



Universidad Central
de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología

EFFECTO DE TETRAHIDROQUINOLINAS SUSTITUIDAS
SOBRE LA REGULACIÓN DE CALCIO INTRACELULAR DE
Trypanosoma cruzi

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la Ilustre Universidad
Central de Venezuela, por la Br. Marinés
García Leal como requisito parcial para
optar al título de Licenciada en Biología.

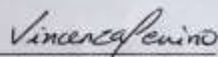
Tutora: Dra. Vincenza Cervino

CARACAS, VENEZUELA

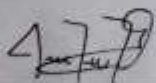
MAYO-2017

ACTA DE VEREDICTO DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. Marín García Leal, C.I.: V-21.468.211 para optar por el título de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en el reglamento respectivo, lo consideramos aprobado con la calificación de veinte (20) puntos. Para dar fe de ello se levanta la presente acta en la ciudad de Caracas a los dieciséis días del mes de mayo de 2017.



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



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



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

ÍNDICE GENERAL

Índice General.....	i
1. Resumen.....	1
2. Introducción	3
2.1 Ciclo de vida del <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
2.2 Tratamiento actual de la Enfermedad de Chagas y blancos de otras posibles drogas.....	9
2.3 El Ca^{2+} en humanos y tripanosomatidios.....	14
2.4 Homeostasis de Ca^{2+} en humanos y tripanosomatidios.....	15
2.5 Drogas que afectan la homeostasis de Ca^{2+} en <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
2.6 Compuestos derivados de productos naturales utilizados como agentes terapéuticos.....	19
3. Antecedentes.....	22
4. Objetivos.....	29
4.1 Objetivo general.....	29
4.2 Objetivos específicos.....	29
5. Materiales y Métodos.....	30
5.1. Materiales.....	30
5.1.1. Reactivos.....	30
5.1.2. Material biológico.....	31
5.2. Metodología.....	31
5.2.1. Cultivo de Parásitos	31
5.2.2. Curva de Proliferación de <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
5.2.3. Efecto de las Tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM180, DM191, DM223, DM231 y DM234 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	32

5.2.4. Obtención de vesículas de membrana plasmática de <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
5.2.5. Obtención de fantasmas de eritrocitos humanos.....	34
5.2.6. Determinación del efecto de las Tetrahydroquinolinas sustituidas DM191, DM117 y DM231 sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de eritrocitos humanos mediante determinación.....	35
5.2.7. Determinación del efecto de las Tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191 y DM231 sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
5.2.8. Determinación de la concentración de proteínas.....	37
5.2.9. Determinación del efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191 y DM231, sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} intracelular en poblaciones de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	38
5.2.10. Determinación del efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191 y DM231, sobre el potencial electroquímico mitocondrial de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	40
5.2.11. Determinación del efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191 y DM231, sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	41
6. Resultados.....	43
6.1. Curva de proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	43
6.2. Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM180, DM191, DM223, DM231 y DM234 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	44
6.3. Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM117 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> y determinación de su IC_{50}	48
6.4. Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM191 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> y determinación de su IC_{50}	50
6.5. Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM231 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> y determinación de su IC_{50}	52

6.6. Efecto de la droga de referencia Benznidazol sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> y determinación de su IC ₅₀	54
6.7. Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191 y DM231 sobre la actividad de la Ca ²⁺ -ATPasa de membrana plasmática de <i>Trypanosoma cruzi</i>	56
6.8. Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191 y DM231 sobre la actividad de la Ca ²⁺ -ATPasa de fantasmas de eritrocitos humanos.....	59
6.9. Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191, DM231 y el Benznidazol sobre los niveles intracelulares de Ca ²⁺ en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	61
6.9.1. Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM117 sobre los niveles intracelulares de Ca ²⁺ en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	62
6.9.2. Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM191 sobre los niveles intracelulares de Ca ²⁺ en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	63
6.9.3. Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM231 sobre los niveles intracelulares de Ca ²⁺ en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	64
6.9.4. Efecto del Benznidazol sobre los niveles intracelulares de Ca ²⁺ en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	65
6.10. Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191, DM231 y del Benznidazol sobre el potencial electroquímico mitocondrial en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	67
6.10.1. Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM117 sobre el potencial electroquímico mitocondrial en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	68
6.10.2. Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM191 sobre el potencial electroquímico mitocondrial en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	69

6.10.3. Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM231 sobre el potencial electroquímico mitocondrial en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	70
6.10.4. Efecto del Benznidazol sobre el potencial electroquímico mitocondrial en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	71
6.11. Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191, DM231 y del Benznidazol sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	72
6.11.1. Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM117 sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	73
6.11.2. Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM191 sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	74
6.11.3. Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM231 sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	75
6.11.4. Efecto del Benznidazol sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	76
6. Discusión.....	78
7. Conclusiones.....	95
8. Bibliografía.....	97

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Distribución Mundial de la Enfermedad de Chagas entre los años 2006-2010.....	4
- Figura 2. Distribución de la Enfermedad de Chagas en Venezuela.....	5
- Figura 3. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> en chipos y humanos.....	8

- Figura 4. Mecanismos de regulación del Ca^{2+} en tripanosomatidios.....	16
- Figura 5. Tetrahydroquinolinas sustituidas de la serie DM.....	25
- Figura 6. Curva de crecimiento de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	44
- Figura 7. Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	45
- Figura 8. Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas seleccionadas sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	47
- Figura 9. Efecto dosis respuesta de la tetrahydroquinolina sustituida DM117 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	49
- Figura 10. Efecto Dosis-Respuesta de la tetrahydroquinolina DM117 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> a las 144 horas de incubación con las diferentes concentraciones del compuesto.....	50
- Figura 11. Efecto dosis respuesta de la tetrahydroquinolina sustituida DM191 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	51
- Figura 12. Efecto Dosis-Respuesta de la tetrahydroquinolina DM191 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> a las 144 horas de incubación con las diferentes concentraciones del compuesto.....	52
- Figura 13. Efecto dosis respuesta de la tetrahydroquinolina sustituida DM231 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	53
- Figura 14. Efecto Dosis-Respuesta de la tetrahydroquinolina DM231 sobre la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> a las 144 horas de incubación con las diferentes concentraciones del compuesto.....	54
- Figura 15. Efecto dosis respuesta del Benznidazol sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	55
- Figura 16. Efecto Dosis-Respuesta del Benznidazol sobre la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> a las 144 horas de incubación con las diferentes concentraciones del compuesto.....	56
- Figura 17. Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191 y DM231 y del Benznidazol sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	58
- Figura 18. Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191 y DM231 y del Benznidazol sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa	

de la membrana plasmática de eritrocitos humanos.....	60
- Figura 19. Efecto de la tetrahydroquinolina DM117 sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	62
- Figura 20. Efecto de la tetrahydroquinolina DM191 sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	64
- Figura 21. Efecto de la tetrahydroquinolina DM231 sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	65
- Figura 22. Efecto del Benznidazol sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	66
- Figura 23. Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM117 sobre el potencial electroquímico mitocondrial en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	69
- Figura 24. Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM191 sobre el potencial electroquímico mitocondrial en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	70
- Figura 25. Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM231 sobre el potencial electroquímico mitocondrial en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	71
- Figura 26. Efecto del Benznidazol sobre el potencial electroquímico mitocondrial en epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	72
- Figura 27. Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM117 sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	74
- Figura 28. Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM191 sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	75
- Figura 29. Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM231 sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	76
- Figura 30. Efecto del Benznidazol sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	77

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. IC ₅₀ de las drogas comerciales, Nifurtimox y Benznidazol en diferentes cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
- Tabla 2. Fármacos que actúan sobre <i>Trypanosoma cruzi</i> y su principal mecanismo de acción.....	13
- Tabla 3. Porcentaje de inhibición de la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> en presencia de las tetrahydroquinolina sustituida DM117, DM180, DM191, DM223, DM231 y DM234 y el Benznidazol.....	46
- Tabla 4. Porcentaje de inhibición de las tetrahydroquinolinas DM117, DM191 y DM231 y del Benznidazol sobre la proliferación de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	48
- Tabla 5. Porcentaje de inhibición de las tetrahydroquinolinas DM117, DM191, DM231 y del Benznidazol sobre la actividad de la Ca ²⁺ -ATPasa de membrana plasmática de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i>	59
- Tabla 6. Relación estructura, IC ₅₀ sobre la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> y actividad en fibroblastos.....	84
- Tabla 7: Tabla Resumen de la actividad de los compuestos sobre la proliferación y sistemas reguladores de calcio de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> y la PMCA de eritrocitos humanos.....	92

1. RESUMEN

Las enfermedades parasitarias son actualmente consideradas un importante problema de salud pública a nivel mundial, afectando a más de 500 millones de personas en el mundo. Una de éstas es la Enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis americana, una parasitosis endémica de América producida por el parásito *Trypanosoma cruzi*. La Enfermedad de Chagas fue descubierta hace más de 100 años y aún un tratamiento terapéutico eficaz permanece desconocido. Dada la problemática existente por no existir vacuna contra la enfermedad, los efectos secundarios generados por las drogas comerciales hasta ahora conocidas: Nifurtimox y Benznidazol, su baja eficacia en ciertas fases y la resistencia que generan al parásito o al paciente, se ha avanzado en el desarrollo de nuevas clases de tripanocidas derivados de productos naturales, que pudiesen minimizar los problemas antes mencionados. Asimismo, el efecto de numerosas drogas tripanocidas ha sido relacionado con la alteración de la homeostasis intracelular de Ca^{2+} , lo cual conlleva a la pérdida de viabilidad del parásito, describiéndose así como posibles blancos a los distintos sistemas encargados de la regulación del Ca^{2+} intracelular, entre ellos la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática (PMCA).

En este proyecto se estudió el efecto de tres tetrahydroquinolinas sustituidas derivadas de plantas de clavo y canela, y de la droga de referencia Benznidazol, sobre la proliferación celular de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y su efecto sobre la actividad de la PMCA y otros sistemas encargados de la regulación intracelular de Ca^{2+} en este parásito. Se pudo observar que estos compuestos tuvieron una actividad antiproliferativa en epimastigotes de *T. cruzi* similar a la producida por el Benznidazol, incrementando además los niveles intracelulares de Ca^{2+} en los parásitos al afectar el funcionamiento de la PMCA y otros sistemas responsables de la homeostasis del calcio, como fue el transporte de Ca^{2+} mitocondrial y los acidocalcisomas, sin afectar a la PMCA de humanos. Dichos resultados permiten sugerir a la PMCA y otros sistemas reguladores de Ca^{2+} localizados en el mitocondrion y los acidocalcisomas de *T. cruzi* como posibles blancos de la acción

de estos compuestos, planteándose además a los mismos como posibles prototipos de potenciales drogas antichagásicas.

Palabras claves: homeostasis intracelular, calcio, *Trypanosoma cruzi*, tetrahydroquinolinas sustituidas, enfermedad de Chagas.

2. INTRODUCCIÓN

En casi todos los grupos de seres vivos, existen especies de organismos que viven estrechamente asociadas a otros. Cuando estas especies carecen de ciertos mecanismos para completar su metabolismo de modo independiente, requieren de compuestos químicos que sólo podrán obtener del organismo en el cual se encuentran, ocasionando en él un potencial daño. Esta asociación entre agente vivo y hospedador es denominada parasitismo, donde dicho agente vivo, o parásito, no sólo utilizará a su hospedador como hábitat temporal o permanente, sino que además dependerá de éste como fuente alimenticia (Gállego, 2007).

Las poblaciones de parásitos se integran en los ecosistemas circulando entre insectos vectores (aquellos capaces de transmitirlos de un organismo a otro) y hospedadores, animales silvestres o domésticos, donde evolucionan (Romaña y col., 2003). El ser humano es también un importante hospedador por ser susceptible al ingreso de estos parásitos, cuyos daños pudieran traducirse en respuestas inmunitarias que derivarían una enfermedad (Pedrique y col., 1999).

Las enfermedades parasitarias son actualmente consideradas un importante problema de salud pública a nivel mundial, debido al gran índice de morbi-mortalidad que ocasionan, y en algunos casos, por su dificultad para controlarlas, afectando a más de 500 millones de personas en el mundo (Monzote y Siddig, 2011). Además, se consideran estrechamente ligadas a bajas condiciones sanitarias, socio-económicas y ambientales, elementos que cohabitan en países sub-desarrollados con condiciones precarias donde dichas enfermedades reciben poca atención y se ven postergadas en las prioridades de la salud pública (Pérez-Arellano y col., 2007). Una de estas enfermedades parasitarias desatendidas es la Enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis americana, una parasitosis endémica de América producida por el parásito *Trypanosoma cruzi*, hemoflagelado del torrente sanguíneo de algunos mamíferos incluyendo al hombre, el cual se hospeda y reproduce en las células

de diferentes tejidos y órganos, sobre los cuales tiene efectos patológicos de complejidad variable (Armada y col., 2014).

La Enfermedad de Chagas afecta zonas de 21 países de América Latina, distribuyéndose desde México hasta Argentina; sin embargo, vectores, reservorios e inclusive humanos infectados han sido reportados en Estados Unidos, Canadá, muchos países europeos y algunos del Pacífico Occidental (Fig. 1). Esto obedece sobre todo a la movilidad de individuos infectados entre América Latina y el resto del mundo (OMS, 2016).

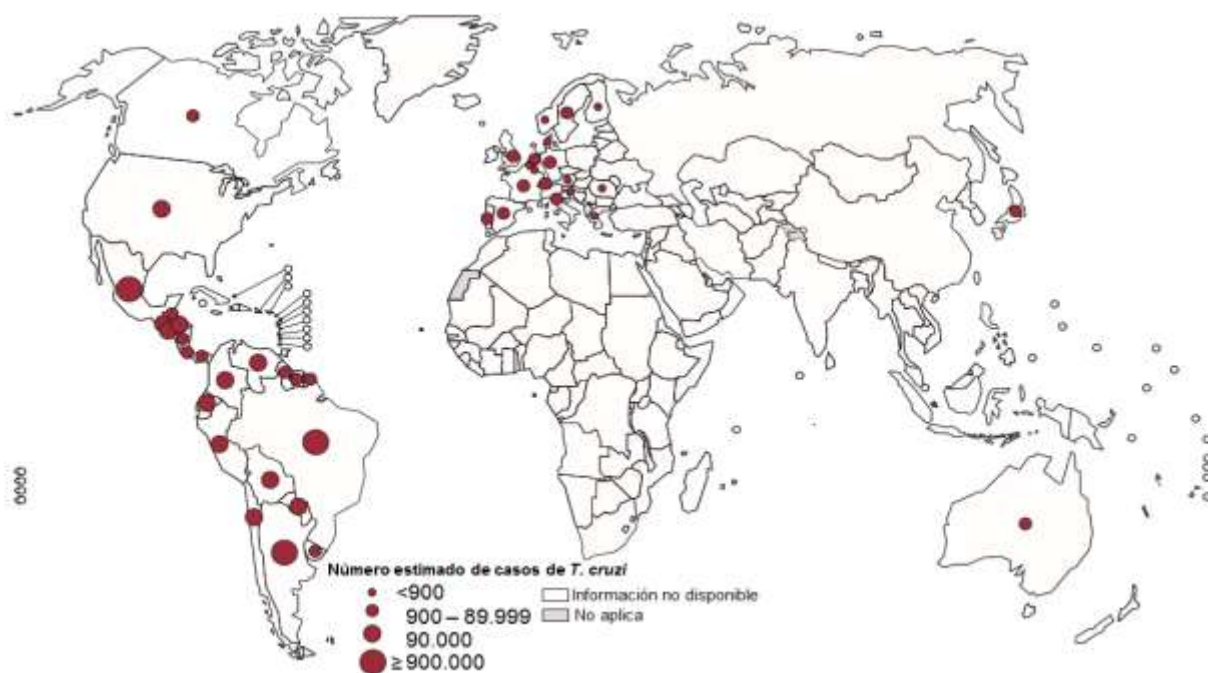


Figura 1. Distribución Mundial de la Enfermedad de Chagas entre los años 2006-2010.

Tomado de: http://www.who.int/chagas/Global_distribution_Chagas

En Venezuela, fue alrededor de 1930 cuando se comenzó a estudiar la Enfermedad de Chagas en varias regiones geográficas del país, estableciéndose como zonas endémicas numerosos estados como: Anzoátegui, Aragua, Barinas, Carabobo, Cojedes, Caracas, Lara, Mérida, Miranda, Monagas,

Portuguesa, Sucre, Táchira, Trujillo, Vargas y Yaracuy (Carrasco y col., 2012) (Fig. 2). Actualmente, los recientes focos agudos se encuentran en la región capital y los estados: Vargas, Cojedes, Lara, Barinas y el oriente-sur del país (Armada y col., 2014) (Fig. 2).

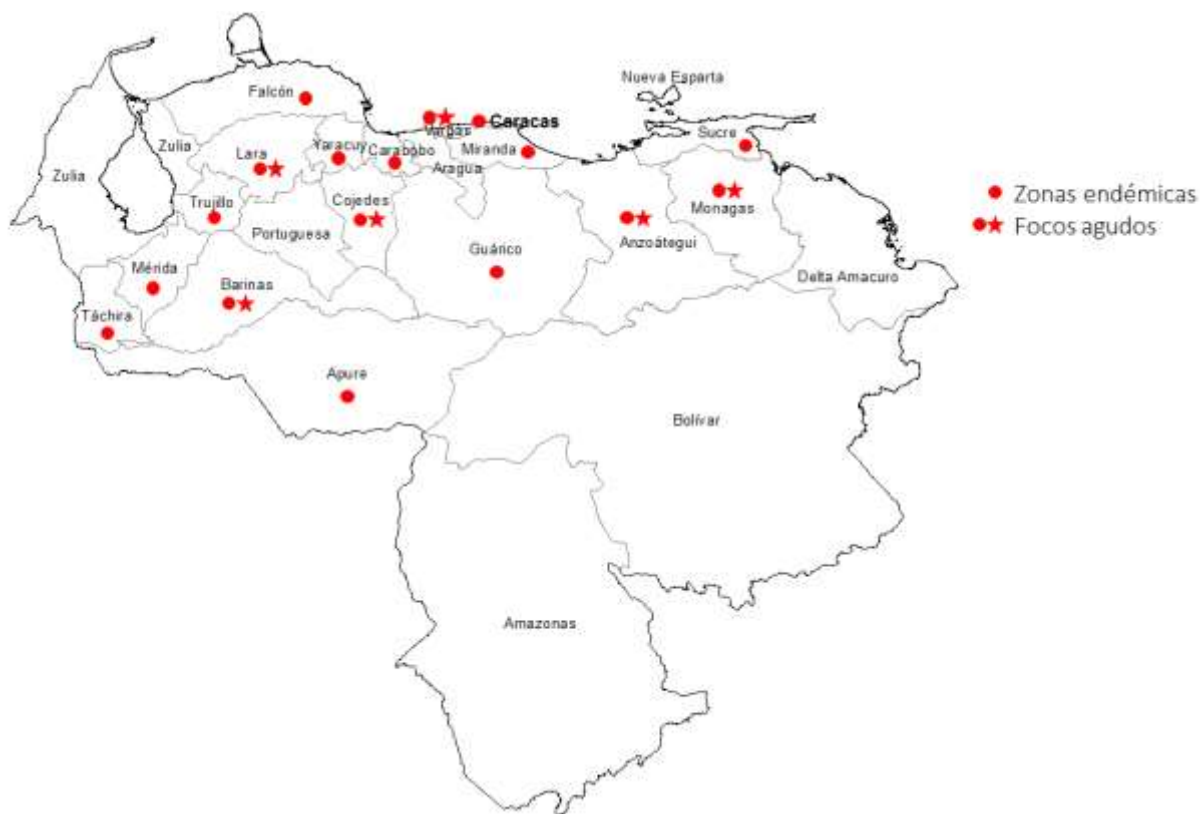


Figura 2. Distribución de la Enfermedad de Chagas en Venezuela.

Tomado de: Armada y col., 2014

Asimismo, en Venezuela la Enfermedad de Chagas tiene una incidencia y seroprevalencia del 4 % y 13 %, respectivamente, en la población general (Rodríguez-Bonfante y col., 2007) y en algunas comunidades indígenas entre 7,4 % y 13,9 % (Añez y col., 2011; Berrizbeitia y col., 2012), considerándose un riesgo para 6 millones de personas que habitan en los estados más afectados.

Actualmente son escasos los estudios epidemiológicos sobre esta enfermedad en los estados Bolívar (Noya-Alarcón y col., 2012) y Delta Amacuro (Lugo y col., 2007).

A nivel mundial se estima que de 8 a 15 millones de personas están infectadas, siendo éste uno de los principales problemas de salud pública de los países latinoamericanos (Armada y col., 2014). Se destacan por su gravedad, la cardiopatía chagásica y las dilataciones de órganos cavitarios (megaesófago, megacólon, etc.), que afectan principalmente al aparato digestivo. Las lesiones cardíacas son responsables de la elevada mortalidad, especialmente en la fase crónica de la enfermedad (Rey, 1991).

El *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de la Enfermedad de Chagas, pertenece al filo Euglenozoa, clase Zoomastigophora, orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, y género Trypanosoma. Fue descrito por el doctor brasileño Carlos Chagas en Brasil en el año 1909, quien encontró por primera vez los flagelados en el intestino de triatominos (Rassi y col., 2010). Este género se caracteriza por presentar un organelo peculiar que los define llamado kinetoplasto, que consiste en una red de ADN extranuclear localizada en un punto específico de la mitocondria (única en estos casos). Esta red de ADN representa una proporción importante del ADN total celular ya que, dependiendo de la especie, puede contener del 10 % al 20 % del ADN total de la célula.

Su forma principal de transmisión es vectorial, desarrollando su ciclo de vida entre dos tipos de hospedadores: vertebrados mamíferos, representados en nueve órdenes, entre los cuales se incluyen animales silvestres, domésticos y sinantrópicos, y otros invertebrados tales como insectos hematófagos (Hemíptera, Reduviidae, Triatominae) conocidos en Venezuela como chipos (Rey, 1991), los cuales no se ven afectados por la infección con el parásito (Rassi y col, 2010). En cada hospedador los parásitos presentan diferentes estadios, donde los mismos pueden adaptarse a una variedad de condiciones (Cervino y Benaim, 2014). Así en el hospedador invertebrado, los triatominos se desarrollarán en epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos, y en el hospedador vertebrado se diferenciarán a tripomastigotes sanguíneos y amastigotes intracelulares. Los cuatro morfotipos se distinguen entre sí por la posición del kinetoplasto en relación al núcleo, por la presencia o ausencia

de una membrana ondulante y por el tamaño (Rey, 1991). Sin embargo, la infección también se puede adquirir mediante transfusión de sangre, transmisión congénita (de la madre infectada a su hijo), donación de órganos, accidentes en laboratorios donde se manipula este tipo de parásito o por ingestión de comida y/o líquido contaminado con el parásito (OMS, 2016).

2.1 Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*

El ciclo de vida inicia cuando el triatomino al alimentarse, ingiere tripomastigotes sanguíneos de la sangre del mamífero infectado, los cuales se diferencian en epimastigotes en el intestino medio (o estómago) del insecto. Estos luego migran hacia el intestino posterior del triatomino, donde se fijan al revestimiento epitelial y se transforman en tripomastigotes metacíclicos, la forma infectiva del parásito (Bern, 2011). Cuando el vector se alimenta de un nuevo hospedador, excreta sus heces por un mecanismo reflejo de defecación rápida donde se encuentran dichos tripomastigotes metacíclicos (Pabón, 2014), éstos ingresan al organismo cuando el hospedador se frota o rasca, pues de esta forma se facilita su penetración a las células alrededor de la herida de la picadura, de una lesión en la piel o de las mucosas, como fibroblastos, histiocitos y especialmente células del sistema fagocítico mononuclear o SFM (Bern, 2011). Los tripomastigotes pueden escapar de lisosomas o vacuolas digestivas e invadir el citoplasma de la célula parasitada donde sufren una reorganización estructural, se diferencian en amastigotes y se multiplican por fisión binaria por unos 4 o 5 días, y al estar colmada la célula de amastigotes, éstos se transforman en tripomastigotes nuevamente, la célula se lisa y son liberados al torrente sanguíneo. Los parásitos circulantes pueden invadir células sanas, principalmente musculares (lisas, estriadas y cardíacas) y nerviosas (astrocitos), volviendo a iniciar los ciclos replicativos y estar disponibles para infectar al triatomino vector sano (Fig. 3). Este ciclo asegura la continuidad de la infección en el hospedador vertebrado y la propagación del parásito a otros

órganos y tejidos, así como también la progresión de las lesiones debidas directamente al parásito (Bern, 2011).

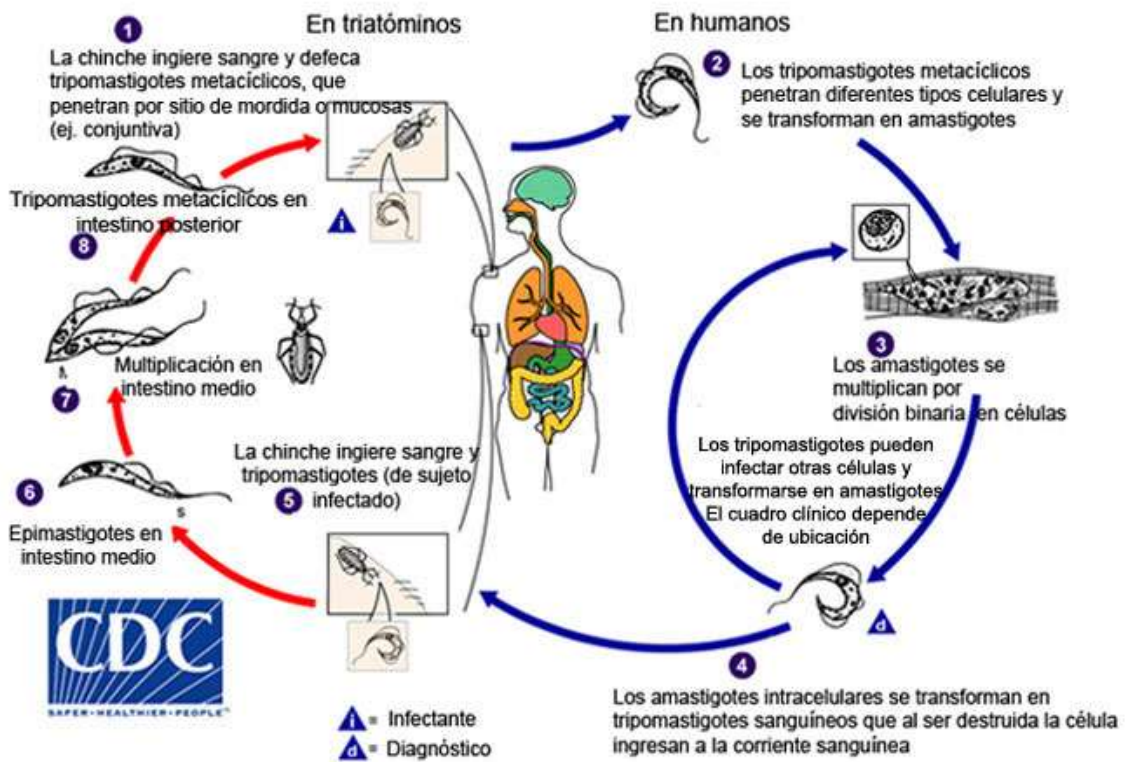


Figura 3. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* en chipos y humanos. Modificado de: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>.

De esta forma la infección por *T. cruzi* presenta dos fases: una *fase aguda* inicial en la que se evidencia una alta parasitemia y se da una respuesta rápida del sistema inmune ante la agresión por el parásito, ocasionando en el paciente síntomas leves; y una *fase crónica* posterior en la que los pacientes no muestran síntomas y los parásitos desaparecen en gran parte del torrente circulatorio, ya que su replicación es controlada por el sistema inmune del huésped, pero pueden ser detectados

en células cardíacas y/o musculares. Entre el 20 % y 30 % de estos pacientes infectados pueden desarrollar una serie de alteraciones graves a nivel cardíaco y/o gastrointestinal (Bern, 2011).

2.2 Tratamiento actual de la Enfermedad de Chagas y blancos de otras posibles drogas

A pesar de que la Enfermedad de Chagas es una enfermedad descubierta hace más de un siglo, tanto la patogénesis como el desarrollo de un tratamiento específico contra la misma, no han sido completamente dilucidados.

Diferentes hipótesis han sido descritas para explicar el origen y el desarrollo de las manifestaciones clínicas de la enfermedad, entre las cuales se destacan la hipótesis autoinmune y la hipótesis parasitaria. La primera está basada en la aparición tardía de la miocardiopatía relacionada a la enfermedad y a la ausencia del parásito en el torrente sanguíneo y/u órganos lesionados, estableciendo que la respuesta inflamatoria se debe a una alteración en la especificidad de la respuesta inmunitaria, la cual inicialmente es contra el parásito y luego dirigida hacia antígenos propios del hospedador (Bonney y Engman, 2015). Es por esta razón que las personas no eran beneficiadas con el tratamiento antiparasitario (Armada y col., 2014), produciéndose un prolongado retraso en la investigación de nuevos fármacos (Urbina, 2010).

En contraste con la hipótesis anterior se encuentra la hipótesis parasitaria, actualmente la más aceptada, que establece una estricta correlación entre la presencia del parásito y las lesiones inflamatorias. Esta se basa principalmente en la detección de antígenos y ADN de *T. cruzi* mediante técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa o PCR en los tejidos infectados y la ausencia del parásito en tejido no afectado (Bonney y Engman, 2015), indicando que la enfermedad debe ser tratada en efecto como una infección parasitaria y no autoinmune (Armada y col., 2014).

En la actualidad el tratamiento existente para combatir la enfermedad se basa en dos únicas drogas, las cuales buscan eliminar el parásito en las personas infectadas y así interrumpir la cadena de transmisión; disminuir la incidencia de niños nacidos con el protozoario; aumentar el número de donantes de sangre y órganos; y evitar las complicaciones inmediatas que puedan surgir por el compromiso de órganos blanco (OMS, 2016).

Dichos fármacos son el Nifurtimox (NFX) un derivado nitrofuránico (Lampit®, Laboratorio Bayer) y el Benznidazol (BZN) un derivado nitroimidazólico (Radanil®, Laboratorio Roche; Rochagan®, inicialmente Laboratorio Roche y actualmente Laboratorio Lafepe, Brasil). El mecanismo de acción de estos fármacos está relacionado con la producción de intermediarios de nitroreducción que generan estrés oxidativo (NFX) (aumenta el número de radicales libres como O^{2-} y H_2O_2) y reductivo (BNZ) (inhibiendo la enzima fumarato reductasa) en el parásito (Pinazo y col., 2010). La comercialización de estos fármacos es bastante reciente, iniciándose entre finales de 1960 y 1970 y han sido aceptados por casi todos los ministerios de salud de Latinoamérica como la quimioterapia específica contra *T. cruzi* (OMS, 2016). Sin embargo, en Venezuela ninguno de los dos fármacos se encuentra registrados en el Instituto Nacional de Higiene, ente regulador adscrito al Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS), y solo se encuentran en la forma de “medicamento de servicio” (Armada y col., 2014). Numerosos datos clínicos reportan que tanto el Nifurtimox como el Benznidazol resultan ser eficaces en la fase aguda de la enfermedad y en las etapas tempranas de la fase crónica (Murcia y col., 2016) reduciendo la severidad de los síntomas, el curso clínico de la enfermedad y la duración de la parasitemia entre un 80 % y 90 % (Pinazo y col., 2010). Sin embargo, en la fase crónica han presentado baja eficacia, demostrándose un rango de cura de aproximadamente 60 % en estudios realizados en niños (Sosa y col, 1998), sin la existencia de datos válidos en pacientes adultos (Pinazo y col., 2010), a pesar de que en los últimos 15 años se ha amplificado el estudio del tratamiento en los mismos.

Al uso de estas drogas se encuentran frecuentemente asociados numerosos efectos secundarios: el Nifurtimox puede producir anorexia, pérdida de peso, náuseas, vómitos, molestias abdominales, dolor de cabeza, entre otros; el Benznidazol, efectos dermatológicos como dermatitis alérgica, parestesia, neuropatía periférica, anorexia, pérdida de peso, náuseas, vómitos, entre otros (Bern, 2011). Sin embargo, el Benznidazol ha sido considerado como el tratamiento de primera línea contra la Enfermedad de Chagas, por presentar menores efectos secundarios que el Nifurtimox y una mayor eficacia (Bern, 2011).

La efectividad de los fármacos comerciales ha sido reportada en los diferentes trabajos con el IC_{50} , la concentración del fármaco requerido para inhibir en un 50 % la población parasitaria *in vitro*, observándose valores variables (ver tabla 1). Es importante mencionar que la eficacia de ambos fármacos varía según el área geográfica, debido a una susceptibilidad diferencial de las distintas cepas existentes de *T. cruzi* (Pinazo y col., 2010), cuando el paciente desarrolla resistencia al tratamiento al cual era inicialmente sensible (Wilkinson y Kelly, 2009) o bajo condiciones experimentales variables. También sus efectos son variables en los diferentes estadios celulares del parásito (Tabla 1).

Tabla 1: IC₅₀ reportados de las drogas comerciales Nifurtimox y Benznidazol, en diferentes cepas de *T. cruzi*.

Fármaco	Cepa	Epimastigotes	Tripomastigotes	Amastigotes	Fuente
Benznidazol	Z3, <i>T. cruzi</i> I y II, Esmeraldo, Y, Silvio X10	Entre 7.33 y 27.30 μ M	-	Entre 3.33 y 22.03 μ M	Luna y col., 2009
	Aislados de <i>T. cruzi</i> : E, PM, 1593, 1595.	Entre 35.78 y 50.43 μ M	Entre 49.32 y >3800 μ M	-	Muñoz-Calderón y col., 2012
	Y	5.6 μ M	-	-	Lechuga y col., 2016
	115, Berenice 62, CL Brenner, Y, Berenice 78, B147, Colombiana, Esmeraldo, Silvio X10, VL10, SC2005, YuYu	7.6 μ M	-	-	Moreno y col., 2010
	CL Brenner	27.12 μ M	-	0.80 μ M	Fonseca-Berzal y col., 2013
Nifurtimox	Z3, <i>T. cruzi</i> I y II, Esmeraldo, Y, Silvio X10	Entre 1.56 y 5.05 μ M	-	Entre 1.1 y 3.55 μ M	Luna y col., 2009
	Aislados de <i>T. cruzi</i> : E, PM, 1593, 1595	Entre 3.65 y 63.42 μ M	Entre 46.54 y 213.96 μ M	-	Muñoz-Calderón y col., 2012
	Tulahuen CL2	-	-	0.45 μ M	Franck y col., 2004

Numerosos avances en el conocimiento de la biología del parásito han permitido desarrollar nuevos enfoques y estrategias para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas con compuestos que se espera sean más selectivos y eficaces, basándose en las diferencias de estos organismos con respecto a las células humanas para determinar posibles nuevos blancos terapéuticos (Tabla 2).

Cómo puede observarse, han sido propuestos diferentes blancos para la acción de distintos compuestos o fármacos (Tabla 2), evidenciándose que algunos fármacos reportados tienen un efecto sobre la disrupción de la regulación del Ca²⁺ intracelular en estos tripanosomatidios, planteándose que los sistemas reguladores de Ca²⁺ podrían ser blancos de la acción terapéutica de algunas drogas,

alterando la homeostasis de Ca^{2+} y conduciendo a la pérdida de la viabilidad del parásito (Cervino y Benaim, 2014).

Tabla 2. Fármacos que actúan sobre *Trypanosoma cruzi* y su principal mecanismo de acción. Fuente: modificada de Apt y Zulantay, 2011; Armada y col., 2014.

Fármaco	Mecanismo de acción	Fuente
Derivados triazólicos (posaconazol, itraconazol, ketoconazol, miconazol, econazol, ravuconazol)	Inhibidores de la síntesis de ergosterol, esteroles esenciales para <i>T. cruzi</i> y homeostasis de calcio	Urbina, 2010; Apt y Zulantay, 2011
Inhibidores de cisteín-proteasas	Bloqueo de la cruzipaina, proteasa esencial del <i>T. cruzi</i>	Urbina, 2010; Apt y Zulantay, 2011
Inhibidores de enzimas relacionadas con las reacciones orgánicas e inorgánicas del pirofosfato (residronate (RIS), tipifarnib)	Inhibidores del metabolismo del pirofosfato	Urbina, 2010; Apt y Zulantay, 2011
Butonina-Sulfaximina (BSO)	Inhibidores de la síntesis y metabolismo del tripanotión	Urbina, 2010; Apt y Zulantay, 2011
Alopurinol	Inhibidores de la captura de purinas y síntesis de ADN	Urbina, 2010; Apt y Zulantay, 2011
Derivados de benzimidazol: sintetizados mediante reemplazos isostéricos del grupo tiazol de la molécula por pirazina, pirimidina, pirimidinas sustituidas y anilinas sustituidas.	Efecto sobre el metabolismo de la glucosa	Velázquez-López y col., 2016
Diamidinas aromáticas	Efecto sobre las secuencias de A/T del ADN circular del kinetoplasto y homeostasis de calcio	Werbovetz, 2006; Wilson y col., 2008
Alcaloides e isoquinolinas	Inhibidores de la cadena respiratoria	Morello y col., 1994
-Cristal violeta -Antiarrítmicos como: amiodarona y dronedarona -Miltefosina	Homeostasis de calcio	Benaim y col., 1993 Benaim y col., 2006; Benaim y col., 2012; Benaim y col., 2014; Benaim y Paniz-Mondolfi, 2012.

2.3 El Ca^{2+} en humanos y tripanosomatidios

El calcio ha sido reconocido como un regulador biológico universal: un importante segundo mensajero que está involucrado en procesos de transducción de señales en todas las células eucariotas estudiadas hasta el presente (Carafoli y Krebs, 2016), regulando así numerosas funciones celulares como por ejemplo, la fertilización, contracción muscular, secreción, metabolismo celular y transcripción de genes (Berridge y col., 2000). El calcio es un catión bivalente cuya concentración en el medio intracelular de las células de los mamíferos es menor con respecto al exterior celular (50-100 nm y ≤ 2 mM, respectivamente) y puede encontrarse unido a compuestos inorgánicos y orgánicos de bajo peso molecular (Carafoli y Krebs, 2016). Este marcado gradiente de concentración constituye la base de su acción como desencadenante de numerosos procesos, ya que su incremento en el interior celular, puede activar diversas cadenas de transducción de señales regulando múltiples funciones celulares (Benaim y col., 2014) o procesos que conducen a la muerte celular (Pinton y col., 2008).

Se ha reportado que en eucariotas inferiores como los tripanosomatidios, el Ca^{2+} también juega un papel importante en el desarrollo de funciones vitales como el movimiento flagelar, diferenciación, despolarización de microtúbulos, invasión de células hospedadoras y en el mecanismo de evasión de la respuesta inmune o variación antigénica (Cervino y Benaim, 2014). Al igual que en mamíferos, la concentración intracelular de Ca^{2+} se encuentra en el rango nanomolar (Docampo, 1993) y cualquier alteración en la misma puede afectar la viabilidad del parásito (Cervino y Benaim, 2014).

2.4 Homeostasis de Ca^{2+} en humanos y tripanosomatidios

Tanto en mamíferos como en tripanosomatidios la homeostasis de Ca^{2+} es mantenida gracias a la acción de distintos sistemas transportadores de Ca^{2+} (Fig. 4) (Carafoli y Krebs, 2016).

En mamíferos, dos Ca^{2+} -ATPasas han sido descritas: en la membrana del retículo endo(sarco)plasmático (bomba SERCA); y en la membrana plasmática (bomba PMCA) (Brini y col, 2012). Ambas pertenecientes a la familia de bombas tipo P, las cuales durante su ciclo catalítico forman un intermediario fosforilado de alta energía (Brini y col., 2012). Al igual que en mamíferos, ha sido identificada y caracterizada una Ca^{2+} -ATPasa (PMCA) en la membrana plasmática de todos los tripanosomatidios estudiados, la cual presenta una alta afinidad por Ca^{2+} , es dependiente de Mg^{2+} y es estimulable por Calmodulina (CaM) (Fig. 4) (Cervino y Benaim, 2014; Carafoli y Krebs, 2016). Tanto en tripanosomatidios como en células eucariotas superiores, esta enzima, es el único mecanismo por el cual se expulsa Ca^{2+} al exterior celular, siendo reportada como la estructura más importante involucrada en la regulación fina de los niveles basales de Ca^{2+} . Asimismo, en los tripanosomatidios ha sido reportada la presencia de una Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA, similar a la de eucariotas superiores, capaz de almacenar Ca^{2+} en el retículo con una alta afinidad (Fig. 4) (Docampo, 1993).

Por otra parte, en los tripanosomatidios se ha reportado la existencia de reservorios intracelulares ácidos de Ca^{2+} , llamados acidocalcisomas (Fig. 4). Estos organelos además de Ca^{2+} , acumulan grandes cantidades de fosfatos en forma de pirofosfato y polifosfatos de cadena larga, por lo que se le atribuyen funciones más bien metabólicas. Sin embargo, ha sido reportado que éstos podrían jugar también algún papel en la regulación de Ca^{2+} ya que presenta una Ca^{2+} -ATPasa que es capaz de introducir Ca^{2+} al organelo de una manera dependiente del pH (Docampo y Huang, 2015). Adicionalmente, se ha reportado en eucariotas superiores y en tripanosomatidios la existencia de un uniporte electroforético de Ca^{2+} mitocondrial, el cual utiliza la diferencia de potencial electroquímico

generado por el gradiente de protones mitocondrial, como fuerza para introducir Ca^{2+} a la mitocondria. Los tripanosomatidios poseen un único mitocondrión, con un sistema electroforético de Ca^{2+} unidireccional que tiene una alta capacidad para acumular el Ca^{2+} pero una muy baja afinidad por este catión, lo cual sugiere que éste no puede ser el responsable de mantener los niveles intracelulares basales de Ca^{2+} en estos parásitos (Fig. 4), pero juega un papel muy importante en la regulación del mismo, una vez que el nivel de Ca^{2+} dentro de la célula se encuentra incrementado en respuesta a alguna señal.

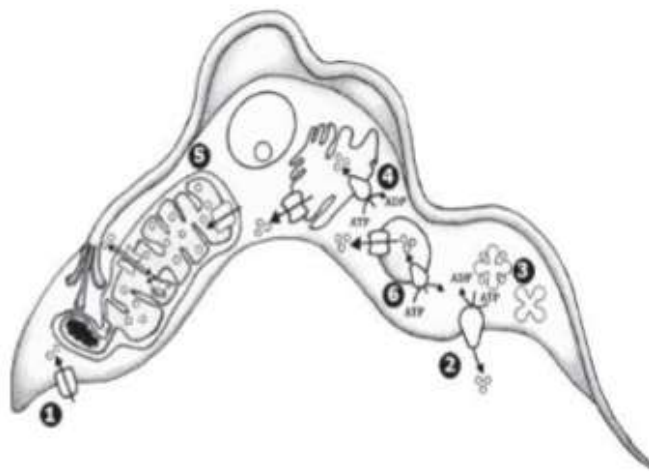


Figura 4. Mecanismos de regulación del Ca^{2+} en tripanosomatidios. 1) Canal de Ca^{2+} , 2) Bomba PMCA, 3) Calmodulina (CaM), 4) Bomba SERCA, 5) Uniporte de Ca^{2+} mitocondrial y 6) Ca^{2+} -ATPasa de los acidocalcisomas. (Tomado de Cervino y Benaim, 2014)

Como puede observarse en la figura 4, los tripanosomatidios al igual que los mamíferos, mantienen su homeostasis de Ca^{2+} , gracias a la acción combinada de diferentes sistemas transportadores de Ca^{2+} . Así, después de alguna señal que incremente los niveles intracelulares de Ca^{2+} , el uniporte de Ca^{2+} mitocondrial y la Ca^{2+} -ATPasa tipo SERCA introducen el Ca^{2+} hacia el interior

de la mitocondria y el retículo endoplasmático respectivamente, disminuyendo así los niveles intracelulares del catión. Seguidamente la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática expulsa Ca^{2+} de la célula con mayor afinidad realizando la regulación fina del Ca^{2+} intracelular y regresándolo a sus niveles basales. Estos sistemas reguladores presentan características funcionales similares en tripanosomatidios y mamíferos. Sin embargo, se han reportado algunas diferencias importantes a nivel estructural y regulatorio que pudieran ser de importancia para el diseño racional de drogas contra estos tripanosomatidios. Dada la importancia del mantenimiento de la homeostasis de Ca^{2+} para la viabilidad del parásito, algunos investigadores han dirigido su atención hacia los estudios de drogas o compuestos que pudieran ejercer su efecto alterando el funcionamiento de los mecanismos encargados de mantener la regulación del Ca^{2+} en estos parásitos afectando su homeostasis. En este sentido, tal como puede observarse en la Tabla 2, algunos estudios han mostrado evidencias del efecto tripanocida de drogas, cuyo mecanismo de acción es sobre los sistemas reguladores de Ca^{2+} (Benaïm y García, 2011).

2.5 Drogas que afectan la homeostasis de Ca^{2+} en *Trypanosoma cruzi*

Uno de los primeros estudios que demostraron que el calcio ejerce un efecto directo en la acción tripanocida fue realizado en 1979 por D'hondt y col. al encontrar que el efecto citotóxico generado por el suero humano en *T. brucei* era brindada por la presencia de calcio en las lipoproteínas de alta densidad (HDL) presentes en el suero. Asimismo, en 1982, un grupo de investigadores también observaron un efecto sinérgico entre el calcio y dos drogas utilizadas (melarsoprol y ácido salicílico hidroxámico o SHAM) en *T. brucei* (Benaïm y García, 2011).

Por otra parte, en 1993, fue reportado que la pentamidina, agente antiprotozoario y antifúngico de la clase de las diamidinas aromáticas inhibe la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática en *T. brucei* y no genera efectos negativos en la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de eritrocitos humanos y

de cerdo (Benaim y García, 2011). Un efecto similar ocurre con el cristal violeta, colorante derivado del trifenilmetano, descrito como agente tripanocida en 1953, con el cual se demostró también en 1993, que inhibe la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática, induce un colapso del potencial de membrana mitocondrial y el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa en epimastigotes de *T. cruzi* (Benaim y García, 2011).

Otra droga, la amiodarona, utilizada como medicamento contra la cardiomiopatía chagásica puesto que es un anti-arritmico de amplio espectro y un potente vasodilatador, se ha evidenciado que tiene un efecto en *T. cruzi* donde se demostró que induce la liberación de calcio de reservorios intracelulares, específicamente del mitocondrion de los epimastigotes de estos parásitos (Benaim y col., 2006) y de los acidocalcisomas (Benaim y col., 2012), traducándose en un efecto inhibitorio en la proliferación de estos tripanosomatidios. Adicionalmente, este efecto también pudo ser observado con alta efectividad en células VERO infectadas con amastigotes, mostrando ser específico del parásito pues no afectó las células del mamífero (Benaim y col., 2006). Demostrándose también un efecto sinérgico al utilizar amiodarona combinada con posaconazol, fármaco antifúngico constituyente de los azoles, que posee actividad tripanocida ya que inhiben la síntesis de ergosterol. Es importante mencionar que ambos fármacos inhiben la oxidoescualeno ciclasa, enzima clave en la biosíntesis de ergosterol, el cual es esencial para la supervivencia del parásito.

Debido a los efectos secundarios de la amiodarona que incluyen toxicidad tiroidea, pulmonar y gastrointestinal, por la presencia de yodo en su estructura, se consideró como una nueva posible droga a un derivado de la misma denominado dronedarona. Al igual que la amiodarona, la dronedarona es un anti-arritmico pero que estructuralmente no presenta yodo y es más liposoluble, lo cual lo hace menos tóxico para el ser humano (Oyetayo y col., 2010). La dronedarona también mostró ser efectiva en la antiproliferación de epimastigotes de *T. cruzi* alterando la homeostasis de

calcio mediante la alcalinización de los acidocalcisomas y la disipación del potencial mitocondrial (Benaïm y col., 2012).

Por otra parte, la miltefosina, fosfolípido sintético originalmente desarrollado como una droga antitumoral y el primer compuesto oral aprobado para tratar leishmaniasis visceral y cutánea (Berman, 2005), se ha demostrado que ocasiona una alteración en la homeostasis de Ca^{2+} en *T. cruzi*, induciendo el colapso del potencial mitocondrial y la salida de calcio desde los acidocalcisomas (Benaïm y col., 2012).

2.6 Compuestos derivados de productos naturales utilizados como agentes terapéuticos

La Enfermedad de Chagas fue descubierta hace más de 100 años y aún un tratamiento terapéutico válido y eficaz permanece desconocido. Dada la problemática existente por: no existir vacuna contra la enfermedad; los numerosos efectos secundarios generados por las drogas comerciales hasta ahora conocidas, basadas en compuestos nitroaromáticos que por su mecanismo de óxido-reducción forman radicales libres tóxicos; su tratamiento a largo plazo; la baja eficacia en ciertas fases; y la resistencia que genera al parásito o al paciente, se ha avanzado en el desarrollo de nuevas clases de tripanocidas derivados de productos naturales, teniendo en cuenta también la interacción que pudiese tener con el hospedador mamífero (Uchiyama, 2009).

Los compuestos naturales han sido explorados basándose en el hecho de que son abundantes en la naturaleza, de fácil extracción y además ricos en componentes con grupos funcionales activos. Entre los productos naturales que han sido más recientemente utilizados están los aislados de extractos de origen vegetal:

Agentes anti-microtúbulos, como la droga taxol, obtenida de *Taxus brevifolia*, conífera nativa del noroeste del Pacífico en Norteamérica, y sus derivados sintéticos utilizados en tratamientos de

cáncer, han resultado tóxicos contra *T. cruzi* causándole alteraciones morfológicas, interrupción de la división nuclear y citocinesis (Duschak y Cuoto, 2007).

Los estilbenos y series sintéticas derivados de polifenoles naturales presentes en familias de plantas superiores, fueron probados en cultivos de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*, encontrándose que algunos actúan similares al Benznidazol en los epimastigotes y otros al cristal violeta en tripomastigotes (Duschak y Cuoto, 2007).

Los flavonoides, metabolitos sintetizados en las plantas y propóleos (la resina que las abejas extraen de las plantas para recubrir y proteger la colmena) también muestran tener actividad tripanocida, actuando contra todas las formas del parásito. Igualmente, derivados de 1,4-naftoquinona muestran actividad antiproliferativa de *Trypanosoma cruzi* (Duschak y Cuoto, 2007).

Se ha demostrado también, que una gran variedad de compuestos de terpenos aislados de diferentes plantas actúa como tripanocidas, como el carvacrol (terpeno fenólico), componente del aceite vegetal de la planta de orégano (*Origanum vulgare*) que actúa a nivel de la homeostasis de calcio (Rao y col., 2010). El grupo de las agelasinas, compuestos derivados de las esponjas marinas, también presentan actividades citotóxicas, como antimicrobial, antimalárica y tripanocida. La agelasina B, por ejemplo, es capaz de incrementar la concentración de Ca^{2+} intracelular inhibiendo la Ca^{2+} -ATPasa del retículo endo(sarco)plasmático e induciendo apoptosis (Pimentel y col., 2012).

Alcaloides obtenidos de *Vinca rosea*, planta herbácea endémica de Madagascar y derivados sintéticos de pimienta negra *Piper nigrum*, han mostrado también tener un efecto inhibitorio de la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, señalándolos como potenciales drogas anti-tripanocidas. Asimismo, glicoalcaloides probados en epimastigotes y tripomastigotes metacíclicos y sanguíneos mostraron un mayor efecto que el ketoconazol, azol que inhibe la síntesis de ergosterol, en epimastigotes de *T. cruzi* (Duschak y Cuoto, 2007).

Numerosos alcaloides que muestran actividad biológica pueden presentar en su estructura química heterocíclicos neutros formados por la fusión de un anillo de benceno y otro de piridina, denominados quinolinas (benzo[b]piridinas o 1 -azanaftaleno) (Collado, 2014). Recientemente, las quinolinas, han ganado un gran interés pues se ha encontrado que poseen actividad antimalárica, antibacterial, analgésica, antiinflamatoria, antitumoral, antifúngica, antiviral y antiprotozoaria. Existen diferentes vías por las cuales pueden sintetizarse y además pueden modificarse para generar numerosas series de quinolinas sustituidas (Marella y col., 2013).

En los últimos años se han sintetizado quinolinas sustituidas denominadas tetrahydroquinolinas. Estas son derivadas a partir del fenilpropano o isoeugenol de plantas de nuez moscada, clavos de olor y canela, en presencia de diversos benzaldehídos, isatina y anilinas, mediante una reacción de cicloadición imino Diels-Alder y por sustitución de los grupos radicales, generándose así series o familias de moléculas (Kouznetsov y col., 2010). Las tetrahydroquinolinas también poseen actividades biológicas como antimalárica, antitumoral, antioxidante, antiinflamatoria y antifúngica (Muñoz y col., 2010; Muñoz y col., 2012) y son de gran interés como posibles drogas a ser exploradas en los tripanosomatidios.

3. ANTECEDENTES

Los aceites esenciales de plantas, hierbas o especias constituyen un grupo de compuestos orgánicos de bajo peso molecular como terpenos, terpenoides y fenilpropenos. Un compuesto perteneciente al grupo de los fenilpropenos, el isoeugenol, se encuentra en gran proporción en plantas de nuez moscada del género *Myristica*, de clavos de olor (*Eugenia caryophyllata*) y de canela (*Cinnamomum verum*) (Hylgaard y col., 2015). El isoeugenol, ha mostrado tener actividad antimicrobial (Hylgaard y col., 2015) y tripanocida en *T. cruzi* y *Leishmania spp.* (Azeredo y Soares, 2013).

Se ha propuesto que la actividad biológica del isoeugenol se debe a su grupo hidroxilo libre (-OH) y su posición en la cadena (Hylgaard y col., 2015) y que su acción en organismos está relacionada a su papel protector en plantas, como los demás componentes de los aceites esenciales (Azeredo y Soares, 2013). Si el isoeugenol es sometido a reacciones de cicloadición imino Diels-Alder es posible generar quinolinas sustituidas denominadas tetrahydroquinolinas y por sustitución de los grupos radicales se sintetizan entonces series o familias de moléculas (Kouznetsov y col., 2010). Como es de esperarse, se ha reportado que las tetrahydroquinolinas también poseen actividades biológicas como antitumoral (Mayora y col., 2014), antimalárica (Muñoz y col., 2012), antioxidante (Muñoz y col., 2012), antiinflamatoria (Muñoz y col., 2012), antifúngica (Lei y col., 2016) y antiviral (Bedoya y col., 2010).

Adicionalmente, se ha reportado en varios estudios que derivados de quinolinas también presentan actividad en diferentes tripanosomatidios. Fournet y col., en 1993, encontraron que quinolinas sustituidas aisladas de la planta *G. longiflora* mostraban actividad leishmanicida *in vivo* en ratones infectados con *L. amazonensis* y *L. venezuelensis* al evaluar el desarrollo de las lesiones producidas por la infección, durante dos semanas.

Posteriormente, Fakhfakh y col. en el 2003, sintetizaron una serie de quinolinas sustituidas (quinolinas-2-sustituidas, quinolinas-3-sustituidas y 2-alquenilquinolinas) que evaluaron *in vitro* en géneros de Leishmania (*L. amazonensis* y *L. infantum*), Trypanosoma (*T. brucei* y *T. cruzi*), y células CEM4fx infectadas con HIV-1, demostrando que tenían actividad tripanocida (disminución en la proliferación) y antiviral (inhibición en la replicación del virus HIV). Uno de los compuestos estudiados, el compuesto 42 (quinolina sustituida con bromo), resultó tener un mayor efecto en amastigotes de *T. cruzi* ($IC_{50}= 0.15 \mu M$).

Franck y col. en el 2004, desarrollaron 18 derivados de quinolinas (quinolinas sustituidas en el carbono 2) que fueron evaluadas *in vitro* en diferentes parásitos (*T. cruzi*, *T. brucei*, *L. infantum*, *L. amazonensis* y *P. falciparum*) y en células infectadas por el retrovirus HTLV-1, observando que sólo 3 de estos compuestos (los número 6, 16 y 17) mostraron mejor actividad tripanocida en las formas amastigotes (disminución de la proliferación) y uno de ellos (el número 16) mostró una inhibición antiviral del 76 % a $10 \mu M$. En el caso de *T. cruzi* sólo un compuesto (el número 18) afectó la proliferación del parásito con un IC_{50} de $0.15 \mu M$, menor que el reportado para la droga de referencia Nifurtimox ($IC_{50} = 0.45 \mu M$).

Worthen y col. en el 2010, compararon el efecto en formas sanguíneas de *Trypanosoma brucei*, de una tetrahydroquinolina 4G (inhibidora de la proteína farnesiltransferasa, Van Voorhis y col., 2007) y otras cinco drogas más (camptotecina, etopósido, quercetina, prostaglandina D_2 y pentamidina), reportándose que inducían la muerte del parásito en un 70 %.

Romero-Bohórquez y col. en el 2012, probaron diversos productos derivados de tetrahydroquinolinas *in vitro* para determinar su actividad en *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania chagasi*, y su citotoxicidad en células VERO y THP-1, reportando que uno de los compuestos (el 7h) afectó la proliferación del parásito con un IC_{50} de $5.77 \mu M$ en *T. cruzi* y $0.27 \mu M$ en *L. chagasi*,

mostrando además un mayor índice de selectividad que las drogas de referencia, sin mostrar citotoxicidad en la línea de células mamíferas.

Asimismo, Rashad y col. en el 2014, evaluaron la actividad de una tetrahydroquinolina disulfonamida y 26 derivados de ésta modificados con diferentes grupos químicos, sobre la proliferación de *Trypanosoma brucei*, reportando que algunos de estos compuestos inhiben el crecimiento del parásito con una buena selectividad. Estos autores demostraron que la efectividad se relacionaba con la posición de dichos grupos en las moléculas, por ejemplo, los compuestos 33, 22, 23 y 10 que presentaban modificaciones con los grupos sulfonil, propil, isopropil y un átomo de flúor en posición *orto* respectivamente, tenían una mayor efectividad.

Más recientemente, Hernández-Chinea y col. en el 2015, estudiaron el efecto leishmanicida de 7 compuestos sintéticos derivados de tetrahydroquinolinas, denominados tetrahydroindeno [2,1-c], en promastigotes y amastigotes de *L. mexicana in vitro*. Estos autores observaron que estos compuestos presentan actividad antiproliferativa en este parásito, reportando que dos de los compuestos estudiados (número 1 y 3) mostraron un efecto sobre la proliferación del parásito con un IC_{50} de 1.0 μM con relación al reportado para las drogas comerciales anfotericina B ($IC_{50} = 0.036 \mu M$) y miltefosina ($IC_{50} = 2.18 \mu M$), mostrando además un alto índice de selectividad. Ambos compuestos produjeron cambios morfológicos en el parásito y el colapso total del potencial mitocondrial, induciendo así la apoptosis.

Di Pietro y col. en el 2015 midieron el potencial terapéutico *in vitro* de compuestos de quinolinas tricíclicas sintetizadas a partir de una benzonaptiridina, inhibidor de la enzima acetilcolinesterasa de los tejidos nerviosos y glóbulos rojos, en *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. infantum*, y su citotoxicidad en modelos murinos observando que estos compuestos tenían una actividad antiproliferativa en todos los parásitos.

En otro estudio realizado por Lechuga y col. en el 2016, una serie de derivados de 4-aminoquinolinas (compuestos 1a – 1g) fueron evaluados en epimastigotes, amastigotes intracelulares y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* combinados con diferentes concentraciones de hemina. Esta combinación mostró una actividad antiproliferativa de los estadios estudiados del parásito, siendo el compuesto 1g el que mostró mayor efectividad tanto en epimastigotes con un $IC_{50} < 1 \mu M$, como en tripomastigotes con un $IC_{50} = 11.7 \mu M$, en relación a la droga comercial Benznidazol que en epimastigotes tuvo un $IC_{50} = 9.5 \mu M$ y en tripomastigotes $IC_{50} = 12 \mu M$. Sin embargo, en amastigotes el efecto antiproliferativo del compuesto 1g fue menor ($IC_{50} = 6.3 \mu M$) con respecto al Benznidazol ($IC_{50} = 2.5 \mu M$).

De esta manera, en vista de que: el tratamiento actual presenta numerosos efectos secundarios, pueden generar resistencia tanto en el parásito como en el hospedador y solo presentan baja eficacia en la fase crónica de la Enfermedad de Chagas; que se han propuesto numerosos mecanismos de acción para afectar el tripanosomatidio; y que las tetrahydroquinolinas han sido una fuente de estudio importante en la búsqueda de nuevas posibles drogas con actividad biológica y farmacológica para el tratamiento de numerosas enfermedades; se propuso en este trabajo estudiar el efecto de seis tetrahydroquinolinas sustituidas de la serie DM (117, 180, 191, 223, 231 y 234) (Figura 5), sintetizadas en el Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, Escuela de Química, Universidad de Santander, A.A. 678, Bucaramanga, Colombia por el Dr. Diego Merchán (Merchán, 2007; Kouznetsov y col., 2010) y donadas por el Profesor Francisco Arvelo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela, sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y el funcionamiento de diferentes sistemas reguladores de Ca^{2+} encargados de mantener la homeóstasis de este catión en el parásito.

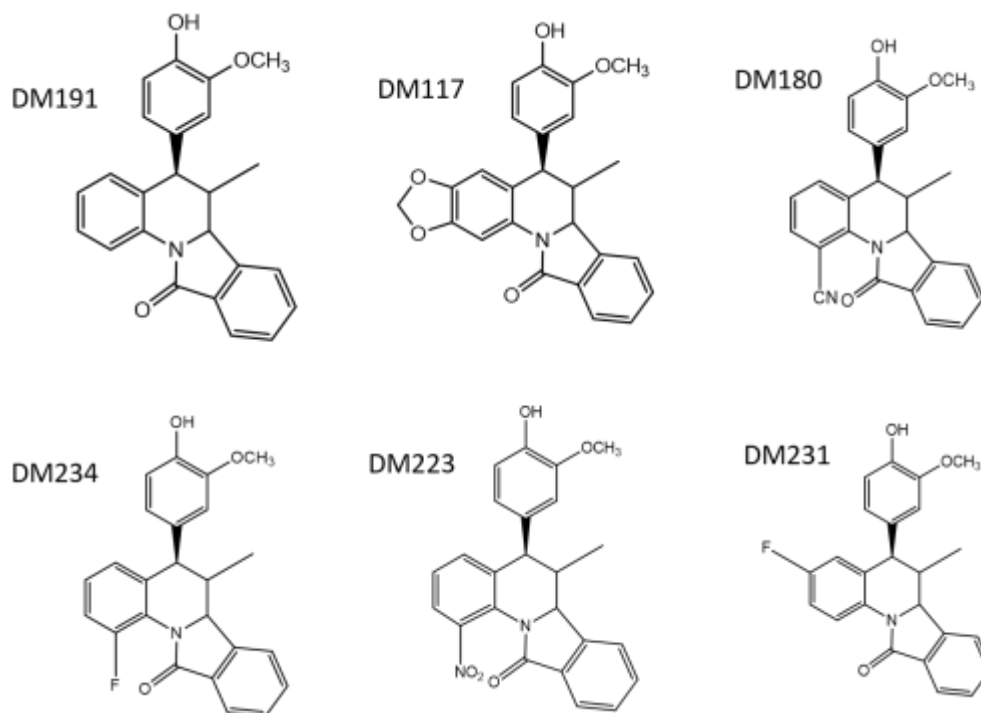


Figura 5 . Tetrahidroquinolinas sustituidas de la serie DM. (Merchán, 2007; Kouznetsov y col., 2010)

Ciertos compuestos de la serie DM han sido estudiados por Muñoz y col., en el 2010, quienes evaluaron la citotoxicidad de las trans-2,4-diaril-r-3-metil-1,2,3,4-tetrahidroquinolinas (DMs) en líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y SKBR3) y su interacción con las drogas gemcitabine y paclitaxel. Fueron escogidos dentro de la serie de DMs estudiadas los compuestos DM8 y DM12, los cuales, mostraron inducir la inhibición del crecimiento tumoral en las líneas celulares nombradas. La adición de gemcitabine y paclitaxel intensificaron la actividad citotóxica de estos compuestos en ambas líneas celulares a concentraciones menores de 1 μM . En este trabajo el compuesto DM12 fue sugerido como un agente nuevo y seguro para la terapia tumoral.

Igualmente, Fonseca-Berzal y col., en el 2013, estudiaron el efecto inhibitorio en la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* y la citotoxicidad en fibroblastos de 22 derivados de tetrahidroquinolinas

de las series DM (1, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13 y 15) y AR (39-45, 45F2, 47, 89, 91 y 92), previamente estudiados en *P. falciparum*, comparando sus efectos con el de la droga de referencia, Benznidazol. Este grupo ha venido trabajando desde hace dos décadas, en el diseño y evaluación biológica de nuevas drogas antichagásicas, así como en la quimioterapia contra la malaria. Los estudios realizados con estos compuestos demostraron que el AR40 (SI = 71.11), AR41 (SI = 32), AR91 (SI = 33.37) y DM15 (SI = 48.62), tenían un mayor índice de selectividad (SI) en epimastigotes de *T. cruzi* que la droga de referencial Benznidazol (SI > 9.44), mostrando una prometedora actividad tripanocida. Estos compuestos fueron probados en la forma intracelular (amastigotes), mostrando que en este estadio la selectividad era menor que la mostrada con la droga de referencia Benznidazol. De estos compuestos, el DM15 fue el único que además de tener una interesante actividad contra *T. cruzi* no mostró efectos tóxicos en fibroblastos.

Estos autores propusieron al DM15 y a las tetrahydroquinolinas como prototipos potenciales de drogas antichagásicas. Adicionalmente, en este trabajo se evaluaron las estructuras de las tetrahydroquinolinas estudiadas, encontrándose que las sustituciones con grupos alquilo o metoxi en la posición C-6 aumentaban el índice de selectividad del compuesto mostrando una influencia importante en el efecto tripanocida, mientras que sustituciones con cloro, grupos aceptores de electrones como el grupo nitro o grupos amino en la estructura de la tetrahydroquinolina, mostraban efectos citotóxicos en fibroblastos. Asimismo, observaron que la presencia de un grupo nitro en un sustituyente fenil aromático, así como la adición de sustituyentes aceptores de electrones como el grupo nitrilo en la molécula también incrementa la actividad tripanocida del compuesto.

Las tetrahydroquinolinas sustituidas evaluadas en este trabajo fueron a su vez probadas en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela, resultando no ser tóxicas en fibroblastos aún a una concentración de 100 µg/ml. Los fibroblastos son un tipo de célula residente del tejido conectivo que se sugiere son

las primeras en ser infectadas una vez el parásito ingresa al hospedador y que son utilizadas como control de células humanas (Lieke y col., 2006).

Es importante mencionar que los mecanismos de acción de las tetrahydroquinolinas no están del todo dilucidados, aunque se sabe que el efecto puede depender de cómo estos compuestos pueden afectar la función de la membrana lipoproteica celular o si modifican la homeostasis iónica, el pH o la integridad celular (Hylgaard y col., 2015).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de tetrahydroquinolinas sustituidas sobre diferentes mecanismos de regulación de Ca^{2+} intracelular en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

4.2. Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de seis tetrahydroquinolinas sustituidas sobre la proliferación de cultivos de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
- Seleccionar aquellas tetrahydroquinolinas sustituidas que generen un mayor efecto sobre la proliferación de cultivos de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
- Determinar el IC_{50} de las tetrahydroquinolinas sustituidas seleccionadas sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
- Estudiar el efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas seleccionadas sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de *Trypanosoma cruzi* y de eritrocitos humanos.
- Determinar el efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas seleccionadas sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en *Trypanosoma cruzi*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Materiales

5.1.1 Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron adquiridos con el mayor grado de pureza posible.

- Los inhibidores de proteasas: inhibidor de tripsina, leupeptina y fenil-metilsulfonyl-fluoruro (PMSF) fueron obtenidos a través de Sigma.
- El fluoróforo (Fura-2AM), se obtuvo de Molecular Probes.
- Los antibióticos Penicilina/Estreptomicina se obtuvieron a través de Sigma.
- El suero fetal de bovino (SFB) fue adquirido de GIBCO-BRL.
- Las tetrahydroquinolinas sustituidas (DM117, DM180, DM191, DM223, DM231 y DM234) fueron sintetizadas en el Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular, Escuela de Química, Universidad de Santander, A.A. 678, Bucaramanga, Colombia por el Dr. Diego Merchán (Merchán, 2007; Kouznetsov y col., 2010) y fueron donadas por el Dr. Francisco Arvelo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela. Se prepararon soluciones “stock” de cada compuesto a una concentración de 6 mM disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO), a partir del cual se tomaron alícuotas para obtener las concentraciones a estudiar en los cultivos celulares y ensayos enzimáticos.
- El Benznidazol fue donado por el Dr. Xenón Serrano-Martín del Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos del Instituto de Estudios Avanzados (IDEA).

5.1.2 Material biológico

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

5.2 Metodología

5.2.1 Cultivo de Parásitos

Los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (cepa IRHO/BR/63/CL Brenner) se cultivaron en un medio LIT modificado constituido por: triptosa (15 g/L), extracto de levadura (5 g/L), extracto de hígado (2 g/L), hemina (20 mg/L disuelta en 50% trietanolamina), glucosa (4 g/L), NaCl (9 g/L), KCl (0.4 g/L) y Na_2HPO_4 (7.5 g/L) suplementado con 5 % de Suero Fetal Bovino (SFB) inactivado a 56 °C por 45 minutos y 1 % Penicilina/Estreptomicina, incubándolos a 28°C en agitación.

5.2.2 Curva de Proliferación de *Trypanosoma cruzi*

Partiendo de un cultivo inicial de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en fase exponencial, previamente visualizado en un microscopio de luz Olympus CK40 a 40X para verificar que se encontraran en buenas condiciones y libres de contaminación, se montaron cultivos en értulas estériles de 125 ml, con un número inicial de parásitos de 7×10^6 células/ml en un volumen final de

10 ml de medio LIT suplementado con 5 % SFB y 1 % Penicilina/Estreptomicina. El número inicial de células del cultivo fue determinado mediante el conteo directo en cámara de Neubauer.

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

5.2.3 Efecto de las tetrahidroquinolinas sustituidas DM117, DM180, DM191, DM223, DM231 y DM234 sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Para determinar el efecto de las tetrahidroquinolinas sustituidas sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, los parásitos fueron cultivados en presencia de cada una de los compuestos (DM117, DM180, DM191, DM223, DM231 y DM234) partiendo de una densidad celular de 7×10^6 cel/ml en 10 ml de medio LIT suplementado con 5 % SFB. Las concentraciones ensayadas de cada compuesto fueron 1 μ M, 3 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M y 30 μ M. Se realizaron mediciones de transmitancia a 560 nm en el Fotocolorímetro Spectronic cada 24 horas durante 10 días consecutivos para determinar la proliferación celular, observando los parásitos en el cultivo mediante un microscopio de luz Olympus CK40 a 40x. Los valores de transmitancia fueron relacionados con el número de células/ml según la tabla obtenida en el punto 5.2.2. Cada experimento fue realizado por triplicado.

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

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

5.2.4 Obtención de vesículas de membrana plasmática de *Trypanosoma cruzi*:

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

Un cultivo de 3 litros de parásitos en fase exponencial tardía, se centrifugó inicialmente a 1000 x g durante 10 min a 4 °C. Los parásitos obtenidos fueron lavados dos veces con un medio que contenía: 11 mM KCl, 140 mM NaCl y 75 mM Tris-HCl a pH 7.4, y una vez con un medio que contenía: 400 mM manitol, 10 mM KCl, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF (disuelto en 1 % DMSO), 0.15 mg/ml inhibidor de

tripsina de soya, 10 µg/ml leupeptina y 20 mM Hepes-KOH pH 7.6, centrifugando a 1000 x g durante 10 min a 4 °C.

Posteriormente el “pellet” de células obtenido fue mezclado con perlas de vidrio de 100-200 µm de diámetro, a una relación 1:4 (peso húmedo de parásitos/peso perlas de vidrio) y las células fueron rotas por abrasión en un mortero a 4 °C entre 5-7 minutos. Los parásitos rotos mecánicamente fueron colectados utilizando el mismo buffer anterior y las perlas de vidrio, las células no rotas y restos de gran tamaño fueron removidos por centrifugación a 1000 x g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue sometido a una centrifugación diferencial, primero a 16000 x g durante 30 min a 4°C y luego a 105000 x g durante 1 hora y a 4 °C.

El “pellet” obtenido fue resuspendido en un medio que contenía: 150 mM KCl, 1 mM DTT, 50 µM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 0.15 mg/ml inhibidor de tripsina de soya, 10 µg/ml leupeptina, 5 µg/ml E64 y 75 mM Hepes-KOH, pH=6.8. La suspensión resultante fue homogeneizada pasándola 3 veces a través de un homogeneizador "Dounce AA" inmerso en hielo y guardadas a -70 °C hasta su utilización.

5.2.5 Obtención de fantasmas de eritrocitos humanos

Los fantasmas de eritrocitos humanos se obtuvieron siguiendo la metodología descrita por Niggli y col., en 1987.

Un litro de sangre humana fue lavado 2 veces con un medio isotónico que contenía: 10 mM Tris-HCl (pH=7.4) y 130 mM KCl, centrifugando a 5800 x g durante 10 min y a 4 °C. El plasma y los glóbulos blancos fueron removidos por succión y los eritrocitos resultantes fueron hemolizados en 10 volúmenes de una solución hipotónica que contenía: 1 mM EDTA y 10 mM Tris-HCl (pH=7.4), centrifugando 2 veces a 21000 x g a 4 °C durante 50 y 40 min respectivamente. Los fantasmas de

eritrocitos obtenidos en este paso, fueron lavados con 10 mM Hepes (pH=7.4) centrifugando a 21000 x g durante 40 min y a 4 °C, 2 o 3 veces hasta eliminar la mayor cantidad de hemoglobina.

Finalmente, los fantasmas fueron lavados 2 veces con un medio isotónico que contenía: 10 mM Hepes (pH=7.4), 130 mM KCl, 0.5 mM $MgCl_2$ y 50 μM $CaCl_2$ centrifugando bajo las mismas condiciones anteriores. Los fantasmas resultantes fueron resuspendidos en la mínima cantidad posible de la solución isotónica anterior y guardados a -70 °C hasta su utilización.

5.2.6 Determinación del efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191 y DM231 sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de eritrocitos humanos

La actividad hidrolítica de la Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de eritrocitos humanos se determinó mediante la cuantificación de fosfato inorgánico (Pi), siguiendo el procedimiento descrito por Fiske y Subbarow en 1925, utilizando sulfato ferroso como agente reductor.

Aproximadamente 0.4 mg/ml de fantasmas de eritrocitos humanos se incubaron durante 40 min a 37 °C en un volumen final de 250 μL de un medio que contenía: 10 mM $MgCl_2$, 1 mM EGTA, 100 mM KCl, 1 mM ATP, 50 mM Mops Tris (pH=7.4) y diferentes concentraciones de $CaCl_2$ que permitieron obtener entre 0 y 10 μM Ca^{2+} libre en el medio. Estas concentraciones de Ca^{2+} libre fueron calculadas utilizando un programa computarizado originalmente descrito por Fabiato y Fabiato en 1979, el cual utiliza un cálculo iterativo (Benaïm y col., 1991). La actividad de la Ca^{2+} -ATPasa fue determinada en ausencia de las tetrahydroquinolinas (actividad basal o control), en presencia de las diferentes tetrahydroquinolinas estudiadas (DM117, DM191 y DM231) a una concentración de 30 μM y en presencia de la droga de referencia Benznidazol también a una concentración de 30 μM .

La reacción se detuvo con 250 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 16 % v/v y la cantidad de Pi liberado, producto de la hidrólisis de ATP por la bomba, fue determinada siguiendo el método de

Fiske & Subbarow, 1925. Para ello se tomaron 200 μL de cada muestra y se le añadieron 700 μL de una solución de molibdato de amonio al 0.57 %. Este compuesto, forma ácido fosfomolibdico a partir del fósforo inorgánico presente, el cual se reduce al añadir 100 μL de sulfato ferroso (40 % p/v), produciendo un color azul, el cual fue medido a 830 nm, proporcional al contenido de fósforo inorgánico y por lo tanto a la actividad de la enzima. La concentración de P_i se calculó a partir de una curva de calibración obtenida utilizando estándares de P_i de concentraciones conocidas. La actividad fue expresada como μmoles de P_i liberado por la enzima por minuto por miligramo de proteína. Todos los resultados corresponden al promedio $\pm$ desviación estándar de al menos 5 experimentos independientes.

5.2.7 Determinación del efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191 y DM231 sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de *Trypanosoma cruzi*

La actividad hidrolítica de la Ca^{2+} -ATPasa de vesículas de membrana plasmática de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* fue determinada siguiendo el procedimiento descrito por Fiske y Subbarow en 1925, utilizando sulfato ferroso como agente reductor.

Aproximadamente 0.5 mg/ml de proteína fueron incubadas durante 40 minutos a 28 °C en un volumen final de 250 μL de un medio que contenía: 50 mM Hepes-KOH (pH=7.4), 200 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 2 mM ATP, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 1.8 mM CaCl_2 (10 μM Ca^{2+} libre), 2 mM DTT, 1 μM A23187, 0.5 mM ouabaina y 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ oligomicina. La actividad de la Ca^{2+} -ATPasa fue determinada en ausencia de las tetrahydroquinolinas (actividad basal o control), en presencia de las diferentes tetrahydroquinolinas estudiadas (DM117, DM191 y DM231) a concentraciones de 5 μM , 10 μM , 15 μM y 30 μM y en presencia de la droga de referencia Benznidazol también a concentraciones de 5 μM , 10 μM , 15 μM y 30 μM .

La reacción se detuvo añadiendo 250 μL de ácido tricloroacético (TCA) al 16 % v/v y se determinó la cantidad de Pi liberado, producto de la hidrólisis de ATP por la bomba, según el método de Fiske & Subbarow, 1925 como fue descrito en la sección anterior. La actividad Ca^{2+} -ATPasa de las vesículas de membrana plasmática de *T. cruzi* fue expresadas como la diferencia entre la actividad Mg^{2+} -ATPasa en presencia de EGTA (sin calcio) y la actividad Ca^{2+} -ATPasa en presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} (actividad total). La actividad fue expresada como nanomoles de Pi liberado por minuto por miligramo de proteína. Todos los resultados corresponden al promedio $\pm$ desviación estándar de al menos 5 experimentos independientes.

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

5.2.8 Determinación de la concentración de proteínas

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

5.2.9 Determinación del efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191 y DM231, sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en poblaciones de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Para realizar las mediciones de los niveles de Ca^{2+} intracelular en poblaciones de epimastigotes de *T. cruzi* fue utilizado el indicador fluorescente “radiométrico” Fura-2/AM. El Fura-2 es un indicador fluorescente que cambia su espectro de absorción o excitación en función de la concentración de Ca^{2+} , mientras que la emisión se mantiene invariable, presentando una longitud de emisión a 510 nm y dos longitudes de excitación, a 340 nm cuando se encuentra unido al calcio y a 380 nm cuando está

libre de Ca^{2+} . Debido a que la forma sensible a Ca^{2+} es el Fura-2, una molécula altamente polar, hidrofílica e incapaz de atravesar la membrana celular, se utilizó el Fura-2AM (penta-acetoximetiléster), un derivado no fluorescente con los 5 grupos ácidos esterificados, hidrofóbico y liposoluble, permeable a la membrana celular. Una vez dentro de la célula, el Fura-2AM, es hidrolizado por las esterasas endógenas del parásito, quedando libre el complejo fluorescente (Fura-2) capaz de unir Ca^{2+} , el cual es además incapaz de atravesar la membrana plasmática permaneciendo en el citoplasma de la célula.

Para las mediciones de fluorescencia fue utilizado un espectrofluorímetro HITACHI F-2000 acoplado a un PC (IBM compatible) con un sistema de adquisición de datos, estableciéndose las siguientes condiciones: Velocidad de cambio 340/380 nm: 2 seg; Apertura de excitación: 10 nm; Apertura de emisión: 10 nm y Velocidad de barrido: 1200 nm/min.

Para realizar las mediciones de Ca^{2+} intracelular, una suspensión de 500 μL de cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial y previamente visualizados al microscopio para asegurarnos de la viabilidad y óptima condición del parásito, fueron cargados con Fura-2AM siguiendo el método propuesto por Mendoza y col., en el 2001. Para ello, los parásitos fueron lavados dos veces con solución PBS-G (57 mM Na_2HPO_4 , 3 mM NaH_2PO_4 , 43.8 mM NaCl y 1 % Glucosa), e incubados en esta misma solución con 6 μM Fura 2/AM, en presencia de 0.1 % ácido plurónico y 2.4 μM probenecid para aumentar la eficiencia de acumulación del Fura-2 en el citoplasma, durante 3 horas a 29 °C, agitación suave y oscuridad.

Las determinaciones de los niveles de Ca^{2+} intracelular fueron realizadas en presencia o en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Para la determinación en presencia de Ca^{2+} extracelular, los parásitos cargados con Fura 2/AM, fueron lavados una vez con 500 μL de PBS-G y luego con 500 μL de solución Tyrode Ca^{2+} (145 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 1.8 mM CaCl_2 , 10 mM Hepes, 11 mM Glucosa). Posteriormente fueron resuspendidos en 500 μL de este último medio y colocados en una cubeta de

cuarzo de 1 ml de capacidad y 4 mm de diámetro. La cubeta fue colocada dentro de un sistema de láminas acopladas a un baño termocontrolado donde se mantuvo la temperatura en 29°C. El sistema tenía acoplado un dispositivo para agitación constante, a través de un minimagneto, garantizando así que los parásitos no sedimentaran y los reactivos añadidos se distribuyeran homogéneamente. Para la determinación en ausencia de Ca^{2+} extracelular se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente utilizando en la cubeta una solución Tyrode sin Ca^{2+} en presencia de 8 mM EGTA.

Utilizando este procedimiento experimental se pudo determinar los niveles intracelulares basales de Ca^{2+} en epimastigotes de *T. cruzi* y evaluar el efecto de las tetrahydroquinolinas DM117, DM191 y DM231 y de la droga de referencia Benznidazol sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en estos parásitos. Las concentraciones utilizadas de estos compuestos fueron las correspondientes a su IC_{50} , 15 y 60 μM (esta última solo para el DM231). Todos los compuestos ensayados fueron añadidos utilizando una jeringa Hamilton, en los puntos señalados con la flecha en cada gráfico, a partir de soluciones concentradas para no afectar el volumen final en la cubeta.

Para conocer la concentración intracelular de Ca^{2+} fue necesario calibrar el sistema, para ello se utilizó el método de Grynkiewicz y col. (1985), aplicando la siguiente ecuación:

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

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

del Fura-2 cuando es excitado a 380 nm, en ausencia de Ca^{2+} y F_{max} es la fluorescencia de Fura-2 cuando es excitado a 380 nm a concentraciones de Ca^{2+} saturantes.

5.2.10 Determinación del efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191 y DM231, sobre el potencial electroquímico mitocondrial de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Para estudiar el efecto de las tetrahydroquinolinas DM117, DM191 y DM231, así como de la droga de referencia Benznidazol sobre el potencial electroquímico mitocondrial, 500 μL de parásitos en fase exponencial tardía (1×10^7 células/ml) fueron colectados por centrifugación a 600 x g por 2 minutos, lavados dos veces con un medio de carga (130 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 2 mM KH_2PO_4 y 20 mM Tris-HCl, pH=7.4) y posteriormente incubados en este mismo medio con 20 μM del fluoróforo rodamina 123, durante 45 minutos, a 29 °C y agitación continua. Transcurrido el tiempo de incubación, los parásitos fueron centrifugados a 600 x g, lavados dos veces con el mismo medio de carga, resuspendidos en 500 μL de este medio y colocados en una cubeta de cuarzo para posteriormente ser evaluados en el fluorímetro HITACHI F-2000, bajo condiciones de temperatura controlada (29 °C) y agitación continua.

La rodamina 123, es un indicador catiónico fluorescente permeable a las células, el cual es incorporado de forma activa por la mitocondria funcional sin inducir efectos citotóxicos (Johnson y col., 1980). Éste se intercala entre la membrana interna y la membrana externa de la mitocondria siguiendo la diferencia de potencial electroquímico mitocondrial, pudiendo ser utilizado para determinar variaciones en el potencial de membrana mitocondrial de distintos tipos celulares incluyendo tripanosomatidios (Wilkes y col., 1997). La longitud de onda de excitación de este fluoróforo corresponde a 488 nm, mientras que la emisión se monitorea a 530 nm. En los experimentos fue utilizado como control 2 μM FCCP (carbonilcianuro-p-

trifluorometoxifenilhidrazona), un protonóforo, desacoplador de la cadena transportadora de electrones. El rango de concentraciones ensayadas de las tetrahydroquinolinas y el Benznidazol fue de 5 μ M a 60 μ M. Todos los compuestos ensayados fueron añadidos utilizando una jeringa Hamilton, en los puntos señalados con la flecha en cada gráfico, a partir de soluciones concentradas para no afectar el volumen final en la cubeta.

5.2.11 Determinación del efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191 y DM231, sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Para evaluar el efecto de las tetrahydroquinolinas DM117, DM191 y DM231, así como de la droga de referencia Benznidazol sobre la alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de *T. cruzi*, 500 μ L de parásitos en fase exponencial tardía (1×10^7 células/ml) fueron colectados por centrifugación a 600 x g por 2 minutos, lavados dos veces con un medio de carga (130 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM KH_2PO_4 y 20 mM Tris-HCl, pH=7.4) y posteriormente incubados en este mismo medio con 2 μ M del fluoróforo naranja de acridina, durante 10 minutos, a 29 °C y agitación continua. Transcurrido el tiempo de incubación, los parásitos fueron centrifugados a 600 x g, lavados dos veces con el mismo medio de carga, resuspendidos en 500 μ L de éste medio y colocados en una cubeta de cuarzo para posteriormente ser evaluados en el fluorímetro HITACHI F-2000, bajo condiciones de temperatura controlada (29 °C) y agitación continua.

La naranja de acridina es un fluoróforo, el cual tiene la capacidad de acumularse en compartimentos intracelulares ácidos, como los acidocalcisomas y de ser liberada si el gradiente de protones es interrumpido. La pérdida de este indicador es un signo de alcalinización de los acidocalcisomas (Docampo y col., 1995). La longitud de onda de excitación de la naranja de acridina corresponde a 488 nm, mientras que la emisión se monitorea a 530 nm. En los experimentos fue

utilizado como control 2 μM nigericina, un intercambiador K^+/H^+ , que provoca la alcalinización de los acidocalcisomas al desacoplar el gradiente de H^+ . El rango de concentraciones ensayadas de las tetrahydroquinolinas y el Benznidazol fue de 5 μM a 60 μM . Todos los compuestos ensayados fueron añadidos utilizando una jeringa Hamilton, en los puntos señalados con la flecha en cada gráfico, a partir de soluciones concentradas para no afectar el volumen final en la cubeta.

6. RESULTADOS

6.1 Curva de proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Con la finalidad de estandarizar los cultivos *in vitro* de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* para la posterior determinación del efecto de las tetrahydroquinolinas sobre la proliferación de estos parásitos, se realizaron curvas de crecimientos de *T. cruzi* durante 10 días. La curva fue iniciada con una población de parásitos de 7×10^6 células/ml, inoculados a partir de un cultivo de epimastigotes de *T. cruzi* en fase exponencial, previamente observado al microscopio óptico, comprobándose el buen estado de los parásitos y la ausencia de contaminación. La proliferación fue seguida determinando la turbidez del cultivo, mediante mediciones de transmitancia a 560 nm en un fotocolorímetro, cada 24 horas durante 10 días, realizando adicionalmente en cada medición el conteo directo de las células mediante una cámara de Neubauer. Los valores obtenidos se relacionaron mediante una regresión exponencial y usando la ecuación de la recta se obtuvo una tabla donde se relacionaba la transmitancia con la densidad poblacional (resultados no mostrados), a partir de la cual fue establecida la población de parásitos en los diferentes cultivos experimentales.

Como se muestra en la Fig. 6, la proliferación del parásito se observó como un aumento en el número de células/ml en el tiempo, observándose claramente una fase exponencial de crecimiento y alcanzándose la fase estacionaria a los diez días. Esta curva es de gran importancia pues permitió conocer el comportamiento del parásito bajo nuestras condiciones de cultivo y el tiempo en el cual la población alcanza la fase exponencial, dato necesario para los ensayos con las tetrahydroquinolinas a estudiar y los cálculos de IC_{50} .

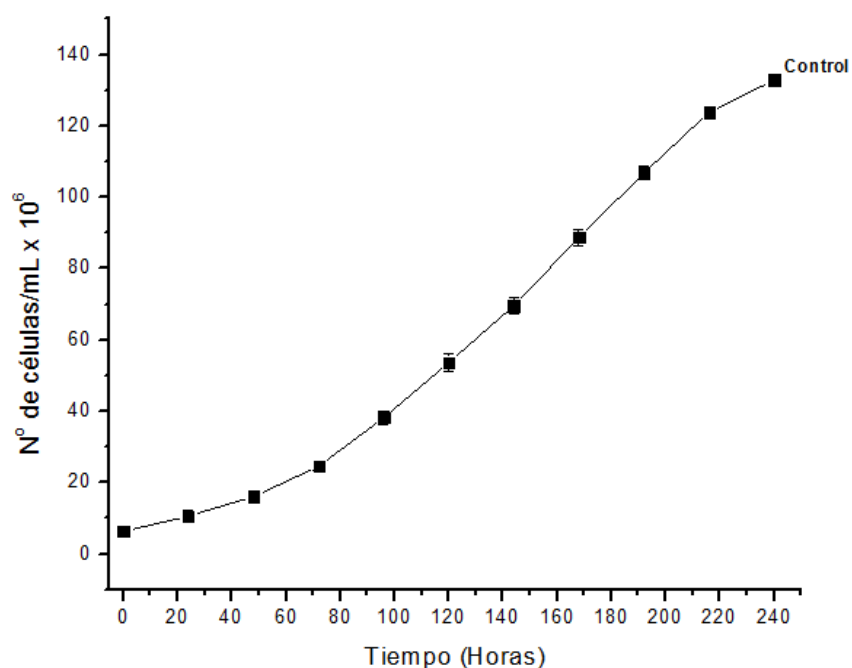


Figura 6. Curva de crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. El cultivo se inició a partir de una población de 7×10^6 cel/ml y su proliferación fue seguida cada 24 horas durante 10 días (240 horas), representándose como el número de células/ml en función del tiempo. Cada punto mostrado en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

6.2 Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM180, DM191, DM223, DM231 y DM234 sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Con la finalidad de evaluar el efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM180, DM191, DM223, DM231 y DM234 sobre la proliferación de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y seleccionar aquellas tetrahydroquinolinas que mostraran un mayor efecto sobre la proliferación del parásito, se realizaron cultivos independientes en értulas de 125 ml, partiendo de una densidad poblacional de 7×10^6 cel/ml de epimastigotes de *T. cruzi*, en presencia de las distintas tetrahydroquinolinas a una concentración de $15 \mu\text{M}$ (Fig. 7), siguiendo la proliferación del parásito durante 10 días.

La proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* en presencia de las diferentes tetrahydroquinolinas es mostrada en la Fig. 7, donde se muestra además: 1) la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* crecidos en ausencia de tetrahydroquinolinas (crecimiento control, Fig. 7), y 2) la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi* en presencia de 15 μ M Benznidazol, droga comercial de referencia actualmente utilizada para el tratamiento terapéutico de la Enfermedad de Chagas (Fig. 7). Es importante resaltar que el DMSO a una concentración de 1 % no afectó la proliferación de parásitos con respecto al crecimiento control en ausencia de los compuestos (resultados no mostrados), demostrando que el mismo puede ser utilizado como vehículo para disolver los compuestos ya que no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de *T. cruzi*.

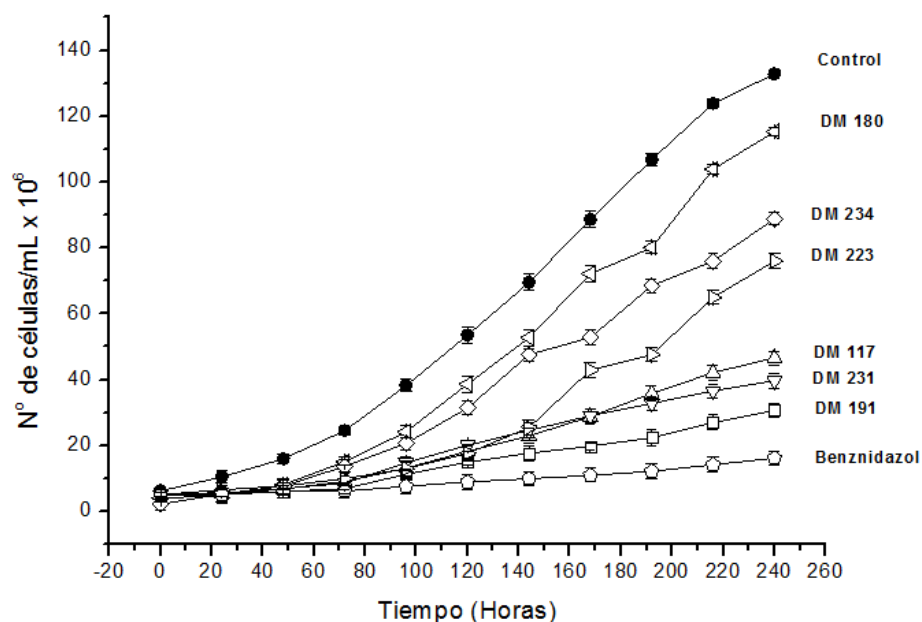


Figura 7. Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. El cultivo se inició a partir de una población de 7×10^6 cel/ml y su proliferación fue seguida cada 24 horas durante 10 días, en ausencia (control), en presencia de 15 μ M de cada una de las tetrahydroquinolinas (DM117, DM180, DM191, DM223, DM231 y DM234) y en presencia de 15 μ M Benznidazol (Benznidazol). Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio ($\pm$) la desviación estándar de tres experimentos independientes.

En la figura 7, se pudo observar que todas las tetrahydroquinolinas ensayadas y el Benznidazol tuvieron un efecto inhibitorio sobre la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi* con respecto al crecimiento control, a una concentración de 15 μ M. Sin embargo, resaltan tres de estos compuestos, las tetrahydroquinolinas DM117, DM191 y DM231, las cuales a una concentración de 15 μ M tuvieron un efecto inhibitorio más marcado sobre la proliferación de este parásito (Fig. 7), con porcentajes de inhibición de 64,92 %, 76,93 % y 70,11 % respectivamente (Ver tabla 3). La droga de referencia Benznidazol a esta concentración inhibió la proliferación de *T. cruzi* en 87,78 % (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de inhibición de la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en presencia de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM180, DM191, DM223, DM231 y DM234 y de la droga de referencia Benznidazol a una concentración de cada compuesto de 15 μ M.

Compuesto	Inhibición de la proliferación parasitaria (%)
Benznidazol	87,78
DM191	76,93
DM231	70,11
DM117	64,92
DM223	45,67
DM234	42,78
DM180	33,10

De las seis tetrahydroquinolinas estudiadas pudimos observar que las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191 y DM231, afectaban la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* en una mayor proporción que el resto de las tetrahydroquinolinas, mostrando una prometedora actividad tripanocida. El efecto de estas tres tetrahydroquinolinas sobre la proliferación del parásito fue

ensayado también a una concentración de 30 μ M, observándose los resultados mostrados en la figura

8.

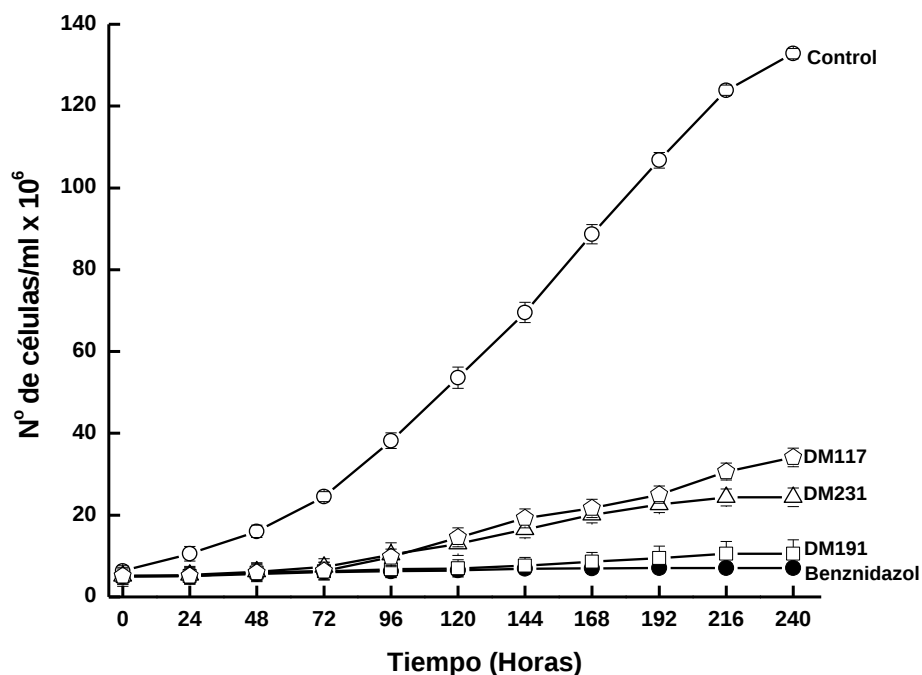


Figura 8. Efecto de las tetrahidroquinolinas sustituidas seleccionadas sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. El cultivo se inició a partir de una población de 7×10^6 cel/ml y su proliferación fue seguida cada 24 horas durante 10 días, en ausencia (control), en presencia de 30 μ M de cada una de las tetrahidroquinolinas (DM117, DM191 y DM231) y en presencia de 30 μ M Benznidazol (Benznidazol). Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio ($\pm$) la desviación estándar de tres experimentos independientes.

A esta concentración las tetrahidroquinolinas DM117, DM191 y DM231 mostraron un porcentaje de inhibición de la proliferación de *T. cruzi* de 74,14 %, 92,02 % y 81,55 % respectivamente. El Benznidazol a esta misma concentración inhibió la proliferación de *T. cruzi* en un 94,66 % (Ver tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de inhibición de la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* en presencia de las tetrahydroquinolinas sustituidas seleccionadas: DM117, DM191 y DM231 y de la droga de referencia Benznidazol a una concentración de cada compuesto de 30 μ M.

Compuesto	Inhibición de la población parasitaria (%)
Benznidazol	94,66
DM191	92,02
DM231	81,55
DM117	74,14

Una vez seleccionadas estas tres tetrahydroquinolinas sustituidas, se procedió a evaluar el efecto dosis-dependiente de cada una de ellas sobre la proliferación celular de *T. cruzi*, para poder determinar su IC₅₀.

6.3 Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM117 sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y determinación de su IC₅₀

Con la finalidad de evaluar el efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM117 sobre la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi* y determinar su IC₅₀, se realizaron curvas de proliferación del parásito partiendo de una población inicial de 7×10^6 cel/ml en presencia de diferentes concentraciones del compuesto (1 μ M, 3 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 30 μ M y 50 μ M) manteniendo un grupo control (sin droga). Los resultados mostraron una inhibición dosis-dependiente de la proliferación celular (Fig. 9).

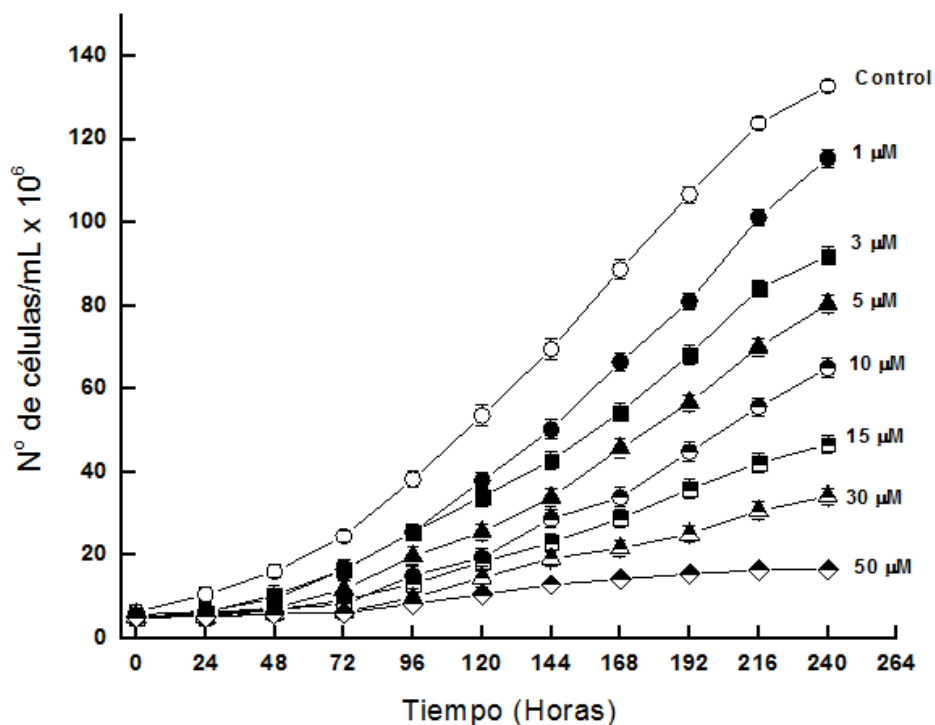


Figura 9. Efecto de la tetrahidroquinolina sustituida DM117 sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. El cultivo se inició a partir de una población de 7×10^6 cel/ml y su proliferación fue seguida cada 24 horas durante 10 días, en ausencia (control) y en presencia de concentraciones crecientes del compuesto (1 μ M a 50 μ M). Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio ($\pm$) la desviación estándar de tres experimentos independientes.

El IC_{50} estimado de la tetrahidroquinolina sustituida DM117 fue de $5,25 \pm 1,03 \mu$ M a las 144 horas de crecimiento, tiempo en el cual el cultivo se encontraba en fase exponencial (Ver Fig. 10). Es importante resaltar que con este compuesto cerca del 90 % de inhibición de la proliferación celular se observó a una concentración de 50 μ M.

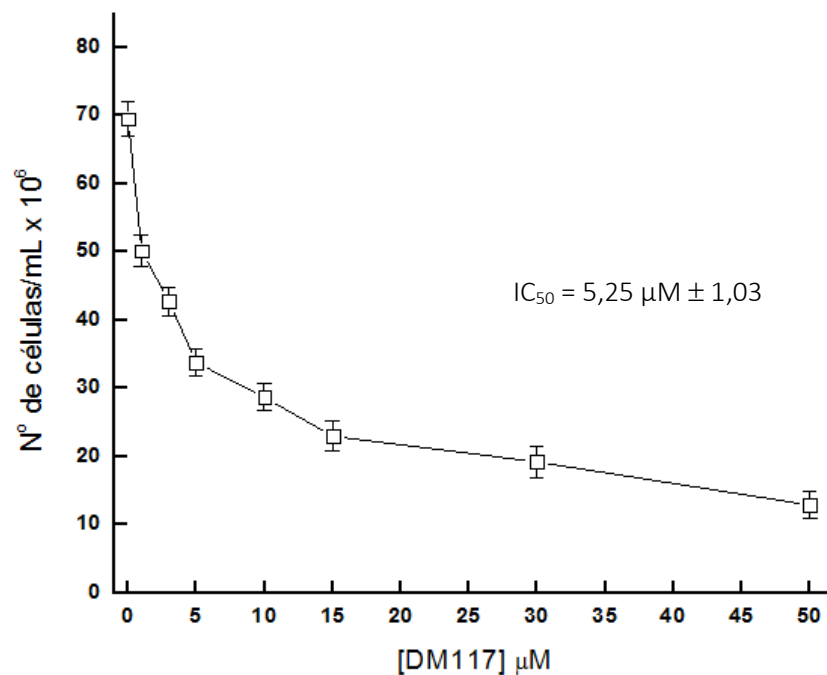


Figura 10. Curva Dosis-Respuesta de la tetrahydroquinolina DM117 sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* a las 144 horas de incubación con las diferentes concentraciones del compuesto. Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio ($\pm$) la desviación estándar de tres experimentos independientes.

6.4 Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM191 sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y determinación de su IC₅₀

Con la finalidad de evaluar el efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM191 sobre la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi* y determinar su IC₅₀, se realizaron curvas de proliferación del parásito partiendo de una población inicial de 7×10^6 cel/ml en presencia de diferentes concentraciones del compuesto (1 μM , 3 μM , 5 μM , 10 μM , 15 μM y 30 μM) manteniendo un grupo control (sin droga). Los resultados mostraron una inhibición dosis-dependiente de la proliferación celular (Fig. 11).

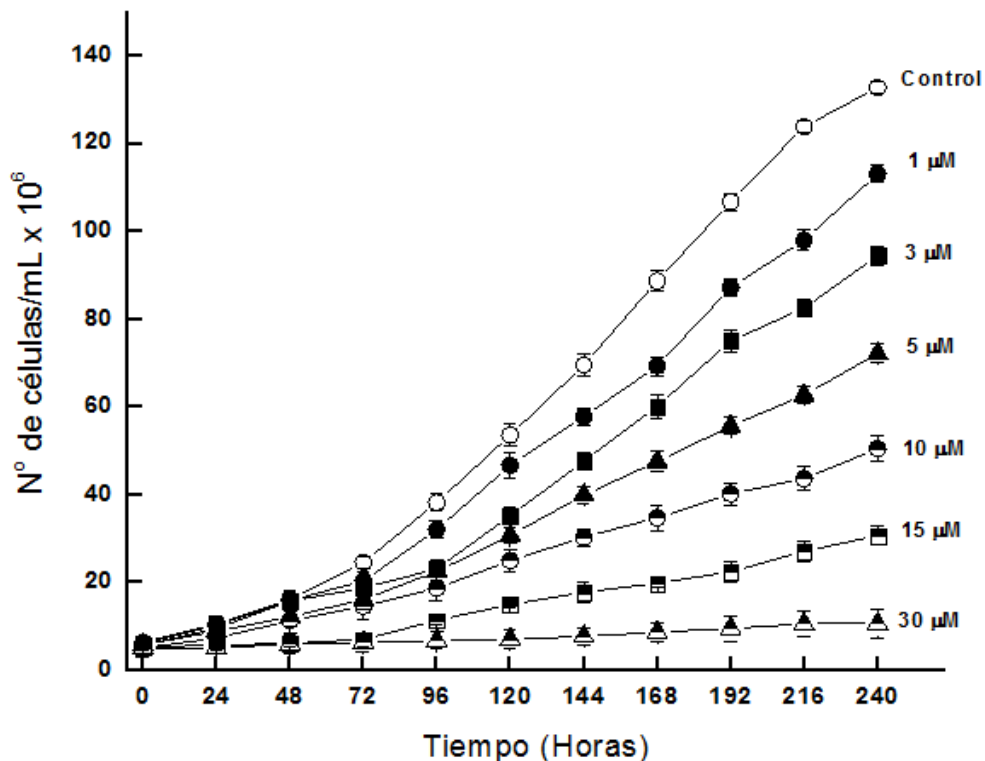


Figura 11. Efecto de la tetrahidroquinolina sustituida DM191 sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. El cultivo se inició a partir de una población de 7×10^6 cel/ml y su proliferación fue seguida cada 24 horas durante 10 días, en ausencia (control) y en presencia de concentraciones crecientes del compuesto (1 μ M a 30 μ M). Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio ($\pm$) la desviación estándar de tres experimentos independientes.

El IC_{50} estimado de la tetrahidroquinolina sustituida DM191 fue de $6,25 \pm 1,04 \mu$ M a las 144 horas de crecimiento, tiempo en el cual el cultivo se encontraba en fase exponencial (Ver Fig. 12). Es importante resaltar que con este compuesto cerca del 90 % de inhibición de la proliferación celular se observó a una concentración de 30 μ M.

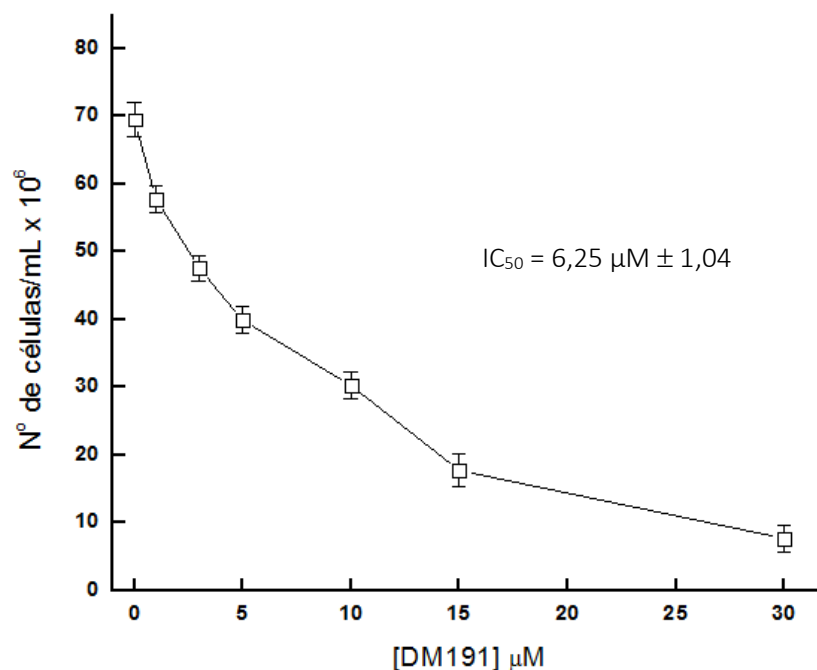


Figura 12. Curva Dosis-Respuesta de la tetrahydroquinolina DM191 sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* a las 144 horas de incubación con las diferentes concentraciones del compuesto. Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio ($\pm$) la desviación estándar de tres experimentos independientes.

6.5 Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM231 sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y determinación de su IC₅₀

Con la finalidad de evaluar el efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM231 sobre la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi* y determinar su IC₅₀, se realizaron curvas de proliferación del parásito partiendo de una población inicial de 7×10^6 cel/ml en presencia de diferentes concentraciones del compuesto (1 μM, 3 μM, 5 μM, 10 μM, 15 μM y 30 μM) manteniendo un grupo control (sin droga). Los resultados mostraron una inhibición dosis-dependiente de la proliferación celular (Fig. 13).

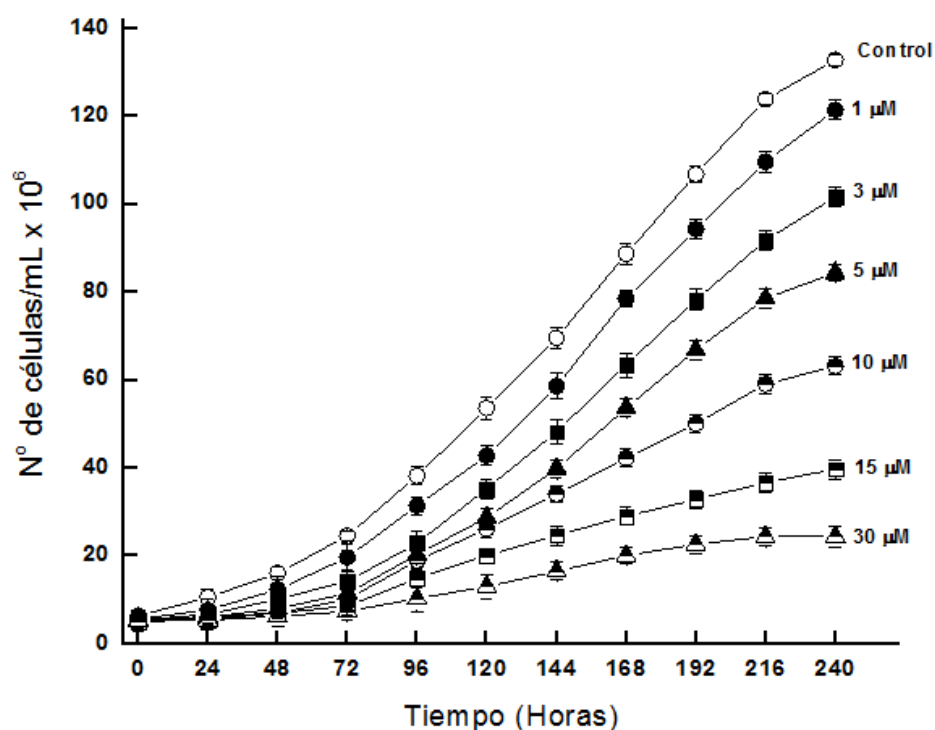


Figura 13. Efecto de la tetrahidroquinolina sustituida DM231 sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. El cultivo se inició a partir de una población de 7×10^6 cel/ml y su proliferación fue seguida cada 24 horas durante 10 días, en ausencia (control) y en presencia de concentraciones crecientes del compuesto (1 μ M a 30 μ M). Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio ($\pm$) la desviación estándar de tres experimentos independientes.

El IC₅₀ estimado de la tetrahidroquinolina sustituida DM231 fue de $7,85 \pm 1,02 \mu$ M a las 144 horas de crecimiento (Ver Fig. 14). Es importante resaltar que con este compuesto cerca del 90 % de inhibición de la proliferación celular se observó a una concentración de 30 μ M.

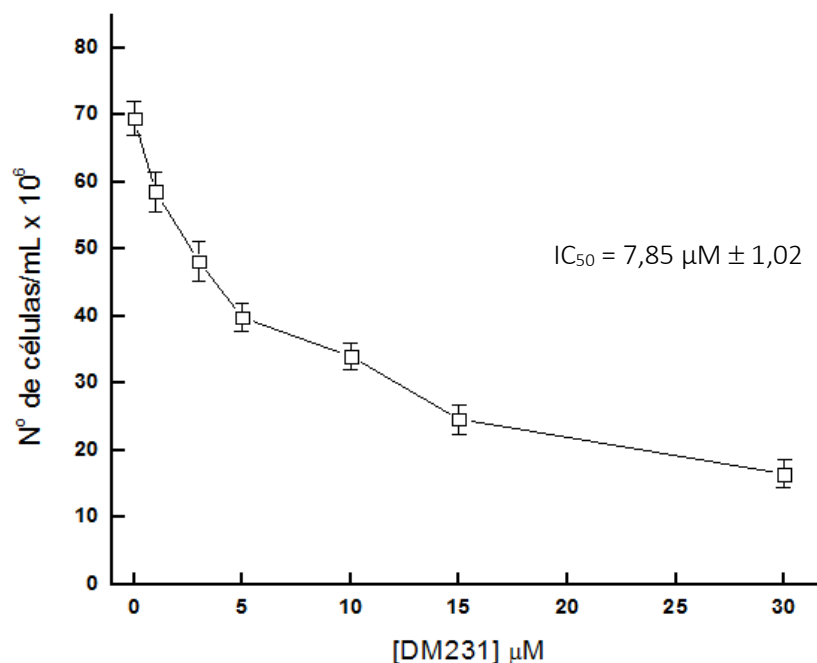


Figura 13. Curva Dosis-Respuesta de la tetrahydroquinolina DM231 sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* a las 144 horas de incubación con las diferentes concentraciones del compuesto. Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio ($\pm$) la desviación estándar de tres experimentos independientes.

6.6 Efecto de la droga de referencia Benznidazol sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y determinación de su IC₅₀

Con la finalidad de evaluar el efecto del Benznidazol, la droga de referencia actualmente utilizada en el tratamiento de la Enfermedad de Chagas, sobre la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi* y determinar su IC₅₀, se realizaron curvas de proliferación del parásito partiendo de una población inicial de 7×10^6 cel/ml en presencia de diferentes concentraciones de la droga (1 μM, 3 μM, 5 μM, 10 μM, 15 μM y 30 μM) manteniendo un grupo control (sin droga). Los resultados mostraron una inhibición dosis-dependiente de la proliferación celular (Fig. 15).

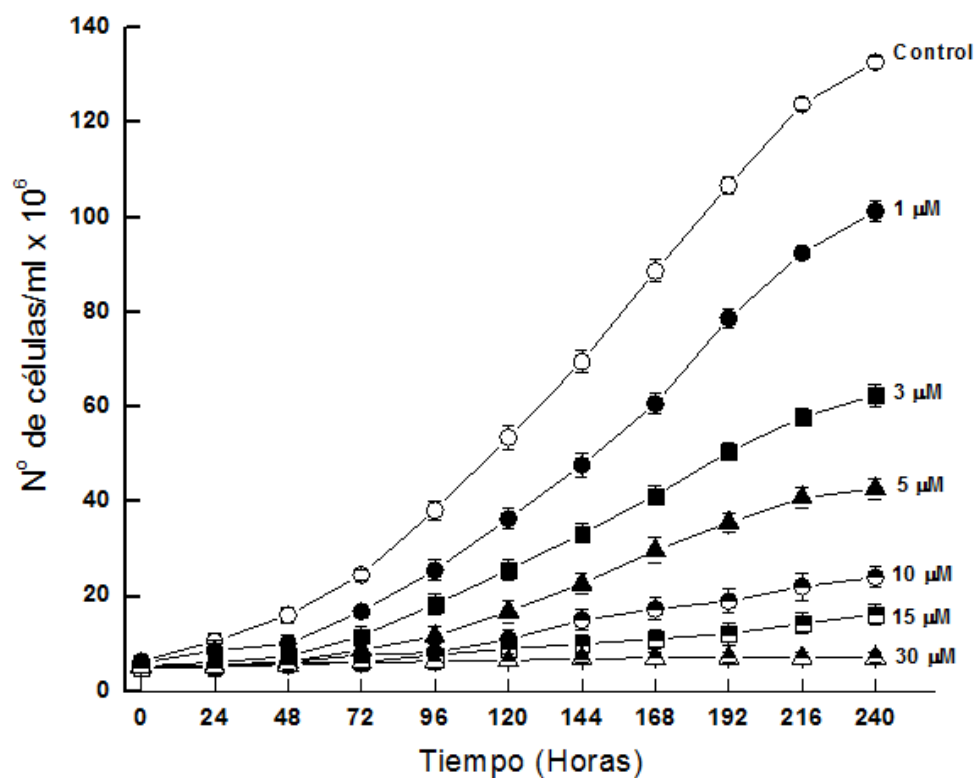


Figura 15. Efecto del Benznidazol sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. El cultivo se inició a partir de una población de 7×10^6 cel/ml y su proliferación fue seguida cada 24 horas durante 10 días, en ausencia (control) y en presencia de concentraciones crecientes de la droga (1 μ M a 30 μ M). Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio ($\pm$) la desviación estándar de tres experimentos independientes.

El IC_{50} estimado del Benznidazol fue de $2,45 \pm 1,02 \mu$ M a las 144 horas de crecimiento, tiempo en el cual el cultivo se encontraba en fase exponencial (Ver Fig. 16). Es importante resaltar que con este compuesto cerca del 90 % de inhibición de la proliferación celular se observó a partir de una concentración de 15 μ M.

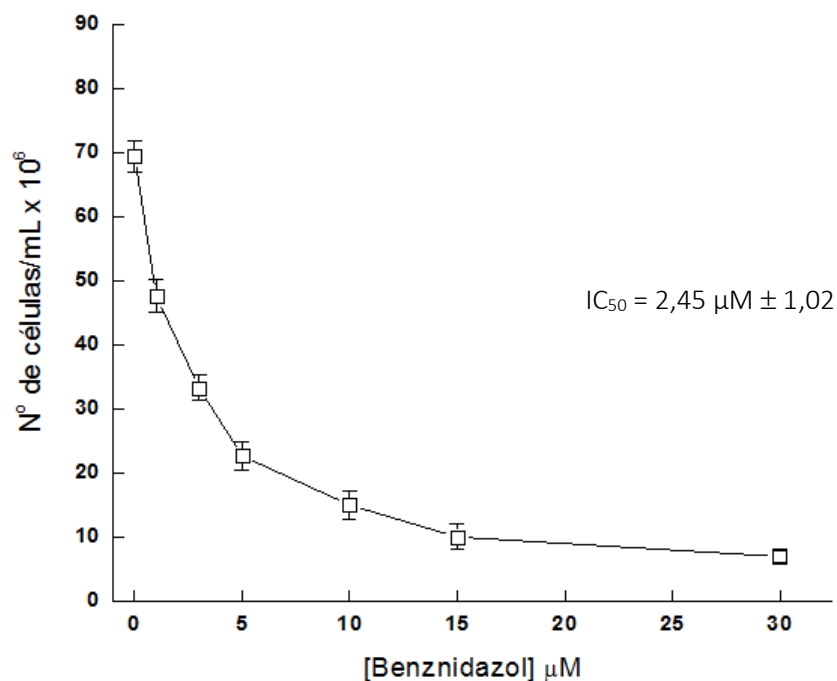


Figura 16. Curva Dosis-Respuesta del Benznidazol sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* a las 144 horas de incubación con las diferentes concentraciones del compuesto. Cada punto mostrado en la gráfica representa el promedio ($\pm$) la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Una vez demostrado el efecto antiproliferativo de las tetrahydroquinolinas DM117, DM191 y DM231, se procedió a estudiar un posible efecto de estos compuestos sobre la regulación del calcio intracelular en *Trypanosoma cruzi*. Para ello, estudiamos el efecto de estas tetrahydroquinolinas y de la droga de referencia Benznidazol sobre diferentes sistemas que se encargan de mantener la homeostasis de Ca^{2+} en estos parásitos.

6.7 Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191 y DM231 sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de *Trypanosoma cruzi*.

Uno de los sistemas reguladores de los niveles intracelulares de Ca^{2+} en los tripanosomatidios es la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática, ya que esta enzima es la encargada de ejercer la regulación fina de los niveles intracelulares basales de Ca^{2+} en los mismos. Con la finalidad de establecer si esta enzima pudiera ser un posible blanco de la acción de las tetrahydroquinolinas DM117, DM191 y DM231, se incubaron preparaciones de membrana plasmática de estos parásitos en ausencia (actividad control) y en presencia de diferentes concentraciones de cada una de los compuestos (5 μM , 15 μM y 30 μM) y se determinó la actividad de hidrólisis de ATP por la Ca^{2+} -ATPasa presente en dichas membranas a una concentración de Ca^{2+} libre de 10 μM . Asimismo, se evaluó el efecto de la droga de referencia Benznidazol sobre la actividad de esta enzima, pues si bien es conocido el efecto antiproliferativo de esta droga en *T. cruzi* no ha sido reportado ningún estudio sobre el efecto de la misma en la regulación intracelular de Ca^{2+} .

Como puede observarse en la Fig. 17, los diferentes compuestos mostraron un efecto inhibitorio sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática de *T. cruzi* a excepción de la tetrahydroquinolina DM117 que no mostró ningún efecto (Ver Fig. 17). El efecto inhibitorio fue dosis dependiente, observándose que a medida que se incrementaba la concentración de las tetrahydroquinolinas DM191 y DM231 y del Benznidazol, ocurría un mayor porcentaje de inhibición de la actividad de la enzima. Sin embargo, el efecto inhibitorio fue menos marcado con el Benznidazol (Fig. 17 y Tabla 5). Estos resultados fueron analizados mediante una prueba t de Student resultando en que las inhibiciones de cada compuesto con respecto al control fueron significativas con un $p \leq 0,05$.

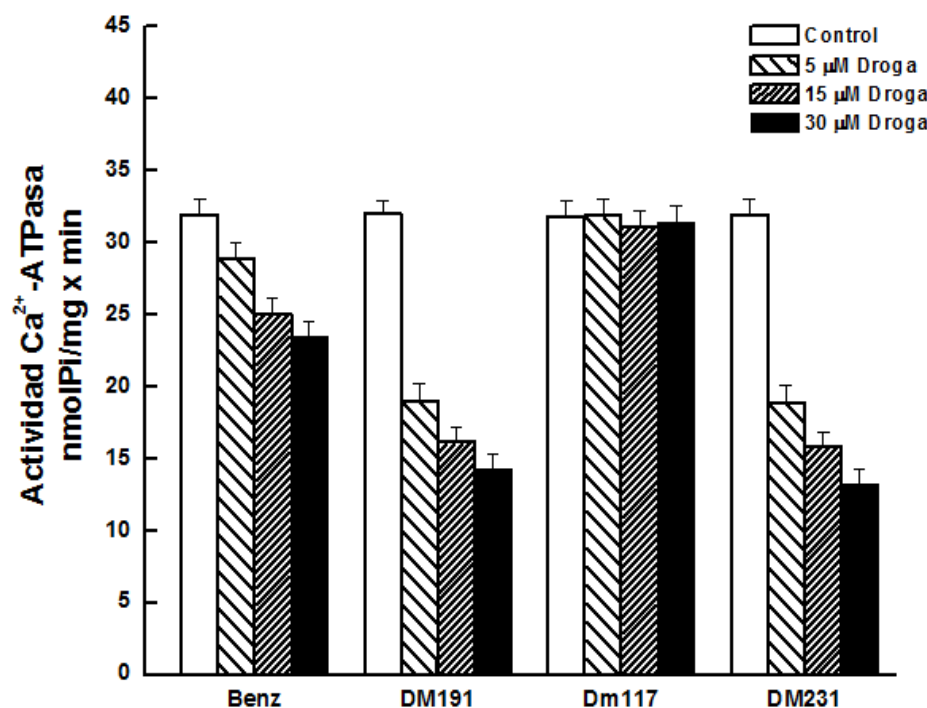


Figura 17. Efecto de las tetrahidroquinolinas sustituidas DM117, DM191 y DM231 y del Benznidazol sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. La actividad fue determinada a una concentración de Ca^{2+} libre de 10 μM . Se observa en cada grupo de barras la actividad control y la actividad en presencia de 5 μM , 15 μM y 30 μM de cada compuesto. Las actividades reportadas corresponden al promedio ($\pm$) la desviación estándar de cinco experimentos independientes, siendo los efectos inhibitorios de cada compuesto con respecto al control estadísticamente significativos con un $p \leq 0,05$.

En la tabla 5 se reportan los porcentajes de inhibición con respecto al control obtenido para cada compuesto a las diferentes concentraciones utilizadas, observándose que las tetrahidroquinolinas sustituidas DM191 y DM231 inhibieron la actividad de la enzima en un 55,22 % y 58,55 % respectivamente a una concentración de 30 μM . Por otra parte, la tetrahidroquinolina DM117 a esta misma concentración, no inhibió la actividad Ca^{2+} -ATPasa de *T. cruzi*. La droga de referencia Benznidazol a 30 μM por su parte, inhibió en menor proporción la actividad de esta enzima (26,65

%). Es importante resaltar que los compuestos DM191, DM231 y el Benznidazol, inhibieron de una manera significativa la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de *T. cruzi* cuando fueron utilizados a una concentración cercana a los IC_{50} determinados para los mismos (5 μM) (Ver Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de inhibición de las tetrahydroquinolinas DM117, DM191, DM231 y del Benznidazol sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, a concentraciones de 5 μM , 15 μM y 30 μM .

Concentración Compuesto	Porcentaje de Inhibición (%) con respecto a la actividad Ca^{2+} -ATPasa control			
	DM117	DM191	DM231	BENZNIDAZOL
5 μM	0	40,54	40,76	9,40
15 μM	2,35	49,56	50,39	21,61
30 μM	1,32	55,22	58,55	26,65

Los resultados mostrados sugieren a la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de estos parásitos, como un posible blanco de acción de las tetrahydroquinolinas DM191 y DM231 y de la droga de referencia Benznidazol.

6.8 Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191 y DM231 sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de fantasmas de eritrocitos humanos

Con la finalidad de profundizar si la Ca^{2+} -ATPasa de *T. cruzi* pudiera ser considerada un posible blanco de la acción de las tetrahydroquinolinas DM117, DM191 y DM231, una vez estudiado el efecto de estos compuestos sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de epimastigotes de *T. cruzi*, se evaluó si los mismos afectaban la enzima análoga de eritrocitos humanos. Para ello se estudió el efecto de cada una de las tetrahydroquinolinas a una concentración de 30 μM sobre la actividad de hidrólisis de ATP de la Ca^{2+} -ATPasa presente en la membrana de eritrocitos humanos a diferentes concentraciones de calcio libre (0,1 μM ; 0,2 μM ; 0,4 μM ; 0,5 μM ; 1 μM ; 2 μM ; 5 μM y 10

μM). Como puede observarse en la Fig. 18, en ausencia de compuestos la enzima presentó una actividad basal, la cual incrementa a medida que se aumenta la concentración de Ca^{2+} libre, observándose una actividad basal máxima a $10 \mu\text{M}$ Ca^{2+} libre donde la enzima se encuentra trabajando a su máxima velocidad (Fig. 18 Control). Asimismo, se pudo evidenciar que ninguna de las tetrahydroquinolinas estudiadas, ni la droga de referencia Benznidazol, afectaron de manera significativa la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de eritrocitos humanos.

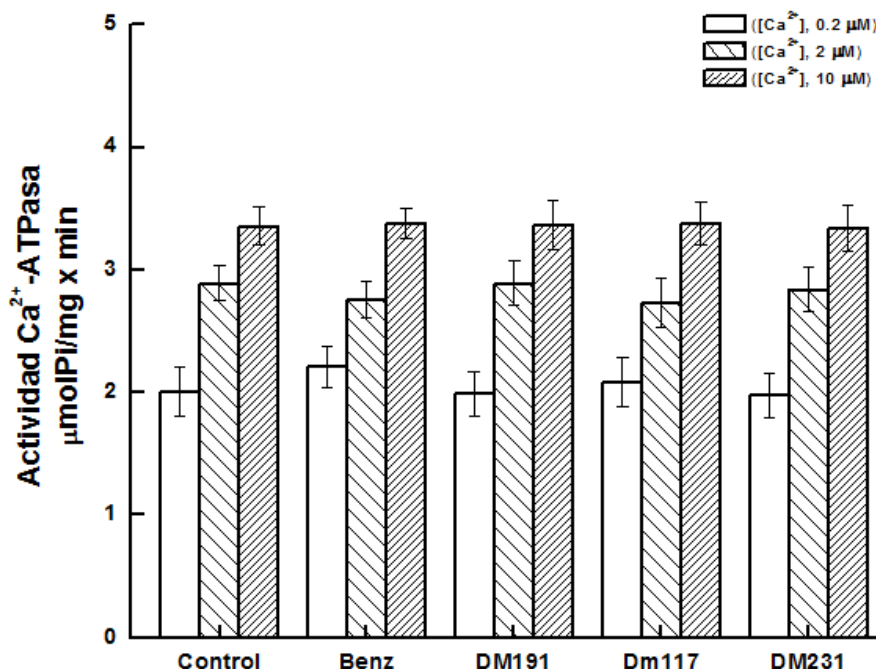


Figura 18. Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191 y DM231 y del Benznidazol sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática de eritrocitos humanos. Las barras representan la actividad de la enzima en presencia de $0.2 \mu\text{M}$, $2 \mu\text{M}$ y $10 \mu\text{M}$ Ca^{2+} libre respectivamente. El grupo control representa la actividad de la enzima en ausencia de compuestos. El resto de los grupos representa la actividad de la enzima en presencia de $30 \mu\text{M}$ Benznidazol, $30 \mu\text{M}$ DM191, $30 \mu\text{M}$ DM117 y $30 \mu\text{M}$ DM231. Las actividades reportadas corresponden al promedio ($\pm$) la desviación estándar de cinco experimentos independientes, no observándose diferencia significativas entre el efecto de cada compuesto y el control con un $p \leq 0,05$.

Estos resultados apoyan la importancia de esta enzima como posible blanco de drogas en *T. cruzi*. La inhibición de esta enzima pudiera afectar la homeostasis del Ca^{2+} del parásito. Sin embargo, en la regulación del Ca^{2+} intracelular participan otros sistemas reguladores de Ca^{2+} que también podrían ser afectados por estas tetrahydroquinolinas.

6.9 Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191, DM231 y el Benznidazol sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Con la finalidad de evaluar el efecto de las diferentes tetrahydroquinolinas sustituidas (DM117, DM191 y DM231) y del Benznidazol sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de *T. cruzi*, los parásitos fueron incubados con el fluoróforo Fura-2AM, en ausencia y en presencia de Ca^{2+} extracelular 2 mM. Una vez obtenidos los niveles intracelulares basales de Ca^{2+} , se agregaron en los tiempos señalados con las flechas en cada gráfico, las diferentes tetrahydroquinolinas de manera independiente a diferentes concentraciones (un rango entre 5 y 60 μM) y se observaron los cambios ocasionados por los compuestos sobre la relación de fluorescencia 340/380 nm. Tomando en cuenta la relación de proporcionalidad entre la relación 340/380 nm y la concentración de Ca^{2+} intracelular planteada en la ecuación de Grynkiewicz, el incremento en la relación 340/380 nm puede traducirse como un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} en el parásito.

6.9.1 Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM117 sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

En la Figura 19 puede observarse el efecto de la tetrahydroquinolina DM117 sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en *T. cruzi*, en presencia (A) y ausencia de Ca^{2+} (B) extracelular.

Como se muestra en la figura, luego de añadir el compuesto DM117 a una concentración de 5 μM , concentración cercana al IC_{50} estimado ($5,25 \pm 1,03 \mu\text{M}$) para este compuesto sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* (Ver sección 6.3), tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} extracelular, se produjo un incremento rápido y de gran magnitud en la relación de fluorescencia a 340/380 nm, seguido de una rápida recuperación donde se alcanzaron niveles intracelulares de Ca^{2+} cercanos al basal. El efecto mostrado en la gráfica fue similar cuando el compuesto fue ensayado a una concentración mayor (15 μM) (resultados no mostrados). El hecho que no se observaran diferencias cuando el ensayo fue realizado en ausencia o presencia de Ca^{2+} extracelular, demostró que el incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} inducido por este compuesto era debido a su liberación desde reservorios intracelulares y no a la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular.

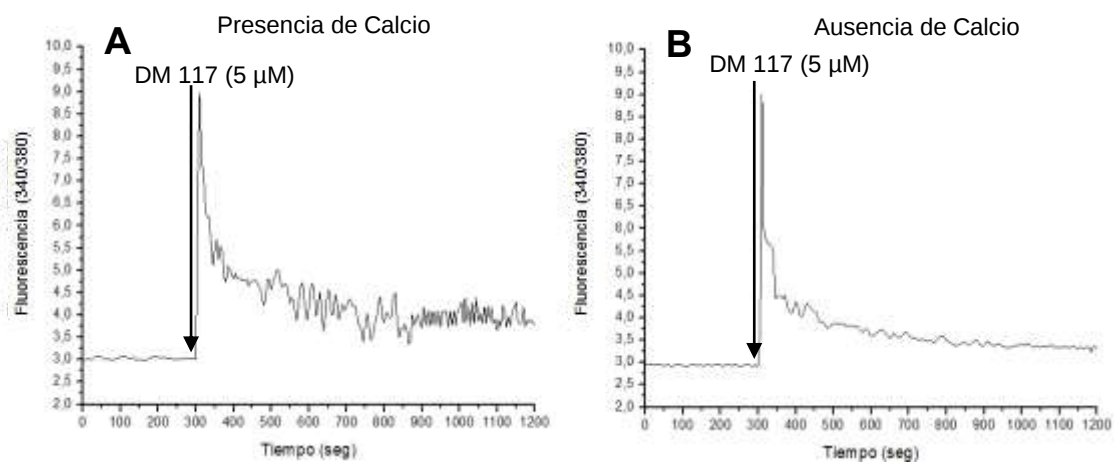


Figura 19. Efecto del compuesto DM117 sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. **A.** Efecto de 5 μM DM117 (flecha) sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en presencia de 2 mM de Ca^{2+} extracelular. **B.** Efecto de 5 μM DM117 sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en ausencia de Ca^{2+} extracelular (8 mM EGTA).

6.9.2 Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM191 sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

El efecto de la tetrahydroquinolina DM191 sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en *T. cruzi*, en presencia y ausencia de Ca^{2+} extracelular, puede ser observado en la Fig. 20 (A y B respectivamente). Como se muestra en la figura, luego de añadir el compuesto DM191 a una concentración de 6 μM , concentración cercana al IC_{50} estimado ($6,25 \pm 1,04 \mu\text{M}$) para su efecto sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* (Ver sección 6.4), tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} extracelular, se produjo un incremento rápido en la relación de fluorescencia a 340/380 nm. A diferencia del comportamiento observado con el compuesto DM117, la magnitud del incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} fue menor. Asimismo, no se observó la recuperación de los niveles basales del ión, sino que éste permaneció elevado dentro del parásito. El efecto mostrado en la gráfica fue similar cuando el compuesto fue ensayado a una concentración de 15 μM (resultados no mostrados). Al igual que con la tetrahydroquinolina DM117, no se observaron diferencia entre los ensayos realizados en ausencia (Fig. 20B) o presencia de Ca^{2+} extracelular (Fig. 20A), este resultado indicó que el DM191 está induciendo el incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} mediante la liberación de este ion desde compartimientos intracelulares.

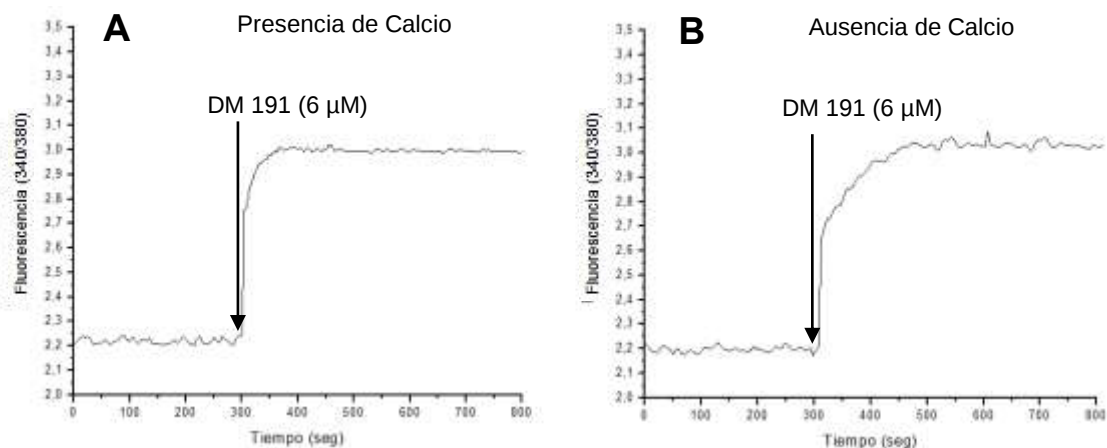


Figura 20. Efecto del compuesto DM191 sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. A. Efecto de 6 μM DM191 (flecha) sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en presencia de 2 mM de Ca^{2+} extracelular. B. Efecto de 6 μM DM191 sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en ausencia de Ca^{2+} extracelular (8 mM EGTA).

6.9.3 Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM231 sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

El efecto de la tetrahydroquinolina DM231 sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en *T. cruzi*, en presencia y ausencia de Ca^{2+} extracelular, puede ser observado en la Fig. 21 (A y B respectivamente). Cuando este compuesto fue añadido a concentraciones cercanas al IC_{50} estimado ($7,85 \pm 1,02 \mu\text{M}$) para su efecto sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* (Ver sección 6.5), y concentraciones mayores (15 μM , 30 μM y 40 μM), tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} extracelular no se observó ningún efecto. Como puede ser observado en el resultado mostrado en la Fig. 21, sólo a una concentración del DM231 de 60 μM se produjo un pequeño incremento en la relación de fluorescencia a 340/380 nm. Al igual que el compuesto DM191, el Ca^{2+} intracelular no alcanzó nuevamente sus niveles basales, sino que se quedó elevado dentro del parásito. Al igual que con las tetrahydroquinolinas DM117 y DM191, no se observaron

diferencias entre los ensayos realizados en ausencia (Fig. 21B) o presencia de Ca^{2+} extracelular (Fig. 21A), este resultado indicó que el DM231 está induciendo el incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} mediante la liberación de este ion desde compartimientos intracelulares.

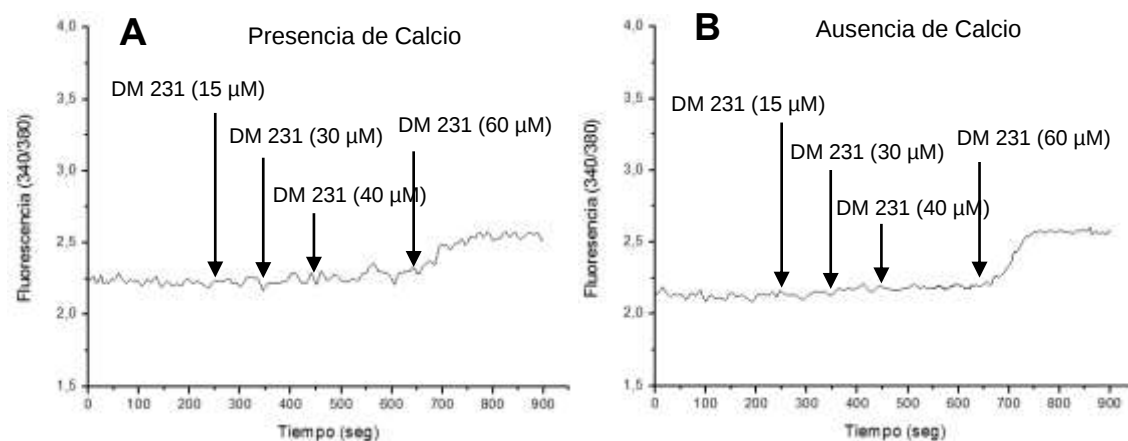


Figura 21. Efecto del compuesto DM231 sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. A. Efecto de concentraciones de 15 μM , 30 μM , 40 μM y 60 μM DM191 (flechas) sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en presencia de 2 mM de Ca^{2+} extracelular. **B.** Efecto de 15 μM , 30 μM , 40 μM y 60 μM DM191 (flechas) sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en ausencia de Ca^{2+} extracelular (8 mM EGTA).

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

Al igual que con las tetrahidroquinolinas DM117, DM191 y DM231, se estudió el efecto de la droga de referencia Benznidazol sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en *T. cruzi*, en presencia y ausencia de Ca^{2+} extracelular (Fig. 22, A y B respectivamente). Con el Benznidazol, a una concentración cercana al IC_{50} estimado ($2,45 \pm 1,02 \mu\text{M}$) no se observó un incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} (resultado no mostrado). Fue necesario una concentración de 15 μM de la

droga para observar un efecto sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en el parásito (Fig. 22 A y B). El incremento observado fue similar al obtenido con el compuesto DM191, observándose luego de añadir el compuesto un incremento rápido en la relación de fluorescencia a 340/380 nm. Asimismo, no se observó la recuperación de los niveles basales del ion, sino que éste permaneció elevado dentro del parásito. Al igual que con las tetrahydroquinolinas DM117, DM191 y DM231 no se observaron diferencias entre los ensayos realizados en ausencia (Fig. 21B) o presencia de Ca^{2+} extracelular (Fig. 22A), este resultado indicó que el incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} inducido por esta droga era debido a su liberación desde reservorios intracelulares y no a la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular.

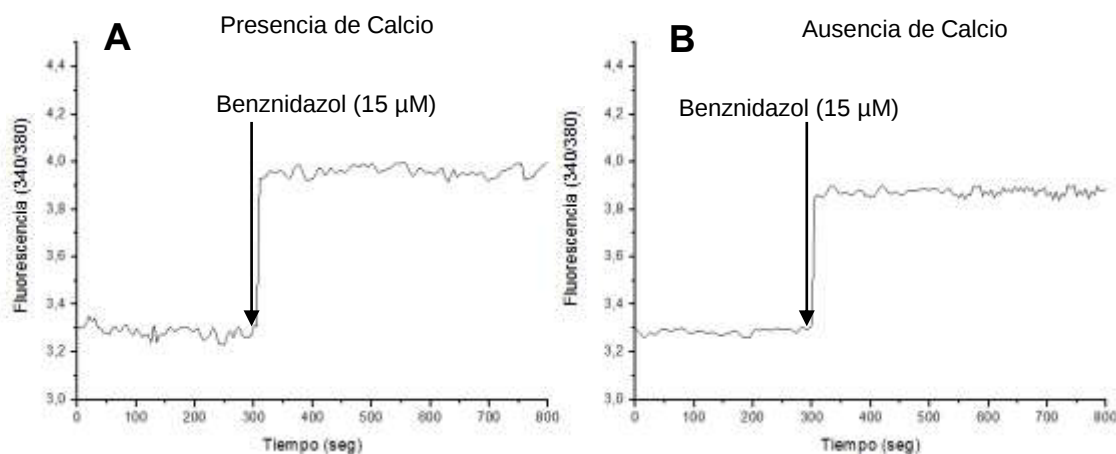


Figura 22. Efecto del Benznidazol sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. A. Efecto de 15 μM Benznidazol (flecha) sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en presencia de 2 mM de Ca^{2+} extracelular. B. Efecto de 15 μM Benznidazol sobre la concentración intracelular de Ca^{2+} en ausencia de Ca^{2+} extracelular (8 mM EGTA).

Los resultados obtenidos demostraron que todos los compuestos incrementan de una manera característica los niveles intracelulares de Ca^{2+} en el parásito, producto de la liberación de

Ca²⁺ desde reservorios intracelulares, es por esto que se procedió a estudiar el efecto de estos compuestos sobre el potencial de membrana mitocondrial y los acidocalcisomas de *T. cruzi*.

6.10 Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191, DM231 y del Benznidazol sobre el potencial electroquímico mitocondrial en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Los tripanosomatidios presentan una mitocondria única, la cual en su membrana interna posee un sistema de transporte de Ca²⁺ electroforético unidireccional, el cual utiliza como fuerza motora la diferencia de potencial electroquímico generado por el gradiente de protones. Este mecanismo es capaz de acumular grandes concentraciones de Ca²⁺ dentro de la mitocondria. Si ocurre una perturbación de este gradiente, el Ca²⁺ es liberado hacia el citoplasma. Así, un cambio en el potencial de la membrana mitocondrial implicaría el desacoplamiento de este gradiente y por lo tanto una alteración de la homeostasis intracelular de Ca²⁺ al liberarse éste hacia el citoplasma.

Para determinar el efecto de las tetrahydroquinolinas DM117, DM291, DM231 y el Benznidazol sobre el potencial electroquímico mitocondrial en epimastigotes de *T. cruzi*, estos parásitos fueron cargados con rodamina 123, un fluoróforo que se caracteriza por acumularse entre la membrana interna y externa de la mitocondria. Cuando el potencial de la membrana mitocondrial es afectado, el fluoróforo se libera, observándose un aumento en la fluorescencia emitida a 530 nm.

6.10.1 Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM117 sobre el potencial electroquímico mitocondrial en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Con el objeto de evaluar el efecto de la tetrahydroquinolina DM117 sobre el potencial electroquímico mitocondrial en epimastigotes de *T. cruzi* se determinaron los cambios de fluorescencia de la rodamina 123 al añadir diferentes concentraciones de DM117. Como se

muestra en la Fig. 23, no se observó cambio en la fluorescencia luego de añadir el compuesto DM117 a una concentración de 5 μM , concentración cercana al IC_{50} estimado ($5,25 \pm 1,03 \mu\text{M}$) para este compuesto sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* (Ver sección 6.3). Los resultados fueron similares cuando el compuesto fue ensayado a una concentración mayor (15 μM) (resultados no mostrados). Sin embargo, la adición posterior de 2 μM FCCP, un protonóforo desacoplante de la cadena transportadora de electrones que afecta el potencial de membrana mitocondrial, utilizado como control positivo, produjo un importante incremento en la intensidad de la fluorescencia (Fig. 23A) motivado por la liberación de la rodamina 123. El experimento fue realizado también de forma inversa, es decir, añadiendo primero el FCCP y luego el DM117 (Fig. 23B), observándose que la adición inicial del FCCP produjo un aumento considerable de la fluorescencia, generando una respuesta máxima pues el DM117 agregado posteriormente a 5 μM y 15 μM no tuvo ningún efecto adicional.

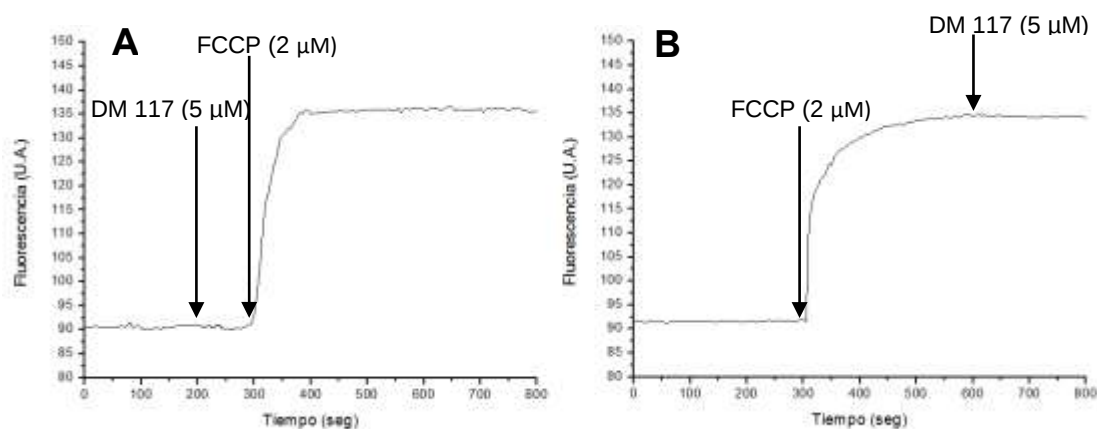


Figura 23. Efecto de la tetrahidroquinolina sustituida DM117 sobre el potencial electroquímico mitocondrial en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. **A.** Efecto de 5 μM DM117 (flecha) seguido de la adición de 2 μM FCCP (flecha). **B.** Efecto del 2 μM FCCP (flecha) seguido de la adición de 5 μM DM117 (flecha).

6.10.2 Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM191 sobre el potencial electroquímico mitocondrial en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

En la Fig. 24 se evaluó el efecto de la tetrahydroquinolina DM191 sobre el potencial electroquímico mitocondrial en epimastigotes de *T. cruzi*. Al añadir el DM191 a una concentración de 6 μM , concentración cercana al IC_{50} estimado ($6,25 \pm 1,04 \mu\text{M}$) para su efecto sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* (Ver sección 6.4), se evidenció un aumento en la fluorescencia de la rodamina 123 a 530 nm, indicando que este compuesto es capaz de desestabilizar el potencial electroquímico mitocondrial. La adición posterior de 2 μM del desacoplante FCCP produjo una respuesta aún mayor en la fluorescencia (Fig. 24A). Invertiendo el orden en la adición de estos compuestos, se observó que el FCCP produjo un incremento considerable en la fluorescencia, mayor al efecto observado con el DM117. Sin embargo, el FCCP no generó una respuesta máxima, pues al agregar posteriormente 6 μM del DM191 se observó un incremento adicional en la fluorescencia de la rodamina 123 (Fig. 24B).

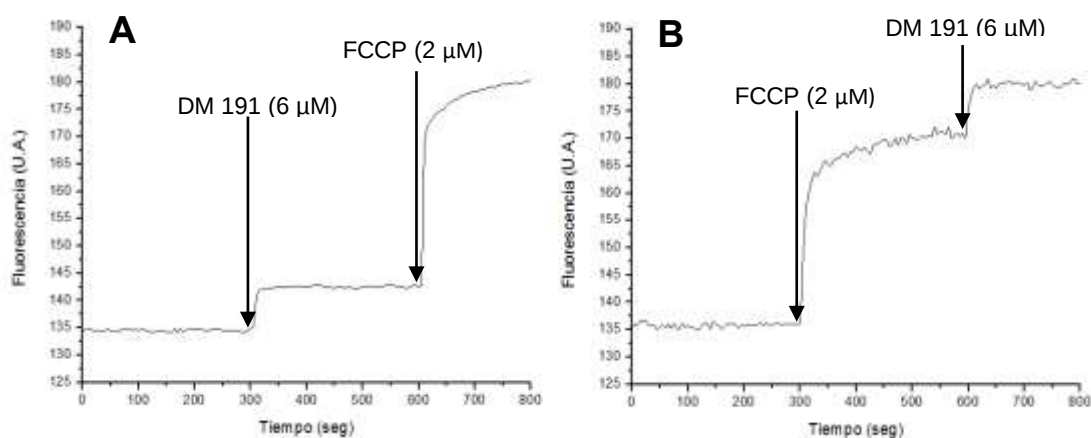


Figura 24. Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM191 sobre el potencial electroquímico mitocondrial en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. A. Efecto de 6 μM DM191 (flecha) seguido de la adición de 2 μM FCCP (flecha). B. Efecto del 2 μM FCCP (flecha) seguido de la adición de 5 μM DM191 (flecha).

6.10.3 Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM231 sobre el potencial electroquímico mitocondrial en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

En la Fig. 25 se evaluó el efecto de la tetrahydroquinolina DM231 sobre el potencial electroquímico mitocondrial en epimastigotes de *T. cruzi*. Al añadir el DM231 a concentraciones cercanas al IC₅₀ estimado ($7,85 \pm 1,02 \mu\text{M}$) para su efecto sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* (Ver sección 6.5), y concentraciones mayores ($15 \mu\text{M}$, $30 \mu\text{M}$ y $40 \mu\text{M}$), no se evidenció ningún efecto sobre el potencial de membrana mitocondrial. Un efecto en el potencial mitocondrial fue observado a $60 \mu\text{M}$ del compuesto. Como puede verse en la Fig. 25A, $60 \mu\text{M}$ DM231 incrementó la fluorescencia de la rodamina 123, el cual fue menor al inducido por la tetrahydroquinolina DM191, indicando que este compuesto es capaz de desestabilizar el potencial electroquímico mitocondrial a altas concentraciones. La adición posterior de $2 \mu\text{M}$ del desacoplante FCCP produjo una respuesta aún mayor en la fluorescencia (Fig. 25A). Invirtiendo el orden en la adición de estos compuestos, se observó que el FCCP produjo un incremento considerable en la fluorescencia de la rodamina 123. Sin embargo, el FCCP no generó una respuesta máxima, pues al agregar posteriormente $60 \mu\text{M}$ del DM231 se observó un pequeño incremento adicional (Fig. 25B).

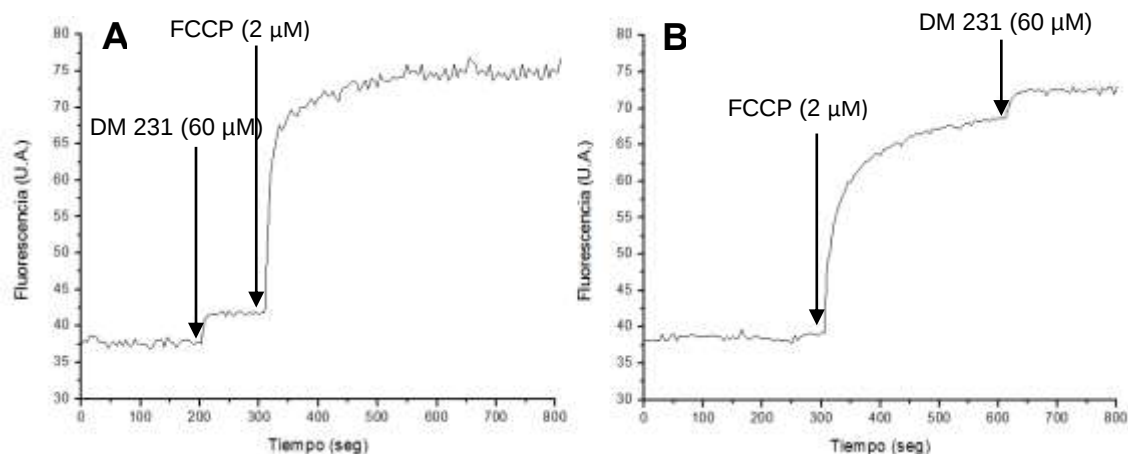


Figura 25. Efecto de la tetrahidroquinolina sustituida DM231 sobre el potencial electroquímico mitocondrial en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. A. Efecto de 60 μM DM231 (flecha) seguido de la adición de 2 μM FCCP (flecha). B. Efecto del 2 μM FCCP (flecha) seguido de la adición de 60 μM DM231 (flecha).

6.10.4 Efecto del Benznidazol sobre el potencial electroquímico mitocondrial en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

El efecto de la droga de referencia Benznidazol también fue evaluado sobre el potencial electroquímico mitocondrial en epimastigotes de *T. cruzi*. Al añadir Benznidazol, a una concentración cercana al IC₅₀ estimado ($2,45 \pm 1,02 \mu\text{M}$) para su efecto sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* (Ver sección 6.4), no se observó un efecto sobre la fluorescencia de la rodamina 123. Sin embargo, a una concentración de 15 μM, la droga fue capaz de inducir un pequeño incremento en la intensidad de la fluorescencia de este fluoróforo, indicando que este compuesto es capaz de desestabilizar el potencial electroquímico mitocondrial a esta concentración. La adición posterior de 2 μM del desacoplante FCCP produjo una respuesta aún mayor en la fluorescencia (Fig. 26A). Invertiendo el orden en la adición de estos compuestos, se observó que el FCCP produjo un incremento considerable en la fluorescencia, no generando una respuesta máxima, pues al agregar

posteriormente 15 μM de Benznidazol se observó un incremento adicional en la fluorescencia de la rodamina 123 (Fig. 26B).

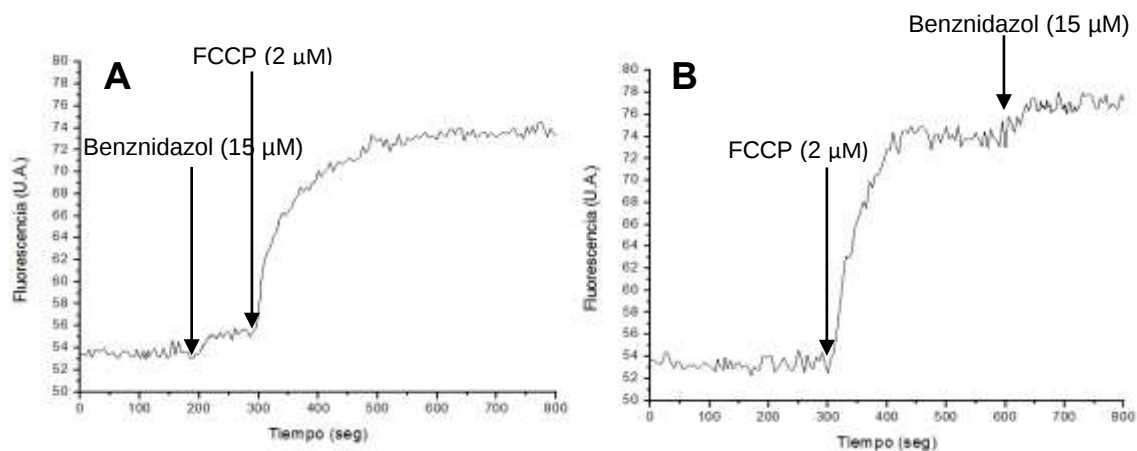


Figura 26. Efecto del Benznidazol sobre el potencial electroquímico mitocondrial en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. **A.** Efecto de 15 μM Benznidazol (flecha) seguido de la adición de 2 μM FCCP (flecha). **B.** Efecto del 2 μM FCCP (flecha) seguido de la adición de 15 μM Benznidazol (flecha).

6.11 Efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191, DM231 y del Benznidazol sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Con la finalidad de evaluar el efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191, DM231 y del Benznidazol sobre los acidocalcisomas de *T. cruzi*, estos parásitos fueron incubados con 2 μM del fluoróforo naranja de acridina, el cual se compartamentaliza en organelos ácidos, como los acidocalcisomas, acumulándose en el interior de los mismos. Esta acumulación es dependiente del gradiente de protones, el cual es mantenido gracias a la presencia de una H^+ -ATPasa vacuolar. Cuando este gradiente es afectado, los acidocalcisomas se alcalinizan y la naranja de acridina es liberada al citoplasma del parásito, observándose un incremento de su fluorescencia a 530 nm.

Los acidocalcisosmas acumulan Ca^{2+} por medio de la actividad de una $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -ATPasa, si el gradiente de H^{+} es alterado, el Ca^{2+} de este compartimiento también será liberado hacia el citoplasma afectando así la homeostasis intracelular de Ca^{2+} en el parásito.

6.11.1 Efecto de la tetrahydroquinolina sustituida DM117 sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisosmas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Con la finalidad de evaluar el efecto de la tetrahydroquinolina DM117 sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisosmas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, se estudió el cambio en la fluorescencia de la naranja de acridina en presencia de 5 μM DM117, concentración cercana al IC_{50} estimado ($5,25 \pm 1,03 \mu\text{M}$) para este compuesto sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* (Ver sección 6.3). Como se muestra en la Fig. 27, al añadir la tetrahydroquinolina la fluorescencia de la naranja de acridina incrementó, producto de su liberación de los acidocalcisosmas a causa de la alcalinización de los mismos. La adición posterior de 2 μM nigericina, un intercambiador $\text{H}^{+}/\text{K}^{+}$ utilizado como control en estos ensayos, el cual provoca la alcalinización de los acidocalcisosmas, se observó un menor incremento en la fluorescencia, ya que el DM117 logró alcalinizar de una manera importante estos organelos (Fig. 27A). Al invertir el orden de adición de estos compuestos, se observó que la nigericina produjo un incremento en la fluorescencia. Sin embargo, no generó una respuesta máxima ya que la adición posterior del DM117 condujo a un incremento adicional de esta fluorescencia (Fig. 27B)

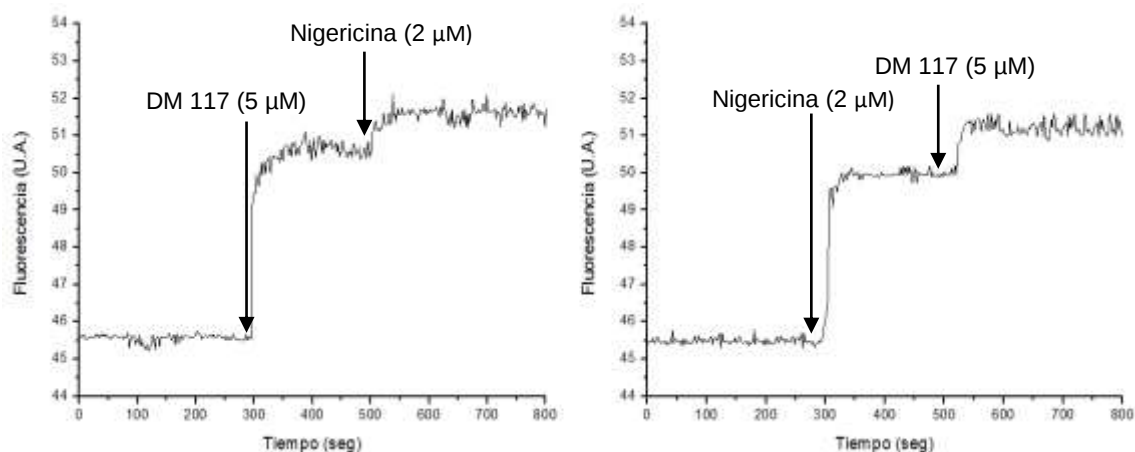


Figura 27. Efecto de la tetrahidroquinolina sustituida DM117 sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. **A.** Efecto de 5 μM DM117 (flecha) seguido de la adición de 2 μM nigericina (flecha). **B.** Efecto del 2 μM nigericina (flecha) seguido de la adición de 5 μM DM117 (flecha).

6.11.2 Efecto de la tetrahidroquinolina sustituida DM191 sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Con la finalidad de evaluar el efecto de la tetrahidroquinolina DM191 sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, se estudió el cambio en la fluorescencia de la naranja de acridina en presencia de 6 μM DM191, concentración cercana al IC_{50} estimado ($6,25 \pm 1,04 \mu\text{M}$) para este compuesto sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* (Ver sección 6.3). Como se muestra en la Fig. 28, al añadir la tetrahidroquinolina la fluorescencia de la naranja de acridina incrementó, lo cual significa que este compuesto provoca la alcalinización de los acidocalcisomas. Sin embargo, el incremento observado fue menor al observado con el DM117. La adición posterior de 2 μM nigericina, mostró un importante incremento en la fluorescencia, mayor al observado para el DM117 (Fig. 28A). Al invertir el orden de adición de estos compuestos, se observó que la nigericina produjo un incremento importante en la fluorescencia de la naranja de

acridina. Sin embargo, no generó una respuesta máxima ya que la adición posterior del DM191 condujo a un incremento adicional de esta fluorescencia (Fig. 28B).

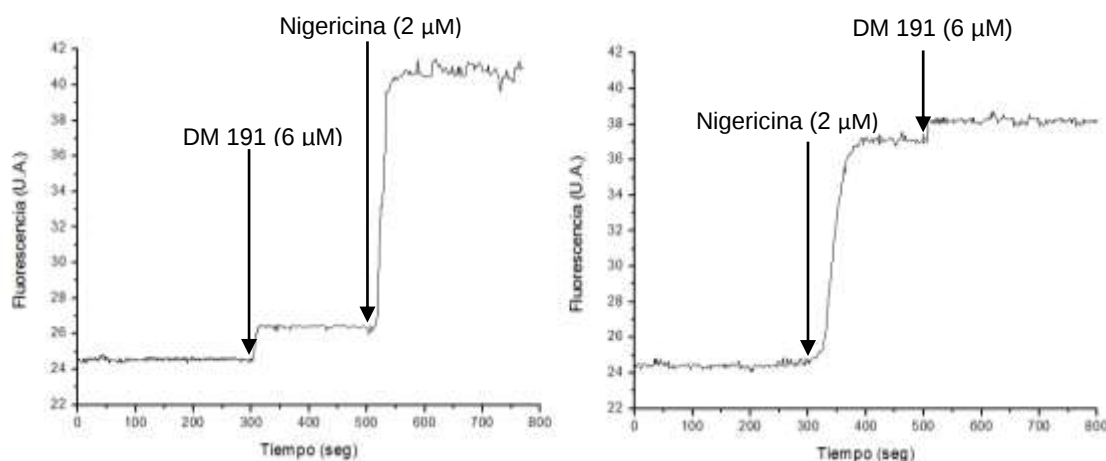


Figura 28. Efecto de la tetrahidroquinolina sustituida DM191 sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. **A.** Efecto de 6 μM DM191 (flecha) seguido de la adición de 2 μM nigericina (flecha). **B.** Efecto del 2 μM nigericina (flecha) seguido de la adición de 6 μM DM191 (flecha).

6.11.3 Efecto de la tetrahidroquinolina sustituida DM231 sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Con la finalidad de evaluar el efecto de la tetrahidroquinolina DM231 sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, se estudió el cambio en la fluorescencia de la naranja de acridina en concentraciones cercanas al IC_{50} estimado ($7,85 \pm 1,02 \mu\text{M}$) para su efecto sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* (Ver sección 6.5), y concentraciones mayores (15 μM , 30 μM y 40 μM), no evidenciándose ningún efecto sobre la alcalinización de los acidocalcisomas. Sin embargo, al añadir una concentración de 60 μM de esta tetrahidroquinolina la fluorescencia de la naranja de acridina incrementó de una manera lenta en el tiempo comparada al de los otros compuestos estudiados, producto de su liberación paulatina de los

acidocalcisosomas a causa de la alcalinización de los mismos. La adición posterior de 2 μM nigericina , condujo a un incremento adicional de la fluorescencia (Fig. 29A). Al invertir el orden de adición de estos compuestos, se observó que la nigericina produjo un incremento rápido en la fluorescencia. Sin embargo, no generó una respuesta máxima ya que la adición posterior del DM231 provocó un incremento adicional de esta fluorescencia (Fig. 29B).

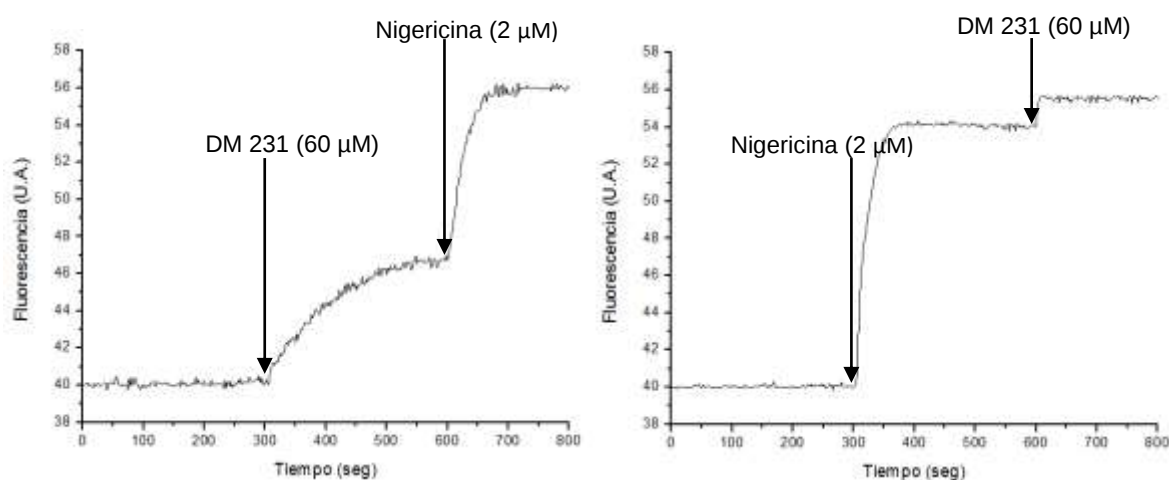


Figura 29. Efecto de la tetrahidroquinolina sustituida DM231 sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisosomas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. **A.** Efecto de 60 μM DM231 (flecha) seguido de la adición de 2 μM nigericina (flecha). **B.** Efecto del 2 μM nigericina (flecha) seguido de la adición de 60 μM DM231 (flecha).

6.11.4 Efecto del Benznidazol sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisosomas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

El efecto de la droga de referencia Benznidazol también fue evaluado sobre la alcalinización de los acidocalcisosomas en epimastigotes de *T. cruzi*. Al añadir Benznidazol, a una concentración cercana al IC_{50} estimado ($2,45 \pm 1,02 \mu\text{M}$) para su efecto sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* (Ver sección 6.4), no se observó un efecto sobre la fluorescencia de la naranja de

acridina. Sin embargo, a una concentración de 15 μM , la droga fue capaz de inducir un incremento lento y paulatino, al igual que se observó con el DM231, en la intensidad de la fluorescencia de este fluoróforo, indicando que este compuesto es capaz de alcalinizar los acidocalcisomas, provocando la liberación de la naranja de acridina de los mismos. La adición posterior de 2 μM nigericina produjo un incremento rápido en la fluorescencia, alcalinizando de manera completa este organelo (Fig. 30A). Invertiendo el orden en la adición de estos compuestos, se observó que la nigericina produjo un incremento rápido en la fluorescencia, no generando una respuesta máxima, pues al agregar posteriormente 15 μM de Benznidazol se observó un incremento adicional en la fluorescencia de la naranja de acridina (Fig. 30B).

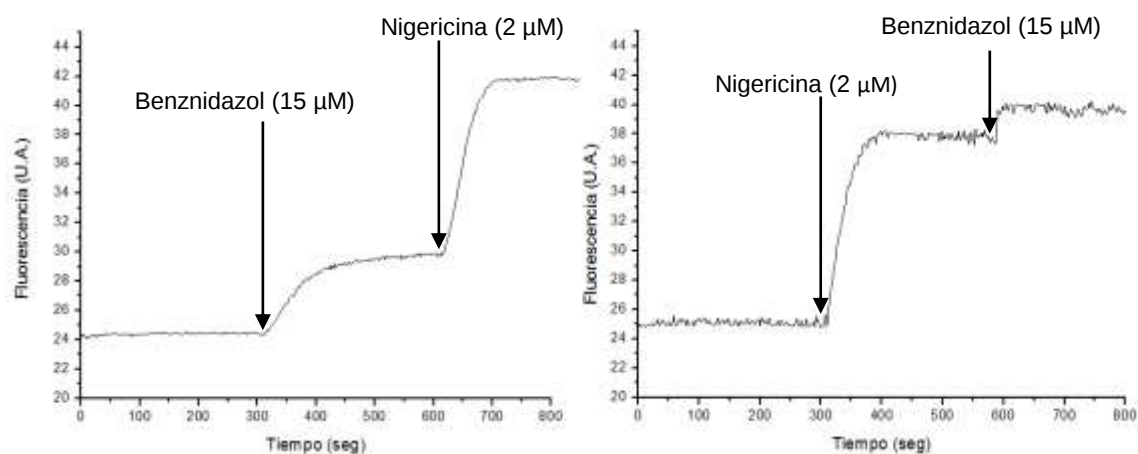


Figura 30. Efecto del Benznidazol sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. **A.** Efecto de 15 μM Benznidazol (flecha) seguido de la adición de 2 μM nigericina (flecha). **B.** Efecto del 2 μM nigericina (flecha) seguido de la adición de 15 μM Benznidazol (flecha).

7. DISCUSIÓN

Uno de los principales intereses en las investigaciones sobre el mejoramiento de los tratamientos y la profilaxia de la Enfermedad de Chagas, ha sido el estudio dirigido hacia la búsqueda de nuevos fármacos más efectivos y con menos efectos secundarios que los utilizados actualmente para el tratamiento de esta enfermedad. En este sentido las investigaciones han sido conducidas en varias direcciones, tales como: 1) el uso de terapias combinadas, utilizando drogas de diferente estructura química y con diferentes blancos de acción con la finalidad de aumentar la eficacia terapéutica. El efecto sinérgico de la combinación de fármacos produce un efecto mayor que el dado por cada droga por separado, logrando así, potenciar el efecto terapéutico, minimizar el desarrollo de resistencia, disminuir las dosis requeridas, el período de tratamiento y los efectos secundarios (Alvar y col., 2008; Field y col., 2017); 2) La búsqueda de nuevos compuestos basados en productos naturales que sean perjudiciales para el parásito sin comprometer la salud del hospedador mamífero, basados en el hecho que estos compuestos podrían tener menores efectos secundarios sobre el paciente (Uchiyama, 2009) y 3) El estudio de nuevos posibles blancos de la acción de drogas en los tripanosomatidios, con la finalidad de generar compuestos que puedan afectar mecanismos intrínsecos del parásito esenciales para su viabilidad, pero que no afecten de manera negativa al hospedador mamífero (Field y col., 2017). Todas estas investigaciones conducen al interés final de encontrar tratamientos alternos a los conocidos actualmente que minimicen los efectos secundarios, mejoren la resistencia e incrementen su eficacia en la fase crónica de la enfermedad que son las limitaciones más importantes del tratamiento actual utilizado para la Enfermedad de Chagas.

A pesar de que la Enfermedad de Chagas es una enfermedad descubierta hace más de un siglo, la patogénesis, así como el desarrollo de un tratamiento específico contra la misma, no han sido completamente dilucidados. En la actualidad el tratamiento existente se basa en dos únicas drogas, el Nifurtimox (NFX) y el Benznidazol (BNZ). El mecanismo de acción de estos fármacos está

relacionado con la producción de intermediarios de nitroreducción que generan estrés oxidativo (NFX) y reductivo (BNZ) en el parásito (Pinazo y col., 2010). Tanto el Nifurtimox como el Benznidazol resultan ser eficaces en la fase aguda de la enfermedad y en las etapas tempranas de la fase crónica (Murcia, 2016) reduciendo la severidad de los síntomas, el curso clínico de la enfermedad y la duración de la parasitemia (Pinazo y col., 2010). Sin embargo, en la fase crónica han presentado baja eficacia. Además, al uso de estas drogas se encuentran frecuentemente asociados numerosos efectos secundarios.

Por estas razones se hace necesario continuar con la búsqueda de nuevos medicamentos que brinden alternativas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Los productos naturales constituyen una fuente esencial de metabolitos para el desarrollo de medicamentos y es por ello que muchos investigadores se han interesado en la obtención de sustancias que actúen como tripanocidas derivadas de productos naturales (Schwikkard y Van Heerden, 2002). Entre los productos naturales aislados de extractos de origen vegetal que han sido más recientemente estudiados y se ha demostrado presentan una actividad tripanocida están: el taxol (Duschak y Cuoto, 2007), los estilbenos y series sintéticas derivados de polifenoles naturales (Duschak y Cuoto, 2007), los flavonoides (Duschak y Cuoto, 2007), terpenos aislados de diferentes plantas, como el carvacrol (Rao y col., 2010), el isoeugenol (Azeredo y Soares, 2013), alcaloides como las quinolinas (Marella y col., 2013), derivados de quinolinas (Fournet y col., en 1993; Fakhfakh y col. en el 2003 y Franck y col. en el 2004) y quinolinas sustituidas denominadas tetrahydroquinolinas (Worthen y col. en el 2010; Romero-Bohórquez y col. en el 2012; Rashad y col. en el 2014; Muñoz y col., en el 2010; Fonseca-Berzal y col., en el 2013).

Las tetrahydroquinolinas están siendo actualmente consideradas de gran interés como posibles drogas a ser exploradas en los tripanosomatidios, por su interesante actividad tripanocida. Sin embargo, sus mecanismos de acción en estos parásitos son desconocidos. Partiendo de esta

premisa, fue de interés evaluar en este trabajo el efecto de tetrahydroquinolinas sustituidas sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y tratar de establecer un posible mecanismo de acción. Estas tetrahydroquinolinas sustituidas fueron obtenidas mediante reacciones de cicloadición imino Diels-Alder a partir del isoeugenol, el cual se encuentra en gran proporción en plantas de nuez moscada del género *Myristica*, de clavos de olor (*Eugenia caryophyllata*) y de canela (*Cinnamomum verum*), (Hyldgaard y col., 2015). Sustituciones de los grupos radicales de estas tetrahydroquinolinas permitieron generar series o familias de moléculas, una de ellas la serie DM, entre las cuales se encuentran las tetrahydroquinolinas sustituidas objeto de nuestros estudios (DM117, DM180, DM191, DM223, DM231 y DM234) (Kouznetsov y col., 2010)

Partiendo de lo anteriormente expuesto, mediante ensayos *in vitro*, se estudió el efecto de estas seis tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM180, DM191, DM223, DM231 y DM234 sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*. Además, se utilizó como droga de referencia en todos los ensayos al Benznidazol, cuyo efecto tripanocida ha sido reportado (Bern, 2011). El Benznidazol ha sido considerado como el tratamiento de primera línea contra la enfermedad de Chagas, por presentar menores efectos secundarios que el Nifurtimox y una mayor eficacia (Bern, 2011).

Todas las tetrahydroquinolinas mostraron un efecto inhibitorio sobre la proliferación de estos parásitos a una concentración de 15 μ M (Fig. 7) Sin embargo, únicamente los compuestos DM117, DM191 y DM231 tuvieron un efecto inhibitorio sobre la población de *T. cruzi* mayor del 50 % y cercano al efecto obtenido con la droga de referencia Benznidazol (Ver Fig. 7 y Tabla 3). Estos tres compuestos fueron evaluados a una concentración mayor (30 μ M), observándose una inhibición de la proliferación parasitaria de 74,14 %, 92,02 % y 81,55 % para los DM117, DM191 y DM231 respectivamente, en relación al porcentaje obtenido en presencia de la misma concentración de Benznidazol que fue de 94,66 %. (Ver Fig. 8 y Tabla 4). Estos compuestos mostraron además una inhibición dosis dependiente de la proliferación del parásito, estimándose sus IC₅₀, la concentración

del compuesto requerido para inhibir en un 50 % la población parasitaria *in vitro*. Así, fue estimado para el DM117 un IC_{50} de $5,25 \pm 1,03 \mu M$ (Ver Fig. 9 y 10), para el DM191 un IC_{50} de $6,25 \pm 1,04 \mu M$ (Ver Fig. 11 y 12) y para el DM231 un IC_{50} de $7,85 \pm 1,02 \mu M$ (Ver Fig. 13 y 14). Resultados similares fueron obtenidos por Fonseca-Berzal y col., en el 2013 quienes también utilizando epimastigotes de *T. cruzi* estimaron valores de IC_{50} entre 4 y 9 μM para otras tetrahydroquinolinas sustituidas de la serie DM (DM1, DM5, DM6, DM7, DM8, DM9, DM12 y DM15), siendo el IC_{50} del compuesto DM6 el más elevado (8,29 μM) y el del compuesto DM15 (4,38 μM), el más bajo.

Asimismo, en este trabajo, el IC_{50} estimado del Benznidazol fue de $2,45 \pm 1,02 \mu M$ (Ver Fig. 15 y 16). Es importante resaltar que con esta droga en epimastigotes de *T. cruzi*, los IC_{50} más bajos reportados en la literatura se encuentran entre los 5 μM y 7 μM (Moreno y col., 2010 y Lechuga y col, 2016). Se ha reportado que la efectividad del Benznidazol puede variar según el área geográfica, debido a una susceptibilidad diferencial de las distintas cepas existentes de *T. cruzi* (Pinazo y col., 2010) y por las condiciones específicas del experimento (Neubig y col., 2003). Estos resultados tomados en conjunto podrían sugerir que las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191 y DM231 tienen una importante actividad antiproliferativa en epimastigotes de *T. cruzi* afectando la proliferación de estos parásitos de una manera similar a la droga de referencia Benznidazol, actualmente utilizada para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas.

Es importante resaltar, que la limitada eficacia mostrada por la droga antichagásica benznidazol en la fase crónica de la enfermedad y la severidad de los síntomas asociados a esta fase de la infección, amerita la necesidad de encontrar moléculas activas contra el estadio intracelular, amastigote, de *T. cruzi*. Los estudios realizados en este trabajo únicamente fueron sobre el estadio epimastigote, quedando por estudiar si las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191 y DM231,

que mostraron un importante efecto sobre la proliferación de los epimastigotes sean también activas como tripanocidas en el estadio intracelular de este parásito.

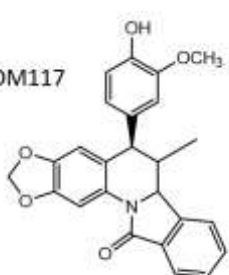
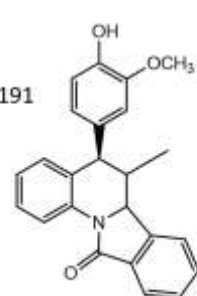
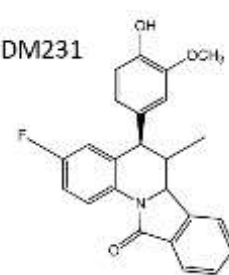
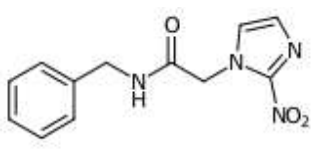
La efectividad de muchas familias de tetrahydroquinolinas sustituidas han sido ensayadas en *T. cruzi* demostrándose una importante actividad tripanocida de algunas de ellas en este parásito. Los efectos observados han llevado a que algunos autores sugirieran una relación entre la actividad tripanocida y citotóxica de los compuestos y su estructura química. Fonseca-Berzal y col en el 2013, reportaron que sustituyentes de grupos alquilo, nitro o metoxi ($R-NO_2$ / $O-CH_3$) en la posición 6 de los anillos de las tetrahydroquinolinas tienen una importante influencia sobre los efectos tripanocidas haciendo más activo a los compuestos. Asimismo, sustituciones de especies sustractoras de electrones también resultan favorables para la actividad tripanocida del compuesto como los grupos como el cianuro ($R-CN$) (Fonseca-Berzal y col., 2013) y ciertos halógenos en el esqueleto de la tetrahydroquinolina, tienen un impacto positivo en la muerte del parásito (Fakhfakh y col., 2003). Por otra parte, sustituciones con grupos aminos ($R-NH_2$) o $-Cl$ pueden generar efectos citotóxicos en humanos, reportándose efectos tóxicos en fibroblastos. La presencia de hidroxilos en los anillos fenólicos también influye de manera negativa sobre las células hospedadoras.

En este trabajo también intentamos relacionar la estructura de las tres tetrahydroquinolinas estudiadas (DM117, DM191 y DM231) y sus efectos antiproliferativos observados en epimastigotes de *T. cruzi*. Es importante mencionar que el compuesto o molécula base, el DM191, el cual no presenta ninguna sustitución tuvo un importante efecto antiproliferativo en epimastigotes de *T. cruzi*. Ninguna de las tetrahydroquinolinas ensayadas presentan sustituciones metílicas o sustituciones con $R-NO_2$ a excepción de la droga de referencia Benznidazol, que pudieran explicar su importante efecto antiproliferativo en el parásito, sin embargo presentan amidas cíclicas que hacen a la molécula electroattractora. En el caso del DM231, éste presenta una sustitución con flúor ($-F$) que se ha

reportado incrementa la actividad tripanocida pudiendo ser este halógeno el responsable del efecto antiproliferativo observado. Por su parte, el DM117 presenta grupos éteres cíclicos en su estructura que pudieran estar incrementado de manera positiva el efecto observado en los epimastigotes de *T. cruzi* (Ver Tabla 6).

Adicionalmente, es importante resaltar que las tres tetrahydroquinolinas de la serie DM evaluadas en este trabajo no mostraron ser tóxicas en fibroblastos, según resultados obtenidos en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela (Ver Tabla 6) no observándose actividad aún a concentraciones de 100 µg/ml. Los fibroblastos son células presentes en el tejido conjuntivo y se presume son las primeras en ser infectadas una vez el parásito ingresa al hospedador (Lieke y col., 2006), ya que se ha sugerido que al igual que sucede en macrófagos, el parásito puede invadir las células somáticas no inmunocompetentes del hospedero susceptible tales como los fibroblastos de la piel y sobrevivir de manera más efectiva en virtud de un medio ambiente interno menos hostil (Hervás-Rodríguez y col., 1996).

Tabla 6: Relación estructura, IC₅₀ sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* y actividad en fibroblastos.

Estructura Compuesto	IC ₅₀ sobre la proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	Actividad sobre Fibroblastos
DM117 	5,25 ± 1,03 μM	Sin actividad (a 100 μg/ml)
DM191 	6,25 ± 1,04 μM	Sin actividad (a 100 μg/ml)
DM231 	7,85 ± 1,02 μM	Sin actividad (a 100 μg/ml)
 Benznidazol	2,45 ± 1,02 μM	Con actividad A 256 μM (Fonseca-Berzal y col., 2013) A 2000 μM (Da Silva-Melo y col., 2000)

Tomando en cuenta esto y nuestros resultados sobre los efectos antiproliferativos de estos compuestos podemos sugerir que estas tres tetrahydroquinolinas pudieran tener una actividad tripanocida prometedora con baja citotoxicidad en células humanas bajo condiciones *in vitro*, sugiriendo a estos compuestos como posibles moléculas a partir de las cuales se podrían diseñar drogas antichagásicas. Sin embargo, para complementar estos resultados es necesario, realizar estudios *in vivo* con respecto a su capacidad de curar lesiones en ratones infectados con *T. cruzi*.

El mecanismo de acción de las tetrahydroquinolinas no ha sido aún reportado. Dado el interesante efecto antiproliferativo observado de las tetrahydroquinolinas DM117, DM191 y DM231 fue de nuestro interés en este trabajo, tratar de establecer un posible mecanismo de acción. Desde los años 80 se han estado realizando estudios de diversas drogas y fármacos con actividad tripanocida sobre la homeostasis intracelular de Ca^{2+} en los tripanosomatidios. En este sentido, es bien conocido, que una alteración en la homeostasis de Ca^{2+} puede ser letal para el parásito (Benaïm y col., 2014) y por lo tanto los sistemas reguladores de Ca^{2+} encontrados en el mitocondrion, el retículo, los acidocalcisomas y la membrana plasmática de los mismos han sido considerados posibles blancos de la acción terapéutica de drogas (Benaïm y García, 2011). Se han reportado que drogas como: el cristal violeta (Benaïm y col., 1993), la pentamidina (Benaïm y García, 2011), la amiodarona y dronedarona (Benaïm y col., 2012) y la mitelfosina (Benaïm y col., 2014), tienen un importante efecto tripanocida y leishmanicida relacionados con alteraciones de la homeostasis de Ca^{2+} en el parásito, ya que estos compuestos afectaron el funcionamiento de distintos sistemas reguladores de Ca^{2+} en los mismos. Unos de los sistemas reguladores más importantes de Ca^{2+} es la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA), pues ésta es la principal estructura encargada del control fino y mantenimiento de los niveles basales de calcio en tripanosomatidios y humanos, es por ello que esta enzima ha sido considerada como un potencial blanco de acción de compuestos que pudieran ser explotados con fines terapéuticos (Cervino y Benaïm, 2014).

Tomando en cuenta lo anterior, en este trabajo evaluamos el efecto de las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191 y DM231 y de la droga de referencia Benznidazol sobre la actividad de la PMCA de epimastigotes de *T. cruzi* y la misma enzima de eritrocitos humanos. Los resultados mostraron que dos de las tetrahydroquinolinas, DM191 y DM231 tuvieron un significativo efecto inhibitorio sobre la actividad de hidrólisis de ATP de la PMCA de epimastigotes de *T. cruzi*, observándose un porcentaje de inhibición de 55,22 % y 58,55 %, respectivamente, sobre la actividad basal de esta enzima en ausencia de los compuestos (Fig. 17). Asimismo, el Benznidazol, también mostró un efecto inhibitorio sobre esta enzima, aunque en un menor grado (26,65 %) que el observado con ambas tetrahydroquinolinas (Fig. 17). Por su parte, el compuesto DM117 no mostró ningún efecto sobre la actividad de la PMCA de *T. cruzi*. Estos resultados sugieren que las tetrahydroquinolinas DM191 y DM231 tienen un efecto sobre la PMCA de estos parásitos y que esta enzima pudiera ser uno de los posibles blancos de acción de estos compuestos. Asimismo, el Benznidazol aunque menos marcado también podría tener como blanco a esta enzima. Es importante resaltar que, este es el primer aporte sobre el estudio donde se relaciona el efecto tripanocida de la droga actualmente utilizada para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, con la homeostasis de Ca^{2+} en *T. cruzi*.

Para que la PMCA pueda ser considerada un posible blanco de acción de estos compuestos, es necesario observar si los mismos tienen algún efecto sobre la enzima homóloga de su hospedador humano, ya que si este fuera el caso, no podrían ser utilizados con fines terapéuticos pues ocasionarían efectos secundarios en el hospedador. Como pudo ser observado, ninguno de estos compuestos tuvo efecto sobre la actividad de hidrólisis de ATP de la PMCA de eritrocitos humanos (Ver Fig. 18), apoyando así el hecho de que los DM191 y DM231, así como el Benznidazol podrían estar teniendo un efecto específico sobre la PMCA de *T. cruzi*. Es importante mencionar, que si bien ha sido reportado que la PMCA de tripanosomatidios y humanos son funcionalmente similares, estas enzimas presentan diferencias estructurales importantes que pudieran explicar el hecho de que no sean afectadas de igual

manera por los compuestos (Benaim y col., 2012). Apoyando esto, existen reportes sobre otros compuestos, como por ejemplo la amiodarona, una droga usada como antiarrítmico en humanos, la cual tiene un efecto tripanocida (Benaim y col., 2014) y leishmanicida (Serrano-Martín y col., 2009) que involucra la alteración de sistemas que regulan la homeostasis de Ca^{2+} en estos parásitos, la cual no presentan efectos importantes sobre la homeostasis de Ca^{2+} en células humanas. Un efecto inhibitorio de estos compuestos sobre la actividad de la PMCA de *T. cruzi*, la cual se encarga de sacar Ca^{2+} desde el citoplasma del parásito al medio extracelular para mantener los niveles basales de éste, afectaría la homeostasis de Ca^{2+} ya que éste permanecería elevado en el citoplasma del parásito, afectándose así procesos celulares que pudieran conducir a la muerte de los mismos. Por esta razón, se propone a la Ca^{2+} -ATPasa de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* como posible blanco terapéutico para los DM191, DM231 y el Benznidazol y para el diseño de nuevos compuestos a estudiar en un futuro.

En este sentido, evaluamos también en este trabajo el efecto de las tetrahidroquinolinas DM117, DM191 y DM231, así como la de la droga de referencia Benznidazol sobre los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de *T. cruzi* mediante técnicas de fluorescencia. Los parásitos fueron cargados con Fura-2AM, fluoróforo específico para este catión y se observaron los cambios en la relación de fluorescencia 340/380 en el tiempo ocasionados por los compuestos. Tomando en cuenta la relación de proporcionalidad entre la relación 340/380 nm y el cálculo de la concentración de Ca^{2+} intracelular planteada en la ecuación de Grynkiewicz, el incremento en la relación 340/380 nm puede traducirse como un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} en el parásito. Utilizando esta aproximación calculamos la concentración intracelular basal de Ca^{2+} en epimastigotes de *T. cruzi*, la cual se mantuvo en un rango de 20-100 nM, compatibles con las concentraciones basales de Ca^{2+} reportadas en la literatura para diferentes tripanosomatidios (Docampo y Huang, 2015).

Como pudo observarse en los resultados, los compuestos DM117 y DM191, indujeron un incremento rápido y de gran magnitud en la relación de fluorescencia a 340/380 nm a

concentraciones de 5 μM y 6 μM respectivamente, concentraciones cercanas al IC_{50} estimado para cada uno de estos compuestos (Fig. 19 y 20). Por otra parte, el compuesto DM231 no afectó el nivel intracelular de Ca^{2+} en *T. cruzi* a concentraciones cercanas al IC_{50} estimado y hasta 60 μM , concentración en la cual apenas se observó un pequeño incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} (Fig. 21). Adicionalmente, una vez alcanzada la máxima concentración de Ca^{2+} en el interior de la célula, se observaron diferencias en la recuperación de los niveles basales de Ca^{2+} , encontrándose que en el caso del compuesto DM117, ocurría una rápida recuperación donde se alcanzaban niveles intracelulares de Ca^{2+} cercanos al basal, lo cual no ocurrió con las tetrahydroquinolinas DM191 y DM231 donde no se observa tal recuperación y el Ca^{2+} permanece elevado en el citoplasma del parásito. Es importante resaltar, que una vez incrementados los niveles intracelulares de Ca^{2+} en respuesta a alguna señal, la célula recupera sus niveles basales de Ca^{2+} gracias a la acción combinada de diferentes sistemas transportadores tales como el uniporte de Ca^{2+} mitocondrial y la Ca^{2+} -ATPasa del retículo endo(sarco)plasmático (SERCA), los cuales introducen el Ca^{2+} desde el citoplasma hacia el interior de la mitocondria y el retículo endoplasmático respectivamente. Adicionalmente, la PMCA realiza la regulación fina regresando el Ca^{2+} a sus niveles basales. Si tomamos en cuenta los resultados observados sobre el efecto de estos compuestos sobre la PMCA de *T. cruzi*, donde los compuestos DM191 y DM231 inhibieron la actividad de esta enzima y el DM117 no la inhibió (Fig. 17), es posible que la recuperación de los niveles basales de Ca^{2+} observada con el compuesto DM117 pueda ser explicada en parte, por el hecho de que este compuesto no afectara el funcionamiento de la PMCA en el parásito.

Estos estudios fueron realizados también con la droga de referencia Benznidazol, encontrándose que esta droga tuvo un efecto muy similar al obtenido con el compuesto DM191, un rápido incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular donde no se observa recuperación y los niveles de Ca^{2+} se mantienen elevados en el citoplasma del parásito. Sin embargo, a diferencia de la

tetrahidroquinolina DM191, el efecto de esta droga, sólo fue observado a partir de una concentración de 15 μM Benznidazol, no mostrando efecto a concentraciones cercanas al IC_{50} estimado sobre la proliferación de *T. cruzi* (Fig. 22). Todas las respuestas obtenidas con las tetrahidroquinolinas DM117, DM191, DM231 y el Benznidazol fueron similares cuando los experimentos se hicieron en ausencia (EGTA) o en presencia de Ca^{2+} extracelular, lo cual indicó que el incremento en los niveles intracelulares de Ca^{2+} inducidos por estas tetrahidroquinolinas en los epimastigotes de *T. cruzi*, viene dado por la liberación de este ion desde organelos intracelulares y no debido a la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular (Benaim y col., 2006).

Con el objeto de profundizar y caracterizar el efecto de estos compuestos sobre la homeóstasis de Ca^{2+} en los epimastigotes de *T. cruzi*, quisimos estudiar cuales compartimientos pudieran estar involucrados en el incremento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} observados en estos parásitos. Para ello, se evaluó el efecto de las tetrahidroquinolinas y el Benznidazol sobre el potencial electroquímico mitocondrial y el grado de alcalinización de los acidocalcisomas como organelos claves en la regulación de Ca^{2+} en *T. cruzi* (Benaim y García, 2011). En este sentido, diferentes autores han demostrado que otros compuestos de origen vegetal como los flavonoides (De Gouveia, 2016) y ciertas quinolinas sustituidas (Torrealba, 2015; Mejías, 2015; Bompert y col., 2013) inducen el aumento del calcio intracelular en tripanosomatidios y que dicho incremento es debido a la salida de Ca^{2+} desde compartimientos intracelulares como el mitocondrion y los acidocalcisomas.

Como pudo observarse, las tetrahidroquinolinas DM191, DM231 y el Benznidazol disipan el potencial electroquímico mitocondrial, generándose la liberación de la rodamina 123 acumulada en la mitocondria con el subsecuente aumento de la fluorescencia a 530 nm. Sin embargo, se observó que sólo el compuesto DM191 afectó el potencial de membrana mitocondrial a concentraciones cercanas a su IC_{50} estimado (6 μM), mientras que el Benznidazol y el DM231 disiparon el gradiente a concentraciones mayores, 15 μM y 60 μM respectivamente (Figuras 24, 25 y 26). Sin embargo, se

pudo observar que estos compuestos no producen la disipación total del potencial mitocondrial ya que la adición posterior de FCCP genera un mayor y rápido incremento de la fluorescencia. En los experimentos controles, donde se colocó primero el FCCP, un protonóforo desacoplante de la cadena transportadora de electrones que afecta el potencial de membrana mitocondrial, se observó que el FCCP incrementa la fluorescencia en una proporción mayor a la observada con los compuestos, pero no disipó totalmente el potencial mitocondrial pues la adición posterior de los DM191, DM231 y el Benznidazol generaron un efecto adicional sobre el potencial mitocondrial. Esta respuesta observada por los compuestos estudiados, después de la adición del FCCP es interesante, pues ha sido reportado que el FCCP es un agente que causa la disipación total del potencial electroquímico mitocondrial (Benaïm y col., 2012). Sin embargo, resultados similares fueron obtenidos con el uso de otras drogas como amiodarona y dronedarona sobre *T. cruzi*, sugiriéndose que éstos podrían deberse a la acción de la droga sobre algún otro compartimiento diferente a la mitocondria, que pudiera estar acumulando pequeñas cantidades de rodamina 123 o también a que como fueron utilizados parásitos intactos, su membrana plasmática pudiera haber restringido la entrada del FCCP y la concentración de éste en el parásito no es la óptima, limitando su acción (Benaïm y col., 2012).

Finalmente, es importante mencionar que el compuesto DM117 no mostró ningún efecto sobre la disipación del gradiente electroquímico mitocondrial hasta una concentración de 15 μM (Ver Fig. 23). Los tripanosomatidios presentan una mitocondria única, la cual en su membrana interna posee un sistema de transporte de Ca^{2+} electroforético unidireccional, el cual utiliza como fuerza motora la diferencia de potencial electroquímico generado por el gradiente de protones. Este mecanismo es capaz de acumular grandes concentraciones de Ca^{2+} dentro de la mitocondria. Si ocurre una perturbación de este gradiente, el Ca^{2+} es liberado hacia el citoplasma. Así, un cambio en el potencial de la membrana mitocondrial implicaría el desacoplamiento de este gradiente y por lo tanto una alteración de la homeostasis intracelular de Ca^{2+} al liberarse éste hacia el citoplasma.

Asimismo, en este trabajo pudimos ensayar el efecto de las tetrahydroquinolinas DM117, DM191, DM231 y el Benznidazol sobre la alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de *T. cruzi*, compartimentos ácidos ricos en pirofosfatos y polifosfatos, los cuales son capaces de acumular grandes cantidades de Ca^{2+} y mantener el pH interno del parásito por la acción de una H^+ -ATPasa vacuolar (Docampo y Moreno, 2001; Docampo, 2015). Para ello, se observó si estos compuestos inducían un incremento en la fluorescencia de los parásitos cargados con naranja de acridina. Este fluoróforo, se acumula en los acidocalcisomas y cuando éstos son alcalinizados, es liberado incrementando su fluorescencia. (Docampo y col, 1995). Todos los compuestos ensayados produjeron la alcalinización de los acidocalcisomas con la consecuente liberación de naranja de acridina. Sin embargo, se observaron algunas diferencias tales como: los compuestos DM117 y DM191 produjeron la liberación rápida de la naranja de acridina a una concentración de 5 μM y 6 μM respectivamente (Figuras 27 y 28). Sin embargo, el efecto fue mucho mayor con el compuesto DM117 que con el DM191 (Figuras 27 y 28). Por su parte, el DM231 y el Benznidazol también produjeron la liberación de naranja de acridina a concentraciones de 60 μM y 15 μM respectivamente. Sin embargo, estos compuestos indujeron una alcalinización más lenta de los acidocalcisomas (Figuras 29 y 30).

Es importante resaltar, que ningunos de los compuestos a las concentraciones empleadas produjeron la alcalinización total de los acidocalcisomas ya que la adición posterior de nigericina, un intercambiador H^+/K^+ utilizado como control en estos ensayos, produce una alcalinización adicional. Experimentos controles donde se añadió primero nigericina, mostraron que este intercambiador producía una importante y rápida alcalinización en todos los casos. Sin embargo, esa alcalinización no fue total, dado a que la adición posterior de los DM117, DM191, DM231 y el Benznidazol indujeron una pequeña alcalinización adicional. Este efecto sugiere que estos compuestos pudieran estar actuando sobre otros organelos ácidos, tales como vacuolas o lisosomas, donde se haya compartimentalizado la naranja de acridina, tal como ha sido reportado para otros compuestos en

este mismo parásito (Benaim y col., 2012). Resalta el hecho que el compuesto DM117 induce la alcalinización casi total de los acidocalcisosmas presentando un mayor efecto que los demás compuestos evaluados anteriormente (Fig. 26). Los acidocalcisosmas acumulan Ca^{2+} por medio de la actividad de una $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -ATPasa, si el gradiente de H^{+} es alterado, el Ca^{2+} de este compartimiento también será liberado hacia el citoplasma afectando así la homeostasis intracelular de Ca^{2+} en el parásito.

Tabla 7: Tabla Resumen de la actividad de los compuestos sobre la proliferación y sistemas reguladores de calcio de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y la PMCA de eritrocitos humanos.

COMPUESTO	INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACIÓN (%)		EFECTO PMCA DE HUMANOS	EFECTO PMCA DE PARÁSITOS	EFECTO CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE CALCIO	EFECTO UNIORTE MITOCONDRIAL	EFECTO $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -ATPasa DE ACIDOCALCISOMAS
	15 μM	30 μM					
DM117	64,92	74,14	Sin efecto	Sin efecto	Incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (cambio transitorio)	Sin efecto	Lo interrumpe
DM191	76,93	92,02	Sin efecto	La inhibe	Incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (cambio no transitorio)	Lo interrumpe	Lo interrumpe
DM231	70,11	81,55	Sin efecto	La inhibe	Incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (cambio no transitorio)	Lo interrumpe	Lo interrumpe
Benznidazol	87,78	94,66	Sin efecto	La inhibe	Incrementa la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (cambio no transitorio)	Lo interrumpe	Lo interrumpe

Englobando todos los resultados obtenidos, es posible mencionar que una vez dentro del parásito, los compuestos estudiados indujeron un incremento del calcio intracelular producido por la salida de iones calcio acumulados en compartimentos celulares, ya que un cambio en las propiedades de los organelos como, el colapso del potencial mitocondrial y la alcalinización de los acidocalcisosmas,

indujeron la salida de calcio hacia el citosol (Ríos, 2010). Este cambio en la concentración intracelular de calcio debería ser transitorio ya que eventualmente los mecanismos de regulación del calcio se encargarían de retornar la concentración a sus niveles basales dentro del parásito. Sin embargo, para el Benznidazol, el DM191 y el DM231, no se observó la recuperación de los niveles basales de Ca^{2+} sino que el incremento generado por estos compuestos fue mantenido en el tiempo. Esto pudiera ser debido a la inhibición inducida por este compuesto sobre la PMCA de *T. cruzi*, que conllevaría a que el movimiento del calcio hacia el exterior celular esté reducido. Esto, unido al hecho de que estos compuestos afectaron el mitocondrion y los acidocalcisomas, y en consecuencia el funcionamiento del uniporte electroforético mitocondrial y la $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -ATPasa de los acidocalcisomas, sistemas encargados de introducir Ca^{2+} hacia la mitocondria y acidocalcisomas respectivamente, se traduce en el incremento mantenido en el tiempo de los niveles intracelulares elevados de Ca^{2+} , alterándose así la homeostasis de este catión y afectándose la viabilidad del parásito. Es importante resaltar que el compuesto DM117, al ingresar al parásito induce una elevación abrupta de los niveles citosólicos del calcio mucho mayor que el observado con los compuestos anteriores. Sin embargo, este compuesto no afectó el transporte de Ca^{2+} mitocondrial y no tuvo efecto sobre la PMCA, lo que explicaría que en este caso, los niveles citoplasmáticos de Ca^{2+} pudieran regresar a los niveles basales en el parásito, manteniéndose su homeóstasis. Esto pudiera coincidir con el hecho de que el compuesto DM117 fuera el que mostrara un menor efecto antiproliferativo de los epimastigotes de *T. cruzi* (Ver Tabla 7).

Para finalizar, estos resultados permiten sugerir a los sistemas transportadores de Ca^{2+} como posibles blanco de la acción de drogas y compuestos a ser utilizados como agentes terapéuticos en *T. cruzi*. Asimismo, se puede sugerir que las tetrahidroquinolinas DM117, DM191 y DM231 pudieran ser utilizadas como prototipos potenciales para el desarrollo de drogas antichagásicas o para estudios de terapias combinadas con otras drogas como por ejemplo el Benznidazol, con la finalidad de

minimizar los efectos secundarios de las drogas actualmente utilizadas. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales en amastigotes y en modelos *in vivo* de la enfermedad de Chagas.

8. CONCLUSIONES

- Las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191 y DM231 ejercen una interesante actividad antiproliferativa en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, comparable a la encontrada con la droga de referencia Benznidazol.
- Las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191 y DM231 ejercen un efecto inhibitorio dosis dependiente en la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* con un IC_{50} de $5,25 \pm 1,03 \mu M$; $6,25 \pm 1,04 \mu M$ y $7,85 \pm 1,02 \mu M$, respectivamente.
- La Droga de referencia Benznidazol muestra una actividad antiproliferativa dosis dependiente de los epimastigotes de *T. cruzi* con un IC_{50} de $2,45 \pm 1,02 \mu M$.
- Las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191, DM231 y el Benznidazol incrementaron los niveles intracelulares de Ca^{2+} en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, mediante la liberación de Ca^{2+} desde reservorios intracelulares.
- Las tetrahydroquinolinas sustituidas DM191 y DM231 y la droga de referencia Benznidazol, inducen el colapso del potencial mitocondrial de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
- Las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191, DM231 y la droga de referencia Benznidazol, inducen la alcalinización de los acidocalcisomas de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
- Las tetrahydroquinolinas sustituidas DM191, DM231 y el Benznidazol inhibieron la actividad de la PMCA de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

- Las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191, DM231 y el Benznidazol no afectaron la actividad de la PMCA de eritrocitos humanos.
- Las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191, DM231 y el Benznidazol afectaron la homeostasis intracelular de calcio en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, proponiéndose los sistemas transportadores de Ca^{2+} como posibles blancos de la acción de estos compuestos.
- Las tetrahydroquinolinas sustituidas DM117, DM191 y DM231 pudieran ser utilizadas como prototipos potenciales para el desarrollo de drogas antichagásicas o para estudios de terapias combinadas con otras drogas con la finalidad de minimizar los efectos secundarios de las drogas actualmente utilizadas.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Cañavate, C. y colaboradores. 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev.* **21(2)**: 334-359.
- Apt, W., Zulantay, I. 2011. Estado actual en el tratamiento de la Enfermedad de Chagas. *Rev Med Chile* **139(2)**: 247-257.
- Armada, F., Hernández, T., Toro, J., Flores, O. 2014. Guía para el diagnóstico, atención y manejo clínico de la Enfermedad de Chagas en Venezuela. Ministerio para el Poder Popular para la Salud, Venezuela, **40335**: 1-71.
- Añez, N., Atencio, R., Rivero, Z., Bracho, A., Rojas, A., Romero, M., Crisante, G. 2011. Chagas disease inapparent infection in asymptomatic individuals from a Yukpa ethnic community in western Venezuela. *Bol. Malaritol. San. Amb.* **51(2)**: 167- 175.
- Azeredo, C., Soares, M. 2013. Combination of the essential oil constituents' citral, eugenol and thymol enhance their inhibitory effect on *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma cruzi* growth. *Rev. Bras. Farmacogn.* **23(5)**: 762-768.
- Bedoya, L., Abad, M., Calonge, E., Saavedra, L., Gutierrez, M., Kouznetsov, V., Alcami, J. y colaboradores. 2010. Quinoline-based compounds as modulators of HIV transcription through NF- κ B and Sp1 inhibition. *Antiviral Res.* **87(3)**: 338-344.
- Benaim, G., Garcia, C.R.S. 2011. Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishmaniasis -a review. *Trop. Biomed.* **28(3)**: 471– 481.
- Benaim, G., Paniz-Mondolfi, A. 2012. The emerging role of amiodarone and dronedarone in Chagas disease. *E. Nat. Rev. Cardiol.* **9(10)**: 605–609.
- Benaim, G., Romero, P. 1990. A Calcium Pump in Plasma Membrane Vesicles from *Leishmania braziliensis*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1027(1)**: 79-84.
- Benaim, G., Hernández, V., Casano, P., Parra, N., Suarez, A. 2014. La amiodarona y la dronedarona, antiarrítmicos de amplio uso y su utilización potencial contra el mal de Chagas y la leishmaniasis. *Memorias del Instituto de Biología Experimental* **7**: 13-16.
- Benaim, G., Hernández-Rodríguez, V., Mujica-González, S., Plaza-Rojas, L., Silva, M., Parra-Gimenez, N. García-Marchan, Y, Paniz-Mandolfi, A., Uzcanga, G. 2012. *In vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of dronedarone, a novel amiodarone derivative with an improved safety profile. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56(7)**: 3720-3725.

- Benaim, G., Lopez-Estraño, C.; Docampo, R, Moreno, S. 1993. "A calmodulin-stimulated Ca^{2+} pump in plasma-membrane vesicle from *Trypanosoma brucei*, selective inhibition by pentamidine". *Biochem J.* **296**: 759-763.
- Benaim, G., Losada, S., Gadelha, F., Docampo, R. 1991. A calmodulin-activated $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ -ATPase is involved in Ca^{2+} transport by plasma membrane vesicles from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* **280(Pt-3)**: 715 – 720.
- Benaim, G., Sanders, J., García-Marchán, Y., Colina, C., Lira, R., Caldera, A., Payares, G., Sanoja, C., Burgos, J., Leon-Rossell, A., Concepcion, J., Schijman, A., Levin, M., Oldfield, E., Urbina, J. 2006. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J. Med. Chem.* **49(3)**: 892-899.
- Bensadoun, A., Weinstein, D. 1976. Assay of Proteins in the Presence of Interfering Materials. *Anal. Biochem.* **70(1)**: 241-250.
- Berman, J. 2005. Miltefosine to treat leishmaniasis. *Expert Opin. Pharmacother.* **6(8)**: 1381–1388.
- Bern, C. 2011. Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas's Disease. *N. Engl. J. Med.* **364(26)**: 2527–2534.
- Berridge, M., Lipp, P., Bootman, M. 2000. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1(1)**: 11–21.
- Berrizbeitia, M., Aguilera, G., Ward, B., Rodríguez, J., Jorquera, A., Ndao, M. 2012. Seroprevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en la población rural de Miraflores, estado Lara. Estabilidad y diferencia de reactividad de epimastigotes fijados. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* **30(10)**:55-60.
- Bompart, D., Núñez-Durán, J., Rodríguez, D., Kouznetsov, W., Meléndez-Gómez, C.M., Sojo, F. y colaboradores. 2013. Anti-leishmanial evaluation of C2-aryl quinolines: mechanistic insight on bioenergetics and sterol biosynthetic pathway of *Leishmania braziliensis*. *Bioorg Med Chem.* **21(14)**: 4426-4431.
- Bonney, K. y Engman, D. 2015. Autoimmune Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *Am. J. Pathol.* **185(6)**: 1537-1547.
- Brini, M., Calì, T., Ottolini, D., Carafoli, E. 2012. Calcium Pumps: Why so many?. *Comprehensive Physiology* **2(2)**: 1045 – 1060.
- Carafoli, E., Krebs, J. 2016. Why Calcium? How Calcium became the best Communicator. *J. Biol. Chem.* **291**: 20849–20857.

- Carrasco, H., Segovia, M., Llewellyn, M., Morocoima, A., Urdaneta-Morales, S. y colaboradores. 2012. Geographical Distribution of *Trypanosoma cruzi* Genotypes in Venezuela. *PLoS Negl Trop Dis*. **6(6):e1707**.
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. [en línea]. <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>. [Consulta: 17 de abril de 2017].
- Cervino, V. y Benaim, G. 2014. Importancia de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática en el mantenimiento de la homeostasis de Ca^{2+} en tripanosomatidios y como posible blanco de drogas. *Memorias del Instituto de Biología Experimental* **7**: 17-20.
- Cohen, E., Ramos, H., Gamargo, M., Urbina, J. 1986. The water and ionic permeability induced by Polyene antibiotics across plasma membrane vesicles from *Leishmania sp.* *Biochem. Biophys. Acta*. **260**: 57-65.
- Collado, D. 2014. Ampliación de química orgánica avanzada: química de heterociclos. Universidad de Málaga, España. [en línea]. http://riuma.uma.es/xmlui/bitstream/handle/10630/7487/Tema_6.Quinolina_e_isoquinolina.pdf?sequence=1. [Consulta: 15 de agosto de 2016].
- Da Silva-Melo, P., Durán, N., Haun, M. 2000. Cytotoxicity of prodigiosin and benznidazole on V79 cells. *Toxicol Lett*. **116(3)**: 237-242.
- De Gouveia, Y. 2016. 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*. *Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela*.
- Di Pietro, O., Vicente-García, E., Taylor, M., Berenguer, D., Viayna, E., Lnazoni, A., Sola, I., Sayago, H., Riera, C., Fisa, R., Clos, M., Pérez, B., Kelly, J., Lavilla, R., Muñoz-Torrero. 2015. Multicomponent reaction-based synthesis and biological evaluation of tricyclic heterofused quinolines with multi-trypanosomatid activity. *Eur. J. Med. Chem.* **105**: 120–137.
- D'hondt, J., Van Meirvenne, N., Moens, L., Kondo, M. 1979. Ca^{2+} is an essential cofactor for trypanocidal activity of normal serum. *Nature* **282(5739)**: 613-615.
- Docampo, R. 1993. Calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi*. *Biol Res*. **26(1-2)**: 189-196.
- Docampo, R., Huang, G. 2015. Calcium signaling in trypanosomatid parasites. *Cell. Calcium* **57(3)**: 194–202.
- Docampo, R. y Moreno, S.N. 2001. The acidocalcisome. *Mol Biochem Parasitol.* **114(2)**:151-159.
- Docampo, R., Scott, D., Vercesi, A., Moreno, S.N.J. 1995. Intracellular Ca^{2+} storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.* **310(Pt-3)**:1005–1012.

- Duschak, V., Couto, A. 2007. An insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. *Recent. Pat. Antiinfect. Drug Discov.* **2(1)**: 19-51.
- Fabiato, A., Fabiato, F. 1979. Calculator Programs for Computing the Composition of the Solutions Containing Multiple Metals and Ligands Used for Experiments in Skinned Muscle Cells. *J. Physiol.* **75(5)**: 463-505.
- Fakhfakh, M.A., Fournet, A., Prina, E., Mouscadet, J.F., Franck, X., Hocquemiller, R., Figadere, B., 2003. Synthesis and biological evaluation of substituted quinolines: potential treatment of protozoal and retroviral co-infections. *Bioorg Med Chem.* **11(23)**: 5013-5023.
- Fiske, C., Subbarow, Y. 1925. The Colorimetric Determination of Phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**: 375-400.
- Field, M.C., Horn, D., Fairlamb, A.H., Ferguson, M.A., Gray, D.W. y colaboradores. 2017. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. *Nat Rev Microbiol.* **15(4)**: 217-231.
- Fonseca-Berzal, C., Merchán, D., Romero-Bohórquez, A., Escario, J., Kouznetsov, V., Gómez-Barrio, A. 2013. Selective activity of 2,4-diaryl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and amastigotes expressing β -galactosidase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23(17)**: 4851–4856.
- Fournet, A., Barrios, A.A., Munoz, V., Hocquemiller, R., Cave, A., Bruneton, J. 1993. 2-substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37(4)**: 859–863.
- Franck, X., Fournet, A., Prina, E., Mahieux, R., Hocquemiller, R., Figadere, B., 2004. Biological evaluation of substituted quinolines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14(14)**: 3635–3638.
- Gállego, J. 2007. Manual de Parasitología: Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. Publicacions I Edicions, Volumen 31, Barcelona, España.
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescent properties. *J. Biol. Chem.* **260(6)**: 3440-3450.
- Hernández-Chinea, C., Carbajo, E., Sojo, F., Arvelo, F., Kouznetsov, V., Romero-Bohórquez, A., Romero, P. 2015. *In vitro* activity of synthetic tetrahydroindeno[2,1-c]quinolines on *Leishmania mexicana*. *Parasitol. Int.* **64(6)**: 479–483.
- Hervás-Rodríguez, J., Mozos, E., Méndez, A., Pérez J., Gómez-Villamandos, J.C. 1996. Leishmania infection of canine skin fibroblasts *in vivo*. *Vet. Pathol.* **33(4)**: 469-473.

- Hyldgaard, M., Mygind T., Piotrowska, R., Foss, M., Meyer, R. 2015. Isoeugenol has a non-disruptive detergent-like mechanism of action. *Front Microbiol.* **6(754)**: 1-14.
- Jonson, L.V., Walsh, M. L., Chen, L. B. 1980. Localization in mitochondria en living cells with rhodamine 123. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**: 990-994
- Kouznetsov, V., Merchán, D., Arvelo, F., Bello, J., Sojo, F., Muñoz, A. 2010. 4-Hydroxy-3-metoxypheyl substituted 3-methyl-tetrahydroquinoline derivatives obtained through imino Diels-Alder reactions as potential antitumoral agents. *Letters in Drug Design & Discovery* **7(9)**: 632-639.
- Lechuga, G., Borges, J., Calvet, C., De Araújo, H., Zuma, A. 2016. Interactions between 4-aminoquinoline and heme: Promising mechanism against *Trypanosoma cruzi*. *Int J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **6(3)**: 154-164.
- Lei, P., Zhang, X., Xu, Y., Xu, G., Liu, X., Yang, X., Zhang, X., Ling, Y. 2016. Synthesis and fungicidal activity of pyrazole derivatives containing 1,2,3,4-tetrahydroquinoline. *Chem. Cent. J.* **10(40)**: 1-6.
- Lieke, T., Steeg, C., Graefe S.E.B., Fleischer, B., Jacobs, T. 2006. Interaction of natural killer cells with *Trypanosoma cruzi*-infected fibroblasts. *Clin Exp Immunol.* **145(2)**: 357-364.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193(1)**: 265-275.
- Lugo, A., Fontelo, J., Jorquera, A., Guevara, P. 2007. Prevalencia de la infección por *T. cruzi* en el estado Delta Amacuro: Evaluación serológica y molecular durante el periodo junio-agosto 2006 en diferentes comunidades. FLAP (Federación Latinoamericana de Parasitología). Isla de Margarita, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **47(Supl.1)**:206.
- Luna, K., Hernández, I., Rueda, C., Zorro, M., Croft, S., Escobar, P. 2009. *In vitro* susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazol. *Biomédica.* **29(3)**: 448-455.
- Marella, A., Tanwar, O., Saha, R., Ali, M., Srivastava, S., Akhter, M., Shaquiquzzaman, M., Alam, M. 2013. Quinoline: A versatile heterocyclic. *Saudi Pharm. J.* **21(1)**: 1-12.
- Mayora, A., Rojas, H., Chirino P., Sojo F., Kouznetsov V., De Sanctis J., Arvelo, F., Benaim, G. 2014. Apoptosis por Tetrahydroquinolinas sustituidas en la línea de cáncer de próstata independiente de andrógenos pc-3. *Observador del conocimiento* **2(4)**.
- Mejías, F. 2015. Efecto del Nelfinavir en combinación con las 7-cloroquinolina-4-oxifenil sustituidas sobre *Leishmania mexicana*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

- Merchán, D. 2007. Eugenol, Precursor natural en la síntesis tetrahydroquinolina 2,4-diaryl sustituidas. Tesis de Licenciatura. Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga, Colombia.
- Mendoza, M., Mijares, A., Rojas, H., Ramos, M., DiPolo, R. 2001. *Trypanosoma evansi*: a convenient model for studying intracellular Ca^{2+} homeostasis using fluorometric ratio imaging from single parasites. *Exp Parasitol.* **99(4)**: 213-219.
- Monzote, L., Siddiq, A. 2011. Drug Development to protozoan diseases. *Open. Med. Chem. J.* **5**: 1-3.
- Morello, A., Lipchenca, I., Cassels, B., Speisky, H., Aldunate, J., Repetto, Y. 1994. Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids up on several strains of *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **107(3)**: 367-371.
- Moreno, M., D'Ávila, D., Silva, M., Galvão, L., Macedo, A. y colaboradores. 2010. *Trypanosoma cruzi* benznidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **105(7)**: 918-924.
- Muñoz-Calderón, A., Santaniello, A., Pereira, A., Yannuzzi, J., Díaz-Bello, Z., Alarcón de Noya, B. 2012. Susceptibilidad *in vitro* a Nifurtimox y Benznidazol de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de pacientes venezolanos con enfermedad de Chagas infectados por mecanismos de transmisión oral y vectorial. *Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.* **71(1)**: 14-22.
- Muñoz, A., Sojo, F., Merchán, D., Kouznetsov, V., Arvelo, F. 2010. Cytotoxic effects of new trans-2,4-diaryl-r-3-methyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines and their interaction with antitumoral drugs gemcitabine and paclitaxel on cellular lines of human breast cancer. *Chem. Bio. Interactions.* **189(3)**: 215-221.
- Muñoz, M., Peticara, M., Sojo, F., Merchán, D., Bello, J., Suarez, A., Benaim, G., Galindo, I., Compagnone, R., Kouznetsov V., Arvelo, F. 2012. Tetrahydroquinolinas: Compuestos de origen sintéticos con propiedades antitumorales sobre líneas de cáncer humano. *Memorias del Instituto de Biología Experimental* **6**: 77-80.
- Murcia, L., Carrilero, B., Ferrer, F., Roig, M., Franco, F., Segovia, M. 2016. Success of benznidazole chemotherapy in chronic *Trypanosoma cruzi*-infected patients with a sustained negative PCR results. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **35(11)**: 1819-1827.
- Neubig, R.R., Spedding, M., Kenakin, T., Christopolous, A. 2003. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology. *Pharmacol Rev.* **55(4)**: 597-606.
- Niggli, V., Zurini, M., Carafoli, E. 1987. Purification, Reconstitution and Molecular Characterization of the Ca^{2+} Pump of Plasma Membranes. *Methods Enzimol.* **139**: 791-808.

- Noya-Alarcón, O., Botto, C., Alarcón de Noya, B., Ferrer, E., Viettri, M., Herrera, L. 2012. Primer registro de triatominos naturalmente infectados por *Trypanosoma cruzi* en el estado Bolívar, Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* **52(2)**:301-306.
- Organización Mundial de la Salud. 2016. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) [en línea]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>. [Consulta: 9 de agosto de 2016].
- Organización Mundial de la Salud. 2010. Global distribution of cases of Chagas disease, based on official estimates, 2006–2010. [en línea]. http://www.who.int/chagas/Global_distribution_Chagas_disease_2006_2010.pdf?ua=1. [Consulta: 17 de abril de 2017].
- Oyetayo, O., Rogers, C., Hofmann, P. 2010. Dronedarone: a new antiarrhythmic agent. *Pharmacotherapy* **30(9)**: 904–915.
- Pabón, J. 2014. Consulta Práctica: Parasitología Clínica. Medbook Panamericana, Primera Edición, Carabobo, Venezuela.
- Pedrique, M., de Castro N., Gutiérrez, S. 1999. Principios de enfermedad y epidemiología y mecanismos de patogenicidad microbiana. Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela, Venezuela. [en línea]. http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Tema_9_Patogenicidad.pdf. [Consulta: 11 de agosto de 2016].
- Pérez-Arellano, J., Hernández-Cabrera, M., Pisos-Álamo, E., Carranza-Rodríguez, C., Castillo-de-Vera, M., Aparicio-Azcárraga, P. 2007. Tratamiento de las enfermedades parasitarias (I): Protozoosis. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, **31(1)**: 1-16.
- Pimentel, A., Felibertt, P., Sojo, F., Colman, L., Mayora, M., Silva, M., Rojas, H., Dipolo, R., Suárez, A., Compagnone, R., Arvelo, F., Galindo-Castro, I., De Sanctis, J., Chirino, P., Benaim, G. 2012. The marine sponge toxin agelasine B increases the intracellular Ca^{2+} concentration and induces apoptosis in human breast cancer cells (MCF-7). *Cancer Chem. Pharmacol.* **69(1)**: 71-83.
- Pinazo, M., Espinosa, G., Gállego, M., López-Chejade, P., Urbina, J., Gascón, J. 2010. Successful treatment with posaconazole of a patient with chronic Chagas' disease and Systemic Lupus Erythematosus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **82(4)**: 583-587.
- Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E., Rizzuto, R. 2008. Calcium and apoptosis: ER – mitochondria Ca^{2+} transfer in the control of apoptosis. *Oncogene* **27(50)**: 6407– 6418.

- Rao, A., Zhang, Y.Q., Muend, S., Rao, R., 2010. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54(12)**: 5062–5069.
- Rashad, A., Jones, A., Avery, V., Baell, J., Keller, P. 2014. Facile synthesis and preliminary structure-activity analysis of new sulfonamides against *Trypanosoma brucei*. *ACS Med. Chem. Lett.* **5(5)**: 496-500.
- Rassi, A Jr., Rassi, A., Marin-Neto, J. Chagas disease. 2010. *Lancet* **375(9723)**: 1388–1402.
- Rey, L. 1991. Parásitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Americas e na Africa. Ed. Guanabara Koogan, Segunda Edición, Río de Janeiro, Brasil.
- Ríos, E. 2010. The cell boundary theorem: a simple law of the control of cytosolic calcium concentration. *J Physiol Sci.* **60(1)**: 81-84.
- Rodríguez-Bonfante, C., Amaro, A., García, M., Mejías, L., Guillen, P. y colaboradores. 2007. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en el municipio Andrés Bello Blanco, Lara, Venezuela: infestación triatomínica y seroprevalencia en humanos. *Cad. Saúde Pública.* **23(5)**:1133-1140.
- Romero-Bohórquez, A., Escobar P., Leal M., Kouznetsov, V. 2012. *In vitro* activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* parasites of 2, 4-diaryl 1, 2, 3, 4-tetrahydroquinoline derivatives. *Lett. Drug. Des. Discov.* **9(8)**: 802–808.
- Romaña, C., Emperaire, L., Jansen, A. 2003. Enfoques conceptuales y propuestas metodológicas para el estudio de las interacciones entre el medio ambiente y la salud: aplicación a un programa de investigación sobre la tripanosomiasis americana. *Cad. Saúde Pública*, **19(4)**: 945-953.
- Schwikkard, S. y Van Heerden, F. 2002. Antimalarial activity of plants metabolites (1990 to 2000). *Nat Prod Rep Articles.* **19(6)**:675-92
- Serrano-Martín, X., Payares, G., De Lucca, M., Martínez J.C., Mendoza-León, A., Benaim, G. 2009. Amiodarone and Miltefosine act synergistically against *Leishmania mexicana* and can induce parasitological cure in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* **53(12)**: 5108-5113.
- Sosa, S., Segura, E., Ruiz, A., Velazquez, E., Porcel, B., Yampotis, C. 1998. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **59(4)**: 526 – 529.
- Torrealba, C. 2015. Efecto de las 7-cloroquimilina -4-oxifenil sustituidas sobre *Leishmania mexicana*. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

- Uchiyama, N. 2009. Antichagasic activities of natural products against *Trypanosoma cruzi*. *Health Sci.* **55(1)**: 31-39.
- Urbina, J., Vivas, J., Ramos, H., Larralde, G., Aguilar, Z., Avian, L. 1988. Alteration of lipids order profile and permeability of plasma membrane from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes grow in the presence of ketoconazole. *Mol. Biochem. Parasitol.* **30**: 185-196.
- Urbina, J. 2010. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop.* **115(1-2)**: 55-68.
- Van Voorhis, W., Rivas, K., Bendale, P., Nallan, L., Hornéy, Barrett, C., Bauer, K., Smart, B., Ankala, S., Hucke, O., Verlinde, C., Chakrabarti, D., Strickland, C., Yokoyama, K., Buckner, F., Hamilton, A., Williams, D., Lombardo, L., Floyd, D., Gelbd, M. 2007. Efficacy, pharmacokinetics, and metabolism of tetrahydroquinoline inhibitors of *Plasmodium falciparum* protein farnesyltransferase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51(10)**: 3659–3671.
- Velázquez-López, J., Hernández-Campos, A., Yépez-Mulia, L., Téllez-Valencia, A, Flores-Carrillo, P., Nieto-Meneses, R., Castillo, R. 2016. Synthesis and trypanocidal activity of novel benzimidazole derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **26(17)**: 4377-4381.
- Werbovetz, K. 2006. Diamidines as antitrypanosomal, antileishmanial and antimalarial agents. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* **7(2)**: 147-157.
- Wilkes, J. M., Mulugeta, W., Wells, C., Peregrine, A. S. 1997. Modulation of mitochondrial electrical potential: a candidate mechanism for drug resistance in African Trypanosomes. *Biochem. J.* **326**: 755-761.
- Wilkinson, S., Kelly, J. 2009. Trypanocidal drugs: Mechanisms, resistance and new targets. *Expert. Rev. Mol. Med.* **11(31)**: 1–24.
- Wilson, W., Tanious, F., Mathis, A., Tevis, D., Hall, J., Boykin, D. 2008. Antiparasitic compounds that target DNA. *Biochimie.* **90(7)**: 999 -1014.
- Worthen, C., Jensen, B., Parsons, M. 2010. Diverse Effects on Mitochondrial and Nuclear Functions Elicited by Drugs and Genetic Knockdowns in Bloodstream Stage *Trypanosoma brucei*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4(5)**: 1-13.