



**UNIVERSIDAD CENTRAL
DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**Estudio del efecto del SQ109 sobre la
homeostasis intracelular del Ca^{2+} y la
viabilidad de *Leishmania mexicana***

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Bachiller Verónica Arantxa García García como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor: Dr. Gustavo Benaim


CARACAS, VENEZUELA

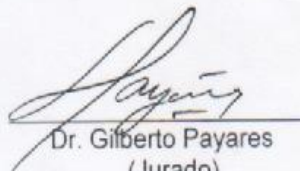
ABRIL – 2016

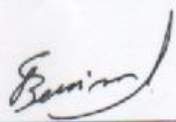
**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
DE LA Br. Verónica Arantxa García García**

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. Verónica Arantxa García García, C.I: 23.686.576, titulado "**Estudio del efecto del SQ109 sobre la homeostasis intracelular del Ca²⁺ y la viabilidad de *Leishmania mexicana***", para optar al título de Licenciado (a) en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los veintiséis días del mes de abril del año 2016, dejando constar que el Dr. Gustavo Benaim actuó como coordinador del jurado examinador.


Dra. Elizabeth Valdivieso
(Jurado)


Dr. Gilberto Payares
(Jurado)


Dr. Gustavo Benaim
(Tutor- Coordinador)

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos del Instituto de Estudios Avanzados (IDEA) y en el Laboratorio de Biofísica del Instituto de Biología Experimental (IBE). Contó con los proyectos CDCH-UCV C-03-8728-2013 y FONACIT 2011000884.

El compuesto empleado en este trabajo (SQ109) fue suministrado por el Dr. Eric Oldfield del Departamento de Química de la Universidad de Illinois, EE. UU.

A mis padres Sulay Guadalupe García y Lisandro García, por su ayuda y apoyo incondicional durante todo el curso de mi carrera.

A mi tutor Dr. Gustavo Benaim, por su disponibilidad y pedagogía.

A mis compañeras de laboratorio: Lic. Vanessa Hernández, Lic. Jessica Rodríguez, Br. Yetsenia De Gouveia y Lic. Andrea Pinto, por ayudar a realizar este Trabajo Especial de Grado.

A la Dra. Vincenza Cervino, por haber estado dispuesta a ayudar a realizar este Trabajo Especial de Grado.

A la Dra. Elizabeth Valdivieso, la Lic. Fabiola Mejías y el Lic. Carlos Torrealba quienes brindaron herramientas experimentales para la elaboración de este Trabajo Especial de Grado.

A la Dra. Cristina Sanoja y la Lic. María García, por brindar herramientas experimentales para la elaboración de este Trabajo Especial de Grado.

A la Dra. Zelandia Fermín, por suministrar macrófagos de la línea J774 utilizados en parte de los experimentos de este Trabajo Especial de Grado.

DEDICATORIA

A mis padres Sulay Guadalupe García y Lisandro García.

A mi hermano Rocco García.

RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios pertenecientes al género *Leishmania*, la cual representa un problema de salud pública a nivel mundial. Ante la falta de vacunas eficaces y de métodos efectivos de control de las poblaciones del insecto vector, la única herramienta de lucha frente a la leishmaniasis es la quimioterapia. Sin embargo, las drogas más utilizadas en Venezuela y gran parte del mundo para tratar la leishmaniasis, el glucantime, el penstostam y la miltefosina, son altamente tóxicas para los pacientes. En este sentido, el desarrollo de nuevas drogas para el tratamiento de la leishmaniasis constituye una prioridad a nivel mundial.

El SQ109 es una droga que actualmente se encuentra en fase III de ensayos clínicos para el tratamiento de la tuberculosis resistente a múltiples drogas. Veiga-Santos y col. recientemente reportaron que el SQ109 tiene efectos antiproliferativos sobre tripomastigotes, epimastigotes y amastigotes de *Trypanosoma cruzi*, demostrando además que colapsa el potencial electroquímico mitocondrial y alcaliniza los acidocalcisomas de epimastigotes de *T. cruzi*. Por esta razón, nos hemos planteado en este trabajo, determinar el efecto *in vitro* del SQ109 sobre promastigotes de *Leishmania mexicana* y sobre macrófagos infectados con amastigotes de *L. mexicana*. Además estudiamos su efecto sobre la homeostasis intracelular del Ca^{2+} . Los resultados obtenidos muestran que el SQ109 tiene un efecto dosis-dependiente sobre la viabilidad y la proliferación de promastigotes de *L. mexicana* y disminuye el porcentaje de macrófagos infectados con amastigotes de *L. mexicana*. Además disrumpe la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, colapsa el potencial electroquímico mitocondrial y alcaliniza los acidocalcisomas de promastigotes de *L. mexicana*. Todo lo anterior indica que el SQ109 puede ser considerado como una potencial droga leishmanicida.

Palabras claves: Leishmaniasis, homeostasis intracelular del Ca^{2+} , SQ109

ABREVIATURAS

[SQ109]: Concentración de SQ109.

SFB_i: Suero Fetal Bovino inactivado.

IC₅₀: Concentración inhibitoria del 50% de la población celular.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

PBS: Buffer Fosfato Salino.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

PMCA: Ca²⁺-ATPasa de la membrana plasmática (por sus siglas en inglés “plasma membrane Ca²⁺-ATPase”).

ATP: Adenosina trifosfato.

TB: Tuberculosis.

MmpL3: Proteína micobacteriana larga 3 de membrana (por sus siglas en inglés “mycobacterial membrane protein large 3”).

FCCP: Carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona.

EGTA: Ácido etilenglicol tetraacético (por sus siglas en inglés “ethylene glycol tetraacetic acid”).

CDC: Centros de Control y Prevención de Enfermedades.

WHO: Organización Mundial de la Salud (por sus siglas en inglés “World Health Organization”).

CMI: Concentración mínima inhibitoria de la población celular.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Leishmaniasis.....	1
1.1.1. Leishmaniasis en Venezuela.....	2
1.2. Tripanosomatidios.....	5
1.3. El género <i>Leishmania</i>	5
1.3.1. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp.....	6
1.4. El Ca ²⁺ en células eucariotas.....	8
1.4.1. Regulación del Ca ²⁺ en tripanosomatidios.....	9
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1. Desarrollo de vacunas contra la leishmaniasis.....	13
2.2. Quimioterapia contra la leishmaniasis.....	14
2.3. SQ109.....	19
2.3.1. SQ109 y la enfermedad de Chagas.....	21
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. Objetivos específicos.....	23
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
4.1. Materiales.....	24
4.1.1. Reactivos.....	24
4.2. Métodos.....	24
4.2.1. Cultivo de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> y curva de crecimiento.....	24
4.2.2. Infección de macrófagos de la línea celular J774 por promastigotes de <i>L. mexicana</i> (Curva de infección).....	25

4.2.3. Ensayo de citotoxicidad (MTT).....	27
4.2.4. Ensayos fluorimétricos.....	29
4.2.4.1. Determinación de la concentración de Ca ²⁺ intracelular de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	29
4.2.4.2. Determinación del potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	33
4.2.4.3. Determinación de la alcalinización de los acidocalcisomas de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	35
5. RESULTADOS	38
5.1. Efecto del SQ109 sobre la proliferación de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	38
5.2. Efecto del SQ109 sobre la viabilidad de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	40
5.3. Efecto del SQ109 sobre la viabilidad de macrófagos de la línea celular J774.....	42
5.4. Efecto del SQ109 sobre macrófagos de la línea celular J774 infectados con amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	43
5.5. Efecto del SQ109 sobre la homeostasis del Ca ²⁺ intracelular de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	45
5.6. Efecto del SQ109 el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	48
5.7. Efecto del SQ109 sobre los acidocalcisomas de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	52
6. DISCUSIÓN	55
7. CONCLUSIONES	63
8. BIBLIOGRAFÍA	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribución de la leishmaniasis cutánea en el mundo y de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea en Venezuela 1988-2007.....	3
Figura 2: Patrones clínicos de la leishmaniasis.....	4
Figura 3: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp.....	7
Figura 4: Modelo esquemático de la regulación del Ca ²⁺ en tripanosomatidios.....	12
Figura 5: Estructura molecular de drogas empleadas para el tratamiento de diferentes formas clínicas de leishmaniasis.....	16
Figura 6: Estructura molecular de la amiodarona y la dronedarona.....	19
Figura 7: Estructura molecular del etambutol y de la diamina SQ109.....	20
Figura 8: Esquema de la reducción del MTT a formazán.....	27
Figura 9: Representación esquemática de la incorporación del fura 2 a la célula.....	30
Figura 10: Espectro de la fluorescencia de excitación del fura 2 en soluciones que contienen 0–39,8 µM de Ca ²⁺ libre.....	31
Figura 11: Determinación del Ca ²⁺ intracelular mediante dos longitudes de onda (λ) de excitación.....	31
Figura 12: Estructura molecular de la rodamina 123.....	34
Figura 13: Espectro de excitación y de emisión de la rodamina 123.....	34
Figura 14: Estructura molecular de la naranja de acridina.....	36
Figura 15: Espectro de excitación y de emisión de la naranja de acridina.....	36

Figura 16: Efecto del SQ109 sobre la proliferación de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	39
Figura 17: Curva dosis-respuesta luego de 48 horas del tratamiento de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> con SQ109.....	40
Figura 18: Efecto del SQ109 sobre la viabilidad de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	41
Figura 19: Efecto del SQ109 sobre la viabilidad de macrófagos de la línea celular J774.....	42
Figura 20: Efecto del SQ109 sobre macrófagos de la línea celular J774 infectados con amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	44
Figura 21: Efecto del SQ109 sobre la homeostasis del Ca ²⁺ intracelular de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	46
Figura 22: Incremento porcentual de la relación de fluorescencia 340/380 nm al añadir 10 µM de SQ109 a promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	47
Figura 23: Efecto del SQ109 sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	49
Figura 24: Efecto de concentraciones crecientes de SQ109 sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	51
Figura 25: Efecto del SQ109 sobre los acidocalcisomas de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	53
Figura 26: Efecto de concentraciones crecientes de SQ109 sobre los acidocalcisomas de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	54

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios pertenecientes al género *Leishmania*. Es transmitida al ser humano por la picadura de flebótomos (De Lima y col., 2010), y menos frecuentemente mediante transmisión congénita y parenteral (transfusión de sangre, jeringas compartidas y accidentes de laboratorio) (Herwaldt, 1999). Se mantiene en la naturaleza por al menos 100 especies de mamíferos que actúan como potenciales reservorios del parásito (De Lima y col., 2010).

La leishmaniasis es una enfermedad prevalente en 98 países, 3 territorios y 5 continentes (figura 1A) y afecta principalmente a las poblaciones más pobres del mundo. Se estiman unos 1,3 millones de casos nuevos y 57.000 muertes al año debido a esta parasitosis. Unos 300.000 casos corresponden a la leishmaniasis visceral y 1 millón a la forma cutánea (WHO, 2013).

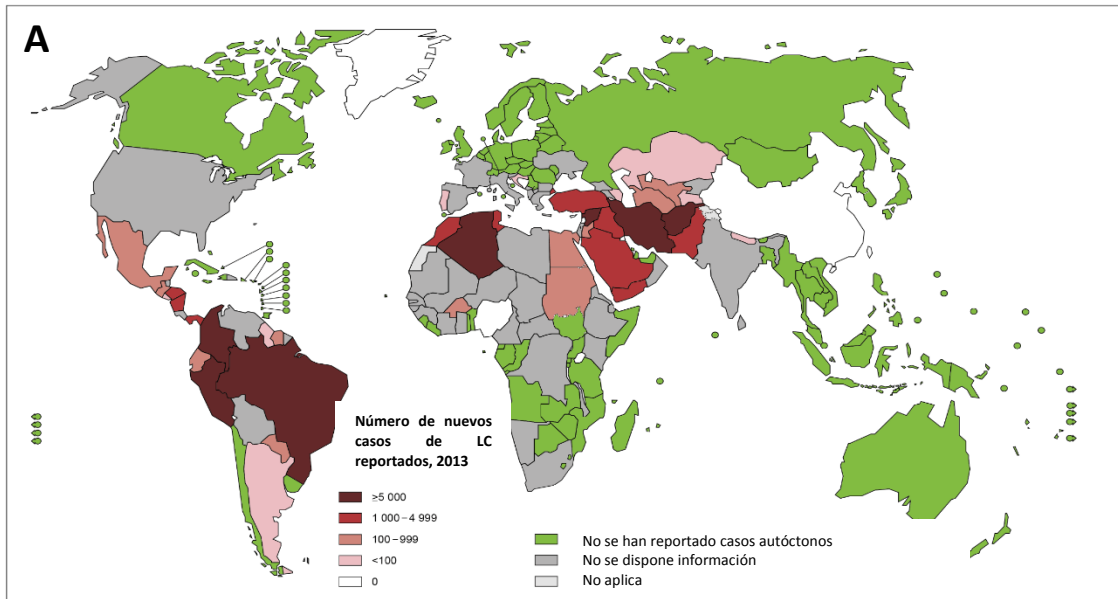
La amplia variedad de especies de *Leishmania* responsables de la leishmaniasis (más de 20 especies que infectan al hombre), combinada con los mecanismos inmunes del hospedador, resulta en un amplio espectro de manifestaciones clínicas (Silva-Jardim y col., 2014). La forma más común de la enfermedad es la leishmaniasis cutánea, la cual causa úlceras en zonas expuestas del cuerpo, produciendo cicatrices permanentes y desfiguraciones (WHO, 2013). Se consideran dos cuadros clínicos cutáneos: leishmaniasis cutánea localizada (LCL) (figura 2A), generalmente circunscrita al sitio de inoculación gracias a una respuesta inmunitaria protectora, y leishmaniasis cutánea difusa (LCD) (figura 2B), caracterizada por una pobre respuesta inmunitaria, que permite la diseminación del parásito por el líquido tisular, la linfa o la vía sanguínea, con desarrollo de lesiones nodulares en toda la piel (Becerril, 2011). Por otro lado, la leishmaniasis visceral (figura 2D),

forma fatal de la enfermedad debido a que afecta órganos vitales del cuerpo, como son el hígado, el vaso y la médula ósea, se caracteriza porque el paciente presenta fiebre, pérdida de peso, esplenomegalia y hepatomegalia, además de anemia. La leishmaniasis mucocutánea (figura 2C), es la forma más destructiva de la enfermedad, causando mutilación parcial o total de las membranas mucosas de la nariz, boca y garganta. Generalmente se desencadena luego de que aparecen las lesiones cutáneas (WHO, 2013).

1.1.1. Leishmaniasis en Venezuela

En 1984 el Instituto Nacional de Dermatología de Venezuela, encargado de llevar los registros de leishmaniasis, obtiene su sede propia y se transforma en el Instituto de Biomedicina. Con esto mejoró de forma notable el registro de casos. Sin embargo, se mantiene un subregistro importante por diversas razones: 1) Persistencia de áreas endémicas sin acceso o con dificultad de acceso a los servicios de salud; 2) Fallas en el sistema de registro de casos; y 3) Un número significativo de casos que son diagnosticados y tratados por servicios médicos o centros de investigaciones ajenos al programa de control que no son reportados (De Lima y col., 2010).

El registro nacional de leishmaniasis reporta un total de 64.843 casos de leishmaniasis cutánea para el lapso comprendido entre 1970 y 2007. En la figura 1B se muestra la distribución de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea en Venezuela para el período 1988-2007. (De Lima y col., 2010).



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2015. All rights reserved.

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization

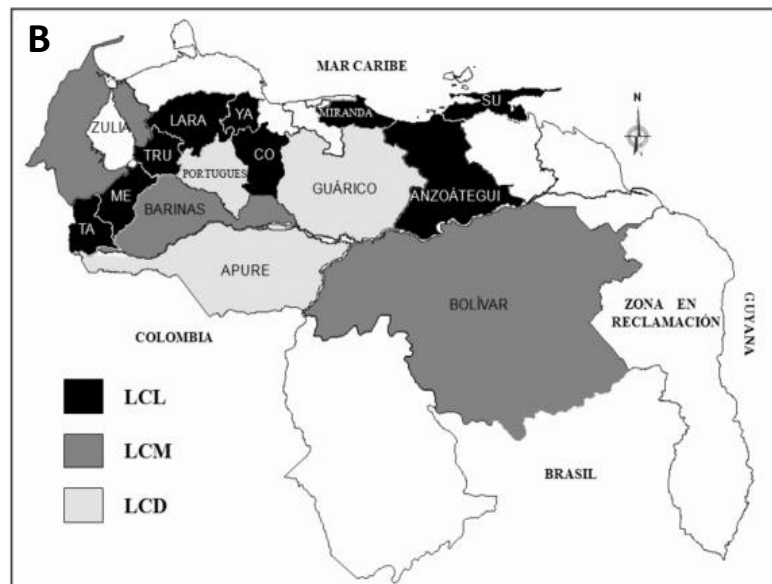


Figura 1: (A) Distribución mundial de la leishmaniasis cutánea, 2013. Tomado de: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_CL_2013.png (Consulta: 24 de mayo de 2015). **(B) Distribución de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea en Venezuela, 1988-2007.** Tomado de De Lima y col., 2010. LC: leishmaniasis cutánea; LCL: leishmaniasis cutánea localizada; LCM: leishmaniasis mucocutánea; LCD: leishmaniasis cutánea difusa; CO: Cojedes; ME: Mérida; SU: Sucre; TA: Táchira; TRU: Trujillo; YA: Yaracuy.



Figura 2: Patrones clínicos de la leishmaniasis. (A) Leishmaniasis cutánea localizada. Tomado de: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/disease.html> (Consulta: 24 de mayo de 2015). (B) Leishmaniasis cutánea difusa. Tomado de Zerpa y Convit, 2009. (C) Leishmaniasis mucocutánea. Tomado de Montenegro-Idrogo y col., 2014. (D) Leishmaniasis visceral. Tomado de: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/disease.html> (Consulta: 24 de mayo de 2015).

Los vectores más frecuentes observados en Venezuela para el año 2002 fueron *Lutzomyia (Lu.) ovallesi*, *Lu. gomezi* y *Lu. panamensis*. Los agentes etiológicos de la leishmaniasis cutánea en el país son *L. mexicana* y *L. braziliensis*, siendo su principal reservorio varias especies de ratones salvajes (Serrano-Martín, 2010).

1.2. Tripanosomatidios

La familia Trypanosomatidae pertenece al Reino: Protista; Subreino: Protozoa, en donde se agrupan organismos eucariotas unicelulares que carecen de pared celular (Madigan y col., 2004); Phylum: Sarcomastigophora; Subphylum: Mastigophora, agrupa organismos que se caracterizan por la presencia de uno o más flagelos en la forma extracelular del parásito; Clase: Zoomastigophorea; Orden: Kinetoplastida, al cual pertenecen organismos que se caracterizan por la presencia de una única mitocondria que ocupa aproximadamente el 12% del volumen celular y posee gran cantidad de ADN, que forma una estructura denominada kinetoplasto, la cual puede ser visible utilizando un microscopio óptico (Gallego, 2006).

Además de la existencia del kinetoplasto, los tripanosomatidios se caracterizan por la posesión de un único flagelo, que puede estar formando el borde de una membrana ondulante o ser libre en toda su longitud (en la fase extracelular del parásito) y que desaparece externamente cuando viven como parásitos intracelulares. Los géneros representativos de esta familia son *Trypanosoma* y *Leishmania*, ambos con un ciclo de vida heteroxeno, con dos hospedadores: vertebrados (hombre y mamíferos reservorio) e invertebrados (insectos dípteros) (Gallego, 2006).

1.3. El género *Leishmania*

La *Leishmania* sp. es un protozoo flagelado intracelular obligatorio que infecta macrófagos y células dendríticas de la piel y vísceras de humanos y diversos mamíferos. Es el agente etiológico de la leishmaniasis, la cual es transmitida por la picadura de la hembra hematófaga de flebótomo, pequeños dípteros del género *Lutzomyia* en América y *Phlebotomus* en Europa, Asia y África (Becerril, 2011).

Leishmania sp. posee características morfológicas y moleculares diferentes, según sea el hospedador (figura 3). En el intestino del vector invertebrado, el parásito se encuentra en forma de promastigote móvil, mide entre 12 y 20 μm y contiene un flagelo anteronuclear que se origina en el cuerpo basal y se sitúa por delante del kinetoplasto. En el hospedador vertebrado, el parásito se transforma en amastigote de localización intracelular, flagelo corto (no libre) y forma redonda, con diámetro de 2,5 a 3,5 μm (Becerril, 2011). Cabe destacar que la forma clínicamente relevante del parásito es la de amastigote, la cual sobrevive y se divide dentro de la vacuola parasitófora de los macrófagos, en un pH ácido de 4,5 a 5,0, debido a que es el causante directo de todos los síntomas de la leishmaniasis, por lo que sería conveniente que cualquier quimioterapia alternativa contra la enfermedad se base en la eliminación de este estadio del parásito (Serrano-Martín, 2010).

Por otro lado, este género se divide en dos subgéneros de acuerdo al sitio de desarrollo en el vector transmisor: *Leishmania* (*Leishmania* (L)) (al cual pertenece *Leishmania mexicana*, agente etiológico de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea), desarrollo en el área suprapilórica (cerca de la proboscis) y *Leishmania* (*Viannia* (V)), desarrollo en el área próxima al intestino medio y posterior (Becerril, 2011).

1.3.1. Ciclo de vida de *Leishmania* sp.

Ciclo de vida (figura 3): Etapas en el humano: 1) El flebótomo ingiere sangre de una persona sana e inyecta los promastigotes metacíclicos a través de la piel; 2) Estos promastigotes son fagocitados por macrófagos; 3) Allí se transforman en amastigotes, los cuales se multiplican dentro de las células (macrófagos y de varios tejidos), lo que causa la lisis de las mismas (4). Esto provoca la liberación de amastigotes que pueden infectar células adyacentes. Etapas en el vector: 5) y 6) El flebótomo ingiere sangre junto con

macrófagos infectados con amastigotes de una persona infectada; 7) Los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos en el intestino medio del vector (CDC, 2013); 8) Los promastigotes procíclicos se dividen y sufren una transición de la forma procíclica no infecciosa de rápida división a la forma infecciosa de promastigote metacíclico (proceso denominado metaciclogénesis, (Davis y col., 2005)), los cuales migran a la proboscis, donde estarán disponibles para ser inoculados al nuevo hospedador mamífero, en la siguiente ingesta de sangre (CDC, 2013).

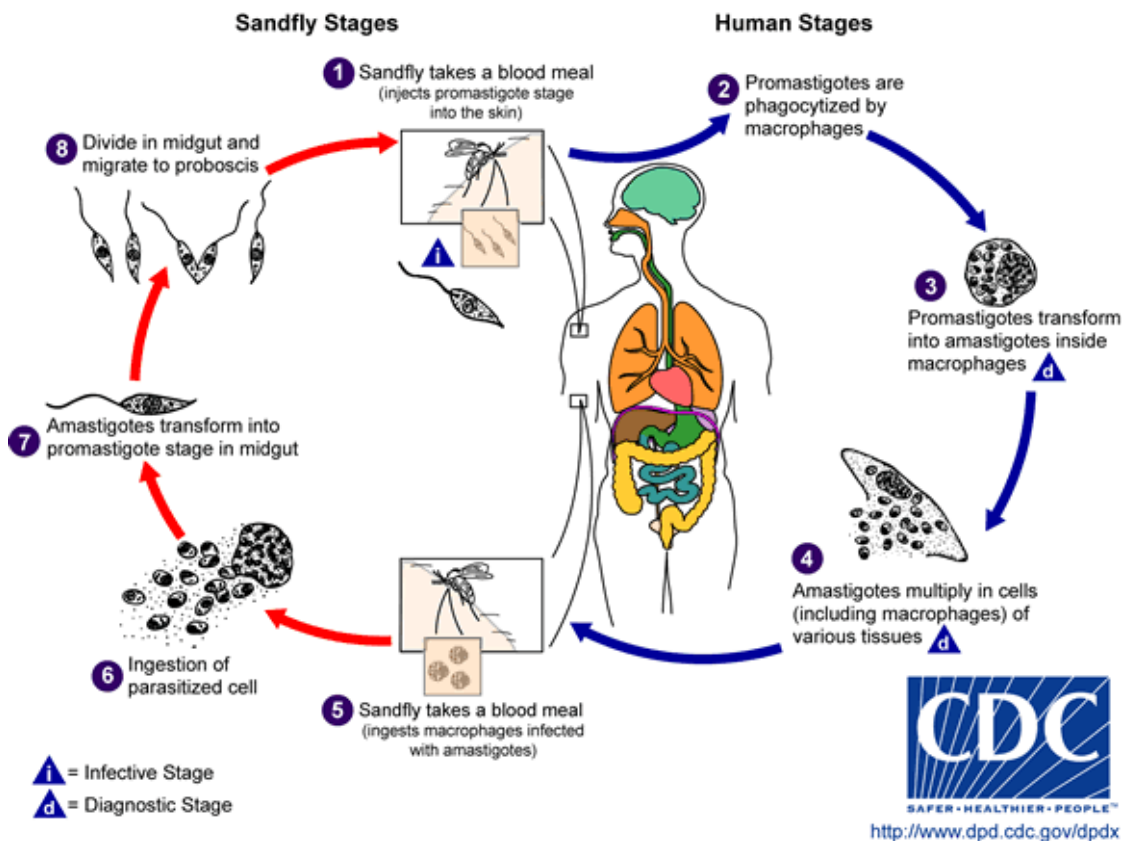


Figura 3: Ciclo de vida de *Leishmania* sp. Infective Stage: estadio infeccioso; Diagnostic Stage: estadio de diagnóstico. Tomado de: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html> (Consulta: 24 de mayo de 2015).

1.4. El Ca^{2+} en células eucariotas

El Ca^{2+} ha sido ampliamente reconocido como un mensajero esencial en todos los eucariotas, desde protozoarios hasta mamíferos. Este ion controla una gran variedad de procesos, como son: división y diferenciación celular, secreción, contracción muscular, metabolismo energético, entre otros (Carafoli y Penniston, 1985). Específicamente, en tripanosomatidios, el Ca^{2+} interviene en el movimiento flagelar, el ensamblaje de microtúbulos, la diferenciación celular, la invasión celular de promastigotes de *L. donovani* y tripomastigotes de *T. cruzi*, entre otros procesos (Benaim y García, 2011; Docampo y Moreno, 1996). Para que el Ca^{2+} actúe de mensajero intracelular debe unirse con gran afinidad y especificidad a una proteína efectora (diana), la cual regula su concentración intracelular y controla sus efectos; y para ello la concentración de este mensajero debe sufrir oscilaciones, alterando así el número de moléculas diana afectadas (Carafoli y Penniston, 1985).

Se distinguen dos clases de proteínas capaces de formar complejos con el Ca^{2+} : 1) Proteínas incorporadas en las membranas de las células, que se localizan tanto en la membrana plasmática como en las membranas de organelos intracelulares: retículo endoplasmático, mitocondria y acidocalcisoma. Ellas gobiernan el paso del Ca^{2+} al citoplasma e interior de organelos intracelulares (y en sentido inverso) y controlan la concentración de Ca^{2+} intracelular, manteniéndola en niveles bajos, lo cual permite disponer de un mensajero intracelular de bajo costo energético, debido a que deben transportarse a través de las membranas (con el uso de energía) sólo unos pocos iones Ca^{2+} para que su concentración intracelular incremente significativamente; y 2) Proteínas solubles en el citoplasma e interior de organelos (Carafoli y Penniston, 1985).

Las células eucariotas en general mantienen una concentración citosólica de Ca^{2+} libre muy reducida (alrededor de 100 nM) en presencia de una concentración extracelular

de Ca^{2+} mucho mayor (1-2 mM) (Alberts y col., 2010). Por ejemplo, los tripanosomatidios son capaces de mantener una concentración citosólica de Ca^{2+} de aproximadamente 50 nM, mucho menor que la concentración de Ca^{2+} extracelular (que está en el orden mM) (Benaim y Romero, 1990). Este hecho implica la presencia de diferentes mecanismos que permiten mantener dicho gradiente de concentración (Benaim y col., 1993a).

1.4.1. Regulación del Ca^{2+} en tripanosomatidios

En tripanosomatidios, así como en todas las células eucariotas, el Ca^{2+} intracelular está finamente regulado, lo cual está garantizado por la presencia de diferentes mecanismos de transporte, algunos de ellos localizados en organelos intracelulares y otros en la membrana plasmática (Benaim y col., 1993a). La disrupción de la homeostasis del Ca^{2+} en cualquier célula, usualmente tiene efectos letales que conducen a la muerte celular mediante apoptosis o necrosis (Zhivotovsky y Orrenius, 2011). Por ejemplo, la elevación sostenida de la concentración de Ca^{2+} citosólica causada por sustancias tóxicas resulta en alteraciones de la función de la mitocondria y la activación de varias enzimas catabólicas dependientes de Ca^{2+} , como las fosfolipasas, proteasas, endonucleasas, entre otras, que contribuyen con la muerte celular (Docampo y Vercesi, 1989). De forma que esto sugiere que la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en estos parásitos es una estrategia prometedora como blanco de nuevas drogas (Benaim y García, 2011).

Como se observa en la figura 4, tres organelos contribuyen con la regulación del Ca^{2+} intracelular en tripanosomatidios: 1) Un único mitocondrion, compartimiento con baja afinidad por el Ca^{2+} , pero con gran capacidad para acumular este ion (Docampo y Vercesi, 1989), el cual presenta un intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ o $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ que dirige el intercambio electroneutro de Ca^{2+} interno por H^+ o Na^+ externo, respectivamente (Benaim y García,

2011). Por otro lado, se reportó que este organelo posee en su membrana interna un uniportador electroforético de Ca^{2+} , que permite la entrada de este ion a la matriz mitocondrial. En este sistema, la fuerza que dirige la acumulación de Ca^{2+} en la mitocondria es el gradiente electroquímico de H^+ a través de la membrana mitocondrial interna (Benaim y col, 1990; Benaim y Cervino, 2000). Cabe destacar que el mantenimiento del potencial transmembrana mitocondrial es esencial para la supervivencia de las células, ya que dirige la síntesis de ATP y mantiene la fosforilación oxidativa (Mukherjee y col., 2002); 2) Un retículo endoplasmático, compartimiento intracelular con alta afinidad por el Ca^{2+} , pero con baja capacidad para acumular este ion, que presenta una Ca^{2+} -ATPasa en su membrana, la cual permite la acumulación del catión en este organelo (Benaim y García, 2011). A su vez presenta un canal de Ca^{2+} que dirige la salida de este ion del retículo endoplasmático al citoplasma (Benaim y col., 1993a); 3) Un compartimiento ácido (denominado acidocalcisoma) en donde se acumula una gran cantidad de Ca^{2+} (Vercesi y col., 1994). Este organelo presenta en su membrana una bomba de tipo vacuolar que transloca H^+ (V-H^+ -ATPasa), permitiendo la acidificación de este compartimiento; un intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ que permite el co-transporte de ambos iones al interior del acidocalcisoma; un canal de Ca^{2+} involucrado en la salida de este ion del acidocalcisoma al citoplasma y una Ca^{2+} -ATPasa (tipo PMCA) que dirige la entrada de Ca^{2+} a este organelo. La mayoría del Ca^{2+} en los acidocalcisomas está unido a polifosfatos y puede ser liberado por la alcalinización de este compartimiento o por la hidrólisis de polifosfatos (Moreno y Docampo, 2003). La función de los acidocalcisomas se ha asociado a la osmorregulación y regulación del pH, debido a que la fusión de estos compartimientos al complejo de la vacuola contráctil, lo cual conduce a la traslocación de la acuaporina presente en la membrana de los acidocalcisomas y al correspondiente movimiento de agua, es responsable de la recuperación del volumen celular y en *T. brucei* se demostró que al inhibir la H^+ -ATPasa presente en la membrana de los acidocalcisomas resulta en una menor capacidad de estos parásitos para adaptarse al

estrés de pH ambiental, respectivamente (Docampo, 2008). Adicionalmente este organelo está asociado a la bioenergética del parásito, ya que constituye un depósito de polifosfato y pirofosfato, que son una fuente alternativa de energía en estos parásitos e incluso más abundantes que el ATP (Benaim y García, 2011). Los acidocalcisomas son un blanco potencial para la quimioterapia de enfermedades causadas por parásitos protozoarios, no sólo porque poseen enzimas involucradas en la síntesis y degradación de polifosfatos que están ausentes o que son distintas a su contraparte en mamíferos, sino debido a sus características acídicas, lo cual permite que se acumulen drogas básicas en este compartimiento, incrementando potencialmente su toxicidad (Docampo y Moreno, 2008).

Todos los sistemas de transporte mencionados están presentes en organelos intracelulares y están limitados por su capacidad como compartimientos. Por lo que ellos son capaces de regular la concentración de Ca^{2+} intracelular a corto plazo (Benaim y col., 1993a). Es por esto que vías de flujo de entrada y salida de Ca^{2+} en la membrana plasmática son determinantes para el mantenimiento de la concentración de este ion a largo plazo (Benaim y col., 1993b). Los tripanosomatidios poseen una Ca^{2+} -ATPasa (PMCA) en su membrana plasmática, distinta a aquellas presentes en organelos intracelulares, que es capaz de bombear este catión fuera de la célula (Benaim y García, 2011). Esta bomba, dependiente de Mg^{2+} , transporta Ca^{2+} acoplado a la hidrólisis de ATP y es estimulada por la Calmodulina (Benaim y col., 1993a). Hasta la fecha no se ha reportado la presencia de una bomba $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en la membrana plasmática de tripanosomatidios, lo que indica que la PMCA es el único mecanismo para el eflujo de Ca^{2+} (Benaim y col., 1993b). Por otro lado, en la membrana plasmática de *Leishmania mexicana*, se reportó un canal de Ca^{2+} similar al canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje tipo L, presente en muchos tipos de células excitables como células musculares, endocrinas y neuronas, que permite la entrada de este ion al citoplasma a favor de su gradiente de concentración, generando cambios en la

concentración citosólica de Ca^{2+} . Su singularidad es que es estimulada por el esfingolípido esfingosina (Benaim y col., 2013).

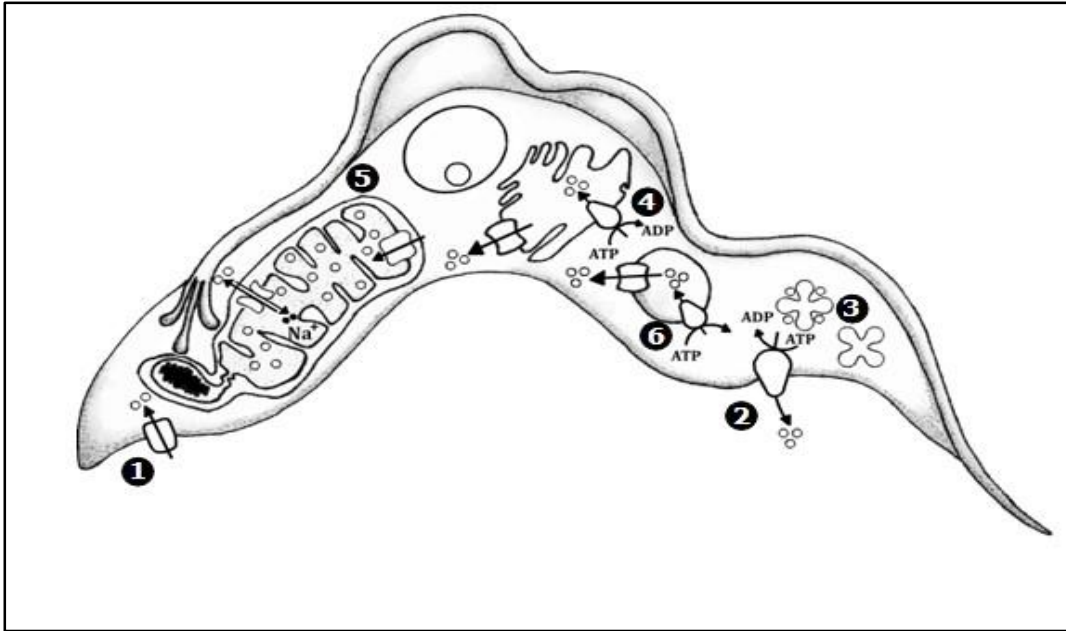


Figura 4: Modelo esquemático de la regulación del Ca^{2+} en tripanosomatidios. El Ca^{2+} entra a la célula a través de un canal de Ca^{2+} (1), y es transportado fuera de la célula por una bomba de Ca^{2+} en la membrana plasmática (PMCA) (2) que es estimulada por la calmodulina (CaM) luego de la unión al Ca^{2+} (3). Dentro de la célula, el Ca^{2+} puede ser secuestrado con alta afinidad por el retículo endoplasmático a través de una bomba de Ca^{2+} diferente a la anterior (4). Un gran mitocondrion (5) puede transportar Ca^{2+} con baja afinidad, mediante un uniporte electroforético mitocondrial de Ca^{2+} . Finalmente, los acidocalcisomas (6) pueden acumular grandes cantidades de Ca^{2+} mediante una Ca^{2+} -ATPasa (tipo PMCA), facilitado por la gran cantidad de polifosfatos presentes dentro de este organelo. Tomado de Benaim y García, 2011.

2. ANTECEDENTES

2.1. Desarrollo de vacunas contra la leishmaniasis

El primer acercamiento para la obtención de un tipo activo de inmunización frente a la leishmaniasis consistía en la inoculación de parásitos vivos o extractos de tejidos procedentes de lesiones cutáneas, dando origen al término “leishmanización”. Sin embargo, la observación de efectos secundarios, incluyendo el desarrollo de lesiones persistentes por tiempo prolongado, psoriasis e inmunosupresión, llevó a la discontinuación de la “leishmanización” en varios países (Dunning, 2009).

Otras aproximaciones para la inmunización frente a la leishmaniasis son (Dunning, 2009): 1) La inoculación de parásitos *Leishmania* sp. atenuados o fracciones de ellos, lo cual confiere escasa protección debido a que durante el proceso de atenuación se destruyen varias proteínas del parásito; 2) La inoculación de subfracciones derivadas de promastigotes de *Leishmania* sp., que no son viables en términos de estandarización, purificación y producción en masa; y 3) Las vacunas basadas en ADN, que están limitadas a proteínas basadas en antígenos. Estas presentan baja inmunogenicidad y hay un procesamiento atípico de las proteínas del parásito (Khan, 2013).

El Dr. Jacinto Convit creó una vacuna contra la leishmaniasis cutánea localizada, basada en una mezcla de promastigotes de *Leishmania braziliensis* muertos y Bacilos de Calmette-Guerin (BCG) atenuados (Convit y col., 1986). Sin embargo, al autoclavar el parásito disminuye la inmunogenicidad del mismo debido a que se destruyen la mayoría de sus proteínas. Por lo que a pesar de ofrecer una alternativa más segura y estable que la vacunación con parásitos vivos, la vacunación con *Leishmania* sp. muerta no es igual a la infección natural y a la vez es menos inmunogénica (Dunning, 2009).

Ante la falta de vacunas eficaces y de métodos efectivos de control de las poblaciones del insecto vector, la única herramienta de lucha frente a la leishmaniasis es la quimioterapia.

2.2. Quimioterapia contra la leishmaniasis

La droga de primera línea utilizada en Venezuela y en gran parte del mundo para tratar la leishmaniasis sigue siendo la misma desde hace más de 60 años: un fármaco altamente tóxico para los pacientes, llamado glucantime (antimoniato de meglumina) (figura 5A), el cual pertenece al grupo de los antimoniales pentavalentes, junto con el estibogluconato de sodio (pentostam) (figura 5B) (Pandey y col., 2005). Estas drogas se comenzaron a emplear en la década de 1940 para el tratamiento de las diversas formas clínicas de leishmaniasis (Soto y Soto, 2006). Sin embargo, ambos medicamentos generan diversos efectos secundarios a nivel renal, cardíaco y hepático, entre los cuales destacan mialgia, pancreatitis, arritmia cardíaca y hepatitis (Pandey y col., 2005). Por otro lado, algunos pacientes no responden al tratamiento y las distintas especies de *Leishmania* presentan diversos grados de susceptibilidad a la droga (Alvar, 1997; Davis y Kedzierski, 2005). Por lo que surgió una segunda línea de tratamiento que incluye drogas como la anfotericina B y la pentamidina (figura 5A). Estas se caracterizan por su alta eficacia, pero son costosas y causan graves efectos secundarios (Davis y Kedzierski, 2005). La pentamidina (diamidina), una droga introducida en 1952 para el tratamiento de la leishmaniasis visceral y de la leishmaniasis cutánea (Croft y Coombs, 2003), es un compuesto que se acumula en la mitocondria del parásito inhibiendo la topoisomerasa mitocondrial I y afectando el potencial de membrana mitocondrial (Basselin y col., 2002; Croft y col., 2006). En nuestro laboratorio se demostró que la pentamidina es capaz de inhibir selectivamente la Ca²⁺-ATPasa de la membrana plasmática de *Trypanosoma brucei*,

sin afectar la enzima homóloga humana, disruptiendo la homeostasis del Ca^{2+} intracelular (Benaim y col., 1993b). Esta droga es menos tóxica que los antimoniales pentavalentes pero causa hipoglicemia, diabetes, nefrotoxicidad y dolor en el sitio de inyección (Pandey y col., 2005). Por otro lado, la anfotericina B (antibiótico poliénico), un antifúngico que desde 1959 se emplea como terapia intravenosa contra infecciones fúngicas y que en 1960 se comenzó a utilizar en la India para el tratamiento de la leishmaniasis visceral resistente a antimoniales (Sbaraglini y col., 2016), interactúa con los esteroides de la membrana produciendo una estructura que da lugar a un poro, lo que origina una permeabilidad alterada, causando la fuga de componentes citoplasmáticos vitales y la muerte celular (Ghannoum y Rice, 1999). Esta muestra mejor respuesta en casos de resistencia a antimoniales y diamidinas, pero es tóxica, causa nefrotoxicidad, anemia y fiebre (Pandey y col., 2005). En las últimas décadas, se han desarrollado varias formulaciones lipídicas de la anfotericina B que reducen su toxicidad e incrementan su hidrofobicidad. Una de estas formulaciones es la incorporación de la droga en liposomas artificiales, bajo el nombre comercial de Ambisone®, obteniéndose un éxito sorprendente. No obstante, el costo de esta combinación es muy elevado, lo cual ha conllevado a un uso muy restringido en los países más pobres, que son justamente los más afectados por esta dolencia (Croft y Coombs, 2003).

Por otro lado, la paromomicina (figura 5A), antibiótico aminoglucósido que en 1960 se identificó como agente leishmanicida y se ha usado en ensayos clínicos para el tratamiento de la leishmaniasis visceral (vía parenteral) y de la leishmaniasis cutánea (vía tópica y parenteral) (Croft y col., 2006), se une al ribosoma, lo que inhibe el proceso de transducción proteica e induce errores de lectura (Fernandez y col., 2011). Sin embargo, presenta baja biodisponibilidad oral, por lo que debe ser inyectada intramuscularmente los 21 días que dura el tratamiento (16-20 mg/kg/día) (Croft y col., 2006), y además produce

diversos efectos secundarios como son nauseas, diarrea, vómito y dolor abdominal (Sbaraglini y col., 2016).

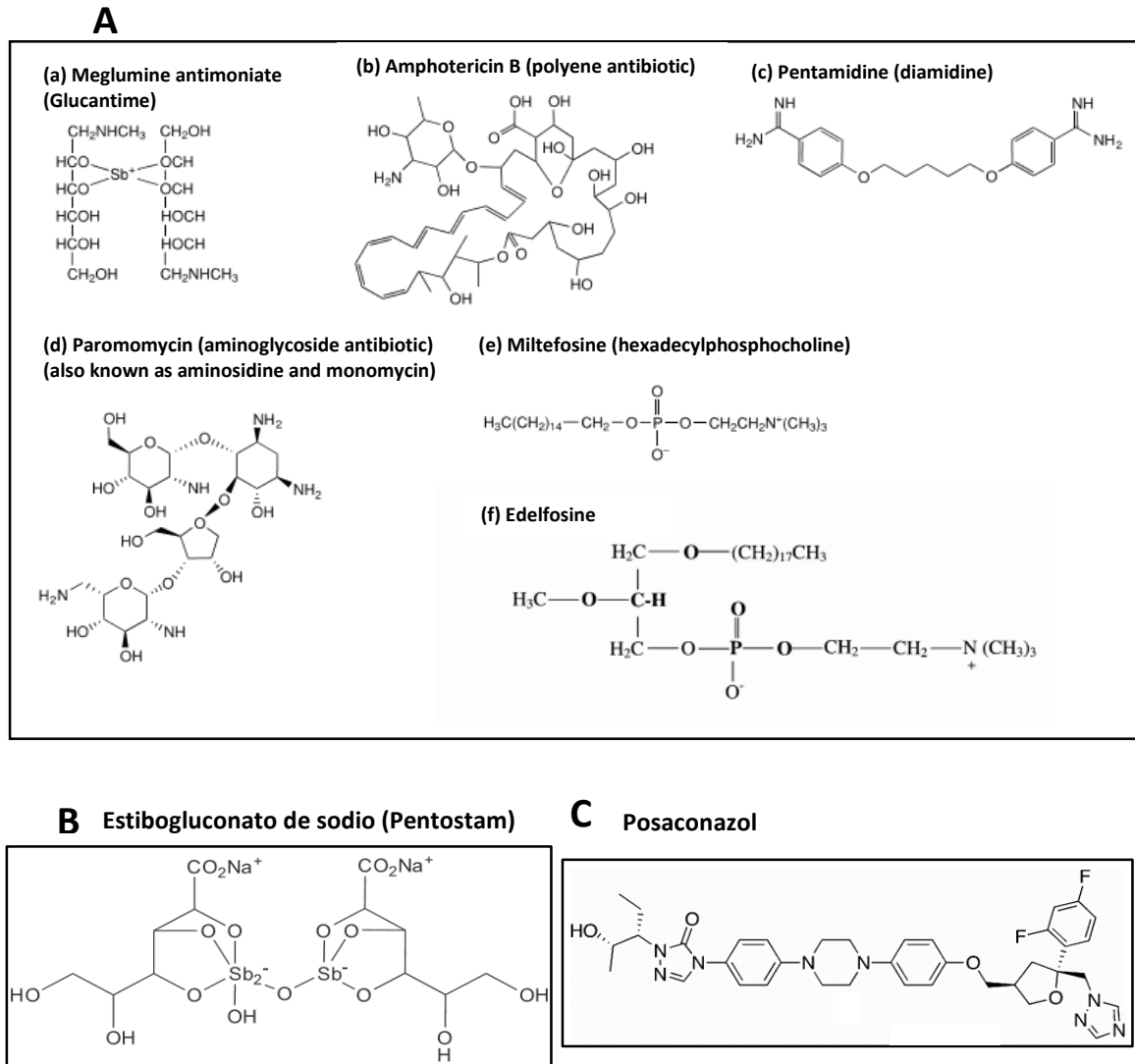


Figura 5: Estructura molecular de drogas empleadas para el tratamiento de diferentes formas clínicas de leishmaniasis. (A) Antimoniato de meglumina (Glucantime); b) Anfotericina B (antibiótico poliénico); c) Pentamidina (diamidina); d) Paromomicina (antibiótico aminoglucósido) (también conocido como aminosidina o monomicina); e) Miltefosina (hexadecilfosfocolina). Tomado de Croft y Coombs, 2003; f) Edelfosina. Tomado de Croft y col. 2003. (B) Estibogluconato de sodio (pentostam). Tomado de Silva-Jardim y col., 2014. (C) Posaconazol. Tomado de Benaim y col., 2006.

Actualmente ha surgido una alternativa para el tratamiento de la leishmaniasis: la miltefosina (figura 5A). Dicho compuesto fue creado en 1978 por Hansjoerg Eibl, del Instituto Max Planck de Biofísica Química en Catinga, Alemania, para el tratamiento del cáncer de mama (Eibl y Unger, 1990), quien sugirió reemplazar el esqueleto central del glicerol de la edelfosina (figura 5A) por una cadena alquil simple, dando lugar a la miltefosina. La actividad leishmanicida de esta droga se descubrió a mediados de 1980 (Croft y Coombs, 2003). Aunque originalmente se definió su mecanismo de acción como un inhibidor de la síntesis de la fosfatidilcolina (fosfolípido esencial de la membrana de muchos tipos celulares y fuente de muchas moléculas de señalización intracelular) (Urbina, 2006; Lux y col., 2000), se ha demostrado que este compuesto (2,5 μM) también disrumpe la homeostasis del Ca^{2+} intracelular de *Leishmania mexicana* al inducir un incremento de la concentración de este ion mediante la activación de un canal de Ca^{2+} presente en la membrana plasmática. Esto último se sugiere debido a que el efecto de la miltefosina sólo se observa en presencia de Ca^{2+} externo (Serrano-Martín y col., 2009b). La miltefosina es activa por vía oral y es el mayor avance en la batalla contra la leishmaniasis; sin embargo, su alta teratogenicidad y desarrollo de resistencia han limitado bastante su uso (Serrano-Martín, 2010).

Los azoles como el ketaconazol, itraconazol, posaconazol y fluconazol, son antifúngicos que bloquean la síntesis de ergosteroles en *Leishmania* sp., mediante la inhibición de la enzima C14 α -demetilasa (Davis y Kedziersk, 2005). Estos parásitos, al igual que los hongos, presentan en sus membranas ergosterol en lugar de colesterol. Los esteroides son componentes esenciales de la membrana plasmática, reguladores de las propiedades físicas de la membrana, como la permeabilidad y la fluidez y juegan un rol esencial en el metabolismo aeróbico y la regulación del ciclo celular. Es por esto, que el bloqueo de la biosíntesis de estas moléculas causa la muerte de estos organismos. El

ketaconazol, fluconazol e itraconazol tienen potente actividad *in vitro* pero no tienen actividad *in vivo* en modelos animales infectados con *Leishmania* sp. Por esta razón, se desarrollaron nuevos azoles y el posaconazol (figura 5C) demostró ser el más potente y eficaz contra *T. cruzi* (Urbina y col., 1998) y *Leishmania* sp. (Buckner y Urbina, 2012); esta droga es mejor que la anfotericina B reduciendo las lesiones cutáneas, pero es menos eficaz para el tratamiento de la leishmaniasis visceral en el modelo murino (Davis y Kedziersk, 2005).

En nuestro laboratorio (2006) se reportó que la amiodarona (figura 6), un antiarrítmico ampliamente utilizado para el tratamiento de pacientes con mal de Chagas que presentan cardiomiopatía chagásica, tiene efecto tripanocida a través de la interrupción de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en epimastigotes y amastigotes intracelulares de *T. cruzi* (Benaim y col., 2006) y promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. mexicana*, como consecuencia de la liberación de este catión de organelos intracelulares (mitocondria y acidocalcisoma) y adicionalmente inhibe la biosíntesis de esteroides en *T. cruzi* y *L. mexicana* a través de la inhibición de la oxidoescualeno ciclasa y de la escualeno epoxidasa, respectivamente. Por otro lado, se demostró que la amiodarona colapsa parcialmente el potencial electroquímico mitocondrial y alcaliniza parcialmente los acidocalcisomas de promastigotes *L. mexicana*, observándose un efecto posterior del FCCP ($2\ \mu\text{M}$) (protonóforo que disipa el potencial de membrana mediante la permeabilización de la membrana mitocondrial interna a H^+ (Serrano-Martín y col., 2009a)), y de la nigericina ($2\ \mu\text{M}$) (ionóforo que cataliza el cambio electroneutro global de K^+ por H^+ (Nicholls, 1987), provocando la alcalinización de los acidocalcisomas), respectivamente (Benaim y col., 2012; Benaim y col., 2014). A pesar de que esta droga ha sido ampliamente utilizada en humanos, la presencia de un 2,5-diiodofenil en su estructura, la cual ha estado asociada con efectos secundarios no deseados relacionados a una toxicidad tiroidea, hace que su uso

prolongado como antiarrítmico sea una dificultad terapéutica. Por este motivo se sintetizó la dronedarona (figura 6), un derivado de la amiodarona, en la cual se reemplaza la estructura 2,5-diiodofenil con un grupo fenil sustituto y se incorpora un grupo metil sulfonil, lo cual permitió la reducción de la toxicidad tiroidea, así como la alta lipofilicidad de la droga parental. La dronedarona también afecta la viabilidad de epimastigotes y amastigotes intracelulares de *T. cruzi* (Benaim y col., 2012) y de promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. mexicana*, al afectar la homeostasis del Ca^{2+} intracelular del parásito como consecuencia de la liberación de este ion de organelos intracelulares (mitocondria y acidocalcisoma). A su vez, colapsa parcialmente el potencial electroquímico mitocondrial y alcaliniza parcialmente los acidocalcisomas de promastigotes de *L. mexicana*, de una forma mucho más rápida que la amiodarona. Igualmente inhibe la oxidoescualeno ciclasa de *L. mexicana* (Benaim y col., 2014).

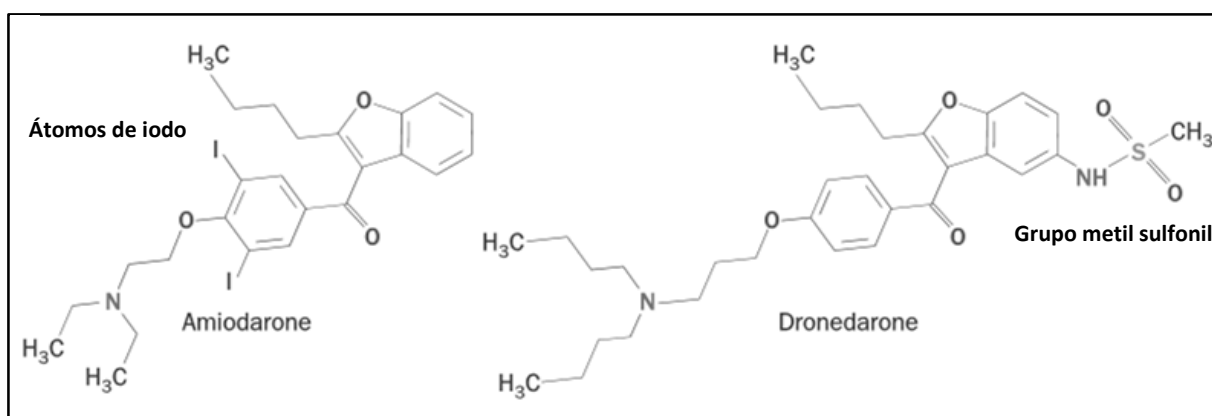


Figura 6: Estructura molecular de la amiodarona (Amiodarone) y la dronedarona (Dronedarone). Tomado de Benaim y Paniz-Mondolfi, 2012.

2.3. SQ109

Basado en el núcleo 1,2-etilendiamina del etambutol (figura 7) (antibiótico sintético de moderada eficacia contra *Mycobacterium tuberculosis*, que inhibe la biosíntesis del

arabinogalactano (componente de la pared celular de la bacteria), empleado para el tratamiento oral de la Tuberculosis (TB) susceptible (Stehr y col., 2014)), se sintetizaron más de 60.000 análogos los cuales se ensayaron contra *M. tuberculosis in vitro* (Lee y col., 2003). De todos estos, el más potente resultó ser el SQ109 (N-geranil-N'-(2-adamantil)etano-1,2-diamina) (figura 7) (Protopopova y col., 2005), el cual tiene como blanco la proteína micobacteriana larga 3 de membrana (MmpL3, por sus siglas en inglés “mycobacterial membrane protein large 3”), un transportador de trehalosa monomicolato que se emplea en la biosíntesis de la pared celular de *M. tuberculosis* (Tahlan y col., 2012).

En estudios *in vitro* se demostró que el SQ109 es activo contra *M. tuberculosis* resistente al etambutol. Por lo que a pesar de ser análoga de esta droga, el SQ109 tiene un mecanismo de acción diferente y se puede considerar como una nueva droga (Sacksteder y col., 2012).

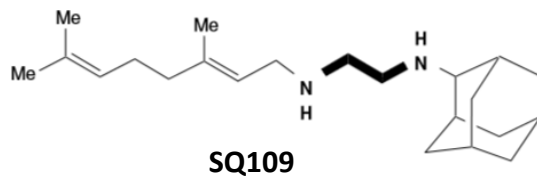
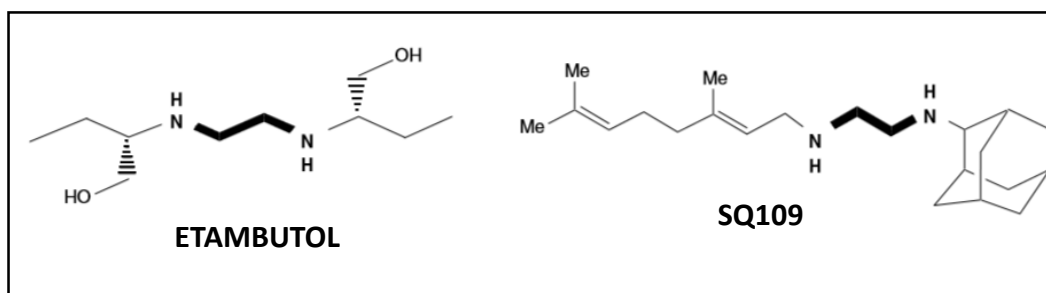


Figura 7: Estructura molecular del etambutol y del SQ109. Tomado de Jia y col., 2005.

Estudios preclínicos demostraron que la administración oral de SQ109 en ratones infectados con *M. tuberculosis* resultó en reducciones dosis-dependientes de la carga bacteriana en la vesícula y los pulmones sin la aparición de efectos secundarios (Jia y col., 2005). Los ensayos clínicos en fase I, realizados en voluntarios sanos, demostraron que el SQ109 no solo es seguro, sino que también es tolerable en dosis orales de hasta 300 mg/kg/día por 14 días (Engohang-Ndong, 2012). Por otro lado, los niveles de SQ109 en el plasma de estos pacientes fueron bajos, indicando que esta droga se distribuye rápida y

ampliamente a los tejidos (como son los pulmones y la vesícula) luego de la administración oral (Sacksteder y col., 2012). Los ensayos clínicos en fase II demostraron que el SQ109 actúa sinérgicamente con la rifampicina y la isoniacida (drogas de primera línea, empleadas para el tratamiento de la TB), y presenta un efecto aditivo cuando se combina con la estreptomicina. En esta fase se concluyó además que el SQ109, a una dosis de 300 mg/kg/día por 14 días, es segura cuando se administra con o sin rifampicina en pacientes con TB susceptible (Heinrich y col., 2015). El SQ109 se encuentra actualmente en ensayos clínicos en fase III, con pacientes que padecen TB (cepas resistentes a múltiples drogas) (Sacksteder y col., 2012).

Debido a que el SQ109 posee actividad contra otros organismos como la bacteria *Helicobacter pylori* y la levadura *Candida albicans*, los cuales no poseen el gen MmpL3, se sugirió que esta droga debía poseer otros blancos de acción en estos organismos y posiblemente en *M. tuberculosis*. Recientemente se reportó que el SQ109 tiene como blanco enzimas involucradas en el transporte de electrones, inhibiendo la respiración y la biosíntesis de ATP, y a su vez colapsa el gradiente de pH y el potencial electroquímico de membrana usado por la ATPasa para la síntesis de ATP (Li y col., 2014).

2.3.1. SQ109 y la enfermedad de Chagas

Recientemente se reportó (Veiga-Santos y col., 2015) que el SQ109 tiene actividad anti-*T. cruzi* (agente etiológico de la enfermedad de Chagas), actuando sobre todas las formas del parásito: tripomastigotes, epimastigotes e incluso la forma clínicamente relevante que son los amastigotes intracelulares, causando cambios ultraestructurales en todas ellas. El SQ109 inhibe la escualeno sintasa de *T. cruzi*, una enzima clave involucrada en la síntesis de ergosteroles del parásito y tiene un efecto dosis-dependiente sobre la

supervivencia de tripomastigotes, epimastigotes y amastigotes de *T. cruzi*, con un IC₅₀ de 50 nM, 4,6 μM y 1,2 μM, respectivamente (Veiga-Santos y col., 2015).

Por otro lado, se reportó que el SQ109 (10 μM) colapsa parcialmente el potencial de membrana mitocondrial de epimastigotes de *T. cruzi*, observándose un efecto posterior del FCCP (8 μM). Adicionalmente, en nuestro laboratorio reportamos que el SQ109 (10 μM) causa una liberación rápida del indicador naranja de acridina de compartimientos intracelulares, un efecto que se refuerza por la adición posterior de nigericina (2 μM), lo cual indica que el SQ109 alcaliniza parcialmente los acidocalcisomas de epimastigotes de *T. cruzi*. Sin embargo, se observó que el SQ109 (10 μM) causa la liberación de naranja de acridina luego de añadir nigericina (2 μM), por lo que se sugiere que esta droga puede estar actuando sobre otros compartimientos acídicos en los cuales se acumula este fluoróforo (Veiga-Santos y col., 2015).

3. OBETIVOS

Se planteó como objetivo general de este trabajo determinar el efecto del N-geranil-N'-(2-adamantil)etano-1,2-diamina (SQ109) sobre promastigotes de *Leishmania mexicana* y sobre macrófagos infectados con amastigotes de *Leishmania mexicana*, así como su efecto sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, el potencial electroquímico mitocondrial y los acidocalcisomas de promastigotes de *Leishmania mexicana*.

3.1. Objetivos específicos

- Determinar el efecto del SQ109 sobre la viabilidad de promastigotes de *Leishmania mexicana*.
- Determinar el efecto del SQ109 sobre la proliferación de promastigotes de *Leishmania mexicana*.
- Estudiar el efecto del SQ109 sobre la viabilidad de macrófagos de la línea celular J774.
- Estudiar el efecto del SQ109 sobre macrófagos de la línea celular J774 infectados con amastigotes de *Leishmania mexicana*.
- Evaluar el efecto del SQ109 sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular de promastigotes de *Leishmania mexicana*.
- Evaluar el efecto del SQ109 sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *Leishmania mexicana*.
- Evaluar el efecto del SQ109 sobre los acidocalcisomas de promastigotes de *Leishmania mexicana*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

4.1.1. Reactivos

Las soluciones y medios de cultivo de parásitos y macrófagos (medio *Liver Infusion Tryptose* (LIT) y *Dulbecco's Minimal Essential Medium* (DMEM), respectivamente) fueron preparados con reactivos adquiridos de SIGMA (Misuri, EE. UU.), BIO-RAD y GibcoBRL (Maryland, EE. UU.). Los fluoróforos fura 2-AM, rodamina 123 y naranja de acridina fueron obtenidos de Molecular Probes (Oregón, EE. UU.). La digitonina, el EGTA, el FCCP, la nigericina y el DMSO fueron obtenidos de SIGMA (Misuri, EE. UU.). El N-geranil-N'-(2-adamantil)etano-1,2-diamina (SQ109) fue suministrado por el Dr. Eric Oldfield del Departamento de Química, Universidad de Illinois, EE. UU. Esta droga se disolvió en DMSO. La concentración máxima de este vehículo nunca fue mayor a 0,1 %.

4.2. Métodos

4.2.1. Cultivo de promastigotes de *Leishmania mexicana* y curva de crecimiento

Los parásitos utilizados para todos los experimentos fueron *Leishmania mexicana*, cepa Bel 21.

Los promastigotes de *Leishmania mexicana* fueron cultivados a temperatura ambiente en medio LIT (triptosa, extracto de levadura, extracto de hígado, glucosa, NaCl, KCl, Na₂HPO₄) suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado (SFB_i) y 1% de penicilina/streptomina, en frascos tipo "T25".

La curva de crecimiento de promastigotes de *Leishmania mexicana* (Modificado de Benaim y col., 2014), se elaboró a través del crecimiento de los parásitos en presencia de concentraciones crecientes de SQ109 (0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 y 10 μM), cada una de las cuales se realizó por triplicado. Se tomó un inóculo inicial de 1.000.000 parásitos/mL, el cual se sembró en tubos de ensayo con 2 mL de medio LIT suplementado con 5% de SFB_i y 1% de penicilina/streptomicina y se procedió a agregar a cada tubo 10 μL de las diferentes concentraciones de SQ109, incluyendo un control al cual no se le agregó la droga. La proliferación celular se determinó diariamente mediante el conteo directo en cámara de Neubauer, hasta que se alcanzó la fase estacionaria del cultivo. Se procedió luego a construir una curva de crecimiento dosis-respuesta y a determinar el IC₅₀ empleando el programa Prisma GraphPad 5.0, el cual establece dicho valor mediante una regresión no lineal y el análisis de la curva sigmoidea del porcentaje de inhibición de la proliferación en función del logaritmo de la concentración de SQ109.

4.2.2. Infección de macrófagos de la línea celular J774 por promastigotes de *Leishmania mexicana* (Curva de infección)

Se utilizó la línea celular de macrófagos J774 (procedentes de linfoma de ratón BALB/c (Ralph y Col., 1975)), los cuales se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de SFB_i y mantenido a 37°C y 7% CO₂.

La infección de los macrófagos de la línea celular J774 por promastigotes de *Leishmania mexicana* se llevó a cabo de la siguiente manera (Modificado de Benaim y col., 2014):

- En placas de 12 pozos se colocó un vidrio cubreobjeto/pozo y se agregó 15.000 macrófagos/cubreobjeto en medio DMEM suplementado con 10% de SFB. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C y 7% CO₂.
- Se agregó en cada pozo 10 parásitos/célula y se incubó las placas durante 2 horas.
- Se procedió a agregar medio DMEM fresco en cada pozo con las concentraciones de SQ109 (2, 5, 10, 20, 50, 200, 500 y 1000 nM), cada una de las cuales se realizó por triplicado. Se incubaron las placas a 37°C y 7% CO₂ durante 48 horas.
- Se realizó dos lavados con PBS 1X, se fijó las células a los vidrios cubreobjetos con metanol 100% y se dejó secar por unos minutos. El metanol es un fijador que deshidrata el tejido al alterar los enlaces hidrofílicos/hidrofóbicos de las proteínas (y otras macromoléculas), modificando su estructura terciaria y cuaternaria y precipitándolas (Montuenga y col., 2009). Luego las células fijadas se tiñeron con Giemsa, diluido 2/3 en agua destilada, por 6 segundos y se utilizó ácido acético al 0,1% para aclarar y ajustar el color. El colorante Giemsa es una mezcla de colorantes compuesta de azul de metileno (básico) y eosina (ácido) (Cruz-Reyes y Camargo-Camargo, 2001).
- Una vez teñidas las células, se procedió a realizar el conteo del número de células infectadas bajo un microscopio de luz, empleando el objetivo de inmersión (100X). Se contó un total de 100 macrófagos/cubreobjeto.
- Para este ensayo se utilizó un control de macrófagos con promastigotes de *Leishmania mexicana* sin droga

- Con el conteo obtenido a las 48 horas luego de agregada la droga, se procedió a elaborar una curva que expresa el porcentaje de macrófagos infectados en relación a cada concentración de SQ109 empleada.

4.2.3. Ensayo de citotoxicidad (MTT)

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT de color amarillo a cristales de Formazán (púrpura) impermeables a la célula, realizado por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa de células metabólicamente activas (Figura 8). Se usa luego una solución para disolver el producto insoluble morado (formazán), obteniéndose una solución coloreada. La cantidad de células metabólicamente activas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Ferrari y col., 1990).

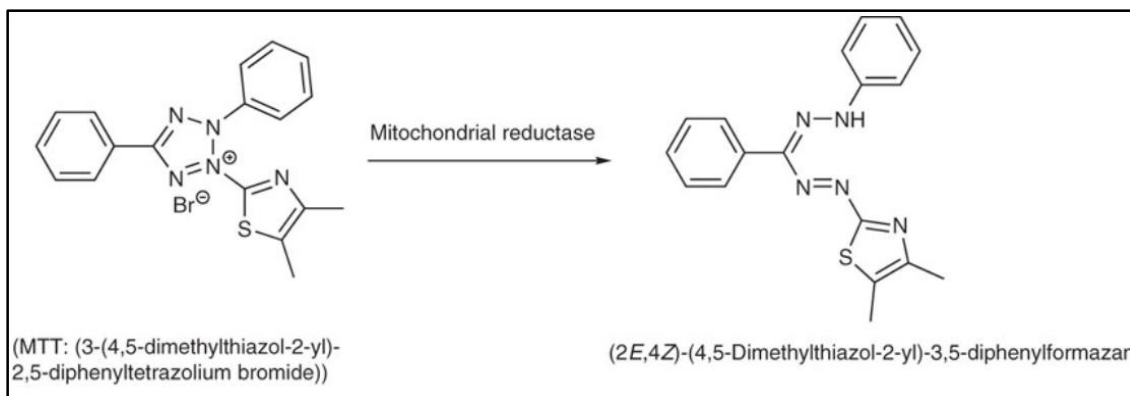


Figura 8: Esquema de la reducción del MTT a Formazán. Reductasa mitocondrial (Mitochondrial reductase); MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio; Formazán: (2E,4Z)-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenil formazán. Tomado de Ebada y col., 2008.

El ensayo de citotoxicidad (MTT) con promastigotes de *Leishmania mexicana* se llevó a cabo de la siguiente manera (Modificado de Muelas-Serrano y col., 2000):

- En placas de 96 pozos se colocó 500.000 parásitos/pozo. Luego se agregó distintas concentraciones de SQ109 (0.2, 0.5, 1, 2, 5 y 10 μ M), cada una de las cuales se realizó por cuadruplicado. La placa se incubó por 72 horas.
- Se utilizaron dos controles: control de parásitos sin droga y como control positivo miltefosina (15 μ M).
- La placa se centrifugó a 1.600xg por 20 min a 4°C y se colocó MTT (0,5 mg/mL diluido en PBS 1X) en cada pozo. Luego se incubó en oscuridad a 37°C por 3 horas.
- Posteriormente, la placa se centrifugó a 1.600xg por 10 min a 20°C y se agregó DMSO a cada pozo. Se midió la absorbancia con un espectrofotómetro ELISA a 570 nm y se determinó el IC₅₀ con el programa Prisma GraphPad 5.0.

El ensayo de citotoxicidad (MTT) con macrófagos de la línea celular J774 se llevó a cabo de la siguiente manera (Modificado de Twentyman y Luscombe, 1987):

- En placas de 96 pozos se colocó 5.000 macrófagos/pozo y distintas concentraciones de SQ109 (0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 y 50 μ M), cada una de las cuales se realizó por cuadruplicado. La placa se incubó a 37°C y 7% CO₂ durante 72 horas.
- Se agregó MTT a cada pozo (0,5 mg/mL diluido en PBS 1X). Luego la placa se incubó en oscuridad a 37°C y 7% CO₂ por 3 horas.
- Se utilizaron dos controles: un control de macrófagos sin droga y un control con Tritón-X-100 (0,1%).
- Posteriormente, se retiró el MTT y se agregó DMSO a cada pozo. Se midió la absorbancia con un espectrofotómetro ELISA a 570 nm y se determinó el IC₅₀ con el programa Prisma GraphPad 5.0.

4.2.4. Ensayos fluorimétricos

4.2.4.1. Determinación de la concentración de Ca^{2+} intracelular de promastigotes de *Leishmania mexicana*

Para la determinación de la concentración de Ca^{2+} intracelular de promastigotes de *Leishmania mexicana* se realizaron mediciones fluorimétricas, utilizando un fluoróforo específico para este catión, fura 2. Este fluoróforo se utilizó en su forma acetoximetil éster (AM), el cual es permeable y puede ser cargado pasivamente en la célula, donde es clivado a un producto impermeable por esterasas intracelulares (Figura 9), cuyos grupos carboxilos libres tornan la molécula no lipofílica, la cual no puede cruzar las membranas celulares y además es sensible al Ca^{2+} (Hangland, 2002).

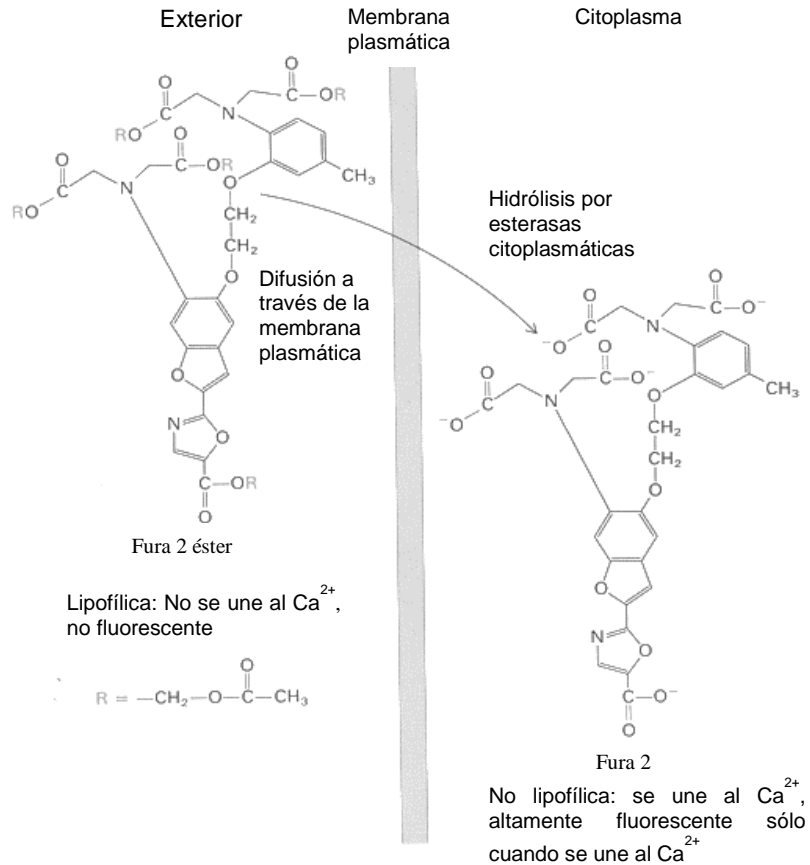


Figura 9: Representación esquemática de la incorporación del fura 2 a la célula. Tomado de Hangland, 2002.

Luego de la unión al Ca^{2+} , el fura 2 exhibe un cambio de absorción que puede ser observado escaneando el espectro de excitación entre 300 y 400 nm, a la vez que se monitorea la emisión a 510 nm (figura 10) (Hangland, 2002). Para poder llevar a cabo esto se empleó un espectrofluorímetro (figura 11) que posee un “chopper”, el cual permite dividir el haz de luz incidente en dos longitudes de onda de excitación del fura 2, 340 y 380 nm, que corresponde con la longitud de excitación del fura 2 unido al Ca^{2+} y del fura 2 no unido al Ca^{2+} , respectivamente, las cuales posteriormente se combinan e inciden sobre la muestra.

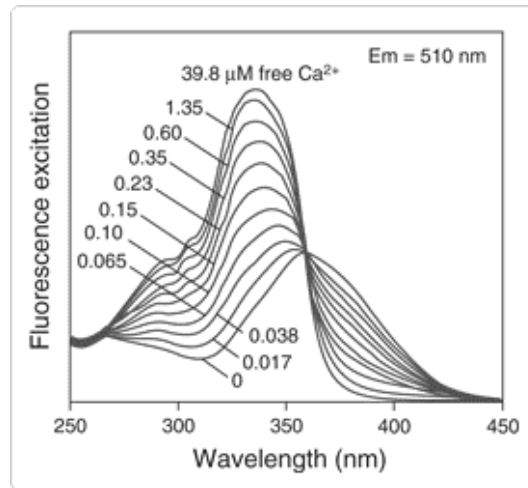


Figura 10: Espectro de la fluorescencia de excitación del fura 2 en soluciones que contienen 0-39,8 μM de Ca^{2+} libre. Se representa la fluorescencia de excitación (Fluorescence excitation) en función de la longitud de onda (wavelength). Free Ca^{2+} : Ca^{2+} libre; Em: longitud de onda de emisión. Tomado de Hangland, 2002.

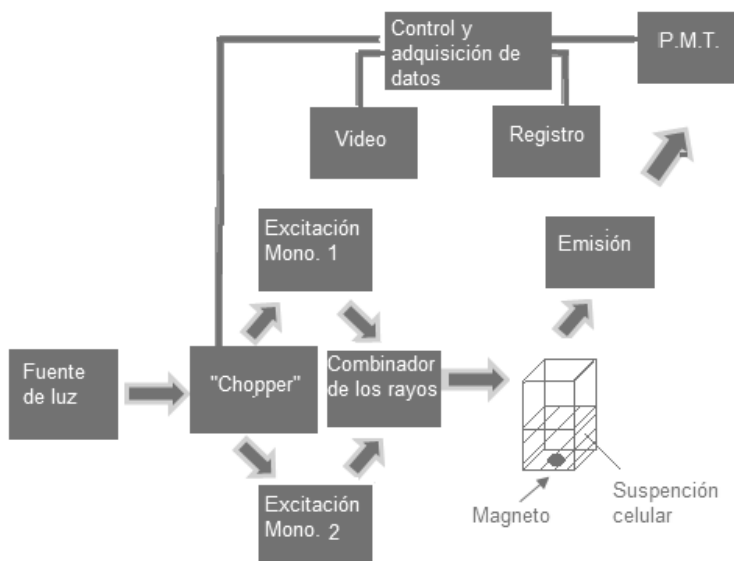


Figura 11: Determinación del Ca^{2+} intracelular mediante dos longitudes de onda de excitación. P.M.T.: fotomultiplicador.

Para la carga de promastigotes de *Leishmania mexicana* con fura 2-AM se procedió de la siguiente manera (Modificado de Benaim y col., 2014):

- Se colocó parásitos *Leishmania mexicana* en tubos de centrífuga "eppendorf" de y se centrifugó a 600xg por 2,5 min. Luego se resuspendió el sedimento en Buffer Tyrode Ca^{2+} (NaCl 145 mM, KCl 4 mM, MgCl_2 2 mM, CaCl_2 1,8 mM, HEPES 10 mM, Glucosa 11 mM, pH 7,4). Este procedimiento se repitió dos veces. En el último lavado se agregó fura 2-AM 1 μM , probenecid 2,4 mM y ácido plurónico 0,025%. El probenecid es un inhibidor del transportador aniónico de la membrana plasmática de los parásitos y su uso reduce la pérdida de la sonda fluorescente, mientras que el ácido plurónico es un detergente de baja toxicidad que se utiliza para impedir la formación de micelas y facilitar así la carga de las células con el fura 2-AM.
- Los tubos "eppendorf" se incubaron a 29°C por 3 horas, en agitación continua.
- Luego se realizaron dos lavados con Buffer Tyrode Ca^{2+} y se agregó en cada lavado probenecid 2,4 mM.
- Se colocó la solución de uno de los tubos "eppendorf" en una cubeta rectangular de cuarzo y luego en el espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55, con agitación constante y temperatura controlada a 29°C.
- Se agregó distintos efectores (SQ109 10 μM , Digitonina 40 μM y EGTA 8 mM), con el uso de una jeringa "Hamilton", y se observó la variación de la concentración de Ca^{2+} intracelular. La digitonina induce un incremento en la fluorescencia ligado a la permeabilización de la membrana plasmática al Ca^{2+} y al fura 2 (Docampo y Vercesi, 1989) y el EGTA es un quelante del Ca^{2+} (sustancia que forma complejos con el Ca^{2+}) remanente en el medio.

- El experimento anterior también se realizó empleando buffer Tyrode sin Ca²⁺ (NaCl 145 mM, KCl 4 mM, MgCl₂ 2 mM, HEPES 10 mM, Glucosa 11 mM) y en presencia de 8 mM de EGTA.

La ecuación propuesta por Grynkiewicz y col. (1985) muestra que la relación 340/380 nm es directamente proporcional a la concentración de Ca²⁺ intracelular:

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

Donde R es la relación de fluorescencia de excitación del fura 2 a 340/380 nm, K_d la constante de afinidad del Fura 2 por el Ca²⁺ (224 nm), R_{min} el valor más bajo de la relación de fluorescencia de excitación del fura 2 a 340/380 nm en ausencia de Ca²⁺ (luego de añadir 8 mM de EGTA), R_{max} el mayor valor de la relación de fluorescencia de excitación del fura 2 a 340/380 nm en presencia de exceso de Ca²⁺ (luego de añadir digitonina (40 μM)), F_{min} el mayor valor de fluorescencia del fura 2 cuando es excitado a 380 nm luego de añadir EGTA, F_{max} el menor valor de fluorescencia del fura 2 cuando es excitado a 380 nm luego de añadir digitonina.

4.2.4.2. Determinación del potencial electroquímico mitocondrial promastigotes de *Leishmania mexicana*

Con el objeto de determinar el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *Leishmania mexicana* se realizaron mediciones fluorimétricas utilizando el fluoróforo rodamina 123 (figura 12). La rodamina 123 es un fluoróforo catiónico, verde fluorescente, permeable a la célula. Se acumula en la mitocondria estrictamente de acuerdo al potencial de membrana mitocondrial (Benaim y col., 2006) y tiene picos de excitación y emisión a 488 y 530 nm, respectivamente (figura 13) (Serrano-Martín y col., 2009a).

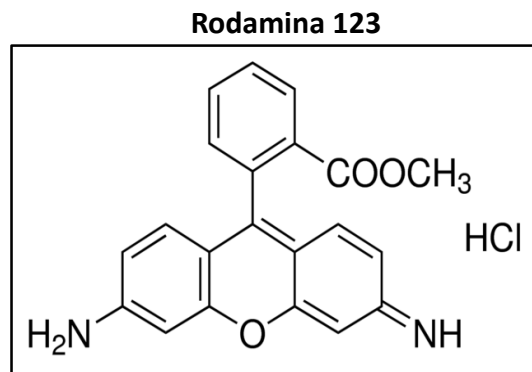


Figura 12: Estructura molecular de la rodamina 123. Tomado de <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r8004?lang=es®ion=AR> (Consulta: 14 de marzo de 2016).

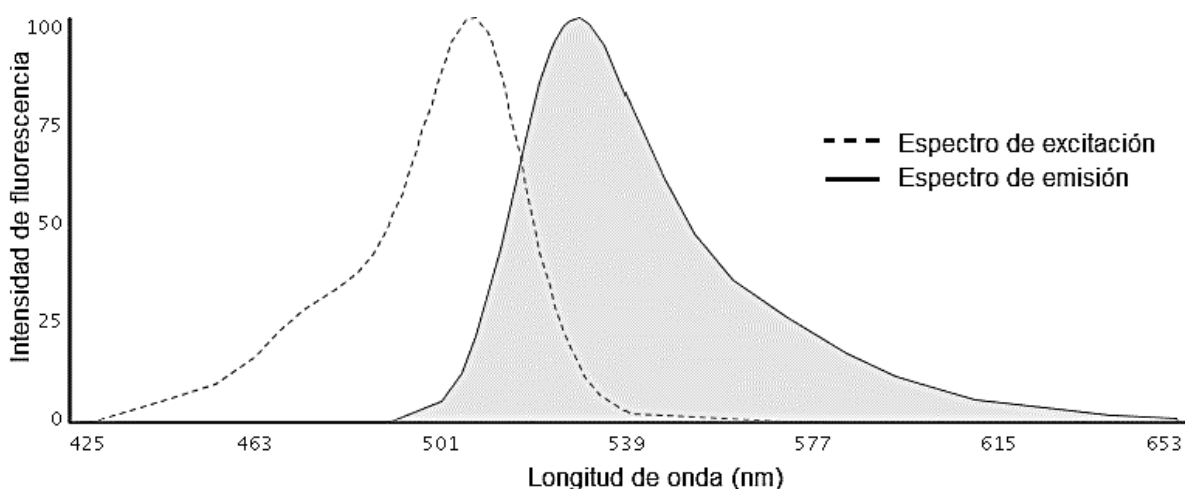


Figura 13: Espectro de excitación y de emisión de la rodamina 123. La curva izquierda, con un pico a 488 nm, representa el espectro de excitación y la curva derecha, con un pico a 530 nm, representa el espectro de emisión de la rodamina 123. Tomado de: <https://www.thermofisher.com/ve/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?ICID=svtool&UID=302moh> (Consulta: 5 de abril 2016).

Para la carga de promastigotes de *Leishmania mexicana* con rodamina 123 se procedió de la siguiente manera (Modificado de Benaim y col., 2014):

- Se colocó parásitos *Leishmania mexicana* en tubos de centrifuga "eppendorf" y se centrifugó a 600xg por 2,5 min. Luego se resuspendió el sedimento en Buffer de carga de naranja de acridina y rodamina 123 (KCl 130 mM, MgCl₂ 1 mM, KH₂PO₄ 2 mM, Tris-HCl 20 mM). Este procedimiento se repitió dos veces y en el último lavado se agregó rodamina 123 (20 μM).
- Los tubos "eppendorf" se incubaron a 29°C por 45 minutos en agitación continua. Se realizaron dos lavados con Buffer de carga de naranja de acridina y rodamina 123.
- Se procedió a colocar la solución de uno de los tubos "eppendorf" en una cubeta rectangular de cuarzo y luego en el espectrofluorímetro Hitachi F7000, con agitación constante y temperatura controlada a 29°C.
- Se agregó distintos efectores (SQ109 (1, 2 y 5 μM) y FCCP 2 μM (como control positivo)), con el uso de una jeringa "Hamilton", y se observó cambios en la fluorescencia.

4.2.4.3. Determinación de la alcalinización de los acidocalcisomas de promastigotes de *Leishmania mexicana*

Con el objeto de determinar la alcalinización de los acidocalcisomas de promastigotes de *Leishmania mexicana* se realizaron mediciones fluorimétricas utilizando el fluoróforo naranja de acridina (figura 14). La naranja de acridina es un fluoróforo catiónico que interactúa con el ADN y el ARN por intercalación dentro de la molécula. En los tripanosomatidios, la naranja de acridina se acumula en compartimientos ácidos, como por ejemplo los acidocalcisomas. Tiene picos de excitación y emisión a 488 y 530 nm, respectivamente (figura 15) (Serrano-Martín y col., 2009a).

Naranja de acridina

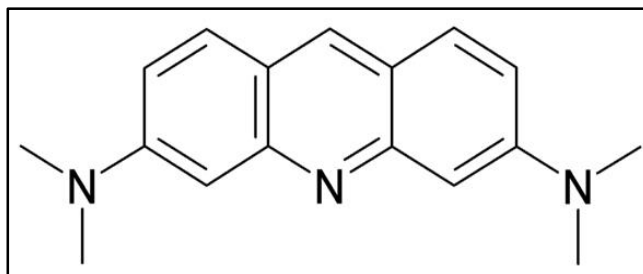


Figura 14: Estructura molecular de la naranja de acridina. Tomado de <http://www.bioprotocol.org/e1162> (Consulta: 14 de marzo de 2016).

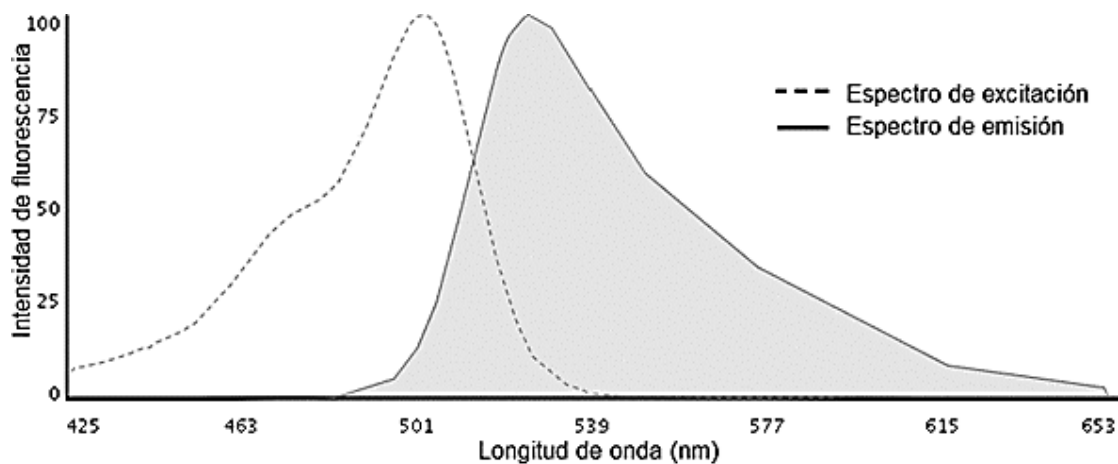


Figura 15: Espectro de excitación y de emisión de la naranja de acridina. La curva izquierda, con un pico a 488 nm, representa el espectro de excitación y la curva derecha, con un pico a 530 nm, representa el espectro de emisión de la naranja de acridina. Tomado de: <https://www.thermofisher.com/ve/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?ICID=svtool&UID=302moh> (Consulta: 5 de abril 2016).

Para la carga de promastigotes de *Leishmania mexicana* con naranja de acridina se procedió de la misma forma descrita para la carga con rodamina 123 (Modificado de Benaim y col., 2014), pero en este caso el fluoróforo empleado fue naranja de acridina a una concentración final de 5 μM y el tiempo de incubación fue 10 minutos. Se procedió luego a colocar la solución de uno de los tubos "eppendorf" en una cubeta rectangular de cuarzo y luego en el espectrofluorímetro Hitachi F7000, con agitación constante y temperatura controlada a 29°C. Se agregó distintos efectores (SQ109 (1, 2, 5 y 10 μM) y Nigericina 2 μM (como control positivo)), con el uso de una jeringa "Hamilton", y se observó cambios en la fluorescencia.

5. RESULTADOS

5.1 Efecto del SQ109 sobre la proliferación de promastigotes de *Leishmania mexicana*

Con el objeto de determinar el posible efecto antiproliferativo del SQ109 sobre promastigotes de *L. mexicana*, poblaciones de estos organismos fueron expuestas a diferentes concentraciones de SQ109, manteniendo un control al cual no se le agregó la droga. Los resultados obtenidos (figura 16) muestran que el SQ109 inhibe la proliferación de promastigotes de *L. mexicana* de una forma dosis-dependiente, observándose una inhibición del 100% de la proliferación celular a una concentración de 5 μM (concentración mínima inhibitoria de la proliferación celular (CMI)). Cabe destacar que a una concentración de 1 μM de SQ109, luego de 96 horas de tratamiento, se observa un incremento en el número de promastigotes, el cual posteriormente disminuye a las 120 horas, manteniéndose luego constante en el tiempo.

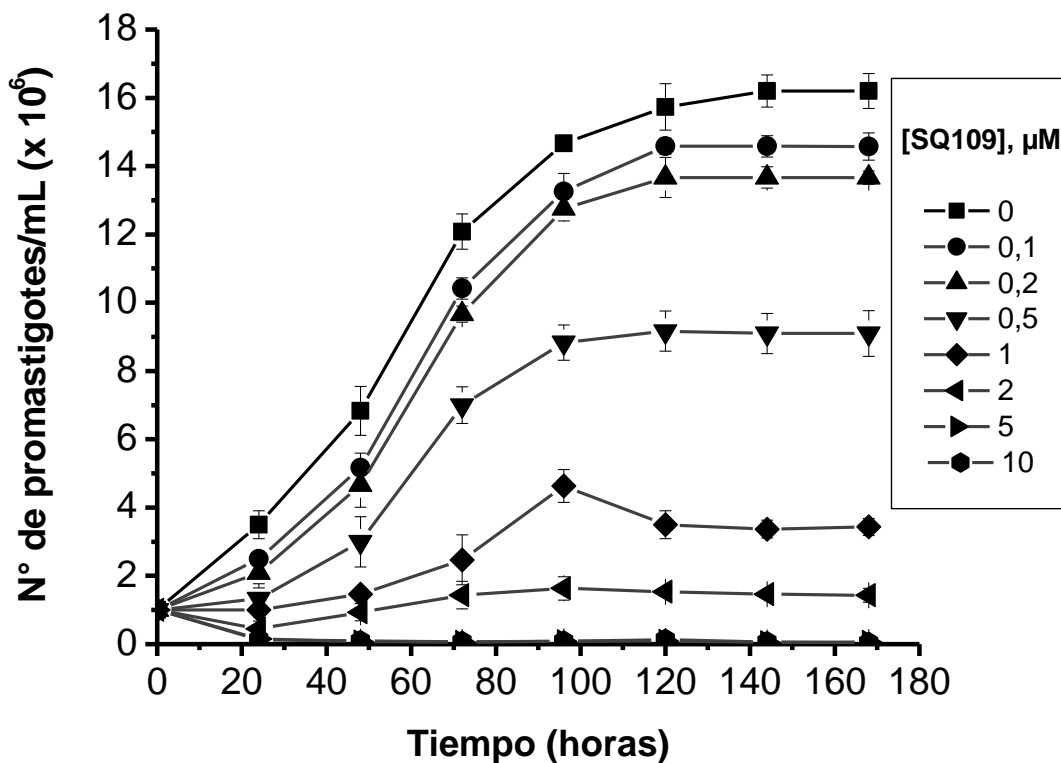


Figura 16: Efecto del SQ109 sobre la proliferación de promastigotes de *Leishmania mexicana*.

Se representa el número de promastigotes/mL en función del tiempo para cada concentración de SQ109 (línea con símbolo). Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar (barras) de al menos tres experimentos independientes.

A partir del gráfico anterior (figura 16) se elaboró una curva dosis-respuesta, en la cual se representa el número de promastigotes/mL en función de la concentración de SQ109 luego de 48 horas de tratamiento (figura 17). El IC_{50} obtenido es $0,35 \pm 0,08 \mu M$.

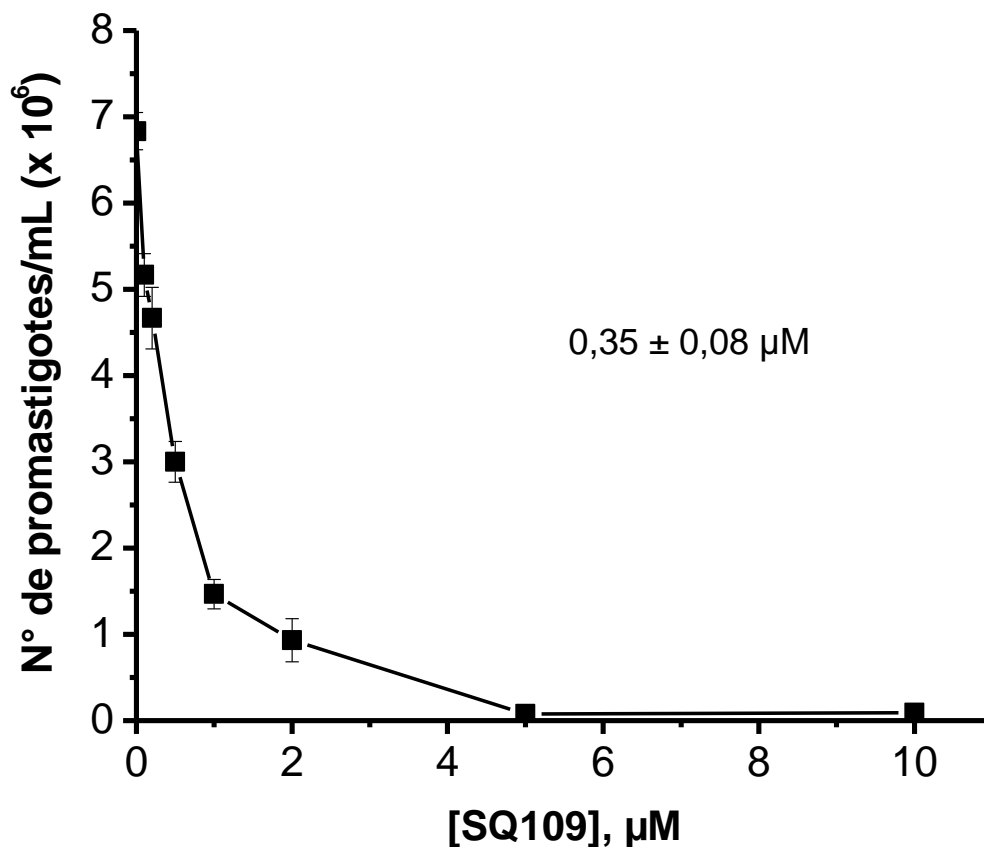


Figura 17: Curva dosis-respuesta luego de 48 horas del tratamiento de promastigotes de *Leishmania mexicana* con SQ109. Se representa el número de promastigotes/mL en función de la concentración de SQ109. Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar (barras) de al menos tres experimentos independientes. IC₅₀: 0,35 \pm 0,08 μ M.

5.2 Efecto del SQ109 sobre la viabilidad de promastigotes de *Leishmania mexicana*

El efecto del SQ109 sobre la viabilidad de promastigotes de *L. mexicana* se evaluó mediante el ensayo de citotoxicidad (MTT). Siendo la densidad óptica (570 nm) directamente proporcional al número de células viables (Ferrari y col., 1990). En la figura 18 se observa que el SQ109 tiene un efecto dosis-dependiente sobre la viabilidad de promastigotes de *L. mexicana*, con un IC₅₀ de 0,45 \pm 0,06 μ M. Adicionalmente se observa

que el SQ109 (10 μM) inhibe el 100% de la viabilidad de estos parásitos, un efecto igual al de la miltefosina (15 μM).

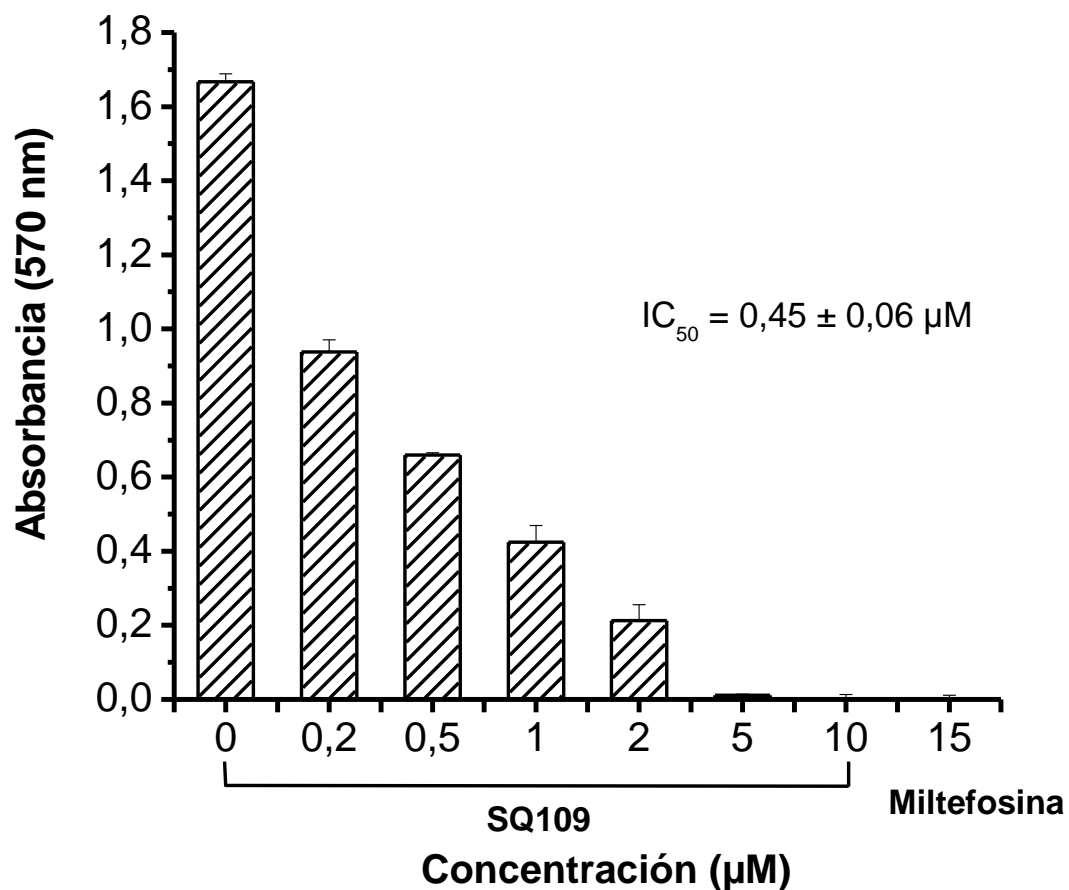


Figura 18: Efecto del SQ109 sobre la viabilidad de promastigotes de *Leishmania mexicana*. Se representa la absorbancia a 570 nm en función de la concentración de SQ109 y de la miltefosina (15 μM). Los parásitos fueron sometidos a concentraciones crecientes de SQ109 por 72 horas. Cada columna representa el promedio de al menos tres experimentos independientes. Las barras en la parte superior de las columnas representan la desviación estándar. IC_{50} : $0,45 \pm 0,06 \mu\text{M}$.

5.3 Efecto del SQ109 sobre la viabilidad de macrófagos de la línea celular J774

Con el objeto de determinar el efecto del SQ109 sobre la viabilidad de macrófagos de la línea celular J774 se realizó también un ensayo de citotoxicidad (MTT). El IC_{50} obtenido es $5,76 \pm 0,12 \mu M$ (figura 19), el cual es aproximadamente 13 veces superior al IC_{50} obtenido con promastigotes de *L. mexicana* ($0,45 \pm 0,06 \mu M$).

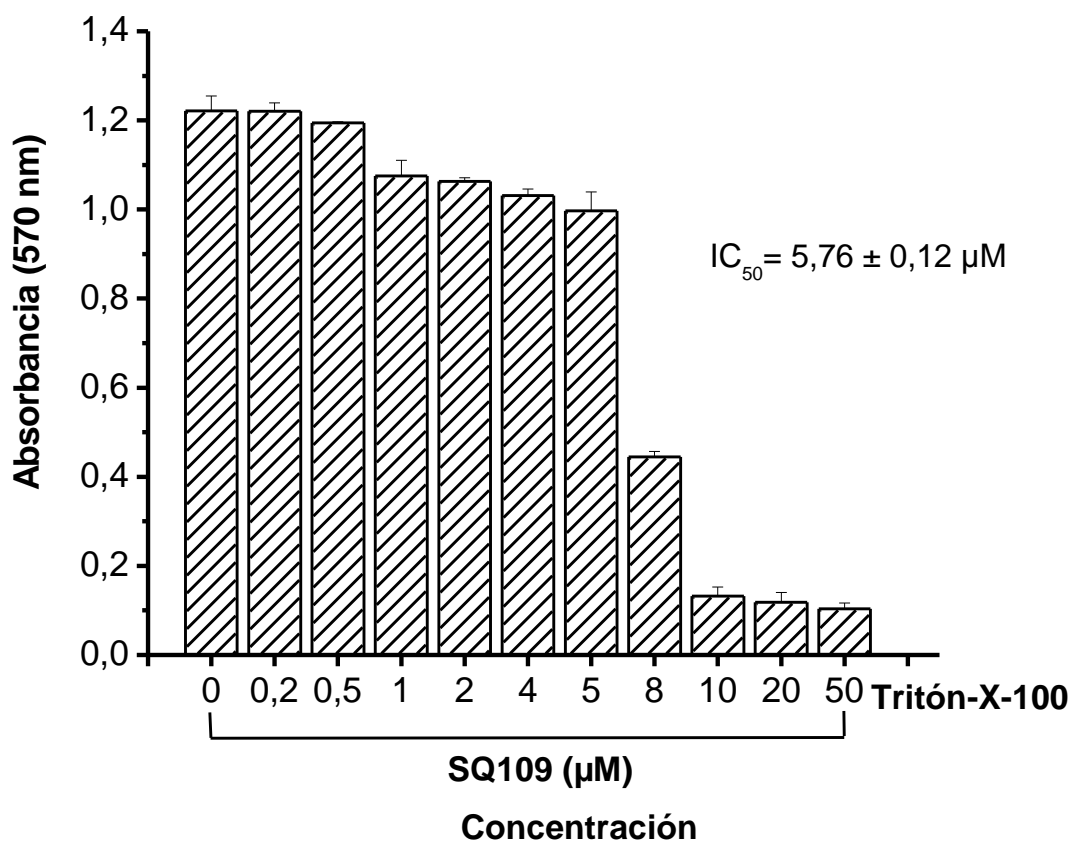


Figura 19: Efecto del SQ109 sobre la viabilidad de macrófagos de la línea celular J774. Se representa la absorbancia a 570 nm en función de la concentración de SQ109 y del Tritón-X-100 (0,1%). Los macrófagos fueron sometidos a concentraciones crecientes de SQ109 por 72 horas. Cada columna representa el promedio de al menos tres experimentos independientes. Las barras en la parte superior de las columnas representan la desviación estándar. IC_{50} : $5,76 \pm 0,12 \mu M$.

5.4 Efecto del SQ109 sobre macrófagos de la línea celular J774 infectados con amastigotes de *Leishmania mexicana*

Con el objeto de evaluar el efecto del SQ109 sobre el porcentaje de macrófagos murinos infectados con amastigotes de *L. mexicana*, se procedió a infectar los macrófagos con promastigotes de *L. mexicana*, los cuales luego se sometieron a concentraciones crecientes de SQ109. En la figura 20 se observa que el SQ109 disminuye el porcentaje de macrófagos infectados con respecto al control sin droga de una forma dosis-dependiente. El IC₅₀ obtenido es $11,2 \pm 0,03$ nM.

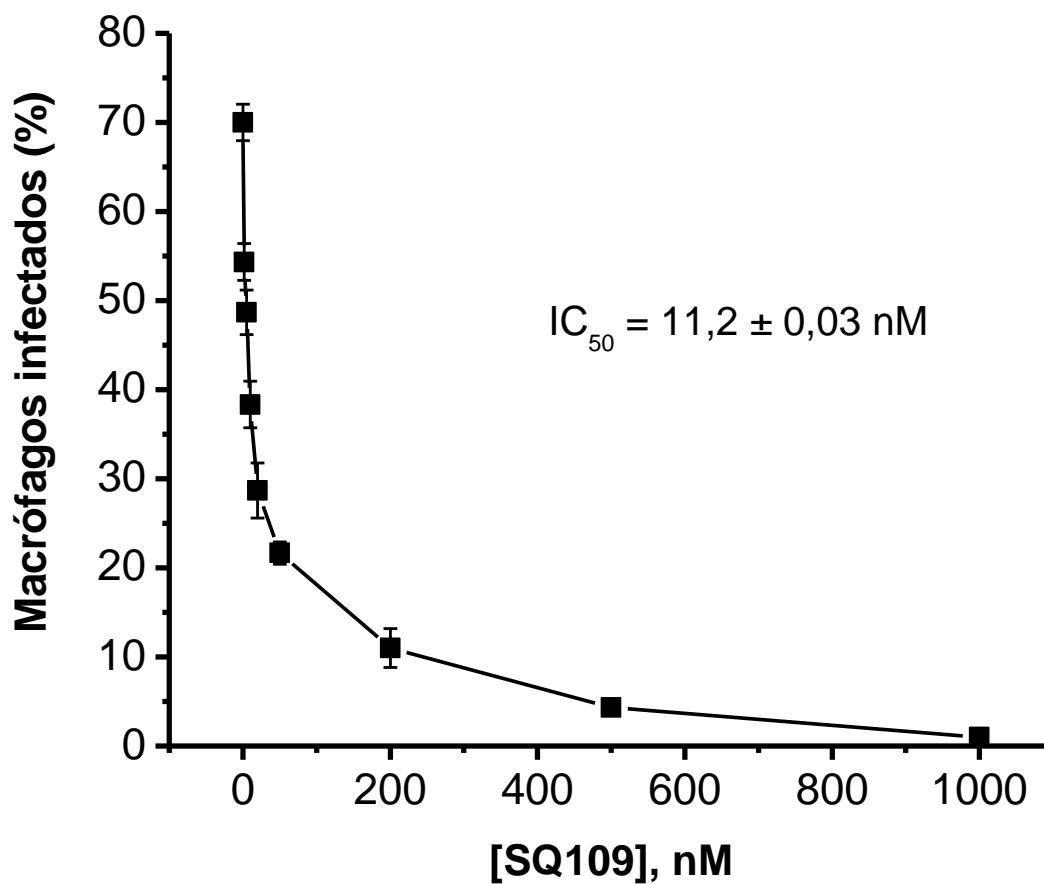


Figura 20: Efecto del SQ109 sobre macrófagos de la línea celular J774 infectados con amastigotes de *Leishmania mexicana*. Se representa el porcentaje de macrófagos infectados en función de la concentración de SQ109. El porcentaje de macrófagos infectados se determinó a las 48 horas de tratamiento y se contó 100 células en cada experimento utilizando el objetivo de inmersión (100X) en un microscopio óptico. Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar (barras) de al menos tres experimentos independientes. IC_{50} : $11,2 \pm 0,03$ nM.

5.5 Efecto del SQ109 sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular de promastigotes de *Leishmania mexicana*

El efecto del SQ109 sobre la concentración de Ca^{2+} intracelular de promastigotes de *L. mexicana* se determinó empleando el fluoróforo fura 2. Posteriormente, se midió la fluorescencia con dos longitudes de onda de excitación (340 y 380 nm) y una de emisión a 510 nm. Como se mencionó anteriormente, la relación 340/380 nm es directamente proporcional a la concentración de Ca^{2+} intracelular. En la figura 21A se observa que el SQ109 (10 μM) induce un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular de promastigotes de *L. mexicana* en presencia de 2mM de Ca^{2+} extracelular. Con el objeto de evaluar si el incremento en la concentración de este catión inducido por la adición del SQ109 (10 μM) es debido a la liberación de este ion de compartimientos intracelulares o por la entrada de Ca^{2+} del espacio extracelular, se procedió a realizar el mismo experimento en ausencia de Ca^{2+} extracelular (8 mM EGTA). Bajo estas condiciones, el SQ109 (10 μM) induce un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular de estos parásitos (figura 21B) muy similar al observado en presencia de Ca^{2+} extracelular.

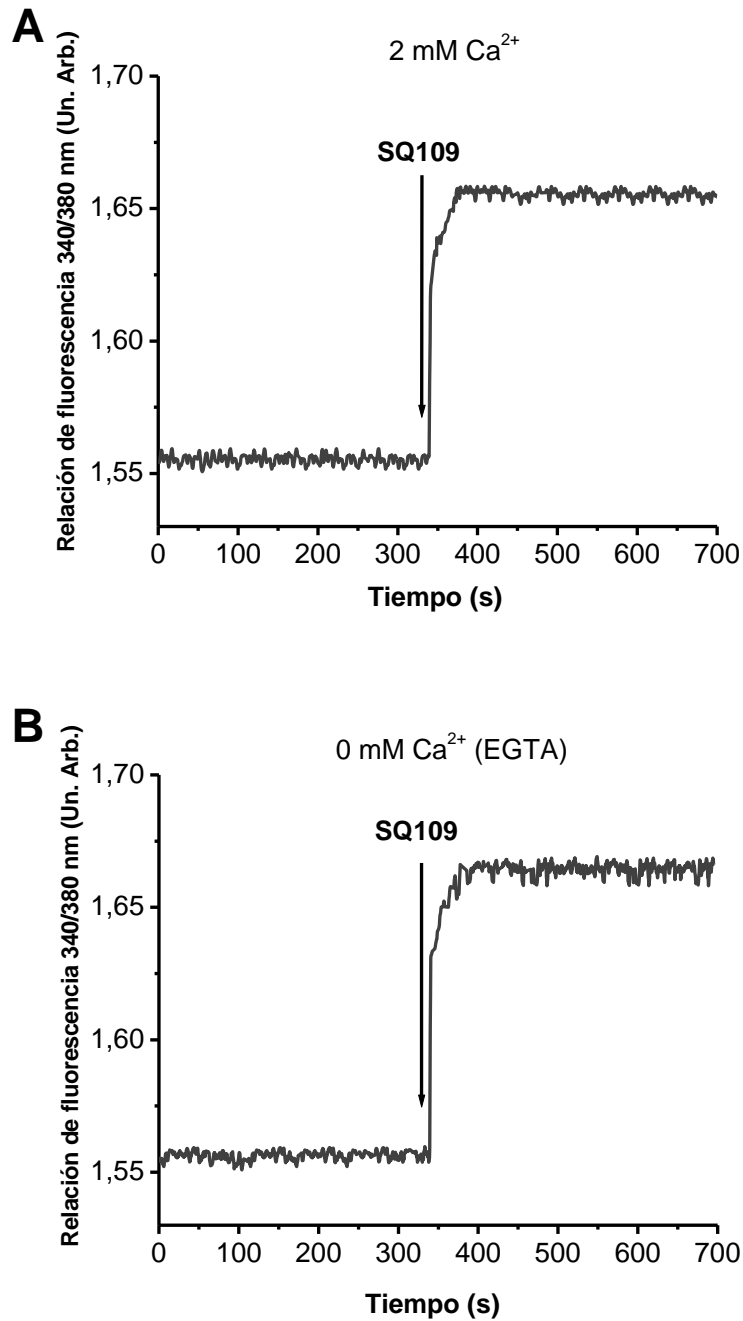


Figura 21: Efecto del SQ109 sobre la homeostasis del Ca²⁺ intracelular de promastigotes de *Leishmania mexicana*. Se muestra la relación de fluorescencia 340/380 nm (unidades arbitrarias (Un. Arb.)) en función del tiempo (segundos). Los parásitos se incubaron con fura 2-AM (1 μ M) por 3 horas. Longitudes de onda de excitación 340 y 380 nm y longitud de onda de emisión 510 nm. (A) Efecto de 10 μ M de SQ109 (flecha) sobre la concentración de Ca²⁺ intracelular de los parásitos en presencia de 2 mM de Ca²⁺ externo y (B) en ausencia de Ca²⁺ externo (8 mM EGTA).

A partir de los datos obtenidos en el experimento anterior se calculó el incremento porcentual de la relación de fluorescencia 340/380 nm al añadir SQ109 (10 μ M) a promastigotes de *L. mexicana* cargados con fura 2, tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Se tomó como 100% del incremento de la relación de fluorescencia 340/380 nm la adición de los efectos del SQ109 (10 μ M) y de la digitonina (40 μ M) (resultado no mostrado) sobre estos parásitos. El SQ109, tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} extracelular, induce un incremento de más del 50% de la relación de fluorescencia 340/380 nm con respecto al nivel basal (antes de añadir los efectores) (figura 22).

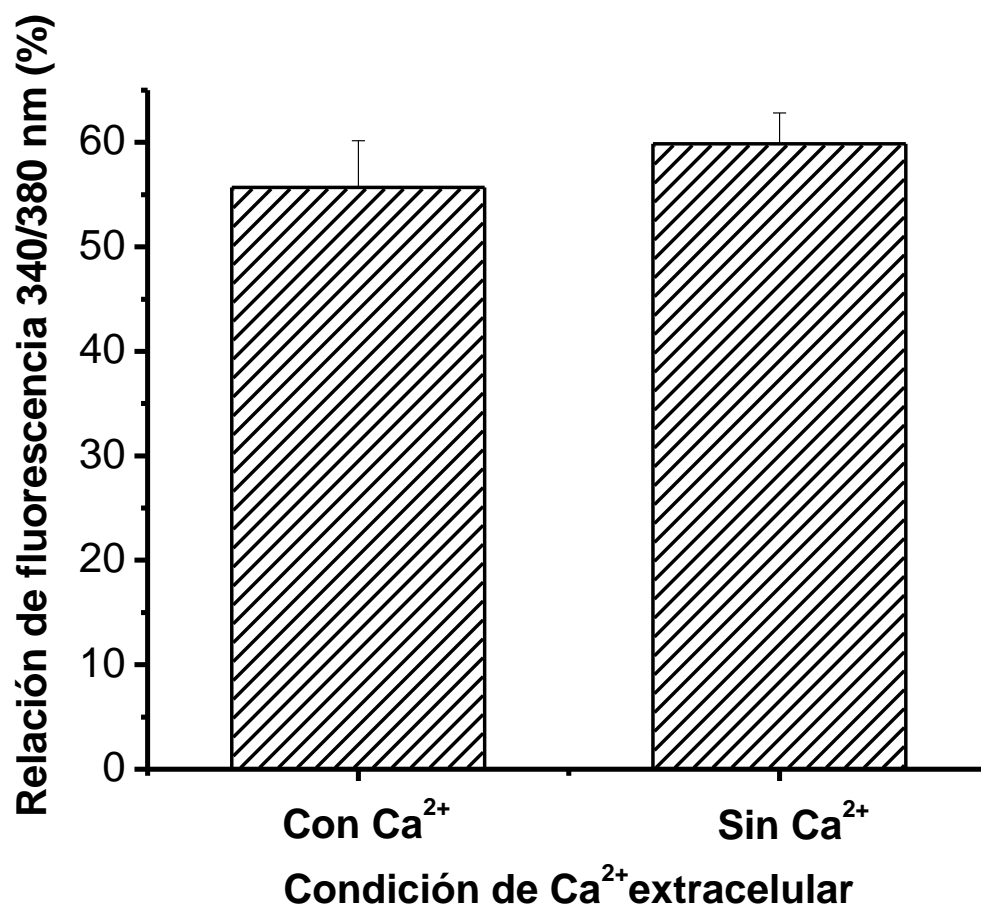


Figura 22: Incremento porcentual de la relación de fluorescencia 340/380 nm al añadir 10 μ M de SQ109 a promastigotes de *Leishmania mexicana*. Cada columna representa el resultado de al menos tres experimentos independientes en presencia (izquierda) y ausencia (derecha) de Ca^{2+} extracelular. Las barras en la parte superior de las columnas representan la desviación estándar.

5.6 Efecto del SQ109 sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *Leishmania mexicana*

Con el objeto de determinar el efecto del SQ109 sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *L. mexicana*, poblaciones de estos parásitos se cargaron con el fluoróforo rodamina 123. El colapso del potencial electroquímico mitocondrial induce la salida del fluoróforo de la mitocondria, lo cual se puede observar como un incremento en la fluorescencia. En este experimento, se determinó cambios en la fluorescencia en respuesta a la adición de SQ109 (5 μM) y de FCCP (2 μM). En la figura 23A se observa que el SQ109 (5 μM) induce un incremento en la fluorescencia y la adición posterior de FCCP (2 μM) no produce ningún efecto. Sin embargo, al invertir el orden de adición de estos compuestos, se observa que el SQ109 (5 μM) induce un incremento en la fluorescencia (figura 23B), luego de la adición de FCCP (2 μM).

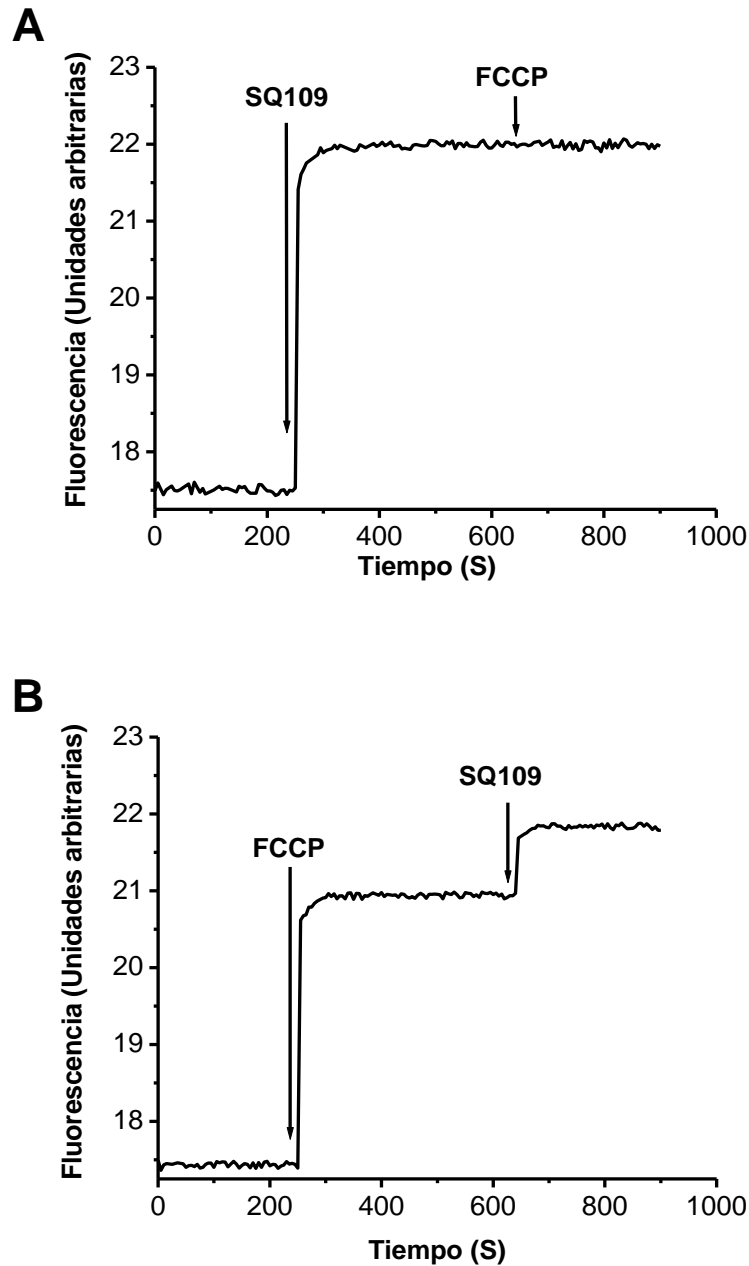


Figura 23: Efecto del SQ109 sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *Leishmania mexicana*. Se representa la fluorescencia en función del tiempo (segundos). Los parásitos se incubaron con rodamina 123 (20 μM) por 45 min. Longitud de onda de excitación 488 nm y longitud de onda de emisión 530 nm. (A) Efecto del SQ109 (5 μM), seguido de la adición de FCCP (2 μM), sobre el potencial electroquímico mitocondrial de los parásitos. (B) Efecto del SQ109 (5 μM), luego de la adición de FCCP (2 μM), sobre el potencial electroquímico mitocondrial de los parásitos.

Con el objeto de determinar el efecto de concentraciones crecientes de SQ109 sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *L. mexicana*, se ensayaron tres concentraciones de SQ109 (1, 2 y 5 μM), seguido de la adición de FCCP (2 μM). Para el cálculo del porcentaje de fluorescencia se tomó en cuenta que la adición de los efectos del SQ109 y del FCCP representa el 100% de la respuesta del sistema, es decir el colapso del potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *L. mexicana*. En la figura 24 se observa que el SQ109 a una concentración de 1 y 2 μM produce aproximadamente el 56 y 60% de la respuesta, respectivamente, y a una concentración de 5 μM se alcanza la respuesta máxima.

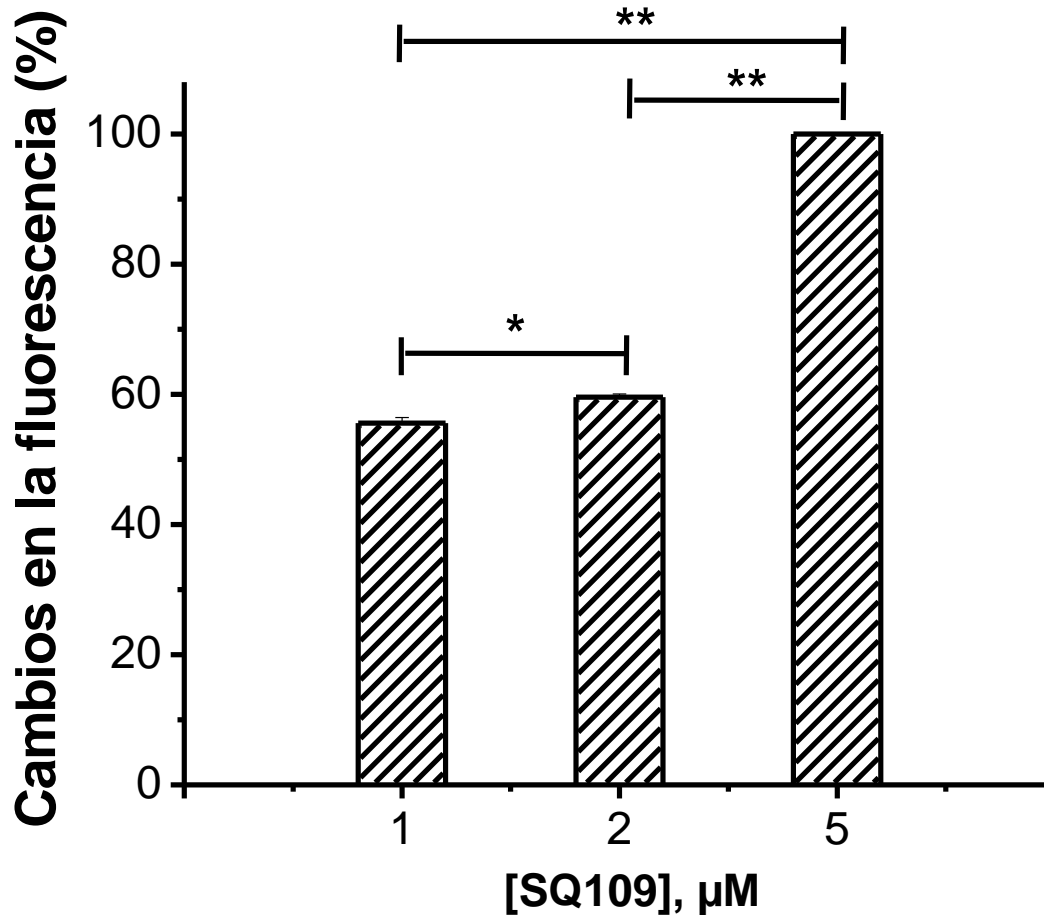


Figura 24: Efecto de concentraciones crecientes de SQ109 sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *Leishmania mexicana*. Se representan los cambios en la fluorescencia en función de la concentración de SQ109. Los parásitos se incubaron con rodamina 123 (20 μM) por 45 min. Longitud de onda de excitación 488 nm y longitud de onda de emisión 530 nm. Cada columna representa el promedio de al menos tres experimentos independientes. Las barras en la parte superior de las columnas representan la desviación estándar. El asterisco (*) representa diferencias estadísticamente significativas (determinadas utilizando la prueba *t* de student, $P \leq 0,05$). Los asteriscos (**) representan diferencias estadísticamente significativas (determinadas utilizando la prueba *t* de student, $P \leq 0,01$).

5.7 Efecto del SQ109 sobre los acidocalcisomas de promastigotes de *Leishmania mexicana*

Con el objeto de determinar el efecto del SQ109 sobre los acidocalcisomas de promastigotes de *L. mexicana*, poblaciones de estos parásitos se cargaron con naranja de acridina, la cual se acumula en compartimientos ácidos. Al alcalinizarse estos compartimientos se produce la liberación del fluoróforo, lo cual se traduce en un incremento en la fluorescencia. En este experimento se determinaron cambios en la fluorescencia en respuesta a la adición de SQ109 (10 μM) y de nigericina (2 μM), el cual alcaliniza a los acidocalcisomas. Los resultados obtenidos muestran que el SQ109 (10 μM) induce un incremento en la fluorescencia y no se observa un efecto posterior de la nigericina (2 μM) (figura 25A). Sin embargo, al invertir el orden de adición de estos compuestos, se observa que el SQ109 (10 μM) induce un incremento en la fluorescencia luego de la adición de nigericina (2 μM) (figura 25B).

Con el objeto de determinar el efecto de concentraciones crecientes de SQ109 sobre los acidocalcisomas de promastigotes de *L. mexicana*, se ensayaron cuatro concentraciones de SQ109 (1, 2, 5 y 10 μM), seguido de la adición de nigericina (2 μM). Para el cálculo del porcentaje de fluorescencia se tomó en cuenta que la adición de los efectos del SQ109 y de la nigericina representa el 100% de la respuesta del sistema, es decir la alcalinización de los acidocalcisomas de promastigotes de *L. mexicana*. En la figura 26 se observa que el SQ109 a una concentración de 1, 2 y 5 μM produce aproximadamente el 42, 61 y 82% de la respuesta, respectivamente, y a una concentración de 10 μM se alcanza la repuesta máxima, pues la nigericina no tiene ya ningún efecto.

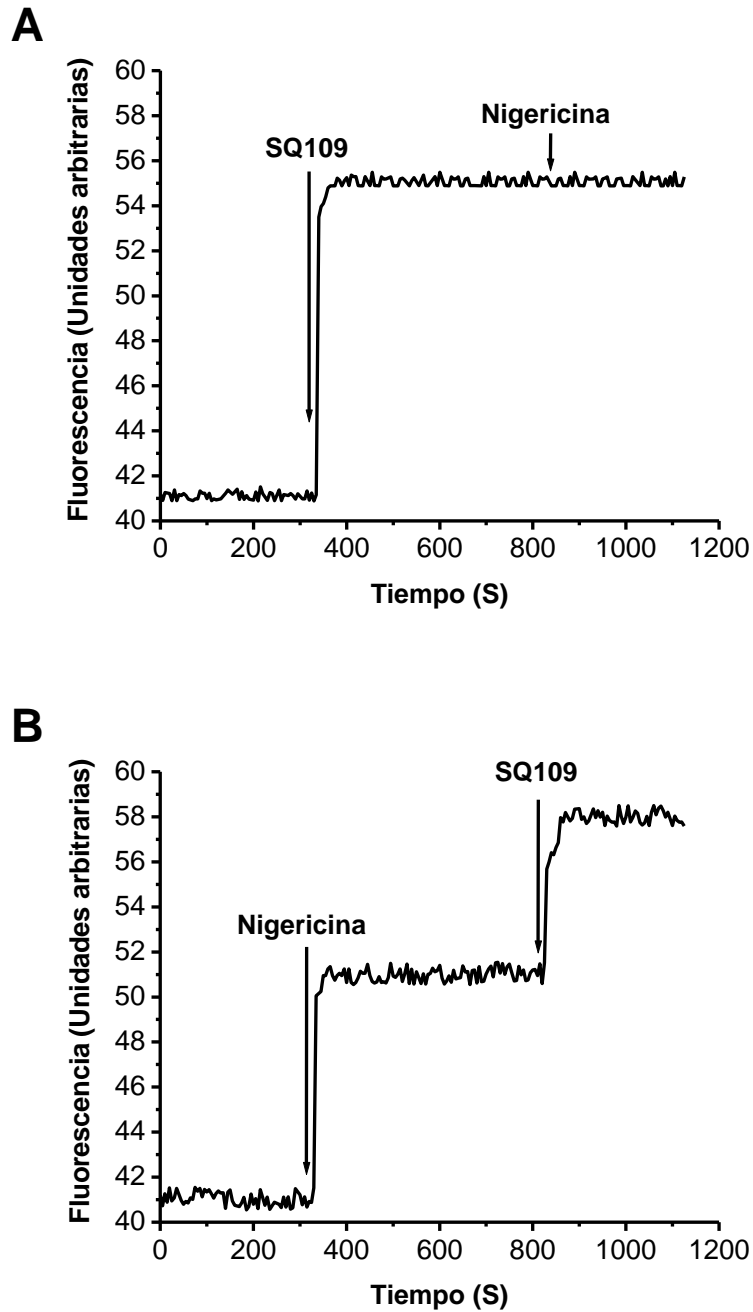


Figura 25: Efecto del SQ109 sobre los acidocalcisomas de promastigotes de *Leishmania mexicana*. Se representa la fluorescencia en función del tiempo (segundos). Los parásitos se incubaron con naranja de acridina ($5 \mu\text{M}$) por 10 min. Longitud de onda de excitación 488 nm y longitud de onda de emisión 530 nm. (A) Efecto del SQ109 ($10 \mu\text{M}$), seguido de la adición de nigericina ($2 \mu\text{M}$). (B) Efecto del SQ109 ($10 \mu\text{M}$), luego de la adición del nigericina ($2 \mu\text{M}$).

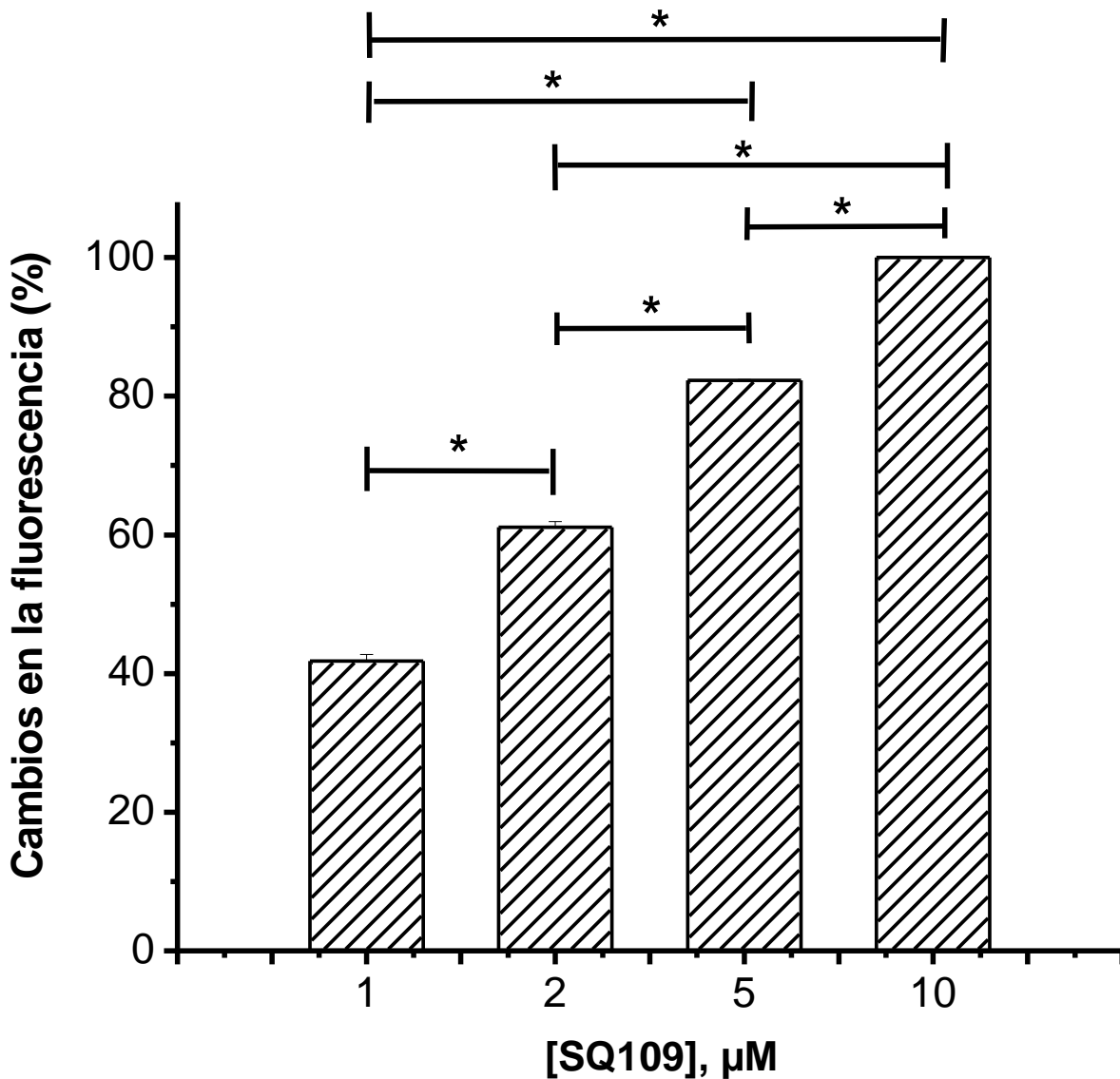


Figura 26: Efecto de concentraciones crecientes de SQ109 sobre los acidocalcisomas de promastigotes de *Leishmania mexicana*. Se representa el cambio en la fluorescencia en función de la concentración de SQ109. Los parásitos se incubaron con naranja de acridina (5 μM) por 10 min. Longitud de onda de excitación 488 nm y longitud de onda de emisión 530 nm. Cada columna representa el promedio de al menos tres experimentos independientes. Las barras en la parte superior de las columnas representan la desviación estándar. El asterisco (*) representa diferencias estadísticamente significativas (determinadas utilizando la prueba *t* de student, $P \leq 0,05$).

6. DISCUSIÓN

Las enfermedades parasitarias tienen un enorme impacto sanitario, social y económico y afectan principalmente a las poblaciones más pobres del mundo. La carga mundial de estas enfermedades se ve agravada por la falta de vacunas autorizadas, por lo que drogas seguras y eficaces son vitales para su prevención y tratamiento. Por desgracia, cuando se dispone de estas, su utilidad está siendo cada vez más amenazada por parásitos resistentes a drogas. Aún más, las drogas de primera línea utilizadas en gran parte del mundo para el tratamiento de la leishmaniasis, una enfermedad parasitaria, el glucantime, el pentostam y la miltefosina, son tóxicas para los pacientes y la última es además teratogénica. Todo esto impulsa la investigación para el descubrimiento de nuevas drogas antiparasitarias a nivel mundial (Andrews y col., 2014; Sbaraglini y col., 2016). Sin embargo, teniendo en cuenta que el desarrollo de nuevas drogas consume tiempo y es costoso, existe un creciente interés en encontrar nuevos usos para drogas existentes (un proceso conocido como reutilización de drogas o reposicionamiento), lo cual tiene muchas ventajas. Típicamente, la seguridad, la eficacia y la toxicidad de una droga existente han sido ampliamente estudiadas. Dado que estos datos ya han sido adquiridos, la reutilización de una droga ahorra tiempo y dinero en comparación con el proceso de síntesis de una droga *de novo* (Beachy y col., 2014). Debido a esto, la reutilización de drogas autorizadas originalmente para otras indicaciones, surge como una aproximación atractiva para el desarrollo de nuevas terapias para enfermedades tropicales desatendidas, como lo es la leishmaniasis (Sbaraglini y col., 2016). Especialmente en el caso de la leishmaniasis cutánea localizada, el tratamiento es importante para acelerar la cura, reducir las cicatrices y prevenir la diseminación del parásito al sitio de las mucosas. Tal es el caso del SQ109, una droga que se encuentra actualmente en ensayos clínicos en fase III para el tratamiento de la tuberculosis resistente a múltiples drogas y que ha demostrado tener actividad *in vitro*

contra otros organismos como *T. cruzi*, siendo parte de su mecanismo de acción el colapso del potencial electroquímico mitocondrial y la alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de *T. cruzi* (Veiga-Santos y col., 2015). Por todo lo anterior, en el presente trabajo nos propusimos estudiar el efecto del SQ109 sobre promastigotes de *L. mexicana* y macrófagos infectados con amastigotes de *L. mexicana*, así como su efecto sobre el potencial electroquímico mitocondrial, los acidocalcisomas y la concentración de Ca^{2+} intracelular de promastigotes de *L. mexicana*. Los resultados obtenidos muestran que el SQ109 inhibe la proliferación de promastigotes de *L. mexicana* de una forma dosis-dependiente, con un IC_{50} de $0,35 \pm 0,08 \mu\text{M}$ y una CMI de $5 \mu\text{M}$. Adicionalmente, luego de 24 horas de tratamiento con SQ109 (5 y $10 \mu\text{M}$), los parásitos pierden la movilidad y adoptan una forma redondeada, un efecto morfológico similar al que produce el SQ109 ($4,6 \mu\text{M}$) sobre epimastigotes de *T. cruzi* luego de 24 y 48 horas de tratamiento (Veiga-Santos y col., 2015). Por otro lado, se observó un incremento en el número de promastigotes de *L. mexicana* luego de 96 horas de tratamiento con $1 \mu\text{M}$ de SQ109. Esto sugiere un intento de recuperación de los promastigotes a los efectos producidos por el SQ109. Sin embargo, luego de una exposición prolongada a esta droga (120 horas), se produjo la muerte celular de los parásitos, manteniéndose luego constante el número de promastigotes en el tiempo. Al comparar estos resultados con los obtenidos por Veiga-Santos y col. (2015) sobre epimastigotes de *T. cruzi*, se observa que el SQ109 tiene un mayor efecto sobre promastigotes de *L. mexicana*, ya que el IC_{50} obtenido por estos investigadores ($4,6 \mu\text{M}$) es 13 veces superior al IC_{50} obtenido con promastigotes de *L. mexicana* en el presente trabajo.

Además de afectar la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*, el SQ109 tiene un efecto dosis-dependiente sobre la viabilidad de promastigotes de *L. mexicana*, con un IC_{50} de $0,45 \pm 0,06 \mu\text{M}$. Siendo este último valor similar al IC_{50} obtenido sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana* ($0,35 \mu\text{M}$). Pudimos observar que el SQ109 a $10 \mu\text{M}$,

conlleva a una disminución del 100 % de la viabilidad de promastigotes de *L. mexicana*, al igual que la miltefosina (15 μM), una droga con potente actividad leishmanicida y con una CMI de 15 μM sobre promastigotes de *L. mexicana* (Serrano-Martín y col., 2009b). Por otro lado, se determinó el efecto del SQ109 sobre macrófagos de la línea celular J774. La viabilidad de estas células de mamífero con respecto al control (sin droga) no se vio afectada a una concentración de 0,2 μM de SQ109, la cual inhibe el 40% de la viabilidad de promastigotes de *L. mexicana*. Aún más, el IC_{50} obtenido ($5,76 \pm 0,12 \mu\text{M}$), es aproximadamente 13 veces superior al IC_{50} obtenido con promastigotes de *L. mexicana* (0,45 μM). Todo lo anterior indica que el SQ109, a concentraciones que afectan la viabilidad del parásito, no tiene un efecto significativo sobre la viabilidad de macrófagos murinos. Adicionalmente se observó que el Tritón-X-100 (0,1%) (detergente que disuelve las membranas celulares (Gaspar, 2016) y utilizado como control de lisis celular) inhibe el 100% de la viabilidad de macrófagos murinos, lo cual no se alcanza incluso a una concentración de 50 μM de SQ109.

Evaluamos también el efecto del SQ109 sobre macrófagos infectados con amastigotes de *L. mexicana*, el cual representa el estadio clínicamente relevante, mostrando que esta droga tiene un efecto dosis-dependiente sobre el porcentaje de macrófagos infectados, obteniéndose un efecto máximo a una concentración de 1 μM y un IC_{50} de $11,2 \pm 0,03 \text{ nM}$. A pesar de que el SQ109, en el rango de concentraciones utilizadas en este experimento, no tiene un efecto significativo sobre los macrófagos, concentraciones superiores de esta droga (5 y 10 μM) causan la lisis de algunas células luego de 48 de tratamiento, observándose sólo unos pocos macrófagos adheridos a los cubreobjetos a una concentración de 10 μM de SQ109, concentración que inhibe el 80% de la viabilidad de los macrófagos murinos. A pesar de esto, el IC_{50} obtenido para macrófagos infectados con amastigotes de *L. mexicana* fue 11,2 nM, un valor dos órdenes de magnitud inferior al IC_{50}

del SQ109 sobre la viabilidad de macrófagos murinos (5,76 μM), lo cual sugiere que esta droga tendría un muy alto índice de selectividad entre ambas células. Este IC_{50} cuando se compara con el obtenido sobre amastigotes intracelulares de *T. cruzi* (1,2 μM) es dos ordenes de magnitud menor, lo cual ofrece una clara ventaja desde el punto de vista terapéutico contra la leishmaniasis, en comparación con el mal de Chagas.

Como se mencionó anteriormente, el Ca^{2+} es un mensajero esencial en todos los eucariotas y la disrupción de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en cualquier célula tiene efectos letales, resultando en la muerte celular por apoptosis o necrosis (Benaim y García, 2011). En nuestro laboratorio se demostró que diferentes drogas con actividad leishmanicida, como son la miltefosina, la amiodarona y la dronedarona, disrumen la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, induciendo un incremento en la concentración de este catión, bien sea por la entrada del mismo del espacio extracelular al citoplasma o por su liberación de compartimientos intracelulares (Serrano-Martín y col., 2009a; Serrano-Martín y col., 2009b; Benaim y col., 2014). Debido a esto, en este trabajo se determinó el efecto del SQ109 sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular de promastigotes de *L. mexicana*. Para ello, los parásitos se cargaron con el fluoróforo fura 2. La escogencia del fura 2 sobre otros indicadores de Ca^{2+} es que este fluoróforo presenta diferentes espectros de excitación cuando está libre o unido a Ca^{2+} . De hecho, el espectro de excitación del fura 2 cambia a menores longitudes de onda a medida que la concentración de Ca^{2+} incrementa (figura 10). Esto permite eliminar variables ligadas a la eficacia del instrumento o a la concentración del fluoróforo. Adicionalmente el fura 2 tiene mayor afinidad por el Ca^{2+} sobre otros iones, como el Mg^{2+} (Gryniewicz y col., 1985). La razón por la cual los resultados obtenidos no se mostraron en función de la concentración de Ca^{2+} , sino en función de la relación de fluorescencia 340/380 nm, es debido a que además de que esta relación es directamente proporcional a la concentración de Ca^{2+} intracelular, los niveles basales de Ca^{2+} entre

réplicas son muy variados y depende del estado metabólico de las células (en este caso de los promastigotes) (Maravall y col., 2000). Y la escogencia de la relación 340/380 nm sobre su inverso, es que el valor de esta relación cambia en la misma dirección en que lo hace la concentración de Ca^{2+} intracelular (Gryniewicz y col., 1985). Los resultados obtenidos muestran que el SQ109 (10 μM) induce un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular de promastigotes de *L. mexicana*, tanto en presencia (Figura 21A) como en ausencia de Ca^{2+} extracelular (Figura 21B). En ambos casos la pendiente del incremento producido por la adición de SQ109 (10 μM) es la misma, lo cual indica que el SQ109 induce incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular de promastigotes de *L. mexicana* producto de la liberación de este catión de compartimientos intracelulares, y no por su entrada desde el exterior.

Como se mencionó anteriormente, la mitocondria y los acidocalcisomas son algunos de los organelos involucrados en la regulación del Ca^{2+} intracelular en tripanosomatidios. Es por esto que en el presente trabajo se determinó el efecto del SQ109 sobre el potencial electroquímico mitocondrial y la alcalinización de los acidocalcisomas de promastigotes de *L. mexicana*.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el SQ109 (5 μM) colapsa rápidamente el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *L. mexicana*, lo cual se observa como un incremento en la fluorescencia, producto de la liberación del fluoróforo rodamina 123 acumulado en las mitocondrias de estos parásitos. Adicionalmente no se observó un efecto posterior del protonóforo FCCP (2 μM), el cual disipa el potencial de membrana mitocondrial al permeabilizar la membrana mitocondrial interna a protones (Benaim y col., 2014). Por otro lado, se observó que el SQ109 tiene un efecto dosis-dependiente sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *L. mexicana*, tendencia similar a la obtenida por Veiga-Santos y col. (2015) sobre

epimastigotes de *T. cruzi*, obteniéndose una respuesta máxima a una concentración de 5 μM de SQ109. Al comparar estos resultados con aquellos obtenidos por Veiga-Santos y col. (2015) sobre epimastigotes de *T. cruzi*, se observa que el SQ109 tiene un mayor efecto sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *L. mexicana*, esto debido a que en el caso de epimastigotes de *T. cruzi*, incluso a una concentración de 40 μM de SQ109 se observa un efecto posterior del protonóforo FCCP. Aún más, la respuesta obtenida sobre promastigotes de *L. mexicana* es mucho más rápida que la obtenida por estos investigadores sobre epimastigotes de *T. cruzi*.

Al invertir el orden de adición del SQ109 y del FCCP se observó que el SQ109 (5 μM) induce un incremento en la fluorescencia cuando los parásitos han sido previamente cargados con rodamina 123, luego de la adición de FCCP (2 μM). Este resultado muestra que bajo estas condiciones experimentales el FCCP no es capaz de disipar completamente el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *L. mexicana*. En nuestro laboratorio hemos observado previamente un efecto similar de la amiodarona (10 μM) y la dronedarona (2,5 μM) sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *L. mexicana* (Benaim y col., 2014). Es posible que esto sea debido a que en estos experimentos no se empleó un ion de carga positiva permeable a la membrana mitocondrial interna que se desplace en sentido contrario a los H^+ , o bien un contraión que se desplace en el mismo sentido, el cual permita balancear las cargas de la membrana mitocondrial interna, con el fin de evitar un potencial de difusión y que de esta forma el FCCP provoque la disipación completa del potencial electroquímico mitocondrial (Nicholls y Ferguson, 1992). En trabajos anteriores hemos utilizado digitonina con el fin de hacer más accesible el FCCP a la mitocondria (Serrano y col., 2009a). Sin embargo, esto altera mucho la composición iónica del medio extramitocondrial, lo cual se aleja de la situación natural. Es por esto, que decidimos no utilizar digitonina en estos experimentos.

En este trabajo pudimos observar que el SQ109 (10 μ M) alcaliniza completamente los acidocalcisomas de promastigotes de *L. mexicana*, lo cual se puede evidenciar del rápido incremento en la fluorescencia, producto de la liberación del fluoróforo naranja de acridina de los acidocalcisomas de promastigotes de *L. mexicana*, y adicionalmente del hecho de no haber observado ningún efecto al añadir nigericina luego del SQ109, que como sabemos, es un intercambiador K^+/H^+ que induce la alcalinización de los acidocalcisomas y la liberación de Ca^{2+} de este compartimiento (Docampo y col., 1995). Por otro lado, se observó que el SQ109 tiene un efecto dosis-dependiente sobre los acidocalcisomas de promastigotes de *L. mexicana*, alcanzándose la respuesta máxima a una concentración de 10 μ M. Los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio muestran que el SQ109 (10 μ M) alcaliniza parcialmente los acidocalcisomas de epimastigotes de *T. cruzi* (Veiga-Santos y col, 2015), observándose un efecto posterior de la nigericina (2 μ M). Esto indica que esta droga tiene un mayor efecto sobre los acidocalcisomas de promastigotes de *L. mexicana* que sobre epimastigotes de *T. cruzi*. En ambos casos, la velocidad del incremento en la fluorescencia es similar.

Al invertir el orden de adición del SQ109 y de la nigericina, se observó que el SQ109 (10 μ M) induce un incremento en la fluorescencia cuando los parásitos han sido previamente cargados con naranja de acridina, luego de la adición de nigericina (2 μ M), resultado similar al obtenido sobre epimastigotes de *T. cruzi* (Veiga-Santos y col, 2015). Esto podría explicarse tomando en cuenta la posibilidad de que el SQ109 puede estar actuando sobre otros compartimientos ácidos donde se acumule el fluoróforo naranja de acridina, como por ejemplo, vacuolas ácidas o fagolisosomas (Benaim y col., 2014).

Estos resultados, conjuntamente con los anteriores obtenidos sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *L. mexicana*, sugieren que parte del incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular es con alta probabilidad debido a la

liberación de este catión de la mitocondria y los acidocalcisomas de promastigotes de *L. mexicana*.

Los resultados obtenidos en este trabajo tomados en conjunto demuestran que el SQ109 tiene un efecto notable contra el parásito *L. mexicana*, el cual es mucho más potente que el reportado para *T. cruzi*, lo cual apoya la idea de profundizar estos estudios orientados hacia la posible terapia contra la leishmaniasis, tomando en cuenta que esta droga, como se indicó, ya se encuentra en fase III desde el punto de vista clínico, contra la tuberculosis resistente a múltiples drogas.

7. CONCLUSIONES

1. El SQ109 tiene un efecto dosis-dependiente sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*, con un IC₅₀ de 0,35 µM y una CMI de 5 µM.
2. Además de afectar la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*, el SQ109 afecta la viabilidad de estos parásitos (IC₅₀: 0,45 µM), y no tiene un efecto significativo, en el rango de concentraciones que afectan la viabilidad de estos parásitos, sobre la viabilidad de macrófagos de la línea celular J774 (IC₅₀: 5,76 µM).
3. El SQ109 disminuye notablemente, de una forma dosis-dependiente, el número de macrófagos infectados con amastigotes de *L. mexicana*, estadio clínicamente relevante del parásito, con un IC₅₀ de 11,2 nM, sin mostrar un efecto significativo sobre los macrófagos murinos en el rango de concentraciones que afectan a los amastigotes de estos parásitos.
4. El SQ109 induce un incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular de promastigotes de *L. mexicana*, producto de la liberación de este catión de compartimientos intracelulares.
5. El SQ109 (5 µM) colapsa el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *L. mexicana* y a una concentración de 10 µM alcaliniza completamente los acidocalcisomas de estos parásitos. Ambos efectos indican que el Ca²⁺ proviene al menos parcialmente de estos compartimientos.
6. Todos estos resultados sugieren que el SQ109 es una droga con alto potencial leishmanicida.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2010. Introducción a la biología celular. Editorial Médica Panamericana, Tercera Edición, Madrid, España.
2. Alvar, J. 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: The first 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**: 298-319.
3. Andrews, K., Fisher, G., Skinner-Adams, T. 2014. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **4**: 95-111.
4. Basselin, M., Denise, H., Coombs, H., Barret, M. 2002. Resistance to pentamidine in *Leishmania 64exicana* involves 64exicana64 of the drug from the mitochondrion. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **46**: 3731-3738.
5. Beachy, S., Johnson, S., Olson, S., Berger, A. 2014. Drug repurposing and repositioning: Workshop summary. The National Academies Press, Primera Edición, Washington, DC, USA.
6. Becerril, M. 2011. Parasitología médica. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A., Tercera Edición, Distrito Federal, México.
7. Benaim, G., Romero, P. 1990. A calcium pump in plasma membrane vesicles from *Leishmania braziliensis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1027**: 79-84.
8. Benaim, G., Bermudez, R., Urbina, J. 1990. Ca²⁺ transport in isolated 64exicana64iso vesicles from *Leishmania braziliensis* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **39**: 61-68.
9. Benaim, G., Cervino, V., Hermoso, T., Felibert, P., Laurentin, A. 1993a. Intracellular calcium homeostasis in *Leishmania 64exicana*. Identification and characterization of a plasma membrane calmodulin-dependent Ca²⁺-ATPase. *Biol. Res.* **26**: 141-150.

10. Benaim, G., López-Estraño, C., Docampo, R., Moreno, S. 1993b. A calmodulin-stimulated Ca²⁺ pump in plasma membrane vesicles from *Trypanosoma brucei*. Selective inhibition by pentamidine. *Biochem. J.* **296**: 759-763.
11. Benaim, G., Cervino, V. 2000. Intracellular Calcium Homeostasis and Signaling in Trypanosomatids. *Elect. J. Pathol. Histol.* **6**: 1-11.
12. Benaim, G., Sanders, J., García-Marchán, Y., Colina, C., Lira, R., Caldera, A., Payares, G. y colaboradores. 2006. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J. Med. Chem.* **49**: 892-899.
13. Benaim, G., García, C. 2011. Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas disease and leishmaniasis – a review. *Trop. Biomed.* **28**: 471-481.
14. Benaim, G., Hernandez-Rodriguez, V., Mujica-Gonzalez, S., Plaza-Rojas, L., Silva, M., Parra-Gimenez, N., García-Marchán, Y. y colaboradores. 2012. In vitro anti-*Trypanosoma cruzi* activity of dronedarone, a novel amiodarone derivative with an improved safety profile. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **56**: 3720-3725.
15. Benaim, G., Paniz-Mondolfi, A. 2012. The emerging role of amiodarone and dronedarone in Chagas disease. *Nat. Rev. Cardiol.* **9**: 605-609.
16. Benaim, G., García-Marchán, Y., Reyes, C., Uzcanga, G., Figarella, K. 2013. Identification of a sphingosine-sensitive Ca²⁺ channel in the plasma membrane of *Leishmania 65exicana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **430**: 1091-1096.
17. Benaim, G., Casanova, P., Hernandez-Rodriguez, V., Mujica-Gonzalez, Parra-Gimenez, N., Plaza-Rojas, L., Concepción, J. y colaboradores. 2014. Dronadarone, an amiodarone analog with improved anti-*Leishmania 65exicana* efficacy. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **58**: 2295-2303.
18. Buckner, F., Urbina, J. 2012. Recent developments in sterol 14-demethylase inhibitors for Chagas disease. *Int. J. Parasitol.* **2**: 236-242.
19. Carafoli, E., Penniston, J. 1985. The calcium signal. *Sci. Am.* **253**:70-78.

20. Convit, J., Ulrich, M., Aranzazu, N., Castellanos, P., Pinardi, M., Reyes, O. 1986. The development of a vaccination model using two microorganisms and its application in leprosy and leishmaniasis. *Leprosy. Rev.* **57**: 263-273.
21. Croft, S., Coombs, G. 2003. Leishmaniasis: Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends. Parasitol.* **19**: 502-508.
22. Croft, S., Sundar, S., Fairlamb, A. 2006. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**:111-126.
23. Croft, S., Engel, J. 2006. Miltefosine-discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. *Transac. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.***1**: 54-58.
24. Cruz-Reyes, A., Camargo-Camargo, B. 2001. Glosario de términos en parasitología y ciencias afines. Plaza y Valdés, S.A., Primera edición, México D.F., México.
25. Davis, A., Kedzierski, L. 2005. Recent advances in antileishmanial drug development. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* **6**: 163-169.
26. De Lima, H., Borges, R., Escobar, J., Convit, J. 2010. Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela: un análisis clínico epidemiológico a nivel nacional y por entidad federal, 1988-2007. *Bol. Mal. Salud. Amb.***50**: 283-299.
27. De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabó, I., Rizzuto, R. 2001. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature.* **476**: 336-340.
28. Docampo, R., Vercesi, A. 1989. Ca²⁺ transport by coupled *Trypanosoma cruzi* mitochondria in Situ. *J. Biol. Chem.* **264**: 106-111.
29. Docampo, R., Scott, D., Vercesi, A., Moreno, S. 1995. Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* **310**: 1005-1012.
30. Docampo, R., Moreno, S. 1996. The role of Ca²⁺ in the process of cell invasion by intracellular parasites. *Parasitol. Today.* **12**: 61-65.

31. Docampo, R. 2008. Estructura y función de los acidocalcisomas. *Mensaje Bioquímico*. **32**: 11-24.
32. Docampo, R., Moreno, S. 2008. The acidocalcisome as a target for chemotherapeutic agents in protozoan parasites. *Curr. Pharm. Des.* **14**: 882-888.
33. Dunning, N. 2009. Review. Leishmania vaccines: From leishmanization to the era of DNA technology. *Biosci. Horiz.* **2**: 73-82.
34. Ebada, S., Edrada, R., Lin, W., Proksch, P. 2008. Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. *Nat. Protoc.* **3**:1820-1831.
35. Eibl, H., Unger, C. 1990. Hexadecylphosphocholine: a new and selective antitumor drug. *Cancer. Treat. Rev.* **17**: 233-242.
36. Engohang-Ndong, J. 2012. Antimycobacterial drugs currently in Phase II clinical trials and preclinical phase for tuberculosis treatment. *Expert Opin. Investig. Drugs.* **21**: 1789-1800.
37. Fernandez, M., Malchiodi, E., Algranati, I. 2011. Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania Mexicana* and mammalian cells. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **55**: 86-93.
38. Ferrari, M., Fornasiero, M., Isetta, A. 1990. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J. Immunol. Methods.* **131**: 165-172.
39. Gallego, J. 2006. Manual de Parasitología. Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. Publicaciones I Ediciones de la Universidad de Barcelona, Primera Edición, Barcelona, España.
40. Gaspar, B. 2016. Permeability of biological membranes. Springer International Publishing, Primera Edició, Suiza.

41. Ghannoum, M., Rice, L. 1999. Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**: 501-517.
42. Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol. Chem.* **260**: 3440-3450.
43. Hangland, R. (2002). Handbook of fluorescent probes and research products. Molecular Probes, Novena edición, Oregon, USA.
44. Heinrich, N., Dawson, R., du Bois, J., Narunsky, K., Horwith, G., Phipps, A., Nacy, C., Aarnoutse, R. y colaboradores. 2015. Early phase evaluation of SQ109 alone and in combination with rifampicin in pulmonary TB patients. *J. Antimicrob. Chem.* **70**:1558-1566.
45. Herwaldt, B. 1999. Leishmaniasis. *Lancet.* **354**: 1191-1199.
46. Jia, L., Tomaszewski, J., Hanrahan, C., Coward, L., Noker, P., Gorman, G., Nikonenko, B., Protopopova, M. 2005. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of SQ109, a new diamine-based antitubercular drug. *Br. J. Pharmacol.* **144**: 80–87.
47. Khan, K. 2013. DNA vaccines: roles against diseases. *Germs.* **3**: 26-35.
48. Lee, R., Protopopova, M., Crooks, E., Slayden, R., Terrot, M., Barry, C. 2003. Combinatorial lead optimization of [1,2]-diamines based on ethambutol as potential antituberculosis preclinical candidate. *J. Comb. Chem.* **5**: 172-187.
49. Li, K., Schurig-Briccio, L., Feng, X., Upadhyay, A., Pujari, V., Lechartier, B., Fontes, f. y colaboradores. 2014. Multitarget drug discovery for tuberculosis and other infectious diseases. *J. Med. Chem.* **57**: 3126-3139.
50. Lux, H., Heise, N., Klenner, T., Hart, D., Opperdoes, F. 2000. Ether-lipid (alkyl-phospholipid analog. *Mol. Biochem. Parasitol.* **111**: 1-14.
51. Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. 2004. Brock. Biología de los microorganismos. Pearson Educación, S. A., Décima Edición, Madrid, España.

52. Maravall, M., Mainen, Z., Sabatini, B., Svoboda, K. 2000. Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength ratioing. *Biophys. J.* **78**: 2655-2667.
53. Montenegro-Idrogo, J., Montañez-Valverde, R., Chian, C., Benites-Villafane, C. 2014. Leishmaniasis mucocutánea en un paciente con infección por VIH. *Rev. Chil. Infectol.* **31**: 610-614
54. Montuenga, L., Ruiz, F., Gonzáles, A. 2009. Técnicas en histología y biología celular. Elsevier Masson, Primera Edición, Barcelona, España.
55. Moreno, S., Docampo, R. 2003. Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 359-364.
56. Muelas-Serrano, S., Nogal-Ruiz, J., Gómez-Barrio, A. 2000. Setting of a colometric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol. Res.* **86**: 999-1002.
57. Mukherjee, S., Das, M., Sudhandiran, G., Shaha, C. 2002. Increase in cytosolic Ca²⁺ levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Biol. Chem.* **277**: 24717-24727.
58. Nicholls, D. G. 1987. Bioenergética. Introducción a la teoría quimiosmótica. Editorial Reverté, S. A., Primera Edición, Barcelona, España.
59. Nicholls, D., Ferguson, S. 1992. Bioenergetics 2. Academic Press, Segunda Edición, Londres.
60. Pandey, S., Suryawanshi, S., Gupta, S., Srivastava, L. 2005. Chemotherapy of leishmaniasis. Part II. Synthesis and bioevaluation of substituted arylketene dithioacetals as antileishmanial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **40**: 751-756.
61. Protopopova, M., Hanrahan, C., Nikonenko, B., Samala, R., Chen, P., Gearhart, J., Einck, L., Nacy, C. 2005. Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. *J. Antimicrob. Chem.* **56**: 968-974.

62. Ralph, P., Prichard, J., Cohn, M. 1975. Reticulum cell sarcoma: An effector cell in antibody-dependent cell-mediated immunity. *J. Immunol.* **114**: 898-905.
63. Sacksteder, K., Protopopova, M., Barry, C., Andries, K., Nacy, C. 2012. Discovery and development of SQ109: a new antitubercular drug with a novel mechanism of action. *Future Microbiol.* **7**: 823-837.
64. Sbaraglini, M., Vanrell, M., Bellera, C., Benaim, G., Carrillo, C., Talevi, A., Romano, P. 2016. Neglected tropical protozoan diseases: Drug repositioning as a rational option. *Curr. Top. Med. Chem.* **16**: 1-22.
65. Serrano-Martín, X., García-Marchán, Y., Fernandez, A., Rodríguez, N., Rojas, H., Visbal, G., Benaim, G. 2009a. Amiodarone destabilizes intracellular Ca²⁺ homeostasis and biosynthesis of sterols in *Leishmania 70exicana*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **53**: 1403-1410.
66. 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. Chemother.* **53**: 5108-5113.
67. Serrano-Martín, X. 2010. Quimioterapia contra la leishmaniasis: Estado del arte, retos y nuevas propuestas desde Venezuela. *Rev. Estud. Trans.* **2**: 69-75.
68. Silva-Jardim, I., Thiemann, O., Anibal, F. 2014. Leishmaniasis and Chagas disease chemotherapy: A critical review. *J. Braz. Chem. Soc.* **25**: 1810-1823.
69. Stehr, M., Elamin, A., Singh, M. 2014. Filling the pipeline – new drugs for an old disease. *Curr. Top. Med. Chem.* **14**: 110-129.
70. Tahlan, K., Wilson, R., Kastrinsky, D., Arora, K., Nair, V., Fischer, E., Barnes, S., y colaboradores. 2012. SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of trehalose

- monomycolate involved in mycolic acid donation to the cell wall core of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **56**: 1797-1809.
71. Twentyman, P., Luscombe, M. 1987. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br. J. Cancer*, **56**: 279-285.
72. Urbina, J., Payares, G., Contreras, L., Liendo, A., Sanoja, C., Molina, J., Piras, M. y colaboradores. 1998. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **42**: 1771-1777.
73. Urbina, J. 2006. Mechanism of action of lysophospholipid analogues against trypanosomatid parasites. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **100**: S9-S16.
74. Veiga-Santos, P., Li, K., Lameira, L., de Carvalho, T., Huang, G., Galizzi, M., Shang, N. y colaboradores. 2015. SQ109, a New drug lead for Chagas Disease. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **59**: 1950-1961.
75. Vercesi, A., Moreno, S., Docampo, R. 1994. Ca^{2+}/H^{+} exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. *Biochem. J.* **304**: 227-233.
76. World Health Organization (WHO). 2013. Leishmaniasis. Disponible en la página web: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> (Consulta: 24 de mayo de 2015).
77. Zerpa, O., Convit, J. 2009. Leishmaniasis cutánea difusa en Venezuela. *Gaz. Méd. Bahia.* **79**: 30-34
78. Zhivotovsky, B., Orrenius, S. 2011. Calcium and cell death mechanisms: A perspective from the cell death community. *Cell Calcium* **50**: 211-221.