



UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Efecto de la
5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona
($C_{20}H_{20}O_8$), flavonoide aislado de *Croton*
caracasana sobre la viabilidad y la
homeóstasis del Ca^{2+} intracelular en
Leishmania mexicana

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
por la Bachiller Yeimy Yeniree
Nieves Acosta como requisito
parcial para optar al título de
Licenciado en Biología.

Tutor: Dr. Gustavo Benaim

CARACAS, VENEZUELA
NOVIEMBRE - 2014

A DIOS Padre todopoderoso.

A mis padres Zoraida Acosta y Encarnación Nieves.

A mis hermanas Glendys Nieves y Gleimys Nieves.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS...

Mi guía. Quien me ha dado la fuerza para superar cada adversidad. Infinitamente bendecida porque me mandaste al mundo con los mejores ángeles guardianes, mis padres.

Todo lo que soy y todo lo que tengo es tuyo Señor, gracias por permitirme vivir esta gran experiencia. Gracias por la vida, gracias por mis padres, gracias por mis hermanas, gracias por mi familia, gracias por permitirme conocer a personas tan maravillosas.

A mi familia...

A mis padres, Zoraida Acosta y Encarnación Nieves. Mami, Papi, gracias por su apoyo incondicional. Porque creyeron en mí y han estado en cada caída para levantarme. Porque su confianza en mí ha sido fundamental para que hoy yo pueda ver alcanzada mi meta. Por cada sacrificio. Este triunfo es de ustedes y para ustedes. Me siento totalmente bendecida por tenerlos como padres. Los amo infinitamente.

A mis hermanas: Glendys Nieves, Gleimys Nieves, Irene Nieves y Dilia Delgado. Ustedes han sido mis mejores amigas. Más que hermanas, las siento como otras madres. Son un ejemplo de lucha y de constancia. Por siempre estar conmigo. Por preocuparse por mí. Por amarme de forma incondicional. Este triunfo es para ustedes. Las amo con todo mi ser.

A mis sobrinos: Irelys, Iderson e Ireanyelis. Mis pequeños saltamontes. Los sueños nunca se abandonan. Luchen por lo que quieren y sean constantes. Para ustedes este logro. Los amo.

A mi tía Julia Mangarre. Usted es otra madre para mí. Gracias por estar todos estos años.

A mis primas, tías y hermanas mayores: Daisy Marín y Yadetsy Mangarre. Gracias por estar. Las amo infinitamente.

A mis primos: Yargelys (Cusita), Edris (Bebe), Erick, Argenys (Argenito), Franklyn (Frank) y a la princesita Adriana. Más que primos los considero mis hermanos. Por cada momento vivido. Por cada gesto de cariño. Por cada risa. Por cada segundo que hemos compartido. Este triunfo es para ustedes primines. Gracias por estar. Los amo con todo mí ser.

A mis amigos...

¿Y quién dijo que la vida universitaria es fácil?. Pero sin lugar a duda, ustedes la hicieron maravillosa.

A Rudy Cabrita (Buu, Cabrita), por ser mi mejor amiga de la UCV. Por soportarme todos estos años, algo que no es nada sencillo. Por los buenos y malos momentos que vivimos juntas. Más que mi amiga, te considero mi hermana. Te quiero muchísimo. Gracias por tantos momentos. El éxito es nuestro bella amiga.

A Katherine (Katy) y Solanyer (Sol), mis hermanitas menores.

A Karen (Crechin), Oriana (Ori.c) e Hiran (Hiran del Valle).

A mi comando aventurero: Oriana (Oriii), Yamilex (Yamii), Jesús (Chuo er mikiti), Andreina (Andrea), Manuel (Tito), Douglimar (Dugliii), Soliangel (Sool) y David.

A mis amigos de bachillerato: Eugenys, Keilys, Fabiola, Renier y Salvador, por tantos años de sincera amistad.

Realmente no tengo palabras que describan lo que ustedes significan para mí. DIOS me bendijo al conocerlos. Gracias por tan inolvidables momentos.

¡Porque los amigos son la familia que uno elige! Para ustedes este triunfo. Los quiero de todo corazón.

A mi tutor Gustavo Benaim, por ser mi guía y darme la oportunidad de formar parte del Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásito.

A Venessa Hernández (Vanesilla) por ser mi guía, mi amiga, mi hermana mayor y mi madre, Por siempre estar pendiente de mí. Por ayudarme en cada cosa que necesité. Por tenerme paciencia. Esta TEG fue posible gracias a tu apoyo incondicional. Te quiero mucho Vanesilla.

A Andrea Pinto (Andre), por ser mi amiga, por el cariño mostrado. Muchas gracias.

A Sheira Mujica (Sheirin), Lourdes Plaza (Lulu), Nereida Parra (Nere), por estar siempre dispuestas a ayudarme cuando inicié en el laboratorio.

A todos..., muchas gracias.

“Queda prohibido llorar sin aprender...,

Queda prohibido no sonreír a los problemas,

no luchar por lo que quieres,

no convertir en realidad tus sueños...”

Pablo Neruda.

RESUMEN

La leishmaniasis es una zoonosis de amplia distribución mundial que representa un problema creciente de salud pública. Es una de las enfermedades más desatendidas en todo el mundo y afecta predominantemente a los países más pobres. Los regímenes de tratamientos actuales se basan en la quimioterapia. Las drogas más utilizadas en Latinoamérica para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea son el antimonio de metilglucamina (Glucantime®), el estibogluconato de sodio (Pentostan®) y la miltefosina. Sin embargo, todas estas drogas causan severos efectos tóxicos a nivel cardíaco, renal y hepático, así como quimioresistencia. En este sentido, el desarrollo de nuevos medicamentos para el tratamiento de la leishmaniasis constituye una prioridad en el mundo.

Actualmente, se han realizado estudios con drogas de origen natural procurando una posible acción parasiticida y que presenten baja toxicidad en humanos. Por tal motivo, en búsqueda de nuevas drogas para el posible tratamiento de la leishmaniasis, en esta trabajo se realizó el estudio del efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre la *Leishmania mexicana*. La PMF es un compuesto tipo flavonoide, aislado de las hojas de *Croton caracasana*, una planta de la cual se han aislado una serie de *seco-entkauranos* con comprobada actividad citotóxica en diferentes líneas de cáncer, además de antibacteriana.

Se estudió el efecto de la PMF sobre la homeostasis intracelular del Ca^{2+} en *Leishmania mexicana*, evaluando su acción sobre el gradiente electroquímico de la

membrana mitocondrial y sobre los acidocalcisomas de estos parásitos, con el fin de determinar si este compuesto promueve la movilización de Ca^{2+} desde estos depósitos intracelulares hacia el citoplasma. Se evaluó la citotoxicidad de la PMF en macrófagos J774-G8 (provenientes de linfoma de ratón) y fibroblastos humanos, además su efecto sobre macrófagos J774-G8 infectados con amastigotes de *L. mexicana* (etapa parasitaria clínicamente relevante).

Los resultados obtenidos demuestran que la PMF es capaz de afectar la viabilidad tanto de promastigotes como de amastigotes de *L. mexicana*, observándose un efecto dosis-dependiente en ambos casos. Esta droga originó un incremento en la concentración intracelular del Ca^{2+} , producto de la desestabilización del potencial electroquímico mitocondrial y de la alcalinización de los acidocalcisomas, lo cual podría conducir a la muerte del parásito. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio demuestran que la PMF pudiera ser la base de un nuevo tratamiento contra la leishmaniasis.

INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN

1. INTRODUCCION.....	1
1.1 La Leishmaniasis.....	1
1.2 Características generales del parásito.....	2
1.2.1 Filogenia del género <i>Leishmania</i>	2
1.2.2 Morfología y Ciclo de vida.....	3
1.3 Manifestaciones Clínicas de la Leishmaniasis.....	5
1.4 Leishmaniasis en Venezuela.....	8
1.5 El ion Ca^{2+} en células eucariotas.....	10
1.5.1 Organelos intracelulares que almacenan Ca^{2+}	12
1.6 Quimioterapia contra la leishmaniasis.....	15
1.6.1 Antimoniales Pentavalentes.....	15
1.6.2 Otros Tratamientos.....	16
1.6.3 La Miltefosina.....	17
1.6.4 Otras alternativas.....	19

1.6.4.1 La Amiodarona.....	19
1.6.4.2 La Dronedarona.....	21
1.7 Flavonoides: compuestos naturales contra la leishmaniasis.....	23
1.7.1 Flavonoides.....	23
1.7.2 Estructura de los flavonoides.....	24
1.7.3 Clasificación de los flavonoides.....	25
1.7.4 Efectos farmacológicos de los flavonoides.....	26
1.7.5 Actividad de flavonoides contra tripanosomatidios.....	27
1.7.6 Flavonoide 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF).30	
2. OBJETIVOS.....	32
2.1 Objetivo General.....	32
2.2 Objetivos Específicos.....	32
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
3.1 Materiales.....	33
3.1.1 Reactivos.....	33
3.2 Experimentos in vitro.....	33
3.2.1 Mantenimiento y cultivo de parásitos.....	33
3.2.2 Mantenimiento y cultivo de macrófagos J774-G8 y fibroblastos humanos.....	34
3.2.3 Experimentos mediante métodos fluorimétricos.....	34

3.2.3.1	Estudio del efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) en la homeóstasis de Ca ²⁺ intracelular en <i>L. mexicana</i>	34
3.2.3.2	Estudio del efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre el potencial electroquímico mitocondrial de <i>L. mexicana</i>	38
3.2.3.3	Estudio del efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre los acidocalcisomas de <i>L. mexicana</i>	39
3.2.3.4	Estudio del efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre poblaciones de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	39
3.2.3.5	Estudio del efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre macrófagos J774-G8 (proveniente de linfoma de ratón) infectados con amastigotes de <i>L. mexicana</i>	40
3.2.3.6	Estudio de citotoxicidad de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre la proliferación celular de promastigotes de <i>L. mexicana</i> , macrófagos J774-G8 y células de mamífero (fibroblastos humanos).....	42

4. RESULTADOS.....	45
4.1 Efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre poblaciones de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	45
4.2 Efecto citotóxico de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre la proliferación celular de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	47
4.3 Efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) en la homeóstasis de Ca ²⁺ intracelular de <i>L. mexicana</i>	49
4.4 Efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre el potencial electroquímico mitocondrial de <i>L. mexicana</i>	51
4.5 Efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre los acidocalcisomas de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	53
4.6 Efecto citotóxico de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre la proliferación celular de macrófagos J774-G8 y células de mamífero (fibroblastos humanos).....	56
4.7 Efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre macrófagos J774-G8 (proveniente de linfoma de ratón) infectados con amastigotes de <i>L. mexicana</i>	59
5. Discusión.....	62
6. Conclusiones.....	71
7. Bibliografía.....	72

INDICE DE ABREVIATURAS

- $[Ca^{2+}]_i$: Concentración de calcio intracelular.
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium.
- DMSO: Dimetil sulfóxido
- FCCP: Carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona.
- LIT: Liver Infusion Tryptose (medio de cultivo).
- MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difenil tetrazolio.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- PBS: Buffer fosfato salino.
- PMF: 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona.
- PMCA: Ca^{2+} - ATPasa de la membrana plasmática.
- PPI: pirofosfato inorgánico.
- SERCA: Ca^{2+} - ATPasa del retículo (sarco)endoplasmático.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flebótomo de la especie <i>Phlebotomus papatasi</i> en el momento de succionar sangre humana.....	2
Figura 2. <i>Lutzomyia sp.</i>	2
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	4
Figura 4. Leishmaniasis Visceral.....	5
Figura 5. Úlcera típica de Leishmaniasis cutánea.....	6
Figura 6. Leishmaniasis mucocutánea infantil.....	7
Figura 7. Leishmaniasis difusa.....	8
Figura 8. Tasa de incidencia de leishmaniasis promedio en Venezuela en el año 2005.....	9
Figura 9. Mecanismos reguladores de Ca^{2+} en Tripanosomatidios.....	15
Figura 10. Estructura química de la miltefosina.....	18
Figura 11. Estructura molecular de la miodarona y la dronedarona.....	23
Figura 12. Flavonoides. Estructura básica de un flavonoide.....	24
Figura 13. Flavonoides. Estructura básica y tipos.....	26
Figura 14. Estructura química de licolchaona A.....	28
Figura 15. Estructura química del Compuesto 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF).....	31

Figura 16. Espectro de excitación y emisión del Fura 2.....	35
Figura 17. Representación esquemática de la incorporación del Fura 2 a la célula...	36
Figura 18. Representación esquemática del sistema de detección de Ca^{2+} mediante dos longitudes de onda de excitación.....	37
Figura 19. Reducción de MTT.....	43
Figura 20. Efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre poblaciones de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	46
Figura 21. Efecto citotóxico de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre una población de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	48
Figura 22. Efecto de la PMF sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en <i>L. mexicana</i>	50
Figura 23. Efecto de la PMF sobre el potencial electroquímico mitocondrial en promastigotes de <i>L. mexicana</i>	52
Figura 24. Efecto de diferentes concentraciones de 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre los acidocalcisomas de <i>L. mexicana</i>	54
Figura 25. Efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona. (PMF) sobre los acidocalcisomas en promastigotes de <i>L. mexicana</i>	55
Figura 26. Efecto citotóxico de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre una población de macrófagos murinos (J774-G8).	57
Figura 27. Efecto citotóxico de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre una población fibroblastos humanos	58

Figura 28. Efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre amastigotes intracelulares de *L. mexicana*..... 60

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ca ²⁺ ATPasas reportadas en parásitos protozoarios.....	14
---	----

1. INTRODUCCION

1.1 La Leishmaniasis

La leishmaniasis es una infección fundamentalmente tropical la cual se encuentra entre las enfermedades más desatendidas en todo el mundo. Se considera que hay 350 millones de personas en riesgo de contraerla, y cada año se producen 2 millones de casos nuevos (OMS, 2010). Esta enfermedad es causada por cerca de 21 especies de protozoarios pertenecientes al género *Leishmania*, transmitidos por vectores del género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en América (Desjeux, 1992).

La *Leishmania* es un protozooario flagelado intracelular obligatorio que infecta macrófagos y células dendríticas de la piel, vísceras de humanos y de diversos mamíferos. Se divide en los subgéneros *Leishmania* (*L*) y *Viannia* (*V*). El género *Leishmania* se ha caracterizado por desarrollarse en los macrófagos de una serie de hospedadores vertebrados, generando la enfermedad. (Becerril, 2008).

El insecto vector pertenece a la Clase *Insecta* y al Orden *Diptera* y son conocidos como jenes o moscas de arena. Los insectos del género *Phlebotomus* son los responsables primarios de la transmisión de la leishmaniasis en el Viejo Mundo, mientras que los del género *Lutzomyia* se encuentran en el Nuevo Mundo (Cárdenas y col., 2006).



Figura 1. Flebótomo de la especie *Phlebotomus papatasi* eVector causante de la leishmaniasis en el viejo mundo. Consultado el 27 de febrero del 2014. Disponible en: <http://www.faba.org.ar/fabainforma/449/ABCL.htm>

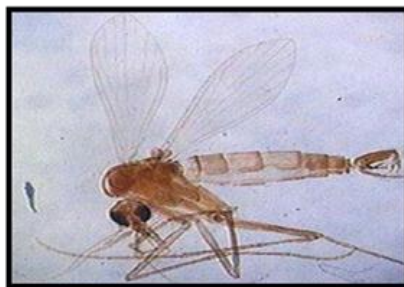


Figura 2. *Lutzomyia sp.* Vector causante de la leishmaniasis en América. Consultado el 27 de febrero del 2014. Disponible en: <http://revistas.concytec.gob.pe/img/revistas/dp/v14n2/a06fig07g.jpg>

1.2 Características generales del parásito.

1.2.1 Filogenia del género *Leishmania*.

- Reino: *Protista*
- Subreino: *Protozoa*
- Phylum: *Sarcomastigophora*
- Subphylum: *Mastigophora*

- Clase: *Zoomastigophora*
- Orden: *Kinetoplastida*
- Suborden: *Trypanosomatina*
- Familia: *Trypanosomatidae*
- Género: *Leishmania*

1.2.2 Morfología y Ciclo de vida.

La *Leishmania* posee características morfológicas y moleculares diferentes, según sea el huésped (Becerril, 2008). Estos parásitos tienen dos fases básicas en su ciclo de vida: una etapa extracelular, denominada promastigote, en el invertebrado anfitrión (flebótomo), y una etapa intracelular dentro de un huésped vertebrado denominada amastigote (Dawit y col., 2013).

El amastigote es inmóvil, tiene forma redondeada, no tiene flagelo y mide aproximadamente de 2,5 a 3,5 micras. El promastigote es alargado y mide entre 18 y 20 micras, presenta un flagelo, tiene núcleo central y citoplasma granulado. La superficie celular está cubierta de lipofosfoglicanos. Presentan un kinetoplasto cercano al bolsillo flagelar. Se alojan en el tubo digestivo del insecto vector y es el estadio que puede mantenerse en los cultivos *in vitro* (Romero, 2007).

El ciclo de vida comienza cuando un flebótomo hembra ingiere sangre parasitada a través de la picada. Una vez ingeridos, los amastigotes migran al

intestino medio del flebótomo, donde se transforman en promastigotes y se dividen por fisión binaria, se mueven (después de cuatro o cinco días) hacia el esófago y glándulas salivares. El flebótomo infectado, regurgita los promastigotes en el torrente sanguíneo de los vertebrados (huésped) durante la segunda ingesta de sangre. Una vez dentro del torrente sanguíneo del huésped vertebrado, los promastigotes son fagocitados por las células hospederas y mediante diferentes procesos pasan a ser amastigotes (Singh y col., 2013).

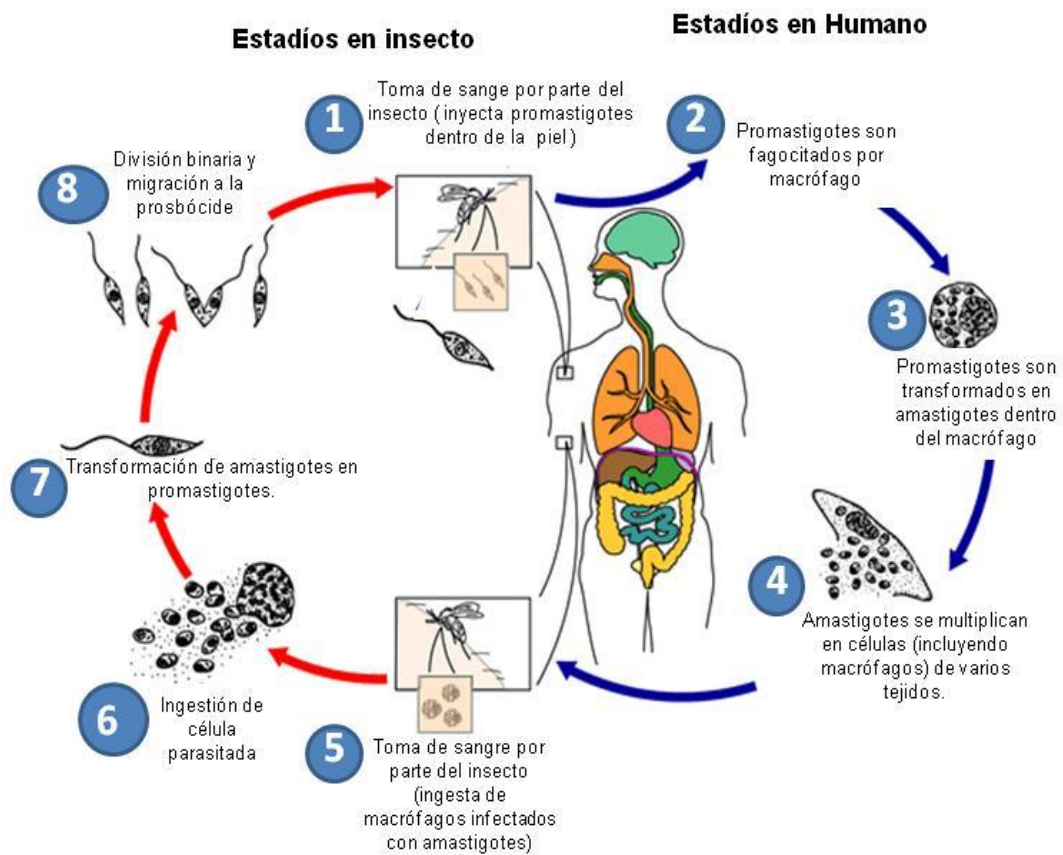


Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania*. Consultado el 12 de enero del 2014. Disponible en: <http://dpd.cdc.gov/dpdx>.

1.3 Manifestaciones Clínicas de la Leishmaniasis.

En el hombre, esta enfermedad toma cuatro principales formas clínicas: visceral, cutánea, mucocutánea y difusa (Desjeux, 1992).

La leishmaniasis visceral, conocida como kala-azar, es una forma severa de la leishmaniasis, generalmente letal cuando se deja sin tratar. Las especies de *Leishmania* más importantes que causan leishmaniasis visceral son *L. donovani* en Asia y África, y *L. infantum* o *L. chagasi* en el occidente de Europa, el suroeste y centro de Asia y en América del Sur. *L. tropica* y *L. amazonensis* puede también inducir la leishmaniasis visceral (Freyend, 2010).



Figura 4. Leishmaniasis Visceral. Consultado el 27 de febrero del 2014. Disponible en: <http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites/images/WHO1.jpg>

La leishmaniasis cutánea es la forma más leve, generalmente un resultado de la infección con parásitos de las especies del subgénero *Viannia*, *L. major*, *L. aethiopica*, además de *L. tropica* y *L. mexicana*, pero puede ser causada por todas las especies de *Leishmania* que infectan a los seres humanos (Freyend, 2010). La leishmaniasis cutánea ocurre en el Nuevo y Viejo Mundo. Esta enfermedad del Viejo Mundo es causada principalmente por *L. tropica*, en las zonas urbanas y *L. major*, en zonas desérticas. Los dos subgéneros de interés en América Latina son *Leishmania leishmania* (Por ejemplo, *L. mexicana*, *L. azonensis*, *L. chagasi*) y *Leishmania viannia* (por ejemplo, *L. panamensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*) (Markle y Makhoul, 2004).



Figura 5. Úlcera típica de Leishmaniasis cutánea (González y Zerpa, 2004).

La leishmaniasis mucocutánea es la forma más severa de la leishmaniasis cutánea. Las especies frecuentemente asociadas a esta enfermedad son: *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, y *L. amazonensis*. Las infecciones inflamatorias asociadas con la leishmaniasis mucocutánea pueden ser potencialmente

mortales (Freyend, 2010). Las lesiones en las mucosas pueden aparecer simultáneamente con un cuadro de leishmaniasis cutánea. Sin embargo, lo más frecuente es que aparezcan después, e inclusive, pueden transcurrir años desde que la lesión cutánea ha cicatrizado (Ríos y Sousa, 2010).



Figura 6. Leishmaniasis mucocutánea infantil (González y Zerpa, 2004).

La leishmaniasis cutánea difusa se puede desarrollar en pacientes que sufren de leishmaniasis cutánea, que tienen una respuesta inmune alterada y están infectados por algún miembro del complejo *L. mexicana* y *L. aethiopica*. Este tipo de leishmaniasis se debe a la diseminación hematogena del parásito. La ulceración es rara y en etapas tardías, después de un período sin cambios importantes, las lesiones tienden a diseminarse comprometiendo grandes extensiones de superficie corporal. El compromiso mucoso es transitorio sin severos grados de inflamación (Rodríguez y col., 1985).



Figura 7. Leishmaniasis difusa. Lesión situada en la región lumbosaera. Consultado el 27 de febrero del 2014. Disponible en: http://revistas.concytec.gob.pe/scielo.php?pid=S102917332011000100006&script=sci_arttext

1.4 Leishmaniasis en Venezuela.

Bonfante y Barroeta informaron que en Venezuela, durante el año 2002, la leishmaniasis se encontraba ampliamente distribuida a lo largo del territorio nacional. Entre 1955 y 2002, el Ministerio de Salud registró cerca de 50.000 casos de leishmaniasis cutánea y más de dos mil casos de leishmaniasis visceral. La enfermedad era predominante en alturas entre 0 y 1.800 metros sobre el nivel del mar, y las personas de sexo masculino las más afectadas, entre ellos gran cantidad de niños menores de 12 años. Los vectores más frecuentes observados para esta fecha fueron *Lutzomyia (Lu.) ovallesi*, *Lu. gomezi* y *Lu. panamensis*. Tanto *Leishmania (L.) chagasi* como *L. infantum* fueron identificados como agentes causales de leishmaniasis visceral, que utilizaron como vectores *Lu. longipalpis* y *Lu. evansi* y como reservorio, perros. Por otra parte, los agentes causales de leishmaniasis cutánea

en el país fueron *L. mexicana* y *L. braziliensis*, y su principal reservorio, varias especies de ratones salvajes (Serrano, 2010).



Figura 8. Tasa de incidencia de leishmaniasis promedio en Venezuela en el año 2005 (De Lima y col., 2009).

Las estadísticas más actuales de casos de muerte por leishmaniasis en Venezuela son del año 2006. Cifras ofrecidas por el Ministerio del Poder Popular para la Salud, Instituto de Biomedicina y el departamento de Informática, reflejaron una tasa de casos de leishmaniasis de 9,97 por 100.000 habitantes. Durante ese año, la enfermedad se encontraba distribuida a lo largo de todo el territorio nacional, con más frecuencia en regiones montañosas: Los Andes y la Serranía de la Costa. Este mismo informe especifica que la tendencia de manifestaciones clínicas de leishmaniasis en

Venezuela era la siguiente: 98% de los casos leishmaniasis cutánea localizada (LCL), 1% leishmaniasis mucocutánea, 0.8% leishmaniasis intermedia y 0.2% leishmaniasis difusa. Resaltante fue el hecho de que el 80% de todos los casos reportados durante ese año fue generado por una sola especie de este parásito: *L. braziliensis* (De Lima y col., 2009).

1.5 El Ca^{2+} como mensajero en células eucariotas.

El calcio (Ca^{2+}) como elemento de señalización celular regula diversas funciones, tales como: contracción, secreción, transcripción y fertilización. También regula otras funciones directamente relacionadas con el cáncer, como la proliferación celular, diferenciación celular y la apoptosis. El calcio es probablemente el más importante entre todos los mensajeros intracelulares, en los mecanismos de traducción de señales en las células eucarióticas. Su función como mensajero está garantizada por la capacidad de la célula de mantener, en virtud de sus diferentes mecanismos homeostáticos, una concentración citoplasmática de este catión 4 órdenes de magnitud por debajo de su concentración extracelular (Benaim, 2004).

El Ca^{2+} es un segundo mensajero que puede ser liberado desde compartimentos intracelulares, pudiendo también difundir desde el exterior celular a través de diferentes canales en la membrana plasmática, desencadenando una cascada de señales intracelulares (Benaim, 2004). Las células eucariotas pueden mantener una diferencia extremadamente alta entre la concentración de Ca^{2+} extracelular

(alrededor de 2 mM) y la concentración en el citoplasma (entre 50-100 nM) (Pimentel y Benaim, 2012).

En cuanto a la regulación intracelular de Ca^{2+} en tripanosomatidios, por ejemplo, *Trypanosoma cruzi* posee una fase extracelular en el torrente sanguíneo humano donde la concentración de Ca^{2+} está alrededor de 2 mM. Después de que este parásito invade a las células huésped, la concentración Ca^{2+} se encuentra alrededor de 30 a 100 nM. Estos parásitos son capaces de mantener una concentración citoplasmática de Ca^{2+} entre 20 y 50 nM (Benaim y García, 2011).

Leishmania sp. también tiene dos diferentes etapas; una forma extracelular (promastigotes, en el intestino medio del insecto) y una forma intracelular (amastigotes) en el interior de los macrófagos infectados. Este hecho implica que estos parásitos deben poseer mecanismos muy eficientes para la regulación de este catión durante cada una de estas etapas, así como durante la proceso de diferenciación (Benaim y García, 2011).

El Ca^{2+} es un ión que resulta ser crítico en el proceso de invasión de estos parásitos a la célula huésped, y su concentración citosólica está regulada por la operación concertada de varios transportadores presentes en la membrana plasmática, retículo endoplasmático, mitocondrias y acidocalcisomas (Docampo y col., 1999). El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, la Ca^{2+} -ATPasa en la membrana plasmática (PMCA), la Ca^{2+} -ATPasa del retículo (sarco)endoplasmático (SERCA) y el uniporte electroforético de Ca^{2+} en la mitocondria, transportan el catión al exterior celular o a

los distintos reservorios intracelulares, regulándose así la entrada y salida de Ca^{2+} de la célula (Carafoli, 1987).

La PMCA se encuentra en todas las células eucariotas estudiadas hasta el momento, mientras que el intercambiador es más típico de células excitables. La PMCA ha sido identificada en diferentes tripanosomatidios (Tabla1) mientras que el intercambiador parece no estar presente (Benaim y col., 1993, Benaim y García, 2011).

1.5.1 Organelos intracelulares que almacenan Ca^{2+} .

Los tripanosomatidios poseen una única mitocondria que ocupa el 12% del volumen total del parásito, la cual es capaz de acumular grandes cantidades de Ca^{2+} . La membrana interna de la mitocondria posee sistemas de transporte de Ca^{2+} que permite el movimiento de este ión a través de ésta, estableciendo un ciclo entre el Ca^{2+} citoplasmático y el intramitocondrial (Benaim y col., 1990; Benaim y García 2011).

El ciclo comprende un uniporte electroforético de Ca^{2+} que permite la entrada de Ca^{2+} utilizando la energía del gradiente electroquímico de protones y un sistema de cotransporte $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ capaz de promover la salida electroneutra de iones Ca^{2+} , el cual constituye el mecanismo más importante de salida de este catión (Benaim y col., 1990; Benaim y García 2011). Este uniporte presenta una alta capacidad de transporte pero una muy baja afinidad por este catión (Benaim, 2004).

Recientemente, mediante el uso de la base de datos MitoCarta (*in silico*), fue identificado un regulador uniporte denominado MICU1 el cual está involucrado con la rápida absorción de Ca^{2+} mitocondrial. Esta proteína de 40 KDa contiene dos dominios transmembrana que detectan el nivel de calcio, actuando como un estimulador del uniporte clave de calcio mitocondrial (MCU). Se encuentra localizada en la membrana interna de la mitocondria (De Stefani y col., 2011).

El retículo endoplásmático también participa en la regulación del Ca^{2+} . La concentración de este ión en el retículo endoplasmático puede alcanzar niveles dentro del orden milimolar. El retículo endoplasmático posee dos vías independientes para la entrada y salida de Ca^{2+} . La entrada de Ca^{2+} es catalizada por la Ca^{2+} -ATPasa de retículo (sarco)endoplasmático (SERCA) que activamente ingresa dos iones Ca^{2+} con la hidrólisis de una molécula de ATP, disminuyendo así la concentración de Ca^{2+} citoplasmático. Diversas Ca^{2+} -ATPasas del tipo SERCA han sido descritas en diferentes protozoarios parásitos (tabla 1) (Moreno y Docampo, 2003).

Los tripanosomatideos también poseen acidocalcisomas, organelos acídicos inusuales, involucrados en la bioenergética de estas células. Se ha reportado que en los acidocalcisomas, el Ca^{2+} cumple una función de unir grandes cantidades de pirofosfatos (PPi, moneda energética alternativa al ATP, presente en grandes cantidades en estos parásitos) (Docampo, 2008).

El poli-P se acumula en grandes cantidades en los acidocalcisomas y su almacenamiento, reduce el efecto osmótico que tendría una cantidad equivalente de Pi. De esta manera, los acidocalcisomas están involucrados en el mantenimiento de la

osmolaridad. Los tripanosomatideos son especialmente ricos en polifosfatos de cadenas corta como poli-P3, poli-P4, y poli-P5. En la membrana interna de los acidocalcisomas ha sido descrito una Ca^{2+} -ATPasa similar a la de membrana plasmática y se ha postulado que un intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ está involucrado en la salida de Ca^{2+} . En estos organelos, también se ha demostrado la presencia de una H^+ -ATPasa vacuolar, y la presencia de un intercambiador Na^+/H^+ (Docampo, 2008).

Ruíz y col., 2001, reportaron que la liberación de Ca^{2+} desde los acidocalcisomas se asocia con la hidrólisis de grupos polifosfatos. La rápida movilización de Ca^{2+} y de polifosfato desde estos organelos sugiere que los acidocalcisomas juegan un papel crítico en la adaptación del parásito a los cambios ambientales.

Tabla 1. Ca^{2+} ATPasas reportadas en parásitos protozoarios (Moreno y Docampo, 2003).

Ca ²⁺ ATPases that have been cloned and sequenced in parasitic protozoa.					
Protozoa	Name	Accession number	Type	Expressed	Function confirmed*
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Tca1	U70620	PMCA	Yes	Yes
	TcSCA	AF093566	SERCA	Yes	Yes
<i>Trypanosoma brucei</i>	Tba1	M73769	SERCA	Yes	Yes
	TbA1	AY065988	PMCA	Yes	Yes ⁱ
	TbA2	AY065989	PMCA	Yes	Yes ⁱ
<i>Leishmania mexicana amazonensis</i>	Lmaa1	U70540	SERCA	Yes	Yes
<i>Plasmodium falciparum</i>	PfATPase6	X71765	SERCA	No	No
	PfATP4	AF203980	New subclass?	Yes	Yes
<i>Toxoplasma gondii</i>	TgA1	AF151372	PMCA	Yes	Yes
<i>Cryptosporidium parvum</i>	CpATPase1	U65981	New subclass?	Yes	No
<i>Entamoeba histolytica</i>	Pmca [†]	U20321	PMCA	Yes	Yes
<i>Trichomonas vaginalis</i>	TVCA1	U65066	SERCA	No	No
	TVCA(2-4) [‡]	AF145282	Unknown	No	No
		AF145283			
	AF145279				

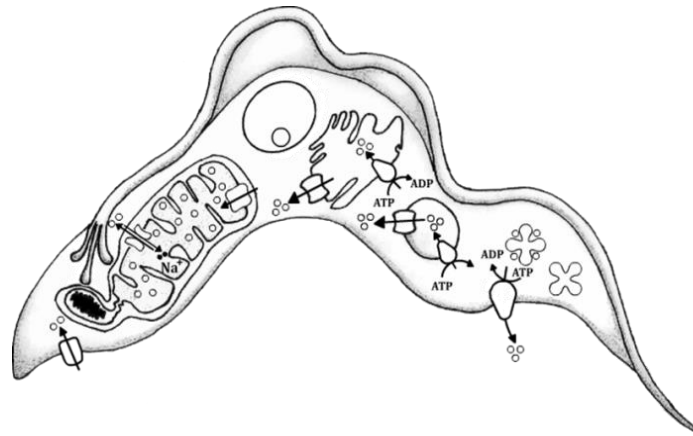


Figura 9. Mecanismos reguladores de Ca^{2+} en Tripanosomatidios. 1. Canal de Ca^{2+} no identificado (membrana plasmática), 2. PMCA (membrana plasmática), 3. Calmodulina, 4. SERCA (Retículo sarcoendoplasmático), 5. Uniporte de Ca^{2+} mitocondrial (mitocondria), 6. PMCA (acidocalcisomas) (Benaim y García, 2011).

1.6 Quimioterapia contra la leishmaniasis.

1.6.1 Antimoniales Pentavalentes.

Históricamente, la lucha contra la leishmaniasis se ha basado en la quimioterapia. En la década de 1940 se inició el empleo de antimoniales pentavalentes para el tratamiento de las diversas formas clínicas de leishmaniasis (Soto y Soto, 2006). Se ha seleccionado una serie de drogas pertenecientes al grupo de los antimoniales pentavalentes como primera línea de tratamiento para los diversos tipos de leishmaniasis. Entre esas drogas tenemos el antimonio de meglumina (glucantime) y el estibogluconato de sodio (pentostan). A pesar de ser los

medicamentos de primera línea para el tratamiento de esta enfermedad, no están claros sus mecanismos de acción sobre el parásito y ha sido demostrado que generan diversos efectos secundarios a nivel renal, cardíaco y hepático, entre los cuales destacan mialgia, pancreatitis, arritmia cardíaca y hepatitis (Serrano, 2010; Pandey y col, 2005).

La pérdida de la eficacia, las dificultades para su administración, el incremento en la frecuencia y la severidad de los efectos secundarios de las sales de antimonio pentavalente han forzado la búsqueda de medicamentos que puedan reemplazar estos compuestos en el tratamiento contra la leishmaniasis (Soto y Soto, 2006).

1.6.2 Otros tratamientos

En el caso de resistencia o de efectos colaterales severos a los antimoniales pentavalentes, se ha recomendado la anfotericina B y la pentamidina. Estas son drogas clínicamente muy tóxicas. Si bien se han desarrollado formulaciones lipídicas de anfotericina B, que son menos nocivas, el alto costo limita su amplio uso en países en vías de desarrollo (Tiuman y col, 2011).

Actualmente existen diferentes formulaciones de Anfotericina B:

Anfotericina B deoxicolato la cual actúa alterando la permeabilidad de la membrana celular, se administra por vía intravenosa. Es un medicamento muy efectivo, con tasas de curación hasta del 98%, pero de uso limitado por los efectos adversos frecuentes (OMS, 2013).

Formulaciones lipídicas de anfotericina B: varias formulaciones, incluyendo la anfotericina B liposomal, complejo lipídico de anfotericina B y anfotericina B de dispersión coloidal, se han utilizado en el tratamiento. Son similares en su eficacia a la anfotericina B deoxicolato pero menos tóxicos. La mayoría de los ensayos clínicos en leishmaniasis se han realizado con la formulación liposomal de anfotericina B (OMS, 2013).

Por otra parte, como tratamiento se tiene la pentamidina, este es un derivado aromático de la diamidina que interactúa con el ADN del kinetoplasto del parásito e inhibe la topoisomerasa II e interfiere en la glicólisis. Se administra por vía intramuscular. El porcentaje de curación varía entre el 84% al 96% (OMS, 2013).

1.6.3 La Miltefosina.

La miltefosina, un alquil-lisofosfolípido, con potente actividad antileishmaniásica, representa un avance importante en el tratamiento de la leishmaniasis (Croft y Engel, 2006). La identificación del potencial antileishmaniásico de la miltefosina y otros derivados de fosfolípidos comenzó a finales de los 80 como resultado de tres líneas independientes de investigación. La primera línea buscaba demostrar la actividad antitumoral de la edelfosina; la segunda se orientó hacia el efecto de estas sustancias sobre el metabolismo de los fosfolípidos en los promastigotes de *Leishmania* y la última en la que se identificó a la miltefosina como agente antileishmaniásico (Croft y col., 1987).

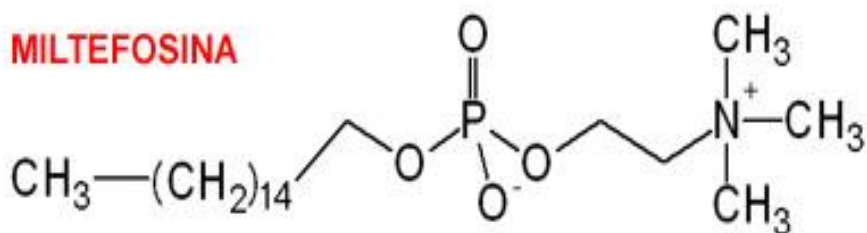


Figura 10. Estructura química de la miltefosina.

Consultado el 3 de diciembre de 2014. Disponible en www.iqb.es/miltefosina.jpg

En una serie de estudios, la miltefosina se suministró por vía oral en ratones BALBc infectados con *L. donovani* y en otro caso, con *L. infantum* lográndose la eliminación de más del 95% de los parásitos con una dosis de 20 mg/kg (Escobar y col., 2001). También se ha mostrado que la miltefosina es capaz de afectar la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en líneas celulares de leucemia mieloide humana (Wang y col., 1998).

Urbina en el 2006, reportó que el mecanismo de acción de la miltefosina en mamíferos y algunos trimanosomatidos está relacionado con la desestabilización de la biosíntesis de algunos derivados de fosfatidilcolina, traduciéndose en un impacto importante sobre la viabilidad de las células tratadas.

Serrano y col., 2009b, reportaron que en *L. mexicana*, la miltefosina afecta la homeóstasis Ca^{2+} intracelular de estos parásitos mediante la inducción del aumento de los niveles de este ión, a través de la activación de un canal Ca^{2+} en la membrana plasmática. Según lo revelado por un ensayo de PCR, con un 90% de cura en un

modelo murino, se demostró que la combinación de amiodarona y la miltefosina tiene efectos sinérgicos sobre la proliferación de los amastigotes intracelulares que crecen dentro de los macrófagos.

1.6.4 Otras alternativas.

Actualmente, en búsqueda de nuevas drogas con posibles efectos tripanocida, se han estudiado una serie de compuestos, los cuales, afecten mediante mecanismos específicos la viabilidad de diferentes tripanosomatidios. En nuestro laboratorio se han realizado pruebas con diferentes drogas, demostrándose su efecto sobre la disrupción de la homeóstasis del Ca^{2+} intracelular en *L. mexicana* y *T. cruzi*, evidenciándose como se afecta directamente la viabilidad de dichos parásitos, tomando en cuenta que la homeóstasis del Ca^{2+} intracelular se le ha considerado un blanco contra estos tripanosomatidios (Benaim y García, 2011).

1.6.4.1 La Amiodarona

La amiodarona (2 – butil – 3 - benzofuranil)[4 - [2 - (dietilamino) ethoxi] - 3,5 –diiodofenil] metanona hidroclicorida) es una droga con propiedades antiarrítmicas clase III, para el tratamiento de algunas cardiomiopatías humanas (Schafer y col., 2010).

Benaim y col., 2006, reportaron que la amiodarona produce la disrupción de la homeostasis de Ca^{2+} intracelular en *T. cruzi* a través de la interacción con organelos intracelulares alterando el potencial electroquímico mitocondrial de estos parásitos.

Adicionalmente se demostró que esta droga produce la alcalinización de los acidocalcisomas en *T. cruzi*.

La amiodarona actúa sinérgicamente con posaconazol, fármaco antifúngico con potente actividad tripanocida. Se ha encontrado también que la amiodarona inhibe la oxidoescualeno ciclasa en *T. cruzi*, enzima clave en la síntesis de ergosterol (Benaim y col., 2006).

Serrano y col., 2009a, mostraron que la amiodarona tiene un gran efecto sobre la viabilidad de promastigotes de *L. mexicana*. Además, su efecto sobre la viabilidad del parásito es mayor en amastigotes intracelulares que en promastigotes, sin afectar a la célula huésped. El uso de técnicas fluorimétricas y de microscopía confocal permitió demostrar que el mecanismo de acción de la amiodarona estaba relacionado con la disrupción de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular a través de una acción directa, no sólo en las mitocondrias, sino también de los acidocalcisomas de estos parásitos.

El análisis de los esteroides libres en promastigotes incubados con amiodarona mostró que este fármaco también afecta la biosíntesis del 5-dehidroepisterol, lo que resulta en la acumulación de escualeno, lo cual sugiere que la amiodarona inhibe la actividad de la escualeno epoxidasa del parásito, inhibiendo la síntesis de ergosterol (Serrano y col., 2009a).

Es importante resaltar que estos parásitos poseen ergosterol, a diferencia de los mamíferos que poseen colesterol en sus membranas, por lo que la inhibición de la síntesis de este esteroide ha sido vinculada directamente con el desarrollo de terapias contra estas parasitosis (Serrano y col., 2009a; Benaim y García, 2011). Tomando en

cuenta estos antecedentes, se ha propuesto que la amiodarona puede ser considerada como una base terapéutica de medicamentos contra la leishmaniasis cutánea causada por *L. mexicana* (Benaim y Paniz, 2012).

1.6.4.2 La Dronedarona.

La dronedarona es un derivado de la amiodarona que ha sido desarrollada para superar la limitación de la presencia de yodo, asociada a efectos adversos de la amiodarona (Kathofer y col., 2006). Está aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) de Estado Unidos de América, y reduce el riesgo de hospitalizaciones con pacientes cardiovasculares y los análisis muestran una disminución en mortalidad cardíaca en comparación con la amiodarona (Page y col., 2009).

Benaim y col., 2012, estudiaron los efectos de la dronedarona en *T. cruzi* con el fin de evaluar si esta droga análoga a la amiodarona tenía propiedades tripanocidas. La dronedarona resulta ser menos tóxica en humanos, debido a la ausencia de grupos yodados, que conllevan a su acumulación indeseada en las tiroides (Benaim y Paniz, 2012). Los resultados indicaron que la dronedarona tiene un efecto dosis-dependiente sobre el crecimiento de epimastigotes y amastigotes intracelulares, ésta última, es la etapa parasitaria clínicamente relevante. El IC₅₀ de la dronedarona en ambas formas parasitarias fueron más bajas que los reportados para la amiodarona. Esta diferencia es mayor para la forma amastigote que para epimastigotes (0.75 µM frente a 2.7 µM).

De manera similar a la amiodarona, la dronedarona indujo un aumento del Ca²⁺ intracelular. Además, se encontró que la incubación de epimastigotes con

amiodarona condujo a una respuesta bifásica de los niveles intracelulares de Ca^{2+} , lo que sugiere que este fármaco induce la liberación del catión divalente a partir de dos compartimentos intracelulares diferentes, la mitocondria y los acidocalcisomas, incluyendo un efecto directo de la droga en el potencial electroquímico mitocondrial, y por medio de la alcalinización de los acidocalcisomas. Estos resultados sugieren a futuro, un posible uso de la dronedarona para el tratamiento de la enfermedad de Chagas (Benaim y col., 2012).

Recientemente se ha demostrado que la dronedarona inhibe eficazmente el crecimiento de promastigotes de *L. mexicana* en cultivos y lo más importante, tiene una excelente actividad contra amastigotes dentro de los macrófagos infectados sin afectar a la célula huésped, con un valor de IC_{50} en amastigotes tres órdenes de magnitud inferiores a los obtenidos previamente con los amastigotes de *T. cruzi* (0.65 nM vs 0.75 μM) (Benaim y col, 2014).

Al igual que con la amiodarona, la dronedarona afecta a la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en el parásito, lo que induce un incremento de Ca^{2+} intracelular. Esto se consigue por el rápido colapso del potencial de membrana mitocondrial y la inducción de la alcalinización de los acidocalcisomas, a mayor velocidad que la observada con la amiodarona. En general, los resultados sugieren la posibilidad de utilizar la dronedarona como un tratamiento para la leishmaniasis cutánea y tal vez otros tipos de leishmaniasis (Benaim y col., 2014).

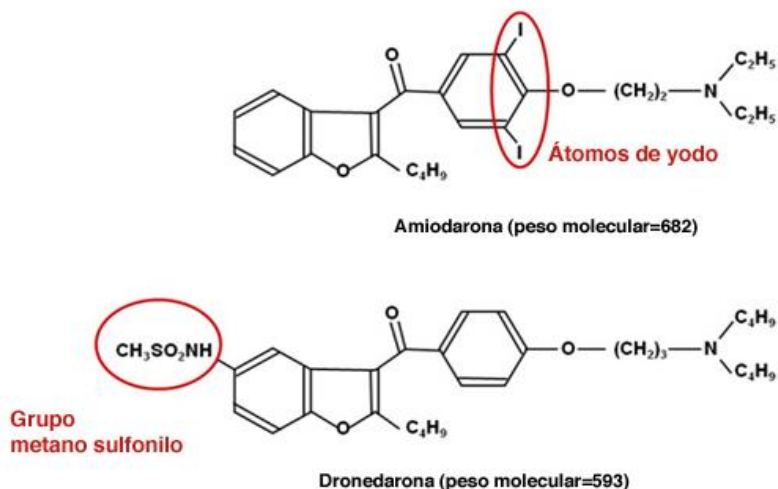


Figura 11. Estructura molecular de la miodarona y la dronedarona. Consultado el 4 de diciembre de 2014. Disponible en: <http://www.Fibrilacionauricularonline.es/default.aspx?idPage=4134>.

1.7 Flavonoides: compuestos naturales contra la leishmaniasis.

1.7.1 Flavonoides.

Los flavonoides son pigmentos vegetales que se sintetizan a partir de fenilalanina (Havsteen, 2002). Se encuentran localizados en la membrana del tilacoide de los cloroplastos (Cartaya y Reynaldo, 2001). El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en

un elevado número de patologías (Martínez y col, 2002). Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas y verduras (Aherne y O'Brien, 2002).

1.7.2 Estructura de los flavonoides.

Los flavonoides representan uno de los grupos más grandes y la clase más diversa de metabolitos secundarios de bajo peso molecular en plantas. Comprenden un amplio grupo de compuestos polifenólicos que poseen un núcleo básico de flavano con dos anillos aromáticos (A y B) interconectados por un anillo heterocíclico de tres átomos de carbono (anillo C). La mayoría de los flavonoides contienen un doble enlace entre el C-2 y C-3 y un grupo ceto en C-4 del anillo C, el cual está unido al anillo B en C-2 (flavona) o en C-3 (isoflavona) (Harborne y Williams, 2000).

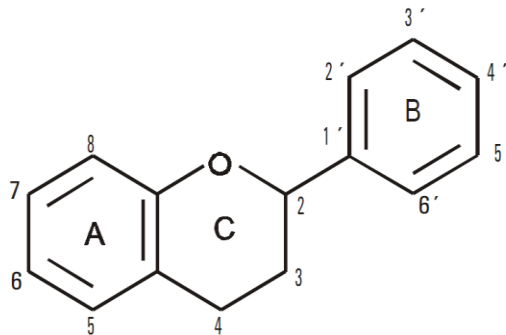


Figura 12. Flavonoides. Estructura básica de un flavonoide. (Martínez y col. 2002).

1.7.3 Clasificación de los flavonoides.

Una variación en el anillo C proporciona la división de estos compuestos. (Kumar y col, 2001). En función de sus características estructurales (fig. 11). se pueden clasificar en:

- Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
- Flavonoles, representados por la quercitina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
- Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
- Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

Tres características estructurales son importantes para su función:

- a) La presencia en el anillo B de la estructura catecol u O-dihidroxi.
- b) La presencia de un doble enlace en posición 2,3.
- c) La presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5 (Martínez y col, 2002).

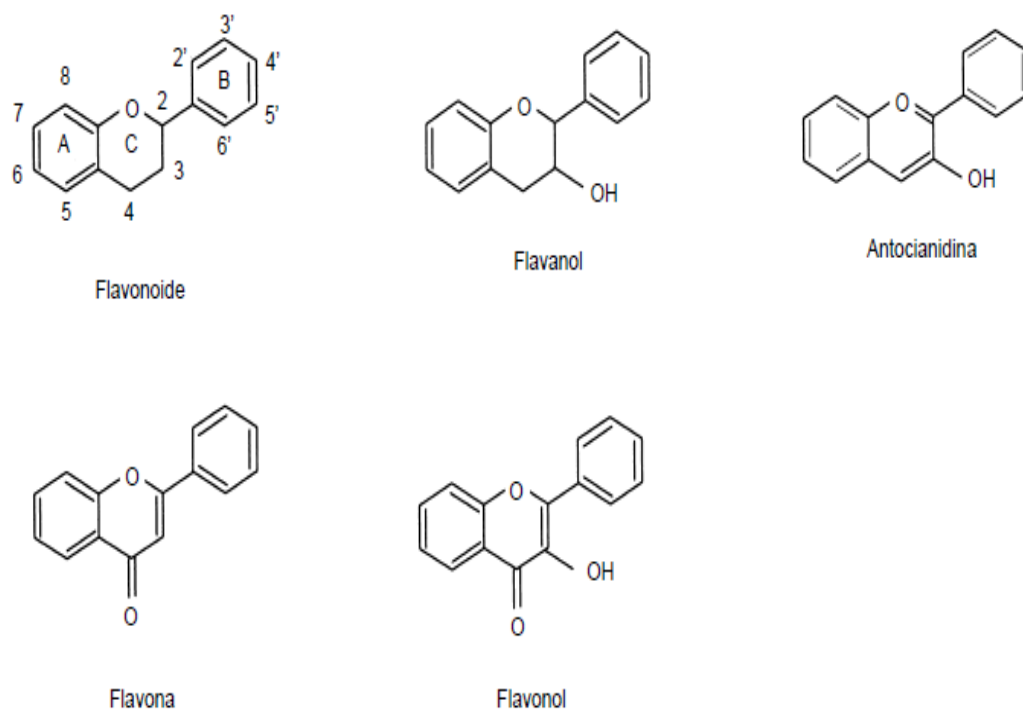


Figura 13. Flavonoides. Estructura básica y tipos (Martínez y col, 2002).

1.7.4 Efectos farmacológicos de los flavonoides.

Se sabe desde hace mucho tiempo que los flavonoides ejercen diversos efectos biológicos (Harborne y Williams, 2000). Son potentes antioxidantes, tienen capacidades de captación de radicales libres (Agrawal, 2011) y son quelantes de cationes divalentes (Kumar y col, 2011). Poseen propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobianas, antialérgicas, antitumorales, antiasmáticas e inhibidoras de enzimas como la transcriptasa reversa, proteína quinasa C, tirosina quinasa C, calmodulina, ornitina decarboxilasa, hexoquinasa, aldosa reductasa, fosfolipasa C y topoisomerasa (Pérez, 2003).

Actualmente hay un interés creciente sobre los compuestos polifenólicos debido a sus efectos beneficiosos en la salud humana. Hasta el momento se han descrito más de 6.000 flavonoides diferentes y se siguen identificando nuevas estructuras (Puebla y col, 2004). Cada vez más, esta clase de productos naturales se está convirtiendo en el tema de investigación anti-infecciosa. Numerosos grupos de flavonoides han sido aislados e identificados estructuralmente, estudiando la actividad antifúngica, antiviral y antibacteriana que estos poseen (Cushnie y Cordero, 2005).

1.7.5 Actividad de flavonoides contra tripanosomatidios.

Extractos de plantas o compuestos derivados de ellos son una valiosa fuente de nuevos agentes medicinales para el tratamiento de la leishmaniasis y otras enfermedades (Marín y col., 2009). Los registros antiguos, así como los informes recientes de la literatura han establecido la eficacia de los productos naturales como fuentes potencialmente ricas de nuevos y selectivos agentes para el tratamiento de importantes enfermedades tropicales causadas por protozoos y otros parásitos. La literatura de productos naturales proporciona una investigación cada vez mayor en derivados de plantas con propiedades leishmanicidas (Mishra y col., 2011).

Según Ramírez y col., 2010, los flavonoides representan una fuente inmensa para la búsqueda de nuevos candidatos de fármacos contra protozoarios. A continuación se mencionarán algunos trabajos donde se evidencia la actividad de flavonoides contra tripanosomatidios.

Chen y col., 1994, demostraron claramente que la licochalcona A es un prometedor compuesto para el desarrollo de un nuevo fármaco contra la leishmaniasis. La administración intraperitoneal de la licochalcona A impide totalmente el desarrollo de lesiones en los ratones infectados con *Leishmania major*. El tratamiento intraperitoneal con licochalcona A en hámster infectados con *L.donovani* resultó en una reducción mayor al 96 % de carga de parásitos en el hígado y el bazo, en comparación con el control. La administración oral de la licochalcona A a concentraciones de 5 a 150 mg/kg de peso corporal por día durante 6 días consecutivos resultó entre un 65 y 85 % de reducción de cargas parasitarias de *L.donovani* en el hígado y el bazo, respectivamente.

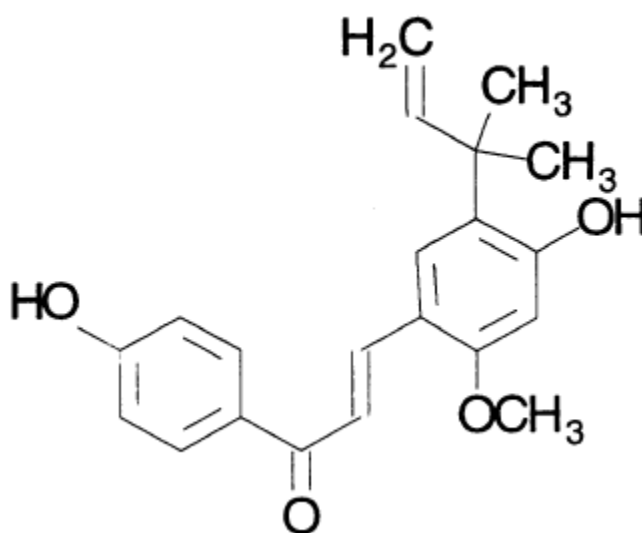


Figura 14. Estructura química de licochalcona A (Chen y col., 1994).

Tasdemir y col., 2006, mediante experimentos *in vitro*, mostraron que la flavona 7,8-dihydroxiflavona tiene una actividad tripanocida sobre *T. brucei rhodesiense* con un IC₅₀ de 68 ng/ml, seguida por 3-hidroxiflavona, ramnetina y tetrahydroxiflavona (IC₅₀ 0.5 µg/ml). La actividad frente a *T. cruzi* fue moderada, y sólo la crisina dimetiléter y el 3- hidroxidaidzeina mostraron un IC₅₀ menor de 5.0µg/ml. La mayoría de los metabolitos que se ensayaron poseían potencial leishmanicida notable. Fisetina, 3-hidroxiflavona, luteolina y quercetina presentaron un IC₅₀ de 0.6, 0.7, 0.8, y 1.0 µg/ml frente a promastigotes de *L. donovani*. La 7,8-dihydroxiflavona (50 mg/Kg) y la quercetina (30 mg/Kg) disminuyeron las infecciones parasitarias en modelos murinos infestados con *T. brucei rhodesiense* y *L. donovani* respectivamente.

Schinor y col., 2007, mostraron que compuestos aislados de *Cresta scapigera* presentan actividad tripanocida sobre *L. amazonensis* y *T. cruzi*. Los extractos crudos evaluados, aislados de *Cresta scapiger*, redujeron notablemente la viabilidad de los amastigotes de *L. amazonensis* a 1g/ml, mientras que sólo los extractos hexánicos de la inflorescencia, no afectaron de forma significativa la lisis de los tripomastigotes de *T. cruzi*. Los flavonoides luteolina y apigenina fueron los más activos contra *L. amazonensis* a una concentración de 84 µg/ml.

Marín y col., 2009, estudiaron un conjunto de flavonoides aislados de partes aéreas de *Consolida oliveriana*: kaempferol, quercetina, trifolina, sus derivados y octa-O-acetilperoxido, donde se evidenció actividad leishmanicida. La proliferación celular y los estudios ultraestructurales mostraron que los compuestos acetilados eran

altamente activos contra *Leishmania (V.) peruviana*, mientras que el octa-O-acetilperoxido fue eficaz contra *Leishmania (V.) braziliensis*. El octa-O-acetilperoxido mostró un IC₅₀ de 7.35µg/ml para *L. (V.) peruviana* y un IC₅₀ de 6.21µg/ml para *L. (V.) braziliensis*, ambos valores por debajo de los IC₅₀ registrados para los controles de Pentostam y Glucantime.

1.7.6 El flavonoide 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF)

En la presente investigación se trabajó con el flavonoide 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF), este fue aislado de las hojas de *Croton caracasana*, una planta de la cual se han aislado una serie de seco-entkauranos con comprobada actividad citotóxica en diferentes líneas de cáncer, además de antibacteriana.

El género *Croton* perteneciente a la familia *Euphorbiaceae*, comprende más de 1.500 especies, es el segundo más numeroso de la familia. Se encuentra distribuida en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, muchas de estas especies son utilizadas por la tradición popular para el tratamiento de numerosas enfermedades (Puebla y col, 2004). Las aplicaciones populares incluyen tratamientos del cáncer, estreñimiento, diabetes, problemas digestivos, disentería, heridas externas, fiebre, hipertensión, inflamación, parásitos intestinales, malaria, úlceras y pérdida de peso. Entre las actividades farmacológicas, experimentalmente comprobada para las especies de este género destacan su potente actividad antiinflamatoria, antiulcerogénica, antidiabética, analgésica y anticancerígena (Chávez, 2013).

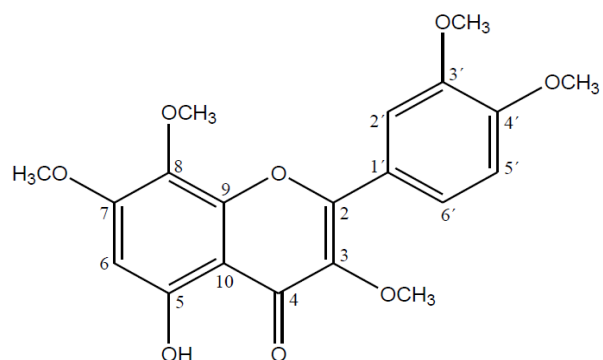


Figura 15. Estructura química del Compuesto 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) (Chávez, 2013).

Por todo lo anteriormente expuesto, en este trabajo especial de grado nos proponemos estudiar el efecto de la PMF sobre *L. mexicana*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

- Determinar el efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre la viabilidad y la homeóstasis del Ca^{2+} intracelular de *Leishmania mexicana*.

2.2 Objetivos Específicos

- Estudiar el efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre el crecimiento de poblaciones de promastigotes de *L. mexicana*.
- Determinar el efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en *L. mexicana*.
- Determinar el efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre el potencial electroquímico mitocondrial en *L. mexicana*.
- Determinar el efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre los acidocalcisomas en *L. mexicana*.
- Estudiar el efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre la viabilidad de macrófagos J774-G8 (proveniente de linfoma de ratón) y células de mamífero (fibroblastos humanos)
- Determinar el efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre macrófagos J774-G8 infectados con amastigotes de *L. mexicana*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales.

3.1.1 Reactivos.

Las soluciones y medios de cultivo fueron preparadas con reactivos adquiridos por diferentes casas comerciales, entre ellas SIGMA (St. Louis, MO) y BIO – RAD. El Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) y el suero fetal bovino fueron adquiridos de GibcoBRL (MD, EEUU). El dimetil-sulfóxido (DMSO), el carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona (FCCP), la nigericina, la penicilina y la estreptomycinina se adquirieron de la casa SIGMA (St. Louis, MO). El Fura – 2AM, la rodamina 123 y la naranja de acridina fueron adquiridos de Molecular Probes Inc. OR.

El flavonoide 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona ($C_{20}H_{20}O_8$) fue suministrado por la Dra. Alírica Suarez del Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela.

3.2 Experimentos in vitro.

3.2.1 Mantenimiento y cultivo de parásitos.

Los promastigotes de *L. mexicana* fueron cultivados a temperatura ambiente en envases T25 en medio Liver Infusion Tryptose (LIT) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado y 1% de penicilina (100 U/ml) / estreptomycinina (10.000 µg/ml).

3.2.2 Mantenimiento y cultivo de macrófagos J774-G8 y fibroblastos humanos.

Los macrófagos J774-G8 y fibroblastos humanos fueron cultivados en Dulbecco's Modified Eagle Medium (medio DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino activado y 1% de penicilina (100 U/ml) / estreptomicina (10.000 µg/ml). Se mantuvieron a 37°C y 5 % CO₂.

3.2.3 Experimentos mediante métodos fluorimétricos:

3.2.3.1 Estudio del efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) en la homeóstasis de Ca²⁺ intracelular en *L. mexicana*.

Para los experimentos fluorimétricos, el conteo de *L. mexicana* se realizó mediante una cámara de Neubauer.

Con la finalidad de estudiar el efecto de la PMF en la [Ca²⁺]_i de *L. mexicana*, estos parásitos se incubaron con Fura 2 acetoximetilado (Fura 2-AM), fluoróforo específico para este catión. Se centrifugaron 500 µL de medio con parásitos a una concentración de 1.5 x10⁶ parásitos/ml a 0,6 xg por 2 min. El “pellet” se resuspendió en PBS Glucosado (PBSG), compuesto por Na₂HPO₄ 13.48 g/L, NaHPO₄-2H₂O 8.78g/L y NaCl 4.25g/L. Posteriormente, los parásitos se incubaron con 2 µM de Fura 2-AM en presencia de ácido plurónico al 5% p/v y 2.4 mM de probenidol, durante 4 horas en agitación constante a 29 °C. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron de

nuevo, se eliminó el sobrenadante y se lavaron dos veces con 500 µl de buffer de lavado, ácido plurónico al 5% p/v y 2.4 mM de probenidid.

El Fura-2 es un indicador fluorescente de alta sensibilidad que es excitado a dos longitudes de onda, 340 nm y 380 nm, y que emite a una longitud de onda de 510 nm. Las características espectrales del Fura-2 son tales que a 340 nm la excitación se incrementa con concentraciones crecientes de Ca^{2+} mientras que a 380 nm ocurre lo contrario.

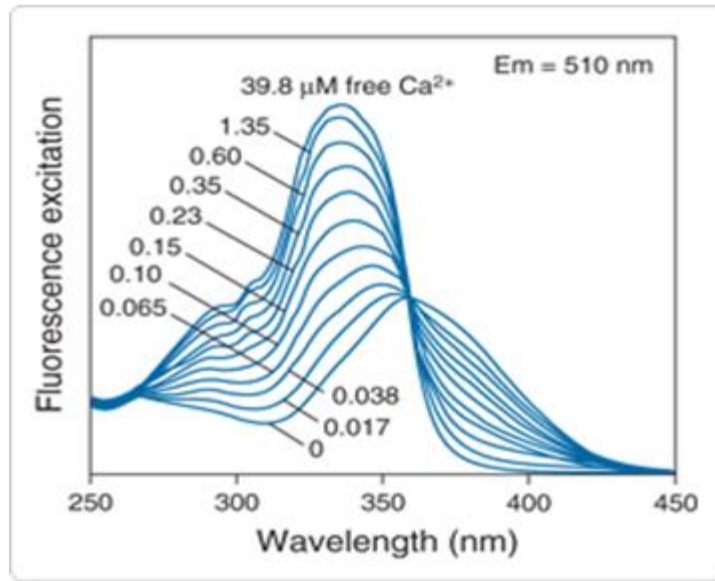


Figura 16. Espectro de excitación y emisión del Fura 2 en el rango de concentración de Ca^{2+} desde 0 hasta 39.8 µM. Consultado el 28 de septiembre del 2014.

Disponible en: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook-/Indicators-for-Ca2-Mg2-Zn2-and-Other-Metal-Ions/Fluorescent-Ca2-Indicators-Excited-with-UV-Light.html>.

Con el objetivo de cargar los parásitos con Fura-2, se utilizó la forma de Fura-2 acetoximetilester (Fura-2 AM). Una forma esterificada, el cual es un compuesto lipofílico,

permeable a la membrana celular. Una vez dentro de la célula, el Fura-2 AM, es hidrolizado por las esterasas endógenas, transformando el compuesto a su forma hidrofóbica, fluorescente y sensible al Ca^{2+} , que es incapaz de cruzar las membranas celulares y por lo tanto permanece en el citoplasma.

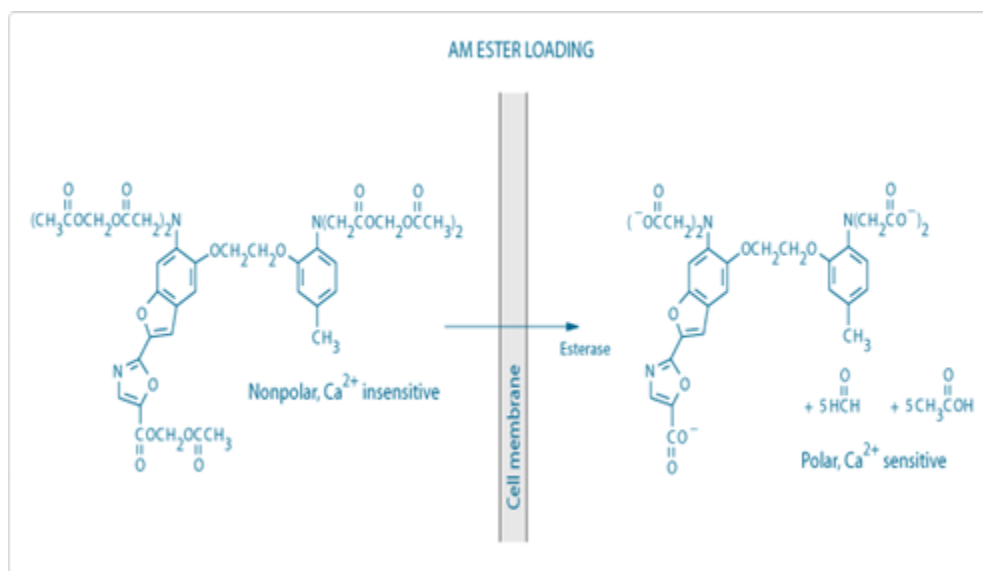


Figura 17. Representación esquemática de la incorporación del Fura 2 a la célula. Consultado el 21 de septiembre 2014. Disponible en: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Technical-Notes-and-Product-Highlights/Loading-and-Calibration-of-Intracellular-Ion-Indicators.html>.

Se usó el fluorímetro Perkin Elmer LS55, el cual tiene la capacidad de hacer incidir 2 diferentes longitudes de onda de excitación sobre la cubeta. Este fluorímetro consta de una fuente de luz que incide en un “chopper” en el cual se separa el haz de luz en sus dos longitudes de onda de excitación del Fura 2; 340 nm para el Fura-2 unido a Ca^{2+} y 380 nm para el Fura-2 libre.

Las longitudes de onda son luego unidas mediante un combinador de rayos que las hace incidir sobre la muestra en la cubeta de cuarzo. La muestra cargada con Fura-2 emite a 510 nm. Esta longitud de onda es recibida por el fotomultiplicador (P.T.M) y luego va al centro de control y adquisición de datos, proporcionando un registro del experimento y una data numérica visible en el monitor de la computadora acoplada al sistema.

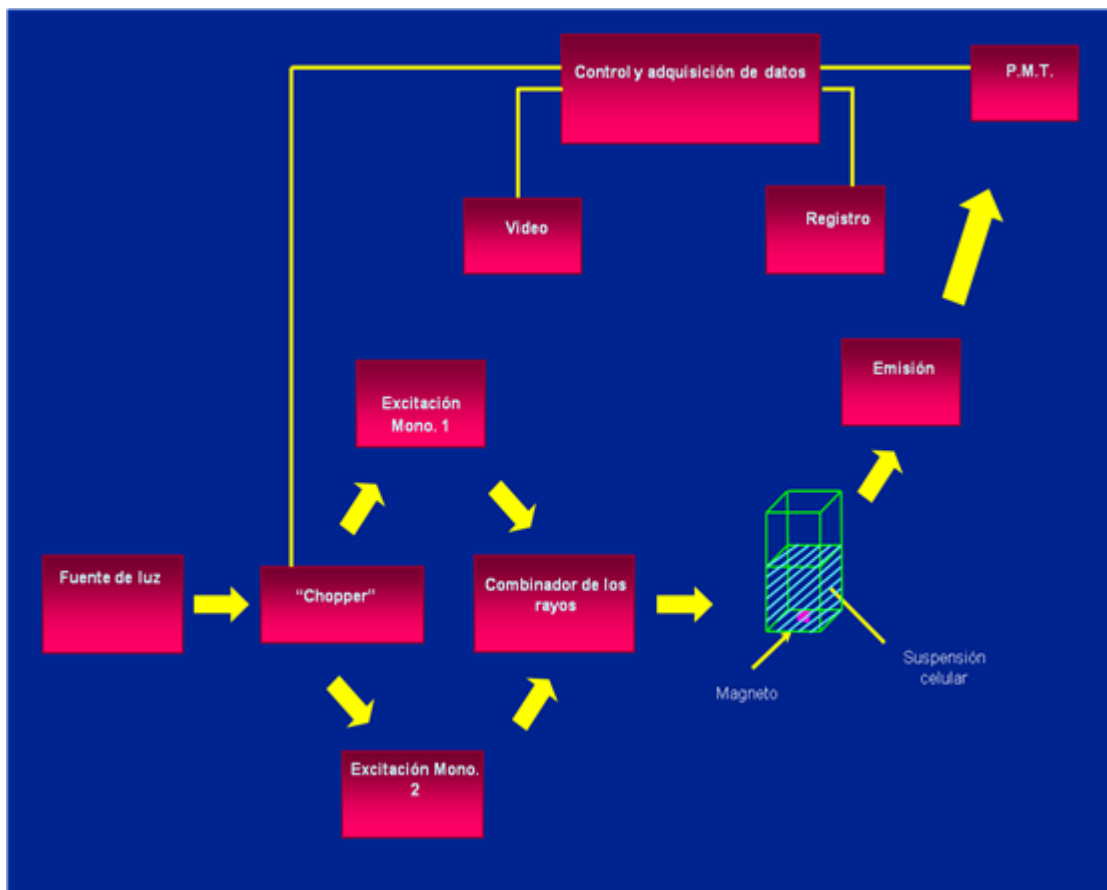


Figura 18. Representación esquemática del sistema de detección de Ca^{2+} mediante dos longitudes de onda de excitación.

3.2.3.2 Estudio del efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre el potencial electroquímico mitocondrial de *L. mexicana*.

Para estudiar el efecto de la PMF en el potencial electroquímico mitocondrial se utilizó el fluoróforo Rodamina-123. Este se intercala entre la membrana interna y la membrana externa de la mitocondria siguiendo la diferencia de potencial electroquímico mitocondrial, por lo que permite determinar las variaciones de dicho potencial. Para esto, se colocaron parásitos a una concentración de $1,5 \times 10^6$ parásitos/ml en Buffer de carga (130 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM KH₂PO₄, 20 mM Tril-HCl) con rodamina 123 a 20 μM, se cargaron por 45 minutos a 29°C en agitación continua. Transcurrido el tiempo, se centrifugó, se descartó el sobrenadante y el “pellet” se resuspendió en 500 μL de buffer de carga.

Este procedimiento de lavado se realizó dos veces. Posteriormente se colocó la muestra en una cubeta de cuarzo en el fluorímetro HITACHI F-7000 con agitación continua a 29 °C. La longitud de onda de excitación de la rodamina 123 corresponde a 488 nm, mientras que la emisión se monitorea a 530 nm.

Las concentraciones de PMF estudiadas fueron de 1, 2.5, 5, 10 y 20 μM. Como control positivo se usó FCCP 2 μM protonóforo desacoplador de la cadena transportadora de electrones.

3.2.3.3 Estudio del efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre los acidocalcisomas de *L. mexicana*.

Para estudiar el efecto de la PMF sobre los acidocalcisomas, se procedió de la misma manera descrita para el estudio del efecto de la PMF sobre el potencial electroquímico mitocondrial de *L. mexicana*, pero empleando como fluoróforo la naranja de acridina, a una concentración final de 2 μM , con un tiempo de carga de 5 minutos en agitación continua a 29°C.

La naranja de acridina es un fluoróforo que se acumula en compartimientos ácidos, como los acidocalcisomas. Cuando se añade algún efector que alcalinice los acidocalcisomas, este fluoróforo es liberado del organelo, siendo monitoreado por el fluorímetro. Se usó el fluorímetro HITACHI F-7000. Al igual que la rodamina-123, la naranja de acridina tiene un espectro de excitación de 488 nm y uno de emisión de 530 nm.

Las concentraciones de PMF estudiadas fueron de 1, 2.5, 5, 10 y 20 μM . Como control positivo se utilizó nigericina a una concentración de 2 μM , ionóforo intercambiador de K^+ por H^+ , lo cual conlleva a la alcalinización de los acidocalcisomas.

3.2.3.4 Estudio del efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre poblaciones de promastigotes de *L. mexicana*.

La susceptibilidad de promastigotes de *Leishmania mexicana* al PMF se evaluó mediante una curva de crecimiento en ausencia y en presencia de diferentes

concentraciones de este compuesto (0, 1, 2, 5, 10, 20 y 40 μM). Inicialmente, se tomó un inóculo de 1×10^6 cel/mL y se sembró en fiolas, previamente esterilizadas, que contenían 10 ml del medio LIT suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado.

Transcurrido un período de 24 horas, se agregó a cada fiola 10 μl de PMF a diferentes concentraciones. Por cada concentración de droga se realizaron tres experimentos. Diariamente, a través de la cámara de Neubauer, se determinó la proliferación celular de promastigotes de *L. mexicana* (siendo esta reportada como parásitos por mililitros (parásitos / ml)). El conteo se realizó hasta que se alcanzó la fase estacionaria del cultivo. Las concentraciones de parásitos fueron graficadas y comparadas con el control (sin PMF) con el fin de estudiar el efecto del PMF sobre el crecimiento de estos parásitos.

3.2.3.5 Estudio del efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre macrófagos J774-G8 (proveniente de linfoma de ratón) infectados con amastigotes de *L. mexicana*.

La susceptibilidad de amastigotes intracelulares de *Leishmania mexicana* al PMF se estudió mediante una curva de infección donde se usaron macrófagos J774-G8 cultivados en Dulbecco's Modified Eagle Medium (medio DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino activado y se mantuvieron a 37°C y 5 % CO_2 . Se evaluaron diferentes concentraciones de PMF (0, 0.5, 1, 2, 3, 5 y 10 μM). El procedimiento para la realización de dicha curva fue el siguiente:

- Se usaron placas de 12 pozos. Bajo condiciones de esterilidad se le colocó a cada pozo un cubre objeto. Se sembraron 5000 macrófagos J774-G8 contenidos en 190 μ l de medio DMEN inactivado. Las placas se incubaron por 30min a 37°C y 5 % CO₂.
- Transcurrido este período de tiempo, y habiendo lavado previamente los promastigotes de *Leishmania mexicana* con medio DMEM para eliminar cualquier resto del medio LIT de cultivo, se procedió a sembrar 10 μ l de medio DMEN que contenían 75000 parásitos, es decir, 15 parásitos por cada macrófago. Las placas se incubaron a 37 °C y 5 % CO₂ durante 24 horas.
- Se retiró el medio de cada pozo y se agregó 490 μ l de medio DMEN. Se realizaron las diluciones correspondientes de PMF en medio DMEN preparando diferentes soluciones stock. Se añadió 10 μ l de droga a cada pozo con concentraciones finales de 0.5, 1, 2, 3, 5 y 10 μ M. Seguidamente se incubaron las placas a 37 °C y 5 % CO₂ durante 72 horas. Cada experimento se realizó por triplicado teniendo un control infección (sin de PMF) y un control droga para cada concentración de PMF evaluada.
- Pasadas las 72 horas, se retiró el medio de cada pozo, se lavó con PBS. Las células fueron fijadas con metanol frío al 100%.
- Luego de que el metanol se evaporó por completo, las células se tiñeron con azul de Giemsa (1/10) por 30 min. El colorante se retiró con agua de chorro, y para lograr el contraste se lavó con ácido acético al 1%.

- Se fijó cada cubre-objeto a una lámina portaobjetos con aceite de pino y se contaron los macrófagos infectados en un microscopio de inmersión, a una magnificación de 100X.
- Por último se determinó el IC₅₀ con el programa Prisma GraphPad5.0.

3.2.3.6 Estudio de citotoxicidad de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre la proliferación celular de promastigotes de *L. mexicana* , macrófagos J774-G8 y células de mamífero (fibroblastos humanos).

Para evaluar el posible efecto citotóxico de la PMF sobre la proliferación celular, se hicieron ensayos de MTT. El de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difenil tetrazolio (MTT) es una sal de color amarillo soluble en agua, cuyo anillo de tetrazolio es clivado principalmente por enzimas deshidrogenasas presentes en mitocondrias activas (de células vivas) produciendo cristales de formazan de color azul oscuro insolubles en medio acuoso.

Este método nos permite cuantificar en forma de densidad óptica las células vivas después de la aplicación de un compuesto, lo que indica que a mayor cantidad de células vivas, mayor densidad óptica y menor citotoxicidad. Para ello, las células deben ser incubadas con MTT (0.4 mg/ml).

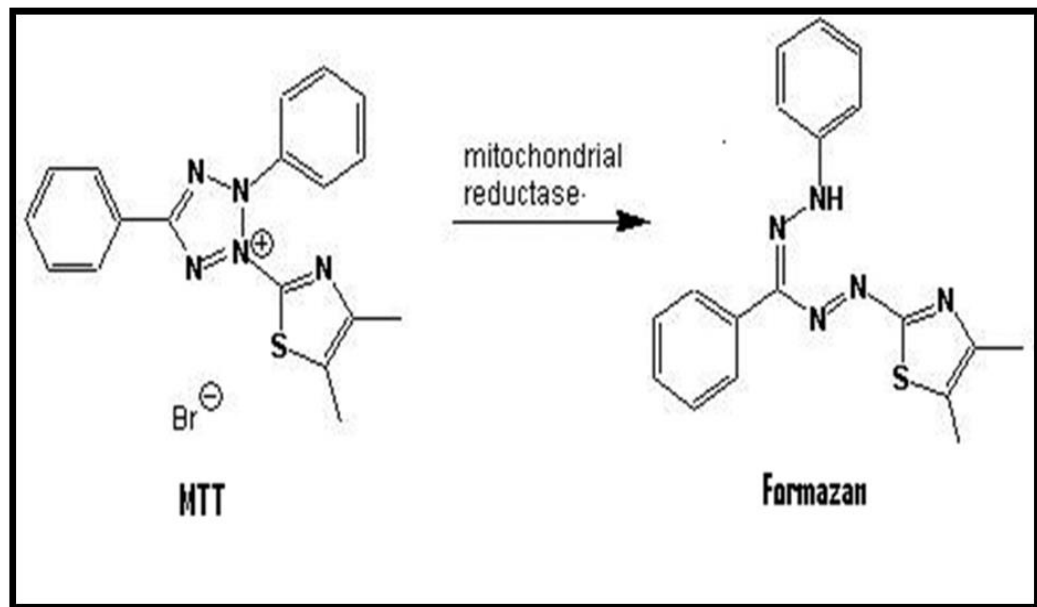


Figura 19. Reducción de MTT. La reducción de MTT en células vivas por los resultados de la reductasa mitocondrial en la formación de formazán insoluble. Consultado el 17 de febrero del 2014. Disponible en <http://www.biotek.com/resources/articles/quantification-cell-viability-epoch.html>

Se procedió de la siguiente manera:

- Se sembraron 5000 células (macrófagos J774-G8) en placas de microtitulación de 96 pozos. Las células fueron tratadas con diversas concentraciones de PMF (0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 2.5, 3, 5, 10, 20, 40 y 50 μM). La placa se incubó a 37 °C y 5 % CO_2 durante 72 horas, evaluando posteriormente la viabilidad de las mismas mediante el método de MTT.
- Transcurridas las 72h, la placa se centrifugó por 20 min a 3800 xg, se retiró el sobrenadante y se le agregó a cada pozo 100 μL de solución MTT a una concentración de 0,4 mg/mL. La placa se dejó incubando en oscuridad a 37 °C y 5 % CO_2 durante 4 horas.

- Luego del período de incubación, la placa se centrifugó por 20 min a 3800 xg, se descartó el sobrenadante y se le añadió a cada pozo 100 µL de DMSO. La placa se clocó en agitación por 5min para lograr la dilución completa de los cristales formados.
- Por último, se realizó la lectura de la absorbancia a 575 nm en un lector de placas de ELISA y se determinó el IC₅₀ con el programa Prisma GraphPad5.0. Cada experimento se realizó por cuadruplicado teniendo un control (sin PMF).

Lo anteriormente descrito, se realizó con células de mamífero (fibroblastos humanos) y con promastigotes de *L. mexicana*. En este último caso (con promastigotes de *L. mexicana*, se sembraron 100.000 parásitos y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente por 4h luego de haber agregado el MTT.

4. RESULTADOS

4.1 Efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre poblaciones de promastigotes de *L. mexicana*.

Con el propósito de estudiar el efecto de la PMF sobre promastigotes de *L. mexicana*, estos parásitos fueron tratados con concentraciones crecientes de dicho compuesto manteniendo un grupo control (sin droga). Se determinó su viabilidad en el tiempo hasta observar una fase estacionaria en el crecimiento. Los resultados indican un efecto dosis-dependiente (fig. 20), observándose como a medida que aumenta la concentración de droga empleada, el número de células por mililitro (cel/ml) disminuye.

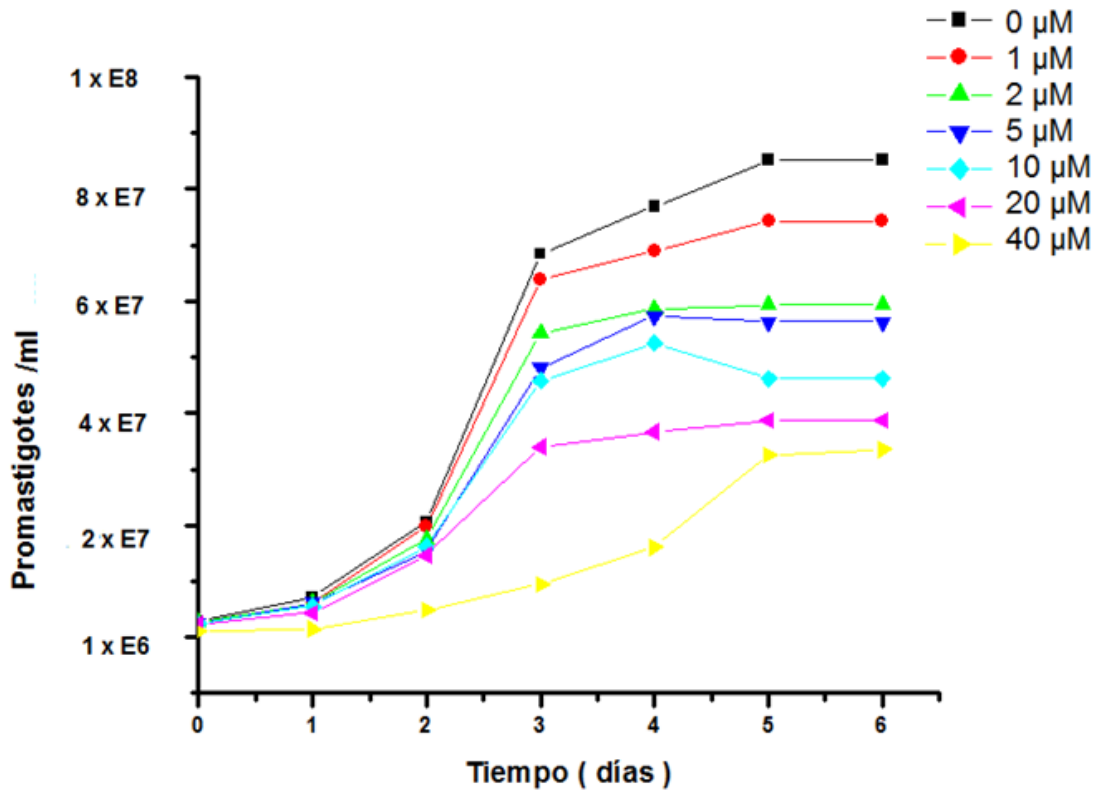


Figura 20. Efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre poblaciones de promastigotes de *L. mexicana*. Los parásitos fueron sometidos a concentraciones crecientes de PMF; se determinó su crecimiento hasta alcanzar la fase estacionaria del cultivo.

4.2 Efecto citotóxico de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre la proliferación celular de promastigotes de *L. mexicana*.

Con el fin de estudiar el posible efecto citotóxico del PMF sobre promastigotes de *L. mexicana*, se realizó una prueba de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difenil tetrazolio (MTT); prueba citotóxica que nos permite cuantificar la viabilidad de una población celular que ha sido expuesta a diferentes concentraciones de algún compuesto (en nuestro caso de PMF), mediante el registro de una densidad óptica, la cual es directamente proporcional a las células vivas presentes.

Para este ensayo se usaron placas de microtitulación de 96 pozos, con un inóculo inicial de 100.000 promastigotes en cada pozo. Estos fueron sometidos a concentraciones crecientes de PMF por 72 h, teniendo un control al cual no se le añadió droga.

Los resultados obtenidos muestran que a mayor concentración de PMF, menor es la absorbancia registrada lo cual nos indica que hay un menor crecimiento celular (fig. 21), demostrándose que la PMF afecta la viabilidad de estos parásitos.

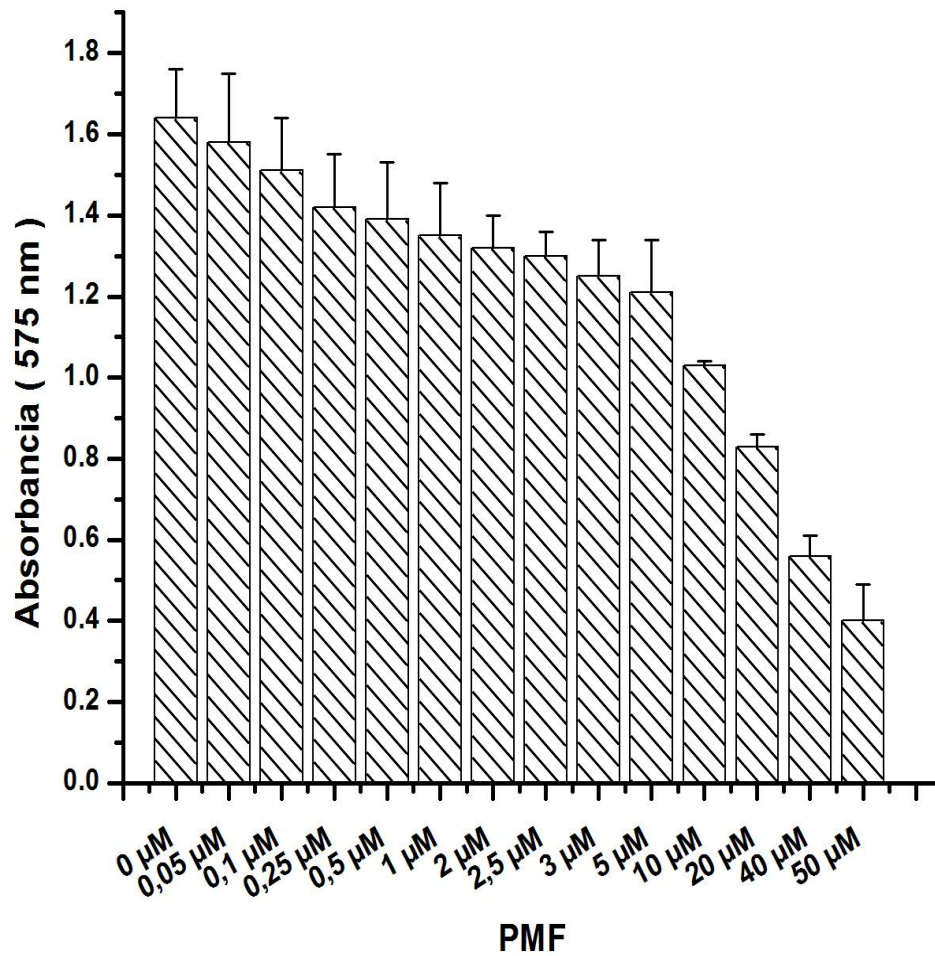


Figura 21. Efecto citotóxico de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre promastigotes de *L. mexicana*. Resultados obtenidos mediante ensayos de MTT. Los parásitos fueron tratados con concentraciones crecientes de PMF evaluando también un control (sin droga) durante un período de 72 h. La absorbancia fue medida a 575 nm. Se observó un IC₅₀ de $16,62 \pm 1,08 \mu\text{M}$.

4.3 Efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) en la concentración intracelular de Ca^{2+} en *L. mexicana*.

Con el objetivo de evaluar el efecto que tiene la PMF sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en *L. mexicana*, estos parásitos se incubaron con el fluoróforo Fura 2-AM. En presencia de Ca^{2+} extracelular (2 mM de Ca^{2+}), al añadir la PMF a una concentración de 10 μM se observó un aumento en la fluorescencia, lo cual se asocia con un incremento en los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (fig. 22A).

Con el propósito de determinar si el incremento de Ca^{2+} observado se debía a la liberación de este catión desde compartimientos intracelulares o si provenía del exterior celular, los parásitos fueron incubados en un buffer sin Ca^{2+} (2 mM EGTA) obteniéndose la misma respuesta. El resultado indica que la PMF incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediante la liberación de este ión desde compartimientos intracelulares (fig. 22B).

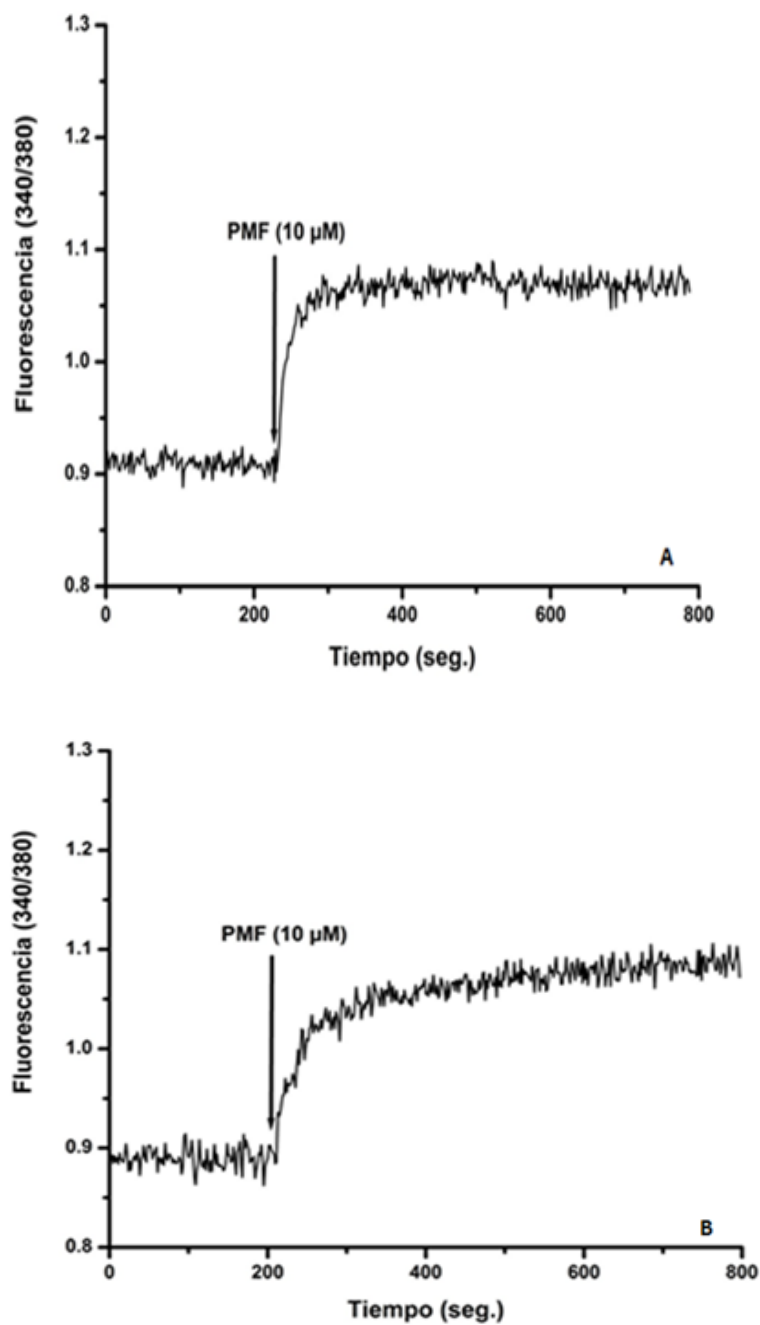


Figura 22. Efecto de la PMF sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en *L. mexicana*. Los parásitos fueron cargados con Fura 2. (A) En presencia de Ca^{2+} extracelular (2Mm de Ca^{2+}). (B) En ausencia de Ca^{2+} extracelular (2 mM EGTA). Las flechas indican la adición de PMF.

4.4 Efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre el potencial electroquímico mitocondrial de *L. mexicana*.

Con el propósito de determinar el efecto de la PMF sobre el potencial electroquímico mitocondrial en promastigotes de *L. mexicana*, estos parásitos se cargaron con rodamina 123, fluoróforo que se caracteriza por acumularse entre la membrana interna y externa de la mitocondria. Cuando el potencial mitocondrial disminuye, el fluoróforo se libera, observándose un aumento en la fluorescencia.

Al añadir la PMF a una concentración de 10 μ M se evidenció un aumento en la fluorescencia, indicando que esta droga es capaz de desestabilizar el potencial electroquímico mitocondrial (fig. 23A). Como control positivo se usó FCCP, protonóforo, desacoplante de la cadena transportadora de electrones de la fosforilación oxidativa. El experimento también se realizó de forma inversa (fig. 23B). En este último caso no se observó aumento significativo en la fluorescencia luego de la adición de PMF.

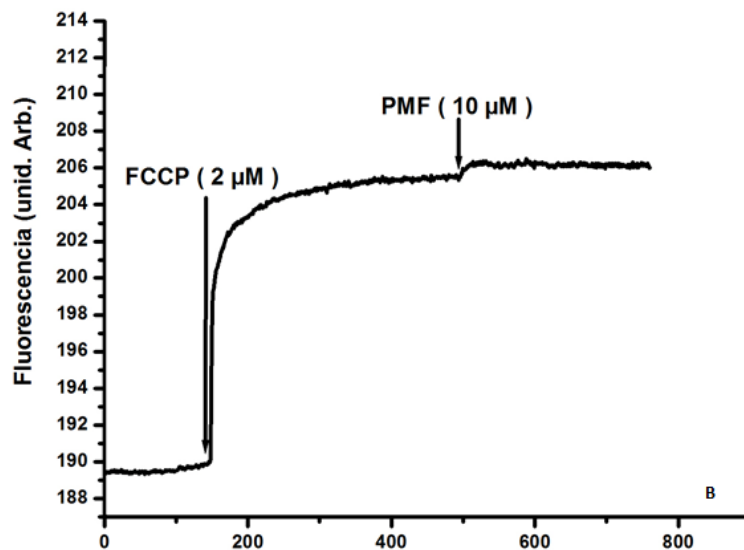
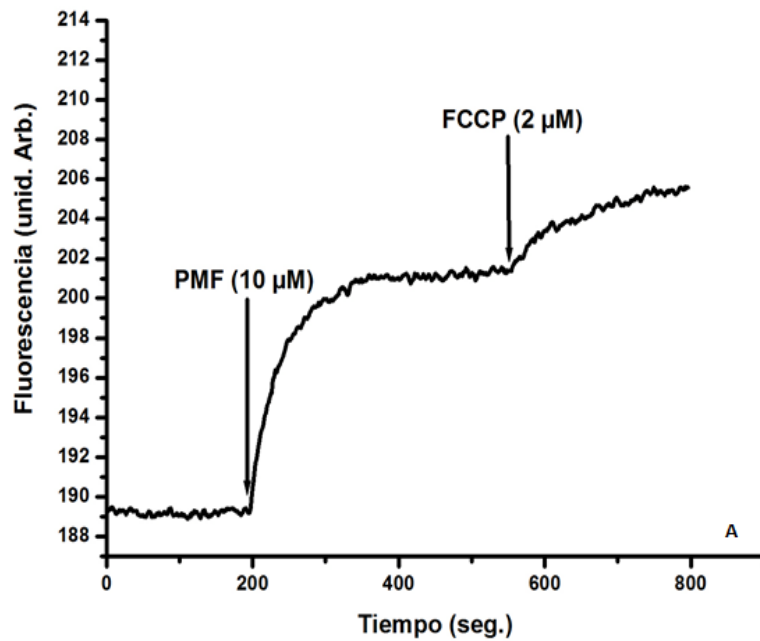


Figura 23. Efecto de la PMF sobre el potencial electroquímico mitocondrial en promastigotes de *L. mexicana*. Los promastigotes de *L. mexicana* fueron incubados con rodamina 123. (A) Efecto de la PMF (10 μM) sobre el potencial mitocondrial. (B) Efecto de la PMF luego de añadir FCCP (2 μM). Las flechas indican la adición de PMF o FCCP.

4.5 Efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre los acidocalcisomas de promastigotes de *L. mexicana*.

Con la finalidad de evaluar el efecto de PMF sobre los acidocalcisomas, los promastigotes de *L. mexicana* fueron incubados con el fluoróforo naranja de acridina a una concentración de 2 μM . Este compuesto tiene afinidad por organelos acídicos como los acidocalcisomas, acumulándose en estos. La liberación de éste fluoróforo desde los acidocalcisomas, es visualizada como un incremento en la fluorescencia.

También se ensayaron diferentes concentraciones de PMF: 2.5, 5 y 10 μM , registrándose una fluorescencia de 75.0%, con 2.5 μM , la cual es menor, estadísticamente significativa con respecto a las otras dos concentraciones. Estos resultados indican que aún a esta concentración, la PMF tiene un potente efecto sobre los acidocalcisomas.

En la figura 25A se observa que al añadir la PMF a una concentración de 10 μM ocurre un aumento en la fluorescencia, lo cual se encuentra asociado con la liberación de la naranja de acridina desde los acidocalcisomas a causa de la alcalinización de los mismos. Como control se usó nigericina a una concentración de 2 μM .

La nigericina intercambia K^+ por H^+ , causando así la alcalinización de los acidocalcisomas. Al agregar la nigericina luego de la PMF, se observó un menor aumento en la señal de fluorescencia, ya que la PMF logró alcalinizar de una manera importante a estos organelos.

Cuando se realizó el experimento de forma inversa (fig. 25B), al añadir primero la nigericina, se observó un incremento en la fluorescencia traducido en la alcalinización de los acidocalcisomas. Sin embargo, al agregar luego la PMF hay un leve incremento de la fluorescencia, que aun siendo pequeño, es significativo y reproducible.

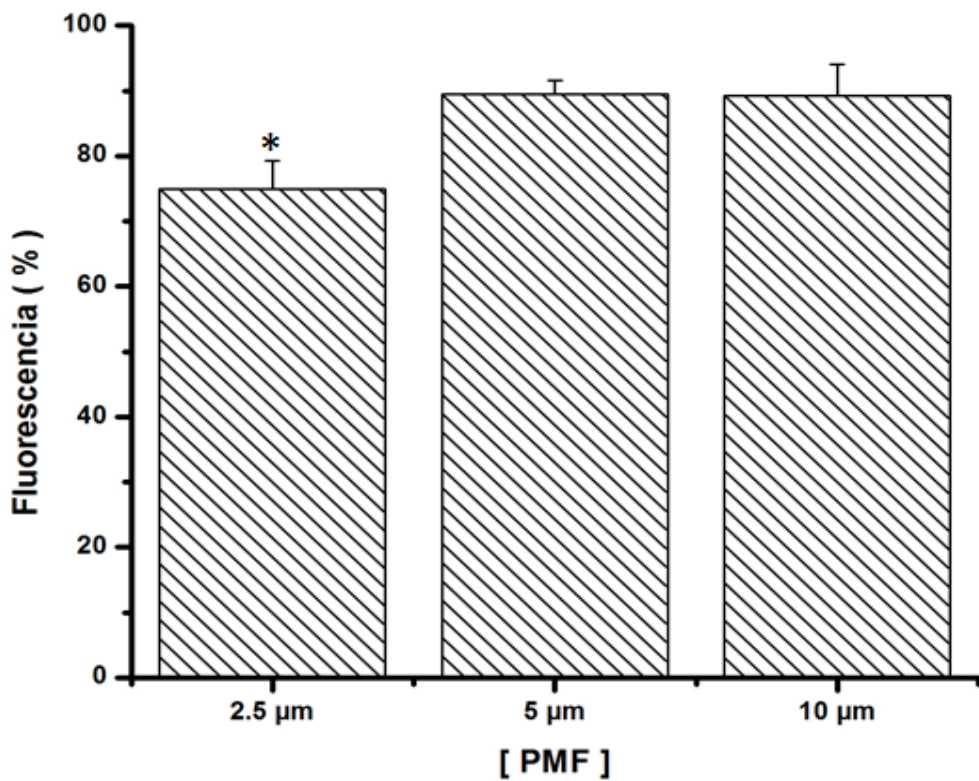


Figura 24. Efecto de diferentes concentraciones de 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre los acidocalcisomas de *L. mexicana*. Los parásitos fueron incubados con naranja de acridina. Se ensayó con PMF a una concentración final de 2.5, 5 y 10 μM. El asterisco (*) representa resultados estadísticamente significativos ($P \leq 0.05$).

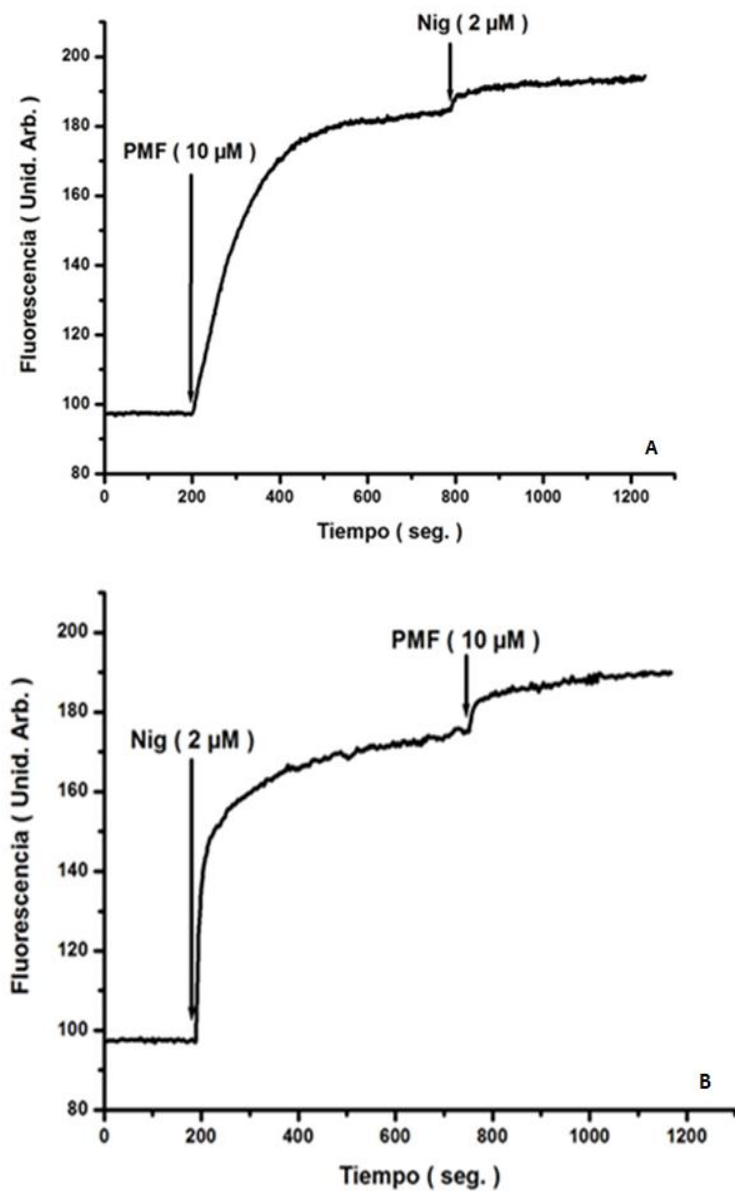


Figura 25. Efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre los acidocalcisomas en promastigotes de *L. mexicana*. Los parásitos fueron incubados con naranja de acridina. (A) Efecto de la PMF (10 μM) sobre los acidocalcisomas. (B) Efecto de la PMF luego de añadir nigericina (2 μM). Las flechas indican la adición de PMF o nigericina.

4.6 Efecto citotóxico de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre la proliferación celular de macrófagos J774-G8 y células de mamífero (fibroblastos humanos).

Al igual que en el caso anterior, con el fin de estudiar el efecto citotóxico que tiene la PMF, pero esta vez sobre la proliferación celular de macrófagos J774-G8 y células de mamífero (fibroblastos humanos), se realizó una prueba de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) sometiendo a estas células a concentraciones crecientes de PMF.

Los resultados obtenidos muestran que el PMF tiene un bajo efecto citotóxico en ambas líneas celulares, reportándose un IC_{50} de $34.47 \pm 1.04 \mu M$ para macrófagos J774-G8 y un IC_{50} de $23.60 \pm 1.07 \mu M$ para fibroblastos humanos.

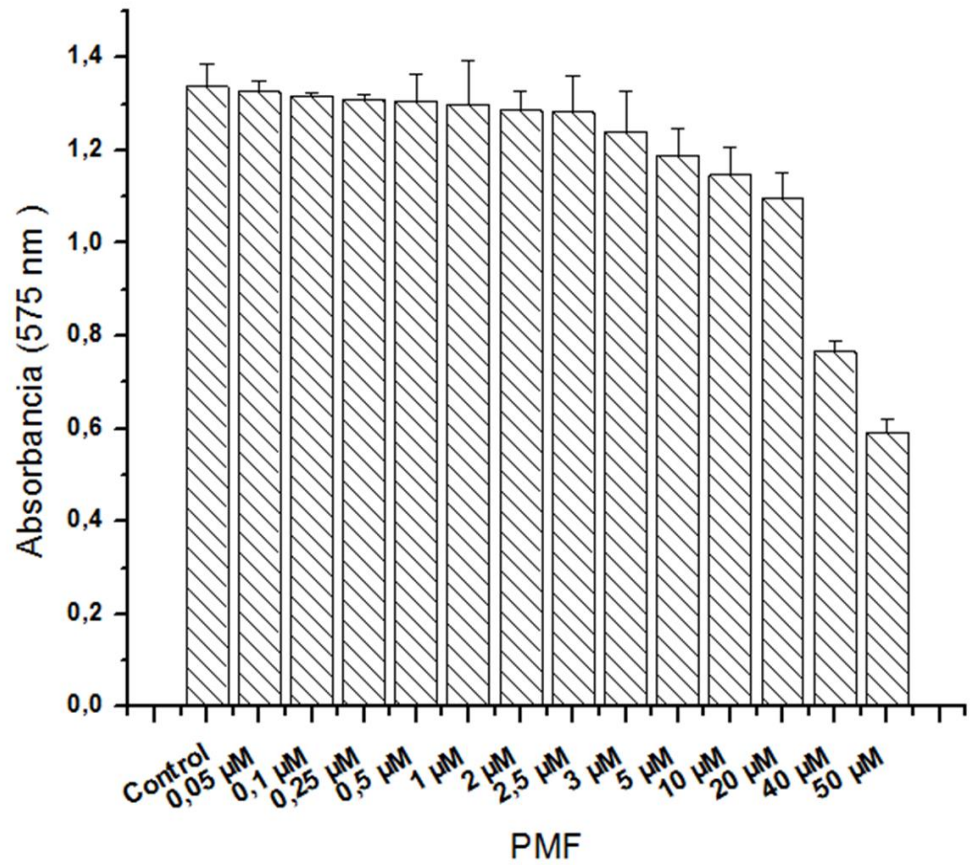


Figura 26. Efecto citotóxico de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre una población de macrófagos murinos (J774-G8). Resultados obtenidos mediante ensayos de MTT. Las células de mamíferos fueron tratadas con concentraciones crecientes de PMF durante un período de 72 h. La absorbancia fue medida a 575 nm. Se determinó un IC₅₀ de $37.47 \pm 1,04 \mu\text{M}$.

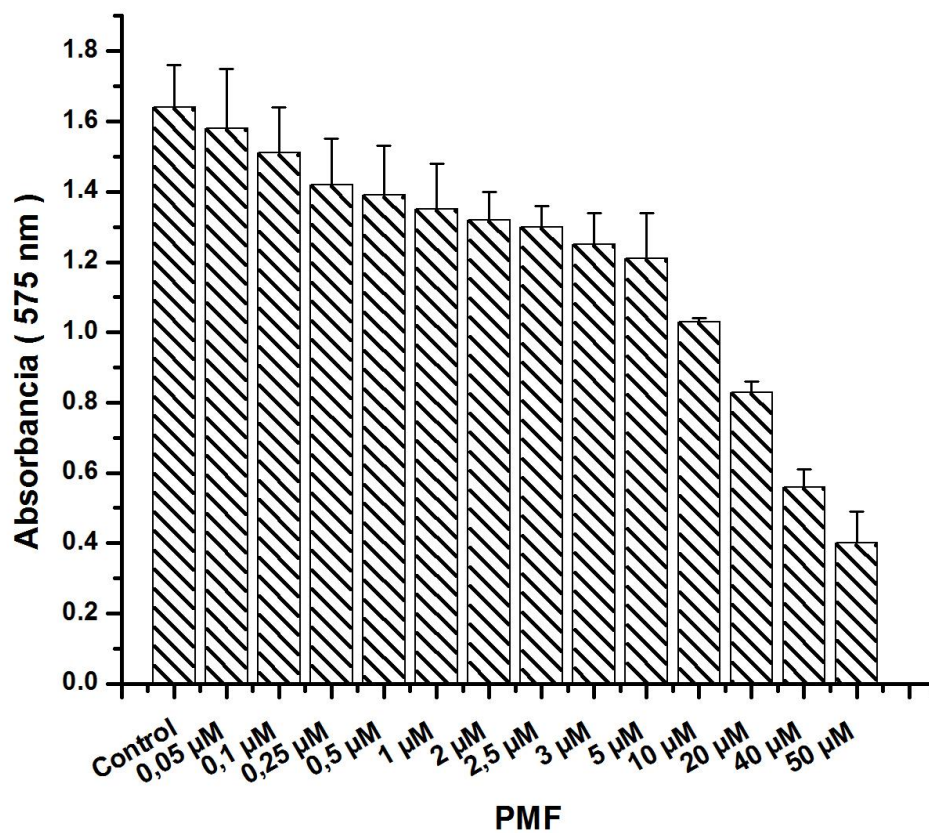


Figura 27. Efecto citotóxico de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre una población fibroblastos humanos. Resultados obtenidos mediante ensayos de MTT. Los fibroblastos fueron tratados con concentraciones crecientes de PMF durante un período de 72 h. La absorbancia fue medida a 575 nm. Se determinó un IC_{50} de $23.60 \pm 1.07 \mu M$.

4.7 Efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre macrófagos J774-G8 infectados con amastigotes de *L. mexicana*.

El estado clínicamente relevante de *L. mexicana* es cuando este se encuentra en forma amastigote. Por tal motivo se estudió el efecto de la PMF sobre macrófagos de la línea J774-G8 infectados con amastigotes de *L. mexicana*. Inicialmente los macrófagos fueron infectados con promastigotes de *L. mexicana* a una proporción de 15 promastigotes por cada macrófago (1:15), evaluándose el efecto de concentraciones crecientes de la droga. Se pudo observar que la PMF es capaz de inhibir la población de amastigotes en el interior de macrófagos, con un IC₅₀ de 0.48µM.

En la figura 28A podemos observar un efecto dosis-dependiente, ya que a mayor concentración de PMF empleada se registró un menor número de macrófagos infectados con amastigotes de *L. mexicana*. Por otra parte, en la figura 28B se observa que el PMF no tuvo ningún efecto en el rango de concentraciones utilizado en este experimento.

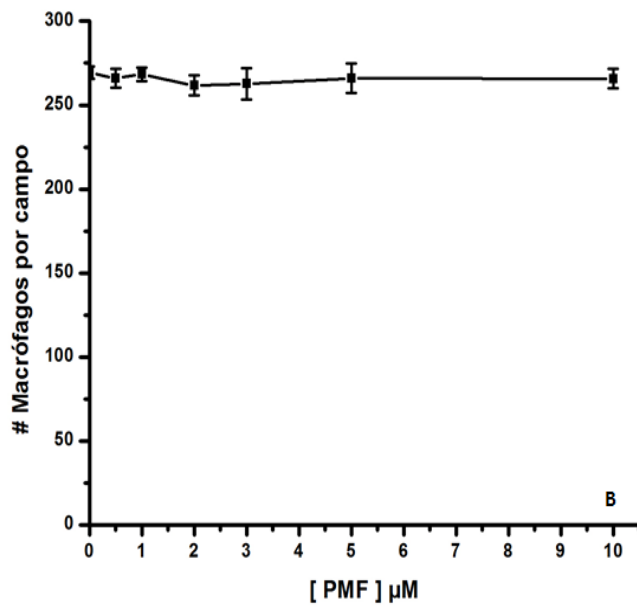
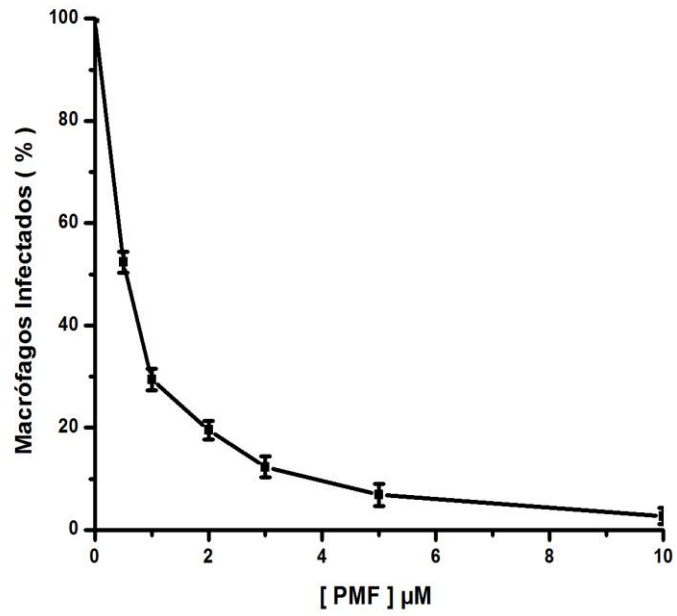


Figura 28. Efecto de la PMF sobre amastigotes intracelulares de *L. mexicana*. (A) Los macrófagos J774-G8 infectados con amastigotes fueron sometidos a concentraciones

crecientes de la PMF. El IC_{50} obtenido fue de $0,48 \mu M$. (B) Efecto de concentraciones crecientes de PMF sobre macrófagos J774-G8 sin infectar.

5. DISCUSION

Los regímenes de tratamientos actuales para la leishmaniasis, basados en la quimioterapia, son limitados y están muy lejos de ser ideales, ya que, a menudo se asocian con efectos secundarios indeseables (Tasdemir y col., 2006). El avance en el campo de las vacunas contra la leishmaniasis, se torna cada vez más lento y arduo. Por esta razón, la quimioterapia representa el elemento crucial en cualquier política de control de esta enfermedad. En tal sentido, las drogas más utilizadas en Latinoamérica para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea como se mencionó anteriormente son el antimonio de n-metilglucamina (Glucantime®) y el estibogluconato de sodio (Pentostan®) (Bonfante y Barroeta, 2002).

Sin embargo, se reportan recidivas en porcentajes elevados, severos efectos tóxicos a nivel cardíaco, renal y hepático, así como quimioresistencia. La vía de administración de las sales antimoniales pentavalentes debe ser parenteral: intramuscular o intravenosa, lo cual también complica el tratamiento, dada la necesidad de dirigirse a un centro asistencial especializado para su aplicación (Bonfante y Barroeta, 2002).

La aparición de parásitos resistentes a los medicamentos, representa un problema adicional y mayor. En tales casos, es inevitable el uso de otros fármacos alternativos parenterales y bastante tóxicos. Todos estos hechos ponen de manifiesto la urgente necesidad de desarrollar tratamientos nuevos, económicos, seguros y fácil de administrar para el control de estas enfermedades infecciosas (Tasdemir y col., 2006).

Por estas razones se hace necesario continuar con la búsqueda de nuevos medicamentos que brinden alternativas para el tratamiento de la leishmaniasis. Los productos naturales constituyen una fuente esencial de metabolitos para el desarrollo de medicamentos. Es por ello que muchos investigadores se han volcado a la realización de estudios etnobotánicos, con el fin de obtener sustancias bioactivas con actividad leishmanicida (Schwikkard y Hereden, 2002).

Desde mediados de los años ochenta, se inició la investigación formal y constante sobre los metabolitos naturales con actividad leishmanicida y antiparasitaria (Chan y Rodríguez, 2001). Los flavonoides constituyen una gran familia de metabolitos secundarios polifenólicos, ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Actualmente hay un interés creciente sobre los compuestos polifenólicos debido a los efectos beneficiosos en la salud humana, atribuidos principalmente a su capacidad antioxidante (Puebla y col., 2004). Los flavonoides están entre los derivados de plantas más atractivos que podrían enriquecer los tratamientos actuales contra la leishmaniasis debido a su amplia gama de propiedades biológicas (Ramírez y col., 2012).

Partiendo de lo anteriormente expuesto, mediante ensayos *in vitro*, se estudió el efecto del flavonoide 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) sobre la homeóstasis del Ca^{2+} intracelular de *L. mexicana*, evaluando el efecto de este compuesto sobre el potencial mitocondrial y los acidocalcisomas de estos parásitos, además de estudiar el efecto citotóxico de este compuesto sobre promastigotes de *L. mexicana*, macrófagos J774-G8, fibroblastos humanos y sobre macrófagos J774-G8 infectados con amastigotes de *L. mexicana*.

Los parásitos de *Leishmania* presentan dos formas en su ciclo de vida; como promastigotes extracelulares flagelados, y como amastigotes intracelulares presentes dentro de los macrófagos del huésped mamífero (Pacheco y col., 1998). Se realizó una curva de crecimiento, en la cual se sometieron poblaciones de promastigotes de *L. mexicana* a concentraciones crecientes de PMF. Como se ilustra en la figura 20, la PMF ejerce un efecto dosis dependiente, es decir, a medida que se emplearon mayores concentraciones de la droga, se registró un menor número de parásitos en el tiempo, evidenciándose que la PMF tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de promastigotes de *L. mexicana*.

Con el objeto de evaluar el efecto citotóxico de la PMF sobre una población de promastigotes de *L. mexicana*, se realizaron ensayos de MTT estudiando concentraciones crecientes de PMF. Este método nos permitió cuantificar en forma de densidad óptica las células vivas después del tratamiento con la droga. A mayor concentración de PMF usada, menor fue la absorbancia registrada, lo que indica que este compuesto afecta la viabilidad de estos parásitos, en concordancia con la curva de crecimiento (fig. 20). Se reportó para este caso un IC_{50} de $16,62 \pm 1,08 \mu M$.

Por otra parte, se sabe que la capacidad de *Leishmania* para infectar el huésped vertebrado depende de su aptitud de sobrevivir en células del linaje fagocítico mononuclear (Alexander y col., 1999). Este proceso puede realizarse *in vitro* empleando diversos tipos celulares. En nuestro caso, se usó macrófagos murinos J774-G8 los cuales fagocitan promastigotes y permiten la morfogénesis intracelular al estadio amastigote, simulando de este modo el proceso de infección natural.

Al estudiar el efecto de la PMF sobre macrófagos J774-G8 infectados con amastigotes de *L. mexicana* se obtuvo una respuesta dosis-dependiente, demostrándose que a mayor concentración de PMF, menor es el número de macrófagos infectados con amastigotes. El IC_{50} obtenido fue de $0.48 \mu M$. Este resultado es bastante interesante ya que el estadio amastigote es la fase clínicamente relevante de *Leishmania*. El amastigote es quien lisa los macrófagos infectados, para posteriormente invadir otras células originando la propagación de la infección. Es importante destacar que, el IC_{50} reportado para amastigotes resultó ser 34 veces menor que el IC_{50} reportado para promastigotes.

Los macrófagos forman parte del sistema inmune y son unas de las principales células que actúan en defensa cuando hay una infección por *Leishmania*. Los promastigotes cuando son inoculados, para escapar de la respuesta inmune específica del huésped, penetran los macrófagos. La adhesión entre el parásito y los macrófagos es fundamental para la invasión de las células del huésped (Tremblay y col., 1996).

Basándonos en lo anterior, se evaluó el efecto citotóxico de la PMF sobre macrófagos J774-G8. Se determinó que este compuesto tiene una baja citotoxicidad sobre dicha línea celular, reportándose un IC_{50} de $37.47 \pm 1,04 \mu M$. El IC_{50} reportado para la célula huésped (J774-G8), resultó ser el doble que el reportado para promastigotes y 78 veces mayor que el IC_{50} reportado para amastigotes. Esto resulta ser importante y crucial ya que queda demostrado que la PMF no afecta significativamente la viabilidad de la célula hospedera, lo cual es de suma importancia para cualquier droga con propiedades leishmanicida.

Adicionalmente, también se evaluó el efecto citotóxico de la PMF sobre células de mamíferos (fibroblastos humanos). La importancia de la piel como sitio inmuno-regulatorio en las formas clásicas de leishmaniasis y la vía de señal epidermal es crucial en la determinación de la respuesta inmune relacionada al tipo de citoquinas generado contra los parásitos de *Leishmania* (Díaz y col., 2002).

El IC₅₀ reportado para fibroblastos fue de $23.60 \pm 1.07 \mu\text{M}$, muy cercano al reportada para promastigotes. Sin embargo, recordando que la fase clínicamente relevante es la fase amastigote, si comparamos el IC₅₀ registrado para fibroblastos con la reportada para amastigote, la PMF tiene un efecto muy significativo e importante y es poco tóxico en células de mamíferos.

El Ca²⁺ ha sido reconocido ampliamente como un segundo mensajero esencial en eucariotas, desde mamíferos hasta parásitos. Esto conlleva a que la regulación intracelular de éste importante catión se convierta en un blanco quimioterapéutico (Benaim y García., 2011). En todos estos parásitos, la regulación del Ca²⁺ citoplasmático se lleva a cabo por tres principales organelos: el retículo endoplasmático, la mitocondria única que está presente en estos parásitos y los acidocalcisomas, un compartimiento especial que se dedica a la acumulación de polifosfatos (Docampo y Moreno., 2001).

En consecuencia, se estudió el efecto que tiene la PMF sobre la homeóstasis del Ca²⁺ intracelular en promastigotes de *L. mexicana*. Estos parásitos se cargaron con Fura 2, fluoróforo específico para este catión, observándose que este compuesto genera un aumento en la fluorescencia, lo cual se traduce como un aumento en la

concentración del Ca^{2+} intracelular. Este experimento se realizó en presencia y en ausencia del Ca^{2+} extracelular, registrándose en ambos casos la misma respuesta, lo cual indica que el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ viene dada por la liberación de este ión desde organelos intracelulares.

Se estudió también el efecto de la PMF sobre el potencial mitocondrial. Los tripanosomatidios están caracterizados por poseer una mitocondria única gigante que ocupa hasta el 12 % del volumen total de parásito (Benaim y col. 2006) y que desempeña un papel metabólico importante (Hannaert y col., 2003). La mitocondria de este parásito posee un uniporte electroforético de Ca^{2+} en su membrana interna que utiliza la diferencia de potencial electroquímico de protones entre el espacio intramitocondrial y el citoplasma como la fuerza motriz para la acumulación de este catión (Benaim y col., 1990).

Los promastigotes de *L. mexicana* fueron cargados con rodamina 123, un fluoróforo que permite visualizar la diferencia de potencial electroquímico mitocondrial. Como se pudo observar la PMF afectó el potencial electroquímico mitocondrial. Este resultado fue corroborado cuando los parásitos fueron expuestos a FCCP, un clásico protonóforo desacoplador que disipa el gradiente mitocondrial de H^+ . En consecuencia, la PMF simula el mismo efecto que el FCCP.

Asimismo, se demostró que la PMF es capaz de alcalinizar los acidocalcisomas, organelos ácidos inusuales, involucrados en la bioenergética de estas células y en la acumulación de grandes cantidades de polifosfatos junto a

Ca^{2+} (Docampo, 2008). Los promastogotes de *L. mexicana* fueron cargados con naranja de acridina, fluoróforo que se caracteriza por acumularse en compartimientos ácidos. Como se pudo observar la PMF genera una rápida alcalinización de los acidocalcisomas de estos parásitos. Este resultado fue corroborado cuando los parásitos fueron expuestos a nigericina, el cual es un ionóforo que cataliza el intercambio electroneuro de K^+ por H^+ induciendo a la alcalinización de los acidocalcisomas.

Se observó en todos los experimentos que el efecto de la PMF luego de la adición de nigericina, aunque es de menor magnitud, resulta ser significativo. Estos resultados sugieren que la PMF es capaz de liberar naranja de acridina de otros compartimientos ácidos además de los acidocalcisomas, como pueden ser fagolisosomas, vacuolas ácidas, entre otros.

Cabe destacar que los tripanosomatideos, a diferencia de los humanos emplean el pirofosfato como moneda energética alternativa al ATP, acumulándose en mayor proporción en los acidocalcisomas, por lo que estos organelos están directamente involucrados con la bioenergética de estos organismos. Tanto estos organelos como la mitocondria están involucrados en procesos bioenergéticos fundamentales en estos parásitos y ambos están relacionados con la regulación intracelular de Ca^{2+} , funciones esenciales para la viabilidad de estos parásitos, por lo que se han convertido en blancos quimioterapéuticos (Benaim y García, 2011).

Trabajos realizados en nuestro laboratorio han demostrado mediante microscopía confocal que la amiodarona genera un colapso del gradiente electroquímico de protones, lo cual eleva los niveles de Ca^{2+} citoplasmático por la salida del catión desde la mitocondria (Benaim y col., 2006). Basándonos en esto y en los resultados obtenidos, podemos inferir que la PMF también colapsa el potencial electroquímico mitocondrial, induciendo así la salida de Ca^{2+} desde la mitocondria y los acidocalcisomas.

Como se ha mencionado anteriormente, la disrupción de la homeóstasis de Ca^{2+} intracelular resulta en un efecto letal para diferentes tripanosomatideos (Benaim y García, 2011). Los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan lo anterior, ya que la PMF afecta la viabilidad de los promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*, al mismo tiempo que afecta la homeóstasis del Ca^{2+} intracelular.

Los resultados obtenidos demuestran que la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona pudiera ser la base de un nuevo tratamiento contra la leishmaniasis. El IC_{50} la PMF para promastigotes resultó estar por encima de los valores esperados. La ventaja de este compuesto es que el IC_{50} para amastigotes resultó ser bastante bajo, además de ser poco tóxico para la célula huésped.

La PMF es un compuesto totalmente natural el cual se extrajo directamente de las hojas de *Croton caracasana*, por lo que a futuro, puede ser modificado químicamente con el fin de potenciar su efecto leishmanicida. Sería interesante

continuar con ensayos *in vivo* para determinar el futuro uso de este flavonoide como un tratamiento eficaz contra la leishmaniasis.

6. CONCLUSIONES

- La 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) ejerce un efecto inhibitorio en la proliferación de los promastigotes de *L. mexicana* con un IC_{50} 16.62 ± 1.08 μ M.
- La 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) induce un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} en los promastigotes de *L. mexicana*, el cual ocurre mediante la liberación de este ión desde organelos intracelulares.
- La 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) genera el colapso del gradiente electroquímico de protones en la mitocondria en promastigotes de *L. mexicana*.
- La 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) induce la alcalinización de los acidocalcisomas en promastigotes de *L. mexicana*.
- La 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) presenta un bajo nivel citotóxico sobre las células huésped (macrófagos J774-G8) con un IC_{50} de 37.47 ± 1.04 μ M.
- La 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) presenta un bajo nivel citotóxico sobre las células de mamíferos (fibroblastos humanos) con un IC_{50} de $23,60 \pm 1.07$ μ M.
- La 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) ejerce un efecto inhibitorio sobre amastigotes de *L. mexicana* en macrófagos infectados. La droga inhibió la proliferación de los amastigotes con un IC_{50} de $0,48$ μ M

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, D. 2011. Pharmacological Activites of Flavonoides: A review. *Int J Pharm Sci / Nanotech.* **4**:1394-98
- Aherne, S., O'Brien, N. 2002. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition.* **18**: 75-81.
- Alexander, J., Satoskar, A., Russell, D. 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci.* **112**: 2993-3002.
- Becerril, M. 2008. Parasitología Médica. Editorial Mac Graw-Gil. Segunda Edición.
- Benaim, G., Bermúdez, R., Urbina, J. 1990. Ca²⁺ transport in isolated mitochondrial vesicles from *Leishmania braziliensis* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **39**: 61-68.
- Benaim, G. 1993. Homeostasis de Ca²⁺ intracelular. La calmodulina y la Ca²⁺-ATPase de membrana plasmática de tripanosomatidios. *Acta Cient. Venez.* **44**: 57-66.
- Benaim, G. 2004. La Ca²⁺-ATPasa de la membrana plasmática como enzima clave en la homeostasis intracelular del calcio. Estimulación por etanol y otros efectores *Acta Cient. Venez.* **55**: 304-314.
- Benaim, G., Sanders J., García-Marchan, Y., Colina, C., Lira, R., Caldera, A., Payares, G., Sanoja, C., Burgos, J., Leon-Rossel A., Concepción, J.L., Schijman, A., Levin M., Oldfield, E. and Urbina, J. 2006. Amiodarone has

intrinsic anti-Trypanosoma cruzi activity and acts synergistically with posaconazole. *J. Med. Chem.* **49**: 892-899.

- Benaim, G., García C. 2011. Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishmaniasis- a review. *Trop. Biomed.* **28**: 471-81.
- Benaim, G., Hernández, V., Mujica, S., Plaza, L., Silva, M., Parra, N., García, Y., Paniz, A., Uzcanga, G. 2012. In vitro anti-Trypanosoma cruzi activity of dronedarone, a novel amiodarone derivative with an improved safety profile. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **56**: 3720-375.
- Benaim, G., Paniz, A. 2012. The emerging role of amiodarone and dronedarone in Chagas disease. *Nat. Rev. Cardiol.* **9**: 605-609.
- Benaim, G., Casanova, P., Hernández, V., Mujica, S., Parra, N., Plaza, L., Concepción, JL., Liu, YL., Oldfield, E., Paniz, A., Suárez, A. 2014. Dronedarone, an Amiodarone Analog with an Improved Anti-Leishmania mexicana Efficacy. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **58**: 2295-2303.
- Bonfante, R., Barroeta, S. 2002. *Leishmanias y Leishmaniasis en América con especial referencia a Venezuela*. Tipografía y Litografía Horizonte C.A. Barquisimeto, Venezuela. **1**: 26-38.
- Carafoli, E. 1987. Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 395- 433.
- Cárdenas R., Sandoval C. M., Rodríguez-Morales A. J., Franco-Paredes. C. 2006. Impact of climate variability in the occurrence of leishmaniasis in northeastern Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75**: 273-277.

- Cartaya, O., Reynaldo, I. 2001. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos Tropicales*. **22**: 5-14.
- Chávez, K. 2013. Fotoquímica y evaluación biológica de *Croton caracasana pittier*. Hemisíntesis y evaluación biológica de derivados del ácido de *Caracasina*. Tesis de Doctorado en Química Médica. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Chen, M., Christensen, S., Theander, T., Kharazmi, A. 1994. Antileishmanial Activity of Licochalcone A in Mice Infected with *Leishmania major* and in Hamsters Infected with *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **38**: 1339-1344.
- Croft, S., Neal, A., Pendergast, W., Chan, J. 1987. The activity of alkyl phosphocholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochem Pharmacol.* **36**: 2633-2636.
- Croft, S., Barret, P., Sundar., S. 2005. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *Brit. Med. J.* **362**: 377-38.
- Cushnie, TP, Cordero, A. J. 2005. The antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J Antimicrob. Agent.* **27**: 343-356.
- Dawit, G., Girma, Z., Simenew K. 2013. A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. *J. Pathol. Bacteriol.* **4**: 2-7.
- De Lima H., Rodríguez N., Feliciangeli M. D., Barrios M. A., Sosa A., Agrela I., Sánchez E. and López O. 2009. Cutaneous leishmaniasis due to *L. chagasi*/

L. infantum in an endemic area of Guárico state, Venezuela. *Trop. Med.* **103**: 721-726.

- De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabo, I., Rizzuto, Rosario. 2011. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature.* **476**: 336-342.
- Desjeux P. 1992. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World. Health. Stat Q.* **45**: 267-275.
- Diaz, N., Zerpa, O., Ponce, L. 2002. Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterization of the lesion. *Exp Dermatol.* **11**: 34-41.
- Docampo, R., Moreno, S. 1999. Acidocalcisome: A Novel Ca²⁺ Storage Compartment in Trypanosomatids and Apicomplexan Parasites. *Parasitol. Today.* **15**: 443-448.
- Docampo, R., Moreno, S. 2001. The acidocalcisome. *Mol. Biochem. Parasitol.* **33**:151-159.
- Docampo, R. 2008. Estructura y función de los acidocalcisomas. *Mensaje Bioquímico.* **32**: 11-23.
- Escobar P, Yardley V, Croft SL. 2001. Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), AmBisome, and sodium stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in immunodeficient scid mice. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **45**:1872-1875.

- Freyend, S. 2010. Analysis of LmxMPK4 and LmxMPK6, two mitogen-activated protein kinases of *Leishmania mexicana*. Tesis de maestría/doctorado. University of Hamburg, Germany. Consultado el 08 de enero, 2014. Disponible en: <http://www.worldcat.org/>
- Harborne J. B., Williams C. A. 2000. Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochem.* **55**: 481-504.
- Havsteen, B. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut.* **96**: 67-202.
- Kumar, B., Prasher, S., Prashant, T., Salhan, M., Sharma, P. 2011. A review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Int Pharm SI.* **1**: 25-41
- Marín, C., Boutaleb, S., Díaz, J., Huertas, O., Rosales, M., Pérez, G., Gutiérrez, R., Sánchez, M. 2009. Antileishmaniasis activity of flavonoids from *Consolida oliveriana*. *J. Nat. Prod.* **72**: 1069-1074.
- Markle, W., Makhoul, K. 2004. Cutaneous Leishmaniasis: Recognition and Treatment. *Am Fam. Physician.* **69**: 1455-1460.
- Martínez, S., J. González, J., Culebras, M., Tuñón, M. 2002. Revisión. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp.* **6**: 271-278.
- Mishra, B., Kale, R., Prasad, V., Tiwari, V., Singh, R. 2011. Scope of natural products in fighting against leishmaniasis. Department of Chemistry & Biochemistry, Faculty of Science, Banaras Hindu University Varanasi, India. 121-154. Fecha de consulta: 29 de enero del 2014. Disponible en: http://www.trnres.com/ebook/uploads/tiwari/T_1302158564Tiwari-4.pdf

- Moreno, S., Docampo, R. 2003. Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 1-6.
- OMS, 2011.
- OMS, 2013.
- Pandey, S., Suryawanshi, S., Gupta, S., Srivastava, L. 2005. Chemotherapy of Leishmaniasis part I: Synthesis and bio-evaluation of substituted arylketene dithioacetals as antileishmanial agents. *Eur. J Med. Chem.* **40**:751-756.
- Puebla, P., Guerrero, M y Correa, S. 2004. Flavonoides del Género Croton. *Rev. Col. Cienc. Duím. Farm.* **33**: 77-85.
- Pérez, G. 2003. Los Flavonoides: Antioxidantes o Prooxidantes. *Rev. Cub. Invest. Biomed.* **22**: 48-57
- Pimentel, A., Benaim, G. 2012. El Ca²⁺ y los esfingolípidos como moduladores de la apoptosis y el cáncer. *Invest. Clin.* **53**: 84-110.
- Ramírez, M., Mendoza, J., Arreola, R., Ordaz, C. 2010. Flavonoides con actividad antiprotozoaria. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* **41**: 6-21.
- Ríos, J., Sousa, O. 2010. Inmunología en la Infección por *Leishmania*: Conceptos Actuales. *Rev. Méd. Cient.* **23**: 19-31.
- Rodríguez, G., Corredor, A., Cáceres, E., Cassiano, G., Arroyo, C., Palau, M., Boshell, J. 1985. Leishmaniasis Difusa. *Biomédica.* **5**: 95-111.
- Romero, R. 2007. Microbiología y Parasitología humana. Ed. Médica Panamericana. Tercera edición. Madrid, España.

- Ruiz, F. Rodrigues, C., Docampo, R. 2001. Rapid Changes in Polyphosphate Content within Acidocalcisomes in Response to Cell Growth, Differentiation, and Environmental Stress in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Biological Chemistry*. **276**: 26114–2612.
- Ruiz JH, Becker I. 2007. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. **29**: 671–678.
- Schafer J. A., Kjesbo N. K., Gleason P. P. 2010. Dronedarone: Current Evidence and Future Questions. *Cardiovasc. Therapeut*. **28**: 38-47
- Schinor, E., Salvador, S., Furusho, E., Alfieri, S., Albuquerque, S., Dias, D. 2007. Effect of extracts and isolated compounds from *Chresta scapigera* on viability of *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Braz J Pharmacol Sci*. **43**: 295-300.
- Serrano, X., García, Y., Fernández, A., Rodríguez, N., Rojas, H., Visbal, G., Benaim, G. 2009a. Amiodarone Destabilizes Intracellular Ca²⁺ Homeostasis and Biosynthesis of Sterols in *Leishmania Mexicana*. *Antimicrob. Agentes. Ch*. **53**: 1403-1410.
- Serrano, X., Payares, G., De Lucca, M., Martínez, J., Mendoza, A., Benaim, G. 2009b. Amiodarone and Miltefosine Act Synergistically against *Leishmania mexicana* and Can Induce Parasitological Cure in a Murine Model of Cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrob. Agentes. Ch*. **53**: 5108-5113.

- Serrano, X. 2010. Quimioterapia contra la leishmaniasis: estado del arte, retos y nuevas propuestas desde Venezuela. *Estudios Transdisciplinarios*. **2**: 69-75. Fundación Instituto de Estudios Avanzados Venezuela.
- Singh, N., Mishra, B., Bajpai, S., Singh, R., Tiwari, V. 2013. Review: Natural product based leads to fight against leishmaniasis. *Bioorgan. Med. Chemother.* **22**: 18-45.
- Soto, J., Soto, P. 2006. Miltefosina oral para el tratamiento de la leishmaniasis. *Biomédica*. **26**: 207-217.
- Tasdemir, D., Kaiser, M., Brun, R., Yardley, V., Schmidt, T., Tosun, F., Ruedi, P. 2006. Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Flavonoids and Their Analogues: In Vitro, In Vivo, Structure-Activity Relationship, and Quantitative Structure-Activity Relationship Studies. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **50**: 1352-1364.
- Tiunan T, Santos A, Ueda-Nakamura T, Dias B, Nakamura C. 2011. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int J Infect Dis.* **15**:525-532.
- Tremblay M, Oliver M, Bernier R. 1996. *Leishmania* and the pathogenesis of HIV infection. *Parasitol Today.* **12**:257-61.
- Urbina J. 2006. Biología del *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania*: Potencial para la intervención quimioterapéutica. Conferencia presentada en el curso “Host-Parasite Interactions and Vector Biology, American Society for Microbiology. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela.

- Wang, Y. Z., Y. B. Chang, C. Xing, and D. Fu. 1998. The interference effects of hexadecylphosphocholine on proliferation and membrane phospholipid metabolism in human myeloid leukemia cell lines. *Int. J. Tissue React.* **20**:101–107.

Referencias Electrónicas:

- <http://revistas.concytec.gob.pe/img/revistas/dp/v14n2/a06fig07g.jpg>
(Consultado el 27 de febrero del 2014)
- <http://dpd.cdc.gov/dpdx> (Consultado el 12 de enero del 2014).
- <http://revistas.concytec.gob.pe/img/revistas/dp/v14n2/a06fig07g.jpg>
(Consultado el 27 de febrero del 2014).
- <http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites/images/WHO1.jpg> (Consultado el 27 de febrero del 2014).
- http://revistas.concytec.gob.pe/scielo.php?pid=S102917332011000100006&script=sci_arttext (Consultado el 27 de febrero del 2014).