,

Benznidazol-DM191 y DM231-DM191 mostraron un importante efecto antiproliferativo, resultando en modelos de acción sinérgicos fuertes para todos los casos; por otra parte, estos compuestos de manera individual también mostraron un efecto inhibitorio importante sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de estos parásitos, sin afectar la Ca^{2+} -ATPasa de eritrocitos humanos (García, 2017). Sin embargo, el efecto observado sobre la enzima mostró ser diferencial. En el caso de las combinaciones Benznidazol-DM231, el efecto observado sobre la enzima es sinérgico; en el caso de la combinación Benznidazol-DM191, el efecto sinérgico sobre la enzima fue observado sólo a concentraciones de Benznidazol mayores a su IC_{50} , mientras que para la combinación de las tetrahydroquinolinas DM231-DM191, el efecto observado fue aparentemente antagónico. En este último caso, se podría pensar que, por una parte, es probable que exista alguna interacción entre ellos que evite su acción individual particularmente sobre esta enzima; o bien que interactúen en sitios distintos en la enzima, que generen cambios conformacionales que eviten la unión o la acción del otro compuesto. Estos resultados permiten sugerir que las tetrahydroquinolinas DM191 y DM231 tienen un efecto sobre la PMCA de estos parásitos y que esta enzima pudiera ser uno de los posibles blancos de acción de estos compuestos. Asimismo, el Benznidazol, aunque con efecto menos marcado, también podría tener como blanco a esta enzima, siendo interesante el efecto diferencial observado en la combinación de estos compuestos, sugiriendo modos de acción diferentes para el Benznidazol y las tetrahydroquinolinas sobre esta enzima.

4. Análisis de acoplamiento molecular

Dado los efectos observados sobre la inhibición diferencial de estos compuestos sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática, quisimos evaluar la posibilidad de

que existiera una interacción directa de los compuestos evaluados sobre la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de *Trypanosoma cruzi* y si es así como sería esta interacción. Para ello, se realizaron análisis *in silico* de acoplamiento molecular mediante el software AutoDockTools4 (ADT) (Morris y col., 2009), utilizando como receptor la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA) de mayor secuencia reportada, de *T. cruzi*, cepa CL Brener (UniProt: código Q4DSJ2). En la Figura 19 es posible visualizar la estructura 3D generada para esta proteína.

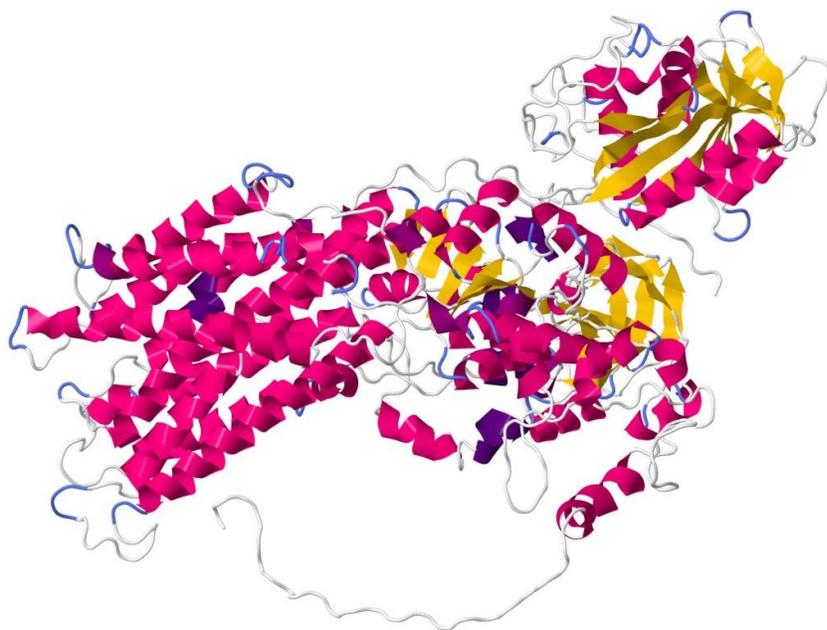


Figura 19. Estructura 3D de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de *Trypanosoma cruzi*.

Obtenida con el software Phyre2 (Kelley y col., 2015) a partir de la secuencia para la PMCA de *T. cruzi* cepa CL Brener en UniProt (Código Q4DSJ2), visualizada con Jmol.

Por otra parte, en la Figura 20 se muestran las estructuras 3D de los compuestos analizados, así como predicciones de sus posibles receptores. La PMCA podría clasificarse

como un receptor de membrana, clase que muestra uno de los mayores porcentajes de probabilidad como receptor para los tres compuestos, destacando que para las DMs es la clase de proteínas con mayor probabilidad de fungir como receptoras.

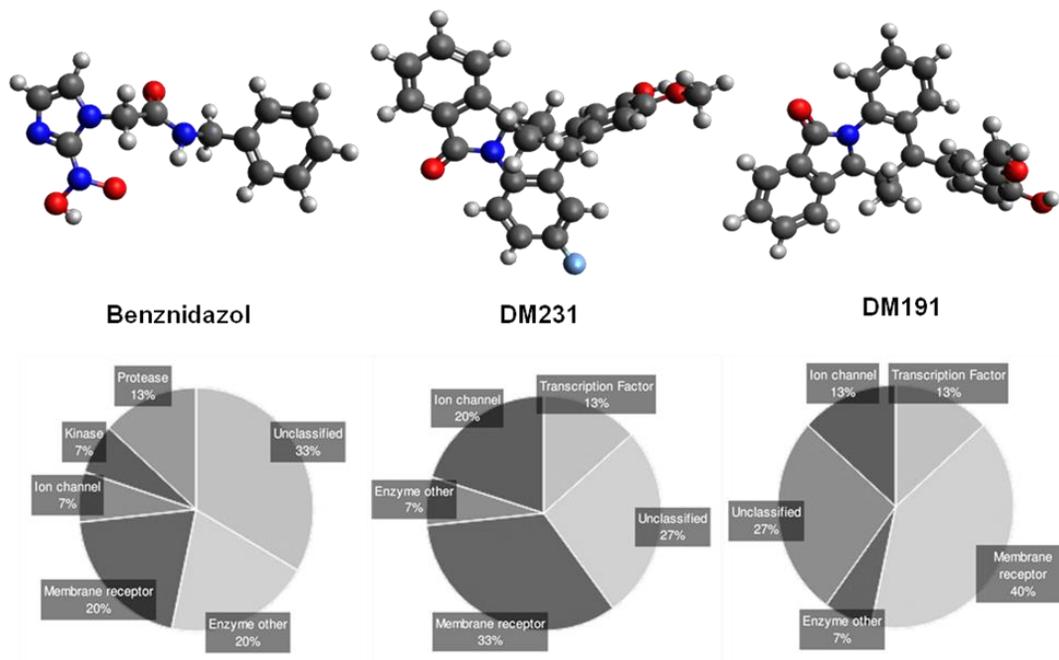


Figura 20. Modelos estructurales 3D para el Benznidazol, DM231 y DM191, y clasificación de sus posibles receptores. Los modelos estructurales 3D fueron obtenidos por el software Avogadro. Se muestran en gris los átomos de carbono; en blanco, los de hidrógeno; en rojo, los de oxígeno; en azul oscuro, los de nitrógeno, y en azul claro, un átomo de flúor. Las predicciones de las clases de posibles receptores para cada compuesto se obtuvieron mediante el servidor SwissTargetPrediction.

La Figura 21 muestra la probabilidad de la presencia de dominios transmembrana en la PMCA de *T. cruzi*, así como de la ubicación (hacia el exterior o el interior celular) de las distintas zonas de su secuencia, obtenidos mediante el servidor TMHMM v 2.0. Las ubicaciones de los dominios transmembrana obtenidos con este servidor coinciden con la información suministrada por UniProt. Los datos obtenidos a través de este análisis permitieron determinar si las secuencias involucradas en los diferentes acoplamientos se

encontrarían en una región transmembrana. Esta información es importante pues de darse la interacción de los compuestos con alguna región involucrada en los dominios transmembranas, se descartarían dada la imposibilidad estérica para dicha interacción.

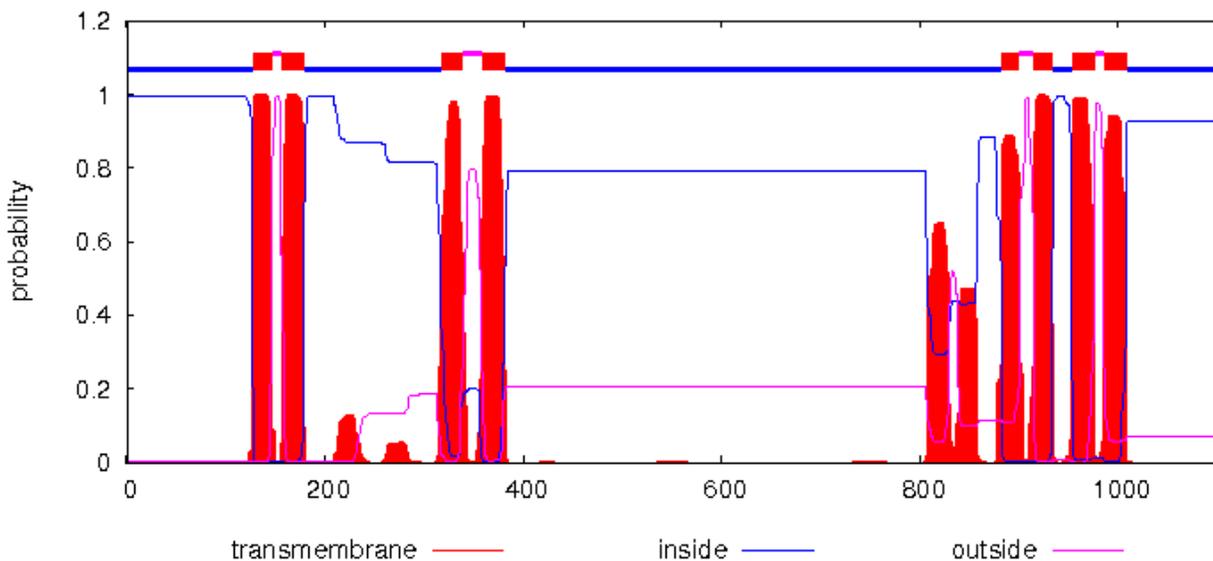


Figura 21. Predicciones topológicas para la Ca^{2+} -ATPasa de *Trypanosoma cruzi*.

Los resultados fueron obtenidos mediante el servidor PSIPRED Protein Sequence Analysis Workbench. Tal como indica la leyenda, se denotan en rosa los aminoácidos en conformaciones helicoidales, en amarillo, los aminoácidos en conformación de hoja β ; y en azul, límites de dominios.

En la Tabla 9 se muestran los valores de energías de acoplamiento obtenidos para cada compuesto con la PMCA, así como los aminoácidos involucrados en el posible sitio de interacción. Dada la gran cantidad de sitios de regulación que se han reportado para la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática humana, se decidieron establecer los análisis de acoplamiento en toda la proteína. Asimismo, se realizaron análisis de las combinaciones del Benznidazol fijo (1) con las tetrahydroquinolinas DM191 y DM231. Las estructuras 3D de los acoplamientos se muestran en la Figura 22. En todos los casos, los posibles sitios de unión se ubicaron fuera de las regiones transmembrana, por lo que se consideraron factibles en ese sentido.

Tabla 9. Valores de energía de acoplamiento obtenidos para los compuestos con la PMCA.

Acoplamiento	Energía de acoplamiento	Aminoácidos involucrados
Benznidazol en PMCA (1)	-3.79	309 Glu; 310 Arg; 744 Val; 762 Asn; 874 Lys
DM231 en PMCA	-6.0	42 Thr; 115 Phe; 116 Trp
DM191 en PMCA	-6.49	113 Leu; 115 Phe; 116 Trp; 117 Arg
Benznidazol+DM231 en PMCA	-3.79 (BZ) -5.96	Igual que al acoplarse individualmente
Benznidazol+DM191 en PMCA	-3.79 (BZ) -6.5	Igual que al acoplarse individualmente

Se muestran los mejores valores para cada acoplamiento, y los aminoácidos involucrados en el sitio de mejor interacción en la PMCA. Obtenidos mediante AutoDockTools.

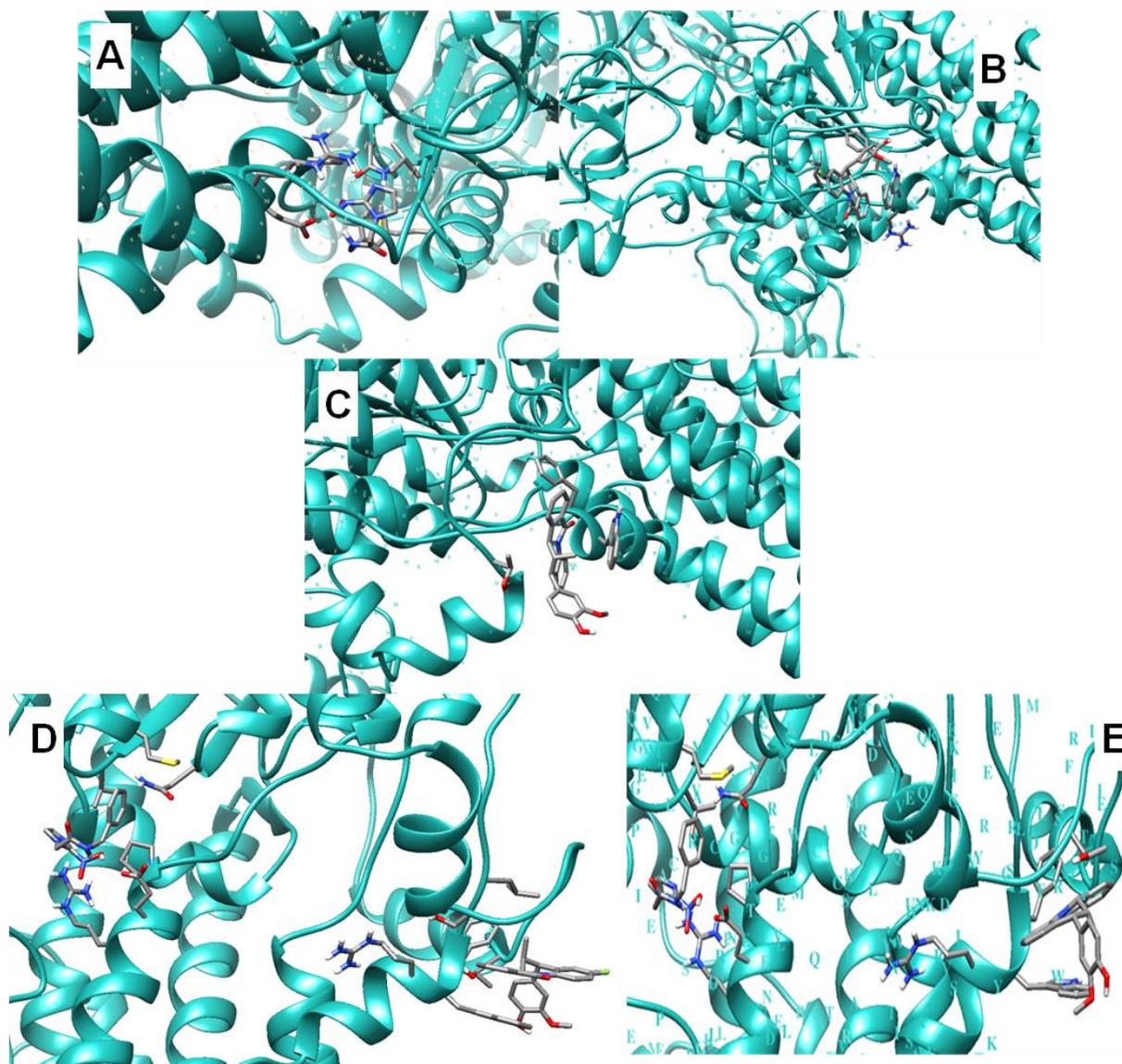


Figura 22. Estructuras 3D de los mejores acoplamientos de los compuestos sobre la PMCA de *T. cruzi*.
 A) Benznidazol. B) DM231. C) DM191. D) Benznidazol con DM231. E) Benznidazol con DM191.

Como puede observarse en la Tabla 9, el menor valor de energía libre lo obtuvo la tetrahydroquinolina DM191, seguida de la DM231 y por último, del Benznidazol. Esto coincide con las inhibiciones observadas en los ensayos *in vitro* de actividad (Figura 16, Figura 17, Figura 18; Tabla 8): la tetrahydroquinolina DM191 mostró mayores niveles de inhibición que la tetrahydroquinolina DM231, y esta a su vez que el benznidazol, lo cual

podría sugerir que estas interacciones establecidas por análisis *in silico* son posibles, y son del tipo inhibitoria para la enzima. Para las combinaciones con Benznidazol, los valores de energía libre de acoplamiento para las tetrahydroquinolinas fueron muy similares a los obtenidos por éstas individualmente, lo cual sugiere que ese modelo de unión con el Benznidazol sería probable. La coincidencia de los posibles sitios de interacción de las tetrahydroquinolinas podría esperarse al considerar la similitud de sus estructuras (Figura 8, Figura 20). Adicionalmente, se puede observar que para los análisis de acoplamiento considerando al Benznidazol como fijo en la PMCA, las energías de acoplamiento obtenidas para ambas tetrahydroquinolinas son muy similares a las obtenidas para ellas al acoplarse de forma individual, lo cual sugiere que sería posible una unión simultánea del Benznidazol y las tetrahydroquinolinas, siendo esto interesante al tomar en cuenta las mayores inhibiciones obtenidas para las combinaciones de estos compuestos en comparación a sus acciones individuales, pudiendo sugerirse una posible acción simultánea de resultado inhibitorio sobre la PMCA.

En virtud de ello, es interesante considerar al Benznidazol y a las tetrahydroquinolinas DM231 y DM1191, como posibles ligandos para la PMCA de *T. cruzi*. Particularmente, dada la facilidad de síntesis y variedad de las tetrahydroquinolinas, aunado a su pequeño tamaño, estas moléculas han sido estudiadas como posibles ligandos ante diversas proteínas, como el receptor opioide μ /receptor opioide δ (Bender y col., 2015), el receptor de estrógeno acoplado a proteína G GPR30 (Ramesh y col., 2010), y el receptor acoplado a proteína G CXCR4 (Debnath y col., 2013), con resultados variables. En general, su variabilidad estructural y posibilidad de modificarla permite jugar con diversos parámetros moleculares para mejorar su posibilidad de acoplamiento, según sea el blanco

deseado. En el caso del Benznidazol, al considerarse que ejerce efectos pleiotrópicos posiblemente derivados de un mecanismo de acción basado en la actividad de sus metabolitos reducidos sobre macromoléculas del parásito, y tomando la evidencia de su acción sobre proteínas (Díaz de Toranzo y col., 1988), como su actividad inhibitoria sobre la NADH-fumarato reductasa de *T. cruzi* (Turrens y col., 2016), aumenta la posibilidad de su papel como ligando sobre proteínas del parásito, tal como sugieren los análisis de acoplamiento mostrados.

Tal como demostró García en el 2017, estos compuestos individualmente afectan la homeostasis de Ca^{2+} , observándose que éstos incrementaban los niveles intracelulares de Ca^{2+} al alterar el potencial de membrana mitocondrial y provocar la alcalinización de los acidocalcisosomas del parásito. Tomando esto, junto al efecto inhibitorio ejercido por estos compuestos sobre la PMCA del parásito, se podría considerar como un posible modo de acción de estos compuestos, la pérdida de la homeóstasis de Ca^{2+} , lo cual tomando en consideración su papel como regulador celular, probablemente fuese un aspecto importante a considerar en la inhibición de la proliferación de *T. cruzi* ejercida por estos compuestos.

En este sentido, tomando en conjunto los efectos de las tetrahydroquinolinas DM231 y DM191, así como del Benznidazol (individualmente y en combinaciones) sobre la actividad *in vitro* de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de *Trypanosoma cruzi*, resumidos en la Tabla 10, en los cuales se evidenció un importante efecto inhibitorio, así como los análisis de acoplamiento *in silico*, los cuales mostraron relación con lo obtenido *in vitro*, nos

permiten sugerir a esta enzima como un posible blanco de estos compuestos a considerar en nuevos estudios antichagásicos, al utilizar ligandos similares a los estudiados.

Tabla 10. Resultados *in vitro* sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y su PMCA.

COMBINACIÓN	IC ₅₀ ± D.E. (µM)	CLASIFICACIÓN	INHIBICIÓN DE LA PMCA
Benznidazol-DM231 DM231-Benznidazol	0,4463 ± 0,2504 0,6618 ± 0,6499	Sinergística	Sí (probablemente sinérgica)
Benznidazol-DM191 DM191-Benznidazol	1,748 ± 0,77 1,699 ± 1,503	Sinergística	Sí (dependiente de la concentración)
DM231-DM191 DM191-DM231	0,1918 ± 0,1639 0,03988 ± 0,03147	Sinergística	Sí (Antagónica)

Dado que esta enzima permite la regulación fina del Ca²⁺ en el parásito, su inhibición implicaría afectar la regulación de la salida del catión de la célula, lo cual junto a los efectos generados individualmente sobre los distintos sistemas transportadores de Ca²⁺ intracelulares se traduciría en un incremento de los niveles intracelulares de este catión, afectándose así la viabilidad del parásito.

VII. CONCLUSIONES

- Las combinación del Benznidazol y la tetrahydroquinolina DM231 resultó sinérgica, obteniéndose índices de combinación de 0,087 y 0,129 al ensayar el efecto de DM231 sobre el Benznidazol, y del Benznidazol sobre DM231, respectivamente.
- Las combinación del Benznidazol y la tetrahydroquinolina DM191 resultó sinérgica, obteniéndose índices de combinación de 0,402 y 0,391 al ensayar el

efecto de DM191 sobre el Benznidazol, y del Benznidazol sobre DM191, respectivamente.

- Las combinación de las tetrahydroquinolinas DM231 y DM191 resultó sinérgica, obteniéndose índices de combinación de 0,006 y 0,027 al ensayar el efecto de DM231 sobre DM191, y de DM231 sobre DM191, respectivamente.
- Al ensayar el efecto de las tetrahydroquinolinas sobre el Benznidazol, en ambos casos se obtuvieron IC_{50} experimentales para la combinación menores al IC_{50} individual para el Benznidazol, lo cual indica que las tetrahydroquinolinas ejercen un efecto potenciador sobre el Benznidazol.
- Todas las combinaciones estudiadas se posicionan como posibles tratamientos tripanocidas en especial las combinaciones DM231-Benznidazol y DM191-Benznidazol, al implicar una reutilización mejorada del Benznidazol con una posible disminución de sus efectos secundarios perjudiciales.
- La combinación de las tetrahydroquinolinas DM231 y DM191 se plantea como posible tratamiento de combinación dado que obtuvo los menores índices de combinación, además de ser compuestos aparentemente inocuos sobre células humanas.
- La combinación DM231-Benznidazol mostró un efecto aparentemente sinérgico respecto a sus efectos inhibitorios sobre la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de *T. cruzi*.
- La combinación DM191-Benznidazol mostró un efecto aparentemente antagónico a mayores concentraciones de DM191, más considerablemente sinérgico a altas

concentraciones de Benznidazol, respecto a sus efectos inhibitorios sobre la Ca²⁺-ATPasa de membrana plasmática de *T. cruzi*.

- La combinación DM231-DM191 mostró un efecto antagónico respecto a sus efectos inhibitorios sobre la Ca²⁺-ATPasa de membrana plasmática de *T. cruzi*.
- Los análisis de acoplamiento *in silico* de los compuestos sobre la Ca²⁺-ATPasa de membrana plasmática de *T. cruzi*. demostraron la posibilidad de unión de todos estos compuestos con la enzima, siendo aparentemente más afín la tetrahydroquinolina DM191, seguida de la tetrahydroquinolina DM231 y por último el Benznidazol. Esto coincide con las inhibiciones de la actividad enzimática observadas.

VIII. RECOMENDACIONES

A fin de comprobar los efectos sinérgicos obtenidos para las combinaciones en diferentes sistemas de interés, se recomienda realizar ensayos con éstas sobre el estadio tripomastigote, para un posterior ensayo *in vivo* con animales de laboratorio.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilera, E., Varela, J., Serna, E., Torres, S., Yaluff, G., Vera, N., Cerecetto, H., y colaboradores. 2018. Looking for combination of Benznidazole and *Trypanosoma cruzi*-triosephosphate isomerase inhibitors for Chagas disease treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **113(3)**: 153-160.

Alarcón De Noya, B., Díaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Mauriello, L., et al. 2010. Large Urban Outbreak of Orally Acquired Acute Chagas Disease at a School in Caracas, Venezuela. *Journal of Infectious Diseases* **201**:1308-1315.

Apt, W., Heitmann, I., Jercic, M., Jofré, L., Muñoz, P., Noemí, I., San Martín, A., y colaboradores. 2008. Parte VI. Tratamiento antiparasitario de la enfermedad de Chagas. *Rev Chil Infect 2008*; **25(5)**:384-389.

Apt, W., Zulantay, I. 2011. Estado actual en el tratamiento de la Enfermedad de Chagas. *Rev Med Chile*. **139(2)**:247–257.

Araujo, M., Martins-Filho, O., Pereira, M., Brener, Z. 2000. A combination of Benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. *J Antimicrob Chemoth*. **45(6)**:819–824.

Ariyani, W., Iwasaki, T., Miyazaki, W., Lu, Y., Takeda, S., Koibuchi, N. 2018. A possible novel mechanism of action of genistein and daidzein for activating thyroid hormone receptor (TR)–mediated transcription. *Toxicol Sci*. kfy097.

Armada, F., Hernández, T., Toro, J., Flores, O. 2015. Guía para el diagnóstico, atención y manejo clínico de la Enfermedad de Chagas en Venezuela. Ministerio para el Poder Popular para la Salud, Venezuela, **40335**: 1–71.

ASP. 2017. *Trypanosoma cruzi*. [En línea] Australian Society for Parasitology. Disponible en: <http://parasite.org.au/para-site/text/cruzi-text.html> [Consulta: 21/10/17]

Avedaño-Rangel, F., Rey, K. 2016. Avances y desafíos en el control de la enfermedad de chagas en Venezuela y un estudio de caso en el estado Mérida. *Consciencia y Diálogo*. **6**:155–164.

Baba, A., Kawamura, N., Makino, H., Ohta, Y., Taketomi, S., Sohda, T. 1996. Studies on disease modifying antirheumatic drugs: synthesis of novel quinoline and quinazoline derivatives and their anti-inflammatory effect. *J. Med. Chem*. **39**:5176–5182.

Bhatia, R., Shreaz, S., Khan, N., Muralidhar, S., Basir, F., Manzoor, N., Khan, A. 2012. Proton pumping ATPase mediated fungicidal activity of two essential oil components. *J Basic Microbiol*. **52(5)**:504–12.

Benaim, G., Cervino, V. 2000. Intracellular Calcium Homeostasis and Signaling in Trypanosomatids. *Elect. J. Pathol. Histol*. **6(1)**:1–11.

Benaim, G., Garcia, C. 2011. Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishmaniasis –a review. *Trop. Biomed*. **28(3)**:471– 481.

Benaim, G., Hernández-Rodríguez, V., Mujica-González, S., Plaza-Rojas, L., Silva, M., Parra-Gimenez, N. García-Marchan, Y., y colaboradores. 2012. *In vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of dronedarone, a novel amiodarone derivative with an improved safety profile. *Antimicrob. Agents Chemother*. **56(7)**: 3720–3725.

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

Benaim, G., Losada, S., Gadelha, F., Docampo, R. 1991. A calmodulin-activated Ca²⁺Mg²⁺-ATPase is involved in Ca²⁺ transport by plasma membrane vesicles from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J*. **280(Pt-3)**: 715–720.

Benaim, G., Moreno, S., Hutchinson, G., Cervino, V., Hermoso, T., Romero, P., Ruiz, F., de Souza, W., Docampo, R. 1995. Characterization of the plasma membrane calcium pump from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J*. **306**: 299–303.

- Benaim, G., Paniz-Mondolfi, A. 2012. The emerging role of amiodarone and dronedarone in Chagas disease. *E. Nat. Rev. Cardiol.* **9(10)**:605–609.
- Benaim, G., Romero, P. 1990. A Calcium Pump in Plasma Membrane Vesicles from *Leishmania braziliensis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1027**(1)**: 79–84.
- Benaim, G., Sanders, J., García-Marchán, Y., Colina, C., Lira, R., Caldera, A., Payares, G., y colaboradores. 2006. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J. Med. Chem.* **49(3)**:892–899.
- Bender, A., Griggs, N., Anand, J., Traynor, J., Jutkiewicz, E., Mosberg, H. 2015. Asymmetric synthesis and in vitro and in vivo activity of tetrahydroquinolines featuring a diverse set of polar substitutions at the 6 position as mixed-efficacy μ opioid receptor/ δ opioid receptor ligands. *ACS Chem. Neurosci.* **6(8)**: 1428–1435.
- Bensadoun, A., Weinstein, D. 1976. Assay of Proteins in the Presence of Interfering Materials. *Anal. Biochem.* 70**(1)**: 241–250.
- Berrizbeitia M., Aguilera Ward, B., Rodríguez, J., Jorquera, A., Ndao, M. 2010. Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en la población rural de Miraflores, estado Monagas. Estabilidad y diferencia de reactividad de epimastigotes fijados. *Rev. Soc. Venez. Microbiol.* **30**:55–60.
- Bonney, K. Y Engman, D. 2015. Autoimmune Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *Am. J. Pathol.* **185(6)**: 1537–1547.
- Boveris, A., Sies, H., Martino, E., Docampo, R., Turrens, J., Stoppani, A. 1980. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.* **188**:643–648.
- Brini, M., Cali, T., Ottolini, D., Carafoli, E. 2013. Intracellular Calcium Homeostasis and Signaling. *Met Ions Life Sci.* **12**:119–168.
- Brini, M., Carafoli, E. 2009. Calcium Pumps in Health and Disease. *Physiol Rev.* **89**: 1341–1378.
- Bustamante, J., Craft, J., Crowe, B., Ketchie, S., Tarleton, R. 2014. New, Combined, and Reduced Dosing Treatment Protocols Cure *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice. *J Infect Dis.* **209**:150–162.
- Carafoli, E. 1987. Intracellular calcium homeostasis. *Ann. Rev. Biochem.* **56**:395–433.
- Carafoli, E. 1992. The Ca²⁺ Pump of the Plasma Membrane. *J Biol Chem.* **267(4)**: 2115–2118.
- Carafoli, E. 1994. Biogenesis: Plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. *FASEB J.* **8(13)**: 993–1002.
- Carafoli, E., Krebs, J. 2016. Why Calcium? How Calcium became the best Communicator. *J. Biol. Chem.* **291**: 20849–20857

- Carrasco, H., Segovia, M., Llewellyn, M., Morocoima, A., Urdaneta-Morales, S, Martínez, C., y colaboradores. 2012. Geographical Distribution of *Trypanosoma cruzi* Genotypes in Venezuela. *PLoS Negl Trop Dis.* **6(6)**:e1707.
- Castro, J. 2014. Efectos tóxicos de los fármacos utilizados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Ciencia e investigación.* **64(5)**:78-92.
- Cervino, V. Y Benaim, G. 2014. Importancia de la Ca²⁺-ATPasa de membrana plasmática en el mantenimiento de la homeostasis de Ca²⁺ en tripanosomatidios y como posible blanco de drogas. *Memorias del Instituto de Biología Experimental* **7**: 17-20.
- Charles, W. 2009. Alkaloids, Págs: 353-415, En: Evans, W. (Ed) Pharmacopoeial And Related Drugs Of Biological Origin. Decimosexta Edición. Saunders Ltd., Londres, Reino Unido.
- Chou, T. 2006. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacol Rev.* **58(3)**:621-681.
- Cohen, E., Ramos, H., Gamargo, M., Urbina, J. 1986. The water and ionic permeability induced by Polyene antibiotics across plasma membrane vesicles from *Leishmania sp.* *Biochem. Biophys. Acta.* **260**: 57-65.
- Da Gama, D., Meuser, M., Melo, G., Carvalho, C., Mondaine, A., Stephens, C., Boykin, D., y colaboradores. 2011. Combined treatment of Heterocyclic Analogues and Benznidazole upon *Trypanosoma cruzi* *In vivo*. *PLoS ONE.* **6(7)**:e22155.
- Dal Pozzo, M., Loreto, S., Santurio, F., Alves, H., Rossatto, L., De Vargas, C. 2012. Antibacterial activity of essential oil of cinnamon and trans-cinnamaldehyde against *Staphylococcus* spp. Isolated from clinical mastitis of cattle and goats. *Acta Sci. Vet.* **40**: 1080.
- De Figueiredo, F., Urbina, J., Mayer, I., Lia, A., Assíria, T., Santana, I., Talvani, A., y col. 2013. Benznidazole and Posaconazole in Experimental Chagas Disease: Positive Interaction in Concomitant and Sequential Treatments. *PLOS Neglect Trop D.*
- Debnath, B., Xu, S., Grande, F., Garofalo, A., Neamati, N. 2013. Small Molecule Inhibitors of CXCR4. *Theranostics.* **3(1)**: 47-75.
- Días, D., Urban, S., Roessner, U. 2012. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites.* **2(2)**:303-336.
- Díaz de Toranzo, E., Castro, J., Franke de Cazzulo, B., Cazzulo, J. 1988. Interaction of Benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia.* **44**: 880-881.
- Docampo, R., de Boiso, J., Boveris, A., Stoppani, A. 1976. Localization of peroxidase activity in *Trypanosoma cruzi* microbodies. *Experientia.* **32**: 972-975.
- Docampo, R., Huang, G. 2015. Calcium signaling in trypanosomatid parasites. *Cell. Calcium* **57(3)**:194-202.

Docampo, R., Moreno, S. 1984. Free Radical Metabolites in the Mode of Action of Chemotherapeutic Agents and Phagocytic Cells on *Trypanosoma cruzi*. *Rev Infect Dis.* **6(2)**: 223–238.

Dorey G, Lockhart B, Lestage P, Casara P. 2000. New Quinolinic Derivatives As Centrally Active Antioxidants. *Bioorg Med Chem Lett.* **10(9)**:935–9.

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., Subbarow, Y. 1925. The Colorimetric Determination of Phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**: 375–400.

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

Fonseca–Berzal, C., Merchán, D., Romero–Bohórquez, A., Escario, J., 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. *Bioorg Med Chem Lett.* **23(17)**:4851–6.

Fouquier, J., Guedj, M. 2015. Analysis of drug combinations: current methodological landscape. *Pharma Res Per.* **3(3)**: e00149.

Fournet, A., Munoz, V., Manjon, A., Angelo, A., Hocquemiller, R., Cortes, D., Cave, A., Bruneton, J. 1988. Activité antiparasitaire d'alcaloïdes bisbenzylisoquinoléiques : 1. Activité in vitro sur des promastigotes de trois souches de *Leishmania*. *Journal of Ethnopharmacology – J Ethnopharmacol.* **24**:327–335.

Fournet, A., Manjon, A., Muñoz, V., Angelo, A., Bruneton, J., Hocquemiller, R., Cortes, D., Cave, A. 1988. Activité antiparasitaire d'alcaloïdes bisbenzylisoquinoléiques. II: Activité in vitro sur des epimastigotes de trois souches typifiées de *Trypanosoma cruzi*. *J Ethnopharmacol.* **24**:337–343.

Fournet, A., Angelo, A., Munoz, V., Hocquemiller, R., Cave, A., Bruneton, J. 1993. 2–Substituted Quinoline Alkaloids as Potential Antileishmanial Drugs. *Antimicrob Agents Ch.* **37(4)**:859–863.

García, M. 2017. Efecto de Tetrahydroquinolinas Sustituidas sobre la regulación de calcio intracelular de *Trypanosoma Cruzi*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Gfeller, D., Grosdidier, A., Wirth, M., Daina, A., Michielin, O., Zoete, V. 2014. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. *Nucleic Acids Res.* **42(W1)**: W32–W38.

Glass, G. 2004. Cardiovascular combinations. *Nat Rev Drug Discov.* **3**: 731–732.

- Goijman, S., Frasc, A., Stoppani, A. 1985. Damage of *Trypanosoma cruzi* deoxyribonucleic acid by nitroheterocyclic drugs. *Biochem Pharmacol.* **34**: 1457–1461.
- Goiijman, S., Stoppani, A. 1985. Effects of nitroheterocyclic drugs on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Pharmacol.* **34(8)**: 1331–1336.
- González, L., García–Huertas, P., Triana–Chávez, O., García, G., Fonseca, S., Mejía–Jaramillo, A. 2017. Aldo–keto reductase and alcohol dehydrogenase contribute to Benznidazole natural resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol.* **106(5)**: 704–718.
- Halicki, P., Ferreira, L., De Moura, K., Carneiro, P., Del Rio, K., Carvalho, T., Pinto, M., y colaboradores. 2018. Naphthoquinone Derivatives as Scaffold to Develop New Drugs for Tuberculosis Treatment. *Front Microbiol.* **9**: 673.
- Hall, B., Bot, C., Wilkinson, S. 2011. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *J Biol Chem.* **286**: 13088–13095.
- Hall, B., Wilkinson, S. 2012. Activation of Benznidazole by Trypanosomal Type I Nitroreductases Results in Glyoxal Formation. *Antimicrob Agents Chemother.* **56(1)**: 115–123.
- Han, Y., Zhang, J., Hu, C. 2018. A systematic toxicity evaluation of cephalosporins via transcriptomics in zebrafish and *in silico* ADMET studies. *Food Chem Toxicol.* **18**: 30264–3.
- Hanwell, M., Curtis, D., Lonie, D., Vandermeersch, T., Zurek, E., Hutchison, G. 2012. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J. Cheminformatics.* **4(1)**: 17.
- Hinojosa, R., Düsman, L., Ueda–Nakamura, T., Oliveira, S., Prado, B., Nobuyoshi, E., Yamada–Ogatta, S., y colaboradores. 2012. *In Vitro* and *In Vivo* Trypanocidal Synergistic Activity of *N*-Butyl–1-(4-Dimethylamino)Phenyl–1,2,3,4-Tetrahydro– β -Carboline–3-Carboxamide Associated with Benznidazole. *Antimicrob Agents Chemoter.* **56(1)**: 507–512.
- Hofmann, F., James, P., Vorherr, T., Carafoli, E. 1993. The C-terminal domain of the plasma membrane Ca^{2+} pump contains three high affinity Ca^{2+} binding sites. *J Biol Chem.* **268**: 10252–10259.
- Humphrey, R., Brockway–Lunardi, L., Bonk, D., Dohoney, K., Doroshov, J., Meech, S., Ratain, M., y col. 2011. Opportunities and challenges in the development of experimental drug combinations for cancer. *J Natl Cancer Inst.* **103**: 1222–1226.
- 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)**: 1–14.
- Ings, R., McFadzean, J., Ormerod, W. 1974. The mode of action of metronidazole in *Trichomonas vaginalis* and other microorganisms. *Biochemical Pharmacology.* **23**:1421–1429.

- Jacquemond-Collet, I., Benoit-Vical, F., Valentin, A., Stanislas, E., Mallié, M., Fourasté, I. 2002. Antiplasmodial and cytotoxic activity of galipinine and other tetrahydroquinolines from *Galipea officinalis*. *Planta Med.* **68(1)**:68–9.
- James, P., Vorherr T., Krebs, J., Morelli, A., Castello, G., McCormick, J., Penniston T., y colaboradores. 1989. Modulation of the erythrocyte Ca²⁺-ATPase by selective calpain cleavage of the calmodulin binding domain. *J. Biol. Chem.* **264**: 8289–8296.
- Jia, J., Zhu, F., Ma, X., Cao, Z., Li, Y., Chen, Y. 2009. Mechanisms of drug combinations: interaction and network perspectives. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**: 111–128.
- Johnston, K., Ford, L., Taylor, M. 2013. Overcoming the Challenges of Drug Discovery for Neglected Tropical Diseases: The A·WOL Experience. *J. Biomol. Screen.* **19(3)**: 335–343.
- Kelley, L., Mezulis, S., Yates, C., Wass, M., Sternberg, M. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols.* **10**:845–858.
- Kinnamon, K., Poon, B., Hanson, W., Waits, V. 1996. Primaquine analogues that are potent anti-*Trypanosoma cruzi* agents in a mouse model. *Ann Trop Med Parasit.* **90(5)**:467–474.
- Kinnamon, K., Poon, B., Hanson, W., Waits, V. 1997. Evidence that certain 8-aminoquinolines are potentially effective drugs against Chagas disease. *Ann Trop Med Parasit.* **91(2)**:147–152.
- Khan, S., Bhardwaj, T., Somvanshi, P., Mandal, R., Dar, S., Jawed, A., Wahid, M., y colaboradores. 2018. Inhibition of C298S mutant of human aldose reductase for antidiabetic applications: Evidence from *in silico* elementary mode analysis of biological network model. *J Cell Biochem.* doi: 10.1002/jcb.26904. [Epub previo a la impresión]
- Kouznetsov, V., Merchán, D., Arvelo, F., Bello, J., Sojo, F., Muñoz, A. 2010. 4-Hydroxy-3-metoxypheñyl substituted 3-methyl-tetrahydroquinoline derivatives obtained through imino Diels-Alder reactions as potential antitumoral agents. *Letters in Drug Design & Discovery* **7(9)**: 632–639.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J. Mol. Bio.* **305(3)**: 567–580.
- Kumar, K., y Mishra, N. 2016. A Review on Molecular Docking: Novel Tool for Drug Discovery. *JSM Chem.* **4(3)**: 1029.
- Landaeta, M. 2016. Enfermedades emergentes y reemergentes: zika, malaria y chagas. *Tribuna del Investigador.* **17(2)**:15–26.
- Lechuga, G., Borges, J., Calvet, C., De Araújo, H., Zuma, A. 2016. Interactions between 4-aminoquinoline and heme: Promising mechanism against *Trypanosoma cruzi*. *Int J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **6(3)**: 154–164.
- Lieke, T., Steeg, C., Graefe S., Fleischer, B., Jacobs, T. 2006. Interaction of natural killer cells with *Trypanosoma cruzi*-infected fibroblasts. *Clin Exp Immunol.* **145(2)**:357–364.

- Liverton, N., Holloway, M., McCauley, J., Rudd, M., Butcher, J., Carroll, S., DiMuzio, J., y colaboradores. 2008. Molecular Modeling Based Approach to Potent P2–P4 Macrocyclic Inhibitors of Hepatitis C NS3/4A Protease. *J. Am. Chem. Soc.* **130(14)**: 4607–4609.
- López–Muñoz, R., Faúndez, M., Klein, S., Escanilla, S., Torres, G., Lee–Liu, D., Ferreira, J. y colaboradores. 2010. *Trypanosoma cruzi*: *In vitro* effect of aspirin with nifurtimox and Benznidazole. *Exp Parasitol.* **124**:167–171.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193(1)**: 265–275.
- Lu, J., Bao, J., Chen, X., Huang, M., Wan, Y. 2012. Alkaloids Isolated from Natural Herbs as the Anticancer Agents. *Evid–Based Compl Alt.* **12**: 12 pages.
- Maya, J., Rodríguez, A., Pino, L., Pabón, A., Ferreira, J., Pavanni, M., Repetto, Y. y colaboradores. 2004. Effects of buthionine sulfoximine nifurtimox and Benznidazole upon trypanothione and metallothionein proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Biol Res.* **37**: 61–69.
- Mayora, A., Rojas, H., Chirino P., Sojo F., Kouznetsov V., De Sanctis J., Arvelo, F., Benaim, G. 2014. Apoptosis por Tetrahydroquinolinas sustituidas en la línea de cáncer de próstata independiente de andrógenos pc–3. *Observador del conocimiento* **2(4)**.
- Merchán, D. 2007. Eugenol, Precursor natural en la síntesis tetrahydroquinolina 2,4–diaril sustituidas. Tesis de Licenciatura. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.
- Mobley, D., Dill, K. 2009. Binding of Small–Molecule Ligands to Proteins: “What You See” Is Not Always “What You Get”. *Structure.* **17**: 489–498.
- Monga, V., Nayyar, A., Vaitilingam, B., Palde, B., Jhamb, S., Kaur, S., Singh, P., Jain, R. 2005. Ring–substituted quinolines. Part 2: Synthesis and antimycobacterial activities of ring–substituted quinolinecarbohydrazide and ring–substituted quinolinecarboxamide analogues. *Bioorg Med Chem.* **12(24)**:6465–6472.
- Moreno, M., D’ávila, D., Silva, M., Galvão L., Macedo, A., Chiari, E., Gontijo, E. y colaboradores. 2010. *Trypanosoma cruzi* benznidazole susceptibility *in vitro* does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **105(7)**: 918–924.
- Moreno, S., Docampo, R., Mason, R., Leon, W., Stoppani, A. 1982. Different Behaviors of Benznidazole as Free Radical Generator with Mammalian and *Trypanosoma cruzi* Microsomal Preparations. *Arch. Biochem. Biophys.* **218(2)**: 585–591.
- Morocoima, A., Tineo, E., Ferrer, E., Herrera, L., Nuñez, M. 2008. Enfermedad de Chagas en el estado Anzoátegui, Venezuela: Registro de un caso agudo y caracterización parasitológica y molecular del aislado. *Bol Malar Salud Amb.* **48**: 147–152.
- Morris, G., Goodsell, D., Halliday, R., Huey, R., Hart, W., Belew, R., Olson, A. 1998. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *J. Comput. Chem.* **19(14)**: 1639–1662.

- Morris, G., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M., Belew, R., Goodsell, D. Y Olson, A. 2009. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Computational Chemistry* 2009, **16**: 2785–91.
- Muñoz, A., Sojo, F., Merchán, D., Kouznetsov, V., Arvelo, F. 2011. 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.-biol. Interact.* **189**: 215–221.
- Noya-Alarcón, O., Botto, C., Ferrer, E., Alarcón De Noya, B. y Herrera, L. 2011. Primeros hallazgos de la presencia de *Trypanosoma cruzi* en población humana de la amazonia venezolana. *Biomédica*; **31(sup.3)**: 209–421.
- OMS. 2017. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) [En línea] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/> [Consulta: 20/10/17].
- Oversteegen, L., Shah, M., Rovini, H. 2007. HIV combination products. *Nat Rev Drug Discov.* **6**: 951–952.
- Pagadala, N., Syed, K., Tuszynski, J. 2017. Software for molecular docking: a review. *Biophys. Rev.* **9**: 91–102.
- Patterson, S., Wyllie, S. 2014. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends Parasitol.* **30(6)**: 289–298.
- Pelizzaro-Rocha, K., Shioji, T., Izumi, E., Ueda-Nakamura, T., Prado, B., Vataru, C. 2010. Synergistic effects of parthenolide and Benznidazole on *Trypanosoma cruzi*. *Phytomedicine.* **18**: 36–39.
- Pérez-Gordones, M. 2011. Una Contribución al estudio de la Ca²⁺-ATPasa de Membrana Plasmática de Humanos y Proteínas Reguladoras de Calcio de *Trypanosoma evansi*. Tesis doctoral. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Pinto-Dias, J. 2000. Epidemiologia. En: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Brener, Z., Andrade, Z., Barral-Netto, M. (eds). Guanabara Koogan, Río de Janeiro. p. 48–74.
- Planer, J., Hulverson, M., Arif, J., Ranade, R., Don, R., Buckner, F. 2014. Synergy Testing of FDA-Approved Drugs Identifies Potent Drug Combinations against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Neglect Trop D.* **8(7)**:e2977.
- Polak, A. y Richle, R. 1978. Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative Benznidazole. *Ann Trop Med Parasit.* **72(1)**: 45–54.
- Rajão, M., Furtado, C., Alves, C., Passos-Silva, D., De Moura, M., Schamber-Reis, B., Kunrath-Lima, M. y colaboradores. 2013. Unveiling Benznidazole's Mechanism of Action Through Overexpression of DNA Repair Proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Environ Mol Mutagen.* **55(4)**: 309–321.
- Ramesh, C., Nayak, T., Burai, R., Dennis, M., Hathaway, H., Sklar, L., Prossnitz, E., Arterburn, J. 2010. Synthesis and characterization of iodinated tetrahydroquinolines targeting the G protein-coupled estrogen receptor GPR30. *J. Med. Chem.* **53(3)**: 1004.

Romero, A., Merchán, D., Kouznetsov, V. 2007. Reacción de IMINO DIELS–ADLER de tres componentes con precursores de origen natural. Generación de nuevas tetrahidroquinolinas 2,4–DIARIL disustituidas. *Scientia Et Technica*. **13(33)**:91–95.

Romero, R. 2007. Microbiología y parasitología humana. Tercera Edición. Ed. Médica Panamericana. México, D.F, México.

Sander, T., Freyss, J., von Korff, M., Rufener, C. 2015. DataWarrior: An Open–Source Program For Chemistry Aware Data Visualization And Analysis. *J. Chem. Inf. Model*. **55(2)**: 460–473.

Savioli, L., Daumeri, D. 2010. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. World Health Organization.

Shim, J., y Liu, J. 2014. Recent Advances in Drug Repositioning for the Discovery of New Anticancer Drugs. *Int. J. Biol. Sci*. **10(7)**:654–663.

Sonnhammer, E., von Heijne, G., Krogh, A. 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. Págs: 175–182 en: J. Glasgow, T. Littlejohn, F. Major, R. Lathrop, D. Sankoff, and C. Sensen (eds.), Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. AAAI Press, Menlo Park, California, E.U.A.

Sousa, S., Ribeiro, A., Coimbra, J., Neves, R., Martins, S., Moorthy, N., Fernandes, P., Ramos, M. 2013. Protein–Ligand Docking in the New Millennium – A Retrospective of 10 Years in the Field *Curr. Med. Chem*. **20(18)**: 2296–2314.

Stauffer, S., Stanto, M., Grego, A., Steinbeiser, M., Shaffer, J., Nantermet, P., Barrow, J., y colaboradores. 2007. Discovery and SAR of isonicotinamide BACE-1 inhibitors that bind β -secretase in a N-terminal 10s-loop down conformation. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. **17(6)**: 1788–1792.

Strehler, E.; Filoteo, A.; Penniston, J., Caride, A. 2007. Plasma-membrane Ca^{2+} pumps: structural diversity as the basis for functional versatility. *Biochem Soc. Trans*. **35 (Pt5)**: 919–922.

Sun, W., Sanderson, P., Zheng, W. 2016. Drug combination therapy increases successful drug repositioning. *Drug Discov Today*. **21(7)**: 1189–1195.

Tallarida, R. 2001. Drug Synergism: Its Detection and Applications. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. **298**: 865–872.

Tejera, E. 1919. La Trypanosomose americaine ou maladie de Chagas au Venezuela. *Bull. Soc. Pathol. Exot*. **12**: 509– 513.

Toso, A., Vial, F., Galanti, N. 2011. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Rev Med Chile* 2011. **139**:258–266.

Turrens, J.F., Watts Jr., B.P., Zhong, L., Docampo, R., 1996. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei* NADH fumarate reductase by Benznidazole and anthelmintic imidazole derivatives. *Mol Biochem Parasitol*. **82**:125–129.

- Urbina, J. 2010. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop.* **115**:55–68.
- Urbina, J., 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.
- Utzinger, J., Keiser, J., Shuhua, X., Tanner, M., Singer, B. 2003. Combination Chemotherapy of Schistosomiasis in Laboratory Studies and Clinical Trials. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **47(5)**: 1487–1495.
- Velásquez, M., Drosos, J., Gueto, C., Márquez, J., Vivas-Reyes, R. 2013. Método acoplado Autodock-PM6 para seleccionar la mejor pose en estudios de acoplamiento molecular. *Rev Colom Quim.* **42(1)**: 1–8.
- Velázquez-López, J., Hernández-Campos, A., Yépez-Mulia, L., Téllez-Valencia, A, Flores-Carrillo, P., Nieto-Meneses, R., Castillo, R. 2016. Synthesis and trypanocidal activity of novel benzimidazole derivates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **26(17)**: 4377–4381.
- Villarroel, A. 2017. Efecto de Tetrahydroquinolinas Sustituidas sobre la regulación de calcio intracelular de *Trypanosoma Cruzi*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Vinaud, M., y De Souza, R. 2017. Mode of action of the main anti-parasitic drugs. *Rev Patol Trop.* **46(2)**: 121–133.
- Viotti, R., Vigliano, C., Alvarez, M., Petti, M., Bertocchi, G., Armenti, A. 2009. Side effects of Benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **7(2)**:157–163.
- Von Itzstein, M., Wu, W., Kok, G., Peg, M., Dyason, J., Jin, B., Van Phan, T., y colaboradores. 1993. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature.* **363(6428)**: 418–423.
- Wang, K., Wright, L., Machan, C., Allen, B, Conigrave, A, y Roufogalis, B. 1991. Protein kinase C phosphorylates the carboxyl terminus of the plasma membrane Ca²⁺-ATPase from human erythrocytes. *J Biol Chem.* **266(14)**:9078–9085.
- WHO. 2015. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases 2015. World Health Organization.
- Yeh, P., Hegreness, M., Aiden, A., Kishony, R. 2009. Drug interactions and the evolution of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **7(6)**: 460–466.
- Yin, N., Ma, W., Pei, J., Ouyang, Q., Tang, C., Lai, L. 2014. Synergistic and Antagonistic Drug Combinations Depend on Network Topology. *PLOS ONE.* **9(4)**: e93960.
- Zvaritch, E.; James, P.; Vorherr, T.; Falchetto, R.; Modyanov, N., y Carafoli, E. 1990. Mapping of functional domains in the plasma membrane Ca²⁺ pump using trypsin proteolysis. *Biochemistry.* **29(35)**: 8070–8076.

