



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

**Estudio del efecto de un metilendioxi-flavonoide aislado de
Iresine diffusa sobre la homeostasis intracelular del Ca^{2+} y la
viabilidad celular de *Leishmania mexicana***

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Yetsenia María De Gouveia Pontes, como requisito parcial para optar por el título de Licenciada en Biología.

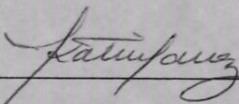
Tutor: Dr. Gustavo Benaim

CARACAS, VENEZUELA
MAYO - 2016

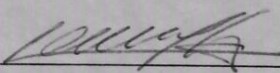
**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
DEL (A) Br. YETSENIA MARIA DE GOUVEIA PONTES**

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. Yetsenia María De Gouveia Pontes, C.I: 22.908.797, titulado "**Estudio del efecto de un metilendioxi-flavonoide aislado de *Iresine diffusa* sobre la homeostasis intracelular del Ca^{2+} y la viabilidad celular 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**.

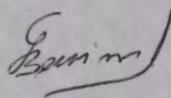
Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los dieciocho días del mes de Mayo del año 2016, dejando constar que el Prof. Gustavo Benaim actuó como coordinador del jurado examinador.



Dra. Katuska Chávez



Profa. Concepción Hernández



Prof. Gustavo Benaim
(Tutor- Coordinador)

Agradecimientos

Este 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 el apoyo del Fondo Nacional de Ciencias, Tecnología e Innovación, Venezuela (FONACIT) (Proyecto 2011000884), y el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico-Universidad Central de Venezuela (CDCH-UCV) (Proyecto PG-03-8728-2013-1).

A mis padres, por su amor infinito, enseñanzas y apoyo constante. Por darme aliento y fuerza para seguir siempre adelante, enfrentando las adversidades.

A mi tutor, el Dr. Gustavo Benaim, por darme la oportunidad de realizar mi trabajo especial de grado en su laboratorio. Por su orientación constante para la realización de este trabajo.

A mis amigas, por su amistad, su confianza y por siempre apoyarme: Francesca Coppola y Verónica García.

A los siguientes investigadores:

*** Instituto de Estudios Avanzados (IDEA)**

Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos: Lic. Vanessa Hernández, Lic. Jessica Rodríguez.

Por sus enseñanzas, asesoramiento y apoyo constante en la realización de este trabajo.

Por siempre estar dispuestas a ayudarme.

Laboratorio de Biología y Quimioterapia de Parasitosis Tropicales: Sr. Jorge Nuñez

Por su ayuda y asesoramiento en el conteo de macrófagos infectados.

*** Instituto de Biología Experimental (IBE)**

Laboratorio de Biofísica: Dra. Vincenza Cervino.

Laboratorio de Biología Celular: Dra. Elizabeth Valdivieso, Lic. Fabiola Mejías, Lic. Carlos Torrealba.

Por su asesoramiento y aporte de herramientas técnicas y experimentales.

Laboratorio de Inmunología y Quimioterapia: Dra. Cristina Sanoja, Dr. Gilberto Payares, Lic. María García.

Por su colaboración, aportes y consejos. Por su disposición en ayudarme en cualquier momento.

*** Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit” del Hospital José María Vargas**

Laboratorio de Bioquímica: Dra. María Argelia Polegre, Lic. Luisa Mavares, Lic. Marisol.

Por permitirme realizar unos experimentos en su laboratorio y poder así cumplir uno de los objetivos de este trabajo. Por su colaboración, disposición y apoyo constante. Por el aporte de suero fetal bovino, crucial para la culminación de este trabajo.

Laboratorio de Inmunología II: Dra. Zelandia Fermín.

Por su colaboración y aporte de la línea de macrófagos murinos J774-G8.

*** Universidad Central de Venezuela (U.C.V.)**

Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Farmacia: Dra. Alírica Suárez, Dra. Katiúska Chávez.

Por su contribución en aportar los compuestos naturales (Flavonoides) para la realización de este trabajo.

*A mis padres, Pedro y Egidia
A mi hermano, Pedro Eusébio*

*Caminante, son tus huellas
el camino y nada más;
caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.*

*Al andar se hace el camino,
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.*

*Caminante, no hay camino,
sino estelas en la mar.*

(“Cantares” XXIX, Antonio Machado (1875-1939))

Resumen

El hemoflagelado *Leishmania* es el causante de la leishmaniasis, la cual dependiendo de la especie infectante, puede generar tres patrones clínicos: leishmaniasis cutánea, mucocutánea o visceral. Es una de las enfermedades más desatendidas en todo el mundo y afecta principalmente a los países más pobres. El tratamiento actual para dicha enfermedad se basa en el uso de los antimoniales pentavalentes (glucantime y pentostam), así como también las drogas de segunda línea: la anfotericina B, la pentamidina y la paramomicina. Sin embargo, estas drogas poseen efectos tóxicos para los pacientes y algunos parásitos ofrecen resistencia a las mismas. Varios investigadores han orientado sus esfuerzos en estudiar nuevas drogas como alternativa para la cura de esta enfermedad, realizando diversos estudios con drogas de origen natural, con el fin de conseguir una acción parasitocida con baja toxicidad en humanos. En este trabajo, nos propusimos estudiar el efecto del 5-metoxi, 6,7-metilendioxi-flavona (Flavonoide 3), aislado de *Iresine diffusa* (variedad de Valeriana), sobre la proliferación celular de *L. mexicana* y macrófagos J774-G8 infectados con amastigotes de *L. mexicana*, observando mediante técnicas fluorimétricas, su efecto sobre la concentración del Ca^{2+} intracelular, el potencial electroquímico mitocondrial y los acidocalcisomas de estos parásitos. Se obtuvo un efecto inhibitorio dosis-dependiente sobre el crecimiento poblacional de la forma libre de estos parásitos con un IC_{50} de 12,62 μM . Igualmente, un efecto dosis dependiente del compuesto sobre el porcentaje de macrófagos infectados con amastigotes de *L. mexicana*, estimándose un IC_{50} de 1,47 μM a las 48 horas de tratamiento en presencia del compuesto. De igual forma, el Flavonoide 3 tiene un efecto rápido y total sobre la disipación del potencial electroquímico mitocondrial a una concentración 20 μM , así como un efecto directo sobre la alcalinización de los acidocalcisomas a 50 μM sobre los promastigotes de *L. mexicana*. Los resultados permiten sugerir que este compuesto modificado químicamente podría ser la base de un futuro tratamiento en contra de esta enfermedad.

Índice General

Agradecimientos	II
Resumen	V
Índice General	VI
Índice de Figuras	IX
1. Introducción	1
1.1 Tripanosomatidios	1
1.1.1 El género <i>Leishmania</i>	2
1.1.2 Características morfológicas y moleculares de <i>Leishmania</i> spp	3
1.1.3 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	3
1.2 Leishmaniasis	5
1.2.1 Leishmaniasis en Venezuela y el Mundo	8
1.3 El papel del ión Ca^{2+} en las células eucariotas superiores y tripanosomatidios	11
1.4 <i>Iresine diffusa</i> : Planta con propiedades farmacológicas	14
1.5 Flavonoides: Compuestos del metabolismo secundario de plantas	15
2. Antecedentes	18
2.1 Quimioterapia contra la leishmaniasis	18
2.1.1 Nuevas drogas leishmanicidas que actúan sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular	21
2.2 Flavonoides: Compuestos con alto potencial antiprotozoario	24
3. Objetivos	30
3.1 Objetivo general	30
3.2 Objetivos específicos	30
4. Materiales y Métodos	31
4.1 Materiales	31
4.2 Métodos	31

4.2.1	Cultivo celular	31
4.2.2	Contaje celular	32
4.2.3	Evaluación de la citotoxicidad de los flavonoides aislados de <i>Iresine diffusa</i>	33
4.2.4	Evaluación del crecimiento poblacional de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	33
4.2.5	Evaluación de la citotoxicidad sobre promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> y macrófagos J774-G8	34
4.2.6	Infección de macrófagos J774-G8 con promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	36
4.2.7	Determinación de la concentración del Ca^{2+} intracelular sobre poblaciones de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	38
4.2.8	Evaluación sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	42
4.2.9	Determinación de la alcalinización de los acidocalcisomas de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	44
5.	Resultados	47
5.1	Efecto del Flavonoide 3 sobre el crecimiento de poblaciones de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	49
5.2	Efecto del Flavonoide 3 sobre la viabilidad celular de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	50
5.3	Efecto del Flavonoide 3 sobre la viabilidad celular de macrófagos J774-G8	51
5.4	Efecto del Flavonoide 3 sobre macrófagos J774-G8 infectados con amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	52
5.5	Efecto del Flavonoide 3 sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	53
5.6	Efecto del Flavonoide 3 sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	55
5.7	Efecto del Flavonoide 3 sobre la alcalinización de los acidocalcisomas de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i>	58

6. Discusión	61
7. Conclusiones	68
8. Bibliografía	69

Índice de Figuras

Figura 1.	Morfología de las formas parasitarias de un tripanosomatidio	1
Figura 2.	Flebótomos	4
Figura 3.	Ciclo de vida del parásito <i>Leishmania</i> sp	5
Figura 4.	Lesiones características de leishmaniasis cutánea localizada	6
Figura 5.	Lesiones nodulares en un paciente con leishmaniasis cutánea difusa (LCD)	6
Figura 6.	Lesiones crónicas en la zona otorrinolaringológica en un individuo con leishmaniasis muco-cutánea (LCM)	7
Figura 7.	Distensión abdominal ó hepatoesplenomegalia ocasionada por inflamación del hígado y bazo	8
Figura 8.	Leishmaniasis en Venezuela y el Mundo	10
Figura 9.	Modelo esquemático de la regulación de Ca^{2+} en un tripanosomatidio (<i>Trypanosoma</i>)	13
Figura 10.	Planta adulta de <i>Iresine diffusa</i>	15
Figura 11.	Estructura básica de los flavonoides	16
Figura 12.	Estructuras de varios subgrupos de flavonoides	17
Figura 13.	Estructura química de los antimoniales pentavalentes	18
Figura 14.	Estructura química de la anfotericina B	19
Figura 15.	Estructura química de la pentamidina	20
Figura 16.	Estructura química de la paramomicina	20
Figura 17.	Estructura química de la amiodarona y la dronedarona	23
Figura 18.	Estructura química de la miltefosina	23
Figura 19.	Estructura química de la licochalcona A	25
Figura 20.	Estructura química de 2-hidroxi-4,4'-dimetoxichalcona (metoxichalcona)	26
Figura 21.	Estructura química de flavonoides glicósidos: fisetina, 3-hidroxi-7-O-metilflavona, luteolina	27
Figura 22.	Estructura química de la biochanina A (isoflavona)	27
Figura 23.	Estructura química del compuesto PMF	28
Figura 24.	Estructura química del 5-metoxi, 6,7-metilendioxi-flavona (Flavonoide 3)	29

Figura 25.	Espectro de excitación fluorescente de fura 2 en una solución que contiene 0-39,8 μ M de calcio libre	38
Figura 26.	Diagrama esquemático de los procesos implicados en las células de carga con fura 2, utilizando acetoximetil-derivado (AM) permeable a la membrana y clivado por esterasas produciendo fura 2	39
Figura 27.	Representación esquemática del sistema de detección fluorimétrica del Ca^{2+} mediante dos longitudes de onda de excitación	40
Figura 28.	Estructura química de la rodamina 123	43
Figura 29.	Espectro de excitación y emisión de la rodamina 123	43
Figura 30.	Estructura química de la naranja de acridina	45
Figura 31.	Espectro de excitación y emisión de la naranja de acridina	45
Figura 32.	Efecto citotóxico de diferentes flavonoides a tres concentraciones (5, 20 y 50 μ M) sobre la viabilidad celular de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	48
Figura 33.	Efecto del Flavonoide 3 sobre el crecimiento de poblaciones de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	49
Figura 34.	Efecto citotóxico del Flavonoide 3 sobre la viabilidad celular de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	50
Figura 35.	Efecto citotóxico del Flavonoide 3 sobre la viabilidad celular de macrófagos J774-G8	51
Figura 36.	Efecto del Flavonoide 3 sobre macrófagos murinos infectados con amastigotes de <i>L. mexicana</i>	52
Figura 37.	Efecto del Flavonoide 3 sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	54
Figura 38.	Efecto del Flavonoide 3 sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	56
Figura 39.	Efecto de diferentes concentraciones del Flavonoide 3 sobre el potencial electroquímico mitocondrial	57
Figura 40.	Efecto del Flavonoide 3 sobre la alcalinización de los acidocalcisomas de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	59

Figura 41. Efecto de diferentes concentraciones del Flavonoide 3 sobre la alcalinización **60**
de los acidocalcisomas de *L. mexicana*

1. Introducción

1.1 Tripanosomatidios

La familia Trypanosomatidae comprende diferentes parásitos causantes de importantes enfermedades en humanos y otros mamíferos. El cuerpo de los tripanosomatidios es usualmente fusiforme en las formas extracelulares y oval en las intracelulares (Figura 1). Además, 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, y que desaparece externamente, cuando viven como parásitos intracelulares (Gállego, 2006).

En el citoplasma, además del núcleo y restantes organelos citoplasmáticos, existe ocupando una gran parte del mismo, hasta el 12 % del volumen total del parásito (Benaim y col., 2006), una mitocondria muy desarrollada en la que se diferencia una región denominada kinetoplasto (Gállego, 2006), el cual aparece como un cuerpo electrodenso en la zona anterior (Villa, 2014).

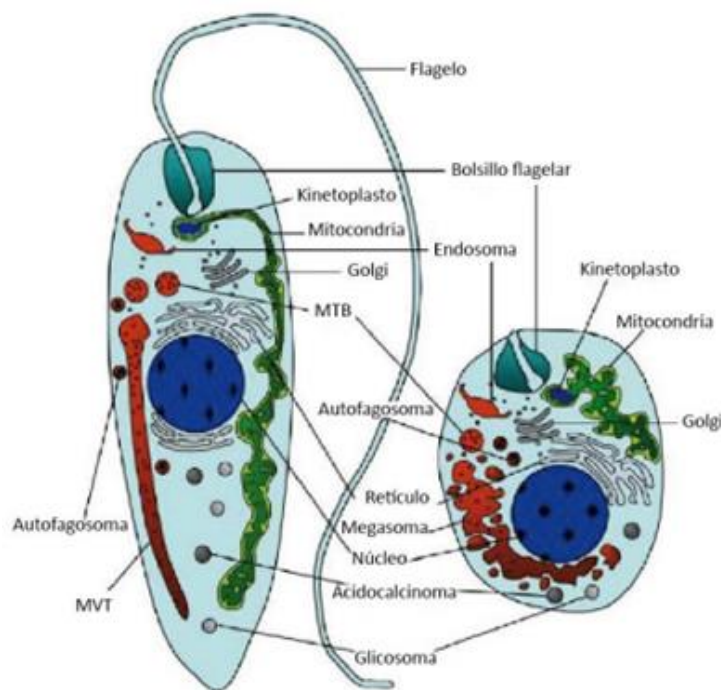


Figura 1. Morfología de las formas parasitarias de un tripanosomatidio (Villa, 2014).

1.1.1 El género *Leishmania*

Leishmania es un protozooario hemoflagelado intracelular obligatorio. Existen más de 20 especies del género *Leishmania* que infectan a humanos (Becerril, 2011), las cuales pueden generar tres manifestaciones clínicas que se clasifican como leishmaniasis cutánea, mucocutánea o visceral, dependiendo de la especie infectante y del sistema inmune del hospedador (Villa, 2014).

Leishmania pertenece al orden Kinetoplastida. En este sentido, desde el punto de vista de su biología molecular y genética, debe señalarse que *Leishmania* tiene dos genomas, nuclear y kinetoplástico, este último equivalente al genoma mitocondrial de los mamíferos (García, 2005).

El género *Leishmania* se divide en los subgéneros *Leishmania* (L.) y *Viannia* (V.) de acuerdo con el sitio de desarrollo en el intestino del díptero transmisor. *Leishmania* se localiza en el área suprapilórica (próxima a la probóscide), en tanto que *Viannia* se encuentra en el intestino medio y posterior (Becerril, 2011).

Por otra parte, el género *Leishmania* se clasifica taxonómicamente de la siguiente forma (García, 2005):

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophora

Orden: Kinetoplastida

Suborden: Trypanosomatina

Familia: Trypanosomatidae

1.1.2 Características morfológicas y moleculares de *Leishmania* spp

Leishmania spp posee características morfológicas y moleculares diferentes, dependiendo de su localización. 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 que se sitúa por delante del kinetoplasto. En el huésped vertebrado, el parásito se transforma en amastigote de localización intracelular con diámetro de 2.5 a 3.5 μm ; estas formas presentan un núcleo central y un kinetoplasto alargado, pudiéndose apreciar la existencia del bolsillo flagelar y un flagelo muy corto, que no sobresale de la bolsa flagelar (Basteiro y col., 2007). Las distintas especies de *Leishmania* se distinguen en la presentación clínica de la enfermedad que causan (Marín y col., 2008), también por presentar diferencias en los lipofosfogluanos (LPGs), de manera específica en las cadenas laterales que se ramifican desde la columna central de fosfosacáridos (Becerril, 2011), los cuales juegan un papel importante en la supervivencia del parásito en el mamífero, por su condición de afinidad con el macrófago (Vásquez y col., 2002). Además, se diferencian por las variaciones en el patrón y nivel de expresión de algunas moléculas como gp63 y gp46, variabilidad en el número de cromosomas (tal es el caso de *L. major* y *L. braziliensis*, por ejemplo), entre otras (Marín y col., 2008).

1.1.3 Ciclo de vida de *Leishmania*

La enfermedad se transmite mediante la picadura de la hembra hematófaga de moscas de la arena (jejenes), pequeños dípteros del género *Lutzomyia* (Figura 2A) en América y *Phlebotomus* (Figura 2B) en Europa. La hembra necesita sangre para el desarrollo de los huevos y adquiere el parásito al ingerirla con células infectadas de huéspedes vertebrados. En el intestino del transmisor, el parásito inicia un proceso de maduración y diferenciación que dura entre 4 y 25 días, en el cual los amastigotes se

transforman en promastigotes procíclicos, que se adhieren al epitelio del intestino medio del mosquito mediante sus LPGs. El promastigote procíclico se convierte en promastigote metacíclico infectivo y durante esta metaciclogénesis las moléculas de LPGs se sintetizan y sufren cambios en la composición de las cadenas laterales, lo que permite que el parásito se desprenda del epitelio intestinal y migre a la faringe y cavidad bucal del díptero. Al picar de nuevo, el mosquito inocula al promastigote infectivo en el huésped vertebrado, donde los macrófagos de la piel, células de Langerhans o monocitos circulantes lo fagocitan. Una vez dentro de los fagolisosomas de las células fagocíticas, los promastigotes se diferencian de nuevo a amastigotes, los cuales proliferan por fisión binaria. Los amastigotes que se liberan infectan células vecinas y el ciclo (Figura 3) se cierra cuando un nuevo mosquito pica al huésped vertebrado infectado (Becerril, 2011).



(A)



(B)

Figura 2. Hembras hematófagas pertenecientes al orden Diptera. **(A)** Hembra del género *Lutzomyia*. **(B)** Hembra del género *Phlebotomus*. Tomado de: <http://ciber-genetica.blogspot.com/2010/07/estudios-de-leishmaniasis-en-la-unam.html> [Consulta: 30 de mayo de 2015].

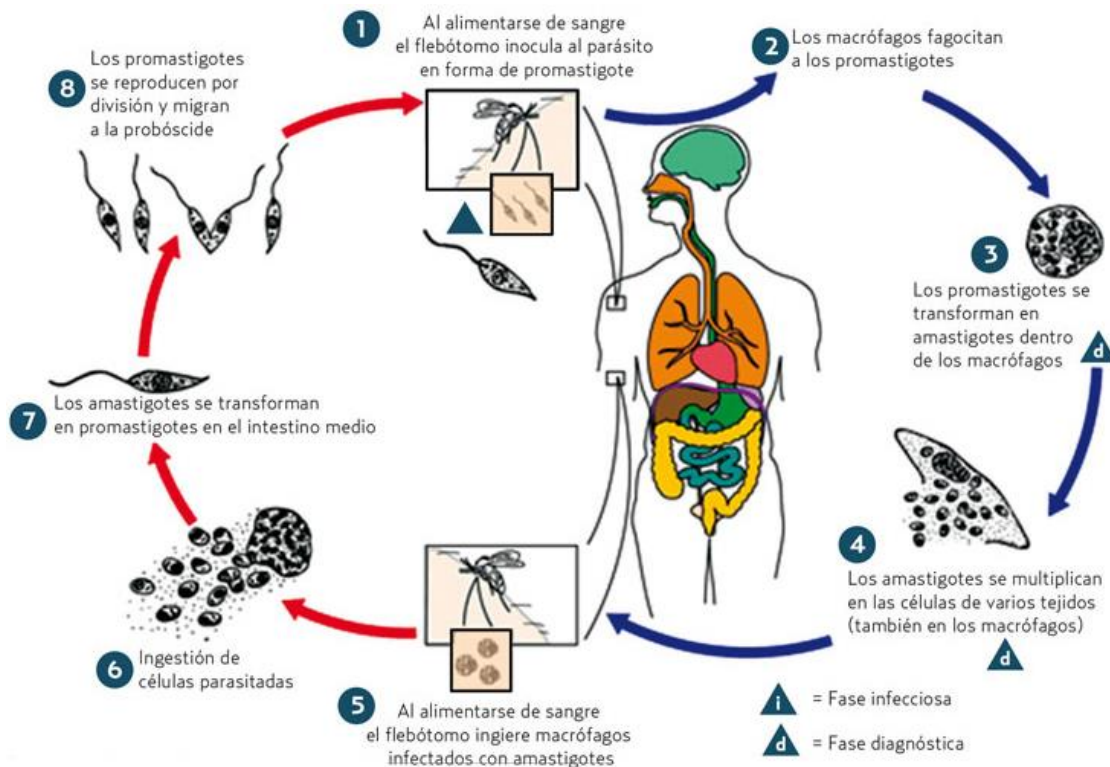


Figura 3. Ciclo de vida del parásito *Leishmania* sp. Tomado de: http://amf-semfyc.com/web/article_ver.php?id=1064 [Consulta: 30 de mayo de 2015].

1.2 Leishmaniasis

Según la especie de *Leishmania* se puede producir una infección cutánea, mucocutánea o visceral. La leishmaniasis cutánea es la forma más frecuente de esta enfermedad. Puede presentarse en dos formas clínicas: la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y la leishmaniasis cutánea difusa (LCD). En Venezuela, se ha reportado casos para *Leishmania mexicana* (Nuñez y col., 2012), la cual es el agente etiológico de la forma cutánea (Romero, 2007) y muco-cutánea (Salazar y Castro, 2001).

La LCL se distingue por la presencia de úlceras únicas o múltiples, redondeadas, de bordes indurados, fondo limpio e indoloro que aparecen en 15 a 20 días después de la picadura del vector infectado (Figura 4). Algunas veces los pacientes con LCL se

curan de manera espontánea en un lapso de 6 meses a 2 años, excepto cuando la lesión ocurre en la oreja, donde es crónica y mutilante (Becerril, 2011).



Figura 4. Lesiones características de leishmaniasis cutánea localizada (Becerril, 2011).

La LCD se caracteriza por la falta de respuesta inmune celular hacia antígenos de *Leishmania*, lo 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, salvo en el cuero cabelludo (Figura 5) (Becerril, 2011).



Figura 5. Lesiones nodulares en un paciente con leishmaniasis cutánea difusa (LCD). El macrófago de estas lesiones contiene abundantes amastigotes de *Leishmania* (Becerril, 2011).

Por otra parte, la leishmaniasis mucocutánea o cutánea mucosa (LCM) cursa con invasión y destrucción de la mucosa nasofaríngea y puede ser desfigurante (Figura 6). Las especies que causan esta forma clínica pertenecen al complejo *L. braziliensis*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) peruviana*. Además, se han reportado casos de LCM causada por *L. mexicana* (Salazar y Castro, 2001). Esta

forma clínica se desarrolla después que desaparecen las lesiones cutáneas y en ocasiones puede presentarse hasta 20 años después. Las lesiones se caracterizan por tener escasos parásitos y los daños son secundarios a la reacción inflamatoria que ocurre en las mucosas nasal, bucal y faríngea, y llevan a la degeneración del tabique nasal (Becerril, 2011).



Figura 6. Lesiones crónicas en la zona otorrinolaringológica en un individuo con leishmaniasis mucocutánea (LCM). Tomado de: <http://www.wynman.com/baylor.html> [Consulta: 7 de junio de 2015].

Por último, la leishmaniasis visceral (LV) cursa con hepatoesplenomegalia, fiebre intermitente, pérdida de peso, anemia y caquexia (Figura 7). En la India, la enfermedad se conoce como kala-azar o enfermedad negra en virtud de la hiperpigmentación que se observa en pacientes de esta región. La LV es letal en 100 % de los casos si no recibe tratamiento, y aún con éste la mortalidad puede llegar a 15 %. La fiebre es consecuencia de la liberación del factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés: *Tumor Necrosis Factor*) por los macrófagos infectados, que actúa sobre el centro termorregulador del hipotálamo (Becerril, 2011).



Figura 7. Distensión abdominal ó hepatoesplenomegalia ocasionada por inflamación del hígado y el bazo. Tomado de: <http://www.lookfordiagnosis.com> [Consulta: 1 de junio de 2015].

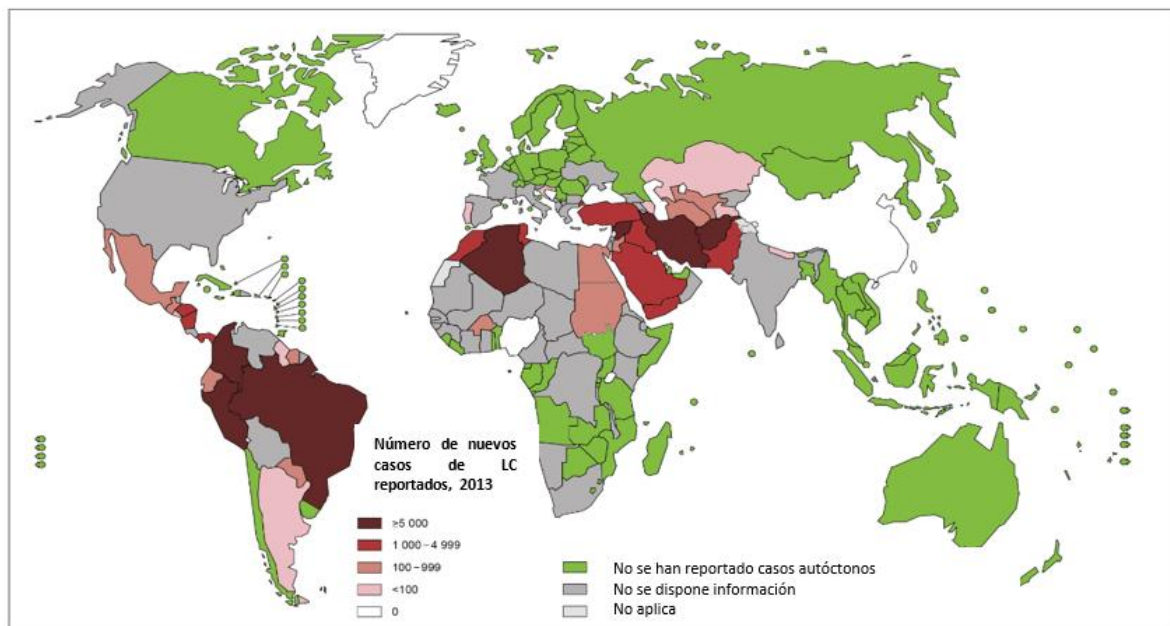
1.2.1 Leishmaniasis en Venezuela y el Mundo

Unas 350 millones de personas están expuestas al riesgo de contraer la enfermedad en 88 países del mundo, en su mayoría se trata de personas en situación de pobreza, en áreas de escasos recursos económicos o con mala distribución de sus riquezas (OMS, 2007). Esta parasitosis se contempla dentro del grupo de enfermedades tropicales desatendidas (NTDs, del inglés: *Neglected Tropical Diseases*). Es prevalente en 98 países, 3 territorios y los 5 continentes (Figura 8, panel superior). Se estiman unos 1.3 millones de casos nuevos al año, aunque en realidad solamente se reporta la mitad (Uribarren, 2015).

La LV constituye un problema de salud pública en Venezuela tanto por su morbilidad como por los cambios de comportamiento en su patrón epidemiológico, siendo de carácter endémico y focal, reportándose casos desde 1941 hasta el año 2012, con una tasa de incidencia promedio anual de 0,2 casos por cada 100.000 habitantes y una letalidad de 7,85 % (Romero y col., 2012).

Se han descrito tres principales focos de LV: un foco Central que comprende los estados Aragua, Carabobo, Guárico, Cojedes y Yaracuy; un foco Occidental conformado por los estados Falcón, Lara, Portuguesa, Trujillo y Zulia y un foco Oriental constituido por los estados Nueva Esparta, Sucre, Anzoátegui y Monagas. Según Zerpa y col., la región oriental tiene alta incidencia, especialmente Nueva Esparta y Anzoátegui, siendo común los focos urbanos y suburbanos. En el estado Aragua se ha visto la aparición de una serie de casos desde el año 2000 en diferentes municipios, estando el municipio Bolívar entre los de mayor importancia epidemiológica (Romero y col., 2012).

El registro nacional de leishmaniasis reportó un total de 64.843 casos de leishmaniasis cutánea (LC) para el lapso comprendido entre 1970 y 2007, según un estudio realizado por De Lima y col. en el 2010. Así, la distribución de las principales formas clínicas de LC en el territorio venezolano elaborada por De Lima y col. en el año 2010 se muestra en la figura 8, panel inferior.



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

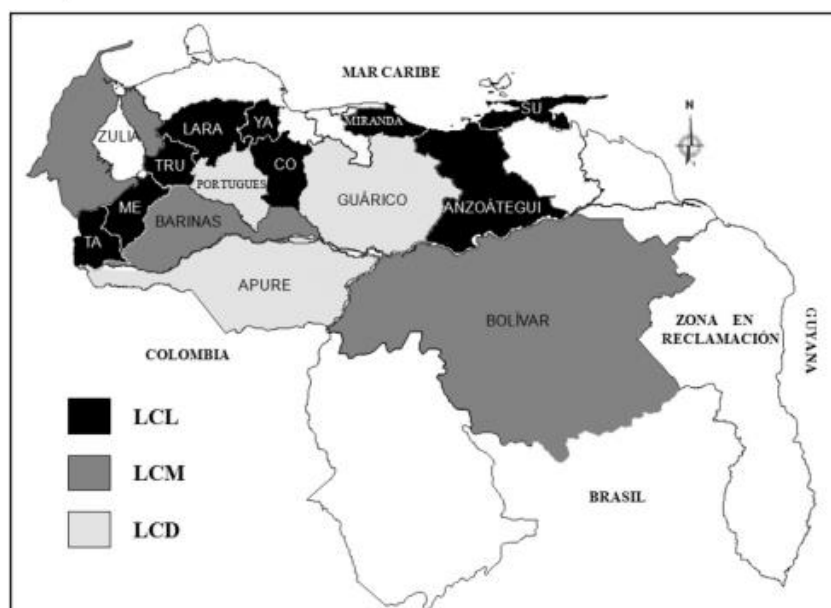


Figura 8. (Panel superior) Endemicidad global de la leishmaniasis cutánea (2012). Tomado de: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_CL_2013.png [Consulta: 30 de mayo de 2015].

(Panel Inferior) Distribución de las principales formas clínicas de leishmaniasis cutánea de acuerdo con los estados que presentan las mayores tasas de incidencia de cada una de ellas. Venezuela 1988-2007 (De Lima y col., 2010).

**Leyenda:* Leishmaniasis cutánea localizada (LCL); Leishmaniasis muco-cutánea (LCM); Leishmaniasis cutánea difusa (LCD). CO: Cojedes; ME: Mérida; SU: Sucre; TA: Táchira; TRU: Trujillo; YA: Yaracuy.

1.3 El papel del Ca^{2+} en las células eucariotas superiores y tripanosomatidios

El Ca^{2+} intracelular juega un rol especial como un segundo mensajero para el control de una variedad de funciones celulares en eucariotas, incluyendo contracción, secreción, división celular y diferenciación (Benaim, 2004). También se ha demostrado que este catión juega un papel fundamental en procesos importantes para la viabilidad celular en diferentes tripanosomatidios (Benaim, 1996). En estos microorganismos, se ha determinado que la concentración del Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) es alrededor de 50 nM, aún menor que la reportada en eucariontes superiores (Benaim, 1996). Sin embargo, estos parásitos poseen dos estadíos que dependiendo de su localización (extracelular o intracelular) encuentran una concentración de Ca^{2+} variable. En este sentido, estos parásitos poseen mecanismos muy eficientes para la regulación de este catión durante cada uno de esos estadíos, y durante el proceso de diferenciación (Benaim y García, 2011).

El Ca^{2+} gana acceso al interior celular a través de la membrana plasmática por medio de varios canales. La exportación activa del Ca^{2+} en células eucariotas es ejecutada mediante la acción de un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y una Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA, del inglés: *Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase*). Aunque no hay evidencia molecular para la presencia de un intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en tripanosomatidios, hay varios reportes de Ca^{2+} -ATPasas de tipo PMCA en diferentes protozoarios parásitos (Benaim, 2004). La Ca^{2+} -ATPasa de mamíferos es activada por la proteína calmodulina enlazadora de Ca^{2+} . Existe evidencia de la estimulación de la Ca^{2+} -ATPasa por la calmodulina en *T. cruzi* (Benaim y col., 1995), *Leishmania braziliensis* (Benaim y col., 1990) y *Leishmania donovani* (Mazumder y col., 1992).

La regulación del Ca^{2+} citoplasmático es realizado por tres organelos: el retículo endoplasmático; la única mitocondria presente en estos parásitos; y el acidocalcisoma, un compartimiento ácido que está dedicado a la acumulación de pirofosfatos (como

moneda energética alternativa al ATP) y a la bioenergética del parásito (Benaim y García, 2011).

El mayor almacenamiento de Ca^{2+} en células es usualmente establecido en el retículo endoplasmático (ER), con concentraciones locales que alcanzan niveles en el orden de milimolar. El ER también posee dos rutas independientes para la entrada y salida del Ca^{2+} . La entrada es catalizada por la bien estudiada Ca^{2+} -ATPasa de retículo sarco-endoplasmático (SERCA) que transloca activamente 2 Ca^{2+} por 1 molécula de ATP. El ER tiene varios tipos distintos de canales que están involucrados en la liberación del Ca^{2+} (Moreno y Docampo, 2003).

La mitocondria del parásito posee un uniporte mitocondrial de Ca^{2+} (CMU, del inglés: *Calcium Mitochondrial Uniporter*) en la membrana interna el cual utiliza la diferencia de potencial electroquímico entre el lumen mitocondrial y el citoplasma como la fuerza motriz para la acumulación de este catión. Este sistema de transporte de Ca^{2+} mitocondrial es caracterizado por una baja afinidad por Ca^{2+} pero una alta capacidad para la acumulación del catión. Cabe destacar que este uniporte mitocondrial de Ca^{2+} ha sido identificado a nivel molecular recientemente (De Stefani y col., 2011). Todas esas características son muy similares al transporte de Ca^{2+} mitocondrial en mamíferos (Benaim y col., 1990).

Los acidocalcisosomas, sin embargo, son organelos ácidos con altos niveles de pirofosfatos y polifosfatos que son capaces de acumular grandes cantidades de Ca^{2+} . Están presentes en diversos microorganismos, incluyendo algas (Ruiz y col., 2001) y en mohos de fango o moldes de limo (Marchesini y col., 2002), y se asemejan con organelos relacionados a lisosomas (LRO, del inglés: *Lysosome-Related Organelles*) de células de mamíferos, donde comparten características morfológicas, propiedades ácidas, el contenido de fósforo y un sistema para la orientación de sus proteínas de la membrana (Docampo y col., 2010). En acidocalcisosomas se ha mostrado que poseen una Ca^{2+} -ATPasa de tipo PMCA, involucrada en la entrada de Ca^{2+} similar a la Ca^{2+} -

ATPasa vacuolar de otros eucariotas unicelulares, y un H^+ -pírofosfatasa vacuolar, involucrada en su acidificación (Docampo y Moreno, 2001). Todos esos sistemas, que operan de forma concertada, contribuyen al mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, manteniendo su $[Ca^{2+}]_i$ bajo 100 nM, muy por debajo de la concentración extracelular (la cual está en el orden mM), permitiendo así que este catión realice una función esencial en la señalización celular (Serrano y col., 2009a). En este sentido, la descripción de la figura 9 explica en detalle de forma puntual los mecanismos involucrados en la regulación del Ca^{2+} en un tripanosomatidio del género *Trypanosoma*.

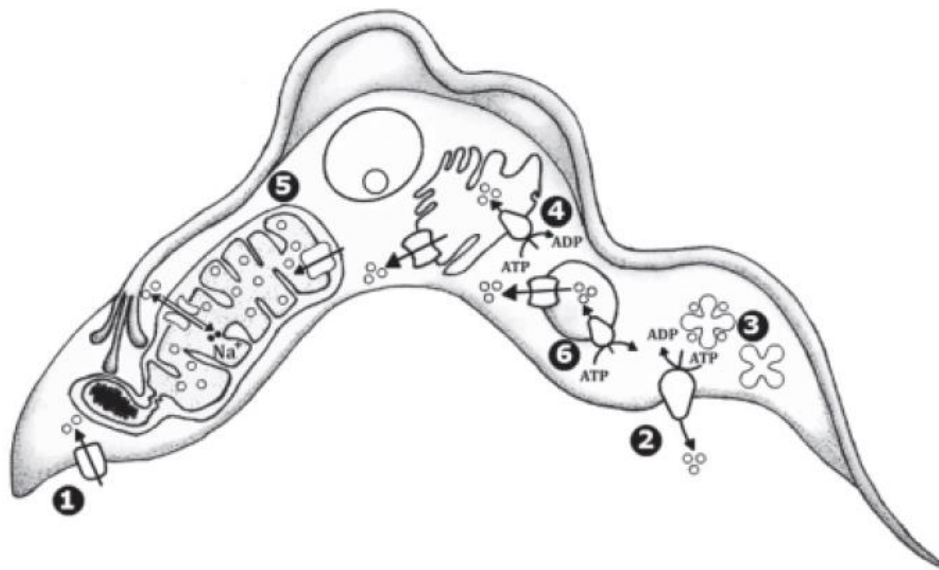


Figura 9. Modelo esquemático de la regulación del Ca^{2+} en un tripanosomatidio (*Trypanosoma*). El Ca^{2+} entra en la célula a través de un canal de Ca^{2+} (1), y se extruye fuera de la célula por una bomba de Ca^{2+} de membrana plasmática (PMCA) (2), que es estimulada por la calmodulina (CaM) tras la unión al Ca^{2+} (3). Dentro de la célula, el Ca^{2+} puede ser secuestrado con alta afinidad por el retículo endoplásmico a través de una bomba SERCA (4), dejando este organelo mediante un canal de Ca^{2+} aún no identificado. La gran mitocondria única (5) puede transportar Ca^{2+} con baja afinidad, por un uniporte mitocondrial de Ca^{2+} (CMU), que es muy similar al recientemente caracterizado en humanos, y también energizado por el potencial electroquímico. El Ca^{2+} intramitocondrial (lumen) podría ser transportado al citoplasma por un intercambiador no electrogénico Ca^{2+}/Na^+ (o Ca^{2+}/H^+). Finalmente, los acidocalcisomas (6) pueden acumular grandes cantidades de Ca^{2+} por una PMCA, facilitado por la gran cantidad de polifosfatos dentro de este orgánulo (Benaim y García, 2011).

1.4 *Iresine diffusa*: Planta con propiedades farmacológicas

El género *Iresine* (Amaranthaceae), extendido por todo el mundo, incluye 35 especies. Sin embargo, sólo unos pocos estudios fitoquímicos y farmacológicos de las especies *Iresine* han sido publicados (Bussmann y Glenn, 2010). Algunas especies de *Iresine* son ampliamente utilizados en la medicina tradicional de diversos países de América con diferentes propósitos.

Iresine diffusa, la especie de la cual se extrajo el flavonoide que se utilizará en el presente estudio (Figura 10), es una planta herbácea o subarborescente, ramosa principalmente en la base, de hasta 2 metros, posee rizomas superficiales de color rojizo. Las hojas son ovalo-lanceoladas o lanceoladas. Las flores son blancas, en amplias panojas piramidales, con espigas alargadas y raquis veloso o pubescente de aspecto blanquecino (Faccini y col., 2007). Esta planta es de uso común en el Perú para tratar las hemorragias, inflamaciones de ovario y la malaria (Celine y col., 2009). En México, la especie ha sido utilizada por los mayas para el tratamiento de varias enfermedades como la malaria, la fiebre tifoidea y el cáncer de próstata (Schmidt y col., 2009); se conoce igualmente que en Argentina se utiliza como remedio para las mordeduras de serpientes (Camargo, 2011). En Venezuela, donde se le conoce popularmente como valeriana, se reconoce con propiedades sedantes (Suárez y col., 2016).



Figura 10. Planta adulta de la especie *Iresine diffusa*. Tomado de: <http://www.fcagr.unr.edu.ar/Extension/Agromensajes/25/5AM25.htm> [Consulta: 15 de noviembre de 2015].

1.5 Flavonoides: Compuestos del metabolismo secundario de plantas

Los flavonoides son un grupo amplio de compuestos polifenólicos que poseen un núcleo básico de flavano con dos anillos aromáticos (A y B) interconectados por un anillo heterocíclico de tres átomos de carbono (anillo C) (Figura 11). La mayoría de los flavonoides contienen un doble enlace entre el C-2 y C-3 y un grupo ceto en el C-4 del anillo C, el cual está unido al anillo B en el C-2 (flavona) o en el C-3 (isoflavona). Debido a diferentes modificaciones en los tres anillos, principalmente el anillo C, los flavonoides representan uno de los grupos más grandes y la clase más diversa de metabolitos secundarios en plantas (Harborne y Williams, 2000).

Estos compuestos se encuentran naturalmente en vegetales y frutas, siendo componentes importantes de la dieta diaria (Harborne y Williams, 2000). Se sabe desde hace mucho tiempo que los flavonoides ejercen diversos efectos biológicos como antioxidantes, agentes anticancerígenos, antimicrobianos, etc. (Harborne y Williams, 2000). Además, estos compuestos actúan como señales químicas o marcadores florales

que sirven para guiar a las abejas y otros insectos polinizadores hacia el néctar, facilitando indirectamente la polinización (Peters y col., 1996). En algunos casos indican a los insectos que la planta que los contiene es apropiada para su alimentación, comportándose como estimulador del apetito y de la masticación de determinados insectos; en otros casos indica al insecto que la planta que los posee es un lugar apropiado para depositar sus huevos, por lo que los flavonoides actúan como estimuladores de la ovoposición y también, en algunos casos, funcionan como señales para determinadas plantas parásitas, indicando que la planta que los posee es susceptible de ser invadida por la parásita (Nakasato, 2000; Lah y col., 2000; Yamasaki y col., 1997).

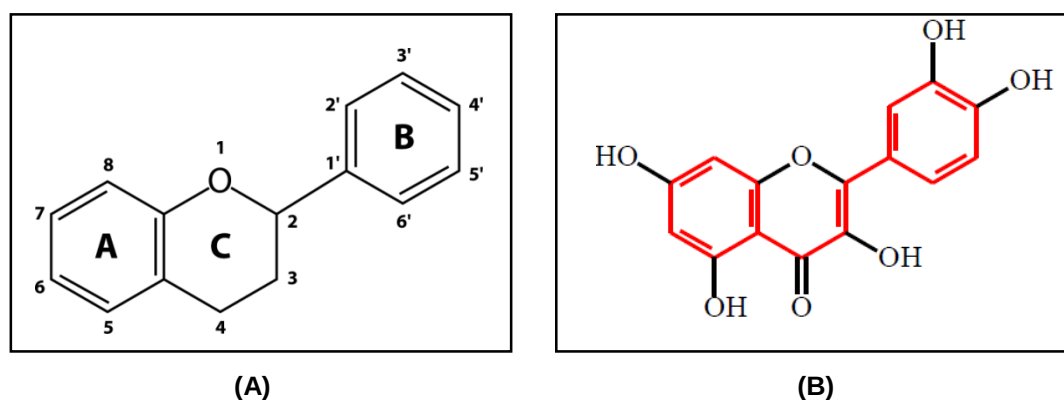
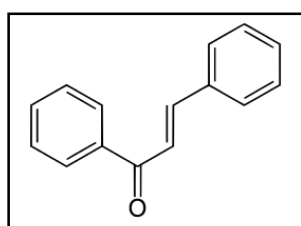
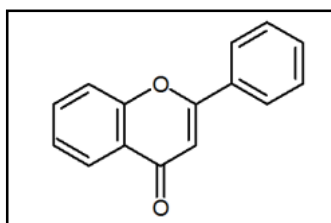


Figura 11. (A) Estructura básica de los flavonoides. Tomado de: <http://www.fitoquimicos.com/Flavonoides.html> [Consulta: 20 de mayo de 2016]. **(B)** Estructura química de uno de los flavonoides más comúnmente hallados en naturaleza: la quercetina. Nótese en color rojo la estructura básica de los flavonoides (Martínez, 2005).

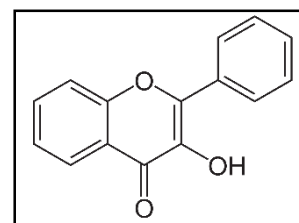
Varios subgrupos de flavonoides son clasificados de acuerdo con las variantes estructurales que presenta el anillo C. En esta clasificación son de suma importancia el estado de oxidación del anillo heterocíclico y la posición del anillo B (Cartaya y Reynaldo, 2001). Ejemplos de estos subgrupos se muestran en la Figura 12: chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos, rotenoides, entre otros (Martínez, 2005).



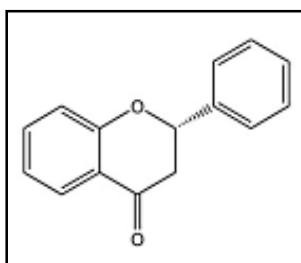
Chalconas



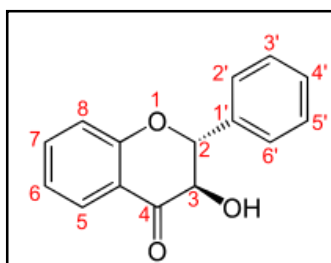
Flavonas



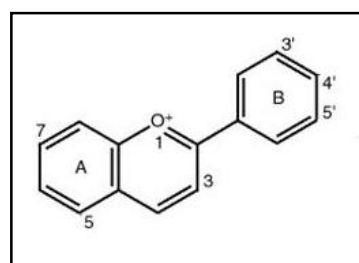
Flavonoles



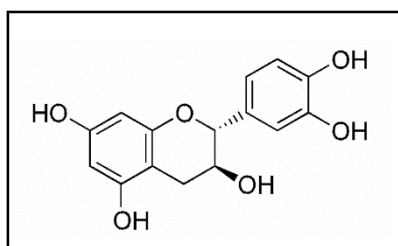
Flavanonas



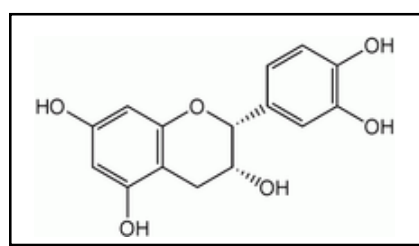
Flavanonoles



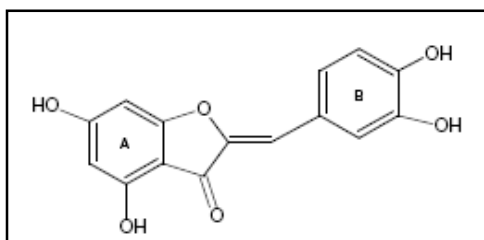
Antocianidinas



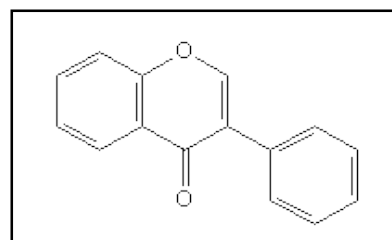
Catequinas



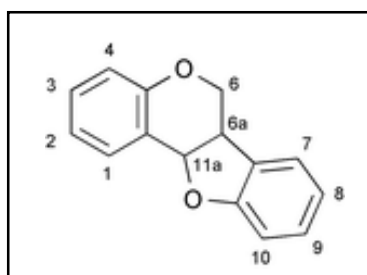
Epicatequinas



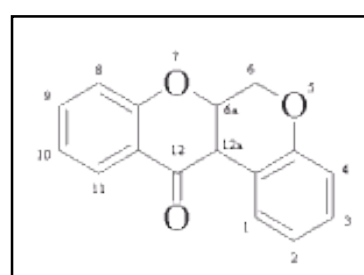
Auronas



Isoflavonas



Pterocarpanos



Rotenoides

Figura 12. Estructuras químicas de varios subgrupos de flavonoides. Tomado de: http://www.beekeeping.com/articulos/salamanca/origen_propoleos_1.htm [Consulta: 31 de junio de 2015].

2. Antecedentes

2.1 Quimioterapia contra la leishmaniasis

Los fármacos actualmente recomendados para el tratamiento de la leishmaniasis (WHO, 1995) incluye los antimoniales pentavalentes: estibogluconato de sodio (pentostam) y antimoniato de meglumina (glucantime) (Figura 13). Los antimoniales se introdujeron por primera vez en 1945 y se mantienen como tratamientos eficaces para algunas formas de leishmaniasis, pero el requisito del prolongado tiempo de tratamiento (mínimo de 28 días de la administración parenteral), la eficacia variable contra LV y LC y la aparición de una resistencia significativa, son factores limitantes en la utilidad de estos medicamentos. El reciente interés en la investigación sobre nuevas drogas se ha centrado, en gran medida, en confirmar la eficacia de los medicamentos genéricos de bajo costo (Moore y col., 2001) y elucidar, al menos, el mecanismo de acción y cómo los parásitos se han vuelto resistentes a los medicamentos. Además, dichos antimoniales tienen efectos tóxicos en el ser humano sobre riñón, corazón e hígado (Pandey y col., 2005).

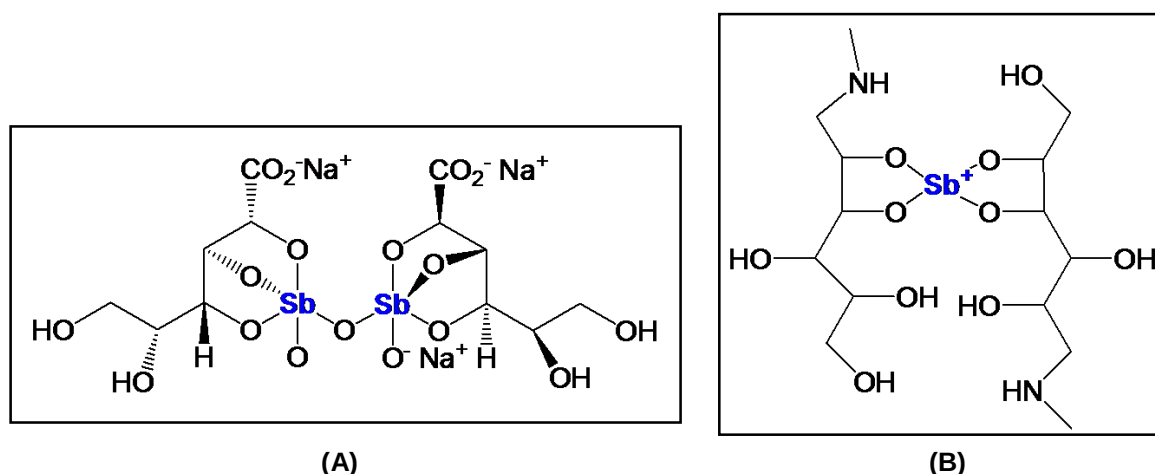


Figura 13. (A) Estructura química del estibogluconato de sodio (pentostam). **(B)** Estructura química del antimoniato de meglumina (glucantime).

Tomado de: <http://www.intechopen.com/books/leishmaniasis-trends-in-epidemiology-diagnosis-and-treatment/metal-based-therapeutics-for-leishmaniasis> [Consulta: 27 de abril de 2016].

Como drogas de segunda línea se emplea la anfotericina B, la pentamidina y la paramomicina.

La anfotericina B (Figura 14) es un antibiótico poliénico y fungicida de amplio espectro. La posología es de 1 mg/kg/día durante 20 días (Singh y Sivakumar, 2004). Es selectivo frente a hongos, *Leishmania* y *Trypanosoma*, debido a su gran afinidad por el ergosterol (predominante en estos microorganismos). La anfotericina B forma canales en la membrana del parásito provocando la pérdida de iones y solutos intracelulares, llevándolo finalmente a la muerte. Entre sus efectos secundarios se encuentran la fiebre, resfriado, dolor de huesos y a largo plazo puede causar hipopotasemia o nefrotoxicidad. La anfotericina B liposomal, ha mejorado su actividad y ha reducido los efectos secundarios, siendo considerada como el mejor fármaco para leishmaniasis visceral, y es usada como el tratamiento de primera línea en Europa y Estados Unidos, caso que no es posible en los países en desarrollo debido a su costo elevado (Chappuis y col., 2007).

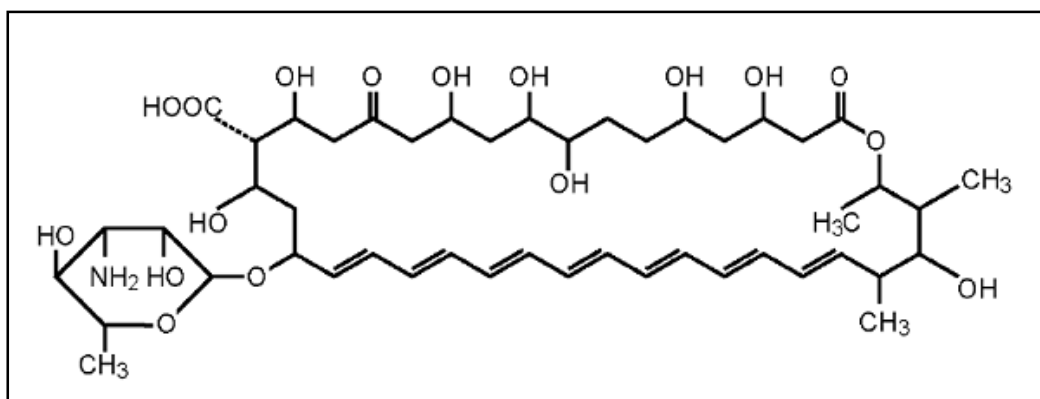


Figura 14. Estructura química de la anfotericina B. Tomado de: <http://www.life-worldwide.org/esp/fungal-diseases/amphotericin-B> [Consulta: 27 de abril de 2016].

La pentamidina (Figura 15) es uno de los fármacos utilizados como segunda opción si los antimoniales pentavalentes no son efectivos. Su mecanismo de acción parece implicar la inhibición de la síntesis del DNA, y afecta la morfología del

kinetoplasto y el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) (Amato y col., 2008). Su administración es parenteral y la aparición de resistencia es muy rápida, por lo cual su uso se ha visto disminuido (Singh y Sivakumar, 2004).

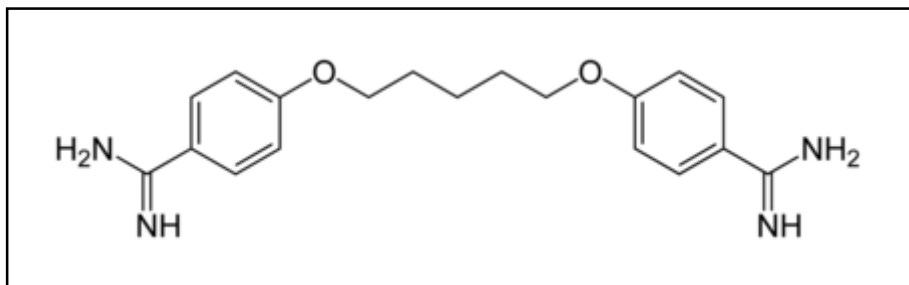


Figura 15. Estructura química de la pentamidina. Tomado de: <http://www.wikiwand.com/es/Pentamidina> [Consulta: 27 de abril de 2016].

La paramomicina (Figura 16) es un antibiótico aminoglucósido también conocido como aminosidina. Se presenta como una alternativa eficaz, segura y económica. Se ha utilizado en ensayos clínicos de fase III (demostración o confirmación del beneficio terapéutico (Johan y Speers, 2010)), administrado por vía parenteral en el tratamiento de la leishmaniasis visceral (14-16 mg/kg/día por 3 semanas), y de forma tópica o parenteral en la forma cutánea. Aunque este fármaco posee una gran actividad frente a patógenos (Davidson, 2009), algunas cepas de *Leishmania* en zonas de África se han mostrado resistentes a este fármaco. En cuanto a su toxicidad, se han observado algunos casos de signos subclínicos de ototoxicidad y nefrotoxicidad (Villa, 2014).

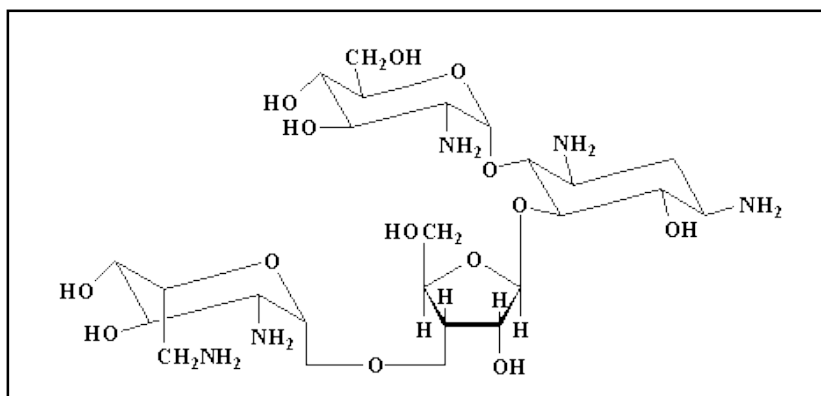


Figura 16. Estructura química de la paramomicina. Tomado de: <https://data.epo.org/publication-server> [Consulta: 27 de abril de 2016].

En vista de la toxicidad y los efectos secundarios de estas drogas utilizadas en la quimioterapia contra la leishmaniasis, se ha hecho necesaria intensificar la investigación en la búsqueda de nuevas drogas como alternativa para la cura de esta enfermedad.

2.1.1 Nuevas drogas leishmanicidas que actúan sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular

En células de mamíferos, el esterol predominante en las membranas es el colesterol, mientras que en *Leishmania* spp es el 5-dehidroepisterol. Además, se ha demostrado que la presencia de este esterol es fundamental para su supervivencia (Serrano y col., 2009b). Las enzimas involucradas en la biosíntesis de esteroides son distintas en humanos y parásitos, validando así estas enzimas como potenciales blancos de acción leishmanicida (Urbina y Docampo, 2003). En este sentido, un estudio realizado por Croft y Coombs en 2003 utilizando azoles, tales como ketoconazol, muestra que éste inhibe la 14α -demetilasa, una enzima clave en la ruta de la biosíntesis de esteroides. Además, Benaim y col. en 2006 encontraron que la amiodarona, como muchos otros azoles, bloquea la síntesis de ergosterol en *T. cruzi* (agente causal del Mal de Chagas), el cual es igualmente esencial para la supervivencia de ese parásito. Asimismo, Serrano y col. en 2009b demostraron que este compuesto también inhibe la síntesis de esteroides en *L. mexicana* a nivel del escualeno epoxidasa, siendo éste esencial para la síntesis de 5-dehidroepisterol.

La amiodarona, un antiarrítmico de clase III comúnmente usado para tratar severas cardiopatías, ha sido el sujeto de recientes estudios como un antimicótico y agente parasiticida, ya que esta droga posee excelentes propiedades farmacocinéticas y un costo muy bajo. Esta droga actúa sobre *T. cruzi* y *L. mexicana* causando disrupción de la homeostasis intracelular del Ca^{2+} , a través de la acción directa no sólo en la mitocondria, sino también en los acidocalcisomas. Sin embargo, la amiodarona produce

toxicidad en la tiroides, debido a la presencia de yodo en su estructura (Figura 13). Es por ello que, Benaim y col. en 2012 se propusieron utilizar un derivado de la amiodarona sobre *T. cruzi*, denominado dronedarona, el cual fue sintetizado con varias modificaciones estructurales, incluyendo el reemplazo del 2,5-diyodofenilo con un grupo fenil no sustituido y la incorporación de un grupo sulfonamida (Figura 17), destinada a reducir parte del fuerte carácter lipofílico del fármaco original.

La dronedarona y la amiodarona actúan a través del mismo mecanismo de acción, mediante la alteración de la homeostasis intracelular del Ca^{2+} de los parásitos, como una consecuencia de un efecto directo del compuesto sobre el potencial electroquímico mitocondrial y también a través de la alcalinización de los acidocalcisomas (Benaim y col., 2012a). Debido a la acción efectiva de la dronedarona sobre *T. cruzi*, Benaim y col. en otro estudio realizado en el 2014, estudiaron el efecto de este compuesto sobre *L. mexicana* y además, lo compararon con la amiodarona. Estos investigadores obtuvieron una potente actividad de la dronedarona contra amastigotes intracelulares en macrófagos, con un IC_{50} de 0,65 nM, en el cual la proliferación celular de la célula huésped no fue inhibida. Este efecto es similar al observado previamente con amiodarona pero ocurre más rápidamente y a una concentración 1000 veces menor. La dronedarona incrementa la concentración del Ca^{2+} intracelular debido a la liberación del Ca^{2+} de la mitocondria y de los acidocalcisomas. Así, la dronedarona no sólo es más potente que la amiodarona contra *L. mexicana* sino que se conoce que tiene menos efectos adversos en humanos (Benaim y col., 2014).

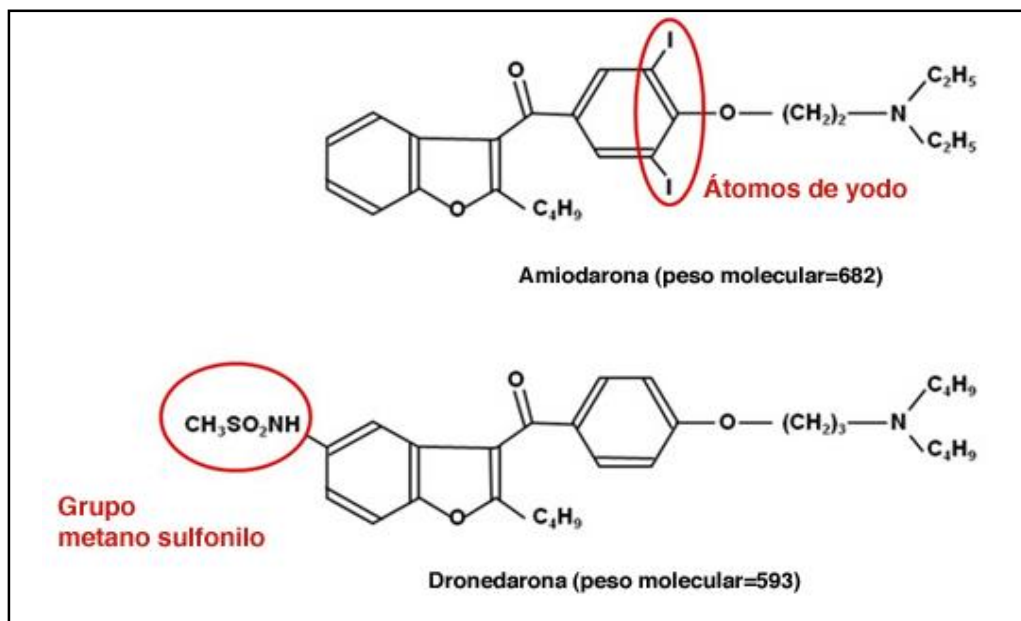


Figura 17. Estructura química de la amiodarona y la dronedarona. Véase que la amiodarona posee dos átomos de yodo, a diferencia de la dronedarona. Tomado de: <http://www.fibrilacionauricularonline.es/default.aspx?idPage=4134> [Consulta: 7 de junio de 2015].

Otra de las drogas utilizadas contra la leishmaniasis es la miltefosina (Figura 18), un alquil-lisofosfolípido con una potente actividad leishmanicida. Sin embargo, la miltefosina presenta una serie de efectos adversos, ya que induce teratogenicidad y presenta potencial desarrollo de resistencia (Croft y Engel, 2006).

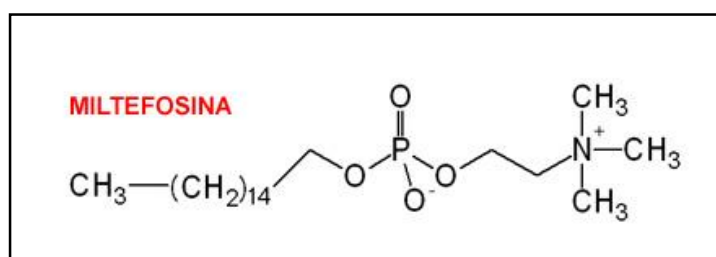


Figura 18. Estructura química de la miltefosina. Tomado de: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/m045.htm> [Consulta: 7 de junio de 2015].

En un estudio realizado en nuestro laboratorio (Serrano y col., 2009a), encontraron que la miltefosina genera un rápido incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en

promastigotes de *L. mexicana*. Este incremento específico inducido por la miltefosina es debido probablemente a la activación de un canal de Ca^{2+} presente en la membrana plasmática, no caracterizado aún (Serrano y col., 2009a), pero probablemente asociado al recientemente descrito canal de Ca^{2+} sensible a la esfingosina, análogo del canal de Ca^{2+} voltaje dependiente tipo *L* de humanos (Benaïm y col., 2013; Sbaraglini y col., 2016).

2.2 Flavonoides: Compuestos con alto potencial antiprotozoario

Muchas investigaciones están enfocadas a buscar nuevas terapias contra el parásito, proponiendo compuestos derivados de plantas (Ramírez y col., 2010).

Los flavonoides representan una fuente inmensa para la búsqueda de nuevos candidatos de fármacos contra protozoarios, cuyo descubrimiento es apremiante, ya que algunos de estos parásitos, como se mencionó anteriormente, han incrementado su resistencia en forma gradual hacia las drogas convencionales, por lo que es necesario una mayor disponibilidad de agentes quimioterapéuticos que sean más efectivos, menos tóxicos y que ofrezcan un menor costo del tratamiento en regiones endémicas (Ramírez y col., 2010).

Se han realizado muchos estudios con el fin de estudiar la actividad de flavonoides contra los protozoarios que afectan más frecuentemente a los seres humanos: *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Entamoeba*, *Giardia* y *Trichomonas* (Ramírez y col., 2010).

Los investigadores Chen y col. en 1993 encontraron que la licochalcona A (Figura 19), una chalcona oxigenada aislada de las raíces de *Glycyrrhiza glabra*, inhibió el crecimiento *in vitro* de promastigotes y amastigotes de *L. major* y *L. donovani*, encontrando que los amastigotes son más susceptibles a este compuesto a una concentración de 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Además reportaron que el organelo blanco de estas moléculas parece ser la mitocondria del parásito. Por otro lado, examinando la actividad

antiparasitaria de la licochalcona A en roedores infectados con *L. major*, se encontró que la administración intraperitoneal en ratones infectados evitó el desarrollo de las lesiones, mientras que en hámsteres infectados con *L. donovani* redujo más del 96 % las lesiones producidas por el parásito en hígado y bazo (Chen y col., 1994).

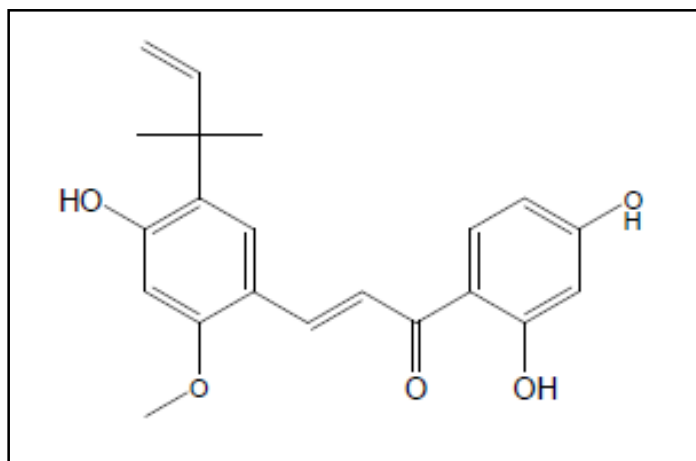


Figura 19. Estructura química de la licochalcona A (Ramírez y col., 2010).

Investigando el probable mecanismo de acción de la licochalcona A, estudios con microscopía electrónica mostraron que esta molécula altera la estructura de la mitocondria de promastigotes y amastigotes de *L. major*, de una manera dependiente de la concentración y sin dañar los organelos del macrófago o su función fagocítica. Además, estudios sobre la función de la mitocondria mostraron que la licochalcona A inhibe la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial (Zhai y col., 1995). Adicionalmente, reportaron que la licochalcona A también inhibe la actividad de la fumarato reductasa en promastigotes de *L. major* y en su mitocondria, e inhibe la fumarato reductasa solubilizada y la fumarato reductasa purificada de *L. donovani*. Debido a que esta enzima no existe en células de mamífero, ésta podría ser un blanco excelente para el diseño de una droga leishmanicida (Chen y col., 2001).

En un estudio enfocado a evaluar la actividad antileishmanial *in vitro* de 20 chalconas aisladas de plantas contra promastigotes de *L. donovani*, *L. infantum*, *L. enriettii* y *L. major*, y, contra amastigotes de *L. donovani* en macrófagos murinos, la

mayoría de los compuestos fueron activos contra el parásito extracelular con un IC_{50} entre 0,07 y 2,01 $\mu\text{g/mL}$. Algunas de ellas, como 2',4'-dihidroxi-4-metoxichalcona (Figura 20), 2'-hidroxi-3,4-dimetoxichalcona y 2-hidroxi-4,4'-dimetoxichalcona, inhibieron la sobrevivencia intracelular de *L. donovani* con valores de IC_{50} entre 0,39 y 0,41 $\mu\text{g/mL}$ (Kayser y Kiderlen, 2001).

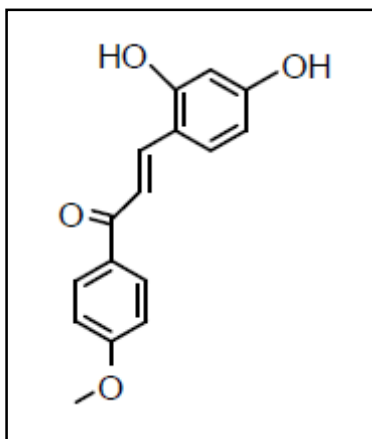


Figura 20. Estructura química de 2-hidroxi-4,4'-dimetoxichalcona (metoxichalcona) (Ramírez y col., 2010).

Por otro lado, flavonoides glicósidos también han sido reportados con actividad antileishmanial *in vitro*. Los más potentes fueron fisetina, 3-hidroxiavona, luteolina (Figura 21) y quercetina con valores de IC_{50} de 0,6, 0,7, 0,8 y 1,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente; solo la quercetina inhibió en un 15,3 % la infección en ratones Balb/c inoculados con *L. donovani* (Tasdemir y col., 2006). Otros investigadores encontraron que este tipo de flavonoides poseen la capacidad para estimular mecanismos de defensa en células infectadas con *Leishmania*, ya que inducen liberación de TNF (factor de necrosis tumoral) e IL-6, esenciales en la proliferación y diferenciación de las células inmunocompetentes (Ercil y col., 2005).

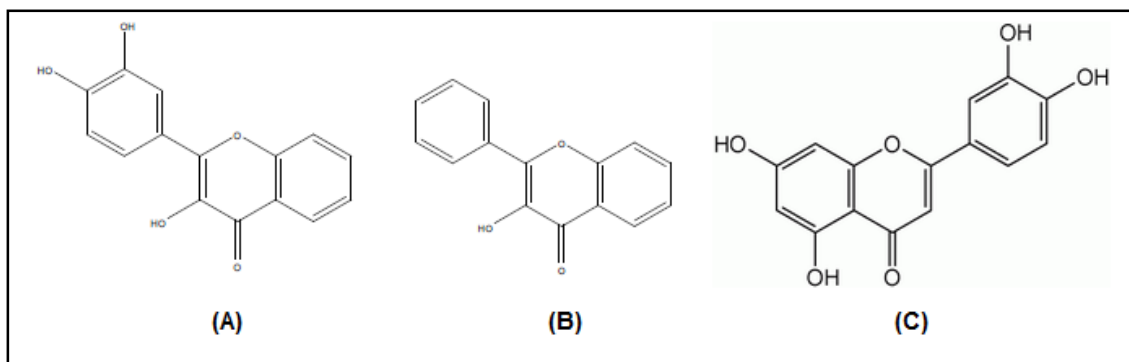


Figura 21. Estructura química de flavonoides glicosidos: **(A)** fisetina, **(B)** 3-hidroxiflavona, **(C)** luteolina (Ramírez y col., 2010).

Estudiando las propiedades contra *Leishmania* de la isoflavona biochanina A (Figura 22), aislada de *Cassia fistula*, se reportó que este compuesto posee un IC_{50} de 18,96 $\mu\text{g/mL}$ contra promastigotes de *L. chagasi*, la cual fue alta si se compara con la de la pentamidina, la cual es de 0,09 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, fue 10 veces menos tóxica que la pentamidina en macrófagos peritoneales, sugiriendo que podría ser usada como prototipo para estudios de relaciones cuantitativas actividad-estructura en el desarrollo de nuevas drogas contra varias especies de *Leishmania* (Sartorelli y col., 2009).

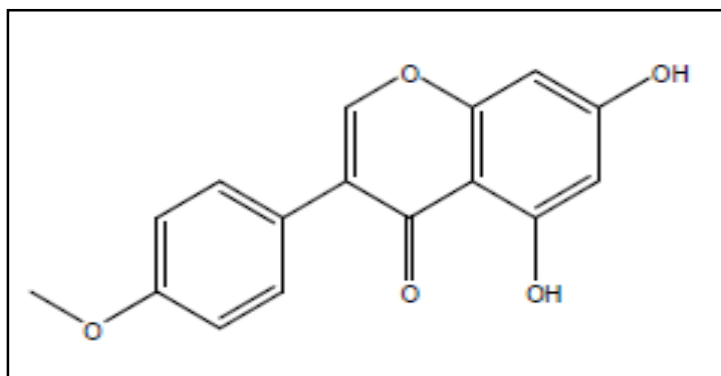


Figura 22. Estructura química de la biochanina A (isoflavona) (Ramírez y col., 2010).

Por otra parte, Yeimy Nieves y col. en 2014 en un estudio realizado en nuestro laboratorio (resultados no publicados), utilizando el flavonoide 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona (PMF) (Figura 23) aislado de *Croton caracasana*, reportó un IC_{50} de 16,62 μM sobre la viabilidad de promastigotes de *L. mexicana*. Asimismo, estudió el

efecto del compuesto sobre la $[Ca^{2+}]_i$ y obtuvo que PMF a 10 μM incrementa la $[Ca^{2+}]_i$ mediante la liberación de este catión desde compartimientos intracelulares.

Adicionalmente, con el fin de determinar el efecto de la PMF sobre el potencial electroquímico mitocondrial y la alcalinización de los acidocalcisomas en promastigotes de *L. mexicana*, los parásitos se cargaron con el fluoróforo rodamina 123 y naranja de acridina, respectivamente. Luego de la adición de PMF a una concentración de 10 μM se evidenció un aumento en la fluorescencia, indicando que este compuesto es capaz de desestabilizar el potencial electroquímico mitocondrial y alcalinizar los acidocalcisomas de estos parásitos.

El estado clínicamente relevante de *L. mexicana* es cuando éste se encuentra en su forma amastigote. Por tal motivo, estos investigadores estudiaron el efecto de la PMF sobre macrófagos de la línea J774-G8 infectados con amastigotes de *L. mexicana* y observaron que la PMF es capaz de disminuir el porcentaje de macrófagos infectados, con un IC_{50} de 0,48 μM .

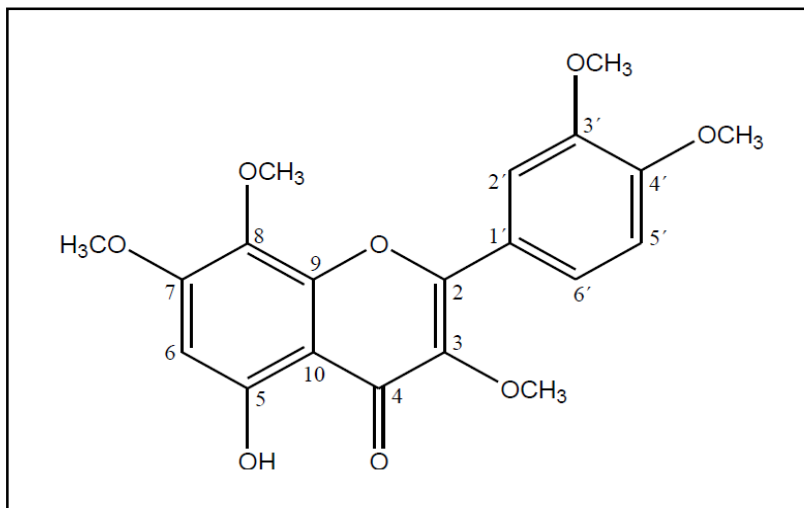


Figura 23. Estructura química del compuesto PMF (Chávez, 2013).

Recientemente, se realizó un estudio farmacológico y fitoquímico de la especie *Iresine diffusa*, presente en nuestro país (Suárez y col., 2016). Estos investigadores aislaron y purificaron 4 compuestos pertenecientes al grupo de los flavonoides. Los compuestos son: 5-metoxi, 6, 7-metilendioxi-coumaronocromena (Diffusanin), 3,5-

dimetoxi, 6,7-metilendioxi-flavona (Flavonoide 2), 5-metoxi, 6,7-metilendioxi-flavona (Flavonoide 3) y 3-hidroxi, 6,7-metilendioxi-flavonol (Flavonoide 4).

El compuesto Flavonoide 3, perteneciente al subgrupo de las flavonas, fue el que se escogió para ser estudiado en el presente trabajo. Su estructura molecular se muestra en la figura 24.

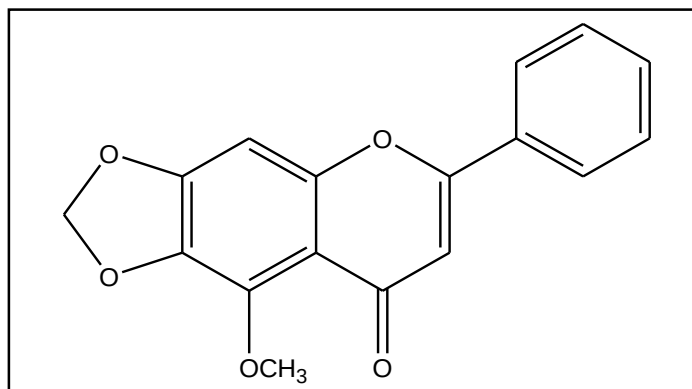


Figura 24. Estructura química del 5-metoxi, 6,7-metilendioxi-flavona (Flavonoide 3) (Suárez y col., 2016).

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

El objetivo general de este trabajo es determinar el efecto del 5-metoxi, 6,7-metilendioxi-flavona (Flavonoide 3) sobre la viabilidad de promastigotes y amastigotes intracelulares de *Leishmania mexicana* y sobre la homeostasis intracelular del Ca^{2+} , el potencial electroquímico mitocondrial y la alcalinización de acidocalcisomas en poblaciones de promastigotes de *Leishmania mexicana*.

3.2 Objetivos específicos

- * Determinar el efecto del Flavonoide 3 sobre el crecimiento de poblaciones de promastigotes de *Leishmania mexicana*.
- * Evaluar el efecto citotóxico del Flavonoide 3 sobre la viabilidad celular de promastigotes de *Leishmania mexicana*.
- * Evaluar el efecto citotóxico del Flavonoide 3 sobre la viabilidad celular de células de mamíferos, específicamente en macrófagos J774-G8, provenientes de sarcoma de ratón.
- * Determinar el efecto del Flavonoide 3 sobre macrófagos J774-G8 infectados con amastigotes de *Leishmania mexicana*.
- * Determinar el efecto del Flavonoide 3 sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular de promastigotes de *Leishmania mexicana*.
- * Evaluar el efecto del Flavonoide 3 sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *Leishmania mexicana*.
- * Evaluar el efecto del Flavonoide 3 sobre la alcalinización de los acidocalcisomas de promastigotes de *Leishmania mexicana*.

4. Materiales y Métodos

4.1 Materiales

Las soluciones y medios de cultivo se prepararon utilizando reactivos provenientes de diferentes casas comerciales: SIGMA (St. Louis, MO), BIO-RAD, GibcoBRL (MD, EEUU) y Molecular Probes Inc. OR.

El medio de cultivo DMEM (del inglés: *Dulbecco's Minimal Essential Medium*) y el suero fetal bovino (SFB) activado fueron adquiridos de GibcoBRL (MD, EEUU). El dimetil-sulfóxido (DMSO), el carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona (FCCP), la nigericina, la penicilina y la estreptomina se obtuvieron de SIGMA (St. Louis, MO). El fura-2AM, la rodamina 123 y la naranja de acridina fueron adquiridos de Molecular Probes Inc. OR.

El Flavonoide 3 fue disuelto en dimetil-sulfóxido (DMSO) para la obtención de un stock a una concentración de 15,83 mM. Cabe destacar que la concentración de DMSO nunca fue mayor al 0,05 % en todos los ensayos.

4.2 Métodos

4.2.1 Cultivo celular

*** Cultivo de promastigotes**

Para el estudio del efecto antiparasitario del Flavonoide 3, se trabajó con cultivos de parásitos de la especie *Leishmania mexicana* (BEL21). Los promastigotes se cultivaron a temperatura ambiente, sin agitación, en medio de cultivo LIT (del inglés: *Liver Infusion Tryptose*) suplementado con 5 % SFB inactivado por calor (60 °C, 30 min) y 1 % de penicilina/estreptomina.

* Cultivo de macrófagos

Los macrófagos de la línea celular J774-G8 provenientes de sarcoma de ratón (Murray, 1981) se cultivaron en frascos T-25 con medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % SFB activado, 1 % de penicilina/estreptomicina y 1 % de L-glutamina. Los cultivos se mantuvieron en la cámara a 37 °C y 7 % de CO₂.

Cabe destacar que los macrófagos murinos utilizados en el experimento de infección (sección 4.2.6), se cultivaron en el medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % de SFB inactivado por calor (60 °C, 30 min), 1 % penicilina/estreptomicina y 1 % L-glutamina.

4.2.2 Contaje celular

Para la realización de los experimentos, se estimó el número de promastigotes presentes en el cultivo celular mediante el contaje directo en la cámara de Neubauer. Para ello, se realizó una dilución $1/50$ de una suspensión de parásitos en buffer fosfato salino 1X (PBS, del inglés: *Phosphate Buffered Saline*) (95 mM Na₂HPO₄ (anhidro), 5 mM NaH₂PO₄·2H₂O, 73 mM NaCl). Posteriormente, una dilución $1/2$ de la suspensión celular anterior con formaldehído 3 %. Así, se procedió al contaje añadiendo 10 µL de la última dilución en la cámara de Neubauer. Se calculó la concentración de células (cél/mL) utilizando la siguiente fórmula:

$$C = \frac{\text{Número de células contadas por cuadrante externo} \times \text{Factor de dilución} \times 10.000}{4}$$

Donde el volumen de cada cuadrante externo (cada uno con 16 subcuadrantes) es constante e igual a 0,0001 mL.

El número de macrófagos se determinó por conteo directo en la cámara de Neubauer. Se realizó una dilución $1/50$ de una suspensión de macrófagos en PBS. Posteriormente, una dilución $1/2$ de la suspensión celular anterior con azul de tripano 0,4 %. Así, se procedió al conteo añadiendo 10 μ L de la última dilución en la cámara de Neubauer. Se contaron las células vivas (no teñidas de azul) utilizando los cuadrantes externos de la cámara. Para calcular la concentración celular (cél/mL), se utilizó la misma fórmula descrita anteriormente para los promastigotes.

4.2.3 Evaluación de la citotoxicidad de los flavonoides aislados de *Iresine diffusa*

Todos los flavonoides estudiados previo a la elección del compuesto objeto de estudio de este trabajo, fueron suministrados por la Dra. Alírica Suárez, perteneciente al Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela. Para ello, se realizaron experimentos de citotoxicidad con los distintos compuestos utilizando concentraciones de 5, 20 y 50 μ M, a fin de obtener el más efectivo sobre la viabilidad celular de estos parásitos. Además, se utilizó la dronedarona 1 μ M como control positivo. El procedimiento para el ensayo de citotoxicidad de todos los compuestos se explica de forma detallada en la sección 4.2.5, donde se procedió de la misma manera con el compuesto elegido: el Flavonoide 3.

4.2.4 Evaluación del crecimiento poblacional de promastigotes de *Leishmania mexicana*

La susceptibilidad de los promastigotes de *L. mexicana* al Flavonoide 3, se evaluó a través del crecimiento poblacional de los parásitos en ausencia y presencia de concentraciones crecientes del compuesto (0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M y 50 μ M). En una placa de cultivo de 24 pozos, se colocó $2 \cdot 10^6$ cél/pozo en 1 mL del medio

de cultivo LIT suplementado con SFB al 5 % y 1 % de penicilina/estreptomicina, colocado previamente en cada pozo. Posteriormente, se agregó a cada pozo las diferentes concentraciones del Flavonoide 3. Para cada concentración del compuesto se realizaron tres réplicas. La proliferación celular (reportada como parásitos por mililitro (parásitos/mL)) se determinó diariamente mediante el conteo directo en la cámara de Neubauer, hasta alcanzar la fase estacionaria del cultivo.

El IC₅₀ (concentración inhibitoria del 50 % del crecimiento celular) se determinó mediante el programa *GraphPad Prism 5 Demo*. Para ello, se aplicó una regresión no lineal de los datos normalizados a las 48 horas de tratamiento *versus* el logaritmo de las concentraciones utilizadas del compuesto.

4.2.5 Evaluación de la citotoxicidad sobre promastigotes de *Leishmania mexicana* y macrófagos J774-G8

El ensayo de citotoxicidad o MTT se utiliza para determinar el posible efecto citotóxico de un agente sobre líneas celulares tumorales o cultivos primarios de células normales. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color morado (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y viabilidad celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido (Pardo, 2006).

Para evaluar de la citotoxicidad (Mosmann, 1983) en promastigotes de *L. mexicana*, se prepararon concentraciones del compuesto Flavonoide 3 mediante diluciones seriadas en medio de cultivo LIT, partiendo del stock a 15,83 mM. En una placa de Petri se colocó un volumen de parásitos del cultivo celular (contado

previamente) con medio de cultivo LIT suplementado con SFB al 5 % y 1 % de penicilina/estreptomicina. Con una pipeta multicanal, se procedió a añadir 190 μ L de la suspensión preparada, en la placa de ELISA de 96 pozos, a fin de tener una concentración de $3 \cdot 10^5$ parásitos/pozo. Posteriormente, se añadió 10 μ L de las diluciones seriadas del compuesto preparadas a fin de tener por pozo cada una de las concentraciones del Flavonoide 3 deseadas (1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M y 50 μ M), miltefosina 15 μ M (control positivo), digitonina 80 μ M (blanco) y medio LIT (control negativo) en cada pozo correspondiente, teniendo en cuenta cuatro réplicas para cada condición. Se incubó la placa en condiciones de humedad por 72 horas.

Finalizado el período de incubación, se centrifugó a 4 °C por 20 minutos a 1600 xg, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 100 μ L de MTT (0,5 mg/mL en PBS). Se incubó en oscuridad por 4 horas a 37 °C, en atmósfera de CO₂ (7 %).

Posteriormente, se centrifugó a 20 °C por 10 minutos a 1600 xg, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 100 μ L de DMSO (Carmichael y col., 1987). Finalmente, se realizó la lectura de la absorbancia a 570 nm en un lector de ELISA. El valor de la absorbancia obtenida con la digitonina 80 μ M se restó a todas las concentraciones utilizadas del compuesto y a los controles. La digitonina es un detergente no iónico que forma poros en las membranas al interactuar con los esteroides (Ouhabi y col., 1998).

Por otra parte, el ensayo de citotoxicidad en macrófagos murinos se realizó siguiendo los mismos pasos descritos anteriormente para los promastigotes de *L. mexicana*, con la diferencia que se utilizó Tritón X-100 0,1 % como blanco y se colocó 5.000 células/pozo en la placa de ELISA de 96 pozos. Además, el valor de la absorbancia obtenida con el Tritón X-100 0,1 % se restó a todas las concentraciones utilizadas del compuesto. El tritón es un detergente no iónico que desnatura las membranas celulares causando lisis celular (Salcedo y col., 2009).

El IC₅₀ (concentración inhibitoria del 50 % de la viabilidad celular) se determinó mediante el programa *GraphPad Prism 5 Demo*. Para ello, se aplicó una regresión no lineal de los datos normalizados a las 72 horas de tratamiento *versus* el logaritmo de las concentraciones utilizadas del compuesto.

El Índice de selectividad (IS) se determinó como el cociente entre el IC₅₀ de los macrófagos y el IC₅₀ de los promastigotes (Herrera, 2011).

4.2.6 Infección de macrófagos J774-G8 con promastigotes de *Leishmania mexicana*

Para la evaluación del compuesto en los macrófagos murinos infectados con amastigotes de *L. mexicana*, se procedió de la forma establecida por Benaim y col., 2014 con modificaciones aportadas por el Laboratorio de Biología Celular – IBE.

Se procedió a despegar los macrófagos de la superficie del contenedor de plástico T-25 en el que se encuentran, mediante el uso de removedores de células y PBS 1X estéril. Luego, en una placa de 12 pozos se colocó una laminilla estéril de vidrio cubreobjeto por cada pozo y se agregaron 15.000 macrófagos/pozo en medio de cultivo DMEM (suplementado con SFB inactivado al 10 %, 1 % penicilina/estreptomicina y 1 % L-glutamina). Seguidamente, se incubaron las placas con los macrófagos durante 24 horas en la cámara a 37 °C y 7 % de CO₂.

Posteriormente, se tomó un volumen de parásitos del cultivo celular y se colocó en un tubo *eppendorf*. Se centrifugó 600 xg durante 3 minutos y el sedimento se resuspendió en el medio de cultivo DMEM (suplementado con SFB inactivado al 10 %, 1 % penicilina/estreptomicina y 1 % L-glutamina). Se procedió a determinar la concentración celular mediante el conteo directo en la cámara de Neubauer.

Finalizado el tiempo de incubación de los macrófagos, se agregó un volumen de parásitos (previamente resuspendidos en medio de cultivo DMEM) para obtener una

proporción de 10 parásitos/célula, es decir, $1,5 \cdot 10^5$ parásitos. Seguidamente, se incubaron las placas en la cámara a 37 °C y 7 % CO₂, durante 3 horas.

Una vez pasado el tiempo de incubación, se retiró el medio de cada pozo y se realizó un lavado con PBS 1X. Se procedió a agregar 1 mL de medio de cultivo DMEM fresco (suplementado con SFB inactivado al 10 %, 1 % penicilina/estreptomicina y 1 % L-glutamina) con las concentraciones del Flavonoide 3 (0,2 µM, 0,5 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM y 25 µM) deseadas por pozo. Seguidamente, se incubaron las placas en la cámara a 37 °C y 7 % CO₂, durante 48 horas.

Finalizado el período de incubación, se retiró el medio de cultivo DMEM de cada pozo y se realizó un lavado con PBS 1X estéril para eliminar macrófagos no adheridos a la laminilla de vidrio cubreobjeto y promastigotes que no infectaron a los macrófagos.

Se fijaron los macrófagos infectados a las laminillas de vidrio cubreobjeto con metanol 100 % frío y se dejó secar aproximadamente 30 minutos. Los macrófagos fijados se tiñeron con el colorante Giemsa (previamente filtrado y diluido $\frac{2}{3}$ en PBS 1X). El colorante Giemsa es una mezcla de colorantes, compuesta de azul de metileno (básico) y eosina (ácido) (Cruz-Reyes y Camargo-Camargo, 2001). Se utilizó ácido acético 0,1 % para aclarar y ajustar el color.

Finalmente, una vez teñidas las células, se fijó el vidrio cubreobjeto a una lámina portaobjeto y se procedió a contar en un microscopio de luz utilizando el objetivo de inmersión (100X). El conteo se realizó contando 10 macrófagos por 10 campos (100 macrófagos en total). El IC₅₀ (concentración inhibitoria del 50 % de la infección) se determinó mediante el programa *GraphPad Prism 5 Demo*, aplicando una regresión no lineal de los datos normalizados las 48 horas de tratamiento *versus* el logaritmo de las concentraciones utilizadas del compuesto.

Cabe destacar que se utilizó como controles: macrófagos sin infectar y macrófagos con promastigotes de *L. mexicana*. Se realizaron tres experimentos

independientes de la infección con las concentraciones del Flavonoide 3 antes descritas, contándose así cada condición (en cada experimento independiente) por triplicado.

4.2.7 Determinación de la concentración del Ca^{2+} intracelular sobre promastigotes de *Leishmania mexicana*

Las mediciones de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se realizaron utilizando el fluoróforo fura 2, un indicador fluorescente, excitable a la luz UV y con un espectro de emisión a 510 nm. En la figura 25, se observa que al disminuir la concentración del Ca^{2+} , el fura 2 va cambiando su pico de absorción de 340 nm a 380 nm porque hay cada vez menos fura 2 unido al Ca^{2+} . Así, el fura 2 no unido al Ca^{2+} es excitado a una longitud de onda de 380 nm.

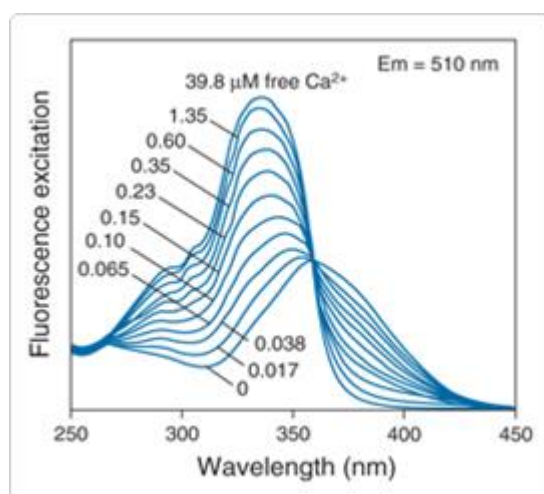


Figura 25. Espectro de excitación fluorescente del fura 2 en una solución que contiene 0-39,8 μM de calcio libre. Se representa la fluorescencia de excitación (Fluorescence excitation) en función de la longitud de onda (Wavelength). Free Ca^{2+} : Ca^{2+} libre (Haugland, 2002).

Cabe destacar que para cargar las células con fura 2, se utiliza el derivado acetoximetilado fura 2-AM (Figura 26). Éste puede atravesar la membrana plasmática de los tripanosomatidios. Una vez en el citoplasma, las esterasas hidrolizan el grupo éster del fura 2-AM produciendo fura 2, el cual es hidrofílico y no puede atravesar

membranas celulares por lo que permanece en el citoplasma. Así, cada molécula de fura 2 se une a un único ión Ca^{2+} presente en el citoplasma.

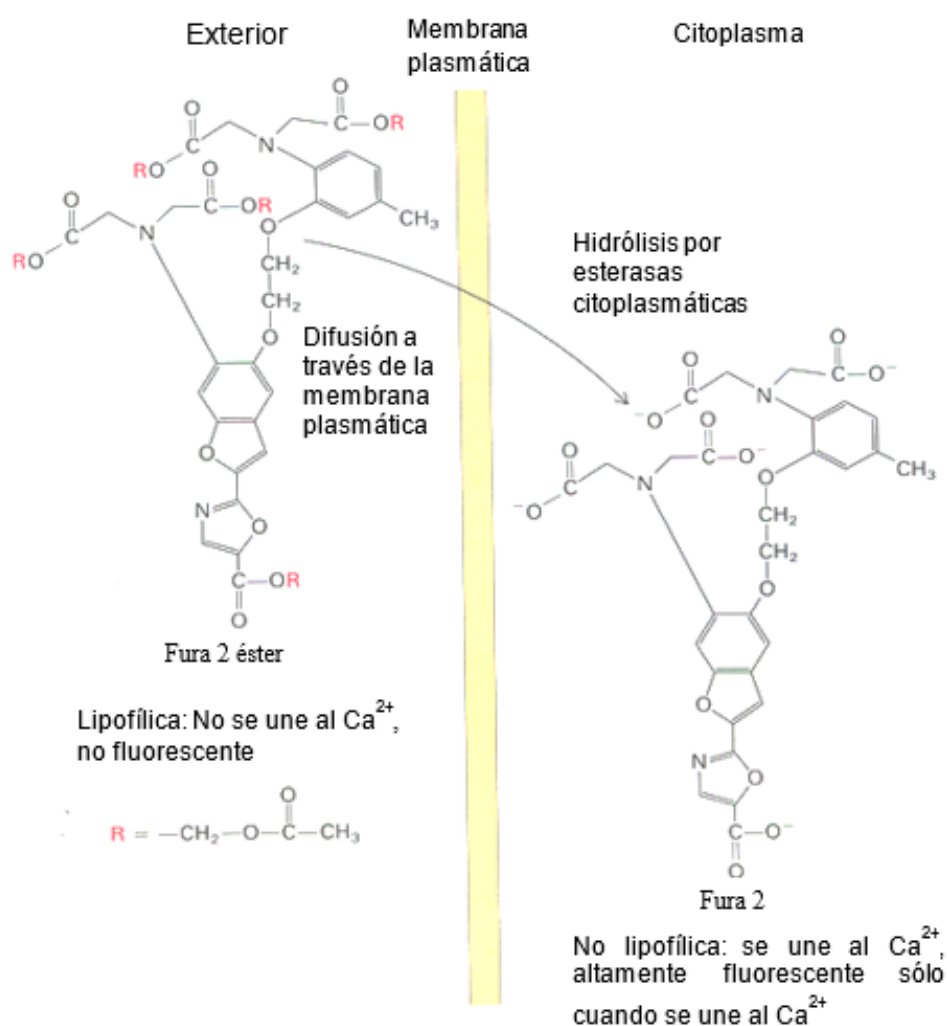


Figura 26. Diagrama esquemático de los procesos implicados en las células de carga con fura 2, utilizando acetoximetil-derivado (AM) permeable a la membrana y clivado por esterazas produciendo fura 2.

Tomado de: <http://www.lifetechnologies.com/ve/en/home/references/molecular-probes-the-handbook/technical-notes-and-product-highlights/loading-and-calibration-of-intracellular-ion-indicators.html> [Consulta: 30 de mayo de 2015].

El fluorímetro utilizado para las mediciones fue *Hitachi F-2000*. Este consta básicamente de una fuente de luz, la cual se hace incidir en un *chopper* que separa la luz en dos longitudes de onda de excitación del fura 2 unido al Ca^{2+} (340 nm) y fura 2

no unido al Ca^{2+} (380 nm). Posteriormente, dichas longitudes son combinadas mediante un combinador de rayos, el cual los hace incidir sobre la muestra de estudio. La muestra por su parte emite luz a 510 nm, lo cual es detectado por un tubo fotomultiplicador (P.M.T.) y posteriormente al centro de control y adquisición de datos, ofreciendo el registro del experimento y una data numérica. La representación esquemática de este sistema experimental se muestra a continuación en la figura 27:

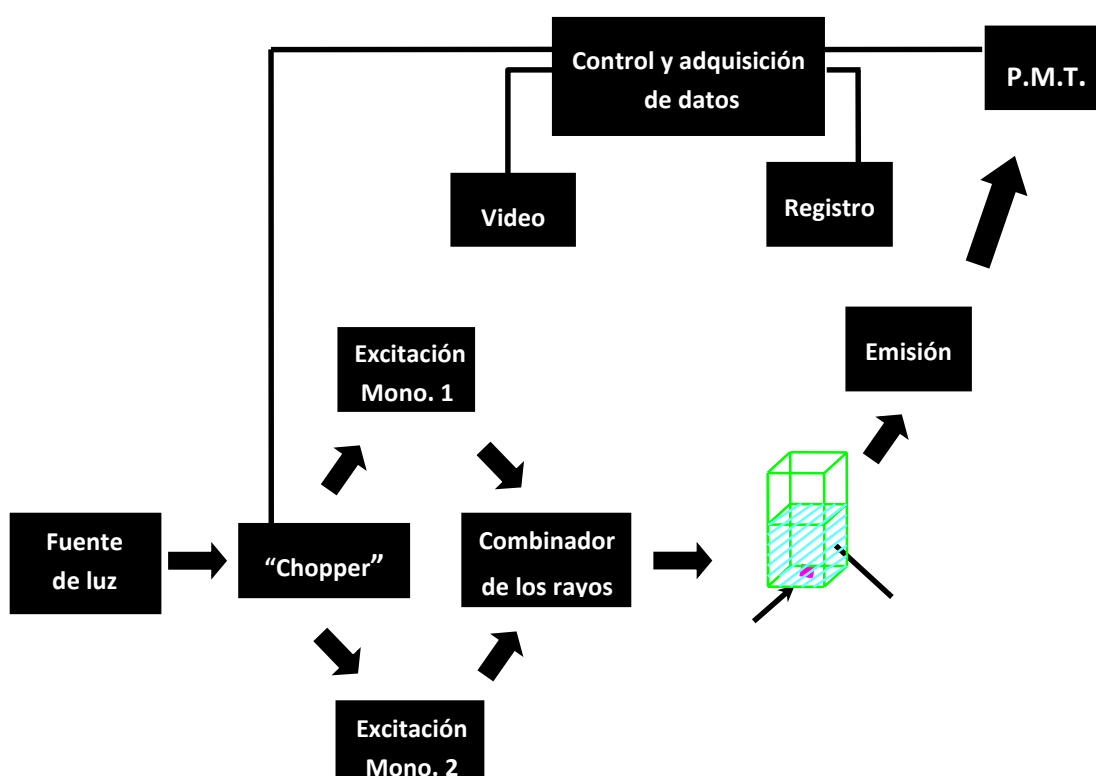


Figura 27. Representación esquemática del sistema de detección fluorimétrica del Ca^{2+} mediante dos longitudes de onda de excitación.

Para realizar la determinación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, se agregó en un tubo *ependorf* 500 μL de una suspensión de parásitos (10^7 promastigotes/mL). Se centrifugó a 600 xg durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 500 μL de *buffer Tyrode* (145 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 1,8 mM CaCl_2 , 10 mM Hepes, 11 mM glucosa). Este paso se realizó 2 veces. Asimismo, se cargó con: 1 μL fura 2 + 2,4 μL probenecid (500 mM) + 1,25 μL ácido plurónico 10 %. Posteriormente, se

incubó a 29 °C por 3 horas en agitación constante (450 rpm en *Thermomixer Compact*) y en oscuridad.

Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó a 600 xg por 3 minutos. Luego, se resuspendió el sedimento obtenido en 500 µL de buffer *Tyrode*. Se repitió este paso realizando dos lavados con dicho buffer. Posteriormente, se añadió 2,4 µL de probenecid a 500 mM. Finalmente, se colocó 500 µL de la suspensión en una cubeta de cuarzo y se midió la respuesta en el fluorímetro *Hitachi F-2000*, con agitación constante y a 29 °C.

Los efectores utilizados fueron los siguientes y en el orden que sigue: (Flavonoide 3 (20 µM); digitonina (40 µM), el cual es un detergente que permeabiliza la membrana y 10 µL de EGTA a 1 M, el cual es un quelante de Ca^{2+}), los cuales se añadieron a la cubeta de cuarzo mediante una jeringa *Hamilton*. Los efectores se añadieron cada cierto tiempo, luego de que cada uno alcanzó su efecto *plateau*, es decir luego de que alcanza su efecto máximo y se mantiene constante en el tiempo. Es importante señalar que, los efectores digitonina y EGTA se utilizan para calcular la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediante la ecuación de Grynkiewicz y col., 1985. En este caso, los efectores se añaden como un control para saber el estado fisiológico del parásito, ya que si éstos presentan un estado de estrés, tendrán altos niveles de Ca^{2+} en el interior celular y ello se refleja luego de la adición de dichos efectores.

Adicionalmente, para determinar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en ausencia de Ca^{2+} extracelular, se realizó el mismo procedimiento explicado previamente con la diferencia que se usó *buffer Tyrode* preparado sin 1,8 mM CaCl_2 . Además, antes de la medición se añadió en la cubeta de cuarzo EGTA a una concentración final de 2 mM. Durante la medición en el fluorímetro, pasado el tiempo de adición del compuesto a 20 µM se añadió CaCl_2 (2 mM), luego la digitonina (40 µM) y por último 10 µL de EGTA a 1 M.

Los resultados se reportan como la relación de fluorescencia ($^{340}/_{380}$) *versus* tiempo (segundos). La relación de proporcionalidad entre la relación de las

fluorescencias ($^{340}/_{380}$) y la $[Ca^{2+}]_i$ se plantea en la ecuación propuesta por Grynkiewicz y col., en 1985:

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

Donde R es la relación de fluorescencia de excitación del fura 2 a $^{340} \text{ nm}/_{380} \text{ nm}$, K_d es la constante de afinidad del fura 2 por el Ca^{2+} (224 nm), R_{min} es el menor valor de la relación de fluorescencia de excitación del fura 2 a $^{340} \text{ nm}/_{380} \text{ nm}$ después de añadir el quelante de Ca^{2+} (EGTA), R_{max} es el mayor valor de la relación de las fluorescencia de excitación del fura 2 a $^{340} \text{ nm}/_{380} \text{ nm}$ en presencia de Ca^{2+} saturante (después de añadir digitonina), F_{min} es el menor valor de fluorescencia del fura 2 cuando es excitado a 380 nm luego de añadir EGTA, F_{max} es el menor valor de fluorescencia del fura 2 cuando es excitado a 380 nm luego de añadir digitonina.

La razón por la cual los resultados no se expresan como $[Ca^{2+}]_i$ se debe a que la concentración basal de este catión es variable entre réplicas y depende de muchos factores tales como el estado metabólico de los promastigotes en cultivo, en el momento de las mediciones (Maravall y col., 2000). Debido a esto, los trabajos recientes reportan los resultados en función de los cambios en la relación de fluorescencia $^{340}/_{380}$.

4.2.8 Evaluación del potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *Leishmania mexicana*

La rodamina 123 (Figura 28) es un permeante celular, catiónico, un tinte fluorescente que es secuestrado fácilmente por la mitocondria activa sin inducir efectos de citotoxicidad (Haugland, 2002). Este fluoróforo específico de mitocondria (Benaim y

col., 2006), permite la visualización del estado de potencial electroquímico de este organelo (Serrano y col., 2009a). Además, la rodamina 123 posee un espectro de excitación a 488 nm y un espectro de emisión a 530 nm (Figura 29) (Serrano y col., 2009a).

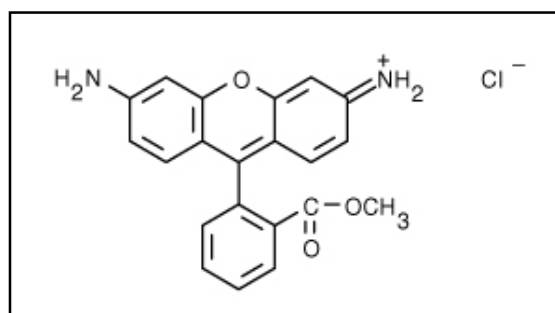


Figura 28. Estructura química de la rodamina 123. Tomado de: www.lifetechnologies.com [Consulta: 2 de junio de 2015].

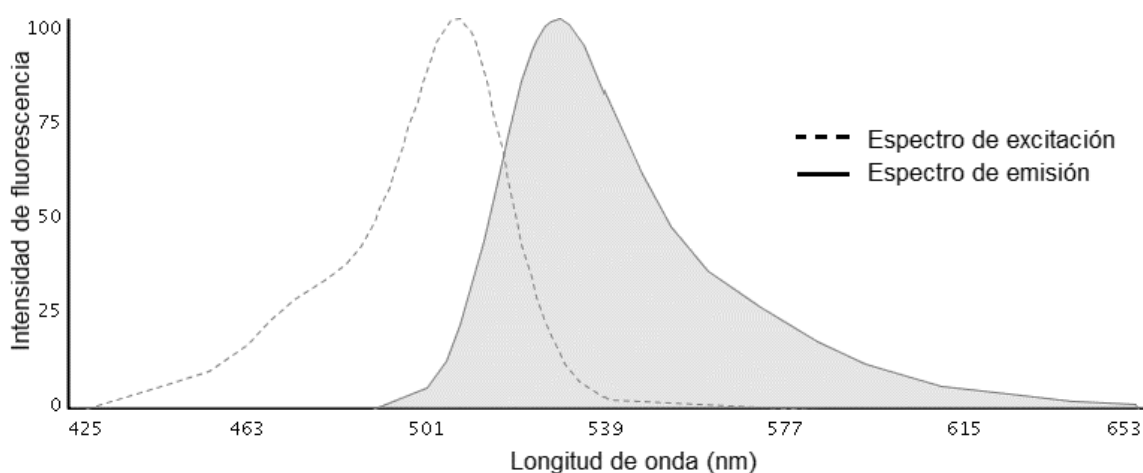


Figura 29. Espectro de excitación y emisión de la rodamina 123. La curva izquierda, con un pico a 488 nm, representa el espectro de excitación y la curva derecha, con un pico a 530 nm, representa el espectro de emisión de la rodamina 123. Tomado de: <https://www.thermofisher.com/ve/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?ICID=svtool&UID=302moh> [Consulta: 18 de abril de 2016].

Para realizar la determinación del efecto del Flavonoide 3 sobre el potencial electroquímico mitocondrial, se agregó en un tubo *ependorf* 500 μ L de una suspensión

de parásitos (10^7 promastigotes/mL). Se centrifugó a 600 xg por 3 minutos y se realizó dos lavados con 500 μ L de buffer de carga (130 mM HCl, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM KH_2PO_4 , 20 mM Tris HCl). Asimismo, se añadió 2 μ L de rodamina 123 a 5 mM, para obtener una concentración final de 20 μ M. Posteriormente, se incubó a 29 °C por 45 minutos en agitación constante (450 rpm en *Thermomixer Compact*) y en oscuridad.

Luego del período de incubación, se centrifugó a 600 xg por 3 minutos y se realizó dos lavados con 500 μ L de buffer de carga. La suspensión se agregó en una cubeta de cuarzo para su medición en el fluorímetro *Hitachi F-2000* con agitación constante y a 29 °C.

Los efectores utilizados fueron los siguientes: FCCP (2 μ M) (control), el cual es un protonóforo que desacopla la fosforilación oxidativa de la cadena transportadora de electrones; Flavonoide 3 a una concentración final de 5 μ M, 10 μ M y 20 μ M. Dichos efectores se añadieron con una jeringa *Hamilton*.

Con respecto al procesamiento de los resultados, se realizó un gráfico de barras en el cual se representa los cambios de la fluorescencia en porcentaje *versus* las tres concentraciones estudiadas. Dicha gráfica se realizó tomando en cuenta que la adición de los efectos generados por el FCCP a 2 μ M (seguido por la adición del Flavonoide 3) constituye el 100 % de respuesta del sistema. La significancia estadística entre las barras, se determinó mediante la prueba t de Student, en la cual $p \leq 0,05$ refleja resultados estadísticamente significativos.

4.2.9 Determinación de la alcalinización de los acidocalcisomas de promastigotes de *Leishmania mexicana*

La naranja de acridina (Figura 30) es un fluoróforo, cuya acumulación en acidocalcisomas es usado como una prueba para la alcalinización (Serrano y col.,

2009a). Cabe destacar que este fluoróforo catiónico, interactúa con el ADN y el ARN por intercalación dentro de la molécula (Darzynkiewicz, 1990). Además, este fluoróforo al igual que la rodamina, posee un espectro de excitación a 488 nm y un espectro de emisión a 530 nm (Figura 31) (Serrano y col., 2009a).

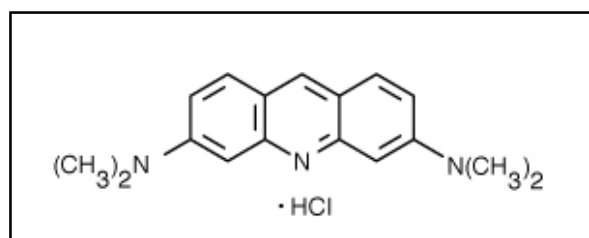


Figura 30. Estructura química de la naranja de acridina. Tomado de: www.lifetechnologies.com [Consulta: 2 de junio de 2015].

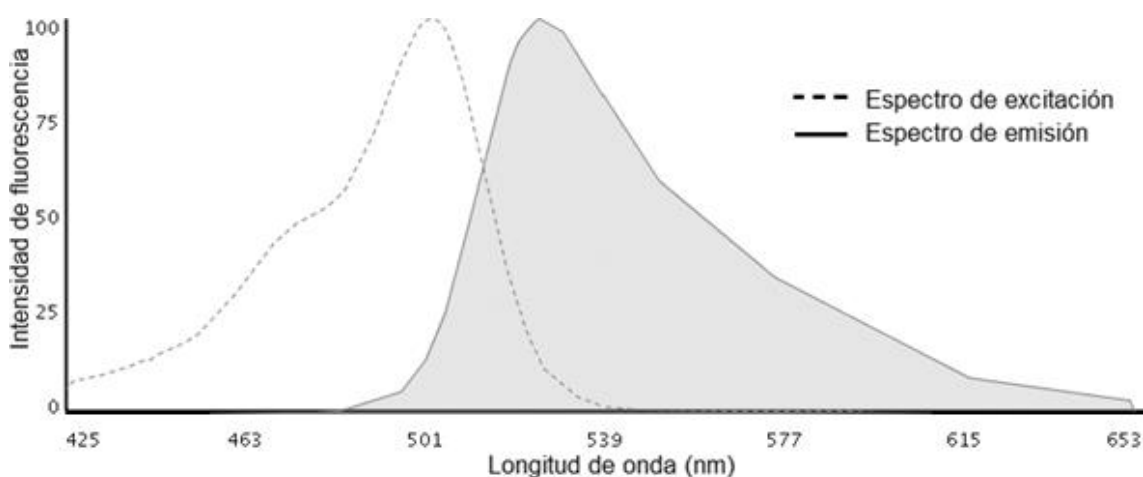


Figura 31. Espectro de excitación y emisión de la naranja de acridina. La curva izquierda, con un pico a 488 nm, representa el espectro de excitación y la curva derecha, con un pico a 530 nm, representa el espectro de emisión de la rodamina 123. Tomado de: <https://www.thermofisher.com/ve/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html?ICID=svtool&UID=302moh> [Consulta: 18 de abril de 2016].

Para realizar la determinación del efecto del Flavonoide 3 sobre los acidocalcisomas, se agregó en un tubo *ependorf* 500 μL de una suspensión de parásitos (10^7 promastigotes/mL). Se centrifugó a 600 xg por 3 minutos y se realizó dos

lavados con 500 μL de buffer de carga. Asimismo, se añadió 1 μL de naranja de acridina a 2,5 mM, para obtener una concentración final de 5 μM . Posteriormente, se incubó a 29 °C por 10 minutos en agitación constante (450 rpm en *Thermomixer Compact*) y en oscuridad.

Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó a 600 xg por 3 minutos y se realizó dos lavados con 500 μL de buffer de carga. La suspensión se agregó en una cubeta de cuarzo para su medición en el fluorímetro *Hitachi F-2000* con agitación constante y a 29 °C.

Los efectores utilizados fueron los siguientes: nigericina (2 μM) (control), el cual es un ionóforo que cataliza el intercambio electroneutro de K^+/H^+ , Flavonoide 3 a una concentración final de 10 μM , 20 μM y 50 μM . Dichos efectores se añadieron con una jeringa *Hamilton*.

Con respecto al procesamiento de los resultados, se realizó un gráfico de barras en el cual se representa los cambios de la fluorescencia en porcentaje *versus* las tres concentraciones estudiadas. Dicha gráfica se realizó tomando en cuenta que la adición de los efectos generados por la nigericina a 2 μM (seguido por la adición del Flavonoide 3) constituye el 100 % de respuesta del sistema. La significancia estadística entre las barras, se determinó mediante la prueba t de Student, en la cual $p \leq 0,05$ refleja resultados estadísticamente significativos.

5. Resultados

Con el fin de seleccionar el flavonoide con mayor efectividad entre todos los disponibles al comienzo de este trabajo, se realizaron experimentos de citotoxicidad con los distintos compuestos. En la Figura 32 se muestra este ensayo de citotoxicidad realizado con los diferentes flavonoides. Se observa el porcentaje de viabilidad celular en función de los flavonoides evaluados a tres concentraciones: 5, 20 y 50 μM . Los resultados muestran que varios de los flavonoides utilizados tuvieron efecto citotóxico sobre promastigotes de *L. mexicana*. Se pudo determinar que el Flavonoide 3 fue el compuesto que presentó una buena efectividad contra la viabilidad de estos parásitos. Por esta razón, se escogió a este compuesto para su estudio durante el desarrollo de este trabajo.

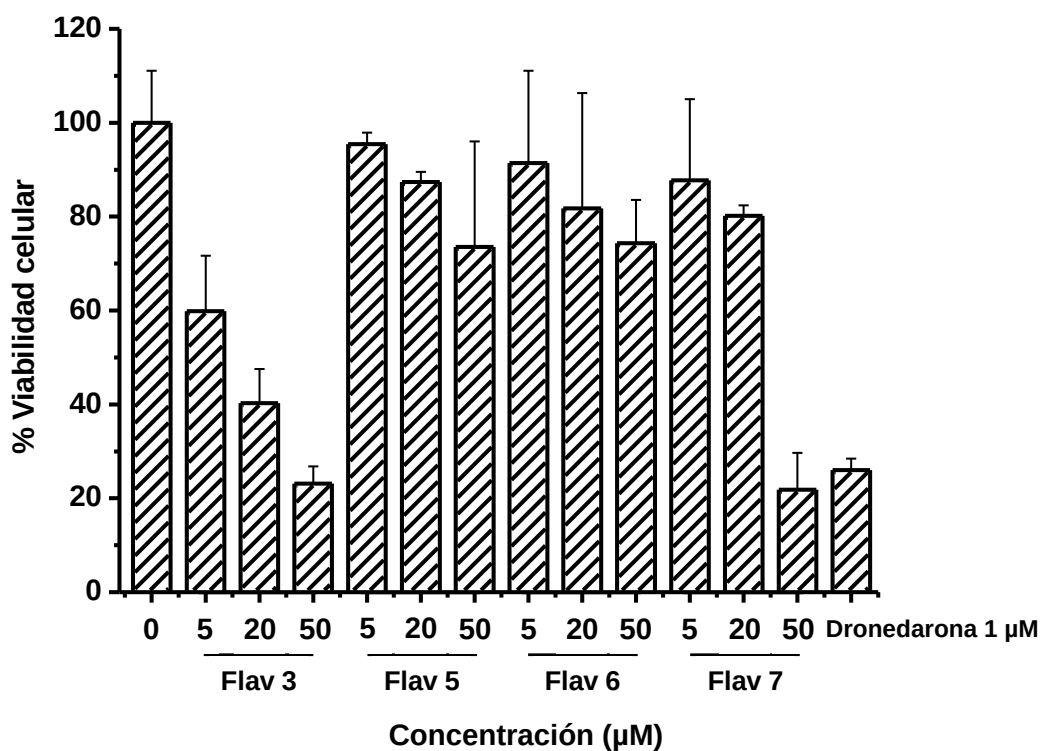
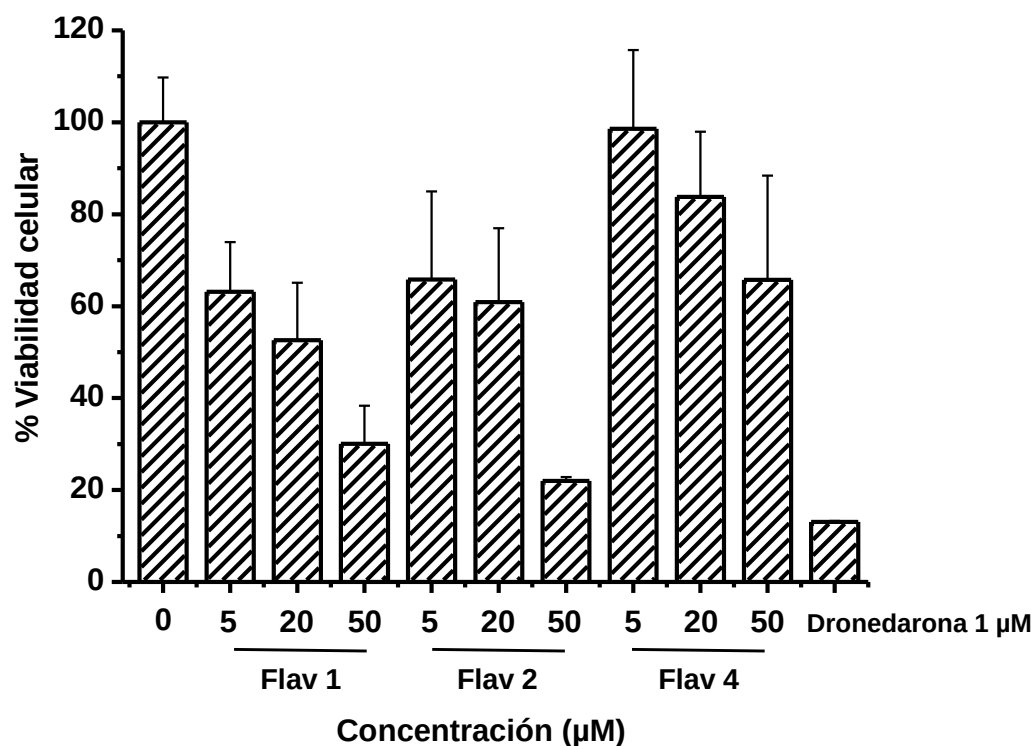


Figura 32. Efecto citotóxico de diferentes flavonoides a tres concentraciones (5, 20 y 50 µM) sobre la viabilidad celular de promastigotes de *L. mexicana*. Se utilizó como control positivo la dronedarona 1 µM.

5.1 Efecto del Flavonoide 3 sobre el crecimiento de poblaciones de promastigotes de *Leishmania mexicana*

Con el objeto de determinar el efecto del Flavonoide 3 sobre el crecimiento de poblaciones de promastigotes de *L. mexicana*, se realizó una curva de crecimiento en presencia de concentraciones crecientes del compuesto, evaluando la proliferación celular diariamente mediante el conteo directo en una cámara de Neubauer, hasta alcanzar la fase estacionaria del cultivo.

En la Figura 33 se muestra la proliferación celular (promastigotes/mL) en función del tiempo (horas) del crecimiento poblacional de estos parásitos. El resultado obtenido refleja un efecto dosis-dependiente del compuesto, lo cual significa que a medida que aumenta la concentración del compuesto, disminuye el número de promastigotes por mL. Asimismo, se estimó un IC_{50} de 12,62 μ M a las 48 horas del crecimiento.

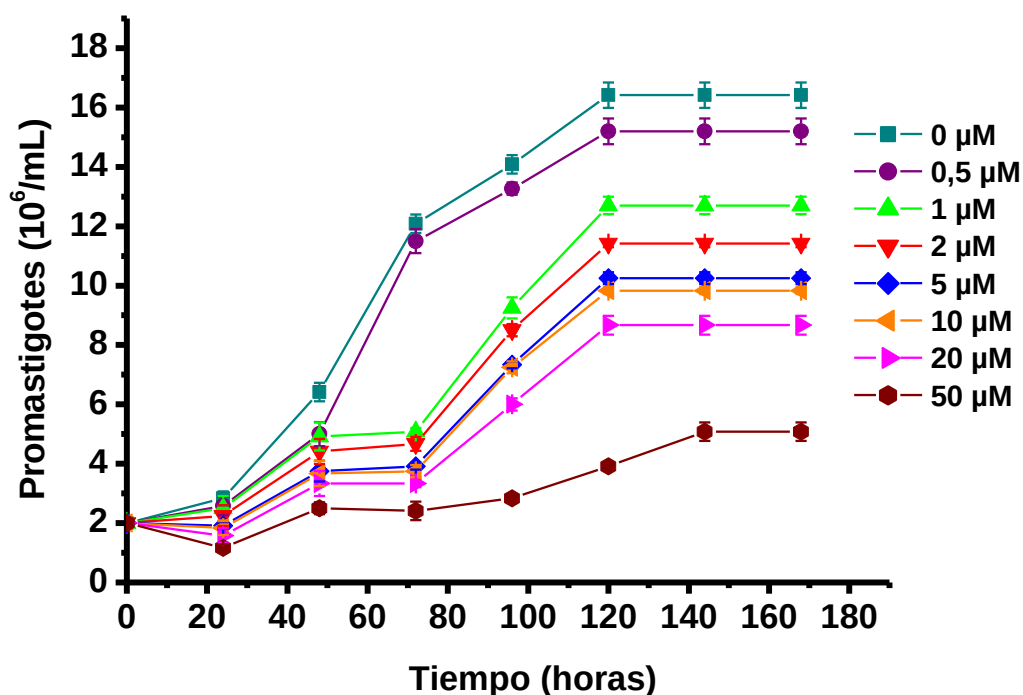


Figura 33. Efecto del Flavonoide 3 sobre el crecimiento de poblaciones de promastigotes de *L. mexicana*. Los parásitos fueron sometidos a concentraciones crecientes del compuesto y se monitoreó el crecimiento hasta alcanzar la fase estacionaria del cultivo. Cada punto representa el promedio $\pm$ DE de tres réplicas.

5.2 Efecto citotóxico del Flavonoide 3 sobre la viabilidad celular de promastigotes de *Leishmania mexicana*

Con el objeto de determinar el efecto citotóxico del Flavonoide 3 sobre la viabilidad celular de promastigotes de *L. mexicana*, se empleó el ensayo de MTT, el cual nos permite cuantificar la viabilidad de una población celular que ha sido expuesta a diferentes concentraciones de un compuesto. Tomando en cuenta que la absorbancia de los cristales de formazán generados son proporcionales al número de células viables, en la Figura 34 se observa un efecto dosis-dependiente del compuesto, ya que a medida que aumenta la concentración del mismo, disminuye la absorbancia. Ello significa que el compuesto afecta la viabilidad celular de *L. mexicana*. El IC₅₀ estimado luego de un período de 72 horas fue de 20,68 μ M.

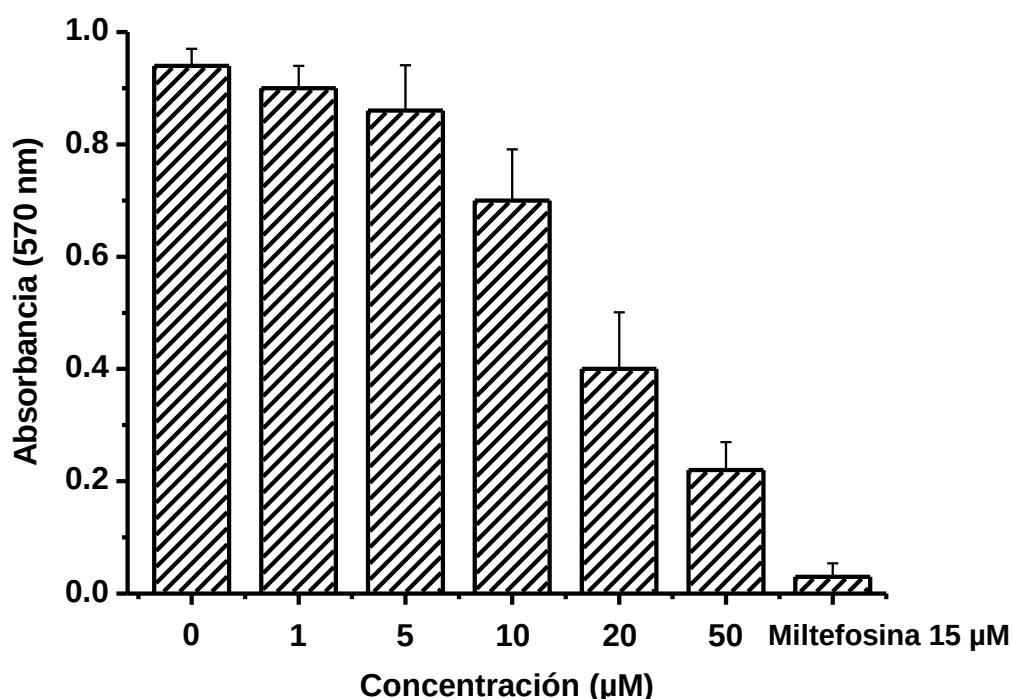


Figura 34. Efecto citotóxico del Flavonoide 3 sobre la viabilidad celular de promastigotes de *L. mexicana*. Los parásitos fueron tratados con concentraciones crecientes del compuesto, utilizando un control negativo (ausencia de droga) y un control positivo (miltefosina 15 μ M). Se utilizó como blanco la digitonina a 80 μ M (ver Materiales y Métodos).

5.3 Efecto citotóxico del Flavonoide 3 sobre la viabilidad celular de macrófagos J774-G8

Con el objeto de determinar el efecto citotóxico del Flavonoide 3 sobre la viabilidad celular de macrófagos J774-G8, se empleó el ensayo de MTT como método, sometiendo a las células a concentraciones crecientes del Flavonoide 3. De acuerdo a los resultados mostrados en la Figura 35, el Flavonoide 3 posee un relativo bajo efecto citotóxico sobre los macrófagos, observándose una diferencia significativa con respecto al control a partir de 50 μM ($p \leq 0,05$) y estimando un IC_{50} de 70,92 μM luego de 72 horas de incubación.

Comparando los valores de IC_{50} obtenidos para los promastigotes ($\text{IC}_{50} = 20,68 \mu\text{M}$) mediante citotoxicidad con respecto al valor de IC_{50} obtenido para los macrófagos, es notable que existe un efecto selectivo sobre los promastigotes, estimándose un índice de selectividad de 3,43.

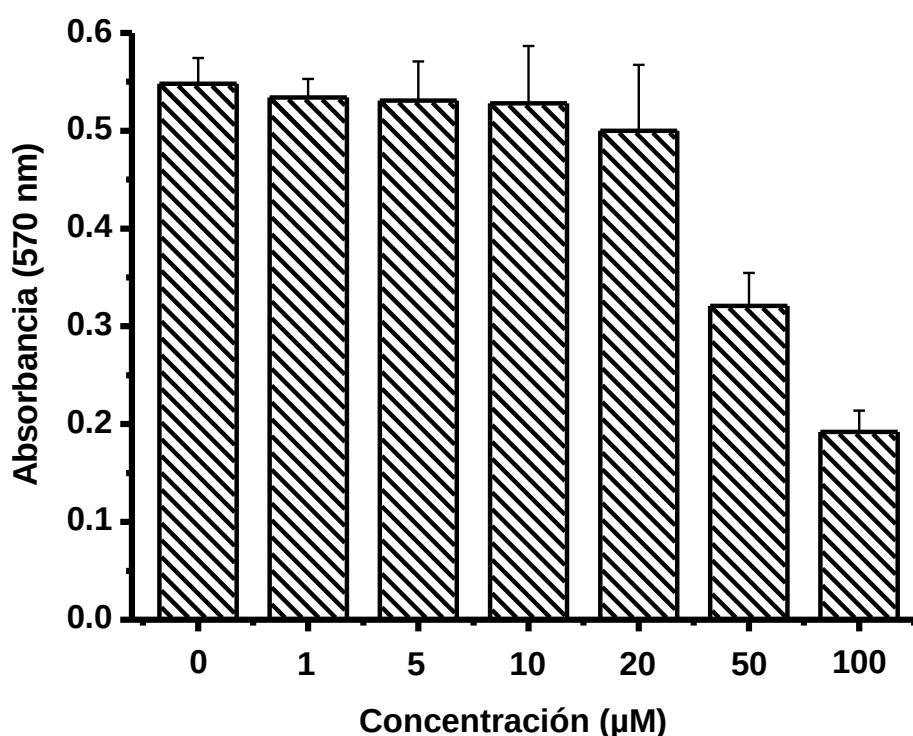


Figura 35. Efecto citotóxico del Flavonoide 3 sobre la viabilidad celular de macrófagos J774-G8. Las células fueron tratadas con concentraciones crecientes del compuesto. Se utilizó como blanco el Tritón X-100 0,1 % (ver Materiales y Métodos).

5.4 Efecto del Flavonoide 3 sobre macrófagos J774-G8 infectados con amastigotes de *Leishmania mexicana*

Con el objeto de determinar el efecto del Flavonoide 3 sobre macrófagos murinos de la línea celular J774-G8 infectados con amastigotes de *L. mexicana*, se realizó una curva de infección que se muestra en la Figura 36, en la cual se observan los datos normalizados del porcentaje de infección de los macrófagos en función de las concentraciones utilizadas del compuesto. El resultado obtenido muestra que este compuesto disminuye el porcentaje de células infectadas con amastigotes, de una forma dosis-dependiente. A las 48 horas de exposición, el IC₅₀ obtenido fue de 1,47 μ M.

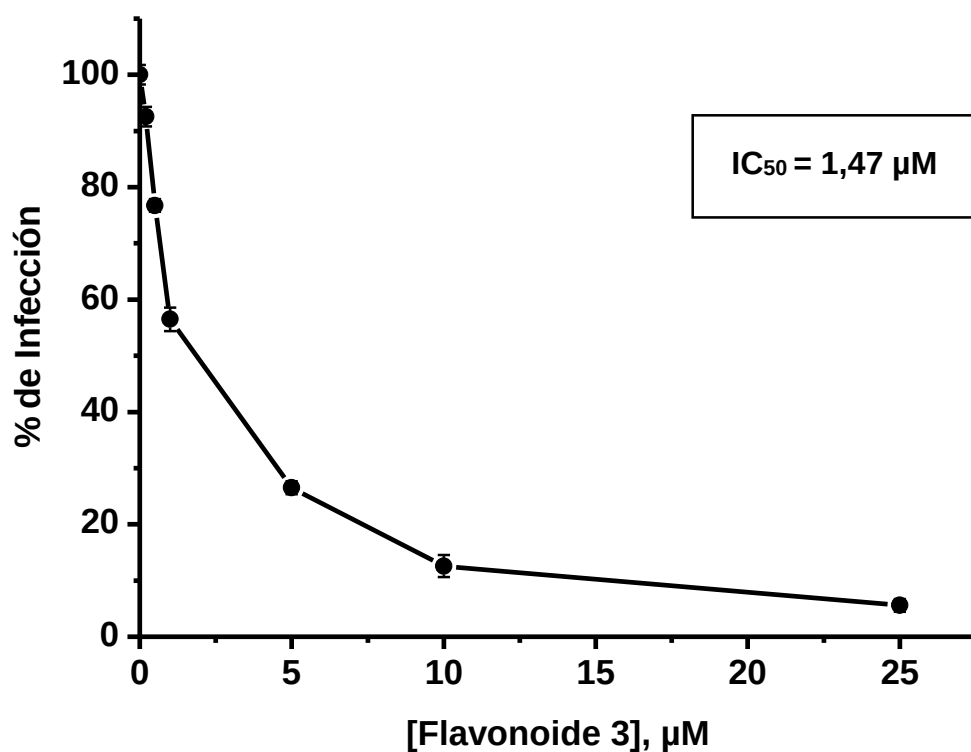


Figura 36. Efecto del Flavonoide 3 sobre macrófagos murinos infectados con amastigotes de *L. mexicana*. Los macrófagos J774-G8 infectados fueron sometidos a concentraciones crecientes del compuesto. Cada punto representa el promedio $\pm$ DE de tres réplicas.

5.5 Efecto del Flavonoide 3 sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular de promastigotes de *Leishmania mexicana*

Con el objeto de evaluar el efecto del Flavonoide 3 sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular de promastigotes de *L. mexicana*, se empleó un método fluorimétrico utilizando el fluoróforo fura 2 para determinar cambios en la concentración de este ión, como se describió en la sección de Materiales y Métodos. De acuerdo a los resultados obtenidos, luego de la adición del Flavonoide 3 a una concentración de 20 μM en presencia de Ca^{2+} , se produjo un aumento en la relación de fluorescencia $^{340\text{ nm}}/_{380\text{ nm}}$ (Figura 37A), lo cual se interpreta como un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ debido a la relación de proporcionalidad establecida en la ecuación de Grynkiewicz y col., 1985. Con el objetivo de evaluar si el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ observado es debido a una entrada del catión desde el exterior celular, o por el contrario, es producto de su liberación de compartimientos intracelulares, se repitió el experimento anterior pero en ausencia de Ca^{2+} extracelular (2 mM de EGTA). Como se puede observar (Figura 37B), el Flavonoide 3 a 20 μM es capaz de aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bajo ambas condiciones experimentales: en presencia y ausencia del catión.

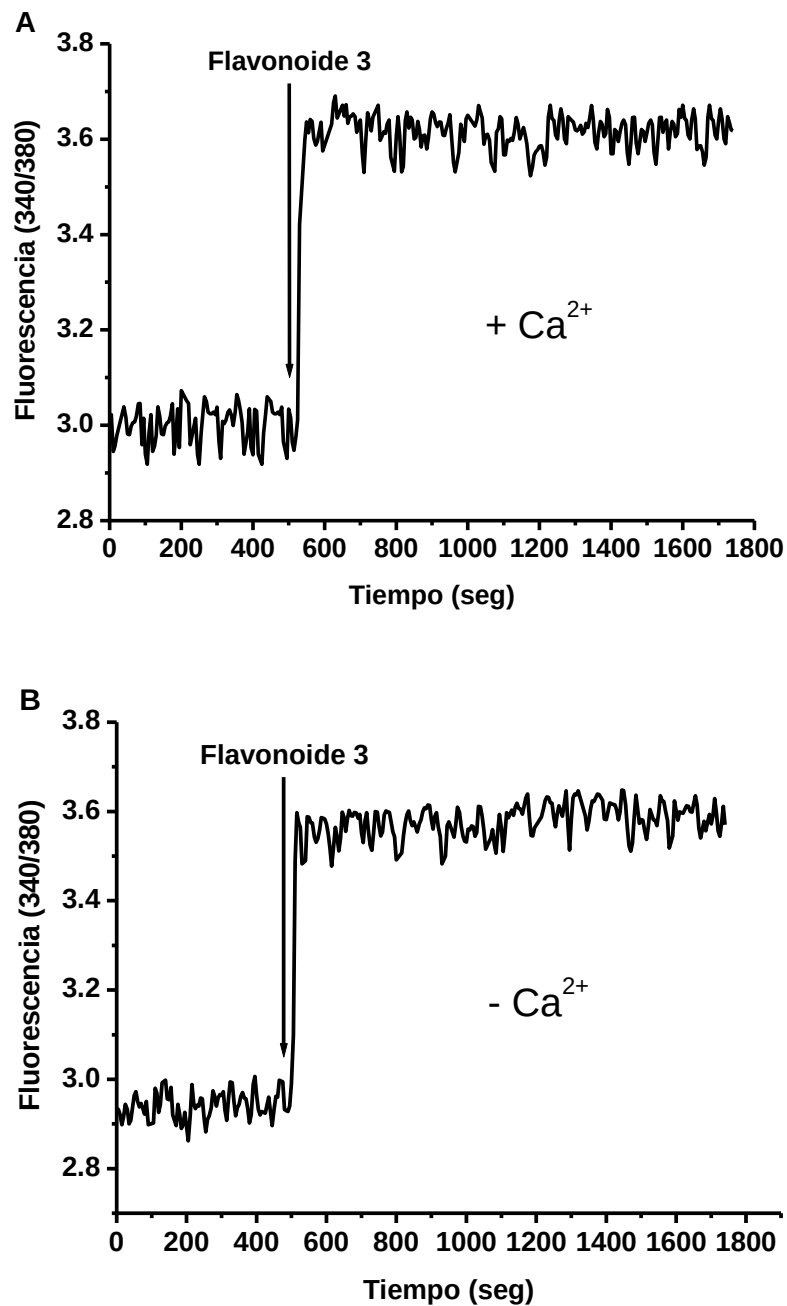


Figura 37. Efecto del Flavonoide 3 sobre la homeostasis del Ca²⁺ intracelular de promastigotes de *L. mexicana*. Los parásitos fueron cargados con fura 2. **(A)** Efecto del Flavonoide 3 (20 µM) sobre la [Ca²⁺]_i en presencia de 2 mM de Ca²⁺ extracelular. **(B)** Efecto del Flavonoide 3 (20 µM) sobre la [Ca²⁺]_i en ausencia de Ca²⁺ extracelular (2 mM de EGTA).

5.6 Efecto del Flavonoide 3 sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *Leishmania mexicana*

Con el objeto de evaluar el efecto del Flavonoide 3 sobre el potencial electroquímico mitocondrial, se empleó el fluoróforo rodamina 123, como se describió en Materiales y Métodos. La disminución del potencial electroquímico produce la liberación del fluoróforo, lo cual conlleva a un aumento en la fluorescencia. En la Figura 38A se muestra el resultado obtenido sobre el aumento de la fluorescencia en función del tiempo al añadir el Flavonoide 3 a una concentración de 20 μM , seguido por la adición de FCCP 2 μM , un protonóforo desacoplante de la cadena transportadora de electrones de la fosforilación oxidativa, utilizado en nuestro caso como control. Se observa que el Flavonoide 3 a esta concentración genera una respuesta máxima en cuanto a la salida del fluoróforo, ya que al añadir FCCP 2 μM la fluorescencia se mantiene constante. Invirtiendo el orden de los compuestos, se observa en la Figura 38B que la adición de FCCP 2 μM produce también la salida total del fluoróforo, reflejado en el incremento en la fluorescencia, lo cual es esperado por ser el experimento control.

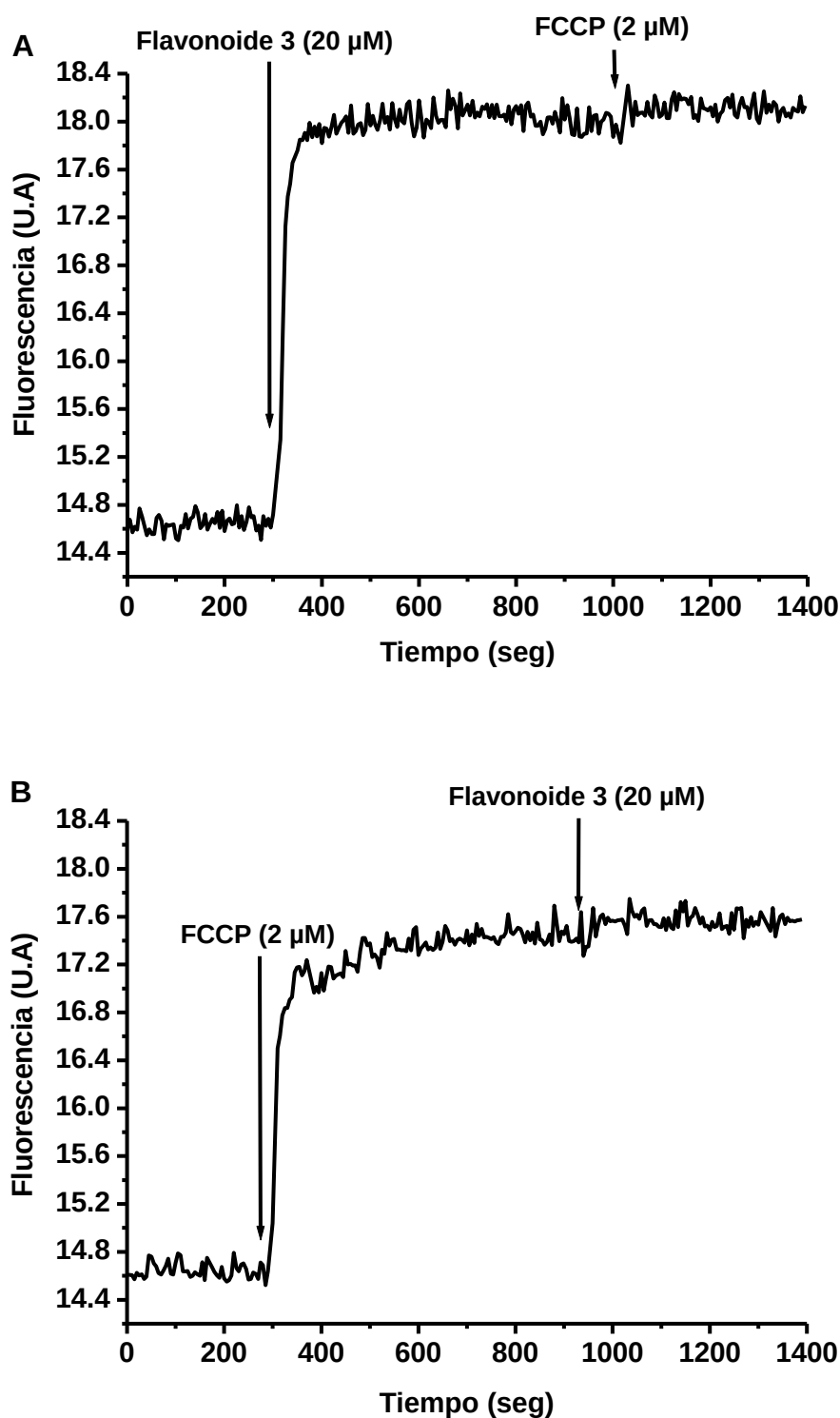


Figura 38. Efecto del Flavonoide 3 sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *L. mexicana*. Los parásitos fueron incubados en presencia de rodamina 123 (20 μ M). **(A)** Efecto del Flavonoide 3 (20 μ M) seguido por la adición del FCCP (2 μ M) sobre el potencial electroquímico mitocondrial. **(B)** Efecto del FCCP (2 μ M) seguido por la adición del Flavonoide 3 (20 μ M) sobre el potencial electroquímico mitocondrial. *(U.A): Unidades Arbitrarias.

Con el objeto de cuantificar la diferencia porcentual del aumento de la fluorescencia de la rodamina 123, en respuesta a la adición de tres concentraciones del Flavonoide 3 (5, 10 y 20 μM), se realizó un gráfico de barras (Figura 39) en el que se visualiza el efecto variable del compuesto sobre el potencial electroquímico mitocondrial. Se consideró al menos tres experimentos independientes para cada concentración. Este resultado muestra que a una concentración de 20 μM se obtiene una respuesta cercana al 100 %, seguido del flavonoide 3 a 10 μM con un aumento de la fluorescencia del 49 %, y finalmente 15 % para una concentración de 5 μM . Cabe destacar que el asterisco representa la diferencia significativa entre los promedios ($p \leq 0,05$).

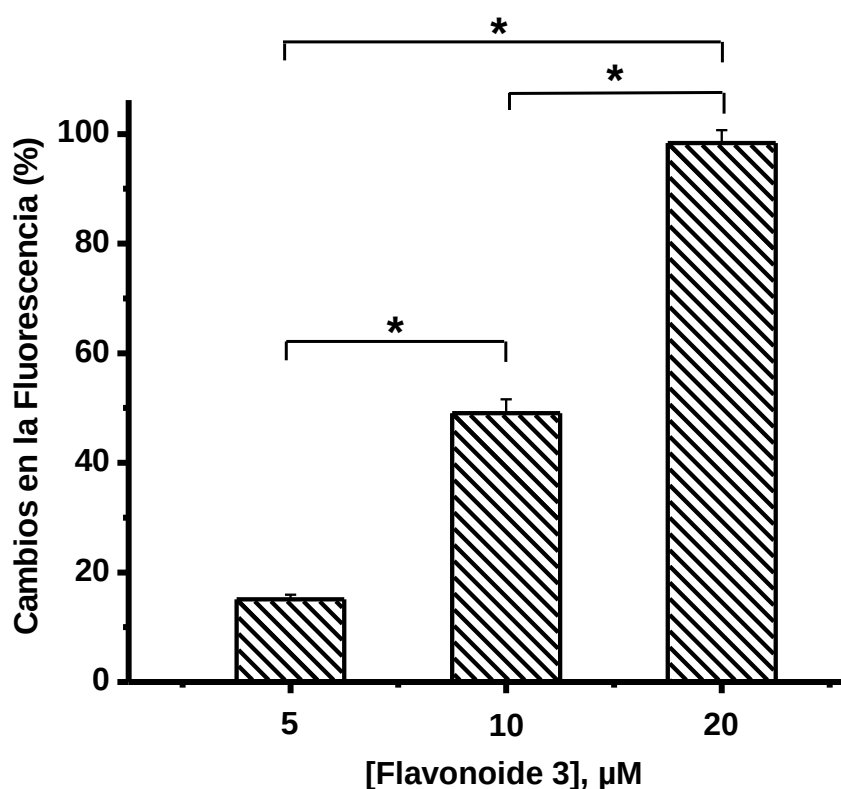


Figura 39. Efecto de diferentes concentraciones del Flavonoide 3 sobre el potencial electroquímico mitocondrial. El asterisco (*) representa resultados estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$) mediante una prueba t de Student. Cada barra representa el promedio $\pm$ DE de al menos tres experimentos independientes.

5.7 Efecto del Flavonoide 3 sobre la alcalinización de los acidocalcisomas de promastigotes de *Leishmania mexicana*

Con el objeto de determinar el efecto del Flavonoide 3 sobre la alcalinización de los acidocalcisomas, se utilizó un método fluorimétrico empleando el fluoróforo naranja de acridina, que se caracteriza por su afinidad hacia organelos acídicos como los acidocalcisomas de estos parásitos, acumulándose en los mismos. La liberación de este fluoróforo, lo cual implica la alcalinización del organelo, se visualiza como un aumento en la fluorescencia.

En la Figura 40A se observa que al añadir Flavonoide 3 a 50 μM se produce un aumento en la fluorescencia, el cual no es máximo, ya que es seguido de un pequeño aumento inducido por la adición de nigericina, un ionóforo que actúa sobre los acidocalcisomas y funciona como antiporte de K^+/H^+ causando así la alcalinización del compartimiento. En la Figura 40B se observa el experimento con la adición de los compuestos de forma inversa. La nigericina, a una concentración de 2 μM , no genera una respuesta máxima de la fluorescencia ya que la adición posterior de Flavonoide 3 a 50 μM genera nuevamente un incremento en la fluorescencia.

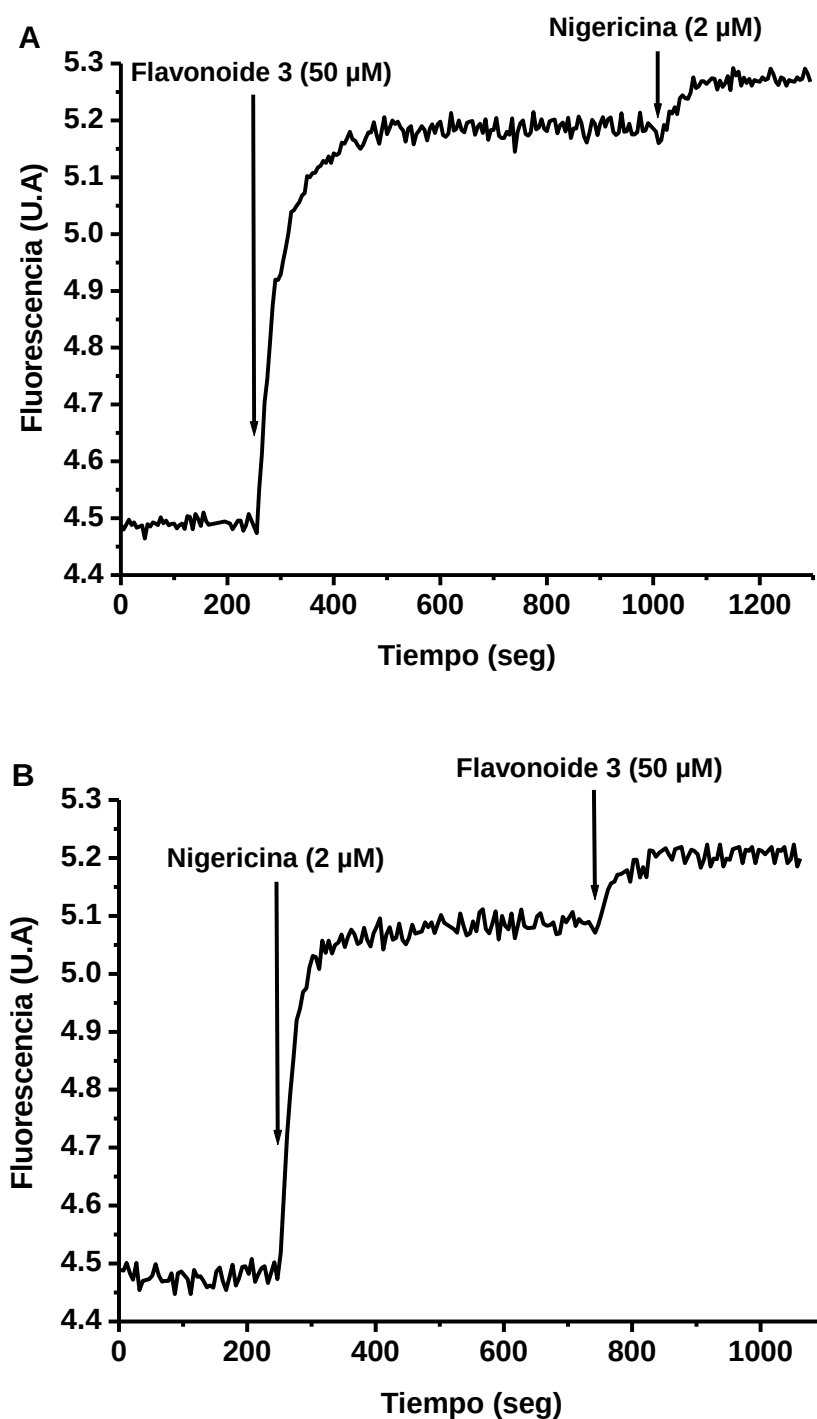


Figura 40. Efecto del Flavonoide 3 sobre la alcalinización de los acidocalcisomas de promastigotes de *L. mexicana*. Los parásitos fueron cargados con naranja de acridina (5 µM). **(A)** Efecto del Flavonoide 3 (50 µM) seguido por la adición de la nigericina (2 µM), sobre el nivel ácido de los acidocalcisomas. **(B)** Efecto de la nigericina (2 µM) seguido por la adición del Flavonoide 3 (50 µM), sobre el nivel ácido de los acidocalcisomas. *(U.A): Unidades Arbitrarias.

Con el objeto de obtener la diferencia porcentual del aumento de la fluorescencia de la naranja de acridina, en respuesta a la adición de tres concentraciones del Flavonoide 3 (10, 20 y 50 μM), se realizó un gráfico de barras (Figura 41) en el que se visualiza el efecto variable del compuesto sobre la alcalinización de los acidocalcisomas. Se consideró al menos tres experimentos independientes para cada concentración. Este resultado muestra que a una concentración de 50 μM se obtiene una respuesta de aproximadamente 90 %, seguido del flavonoide 3 a 20 μM con un aumento de la fluorescencia del 49,8 %, y finalmente 19,8 % para una concentración de 10 μM . Cabe destacar que el asterisco representa la diferencia significativa entre los promedios ($p \leq 0,05$).

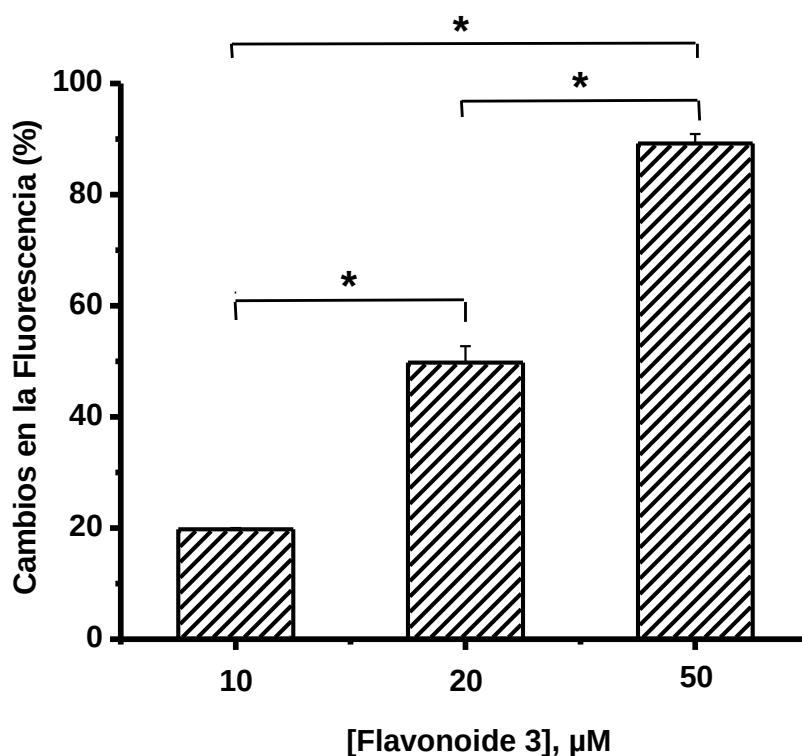


Figura 41. Efecto de diferentes concentraciones del Flavonoide 3 sobre la alcalinización de los acidocalcisomas. El asterisco (*) representa resultados estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$) mediante una prueba t de Student. Cada barra representa el promedio $\pm$ DE de al menos tres experimentos independientes.

6. Discusión

Las flavonas presentan acción antimicrobiana, aunque a concentraciones muy elevadas en comparación con los antibióticos (Rice-Evans y col., 1996). No obstante, se han encontrado que algunas flavanonas en cítricos presentan actividad frente al *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Bacillus typhosus* (Markham y col., 1975). La actividad antifúngica también ha sido reportada. Este es el caso de muchos flavonoides de naturaleza lipofílica (flavonas, flavanonas e isoflavanonas) que presentan una actividad antifúngica muy considerable y que constituyen verdaderas barreras frente a los hongos patógenos (David y Norton, 1995; Frankel y col., 1995). Una actividad antiparasitaria fue obtenida en el presente trabajo sobre promastigotes de *L. mexicana*. En este sentido, el flavonoide 5-metoxi, 6,7-metilendioxi-flavona (Flavonoide 3) resultó ser uno de los más efectivos sobre la viabilidad celular de promastigotes de estos parásitos frente a otros seis flavonoides que fueron evaluados en un ensayo de citotoxicidad.

El Flavonoide 3 tiene un efecto inhibitorio sobre la proliferación de *L. mexicana*. Además, un efecto dosis-dependiente de la concentración del compuesto sobre la proliferación celular, lo cual significa que, a medida que aumenta la concentración del compuesto disminuye de manera proporcional el crecimiento de los parásitos en el tiempo. En este sentido, se estimó un IC_{50} de 12,62 μM a las 48 horas del crecimiento celular, indicando que esta concentración inhibe el 50 % de la proliferación celular con respecto al control sin tratamiento. Un efecto parasitostático y citotóxico fue obtenido a las 72 horas del crecimiento con las concentraciones del compuesto utilizadas (exceptuando a la menor concentración, 0,5 μM). En este sentido, el compuesto parece detener el crecimiento de los promastigotes. Sin embargo, transcurrido este tiempo, se observó un brusco crecimiento a las 96 horas del tratamiento, con excepción de 50 μM

en la cual se observa un aumento ligero en la proliferación de los parásitos, hasta que alcanzan la fase estacionaria del cultivo.

Un efecto dosis-dependiente sobre promastigotes de *L. amazonensis* fue obtenido por los investigadores Fonseca-Silva y col., en 2015, utilizando la quercetina, la (-)-epigallocatequina 3-O-galato (EGCG) y la apigenina la cual pertenece al subgrupo flavona, al igual que el Flavonoide 3. Obtuvieron un IC_{50} de 31,4 μM a las 48 horas, 63 μM a las 120 horas y 23,7 μM a las 24 horas, para cada compuesto respectivamente. Comparando el IC_{50} del Flavonoide 3 (12,62 μM) con el obtenido con la quercetina, ambos a las 48 horas de tratamiento, se observa que nuestro compuesto posee una buena actividad antileishmanial sobre *L. mexicana*, ya que es de casi tres veces más potente a lo obtenido con la quercetina.

En un estudio realizado por Mittra y col. en 2000 evaluaron el efecto de la luteolina, una flavona con una fuerte actividad antioxidante (Boukhary y col., 2015), y la quercetina sobre *L. donovani*. Estos investigadores obtuvieron un potente efecto antiparasitario con un IC_{50} de 12,5 y 45,5 μM para la luteolina y quercetina, respectivamente, luego de 24 horas de tratamiento. Es interesante recalcar el mecanismo de acción que estos investigadores encontraron sobre estos parásitos. La luteolina y la quercetina tienen un efecto inhibitorio sobre la enzima topoisomerasa II *in vitro*; incluso inducen la apoptosis sobre los promastigotes de *L. donovani*. Estos estudios sobre el uso de estos flavonoides en el crecimiento poblacional de parásitos del género *Leishmania*, permiten posicionar al Flavonoide 3 como buen candidato antileishmanial.

Con la finalidad de demostrar el efecto citotóxico observado en la curva de crecimiento poblacional de los promastigotes a las 72 horas del tratamiento, se realizó un ensayo de citotoxicidad. El ensayo con MTT muestra una alta correlación entre la cantidad de MTT metabolizado y el número de células viables por ensayo. Por tal motivo puede ser utilizado como un indicador adecuado para estimar el número de células vivas

de un cultivo (Rodríguez y col., 1997). Tomando en cuenta que en un cultivo de células eucariotas en fase exponencial de crecimiento, las células presentan una actividad metabólica constante, la cantidad de cristales de formazán producidos es proporcional al número de células viables (Riss y col., 2013). En este sentido, se obtuvo un efecto dosis-dependiente sobre los promastigotes, en la cual la absorbancia disminuye a medida que aumenta la concentración del compuesto. Para este ensayo, el IC₅₀ obtenido fue de 20,68 µM, en contraste con el ensayo realizado con la línea J774-G8 de macrófagos, donde se estimó un IC₅₀ de 70,92 µM. Ello refleja que estas células de mamíferos no se ven afectadas por el compuesto hasta alcanzar una concentración de 50 µM, la cual comienza a ser citotóxicamente significativa sobre las células y tiene un efecto importante sobre promastigotes de *L. mexicana* ya que afecta más de la mitad de la viabilidad de estos parásitos. Además, el compuesto presenta una acción selectiva sobre los promastigotes (IS=3,43), según la definición de IS descrita por Herrera en 2011, quien consideró selectivos a compuestos con IS ≥ 3. Esto indica que nuestro compuesto es relativamente bueno en vista de que actúa selectivamente contra los promastigotes.

Los resultados obtenidos sobre macrófagos infectados con amastigotes de *L. mexicana*, el cual representa el estadio clínicamente relevante del parásito, demuestran que el compuesto afecta el porcentaje de macrófagos infectados de una forma dosis-dependiente, con un IC₅₀ estimado de 1,47 µM luego de 48 horas de tratamiento.

Se han reportado estudios realizados con flavonoides sobre amastigotes de especies de *Leishmania* en macrófagos infectados. Uno de ellos es el realizado por Inacio y col. en 2013, utilizando el flavonoide EGCG, el flavonol más abundante en el té verde (Steinmann y col., 2013). Estos investigadores infectaron macrófagos murinos con promastigotes de *L. amazonensis* por 3 horas, al igual que en este trabajo. Luego de 72 horas de tratamiento con EGCG obtuvieron un IC₅₀ de 1,6 µM sobre amastigotes intracelulares. En otro estudio, enfocado a evaluar la actividad del mismo flavonoide

sobre amastigotes intracelulares de *L. braziliensis*, nuevamente, los investigadores Inacio y col., en 2014 obtuvieron que el compuesto tiene un IC₅₀ de 3,4 µM luego de 72 horas de tratamiento. En vista de que dicho valor de IC₅₀ no es comparable con el obtenido en este trabajo, debido a los distintos tiempos empleados en la incubación con el compuesto, y además que estos investigadores evaluaron el efecto sobre la susceptibilidad de los amastigotes intracelulares, cabe resaltar la buena actividad que puedan tener algunos flavonoides, como el EGCG, al respecto. Esto nos permite sugerir que, en vista de que el Flavonoide 3 disminuye notablemente el porcentaje de macrófagos infectados con amastigotes y que adicionalmente, el compuesto no es citotóxico sobre la célula huésped hasta una concentración de 20 µM, ello sugiere que el compuesto podría tener un efecto sobre la proliferación de amastigotes intracelulares de *L. mexicana*. Por lo tanto, sería interesante confirmar dicho supuesto.

Con la finalidad de determinar los posibles mecanismos de acción mediante los cuales el Flavonoide 3 afecta la viabilidad de *L. mexicana*, se estudió su efecto sobre la [Ca²⁺]_i. Es importante señalar que se ha postulado que la disrupción de la homeostasis del Ca²⁺ intracelular tiene efectos letales en estos parásitos (Benaim y García, 2011). Así, en estos experimentos se obtuvo que la adición del Flavonoide 3 a una concentración de 20 µM desestabiliza la homeostasis intracelular del Ca²⁺, lo cual se visualiza como un aumento en la relación de fluorescencia ³⁴⁰/₃₈₀. Debido a la relación de proporcionalidad entre la relación de fluorescencia ³⁴⁰/₃₈₀ y la [Ca²⁺]_i, propuesta por Grynkiewicz y col., 1985, el aumento en la relación de fluorescencia ³⁴⁰/₃₈₀ obtenido en estos resultados es proporcional al incremento en la concentración del Ca²⁺ intracelular de los promastigotes. Se obtuvo además que el incremento en la [Ca²⁺]_i se produce en presencia y en ausencia de Ca²⁺ extracelular, lo cual indica que este incremento se debe a su liberación de organelos intracelulares y no a una entrada de Ca²⁺ proveniente del exterior celular.

Los flavonoides pueden presentar acción antialérgica, la cual está relacionada con que interfieren en la actividad de las ATPasas transportadoras en las membranas incluyendo las calcio dependientes (Cartaya y Reynaldo, 2001). Las flavonas tienen cierta analogía estructural con el fármaco antialérgico ampliamente utilizado, el cromoglicato, cuya actividad puede ser explicada a nivel de la vía de entrada del Ca^{2+} . Estos previenen la secreción de la histamina como respuesta a un antígeno (Park y col., 1997). Además, los investigadores Guan y col. en 2014 estudiaron el efecto de flavonas aisladas de *Acanthopanax senticosus* sobre canales de Ca^{2+} tipo L (usando la técnica de patch-clamp) y sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de miocitos ventriculares de ratón. Obtuvieron un efecto cardioprotector por parte de las flavonas estudiadas atribuido principalmente a la disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. En este sentido, la regulación intracelular de éste catión se ha convertido en un blanco quimioterapéutico, debido a que está involucrado en diversas funciones celulares en organismos eucariotas, desde protozoarios hasta mamíferos (Benaïm y García, 2011).

Partiendo de lo anterior, a fin de demostrar los posibles organelos intracelulares involucrados en la liberación del Ca^{2+} y por tanto en el consecuente incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, se evaluó el efecto del compuesto sobre el potencial electroquímico mitocondrial y sobre la alcalinización de los acidocalcisomas.

En primer lugar, sobre el potencial electroquímico mitocondrial se obtuvo que la adición del Flavonoide 3 a una concentración de 20 μM produce un incremento en la fluorescencia producto de la liberación de la rodamina 123 acumulada en la mitocondria, en función del gradiente electroquímico mitocondrial (Benaïm y col., 2012a). Esto significa que el compuesto colapsa por completo del potencial electroquímico mitocondrial de estos parásitos, debido a que la adición posterior del desacoplador y protonóforo FCCP no genera un incremento significativo en la fluorescencia. Sin embargo, la adición del compuesto a una concentración de 5 y 10 μM , disipa solo parcialmente el potencial electroquímico mitocondrial.

La actividad desacopladora de la fosforilación oxidativa se ha reportado en las chalconas y dihidrochalconas y está asociada a la presencia de hidrógeno o hidroxilo en las posiciones 2' y 4' (Amellac, 1985). Debido a esto y a los resultados obtenidos en este trabajo sobre el potencial electroquímico mitocondrial, se puede sugerir que el Flavonoide 3 tiene un efecto desacoplador sobre la fosforilación oxidativa. Además, la presencia de grupos hidroxilos está asociada con la actividad antioxidante de algunos flavonoides. La disposición de estos grupos en posición meta en los carbonos 5 y 7 del anillo en apigenina, le confiere dicha actividad antioxidante. Lo mismo ha sido reportado para la quercetina, con la sustitución 3' 4' orto dihidroxi en el anillo B (Maully y col., 1998).

Se ha reportado que muchos flavonoides tienen actividad sobre la mitocondria de diversos parásitos del género *Leishmania*. Tal es el caso de Fonseca-Silva y col. (2011), quienes describieron el posible mecanismo de acción de la quercetina sobre la mitocondria de *L. amazonensis*. Sus resultados sugieren que el compuesto está involucrado en el colapso mitocondrial por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés: *Reactive Oxygen Species*), lo cual reduce severamente el número de parásitos. Estos investigadores en otro estudio realizado recientemente en el 2015, demostraron el mismo efecto de ROS sobre estos promastigotes, pero utilizando la apigenina. Por otra parte, usando microscopia electrónica, los investigadores Zhai y col., en 1995 demostraron que la licochalcona A altera la ultraestructura mitocondrial de promastigotes y amastigotes de *L. major* de una forma dependiente de la concentración y sin alterar los organelos de la célula huésped. Estos estudios en conjunto reflejan a la mitocondria como un blanco de acción de algunos flavonoides. Como se explicó anteriormente, el Flavonoide 3 disipa por completo el potencial electroquímico mitocondrial a una concentración de 20 μ M. En este sentido, resultaría interesante ampliar el estudio de éste con el fin de establecer a qué nivel específico actúa sobre la mitocondria de estos parásitos.

En segundo lugar, con respecto a la alcalinización de los acidocalcisomas se obtuvo que la adición del compuesto a una concentración de 50 μM produce un incremento parcial en la fluorescencia, cerca del 90 %, debido a la liberación de la naranja de acridina acumulada en los acidocalcisomas. Este aumento en la fluorescencia es seguido por un ulterior incremento de la misma debido a la adición de la nigericina. Los resultados demuestran que el Flavonoide 3 a una concentración de 50 μM alcaliniza casi totalmente a los acidocalcisomas de estos parásitos, ya que el efecto de la nigericina luego del Flavonoide 3 es muy pequeño. Cabe destacar que en el experimento control, en el que se invierte el orden de adición de los compuestos, se observa que la nigericina genera un rápido aumento en la fluorescencia, pero parcial ya que es seguido nuevamente por otro aumento, inducido por el Flavonoide 3 a 50 μM . La posible explicación a este comportamiento es que, sabiendo que la nigericina es conocida por su capacidad de alcalinizar completamente los acidocalcisomas de estos parásitos (Vercesi y col., 2000) y que la naranja de acridina se acumula en organelos acídicos, el compuesto podría estar actuando sobre otros organelos acídicos tales como las vacuolas acídicas y los fagolisosomas (Docampo y col., 1995), generando así una liberación del fluoróforo de dichos compartimientos, lo cual se traduciría en un incremento en la fluorescencia.

Finalmente, estos resultados permiten sugerir que el Flavonoide 3 podría constituir la base para un futuro tratamiento contra la leishmaniasis. Es un compuesto ventajoso ya que el IC_{50} sobre macrófagos infectados con amastigotes resultó ser bajo, además de ser poco tóxico para la célula huésped. No obstante, en vista de la existencia de varias drogas sintéticas con un mayor potencial antiparasitario, cabe destacar que el compuesto objeto de este estudio es totalmente natural y su efecto antileishmanial podría ser potenciado en un futuro modificando químicamente su estructura. Además, podría ser utilizado en conjunto con otro compuesto con propiedades leishmanicidas conocidas a fin de producir un efecto sinérgico.

7. Conclusiones

- * El Flavonoide 3 ejerce un efecto inhibitorio dosis-dependiente sobre el crecimiento celular de promastigotes de *L. mexicana*, con un IC₅₀ de 12,62 µM y tiene un efecto citotóxico dosis-dependiente sobre la viabilidad de la forma libre de *L. mexicana*, con un IC₅₀ estimado de 20,68 µM. En contraste, este compuesto posee leve citotoxicidad sobre macrófagos, que comienza a ser citotóxicamente significativo a partir de 50 µM, con un IC₅₀ de 70,92 µM.
- * El Flavonoide 3 disminuye de manera dosis-dependiente el porcentaje de macrófagos infectados con amastigotes intracelulares de *L. mexicana*, con un IC₅₀ de 1,47 µM.
- * Uno de los mecanismos involucrados en el efecto del Flavonoide 3 sobre el crecimiento de *L. mexicana*, es la alteración de la homeostasis intracelular del Ca²⁺, debido al aumento de la [Ca²⁺]_i producto de su liberación desde compartimientos intracelulares, tales como mitocondria y acidocalcisomas
- * El Flavonoide 3 tiene un fuerte efecto sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *L. mexicana*, induciendo su rápido colapso.
- * El Flavonoide 3 tiene un efecto directo sobre los acidocalcisomas de promastigotes de *L. mexicana*, induciendo su rápida alcalinización.
- * El Flavonoide 3 podría ser la base de un futuro tratamiento en contra de esta enfermedad, modificando químicamente su estructura para potenciar su efecto o ser utilizado en conjunto con otro compuesto con propiedades leishmanicidas conocidas a fin de producir un efecto sinérgico.

8. Bibliografía

1. Amato, V., Tuon, F., Bacha, H., Neto, V., Nicodemo, A. 2008. Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. *Acta Trop.* **105**: 1-9.
2. Amellac, A. 1985. Inhibition of mast cell histamine release by flavonoids and bioflavonoids. *Plant. Med.* **64**: 153-158.
3. Becerril, M. 2011. Parasitología médica. Tercera edición, Mc Graw Hill. México. Pág 73-75.
4. Benaim, G., Bermudez, R., Urbina, J. 1990. Ca^{2+} transport in isolated mitochondrial vesicles from *Leishmania braziliensis* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **39**: 61-68.
5. Benaim, G., Moreno, S., Hutchinson, G., Cervino, V., Hermoso, T., Romero, P., Ruiz, F., de Sousa, W., Docampo, R. 1995. Characterization of the plasma-membrane calcium pump from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* **306**: 299-303.
6. Benaim, G. 1996. Intracellular Calcium Signaling and Regulation in *Leishmania*. Molecular and Immune Mechanism in the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis. *Medical Intelligence Unit*, Austin, Texas. **5**: 589-106.
7. Benaim, G., Cervino, V. 2000. Intracellular Calcium Homeostasis and Signaling Trypanosomatids. *Elect. J. Pathol. Histol.* **6**: 1-11.
8. Benaim, G. 2004. La Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática como enzima clave en la homeostasis intracelular del calcio. Estimulación por etanol y otros efectores. *Acta Cientif. Venezol.* **55**: 304-314.
9. Benaim, G., Sanders J., Garcia-Marchan, Y., Colina, C., Lira, R., Caldera, A., Payares, G., Sanoja, C., Burgos, J., Leon-Rossel, A., Concepcion, J.L., Schijman, A., Levin, M., Oldfield, E. and Urbina, J. 2006. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J. Med. Chem.* **49**: 892-899.

10. Benaim, G., Garcia, C. 2011. Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishmaniasis. *Trop. Biomed.* **28**: 471-481.
11. Benaim G., Hernandez-Rodriguez V., Mujica-Gonzalez S., Plaza-Rojas, L., Silva ML., Parra-Gimenez, N., Garcia-Marchan, Y., Paniz-Mondolfi, A., Uzcanga. G. 2012a. In vitro anti-*Trypanosoma cruzi* activity of dronedarone, a novel amiodarone derivative with an improved safety profile. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **56**: 3720-3725.
12. Benaim, G., García-Marchán, Y., Reyes, C., Uzcanga, G. y Figarella, K. 2013. Identification of a sphingosine-sensitive Ca²⁺ channel in the plasma membrane of *Leishmania mexicana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **430**: 1091-1096.
13. Benaim, G., Casanova, P., Hernandez-Rodriguez, V., Mujica-Gonzalez, S., Parra-Gimenez, N., Plaza-Rojas, L., Concepción, JL., Liu, YL., Oldfield, E., Paniz-Mondolfi, A., Suarez, Al. 2014. Dronedarone an amiodarone analog with improved anti-*Leishmania mexicana* efficacy. (2014). *Antimicrob. Agents. Chemother.* **58**: 2295-2303.
14. Besteiro, S., Williams, R., Coombs, G., Mottram, J. 2007. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int. J. Parasitol.* **37**: 1063-1075.
15. Boukhary, R., Raafat, K., Ghoneim, A., Aboul, M., El-Lakany, A. 2015. Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Salvia fruticose*: an HPLC determination of phenolic contents. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*
16. Bussman, R.W., Glenn, A., 2010. Medicinal plants used in Northern Peru for reproductive problems and female health. *J. Ethnobiol. and Ethnomed.* **6**: 1-12.
17. Carafoli, E. 2002. "Calcium signaling: a tale for all seasons". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S A.* **99**: 1115-1122.
18. Cartaya, O., Reynaldo, I. 2001. Flavonoides: características químicas y aplicaciones. *Revista Cultivos Tropicales.* **22**: 5-14.
19. Celine, V., Pabon, A., Deharo E., Albán-Castillo, J., Estevez-Yannick, L. F.A., Rojas, R., Gamboa, D., Sauvain, M., Castillo, D., Bourdy, G. 2009. Medicinal

- plants from the Yanesha (Peru): evaluation of the leishmanial activity of selected extracts. *J. Ethnopharmacol.* **123**: 413-422.
20. Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 873-882.
 21. Chávez, K. 2013. Fotoquímica y evaluación biológica de *Croton caracasana pittier*. Hemisíntesis y evaluación biológica de derivados del ácido de *Caracasina*. Tesis de Doctorado en Química Médica. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
 22. Chen M., Christensen S. B., Blom J., Lemmich E., Nadelmann L., Fich K., Theander T. G., Kharazmi A. 1993. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **37**: 2550-2556.
 23. Chen M., Christensen B. S., Theander T. G., Kharazmi A. 1994. Antileishmanial activity of licochalcone A in mice infected with *Leishmania major* and in hamsters infected with *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **38**: 1339-1344.
 24. Chen M., Zhai L., Christensen S. B., Theander T. G., Kharazmi A. 2001. Inhibition of fumarate reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by chalcones. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **45**: 2023-2029.
 25. Croft, S. L., Coomb, G. H. 2003. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends. Parasitol.* **19**: 502-508.
 26. Croft, S., and Engel, J. 2006. Miltefosine discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **100**: S4-S8.
 27. 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.

28. Darzynkiewicz, Z. 1990. Differential staining of DNA and RNA in intact cells and isolated cell nuclei with acridine orange. *Meth. Cell. Biol.* **33**: 285-298.
29. David, P., Norton, R. 1995. Browning-associated mechanism of resistance to insects in corn callus tissue. *J. Chem. Ecol.* **21**: 583-600.
30. Davidson, R., den Boer, M., Ritmeijer, K. 2009. Paromomycin. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **103**: 653-660.
31. 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. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental.*
32. De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I., Rizzuto, R. 2011. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature.* **476**: 336-340.
33. Docampo, R., Scott, D., Vercesi, E., Moreno, S. 1995. Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* **310**: 1005-1012.
34. Docampo, R., Moreno, S. 2001. The acidocalcisomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **50**: 113-119.
35. Docampo, R., Ulrich, P., Moreno, S. 2010. Evolution of acidocalcisomes and their role in polyphosphate storage and osmoregulation in eukaryotic microbes. *Phil. Trans. R. Soc.* **365**: 775-784.
36. Ercil D., Kaloga M., Radtke O. A., Sakar M. K, Kiderlen A. F., Kolodziej H. 2005. O-galloyl flavonoids from *Geranium pyrenaicum* and their *in vitro* antileishmanial activity. *Turk. J. Chem.* **29**: 437-443.
37. Faccini, D., Puricelli, E., Ferrari, S. 2007. Control de *Iresine diffusa* con herbicidas postemergentes. *Revista agromensajes.*
38. Frankel, E., Waterhouse, A., Terssedre, P. 1995. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low density lipoprotein. *J. Agr. Food Chem.* **43**: 890-894.

39. Fonseca- Silva, F., Inacio, J., Canto-Cavalheiro, M., Almeida-Amaral, E. 2011. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. *PLoS. One.* **6**: 1-7.
40. Fonseca-Silva, F., Canto-Cavalheiro, M., Menna, R., Almeida-Amaral, E. 2015. Effect of apigenin on *Leishmania amazonensis* is associated with reactive oxygen species production followed by mitochondrial dysfunction. *J. Nat. Prod.* **78**: 880-884.
41. Gállego, J. 2006. Manual de Parasitología: Morfología y Biología de los Parásitos de interés sanitario. Edicions de la Universitat de Barcelona. Primera edición. Madrid, España.
42. García, D. 2005. Leishmaniasis cutánea. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. España.
43. Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsient, R. 1984. A New Generation of Calcio Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties. *J. Biol. Chem.* **266**: 3440-3450.
44. Guan, S., Ma, J., Chu, X., Gao, Y., Zhang, Y., Zhang, X., Zhang, F., Liu, Z., Zhang, J., Chu, L. 2014. Effects of total flavones from *Acanthopanax senticosus* on L-type calcium channels, calcium transient and contractility in rat ventricular myocytes. *Phytother. Res.* **29**: 533-539.
45. Hangland, R. 2002. Handbook of fluorescence Probes and Research Products. Editorial Molecular Probes. 9th Edition. Oregon.
46. Harborne, J., Williams, C. 2000. Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochem.* **55**: 481-504.
47. Herrera, L. 2011. Evaluación de la actividad de componentes de aceites esenciales de plantas colombianas frente a *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* spp. Tesis de Magister en Ciencias Biomédicas. Universidad Industrial de Santander. Bogotá, Colombia.

48. Inacio, J., Canto-Cavalheiro, M., Almeida-Amaral, E. 2013. In vitro and in vivo effects of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate on *Leishmania amazonensis*. *J. Nat. Prod.* **76**: 1993-1996.
49. Inacio, J., Gervazoni, L., Canto-Cavalheiro, M., Almeida-Amaral, E. 2014. The effect of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate *in vitro* and *in vivo* in *Leishmania braziliensis*: involvement of reactive oxygen species as a mechanism of action. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**: e3093.
50. Johan, K., Speers, M. 2010. Revisión de ensayos clínicos: una guía para el comité de ética. Hong Kong, China.
51. Kayser O., Kiderlen A. F. 2001. *In vitro* leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones. *Phytother. Res.* **15**: 148-152.
52. Kirchoff L. V. 1993. American trypanosomiasis (Chagas' disease) - a tropical disease now in the United States. *N. Engl. J. Med.* **329**: 639-644.
53. Maravall, M., Mainen, Z., Sabatini, B., Svoboda, K. 2000. Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength ratioing. *Biophys. J.* **78**: 2655-2667.
54. Marchesini, N., Ruiz, F., Vieira M., Docampo, R. 2002. Acidocalcisomes are functionally linked to the contractile vacuole of *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* **277**: 8146-8153.
55. Marín, M., Aguilar, Y., Ramírez, J., Triana, O., Muskus, C. 2008. El análisis molecular y el inmunogénico sugieren la ausencia de las proteínas hidrofílicas de la superficie en *Leishmania (Viannia) panamensis*. *Biomédica.* **28**: 423-432.
56. Markham, K., Mabry, T. 1975. The flavonoids. London, *Chapman and Hall*. p 77.
57. Martinez, A. 2005. Flavonoides. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín, Colombia.
58. Mauly, P., Gaydov, E., Auffray, A. 1998. Simultaneous separation of flavanone glycosides and polymethoxylated flavones in citrus juices using liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **800**: 171-179.

59. Mazumder, S., Mukherjee, T., Ghosh, J., Ray, M., Bhaduri, A. 1992. Allosteric modulation of *Leishmania donovani* plasma membrane Ca^{2+} -ATPase by endogenous calmodulin. *J. Biol. Chem.* **267**: 18440-18446.
60. Mitra, B., Saha, A., Roy, A., Pal, C., Mandal, S., Mukhopadhyay, S., Bandyopadhyay, S., Majumder, H. 2000. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. *Mol. Med.* **6**: 527-541.
61. Moreno, S.N.J y Docampo, R. 2003. "Calcium regulation in protozoan parasite". *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 359-364
62. Moore, E. y col. 2001. Comparison of generic and proprietary sodium stibogluconate for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *Bull. World. Health. Organ.* **79**: 388-393.
63. Murray, H. 1981. Interaction of *Leishmania* with a macrophage cell line. *Brief. Definitive. Report.* **153**: 1690-1695.
64. Nakasato, Y. 2000. Methionine induced phytoalexin. Production in rice leaves. *Biasci. Biotechnol. Biochem.* **64**: 577-583.
65. Nieves, Y. 2014. Efecto de la 5-hidroxi-3,7,8,3',4'-pentametoxiflavona, flavonoide aislado de *Croton caracasana* sobre la viabilidad y la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en *Leishmania mexicana*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
66. Nuñez, J., Bompert, D., Charris, J., Camacho, J., Rodriguez, T., Visbal, J., Álvarez, A., García, Y., Serrano, X. 2012. Efectos deletéreos del JC25 sobre la bioenergética celular y la biosíntesis de esteroides de *Leishmania braziliensis*. *Revista Facultad de Farmacia.* **75**: 50-58.
67. OMS (2007). 60ª Asamblea Mundial de la Salud. Control de la leishmaniasis. Informe de la Secretaria; Resolución N° A60/10; Ginebra, Suiza.

68. Ouhabi, R., Boue-Grabot, M., Mazat, P. 1998. Mitochondrial ATP synthesis in permeabilized cells: assessment of the ATP/O values *in situ*. **263**: 169-175.
69. Pandey, S., S. Suryawanshi, S. Gupta, and L. Srivastava. 2005. Chemotherapy of leishmaniasis. Part II. Synthesis and bioevaluation of substituted arylketene dithioacetals as antileishmanial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **40**: 751-756.
70. Park, Y., Koo, M., Contado, J. 1997. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arg. Biol. Technol.* **40**: 97-106.
71. Peters, N., Frost, J., Long, S. 1996. A plant flavone luteolin induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science*. **233**: 977-980.
72. Ramírez, M., Mendoza, J., Arreola, R., Ordaz, C. 2010. Flavonoides con actividad antiprotzoaria. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* **41**: 6-21.
73. Ribeiro A., Pilo-Veloso D., Romanha A. J., Zani C. L. 1997. Trypanocidal flavonoids from *Trixis vauthieri*. *J. Nat. Prod.* **60**: 836-841.
74. Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **20**: 933-956.
75. Riss, T., Moravec, R., Niles, A., Benink, H., Worzella, T., Minor, L. 2013. Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual [Internet]*.
76. Rodríguez, J., Vicente, V., Canteras, M. 1997. Valor del ensayo colorimétrico con MTT en el estudio del crecimiento y citotoxicidad *in vitro* de líneas de melanoma. *Patología*. **30**: 18-27.
77. Romero, R. Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Editorial médica panamericana. México, 2007.
78. Romero, J., Praderes, G., Calzolaio, V. 2012. Leishmaniasis Visceral. Estudio clínico epidemiológico de una serie de casos en el estado Aragua. Venezuela 2000-2010. *Comunidad y Salud*.

- 79.** Ruiz, F., Marchesini, N., Seufferheld, M., Govindjee, R. 2001. The polyphosphate bodies of *Chlamydomonas reinhardtii* possess a proton-pumping pyrophosphatase and are similar to acidocalcisomes. *J. Biol. Chem.* **276**: 46196-46203.
- 80.** Salazar, M., Castro, E. 2001. Leishmaniasis cutánea, mucocutánea y cutánea difusa. *Dermatol. peruana*. Vol. **11**.
- 81.** Salcedo, G., Trejo, T., Martinez, B., De Jesús, A., Arenas, M., Jiménez, A. 2009. Establecimiento de un protocolo de permeabilización con detergentes que incrementan la eficiencia en la producción de betacianinas en cultivos de células de *Beta vulgaris*. *Scielo*. **34**: 666-671.
- 82.** Sartorelli P., Carvalho C. S., Reimão J. Q., Pena F. M., Tempone A. G. 2009. Antiparasitic activity of biochanin A, an isolated isoflavone from fruits of *Cassia fistula* (Leguminosae). *Parasitol. Res.* **104**: 311-314.
- 83.** 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**: 000-000.
- 84.** Serrano X., Payares G., De Lucca. M., Martínez J.C., Mendoza – León A. and Benaim. 2009a. Amiodarone and Miltefosine Act Synergistically against *Leishmania mexicana* and Can Induce Parasitological Cure in a Murine Model of Cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* **53**: 5108-5113.
- 85.** Serrano X., García, Y., Fernandez, A., Rodriguez, N., Rojas, H., Visbal, G., Benaim, G. 2009b. Amiodarone Destabilizes Intracellular Ca²⁺ Homeostasis and Biosynthesis of Sterols in *Leishmania mexicana*. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* **53**: 1403-1410.
- 86.** Schmidh, C., Fronza, M., Goetttert, M., Geller, F., Luik, S., Flores, E. M., Bittencourt, C. F., Zanetti, G. D., Heinzmann, B. M., Laufer, S., Merfort, I. 2009. *J. Ethnopharmacol.* **122**: 523-532.

87. Singh, S., Sivakumar, R. 2004. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J. Infect. Chemother.* **10**: 307-315.
88. Steinmann, J., Buer, J., Pietschmann, T., Steinmann, E. 2013. Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea. *Pharmacol.* **168**: 1059-1073.
89. Suárez, A., Ramirez, C., Palácios, R., Rojas, K., Delle Monache, F., Tillet, S. 2016. Flavonoides de *Iresine diffusa*. *Revista de la Facultad de Farmacia, UCV.* **79**.
90. Takeara R., Albuquerque S., Lopes N. P., Topes J. L. C. 2003. Trypanocidal activity of *Lychnophora staavioides* Mart. (Vernonieae, Asteraceae). *Phytomedicine.* **10**: 490-493.
91. Thakur, C.P. y col. 1999. Amphotericin B deoxycholate treatment of visceral leishmaniasis with newer modes of administration and precautions: a study of 938 cases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **93**: 319-323.
92. Tasdemir D., Kaiser M., Brun R., Yardley V., Schmidt T. J., Tosun F., Ruedi P. 2006. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *In vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **50**: 1352-1364.
93. Urbina J. A. 1999. Chemotherapy on Chaga's disease: the how and the why. *J. Mol. Med.* **77**: 332-338.
94. Urbina J.A. and Docampo R. 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends. Parasitol.* **19**: 495-501.
95. Uribarren, T. 2015. Leishmaniosis o Leishmaniasis. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.
96. Vásquez, L., Sierra, D., Rojas, E. 2002. Mecanismos de transmisión de la leishmaniasis. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* **22**: 182-187.

- 97.** Vercesi, A., Rodríguez, C., Catisti, R., Docampo, R. 2000. Presence of a Na⁺/K⁺ exchanger in acidocalcisomes of *Leishmania donovani* and their alkalization by antileishmanial drugs. *FEBS Lett.* **473**: 203-206.
- 98.** Villa, J. 2014. Nuevas estrategias para el tratamiento de la leishmaniasis: mecanismo de acción de lípidos antitumorales, interacción hospedero-parásito, y su posible utilidad terapéutica. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca. Salamanca, España.
- 99.** World Health Organization, (1995) WHO Model prescribing information: drugs used in parasitic diseases, 2nd edition, WHO, Geneva.
- 100.** Yamasaki, H., Sakihama, Y., Ikihara, N. 1997. Flavonoid peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant. Physiol.* **115**: 1405-1412.
- 101.** Zerpa O., Borges R., Loyo N., Galindo W., Belisario D., Rodríguez N. y col. 2002. Comparación de cinco métodos para el diagnóstico de Leishmaniasis cutánea. *Dermatol. Venez.* **40**: 106-110.
- 102.** Zhai L., Blom J., Chen M., Christensen S. B., Kharazmi A. 1995. The antileishmanial agent licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **39**: 2742-2748.