



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA**

**FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

Efecto de un derivado del benzofurano basado
en la estructura de la amiodarona sobre
Leishmania donovani.

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Bachiller Nathalia Lissette Martínez Sotillo como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor: Dr. Gustavo Benaim

CARACAS, VENEZUELA

JULIO, 2018

ACTA DE VEREDICTO DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

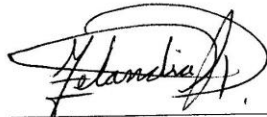
Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. Nathalia L. Martínez S., CI: 25.751.925 para optar por el título de Licenciada en 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 ocho días del mes de Mayo de 2018.



Dr. Gustavo Benaim

C.I: 3.658.620

Tutor Académico



Dra. Zelandia Fermin

C.I: 9.813.576

Jurado principal



Dra. Francehuli Dager

C.I: 2.963.235

Jurado principal

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos del Instituto de Estudios Avanzados, IDEA, y con el financiamiento de los proyectos FONACIT 2017000274 y CDCH-UCV PG 03-8728-2013/2, a mi tutor, el Dr. Gustavo Benaim.

El compuesto derivado de la amiodarona (AMIODER), empleado en la realización del presente trabajo fue suministrado amablemente por Elżbieta Hejchman del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Warsaw, Polonia, con quien tenemos un convenio de colaboración.

A mi tutor el Dr. Gustavo Benaim quien me aceptó en su laboratorio y continuamente señaló mis capacidades lo cual afirmó mi confianza en la realización de este trabajo y siempre estuvo disponible para aclarar cualquier duda.

A mis padres Noreivi Sotillo e Himer Martínez, a mis abuelos Norma Carrillo y Carlos Pérez, a mi tía Idania Sotillo y a mi mejor amigo Sandro Di Sante por su ayuda y apoyo incondicional durante todo el curso de mi carrera.

A mis compañeras de laboratorio: Lic. Jessica Rodríguez y Lic. Andrea Pinto, quienes estuvieron dispuestos para prestarme su apoyo técnico y ayudar a realizar este Trabajo Especial de Grado.

A la Dra. Zelandia Fermín por brindar sus conocimientos y consejos cuando necesite su ayuda para la elaboración de este Trabajo Especial de Grado.

Índice

CONTENIDO	Pàg.
Índice de Figuras	iv
Abreviatura	vii
Resumen	viii
1.0 Introducción	
1.1 Leishmaniasis	1
1.2 Epidemiología y patología de la leishmaniasis	2
1.3 Efectos morfológicos y ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp.	5
1.4 Clasificación y biología de <i>Leishmania donovani</i>	6
1.5 El papel del Ca ²⁺ en tripanosomatidios y organelos implicados en su almacenamiento	7
1.6 Tratamiento actual	12
1.7 Quimioterapias contra leishmaniasis	15
1.8 Búsqueda de nuevos compuestos	17
2.0 Objetivos	
2.1 Objetivo general	25
2.2 Objetivos específicos	25
3.0 Materiales y métodos	
3.1 Mantenimiento de parásitos y macrófagos	26
3.2 Estudio del efecto del AMIODER sobre la proliferación de promastigotes de <i>L. donovani</i>	26
3.3 Estudio de la citotoxicidad del AMIODER sobre células de mamífero mediante el ensayo de MTT	27
3.4 Determinación del efecto del AMIODER sobre amastigotes	

intracelulares de <i>L. donovani</i>	28
3.5 Determinación del efecto del AMIODER sobre la homeostasis intracelular de Ca ²⁺ de promastigotes de <i>L. donovani</i>	29
3.6 Determinación del efecto de AMIODER sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de <i>L. donovani</i>	33
3.7 Determinación del efecto de AMIODER sobre la alcalinización de los acidocalcisomas de promastigotes de <i>L. donovani</i>	33
4.0 Resultados	
4.1 Efecto del AMIODER sobre la proliferación de promastigotes de <i>L. donovani</i> mediante curva de crecimiento	35
4.2 Efecto de la citotoxicidad del AMIODER sobre células de mamífero mediante el ensayo de MTT	37
4.3 Efecto del AMIODER sobre amastigotes intracelulares de <i>L. donovani</i> mediante infección	39
4.4 Efecto del AMIODER sobre la homeostasis intracelular de Ca ²⁺ de promastigotes de <i>L. donovani</i>	39
4.5 Efecto de AMIODER sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de <i>L. donovani</i>	43
4.6 Efecto de AMIODER sobre los acidocalcisomas de promastigotes de <i>L. donovani</i>	45
Discusión	49
Conclusiones	59
Bibliografía	60

Índice de Figuras

FIGURAS	Pág
Figura 1. Distribución mundial de la leishmaniasis visceral	2
Figura 2. Estados en los que se encuentran focos de leishmaniasis visceral en Venezuela	4
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Leishmania donovani</i> mostrando los estadios morfológicos del parásito en el vector invertebrado y en el huésped mamífero	6
Figura 4. Modelo esquemático de la regulación de Ca^{2+}	13
Figura 5. Estructura química de los derivados del benzofurano, amiodarona y dronedarona	18
Figura 6. Efecto de la dronedarona sobre la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	19
Figura 7. Efecto de la dronedarona y amiodarona sobre promastigotes de <i>L. mexicana</i>	20
Figura 8. Estructura básica de los bisbenzofuranos reportados por Bakunova y col., 2007	22
Figura 9. Estructura básica de los derivados de pentamidina portando como motivo el benzofurano, sintetizados por Barkunov y col., 2009	22
Figura 10. Estructura de los derivados 3d y 4 del benzofurano sintetizados por Hejchman y col., 2012	23
Figura 11. Esquema de la reducción del MTT a Formazán. Tomado de Ebada y col., 2008. con modificaciones. Formazán: (2E,4Z)-(4,5-	28

Dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazán.

Figura 12. Representación esquemática de la incorporación del fura 2 a la célula	30
Figura 13. Diagrama esquemático ordenador, muestra y fluorímetro programado a dos longitudes de excitación	31
Figura 14. Ecuación descrita por Grynkiewicz y col., 1985, para obtener la $[Ca^{2+}]$ en función a la fluorescencia del Fura-2 cuando éste es excitado con longitudes de onda de 340 y 380 nm	32
Figura 15. Estructura molecular de la rodamina 123 y la naranja de acridina	34
Figura 16. Efecto del AMIODER sobre la proliferación de poblaciones de promastigotes de <i>Leishmania donovani</i> .	36
Figura 17. Curva dosis-respuesta luego de 96 horas del tratamiento de promastigotes de <i>L. donovani</i> con AMIODER	37
Figura 18. Sensibilidad de macrófagos al AMIODER	38
Figura 19. Efecto del AMIODER sobre amastigotes intracelulares de <i>L. donovani</i>	40
Figura 20. Efecto del AMIODER sobre la $[Ca^{2+}]$ intracelular de promastigotes de <i>L. donovani</i>	41
Figura 21. Aumento porcentual de la relación de fluorescencia 340/380 nm al añadir 10 μ M de AMIODER a promastigotes de <i>L. donovani</i> cargados con fura 2, luego de alcanzarse el <i>plateau</i>	42
Figura 22. Efecto del AMIODER sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de <i>L. donovani</i>	44

Figura 23. Aumento porcentual de la fluorescencia respecto al nivel basal luego de la adición de AMIODER a promastigotes de <i>L. donovani</i> cargados con Rodamina 12	46
Figura 24. Efecto del AMIODER sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de promastigotes de <i>Leishmania donovani</i>	47
Figura 25. Aumento porcentual de la fluorescencia respecto al nivel basal luego de la adición de AMIODER a promastigotes de <i>L. donovani</i> cargados con Naranja de acridina	48

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ATP: Adenosina trifosfato.

CMU: Uniportador Mitocondrial de Ca^{2+} (por sus siglas en inglés: calcium mitochondrial uniporter)

DMSO: Dimetil-sulfóxido

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

FCCP: Carbonilcianuro- p- trifluorometoxi-hidrazona.

IS: Índice de selectividad

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

LPGs: Lipofosfogluicanos

PBS: Buffer Fosfato Salino.

PMCA: Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática (por sus siglas en inglés “plasma membrane Ca^{2+} -ATPase”).

λ : Longitud de onda

SERCA: Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarco-endoplásmico (por sus siglas en inglés de “sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase”)

Resumen

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades parasitarias transmitidas a humanos y otros mamíferos mediante la picadura de diferentes especies del género *Phlebotomus* o *Lutzomyas*. Su agente causal, es el parásito tripanosomatidio *Leishmania* sp. Esta enfermedad, representa un problema de salud pública a nivel mundial ante la falta de vacunas o tratamientos eficaces y de métodos efectivos de control de las poblaciones del insecto vector. La única herramienta de lucha frente a la leishmaniasis es la quimioterapia, donde la miltefosina representa el mayor avance en tratamientos contra esta enfermedad. Sin embargo, ésta posee un efecto teratogénico y además se han observado casos de resistencia a esta droga. La amiodarona, un conocido antiarrítmico, ha sido el sujeto de recientes estudios como un antimicótico y agente parasitocida, presentando excelentes propiedades farmacocinéticas y un costo relativamente bajo. Esta droga actúa sobre *Leishmania* sp. causando una alteración de la homeostasis intracelular del Ca^{2+} , por medio de la liberación de este catión a partir de organelos intracelulares. Considerando la importancia en la investigación de este tipo de drogas, en este trabajo se propuso evaluar el efecto de un derivado del benzofurano (AMIODER), el cual está basado en la estructura de la amiodarona. Se evaluó el efecto sobre los promastigotes en presencia de diferentes concentraciones de AMIODER (0 - 50 μM), así como su efecto sobre células huésped de mamífero (macrófagos) ; se determinó el efecto de la droga sobre la proliferación de amastigotes en el interior de macrófagos de origen murino; Se evaluó el mecanismo de acción del AMIODER sobre los promastigotes en relación a la concentración intracelular del Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), así como el efecto de la droga sobre el potencial electroquímico mitocondrial y sobre los acidocalcisomas de promastigotes de *L. donovani*. Los resultados demuestran que esta droga tiene un importante efecto sobre este parásito, fundamentalmente sobre la fase amastigote, la cual representa la forma clínicamente relevante, presentando un IC_{50} de 0,14 μM y además altera la homeostasis de Ca^{2+} intracelular producto de la liberación de este catión de la mitocondria y los acidocalcisomas. Este hecho podría ser potencialmente explotado desde el punto de vista farmacológico, presentando una potencial alternativa en la terapia contra *L. donovani*.

Palabras clave: Benzofurano, *Leishmania*, AMIODER, Ca^{2+} , amiodarona, homeostasis

1. Introducción

1.1 Leishmaniasis

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades parasitarias transmitidas a humanos y otros mamíferos por pequeños dípteros del género *Lutzomyia* sp. en el nuevo mundo y *Phlebotomus* sp. en el viejo mundo (De Lima y col., 2010), y menos frecuentemente mediante transmisión congénita y parenteral (vía transfusión de sangre, jeringas compartidas y accidentes de laboratorio) (Herwaldt, 1999). En la naturaleza se tiene al menos 100 especies de mamíferos que actúan como potenciales reservorios del parásito, en donde perros domésticos, roedores y rabipelados, se encuentran dentro de esta larga lista (De Lima y col., 2010).

Las leishmaniasis son enfermedades prevalentes en 88 países, 3 territorios y 5 continentes (Figura 1) y afecta principalmente a las poblaciones más pobres del mundo. Más del 90% de los casos se registran en seis países: Brasil, Etiopía, Sudán, Sudán del Sur, India y Bangladesh (Pigott y col., 2014). Se estiman unos 1,3 millones de casos nuevos y 57.000 muertes al año debido a esta parasitosis. Unos 300.000 casos corresponden a la leishmaniasis visceral y 1 millón a la forma cutánea o muco-cutánea (WHO, 2014). Esta enfermedad está presente en áreas tropicales y subtropicales y genera alta mortalidad y morbilidad (WHO, 2004; Serrano y col., 2009a), y aunque afecta personas de todas las edades, alrededor del 60% de las personas que la padecen pertenece a jóvenes adultos y rara vez a niños menores de cuatro años de edad (Pigott y col., 2014).

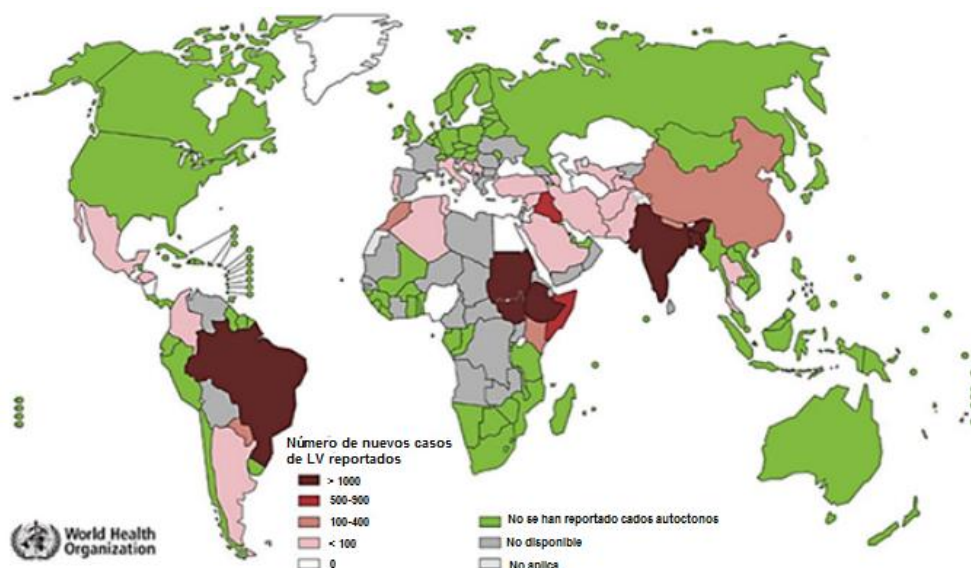


Figura 1. Distribución mundial de la leishmaniasis Visceral (LV). Tomado de World Health Organization (WHO), 2014.

1.2. Epidemiología y patología de la Leishmaniasis

La leishmaniasis puede ser causada por alrededor de 20 especies de *Leishmania*, lo cual combinado con los mecanismos inmunes del hospedador, resulta en un amplio espectro de manifestaciones clínicas (Silva-Jardim y col., 2014). Según la especie de *Leishmania* se pueden producir diferentes casos clínicos, como lo son infección cutánea, muco-cutánea o visceral.

La leishmaniasis cutánea es la forma más frecuente de esta enfermedad. Puede presentarse en dos formas clínicas con pronóstico y características inmunológicas opuestas: la leishmaniasis cutánea localizada (LCL), generalmente circunscrita al sitio de inoculación gracias a una respuesta inmunitaria-celular protectora, pudiendo presentarse además casos de metástasis, se distingue por la presencia de úlceras únicas o múltiples, redondeadas, de bordes indurados, fondo limpio e indoloro que aparecen 15 a 20 días después de la picadura del vector

infectado y la leishmaniasis cutánea difusa (LCD), caracterizada por una pobre respuesta inmunitaria celular, que permite la diseminación del parásito por el líquido tisular, la linfa o la vía sanguínea, con desarrollo de lesiones nodulares en toda la piel. *Leishmania mexicana* es el agente etiológico principal de estas (Cabello, 2007; Becerril, 2011).

La leishmaniasis muco-cutánea (LMC) cursa con invasión y destrucción de la mucosa nasofaríngea y puede ser desfigurante. Generalmente se desencadena luego de que aparecen las lesiones cutáneas. Las especies que causan esta forma clínica pertenecen al complejo *L. braziliensis*: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* y *L. mexicana (V.)* (Salazar y Castro, 2001).

La leishmaniasis visceral (LV) generalmente afecta al bazo, al hígado, vesícula y otros tejidos linfoides y, si no se trata, es mortal; una fracción de los casos de LV tratados con éxito resultan en erupciones maculopapulares o nodulares (leishmaniasis dérmica post-kala-azar) (Murray y col., 2005; Pratlong y col., 2009).

La leishmaniasis visceral cursa con hepatoesplenomegalia, fiebre intermitente, pérdida de peso, anemia y caquexia. En la India, la enfermedad se conoce como kala-azar o enfermedad negra en virtud de la hiperpigmentación que se observa en pacientes de esta región. La LV es letal en 100 % de los casos si no recibe tratamiento, y aun con éste, la mortalidad puede llegar hasta un 15 %. (Becerril, 2011).

La leishmaniasis visceral constituye un problema de salud pública en Venezuela tanto por su morbilidad como por los cambios de comportamiento en su

patrón epidemiológico, siendo de carácter endémico y focal, reportándose casos desde 1941 hasta el año 2012, con una tasa de incidencia promedio anual de 0,2 casos por cada 100.000 habitantes y una letalidad de 7,85 % (Becerril, 2011).

Se han descrito tres principales focos de LV: un foco Central que comprende los estados Aragua, Carabobo, Guárico, Cojedes y Yaracuy; un foco Occidental conformado por los estados Falcón, Lara, Portuguesa, Trujillo y Zulia y un foco Oriental constituido por los estados Nueva Esparta, Sucre, Anzoátegui y Monagas (Zerpa y col., 2003). La región oriental tiene alta incidencia, especialmente en Nueva Esparta y Anzoátegui, siendo común los focos urbanos y suburbanos. En el estado Aragua se ha visto la aparición de una serie de casos desde el año 2000 en diferentes municipios, estando el municipio Bolívar entre los de mayor importancia epidemiológica (Romero y col., 2012).

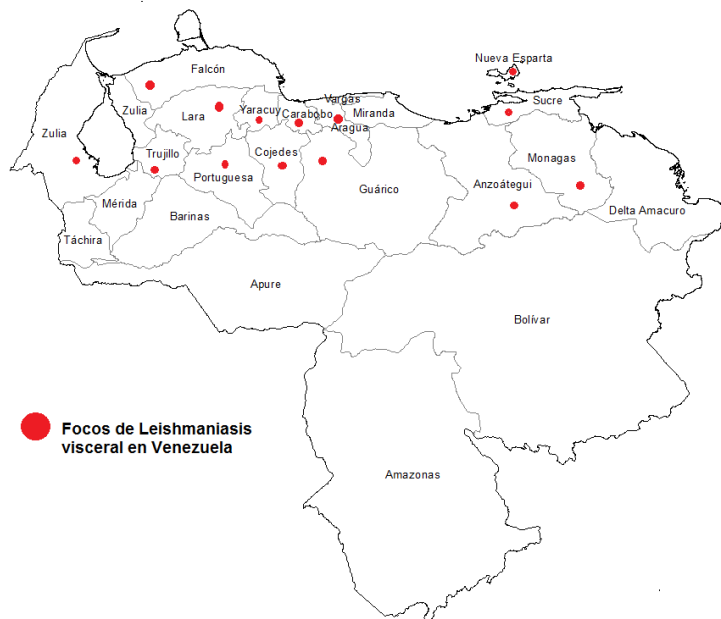


Figura 2. Estados en los que se encuentran focos de Leishmaniasis visceral en Venezuela.

1.3. Estadios morfológicos y Ciclo de vida de *Leishmania* sp.

Leishmania sp. posee dos estadios diferentes; una forma extracelular flagelada (promastigote), la cual se aloja en el intestino medio de un hospedador invertebrado (flebótomo) y mide entre 12 y 20 μm . Después de la transmisión al hospedador vertebrado, el parásito se diferencia en la etapa amastigote patogénica que está adaptada para la supervivencia intracelular y posee una forma redondeada, no posee flagelo aparente y mide entre 2.5 a 3.5 μm . Esta transición de desarrollo es inducida por factores ambientales incluyendo temperatura elevada y pH ácido y es probable que se lleve a cabo mediante cascadas de señalización que implican proteínas quinasas aguas abajo (Morales y col., 2008).

El vector infeccioso necesita sangre para el desarrollo de los huevos y adquiere el parásito al ingerirla con células infectadas de huéspedes vertebrados. En el intestino del transmisor, el parásito inicia un proceso de maduración y diferenciación que dura entre 4 y 25 días, en el cual los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos, que se adhieren al epitelio del intestino medio del vector mediante sus lipofosfogluanos (LPGs). El promastigote procíclico se convierte en promastigote metacíclico infectivo y durante esta metaciclogénesis las moléculas de LPGs se duplican y sufren cambios en la composición de las cadenas laterales, lo que permite que el parásito se desprenda del epitelio intestinal y migre a la faringe y cavidad bucal del díptero. Al picar de nuevo, el vector inocular al promastigote infectivo en un nuevo hospedador vertebrado, invadiendo así los macrófagos residentes de la piel, células de Langerhans o monocitos que lo fagocitan. Una vez dentro de los fagolisosomas de

las células fagocíticas, los promastigotes se diferencian de nuevo a amastigotes, los cuales proliferan por fisión binaria y llevan al rompimiento de la célula. Los amastigotes que se liberan infectan células vecinas produciendo de esta manera la enfermedad; y finalmente, el ciclo (Figura 3) se cierra cuando un nuevo flebótomo pica al huésped vertebrado infectándolo (Becerril, 2011).

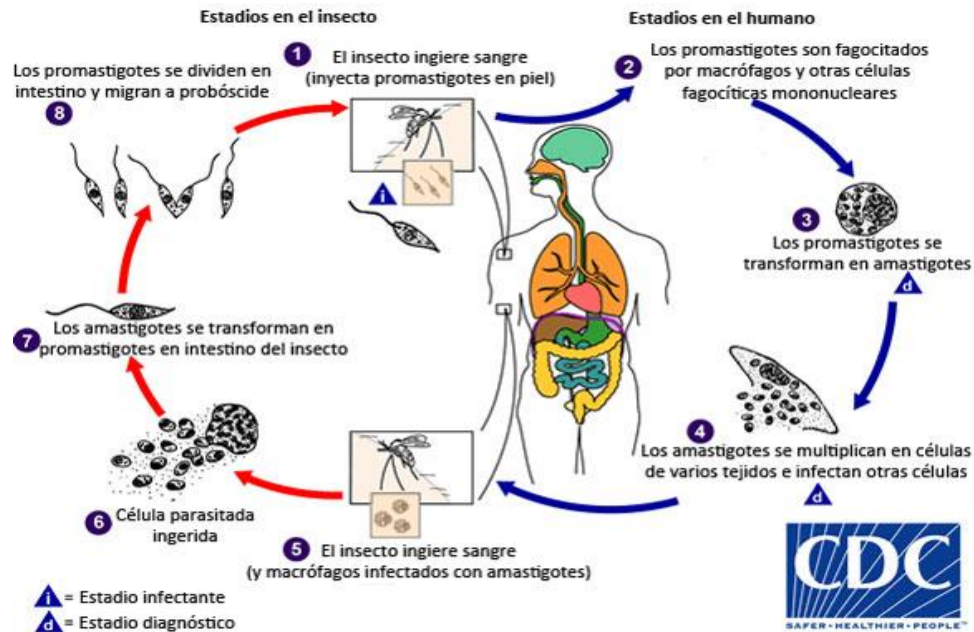


Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania donovani* mostrando los estadios morfológicos del parásito en el vector invertebrado y en el hospedador mamífero (CDC, 2013).

1.4. Clasificación y biología de *Leishmania donovani*.

Leishmania donovani es uno de los principales agentes etiológicos de leishmaniasis visceral o Kala-azar (Serrano y col., 2009a). Es un endoparásito protozoario perteneciente al phylum *Sarcomastigophora*, subphylum *Mastigophora*, clase *Zoomastigophora*, orden *Kinetoplastida*, Suborden

Trypanosomatina, familia *Trypanosomatidae*, género *Leishmania*, especie *L. donovani*.

Entre los rasgos distintivos de los tripanosomatidios se encuentra la presencia de una mitocondria única muy desarrollada, en la que se diferencia una región denominada kinetoplasto, correspondiente al ADN mitocondrial, y un único flagelo (Gállego, 2006). El flagelo es una estructura presente en todos los tripanosomatidios incluyendo a *L. donovani*, el cual se une al cuerpo celular y su tamaño varía dependiendo del estadio de desarrollo, midiendo 1 μM de longitud en los amastigotes y cerca de 20 μM en las formas elongadas del parásito. El flagelo puede estar formando el borde de una membrana ondulante o ser libre en toda su longitud (en la fase extracelular del parásito) y que desaparece externamente cuando viven como parásitos intracelulares. Los géneros representativos de esta familia son *Trypanosoma* sp. y *Leishmania* sp., ambos con un ciclo de vida heteroxeno, con dos hospedadores: vertebrados (hombre y mamíferos que conforman el reservorio) e invertebrados (insectos dípteros) (Gallego, 2006).

1.5. El papel del Ca^{2+} en tripanosomatidios y organelos implicados en su almacenamiento

El Ca^{2+} ha sido reconocido como un segundo mensajero esencial en todos los eucariotas, desde parásitos hasta mamíferos. Este catión en tripanosomatidios participa en diversas funciones, como son: el movimiento flagelar, el ensamblaje de microtúbulos, la diferenciación celular, la invasión celular de promastigotes de *L. donovani* y tripomastigotes de *T. cruzi*, entre otras (Benaim y García, 2011; Docampo y Moreno, 1996). Para que el Ca^{2+} actúe como mensajero intracelular

debe unirse con gran afinidad y especificidad a una proteína efectora (diana), la cual regula su concentración intracelular y controla sus efectos; y para ello la concentración de este mensajero debe sufrir oscilaciones, alterando así el número de moléculas diana afectadas (Carafoli y Penniston, 1985).

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

Las células eucariotas en general mantienen una concentración citosólica de Ca^{2+} libre muy reducida (alrededor de 100 nM) en presencia de una concentración extracelular de Ca^{2+} mucho mayor (1 - 2 mM) (Alberts y col., 2010). Por ejemplo, los tripanosomatidios son capaces de mantener una concentración citosólica de Ca^{2+} de aproximadamente 50 nM, cuatro veces menor que la concentración de Ca^{2+} extracelular, que está en el orden mM (Benaim y Romero, 1990). Este hecho implica la presencia de diferentes mecanismos que permiten mantener dicho gradiente de concentración (Benaim y col., 1993a).

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

Como se mencionó anteriormente, se han identificado tres organelos que contribuyen con esta fina regulación en tripanosomatidios: Un mitocondrion único gigante, los acidocalcisomas y el retículo endoplasmático.

El mayor almacenamiento de Ca^{2+} en eucariotas superiores es usualmente establecido en el retículo endoplasmático (RE), con concentraciones en su interior que alcanzan niveles en el orden milimolar. El retículo endoplasmático en la mayoría de los tripanosomatidios representa un compartimiento intracelular de alta afinidad por Ca^{2+} que posee una Ca^{2+} -ATPasa de retículo sarco-endoplásmico (SERCA) similar a la que poseen otras eucariotas (Benaim y García, 2011). El RE posee dos rutas independientes para la entrada y salida de Ca^{2+} . La entrada es

catalizada por la SERCA, la cual transloca activamente 2 cationes Ca^{2+} por 1 molécula de ATP. El RE tiene varios tipos distintos de canales que están involucrados en la liberación de Ca^{2+} (Moreno y Docampo, 2003).

La mitocondria del parásito posee un Uniporte Mitocondrial de Ca^{2+} (CMU, por sus siglas en inglés: calcium mitochondrial uniporter) en la membrana interna, el cual utiliza la diferencia de potencial electroquímico entre la mitocondria y el citoplasma como la fuerza impulsora para la acumulación de este catión. Este sistema de transporte de Ca^{2+} mitocondrial es caracterizado por una baja afinidad por Ca^{2+} del uniporte, pero una alta capacidad del organelo para la acumulación del catión. Este uniporte de Ca^{2+} ha sido identificado a nivel molecular recientemente (De Stefani y col., 2011). Todas esas características son muy similares al transporte de Ca^{2+} mitocondrial en *L. mexicana* (Benaim y col., 1990).

Los acidocalcisomas, son organelos ácidos capaces de acumular grandes cantidades de Ca^{2+} y que además están involucrados en la bioenergética de estos parásitos (Docampo y Vercesi, 1989; Benaim y Garcia, 2011). Los acidocalcisomas ocupan entre el 1-2 % del volumen celular total, son electrondensos y su carácter ácido le permite acumular colorantes diamidínicos como la naranja de acridina (Docampo, 2011). Los altos niveles de pirofosfatos y polifosfatos son los que le permiten la acumulación de grandes cantidades de Ca^{2+} ; se ha demostrado que poseen una Ca^{2+} -ATPasa de tipo PMCA (de sus siglas en inglés Plasma Membrane Ca^{2+} -ATPase), involucrada en la entrada de Ca^{2+} similar a la Ca^{2+} -ATPasa vacuolar de otros eucariotas unicelulares, y un H^{+} -pirofosfatasa vacuolar, involucrada en su acidificación (Docampo y Moreno, 2001). Todos esos sistemas, que operan de forma concertada, contribuyen al

mantenimiento de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular, manteniendo su concentración intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) bajo 100 nM, muy por debajo de la concentración extracelular, permitiendo así que este catión realice una función esencial en la señalización celular (Benaim y Garcia, 2011).

Entre las funciones principales de los acidocalcisomas, se encuentra el almacenamiento de fosfato inorgánico. Los acidocalcisomas son el mayor depósito celular de compuestos de fosfato (P_i , PP_i y poli P) en diferentes bacterias y células eucariotas incluyendo *Leishmania donovani*. El PP_i es un producto colateral de las reacciones biosintéticas como las de la síntesis de ácidos nucleicos, coenzimas y proteínas, la activación de ácidos grasos y la síntesis de isoprenoides. Los polifosfatos constituyen una segunda moneda energética alternativa al ATP para estos parásitos, debido a que la energía de hidrólisis del pirofosfato es similar a la energía de hidrólisis enlace entre el fosfato “ β ” y el fosfato “ γ ” del ATP. Otras funciones son el almacenamiento de cationes, la homeostasis el pH intracelular y la regulación osmótica; esta última es esencial para los tripanosomatidios digenéticos ya que, tanto en el insecto vector como en el huésped vertebrado, los parásitos están sujetos a estrés osmótico. El mecanismo de disminución regulatoria del volumen, que involucra la liberación de iones y osmolitos, incluyendo aminoácidos, permite la adaptación de los tripanosomatidios al estrés hipo-osmótico. Sin embargo, una parte considerable de la recuperación del volumen no se puede atribuir sólo a la liberación de aminoácidos y iones, por lo que se ha propuesto que los acidocalcisomas están involucrados en este proceso (Docampo, 2008).

Uno de los principales transportadores de Ca^{2+} en la membrana plasmática es la Ca^{2+} -ATPasa (PMCA). Esta bomba pertenece a la familia ATPasa de tipo "P" y transporta un Ca^{2+} al espacio extracelular a costa de la hidrólisis de una molécula de ATP. La PMCA tiene una alta afinidad por Ca^{2+} y está modulado por diferentes agentes. El principal modulador de la enzima es calmodulina (CaM), que induce una disminución de la K_m para el catión desde 10 - 20 μM hasta 1 μM después de su interacción y también aumenta la V_{max} de la enzima (Gordones y col., 2017). Existe evidencia de la estimulación por la calmodulina en *T. cruzi* (Benaim y col., 1995), *Leishmania braziliensis* (Benaim y col., 1990b) *Leishmania donovani* (Mazumder y col., 1992) y *T. equiperimum* (Gordones y col., 2017). En la figura 4 se ilustra en detalle los mecanismos involucrados en la regulación de Ca^{2+} en tripanosomatidios.

1.6. Tratamiento actual

La miltefosina, un alquil-lisofosfolípido, es una droga generalmente usada contra la leishmaniasis, y se sabe que ejerce una acción contra el parásito a través de la apertura de un canal de Ca^{2+} de la membrana plasmática. La miltefosina representa uno de los mayores avances en tratamientos contra leishmaniasis; Sin embargo, presenta una serie de efectos adversos tales como el efecto teratogénico y el desarrollo potencial de resistencia (Benaim y col., 2013).

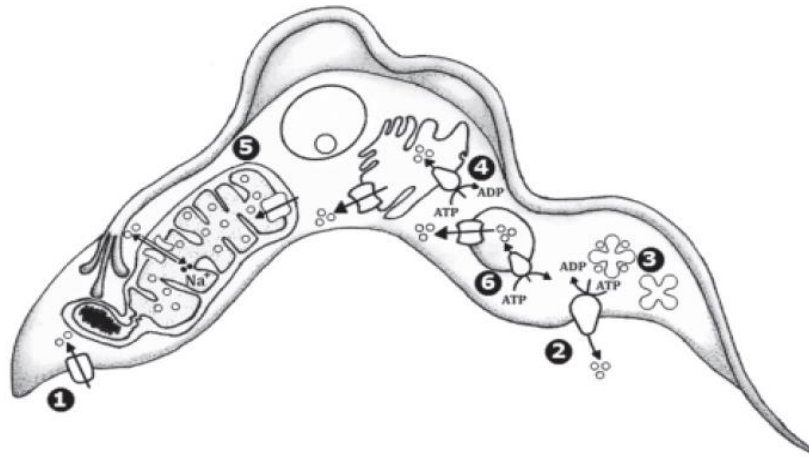


Figura 4. Modelo esquemático de la regulación de Ca^{2+} en tripanosomatidios.

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

En nuestro laboratorio logramos demostrar la presencia de un canal de Ca^{2+} en la membrana plasmática de *L. mexicana* (Benaim y col. en el 2012) responsable de la entrada del catión en este parásito. Este canal es similar al canal de Ca^{2+}

voltaje-dependiente tipo L de humanos VGCC (de sus siglas en inglés Voltage Gated Ca^{2+} Channel). Ambos canales son bloqueados por antagonistas específicos bien conocidos, tales como verapamil, nifedipina y diltiazem. Aún más, el de parásitos también puede ser abierto por BayK 8644, un agonista del VGCC de tipo L muy específico. Sin embargo, y muy resaltante, a diferencia del canal de humanos, el de parásitos se abre específicamente con el esfingolípido esfingosina. Mediante un análisis de la secuencia de aminoácidos de ambos canales, se identificaron dos secuencias como posibles canales de Ca^{2+} y se confirmó la presencia de dominios conservados (Benaim y col., 2012).

En un estudio muy reciente realizado en nuestro laboratorio (Pinto y col., 2018a), se encontró que la miltefosina posee un doble efecto sobre *L. donovani*. Por una parte, la apertura del canal de Ca^{2+} en la membrana plasmática sensible a la esfingosina y análogo al canal de Ca^{2+} voltaje-dependiente tipo L de humanos VGCC mencionado en el párrafo anterior, y además, un efecto directo sobre los acidocalcisomas recientemente identificado en este trabajo (Pinto y col., 2018a), además de su ya conocido previamente efecto sobre las mitocondrias, también corroborado en el trabajo anterior. Los efectos mencionados en combinación deben producir una gran acumulación de Ca^{2+} intracelular y de hecho se correlacionan con el abrupto incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular bajo la adición de miltefosina, por lo cual, sumado a la acción bien reconocida de la miltefosina sobre la síntesis de fosfolípidos y sobre la inhibición de la citocromo C oxidasa, contribuiría a la muerte del parásito inducida por este fármaco y podría explicar los grandes beneficios atribuidos a esta droga.

1.7. Quimioterapias contra Leishmaniasis

La droga de primera línea utilizada en Venezuela y en gran parte del mundo para tratar la leishmaniasis sigue siendo la misma desde hace más de 60 años. Se trata un fármaco altamente tóxico llamado glucantime (antimoniato de meglumina), el cual pertenece al grupo de los antimoniales pentavalentes, junto con el estibogluconato de sodio, conocido comercialmente como pentostam (Pandey y col., 2005). Estas drogas se comenzaron a emplear en la década de 1940 para el tratamiento de las diversas formas clínicas de leishmaniasis. Sin embargo, ambos medicamentos generan diversos efectos secundarios a nivel renal, cardíaco y hepático, entre los cuales destacan mialgia, pancreatitis, arritmia cardíaca y hepatitis (Pandey y col., 2005). Por otro lado, algunos pacientes no responden al tratamiento y las distintas especies de *Leishmania* presentan diversos grados de susceptibilidad a la droga (Alvar, 1997; Davis y Kedzierski, 2005). Por lo cual, surgió una segunda línea de tratamiento que incluye la anfotericina B y la pentamidina. Esta última creada para el tratamiento de la leishmaniasis visceral y cutánea, la cual actúa acumulándose en la mitocondria del parásito inhibiendo la topoisomerasa mitocondrial II y la biosíntesis de poliaminas y afectando el potencial de membrana mitocondrial. Estas se caracterizan por su alta eficacia, pero son costosas y causan graves efectos secundarios (Basselin y col., 2002; Croft y Coombs, 2003; Davis y Kedzierski, 2005). En nuestro laboratorio se ha demostrado que la pentamidina es capaz de inhibir selectivamente la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática de *Trypanosoma brucei*, sin afectar la enzima homóloga humana (Benaim y col., 1993b). Esta droga es menos tóxica que los antimoniales pentavalentes pero causa hipoglicemia, diabetes, nefrotoxicidad y

dolor en el sitio de inyección (Pandey y col., 2005). Por otro lado, con respecto a la anfotericina B (antibiótico poliénico), se comenzó a usar en la India para el tratamiento de la leishmaniasis visceral resistente a antimoniales (Sbaraglini y col., 2016). Este antibiótico poliénico interactúa preferencialmente con los esteroides de la membrana del parásito (ergosterol), produciendo una estructura que da lugar a un poro, lo que origina una permeabilidad alterada, causando la fuga de componentes citoplasmáticos vitales y concomitante la muerte celular (Ghannoum y Rice, 1999). Esta muestra mejor respuesta en casos de resistencia a antimoniales y diaminas, pero es tóxica, causa nefrotoxicidad, anemia y fiebre (Pandey y col., 2005). En las últimas décadas, se han desarrollado varias formulaciones lipídicas de la anfotericina B que reducen su toxicidad e incrementan su asimilación directa por el parásito. Una de estas formulaciones es la incorporación de la droga en liposomas artificiales, bajo el nombre comercial de “Ambisone”, la cual ha sido muy exitosa (Croft y Coombs, 2003).

Por otro lado, la paromomicina, antibiótico aminoglucósido que en 1960 se identificó como agente leishmanicida y se ha usado en ensayos clínicos para el tratamiento de la leishmaniasis visceral (vía parenteral) y cutánea (vía tópica y parenteral) (Croft y col., 2006), se une al ribosoma del parásito, lo que inhibe el proceso de transducción proteica e induce errores de lectura (Fernández y col., 2011). Sin embargo, presenta baja biodisponibilidad oral, por lo que debe ser inyectada intramuscularmente durante los 21 días que dura el tratamiento (16-20 mg/kg/día) (Croft y col., 2006), y además produce diversos efectos secundarios como son náuseas, diarrea, vómito y dolor abdominal (Sbaraglini y col., 2016).

Actualmente ha surgido una alternativa para el tratamiento de la leishmaniasis: la miltefosina, la cual se mencionó anteriormente

1.8. Búsqueda de nuevos compuestos

En células de mamíferos, el esteroles de la membrana predominante es el colesterol mientras que en *Leishmania sp.* es el 5-dehidroepisterol, lo cual indica que las enzimas involucradas en la biosíntesis de esteroides de membrana son distintas en humanos y parásitos, validando así estas enzimas como potenciales blancos de acción leishmanicida (Urbina y Docampo, 2003). En este sentido, un estudio realizado por Croft y Coombs en 2003 utilizando azoles tales como ketoconazol, posaconazol, itraconazol, fluconazol se demuestra que éstos inhiben la 14 α -demetilasa, una enzima clave en la ruta de la biosíntesis de esteroides.

. La Amiodarona, antiarrítmico comúnmente usado para tratar severas cardiopatías, incluyendo arritmias causadas por cardiomiopatías en pacientes con mal de Chagas, ha sido el sujeto de recientes estudios como un antimicótico y agente parasitocida, ya que esta posee excelentes propiedades farmacocinéticas y un costo relativamente bajo. Esta droga actúa sobre *T. cruzi* (Benaim y col., 2006) y *L. mexicana* (Serrano y col., 2009a), causando la alteración de la homeostasis intracelular del Ca²⁺, a través de su acción directa no sólo en mitocondrias, sino también en acidocalcisomas. También inhibe la síntesis de ergosterol en *T. cruzi* a través de su acción sobre la oxidoescualeno ciclasa (Benaim y col., 2006) en *L. mexicana* a nivel de la escualeno epoxidasa, siendo esta esencial para la síntesis de 5-dehidroepisterol (Serrano y col., 2009a). Asimismo, se demostró que esta droga presenta un notable efecto sinérgico

tanto *in vitro* como *in vivo*, con la miltefosina (Serrano y col., 2009b), demostrándose que esta combinación conlleva a la cura parasitaria de un 90 % de los ratones infectados. Sin embargo, como una desventaja se tiene que la amiodarona produce toxicidad en la tiroides, debido a la presencia de yodo en su estructura y además induce fibrosis pulmonar a largo plazo.

La dronedarona, un nuevo compuesto derivado de la amiodarona producido por Sanofi-Aventis fue aprobado por la FDA como antiarrítmico (Page y col., 2009). Este compuesto posee la misma estructura que la amiodarona, con la diferencia de que no presenta los dos átomos de yodo y tiene un menor carácter hidrofóbico (Figura 5), lo que le confiere una menor toxicidad.

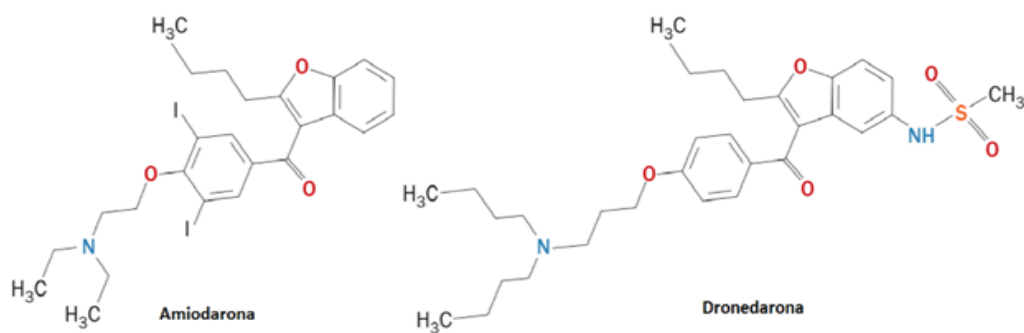


Figura 5. Estructura química de los derivados del benzofurano, amiodarona y dronedarona (Benaim y Paniz-Mondolfi, 2012).

En nuestro laboratorio (Benaim y col., 2014) recientemente demostramos que la dronedarona a concentraciones $< 0,25 \mu\text{M}$ ejerce un profundo efecto sobre el crecimiento de promastigotes de *L. mexicana* en cultivo con un IC_{50} de 115 nM y un efecto en amastigotes intracelulares en macrófagos infectados con un IC_{50} de 0,65 nM. Ambos valores de IC_{50} son significativamente menores que los

observados con amiodarona bajo las mismas condiciones experimentales en el 2009 por Serrano y col., donde el IC₅₀ de promastigotes fue 900 nM y de 8 nM en amastigotes. En este mismo trabajo, se demostró que la amiodarona induce un incremento en los niveles de Ca²⁺ intracelular. La dronedarona también induce este incremento de Ca²⁺ intracelular sobre el parásito como se observa en la Figura 6 (Benaim y col., 2014).

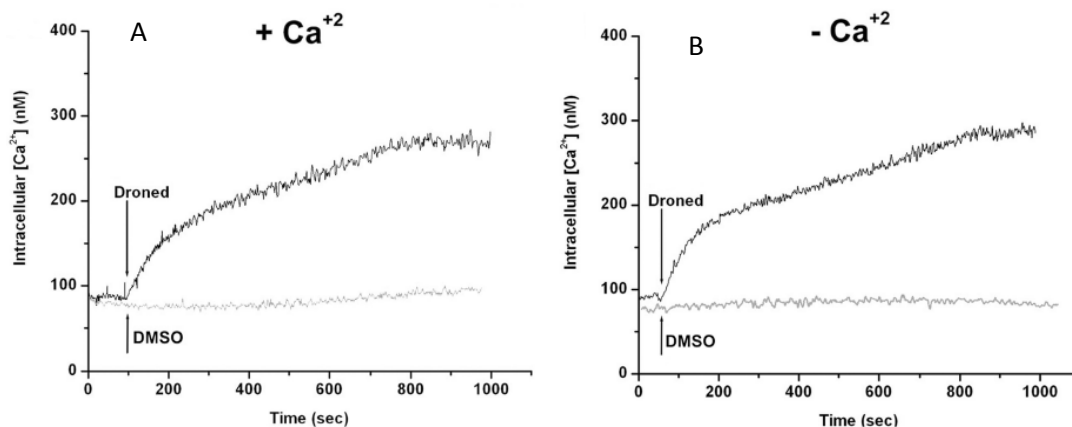


Figura 6. Efecto de la dronedarona sobre la concentración de calcio intracelular ([Ca²⁺]_i) de promastigotes de *L. mexicana*. (A) Efecto de 2,5 μM de dronedarona sobre la [Ca²⁺]_i en presencia de una [Ca²⁺]_e externa de 2 mM. (B) Efecto de la dronedarona sobre la [Ca²⁺]_i en ausencia de calcio extracelular (EGTA). En gris claro se observa el control con el vehículo de la droga (DMSO), el cual no ejerce ningún efecto sobre los promastigotes.

La dronedarona también ejerce un efecto sobre los acidocalcisomas, induciendo una rápida alcalinización de promastigotes a 2,5 μM, aun mas rápido que el inducido por la amiodarona, como se observa en la Figura 7A. En el mismo

trabajo de investigación se determinó el efecto de la dronedarona sobre el potencial electroquímico de la membrana mitocondrial usando el fluoróforo Rodamina 123, el cual se caracteriza por acumularse en las mitocondrias energizadas. Un incremento en la fluorescencia de Rodamina 123 corresponde a su liberación de las mitocondrias producto de la disipación del potencial electroquímico. Así, la dronedarona ejerce también un rápido incremento en la fluorescencia, debido al colapso del potencial de la membrana mitocondrial. Nuevamente el efecto de la dronedarona ($2,5 \mu\text{M}$) fue más rápido que con la amiodarona ($10 \mu\text{M}$), como se observa en la Figura 7B. (Benaim y col., 2014).

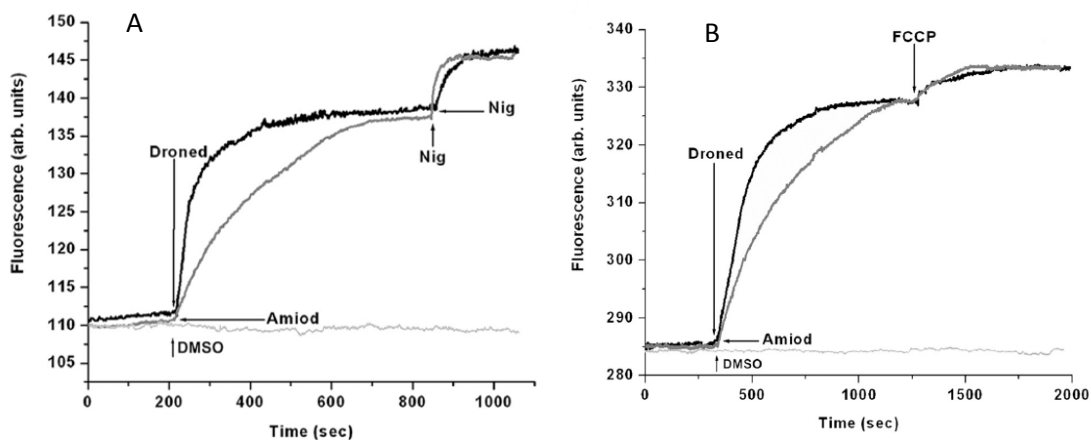


Figura 7. Efecto de la dronedarona y amiodarona sobre promastigotes de *L. mexicana*, (A) En negro se observa el efecto de la dronedarona ($2,5 \mu\text{M}$) y en gris el de amiodarona ($10 \mu\text{M}$) sobre los acidocalcisomas y el efecto ulterior de la nigericina ($2 \mu\text{M}$). (B) En negro se observa el efecto de la dronedarona ($2,5 \mu\text{M}$) y en gris el de amiodarona ($10 \mu\text{M}$) sobre el potencial electroquímico mitocondrial y

el efecto ulterior del FCCP (1 μ M). En gris claro se observa el vehículo de las drogas (DMSO), el cual no ejerce ningún efecto sobre los organelos mencionados.

Por otra parte, Bakunova y col (2007), sintetizaron 43 cationes bis-benzofuranos, otra serie de compuestos con dos motivos benzofuranoides en su estructura que mostraron actividad *in vitro* contra tripomastigotes de *T. b. rhodesiense*, *P. falciparum* y amastigotes axénicos de *L. donovani*, con valores de IC₅₀ que van desde 8 nM hasta 18.7 μ M. De los 43 bis-benzofuranos, 16 presentaron valores de IC₅₀ menores a 100 nM. Sobre *L. donovani*, el IC₅₀ más alto lo mostró el compuesto 14 que posee amidinas, los cuales son un tipo de compuestos orgánicos que poseen un efecto ectoparasitocida y se ha demostrado que posee un efecto tripanocida y leishmanocida *in vitro* e *in vivo* (Bofante y Barroeta, 2002).

Bakunov y col (2009), reportaron la síntesis de 48 derivados de pentamidina portando el benzofurano como motivo con propiedades antiprotozoarias, demostrando que tienen un efecto tripanocida, siendo los más potentes, los compuestos 26, 27, 37 y 38, con valores de IC₅₀ sobre *T. b. rhodesiense* de 41, 61, 25 y 88 nM, respectivamente, mientras que los valores correspondientes sobre mioblastos L6 de rata fueron 45.6, 10.3, 8.6 y 49.9 μ M. Por otra parte los compuestos más potentes sobre *L. donovani* fueron el 12, 25, 26, 28, 32, 34, 37, 39 y 44 con valores de IC₅₀ de 1.9, 0.78, 1.6, 0.61, 2.1, 0.65, 0.78, 0.48 y 1.4 μ M, respectivamente. Todos estos compuestos poseen en su estructura un trimetileno uniendo los dos grupos fenoles y un benzofurano.

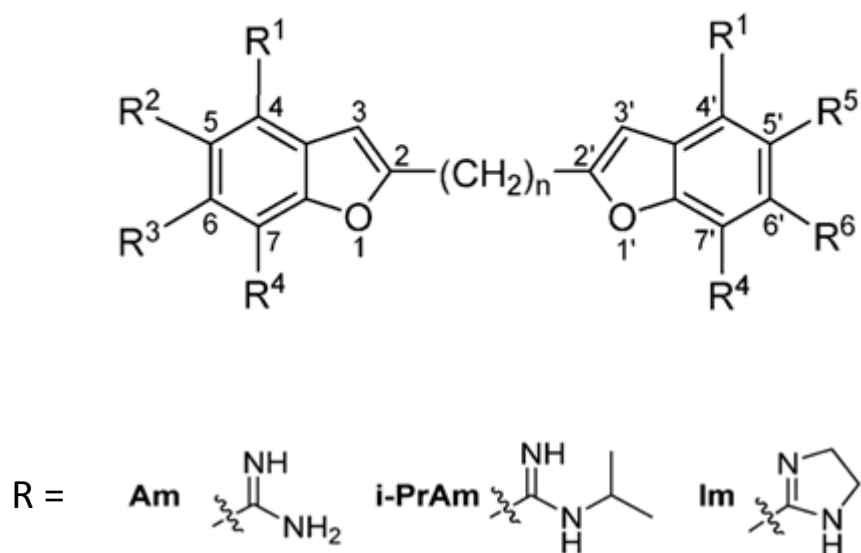


Figura 8. Estructura básica de los bis-benzofuranos reportados por Bakunova y col., 2007. En la estructura superior, n representa el número de carbonos entre los dos motivos benzofuranoides y los grupos R pueden ser amidina (Am), N-isopropilamina (i-PrAm) o imidazol (Im).

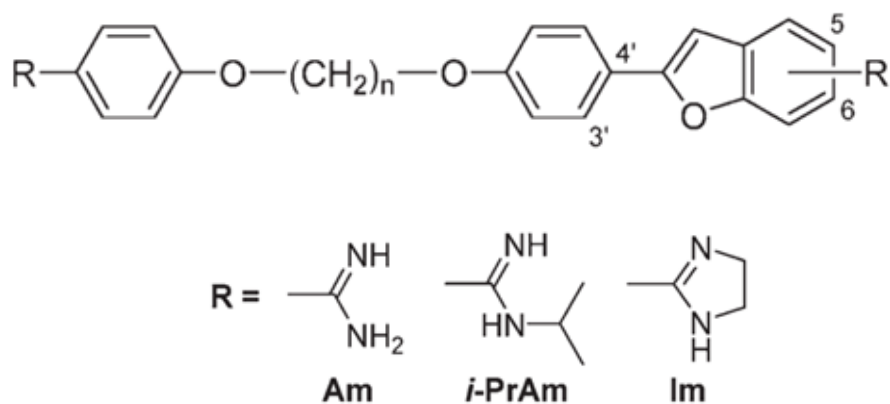


Figura 9. Estructura básica de los derivados de pentamidina portando como motivo el benzofurano, sintetizados por Bakunov y col., 2009.

Hejchman y col., 2012, basados en la estructura de la amiodarona, sintetizaron 12 compuestos derivados de los ácidos 2- y 3-benzofurancarboxílicos,

de los cuales dos mostraron una marcada actividad antifúngica, los derivados 3d (metil-5-bromo-7-(O-etil-2'-dietilamino)-6-metoxi-2-benzofurancarboxilato) y 4 (Metil-7-acetil-5-bromo-6-hidroxi-3-bromometil-2-benzofurancarboxilato), mostrados en la Figura 10. Este segundo compuesto es el que se utilizó en el presente trabajo y se denominará AMIODER en menciones posteriores. Ambos compuestos inhibieron completamente el crecimiento de *Cryptococcus neoformans* a una concentración de 20 μM . Sin embargo, el derivado 4 resultó ser menos tóxico para la línea celular humana K-562 no mostrando efecto sobre el crecimiento a concentraciones ente 10 y 30 μM , las cuales son las concentraciones inhibitorias de *C. neoformans*, mostrando solo una inhibición leve del crecimiento de K-562 a 50 μM ; sugiriendo de esta manera que el derivado 4 podría tener un potencial uso terapéutico. Por otra parte, el derivado 3d afecta el crecimiento de esta línea celular a concentraciones a partir de 10 μM , siendo éste significativamente más toxico que la amiodarona. Adicionalmente, el derivado 4 posee una actividad estimulante importante en combinación con la amiodarona (Hejchman y col., 2012).

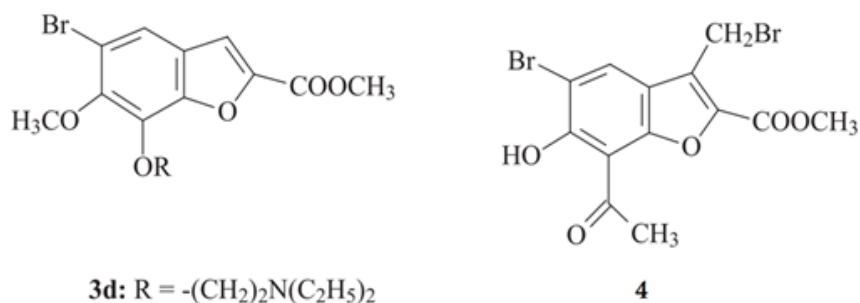


Figura 10. Estructura de los derivados 3d y 4 del benzofurano sintetizados por Hejchman y col., 2012.

En 2018b Pinto y col., estudiaron por primera sobre un tripanosomatidio, el efecto de AMIODER sobre la proliferación en cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*, demostrando que este compuesto si posee un efecto significativo sobre amastigotes en el interior de macrófagos con un IC₅₀ de 1,0 ± 1,3 μM. En contraste, ésta droga no posee un efecto citotóxico significativo sobre las células Vero (provenientes de riñón de mono verde africano, utilizadas como modelo de infección) hasta una concentraciones de 25 μM.

Además se determinó que parte del mecanismo involucrado en el efecto del AMIODER sobre el crecimiento de los epimastigotes de *T. cruzi* es la alteración de la homeóstasis del Ca²⁺ intracelular, produciendo un incremento en la concentración intracelular de este catión como producto de su liberación desde compartimientos intracelulares. En este mismo trabajo, se observó un efecto adicional del AMIODER sobre el potencial electroquímico mitocondrial y sobre los acidocalcisomas indicando que el Ca²⁺ proviene al menos parcialmente de estos compartimientos (Pinto y col., 2018b). Tomando en cuenta estos antecedentes, en el siguiente trabajo nos propusimos extender estos estudios a *L. donovani*, tomando en cuenta que la infección con este parásito es fatal en humanos, si no se trata adecuadamente.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General:

Estudiar el efecto del metil 7-acetil-5-bromo-6hidroxi-3-brometil-2-benzofurancarboxilato (AMIODER), un derivado del benzofurano, inspirado en la estructura de la amiodarona sobre la viabilidad celular de *Leishmania donovani* tanto en su forma promastigotes como en amastigotes en el interior de células de mamífero y su posible efecto sobre la homeóstasis del Ca^{2+} intracelular en los promastigotes de *L. donovani*.

2.2 Objetivos específicos:

1. Estudiar el efecto del AMIODER sobre la viabilidad de promastigotes de *L. donovani* en comparación con su efecto en macrófagos.
2. Determinar el efecto del AMIODER sobre la proliferación de amastigotes de *L. donovani* en el interior de macrófagos.
3. Determinar el efecto del AMIODER sobre la homeóstasis del Ca^{2+} intracelular en promastigotes de *L. donovani*.
4. Evaluar el efecto del AMIODER sobre el potencial electroquímico mitocondrial en promastigotes de *L. donovani*.
5. Evaluar el efecto del AMIODER sobre los acidocalcisomas de promastigotes de *L. donovani*.

3. Materiales y métodos

3.1. Mantenimiento de parásitos y macrófagos

Los promastigotes de *L. donovani* cepa DD8 se cultivaron en medio LIT (Liver Infusion Tryptose) a 26°C, pH 7.4, suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, y fueron mantenidos en agitación constante. Los macrófagos se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado con 10 % de suero fetal bovino y se mantuvieron incubadas a 37 °C y 5 % de CO₂.

En los experimentos subsiguientes, el título de los cultivos se determinó mediante conteo directo en una cámara de *Neubauer*.

3.2. Estudio del efecto del AMIODER sobre la proliferación de promastigotes de *L. donovani*.

Se determinó el crecimiento de los promastigotes de *L. donovani* en presencia de concentraciones crecientes de AMIODER (de 0 a 50 µM) mediante conteo directo en una cámara de *Neubauer*. Partiendo de un cultivo de promastigotes en fase exponencial, se sembraron en tubos de ensayo, 2 mL de cultivo a una concentración inicial de $2,5 \times 10^6$ promastigotes/mL en medio LIT, se añadió la droga a cada tubo incluyendo un control con la máxima concentración usada de DMSO. Cada condición se realizó por triplicado y los parásitos se incubaron a 29 °C. Se realizó el conteo diariamente durante 7 días. El IC₅₀ se determinó usando el programa Graph Pad 5.0. Para ello se emplearon los datos correspondientes a la curva dosis-respuesta (número de células en función a la concentración de droga) a las 96 horas de tratamiento.

3.3. Estudio de citotoxicidad del AMIODER sobre células de mamífero mediante el ensayo de MTT.

Se sembraron 4.000 células (macrófagos, Línea celular J774) en cada pozo de una placa de microtitulación de 96 pozos y se incubaron durante 48 horas a 37 °C y 5 % de CO₂ en presencia de concentraciones crecientes de AMIODER (0; 0,5; 1; 5; 10; 30; 100 µM) y se utilizó Triton X 100 al 0,1 % como controles positivo o de muerte (con cuatro replicas en cada condición). Se agregó una solución MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difenil tetrazolio) a una concentración de 0.5 mg/ml. La placa se incubó en oscuridad durante 4h a 37 °C y 5 % de CO₂. Luego se centrifugó de nuevo por 15 minutos 1.550 x g, se descartó el sobrenadante y se añadió DMSO (100 µl) en cada pozo. Se realizó la lectura de la densidad óptica a 570 nm en un lector de placas de ELISA y se determinó el IC₅₀ aplicando una regresión lineal a los datos de absorbancia normalizados (en porcentaje) con el programa Prisma GraphPad 5.0.

El principio de éste método es la reducción de MTT (sal de color amarillo soluble en agua) a cristales de Formazan, color azul oscuro e insolubles en agua. Esto es llevado a cabo por deshidrogenasas mitocondriales en las células vivas. Esto permite cuantificar las células viables en función de la densidad óptica después de la aplicación e incubación con el compuesto evaluado, de manera que mayor densidad óptica obtenida, mayor cantidad de células vivas, y menor citotoxicidad del compuesto (Ferrari y col., 1990).

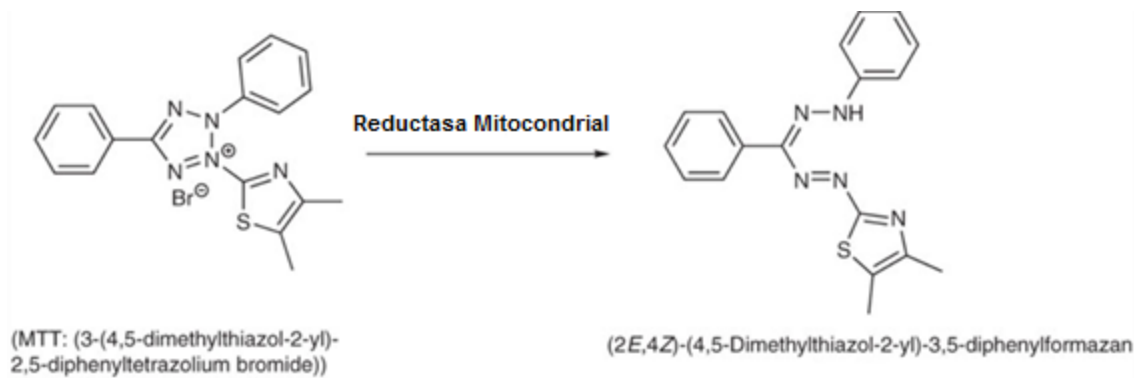


Figura 11. Esquema de la reducción del MTT a Formazán. Tomado de Ebada y col., 2008.con modificaciones. Formazán: (2E,4Z)-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazán.

3.4. Determinación del efecto del AMIODER sobre amastigotes intracelulares de *L. donovani* mediante infección.

Se sembraron 4.500 células en medio DMEM (suplementado con 10 % de SFB) sobre cubreobjetos de 1 cm² dispuestos en los pozos de una placa de 24 pozos y se incubaron durante 24 horas con promastigotes a una concentración de 15 parásitos por célula, luego de lo cual cada pozo fue lavado 2 veces con PBS con el objeto de remover los parásitos no adheridos. A cada pozo se añadió medio DMEM suplementado con 2 % de SFB con la concentración de AMIODER deseada (concentraciones entre 0 y 5 µM, por triplicado) y la placa se incubó por 72 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Se retiró el medio de cultivo de cada pozo, y cada cubreobjeto fue lavado con PBS. Las células se fijaron con metanol al 100 % y se tiñeron con colorante Giemsa en una dilución 1/5 en agua destilada y se lavaron con ácido acético al 0,01 %. Cada cubreobjetos se fijó a una lámina portaobjetos y se contaron las células infectadas (100 células por cubreobjeto) en un microscopio

óptico empleando una magnificación de 100X. El IC₅₀ se determinó usando el programa Prisma GraphPad 5.0 el cual aplica una regresión no lineal a los datos normalizados de la respuesta obtenida en función al logaritmo de la concentración de la droga empleada.

3.5. Determinación del efecto del AMIODER sobre la homeostasis intracelular del Ca²⁺ de promastigotes de *L. donovani*.

Con el objetivo de evaluar el efecto del AMIODER sobre la [Ca²⁺] intracelular de promastigotes de *L. donovani*, los parásitos fueron cargados con Fura-2 AM (acetoximetilado), el cual es permeable y puede ser cargado pasivamente en la célula, dentro de ésta las esterasas intracelulares hidrolizan los grupos éster que unen el acetoximetilado a los grupos carboxilos del Fura-2, dejando de este modo los grupos carboxilos libres que tornan la molécula a no lipofílica, la cual no puede cruzar las membranas celulares y además es sensible a Ca²⁺. Dentro de las células cada molécula de fura 2 se puede unir a un único Ca²⁺, por lo tanto, esta unión es proporcional a la concentración de Ca²⁺ citosólica dentro de un cierto rango (Hangland, 2002).

El Fura- 2 es un indicador de Ca²⁺ fluorescente que presenta dos longitudes de onda de excitación diferentes cuando se encuentra unido o libre al Ca²⁺ (340 y 380 nm, respectivamente) mientras que la emisión se mantiene a 510 nm.

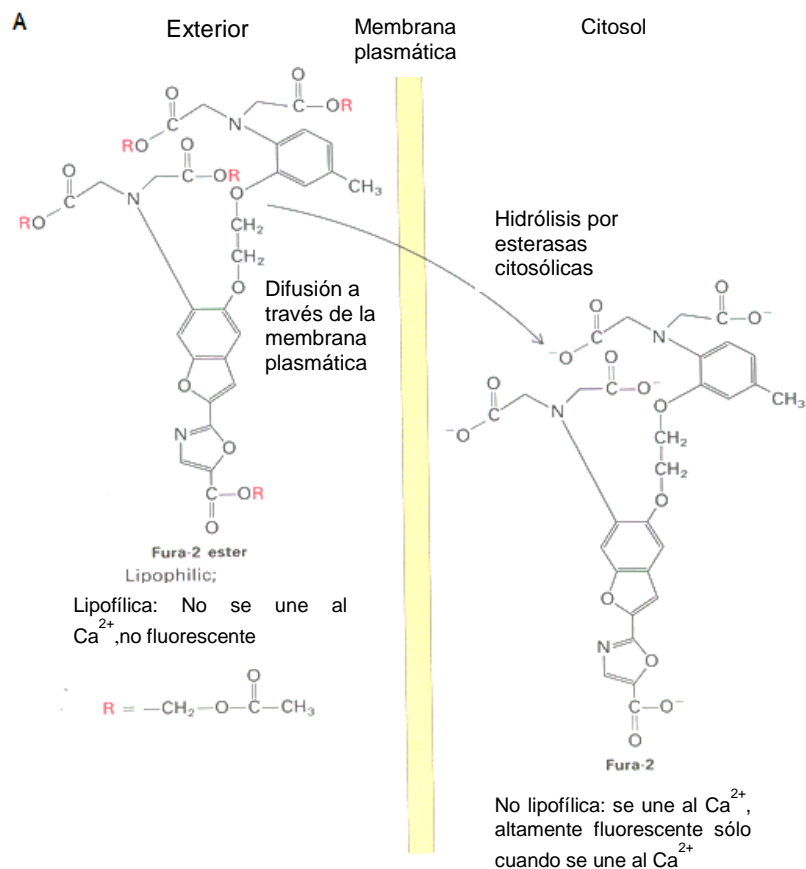


Figura 12. Representación esquemática de la incorporación del fura 2 a la célula. Tomado de Hangland, 2002.

Para cumplir este objetivo 7×10^6 promastigotes/mL fueron recolectados de un cultivo en fase exponencial por centrifugación a $600 \times g$ por 2 minutos, se lavaron 2 veces en un tampón tyrode (NaCl 145mM, KCl 4mM, MgCl_2 2mM, HEPES 10mM, Glucosa 11mM) con y sin Ca^{2+} según fuese el objetivo a evaluar y se incubaron a una concentración final de $2 \mu\text{M}$ de Fura 2 acetoximetilado (Fura 2-AM), 0.1 % de ácido plurónico y 2.4 mM de probenidol (un inhibidor de transportadores aniónicos) por 1 hora y media, en oscuridad, agitación constante y a 29°C . Transcurrido el tiempo de incubación con el fluoróforo, los parásitos se lavaron 2 veces con tampón de carga y se resuspendieron en $500 \mu\text{l}$ en presencia

probenicid a 2.4 mM. La muestra se colocó en una cubeta de cuarzo, la cual se introdujo en un fluorímetro Perkin Elmer LS-55 que se encuentra acoplado a un agitador y a un baño a 29 °C.

El fluorímetro Perkin Elmer LS-55 posee un sistema que permite hacer incidir 2 diferentes longitudes de onda de excitación sobre la cubeta (340 y 380 nm). Este dispositivo consta de una fuente de luz que incide en un "chopper" en el cual el haz de luz incidente se separa en las dos longitudes de onda de excitación del Fura 340 nm (para el Fura 2 unido a Ca^{2+}) y 380 nm (para el Fura libre). Las longitudes de onda son luego unidas mediante un combinador de rayos, que las hace incidir sobre la muestra en la cubeta de cuarzo. La muestra cargada con Fura-2 emite fluorescencia a 510 nm.

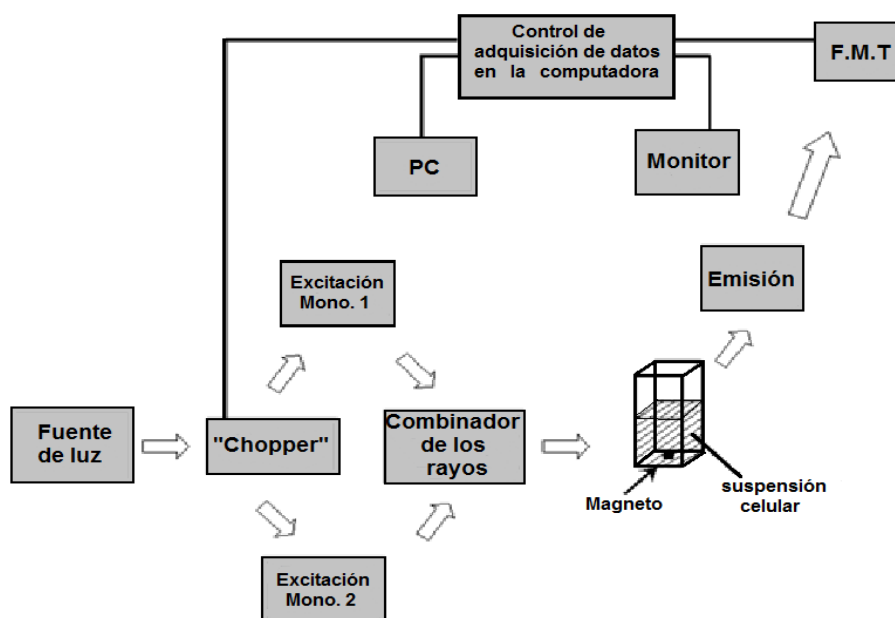


Figura 13. Diagrama esquemático ordenador, muestra y fluorímetro programado a dos longitudes de excitación.

Luego de iniciar la fluorimetría, se realizó por triplicado una prueba utilizando 10 µM AMIODER; se utilizó como control la digitonina a 40 µM y el EGTA a 8 mM empleando volúmenes de alrededor de 1 µl con la ayuda de una jeringa Hamilton. En los experimentos en presencia de Ca²⁺ extracelular, se usó un tampón de carga con 2 mM CaCl₂. La relación de proporcionalidad entre la relación de las fluorescencias 340/380 nm y la [Ca²⁺]_i se plantea en la ecuación propuesta por Grynkiewicz y col., 1985, siendo proporcional al cociente 340/380.

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

Figura 14. Ecuación descrita por Grynkiewicz y col., 1985, para obtener la [Ca²⁺] en función a la fluorescencia del Fura-2 cuando éste es excitado con longitudes de onda de 340 y 380 nm.

En la Figura14, K_d es la constante de afinidad del Fura 2 por Ca²⁺ (224 nm), R_{min} el valor más bajo de la relación de las fluorescencias de excitación 340 nm/380 nm en ausencia de Ca²⁺ (después de añadir el quelante de Ca²⁺ EGTA a una concentración de 8 mM), R_{max} el mayor valor de la relación de las fluorescencias de excitación 340 nm/380 nm en presencia de exceso de Ca²⁺ (después de añadir digitonina), F_{min(380)} es el mayor valor de fluorescencia del Fura-2 cuando es excitado a 380 nm luego de añadir EGTA (ausencia de Ca²⁺ extracelular), F_{max(380)} es el menor valor de fluorescencia del Fura-2 cuando es excitado a 380nm luego de añadir digitonina (la cual permeabiliza la membrana y permite la liberación del Ca²⁺ al exterior celular).

3.6. Determinación del efecto del AMIODER sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *L. donovani*.

Para estudiar el efecto del AMIODER sobre el potencial electroquímico mitocondrial se colectaron 4×10^6 parásitos por centrifugación a $600 \times g$ y se resuspendieron en tampón de carga (130 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM KH₂PO₄, 20 mM Tris-HCl) con 20 μ M del fluoróforo rodamina 123, se incubaron por 45 minutos a 29°C y en agitación continua. La rodamina 123 es un fluorocromo catiónico, verde fluorescente, permeable a la célula. Se distribuye en el espacio transmembrana de la mitocondria estrictamente de acuerdo a su potencial de membrana (Benaim y col., 2006) y tiene picos de excitación y emisión a 488 y 530nm, respectivamente (Serrano y col., 2009a).

Transcurrido el tiempo de incubación con el fluoróforo la muestra se lavó dos veces en 500 μ l de tampón de carga. Posteriormente se añadió la suspensión de parásitos en una cubeta de cuarzo que se colocó en un fluorímetro HITACHI F-7000 con agitación continua a 29 °C. Se utilizó FCCP a 2 μ M (protonóforo, el cual desacopla la cadena transportadora de electrones de la fosforilación oxidativa) como control positivo.

3.7. Determinación del efecto del AMIODER sobre la de alcalinización de los acidocalcisomas de *L. donovani*.

Para estudiar el efecto AMIODER sobre los acidocalcisomas de *L. donovani*, se procedió de la misma manera descrita para el estudio del efecto del AMIODER sobre el potencial electroquímico mitocondrial de *L. donovani*, pero en este caso el fluoróforo empleado fue la naranja de acridina a una concentración

final de 5 μM y el tiempo de incubación con los parásitos fue de 5 minutos. La naranja de acridina es un fluoróforo diamidínico que interactúa con el ADN y el ARN por intercalación dentro de la molécula. En los tripanosomatidios, la naranja de acridina se acumula en compartimientos ácidos, como lo son los acidocalcisomas (Serrano y col., 2009a). Tiene picos de excitación y emisión a 488 y 530nm, respectivamente al igual que la Rodamina 123. Transcurrido el tiempo de incubación se eliminó el fluoróforo excedente lavando dos veces en 500 μL de tampón de carga. Los parásitos cargados se añadieron en una cubeta de cuarzo que se colocó en un fluorímetro HITACHI F-7000 con agitación continua y a una temperatura de 29°C. La longitud de onda de excitación del naranja de acridina corresponde a 488 nm, mientras que la emisión se monitorea a 530 nm. Se utilizó nigericina a una concentración de 2 μM (ionóforo intercambiador de H^+ por K^+) como control positivo.

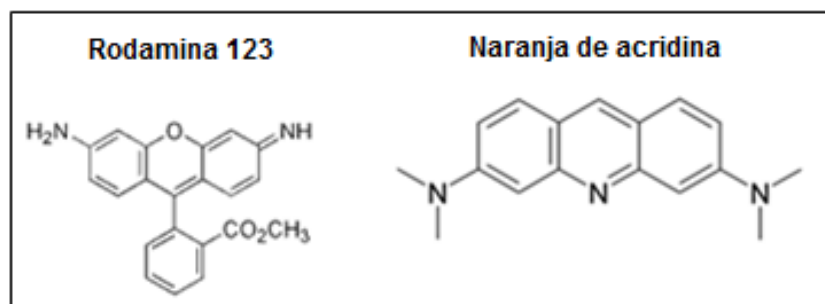


Figura 15. Estructura molecular de la rodamina 123 y la naranja de acridina

4. Resultados

4.1. Efecto del AMIODER sobre la proliferación de promastigotes de *Leishmania donovani*.

Con el objetivo de determinar el posible efecto anti-proliferativo del AMIODER sobre promastigotes de *L. donovani* se realizó una curva de crecimiento en concentraciones crecientes del compuesto (0 - 50 μM), y la proliferación celular se evaluó diariamente mediante contaje directo en una cámara de *Neubauer* hasta alcanzar la fase estacionaria del cultivo. En la Figura 16 se muestra la proliferación celular (promastigotes/ml) en función del tiempo (horas). El resultado obtenido, refleja el efecto dosis-respuesta del compuesto, lo cual significa que a medida que aumenta la concentración de droga, disminuye el número de promastigotes.

A partir del gráfico de la Figura 16, se elaboró una curva dosis-respuesta, en la cual se representa el porcentaje de promastigotes/ml en función de la concentración de AMIODER luego de 96 horas de tratamiento (Figura 17). El IC_{50} obtenido fue de 4,15 μM

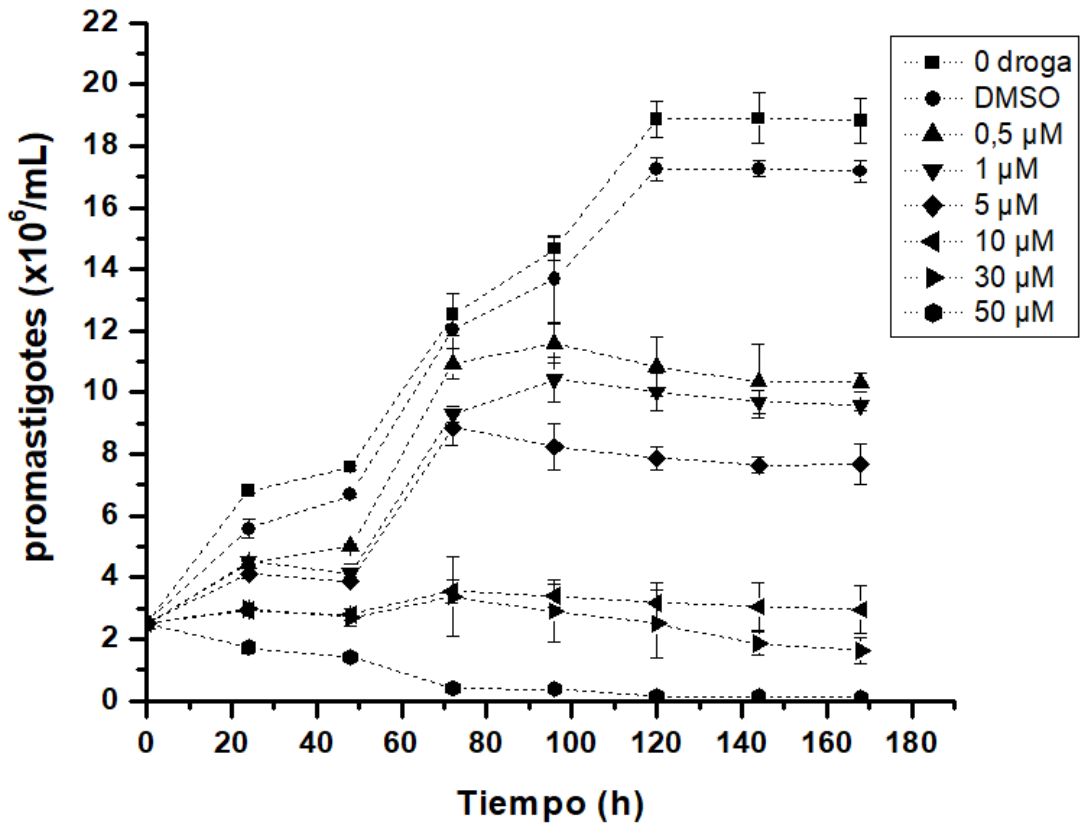


Figura 16. Efecto del AMIODER sobre la proliferación de poblaciones de promastigotes de *Leishmania donovani*. Se representa el número de promastigotes/ml en función del tiempo (horas) para cada concentración de AMIODER (línea con símbolo). Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar (barras) de tres experimentos independientes.

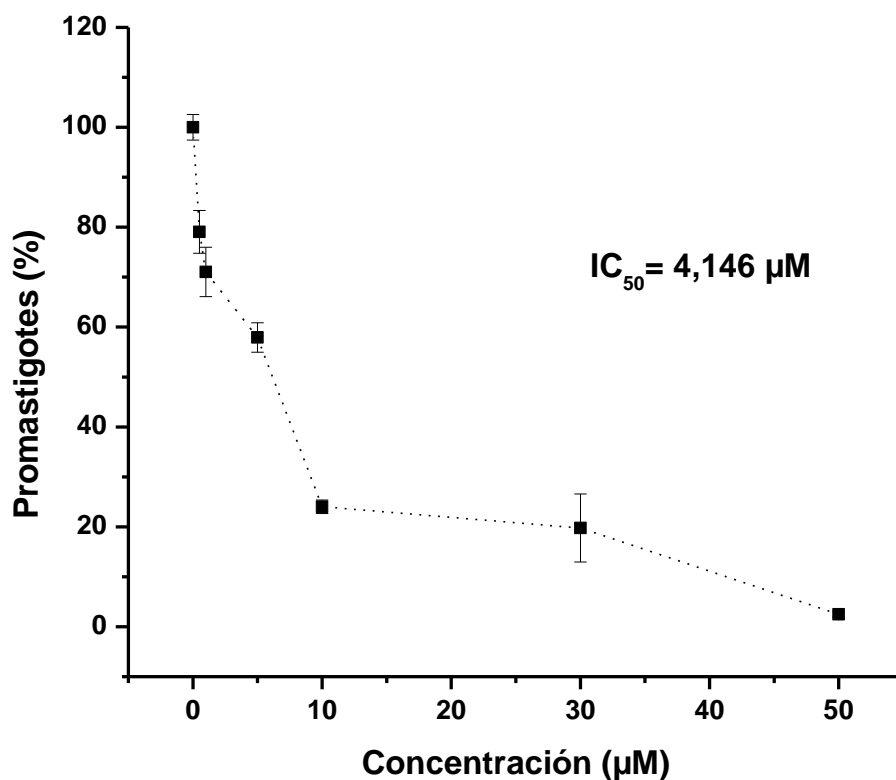


Figura 17. Curva dosis-respuesta luego de 96 horas del tratamiento de promastigotes de *L. donovani* con AMIORDER. Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar (barras) de tres experimentos independientes. $IC_{50} = 4,15 \mu M$.

4.2. Estudio de citotoxicidad del AMIORDER sobre células de mamífero

Con el objeto de determinar el efecto del AMIORDER sobre la viabilidad de células de mamífero, se utilizaron macrófagos como modelo y se empleó el ensayo de MTT como método para determinar la citotoxicidad. Considerando la relación de proporcionalidad entre la absorbancia de los cristales de formazan generados y el número de células viables. No se observó un efecto citotóxico

significativo respecto al control (0 droga) tras la exposición de las células durante 72 h a concentraciones de AMIODER de 0,5 a 5 μM ($p > 0,05$).

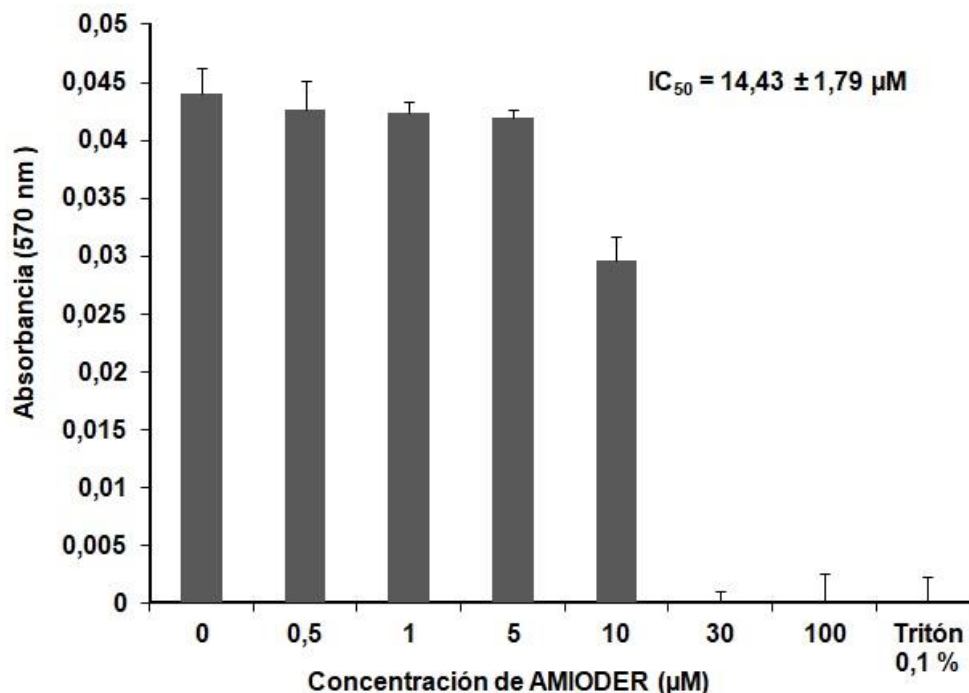


Figura 18. Sensibilidad de macrófagos al AMIODER. Se representa el efecto del AMIODER sobre la viabilidad de macrófagos expuestas a diferentes concentraciones de AMIODER. 48 h después de la adición de la droga se realizó el ensayo de MTT y se determinó la viabilidad de los macrófagos en cada condición (barras), tomando en cuenta el control 0 droga como el valor de absorbancia de máxima viabilidad para este experimento. Las barras representan la desviación estándar ($n=4$).

4.3. Determinación del efecto del AMIODER sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania donovani* en macrófagos infectados

Con el objeto de determinar el efecto del AMIODER sobre la proliferación de amastigotes en el interior de las células de mamífero se realizó una curva de infección empleando macrófagos como células huésped en presencia de concentraciones crecientes de AMIODER (de 0,005 a 5 μM) y con 72 horas de exposición. Los resultados demuestran que esta droga produce la disminución del porcentaje de células infectadas de una forma dosis-dependiente. El IC_{50} estimado a las 72 horas fue 0,141 μM .

4.4. Efecto del AMIODER sobre la homeostasis intracelular de Ca^{2+} en promastigotes de *Leishmania donovani*

Con el objetivo de evaluar el efecto del AMIODER sobre la homeóstasis del Ca^{2+} en promastigotes de *L. donovani* se empleó la fluorimetría como técnica que permitió cuantificar la fluorescencia del fura-2 cuando es excitado por longitudes de onda de 340 y a 380 nm, en respuesta a la adición del AMIODER. Se observó que luego de añadir este análogo de la amiodarona a una concentración de 10 μM , éste produjo un incremento en la relación de fluorescencias a 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 (Figura 14), dicho aumento en la relación 340/380 se interpreta como un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

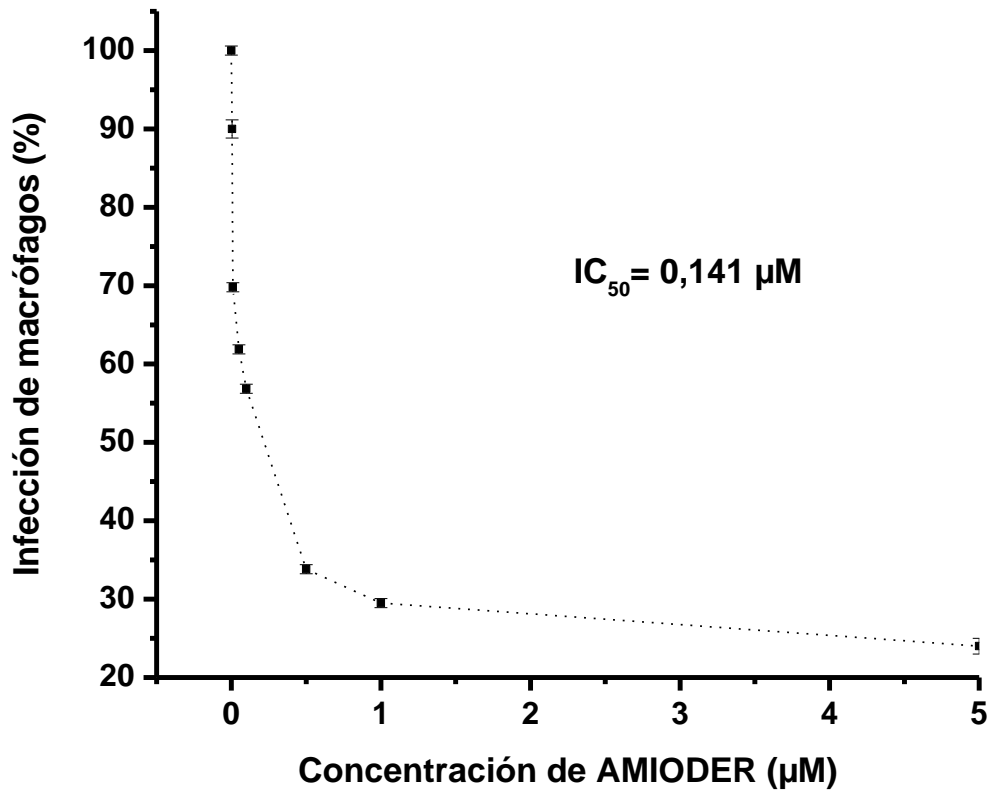


Figura 19. Efecto del AMIODER sobre amastigotes intracelulares de *L. donovani*. Macrófagos infectados con promastigotes de *L. donovani* fueron expuestos a diferentes concentraciones de AMIODER. El porcentaje de macrófagos infectados y el IC₅₀ sobre amastigotes se determinó 72 h después de la adición de la droga. Cada barra representa la desviación estándar de tres réplicas para cada concentración.

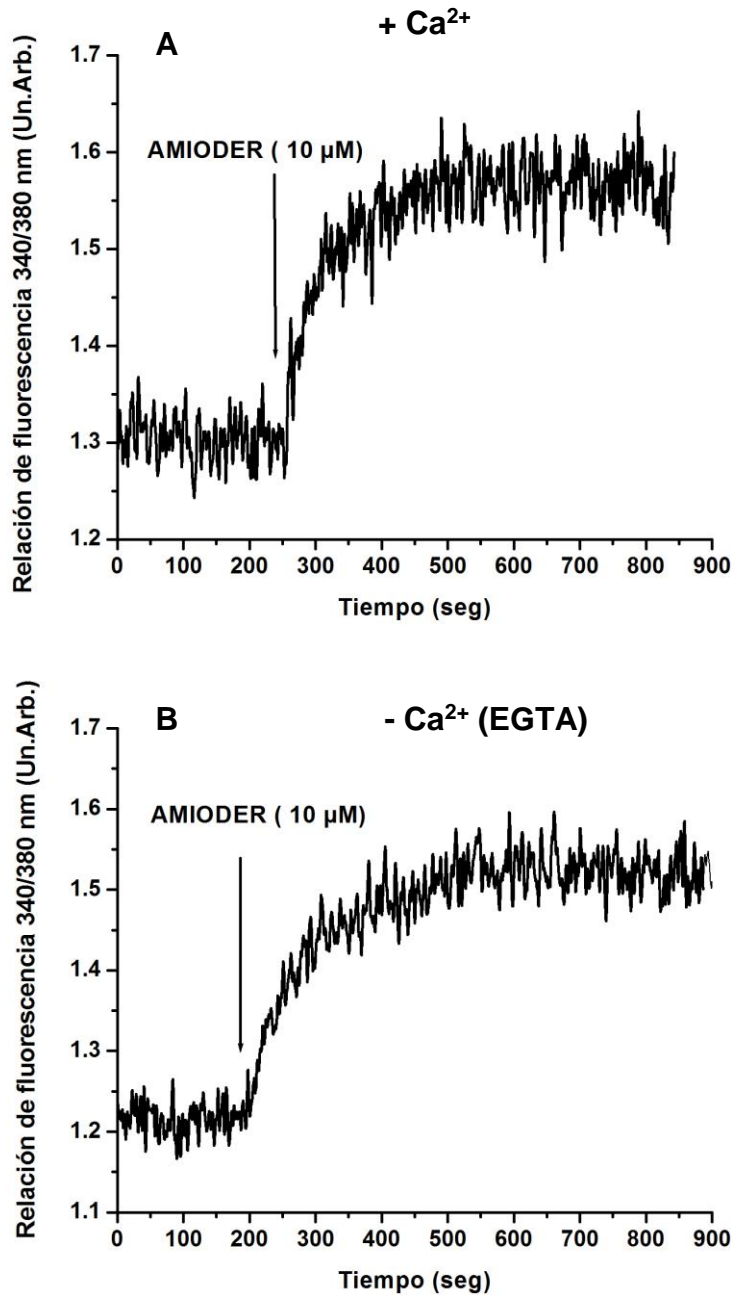


Figura 20. Efecto del AMIODER sobre la $[Ca^{2+}]_i$ de promastigotes de *L. donovani*. (A) Efecto de 10 μ M de AMIODER (flecha) sobre la concentración de Ca^{2+} intracelular en presencia de 2 mM de Ca^{2+} extracelular. (B) Efecto de 10 μ M de AMIODER (flecha) sobre la concentración de Ca^{2+} intracelular en ausencia de Ca^{2+} extracelular (EGTA).

Se muestra el aumento porcentual de la relación de fluorescencia 340/380 al añadir 10 μM de AMIODER a promastigotes de *L. donovani* incubados con Fura-2, tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} extracelular. Se observa que entre ambos casos el aumento de la relación de fluorescencia 340/380 respecto al nivel basal no es estadísticamente significativo.

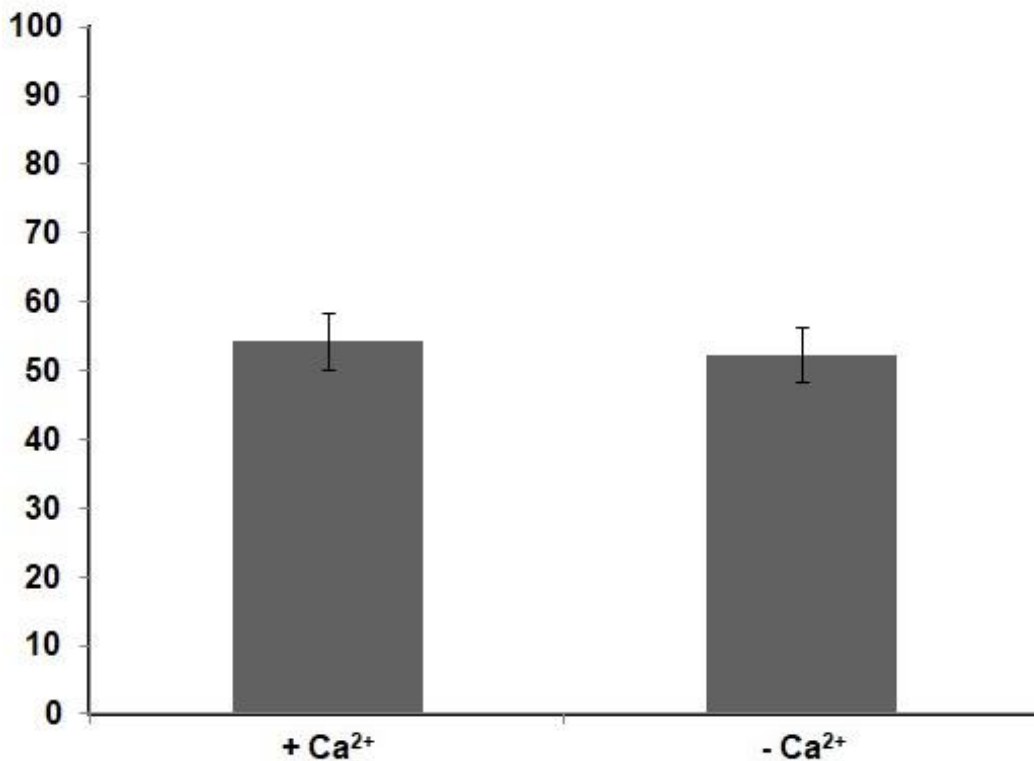


Figura 21. Aumento porcentual de la relación de fluorescencia 340/380 nm al añadir 10 μM de AMIODER a promastigotes de *L. donovani* cargados con Fura 2, luego de alcanzarse un *plateau*. Cada columna representa el resultado de tres experimentos independientes en presencia (izquierda) y ausencia (derecha) de Ca^{2+} extracelular. Las barras en la parte superior de cada columna representan la desviación estándar. La diferencia entre ambos experimentos no son estadísticamente significativas.

4.5. Efecto del AMIODER sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *L. donovani*

Con el objetivo de evaluar el efecto del AMIODER sobre el potencial electroquímico mitocondrial de *L. donovani*, se determinaron los cambios en la fluorescencia de la Rodamina-123 en respuesta a la adición de 2, 5 y 10 μM de AMIODER. Se observó que al añadir la droga en todos los casos hubo un aumento en la fluorescencia de la Rodamina-123. Este efecto fue menor al emplear 2 μM de AMIODER y la respuesta observada en la fluorescencia se incrementa al añadir mayores concentraciones de la droga. La adición posterior del protonóforo FCCP produjo un incremento ulterior en la fluorescencia después del AMIODER, efecto que fue mayor a menor concentración de AMIODER, disminuyendo con el aumento en la concentración de la droga añadida previamente. Invertiendo el orden de adición de estos compuestos, se observó que el FCCP, como era de esperarse, produce un aumento considerable en la fluorescencia. Sin embargo, el FCCP no generó una respuesta máxima ya que la adición posterior de AMIODER indujo aún un ulterior incremento en la fluorescencia de la rodamina 123.

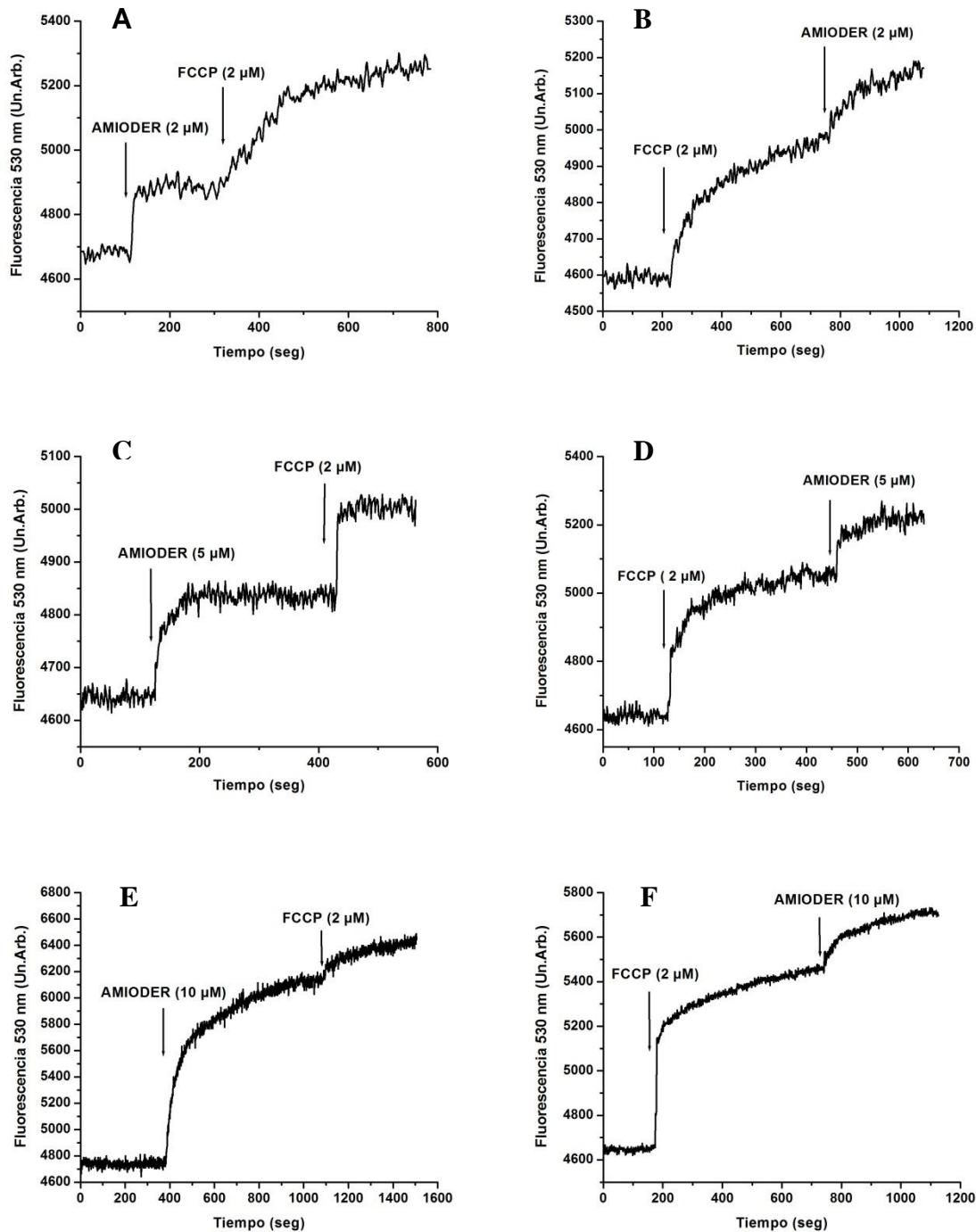


Figura 22. Efecto del AMIORDER sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *L. donovani*. (A) Efecto de 2 μM de AMIORDER seguido de la adición de FCCP (2 μM) (B) Efecto de FCCP a 2 μM y posterior adición de 2 μM de AMIORDER (C) Efecto de 5 μM de AMIORDER seguido de la adición de 2 μM de FCCP. (D) Efecto de 2 μM de FCCP seguido de la adición de 5 μM de AMIORDER. (E) Efecto de 10 μM de AMIORDER y posterior adición de FCCP a 2 μM . (F) Efecto de 2 μM de FCCP seguido del AMIORDER a 10 μM .

Con el objetivo de visualizar el efecto dosis-dependiente del AMIODER sobre el potencial electroquímico mitocondrial, se graficó el aumento en la fluorescencia de la rodamina 123 con respecto al nivel basal de promastigotes tratados con 2, 5 y 10 μM de AMIODER. Tomando en cuenta que la adición de los efectos generados por el AMIODER y el FCCP constituye el 100% de respuesta del sistema, se obtuvo que entre 2 y 5 μM de AMIODER se generó una respuesta no significativa estadísticamente, alrededor de 40%, mientras que la adición del AMIODER a 10 μM generó una respuesta de aproximadamente 80%. Ésta última respuesta es estadísticamente significativas de la respuesta generada a concentraciones de 2 y 5 μM con un $p < 0,01$.

4.6. Efecto del AMIODER sobre la alcalinización de los acidocalcisomas de promastigotes de *L. donovani*

Con el objeto de evaluar el efecto del AMIODER sobre la alcalinización de los acidocalcisomas de promastigotes de *L. donovani*, se empleó la naranja de acridina como fluoróforo, el cual como se indicó, se acumula en compartimientos ácidos, en respuesta a la adición de 1, 5 y 10 μM de AMIODER. Se observó que al añadir la droga hubo un aumento en la fluorescencia, producto de la liberación de la naranja de acridina. Además, el efecto observado fue dosis-dependiente, ya que un incremento en la concentración de la droga añadida generó un aumento proporcional en la fluorescencia. En este sentido, 2 μM de AMIODER produjo una respuesta menor a la generada por 5 μM y ésta concentración, a su vez, generó una respuesta menor a la producida por 10 μM de AMIODER. La adición posterior de nigericina produjo un ulterior aumento en la fluorescencia después de la droga

y la respuesta generada fue dependiente de la concentración de droga usada, siendo mayor a 2 μM de AMIODER, y respectivamente menor luego de 5 y 10 μM de AMIODER. Invertiendo el orden de adición de estos compuestos, se observó que la nigericina produce un aumento en la fluorescencia. Sin embargo, no genera una respuesta máxima ya que la adición posterior de AMIODER genera todavía un incremento en la fluorescencia.

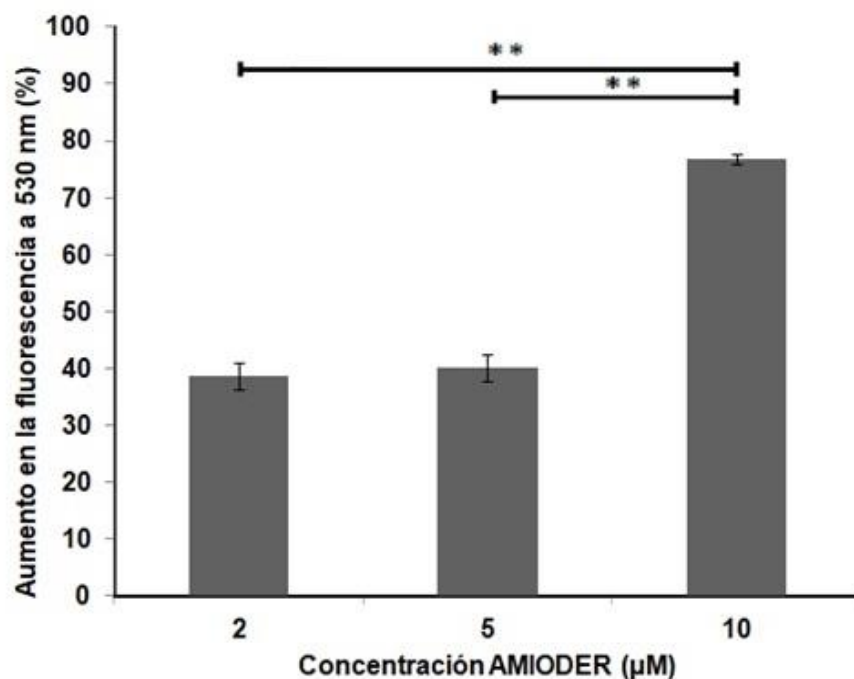


Figura 23. Aumento porcentual de la fluorescencia respecto al nivel basal luego de la adición de AMIODER a promastigotes de *L. donovani* cargados con Rodamina 123. Cada columna representa el resultado de tres experimentos independientes usando una concentración de AMIODER (2, 5 y 10 μM) con las respectivas barras de desviación estándar. Las barras horizontales con doble asterisco indican una diferencia significativa ($p < 0,01$).

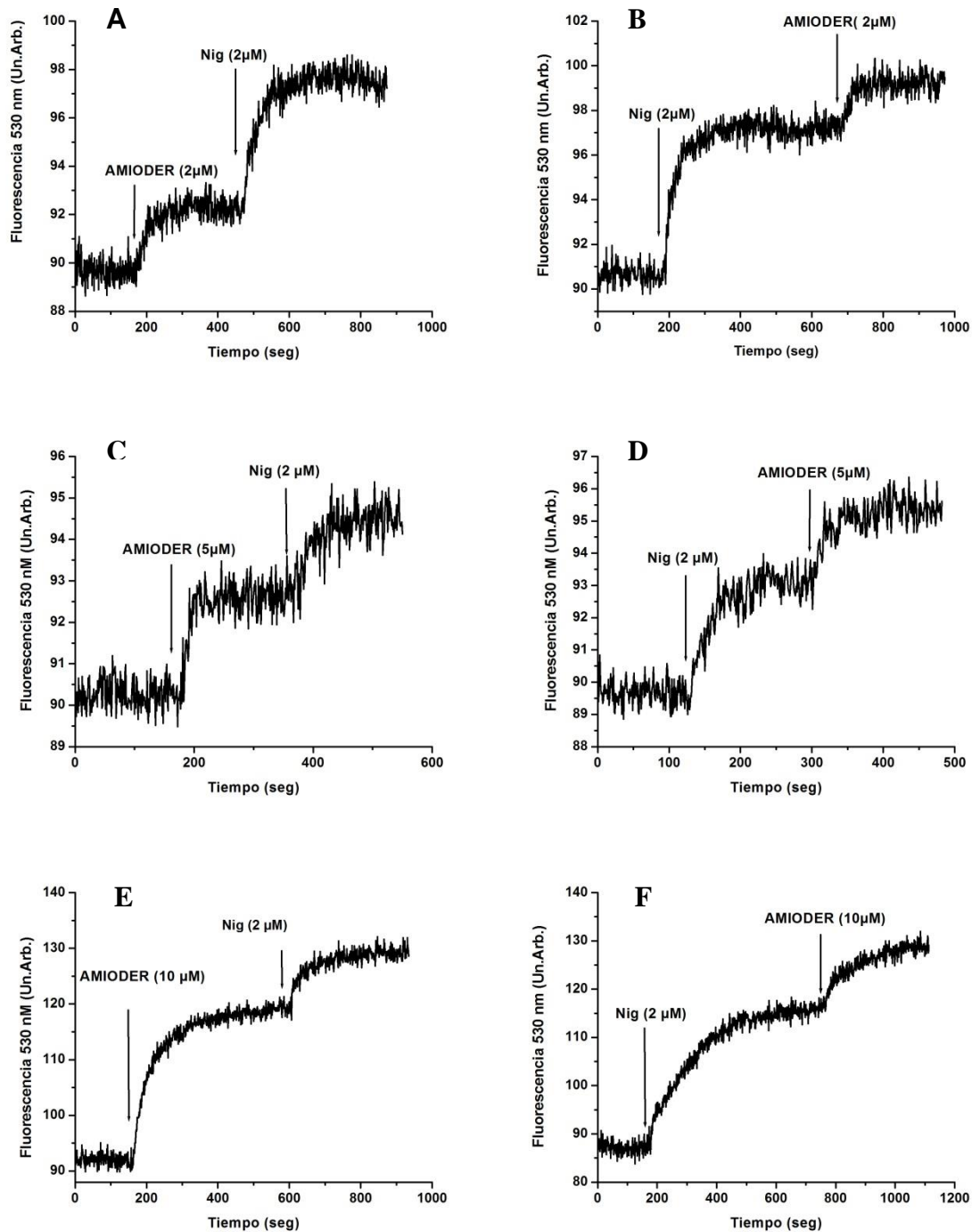


Figura 24. Efecto del AMIORDER sobre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de promastigotes de *Leishmania donovani*. (A) Efecto de 2 μM de AMIORDER seguido de la adición de nigericina (2 μM) (B) Efecto de nigericina a 2 μM y posterior adición de 2 μM de AMIORDER (C) Efecto de 5 μM de AMIORDER seguido de la adición de 2 μM de nigericina. (D) Efecto de 2 μM de nigericina seguido de la adición de 5 μM de AMIORDER. (E) Efecto de 10 μM de AMIORDER y posterior adición de nigericina a 2 μM . (F) Efecto de 2 μM de nigericina seguido de AMIORDER a 10 μM .

En la Figura 25 se muestra la relación entre el grado de alcalinización de los acidocalcisomas de los promastigotes de *L. donovani* y la concentración de AMIODER añadida, como el aumento porcentual de la fluorescencia respecto a la basal en función a la adición de 2, 5 y 10 μM de AMIODER. Se obtuvo que el AMIODER a 2 μM genera aproximadamente un 30% de respuesta, con 5 μM se produjo un 55 % de respuesta y con 10 μM de AMIODER la respuesta generada fue cerca del 75%. Estas respuestas son estadísticamente significativas, como se indica en la leyenda de la Figura

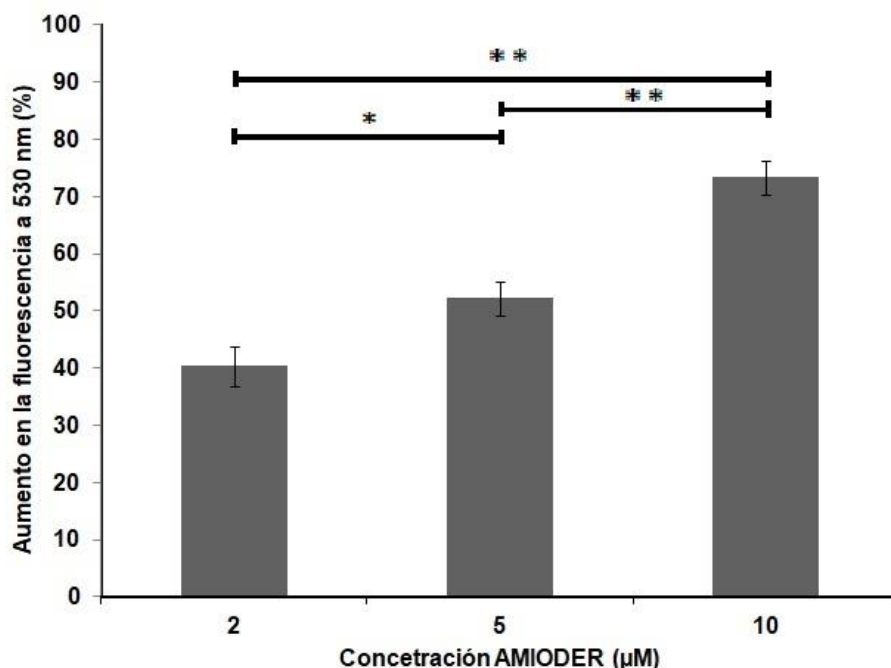


Figura 25. Aumento porcentual de la fluorescencia respecto al nivel basal luego de la adición de AMIODER a promastigotes de *L. donovani* cargados con Naranja de acridina. Cada columna representa el resultado de tres experimentos independientes usando una concentración de AMIODER (2, 5 y 10 μM). Las barras representan el error estándar. Las barras horizontales con asterisco indican una diferencia significativa entre las medias ($p < 0,05$) y el doble asterisco una diferencia significativa $p < 0,01$.

Discusión

Las enfermedades parasitarias tienen un enorme impacto sanitario, social y económico y afectan principalmente a las poblaciones más pobres del mundo. La carga mundial de estas enfermedades se ve agravada por la falta de vacunas, por lo que drogas seguras y eficaces son vitales para su prevención y tratamiento. Por desgracia, cuando se dispone de estas, su utilidad está siendo cada vez más amenazada por parásitos resistentes a drogas. Aún más, las drogas más utilizadas en gran parte del mundo para el tratamiento de la leishmaniasis como lo son el glucantime, el pentostam y la miltefosina, son tóxicas para los pacientes y la última es teratogénica. Todo esto impulsa la investigación para el descubrimiento de nuevas drogas antiparasitarias a nivel mundial (Andrews y col., 2014; Sbaraglini y col., 2016).

La amiodarona, es una droga usada como antiarrítmico cuyo efecto anti-*T. cruzi* (Benaim y col., 2006) y *Leishmanicida* (Serrano-Martín y col., 2009) han sido demostrados y en ambos casos, parte del mecanismo de acción de la droga involucra la alteración de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en estos parásitos. Otra estrategia en la investigación de drogas involucra la síntesis de compuestos *de novo*, con base en las estructuras químicas de diversos agentes que han mostrado especificidad contra blancos en microorganismos de interés clínico. En este sentido, la amiodarona fue empleada por Hejchman y col. en el 2012 como estructura base para la síntesis de diversos compuestos que puedan actuar contra especies de hongos patógenos, obteniendo el derivado AMIODER, el cual actúa como antifúngico y altera la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de *Saccharomyces cerevisiae*, aunque a través

de mecanismos muy diferentes a los observados en el presente estudio, ya que su efecto depende de la presencia de Ca^{2+} extracelular (Hejchman y col. 2012)

Con base en la similitud estructural entre el AMIODER y la amiodarona, y en la actividad comprobada de la amiodarona como agente leishmanicida (Serrano y col., 2009a, Macedo-Silva y col., 2011), así como el efecto de esta droga sobre *T. cruzi* (Pinto y col., 2018b), en éste trabajo se evaluó el efecto del derivado AMIODER sobre la proliferación de promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. donovani* y su posible mecanismo de acción en lo concerniente a la homeostasis del Ca^{2+} intracelular en promastigotes. Se obtuvo que el AMIODER es capaz de inhibir la proliferación de promastigotes de *L. donovani* en cultivo y que dicho efecto anti-proliferativo es dosis-dependiente. De manera que el crecimiento del cultivo disminuye en el tiempo de una forma proporcional a la concentración de droga empleada. El efecto observado sobre la forma del insecto con esta droga fue significativamente mayor al observado en *T. cruzi*. Así, con una concentración de 0,5 y 1 μM de AMIODER, el cultivo alcanza un título celular máximo de aproximadamente la mitad respecto al control; en contraste, en *T. cruzi*, donde solo se alcanza con 5 y 10 μM de AMIODER (Pinto y col., 2018b). Adicionalmente, se observó la inhibición casi total del crecimiento de los promastigotes expuestos a 10 μM de AMIODER, mientras que en *T. cruzi*, la concentración que causó la muerte total de los epimastigotes fue de 30 μM (Pinto y col. 2018b). Cabe destacar que el tratamiento con 50 μM de AMIODER a partir de las 24 horas, induce la aparición de formas redondeadas y condensadas del parásito y no se observó ninguno con forma elongada. Es interesante mencionar, que un efecto morfológico parecido fue observado en presencia de esfingosina en

promastigotes de *Leishmania mexicana* (Benaim y col., 2013) y en *T. cruzi* en presencia de AMIODER (Andrea Pinto, comunicación personal).

En la curva dosis-respuesta obtenida después de 96 horas de tratamiento de los promastigotes de *L. donovani* con las diferentes concentraciones de AMIODER, se obtuvo un IC₅₀ de 4,15 µM, casi tres veces menor que el reportado para *T. cruzi* (Pinto y col., 2018b). Cabe destacar que la curva dosis-respuesta obtenida para las 48 y 72 horas fue similar a las 96 horas. Sin embargo, se decidió colocar la curva a 96 horas ya que es donde se evidencia mejor el efecto dosis-dependiente de la droga. En contraste, también determinamos el efecto del AMIODER sobre macrófagos como células de mamífero modelo, y que además fueron utilizadas en los experimentos de infección con amastigotes. En este experimento no se cuantifica directamente el número de células viables, sino la absorbancia del formazan producido por las células viables mediante el ensayo de MTT, el cual es ampliamente aceptado como un ensayo de viabilidad celular, tomando en cuenta que un cultivo de células eucariotas en fase exponencial de crecimiento, presentan una actividad metabólica constante, y en este sentido, la cantidad de cristales de formazan producidos es proporcional al número de células viables (Riss y col., 2013). Los macrófagos no se encontraron afectados por concentraciones de AMIODER de hasta 10 µM. Por otra parte al emplear concentraciones superiores a 10 µM se observa un efecto citotóxico significativo del AMIODER sobre macrófagos ($p < 0,05$). Adicionalmente se observó que el Tritón - X - 100 (0,1 %), el cual es un detergente que disuelve las membranas celulares (Gaspar, 2016) utilizado como control de lisis celular, inhibe el 100% de

la viabilidad de macrófagos murinos, lo cual ya se alcanza a una concentración de 30 μM de AMIODER.

Con el fin de evaluar si el AMIODER tiene un efecto inhibitorio sobre *L. donovani* en su forma de amastigote, el estadio clínicamente relevante del parásito, se realizó una curva de infección, utilizando macrófagos de origen murino cepa J-774 como células huésped. Luego de 3 horas post-infección aproximadamente, se logra la transformación de los promastigotes en amastigotes, y se inicia el proceso de supervivencia intracelular y multiplicación al interior de las células. Una vez se ha establecido la infección (24 horas post-infección) las células infectadas se expusieron a la acción del compuesto. Este proceso *in vitro* es similar a lo que ocurre en una infección natural cuando el insecto vector inocula los promastigotes, quienes al ingresar a los macrófagos presentes en piel y otros tejidos, se transforman en amastigotes, sobreviven a la respuesta inducida por el macrófago, logrando así establecer la infección y desarrollar la enfermedad (Mesa y col., 2010). Como pudimos observar, los resultados de la infección sobre macrófagos muestran una notable disminución en el porcentaje de células infectadas el cual es directamente proporcional al incremento en la concentración de AMIODER empleada. Es importante destacar que la cantidad de amastigotes presentes en diferentes células fue independiente de la concentración y variaba desde 1 hasta más de 100 amastigotes por célula en el rango de concentraciones desde 0,005 a 5 μM , de manera que no fue posible determinar un promedio de amastigotes por célula en cada concentración en este rango. Aunque el grado de infección de cada célula individual varió ampliamente, se observó una distribución aleatoria de las células infectadas a lo largo de la

lámina y en este sentido fue posible cuantificar el porcentaje de células infectadas, seleccionando al azar campos visuales. Se obtuvo un efecto dosis-dependiente con un IC₅₀ de 0,14 μM, el cual es 10 veces menor que el reportado para *T. cruzi* (Pinto y col., 2018b). Tomando en consideración estos valores de IC₅₀ sobre amastigotes de *L. donovani* y el efecto citotóxico del AMIODER sobre macrófagos a concentraciones de hasta 10 μM, se calculó el índice de selectividad (IS), el cual se determinó como el cociente entre el IC₅₀ de los macrófagos y el IC₅₀ obtenido sobre los amastigotes en macrófagos infectados. Según la definición de IS descrita por Katsuno y col., en 2015, quienes consideran selectivos a compuestos con un IS ≥ 10, se puede concluir que el AMIODER tiene un efecto selectivo importante sobre los amastigotes, siendo este índice para esta droga de 103,07, por lo cual se considera que el AMIODER tiene una potente actividad anti-*Leishmania* (De Gouveia y col., 2017).

Se observa que el IC₅₀ en amastigotes es aproximadamente 30 veces menor que en promastigotes. Esto puede deberse a que los promastigotes están cubiertos por un glicocálix grueso de entre 7 nm y 17 nm de espesor dependiendo si son promastigotes procíclicos o metacíclicos respectivamente. Sin embargo, los amastigotes prácticamente no tienen glicocálix, lo que permitiría el paso del compuesto de una manera más eficiente y rápida (Oliver y col., 2005). Por otra parte, existen diferencias a nivel bioquímico y molecular entre la forma de amastigote y promastigote; en el catabolismo de glucosa, utilización de los ácidos grasos, nucleasas, proteasas de cisteína, metabolismo de purina, fosforilación de proteínas, expresión génica, proteína de superficie de membrana, metaloproteasa

gp63 y el lipofosfoglicano (Croft y Yardley, 2002), que de una u otra forma pudieran estar involucradas en el aumento de eficacia de la droga en este estadio.

Para elucidar el posible mecanismo de acción del AMIODER sobre los promastigotes de *L. donovani*, se estudió el efecto de esta droga sobre la $[Ca^{2+}]_i$ de los promastigotes empleando técnicas de fluorescencia. Éstos últimos, fueron incubados con el fluoróforo Fura-2 AM, el cual al ingresar a las células es transformado a su forma de Fura-2, en donde los grupos acetoximetilos son escindidos por las esterasas inespecíficas intracelulares, quedando de esta manera el fluoróforo secuestrado dentro de la célula y además, libre para su unión al Ca^{2+} . El Fura-2 presenta un espectro de absorción diferencial cuando está libre o unido a Ca^{2+} . Esta característica del indicador permite determinar la asociación en el equilibrio y la $[Ca^{2+}]_i$ a través de la relación entre las emisiones a 510 nm cuando se excita alternativamente en fracciones de segundo a 340 y 380 nm. Esto confiere la gran ventaja de obtener una señal que es independiente del nivel de carga del fluoróforo (Barreto-Chang y Dolmetsch, 2009). Como se explico anteriormente, la ecuación propuesta por Grynkiewicz y col., 1985, permite asumir una relación de proporcionalidad entre la relación entre las fluorescencias de excitación del Fura-2 a 340/380 y la $[Ca^{2+}]_i$. De esta forma, los resultados mostrados, correspondientes al efecto del AMIODER sobre la relación de fluorescencias a 340/380 del Fura-2 en promastigotes de *L. donovani*, y estos son proporcionales a la $[Ca^{2+}]_i$ de los promastigotes. La razón por la cual estos resultados no se mostraron en función a $[Ca^{2+}]_i$ es porque la concentración basal de este catión es muy variable entre réplicas y depende de múltiples factores incluyendo el estado metabólico de los promastigotes en cultivo en el momento en

que se usan y de las soluciones utilizadas para calibrar el método. Es por ello que en trabajos recientes se suele reportar los resultados como los cambios en la relación 340/380, en lugar de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$. En estos experimentos, se obtuvo que la adición del AMIODER a una concentración de 10 μ M produce un incremento en la relación de fluorescencias 340/380 en presencia de Ca^{2+} , indicando que hay un aumento en la concentración intracelular de este catión. Este resultado fue similar al obtenido sin Ca^{2+} en el exterior, utilizando EGTA para “secuestrar” o quelar todo el Ca^{2+} en el exterior de las células lo cual indica que el incremento en la concentración intracelular de este catión es producto de su liberación desde compartimientos intracelulares, al igual que ocurre con los epimastigotes de *T. cruzi* (Pinto y col., 2018b). Con el objeto de determinar cuáles compartimientos podrían estar involucrados en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en los promastigotes de *L. donovani*, se evaluó el efecto que este compuesto podría tener sobre el potencial electroquímico mitocondrial y sobre los acidocalcisomas, como organelos clave en la regulación del Ca^{2+} en *Leishmania sp.* (Benaim y García, 2011).

Se obtuvo que el AMIODER a todas las concentraciones utilizadas en este trabajo disipa el potencial electroquímico mitocondrial, lo cual produce la liberación de la Rodamina 123 acumulada en la mitocondria hacia el citoplasma. Sin embargo, el AMIODER no produce la disipación total del potencial electroquímico mitocondrial, ya que una adición posterior de FCCP genera un ulterior incremento en la fluorescencia. Esto podría ser debido a la mencionada presencia de un grueso glicocalix en la membrana de los promastigotes de *L. donovani*. De hecho, en el caso de *L. mexicana*, este incompleto efecto de la

adición de FCCP posterior al de la droga, es mayor (García-García y col., 2016), en comparación con el parásito estudiado en este trabajo y a la vez, bastante menor que en *T. cruzi* (Benaim y col., 2012), permitiéndonos concluir que la magnitud del efecto final del FCCP depende mucho del parásito. Se observó que el efecto del AMIODER fue dosis-dependiente, obteniéndose a 10 μM prácticamente una respuesta máxima con un aumento ulterior del FCCP mínimo con relación al aumento en fluorescencia de la droga. En los experimentos control, en los que se invierte el orden de adición de los compuestos (FCCP y AMIODER) se obtuvo que el FCCP no disipa por completo el potencial electroquímico mitocondrial, ya que la adición posterior del AMIODER a todas las concentraciones genera todavía cierto efecto sobre el potencial mitocondrial. Esta respuesta observada al añadir la droga después del FCCP es importante, ya que se conoce que el FCCP es un agente que causa una total disipación de potencial electroquímico mitocondrial. Un efecto similar fue obtenido por Benaim y col., 2012, en un trabajo en el cual evalúan el efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre *T. cruzi*. También fue observado en nuestro laboratorio (Benaim y col., 2014) sobre *L. mexicana* e incluso por Pinto y col. en el 2018b, cuando evaluó el AMIODER sobre *T. cruzi*. Esto puede ser explicado, debido a que el flujo significativo y constante de H^+ por parte del FCCP no sea posible, ya que el flujo de pequeñas cantidades de H^+ generan un potencial de membrana positivo en el exterior de la misma, que al no ser acompañados por un cotraión, como por ejemplo Cl^- , comprometería la salida total de los protones a favor de su gradiente electroquímico mitocondrial, debido a que los requerimientos en balance de cargas

no son satisfechos (Nicholls y Ferguson, 1994). Esta necesidad de equilibrio en cargas podría estar causando el lento efecto por parte del FCCP.

Adicionalmente, observamos que el AMIODER induce un incremento en la fluorescencia de parásitos incubados con naranja de acridina, un colorante catiónico que a bajo pH se protona y se agrega en compartimientos ácidos por interacciones electrostáticas. Como se mencionó, este fluoróforo se acumula principalmente en los acidocalcisomas. Así, el AMIODER produce la alcalinización de los acidocalcisomas con la consecuente liberación de la naranja de acridina, siendo el efecto de la droga sobre estos organelos dosis-dependiente. Sin embargo, a las concentraciones empleadas, el AMIODER no produce una alcalinización total de estos organelos ya que la adición posterior de nigericina produce un efecto ulterior sobre los acidocalcisomas (figuras 24A, C Y E). También se obtuvo que al añadir nigericina de forma previa a la adición de AMIODER como control, se produce la alcalinización de los acidocalcisomas, en la que la nigericina sustituye y supera el efecto del AMIODER a una concentración de 2 μ M, pero solo sustituye el efecto de la droga a 5 y 10 μ M mas no lo supera. Sin embargo, la alcalinización de estos compartimientos no fue total, ya que al añadir AMIODER posteriormente a la nigericina hubo un incremento ulterior en la fluorescencia de la naranja de acridina. Este efecto de la droga luego de añadir nigericina sugiere la existencia de otros compartimientos ácidos sobre los cuales el compuesto podría estar actuando, como ha sido reportado por otros compuestos en este mismo sistema por Benaim y col., 2012 y 2014 y por el mismo compuesto en *T. cruzi* (Pinto y col., 2018b). Estos resultados pueden deberse a que la naranja de acridina se acumula en los organelos ácidos, y aunque los

acidocalcisosomas son los organelos acidicos predominantes en tripanosomatidios, existen otros compartimientos como fagolisosomas y/o vacuolas acídicas, los cuales podrían estar acumulando pequeñas cantidades del fluoróforo y provocando su liberación tras la adición de la droga (De Gouveia y col., 2017). También se mostró la relación entre la alcalinización de los acidocalcisosomas de los promastigotes de *L. donovani* y la concentración de AMIODER), como el aumento porcentual de la fluorescencia respecto a la basal en función a la adición de AMIODER. Se obtuvo que el AMIODER a 2 μM genera un 40 % de respuesta, con 5 μM se produjo un 50 % de respuesta y con 10 μM la respuesta generada fue de 75 % lo cual demuestra que a esta última concentración el sistema podría no haber reflejado el efecto máximo de esta droga. En *T. cruzi* (Pinto y col., 2018b) también se realizaron experimentos similares ensayando las concentraciones de AMIODER 5, 10 y 20 μM , en donde aún con 20 μM solo se alcanzaba el 85% de la respuesta.

Evaluando los resultados en conjunto se puede demostrar que la adición de AMIODER a promastigotes de *L. donovani* provoca la liberación parcial de Ca^{2+} al citoplasma desde compartimiento intracelulares, por lo cual, el incremento observado en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en presencia de AMIODER es con toda probabilidad producto de la acción de este fármaco sobre los acidocalcisosomas y sobre las mitocondrias. Es importante resaltar que este efecto es más potente que el reportado para *T. cruzi* por Pinto en el 2018b. Adicionalmente, como se mencionó anteriormente, el IC_{50} encontrado sobre amastigotes en el interior de macrófagos, la cual constituye la fase clínicamente relevante es de 0.14 μM , del orden de 10 veces menor al encontrado en *T. cruzi* (1.0 μM). Todo lo anterior apoya

profundizar estos estudios en busca de derivados del benzofurano basados en la estructura de la amiodarona, orientados hacia la búsqueda de una posible terapia contra la leishmaniasis.

5. Conclusiones

- El AMIODER tiene un efecto inhibitorio dosis-dependiente sobre la proliferación de promastigotes de *L. donovani*.
- El AMIODER tiene un efecto significativo sobre la viabilidad de los amastigotes de *L. donovani* con un IC₅₀ de 0,141 μM. En contraste, ésta droga no posee un efecto citotóxico significativo sobre macrófagos a concentraciones de hasta 10 μM, lo cual le confiere un IS de 103.
- Parte del mecanismo involucrado en el efecto del AMIODER sobre el crecimiento de los promastigotes de *L. donovani* es la alteración de la homeóstasis del Ca²⁺ intracelular, produciendo un incremento en la concentración intracelular de este catión como producto de su liberación desde compartimientos intracelulares.
- El aumento de Ca²⁺ intracelular por parte del AMIODER, es debido a la liberación parcial de este catión desde la mitocondria y los acidocalcisomas, afectando el potencial electroquímico mitocondrial y el grado de alcalinización de los acidocalcisomas respectivamente.

Bibliografía

- **Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.** (2010). *Introducción a la Biología Celular*. Editorial Médica Panamericana, Tercera Edición, Madrid, España
- **Alvar, J.** (1997). *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev.* **10**: 298-319.
- **Barreto-Chang, O. L., Dolmetsch, R. E.** (2009). Calcium Imaging of Cortical Neurons using Fura-2 AM. *J Vis Exp.* **23**:1-3
- **Basselin, M., Denise, H., Coombs, H., Barret, M.** (2002). Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrob. Agents Chemother.***46**: 3731-3738
- **Bakunova, S. M., Bakunov, S. A., Wenzler, T., Barszcz, T., Werbovetz, K. A., Brun, R., Hall, J. E. and Tidwell, R. R.** (2007). Synthesis and in Vitro Antiprotozoal Activity of Bisbenzofuran Cations. *J Med Chem.***50**: 5807-5823.
- **Bakunov, S. A., Bakunova, S. M., Bridges, A. S., Wenzler, T., Barszcz, T., Werbovetz, K. A., Brun, R. and Tidwell, R. R.** (2009). Synthesis and antiprotozoal properties of pentamidine congeners bearing the benzofuran motif. *J Med Chem.* **52**: 5763–5767.
- **Becerril, M.** (2011). *Parasitología Médica*. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A., Tercera Edición, Distrito Federal, México
- **Benaim, G., Bermudez, R., Urbina, J.A.** (1990). Ca²⁺ transport in isolated mitochondrial vesicles from *Leishmania braziliensis* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* **39**:61-8.

- **Benaim, G. and Romero, P.J.** (1990). A calcium pump in plasma membrane vesicles from *Leishmania braziliensis*. *Biochim Biophys Acta*. **1027**: 79-84.
- **Benaim, G., Moreno, S. N. J., Hutchinson, G., Cervino, V., Hermoso, T., Romero, P. J., ... & Docampo, R.** (1995). Characterization of the plasma-membrane calcium pump from *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical journal*. **306**: 299-303.
- **Benaim, G., Sanders, J. M., Garcia-Marchan, Y., Colina, C., Lira, R., Caldera, A. R., Payares, G., Sanoja, C., Burgos, J. M., Leon-Rossell, A., Concepción, J. L., Schijman, A. G., Levin, M., Oldfield, E. and Urbina, J. A.** (2006). Amiodarone has an intrinsic Anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J Med Chem*.**49**: 892-899.
- **Benaim, G., Cervino, V., Hermoso, T., Felibert, P., Laurentin, A.** (1993a). Intracellular calcium homeostasis in *Leishmania mexicana*. Identification and characterization of a plasma membrane calmodulin-dependent Ca²⁺-ATPase. *Biol. Res*.**26**: 141-150.
- **Benaim, G., López-Estraño, C., Docampo, R., Moreno, S.** (1993b). A calmodulin-stimulated Ca²⁺ pump in plasma membrane vesicles from *Trypanosoma brucei*. Selective inhibition by pentamidine. *Biochem J*. **296**: 759-763.
- **Benaim, G., & Garcia, C. R.** (2011). Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishmaniasis—a review. *Trop biom*. **28**: 471-481.

- **Benaim, G., Paniz-Mondolfi, A. E.** (2012). The emerging role of amiodarone and dronedarone in Chagas disease. *Nat Rev Cardiol.* **9**:605-09.
- **Benaim, G., García-Marchán, Y., Reyes, C., Uzcanga, G., & Figarella, K.** (2013). Identification of a sphingosine-sensitive Ca²⁺ channel in the plasma membrane of *Leishmania mexicana*. *Biochem biophys res commun.* **430**: 1091-1096.
- **Benaim, G., García-Marchán, Y., Reyes, C., Uzcanga, G., & Figarella, K.** (2013). Identification of a sphingosine-sensitive Ca²⁺ channel in the plasma membrane of *Leishmania mexicana*. *Biochemical and biophysical research communications.* **430**: 1091-1096.
- **Benaim, G., Casanova, P., Hernandez-Rodriguez, V., Mujica-González, Parra-Gimenez, N., Plaza-Rojas, L., Concepcion, J. L., Liu, Y.L., Oldfield, E., Paniz-Mondolfi, A., and Suarez, A. I.** (2014). Dronedarone, an Amiodarone analog with improved anti-*Leishmania mexicana* efficacy. *Antimicrob Agents Chemother.* **58**:1-8.
- **Bofante, R., & Barroeta, S.** (2002). Leishmanias y leishmaniasis en América con especial referencia en Venezuela. *Barquisimeto: Editorial Lara*, 270.
- **Cabello, R. R.** (2007). *Microbiología y parasitología humana/Microbiology and Human Parasitology: Bases etiologicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias/Etiological Basis of Infectious and Parasitic Diseases*. Ed. Médica Panamericana.
- **Carafoli, E., Penniston, J.** (1985). The calcium signal. *Sci. Am.* **253**:70-78
- **Croft, S. L., Coomb, G. H.**(2003). Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* **19**: 502-508.

- **Croft, S., Sundar, S., Fairlamb, A.** (2006). Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* **19**:111-126
- **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** 2013. Parasites – Leishmaniasis. Atlanta, USA. Disponible en la página web: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/>(Consulta: 5 septiembre de 2017).
- **Davis, A., Kedzierski, L.** (2005). Recent advances in antileishmanial drug development. *Curr Opin Investig Drugs.* **6**: 163-169
- **De Gouveia, Y. M., Hernández-Rodríguez, V., Rodríguez-Durán, J., Suárez, A. I., & Benaim, G.** (2018). Efecto de un metilendioxi-flavonoide aislado de *Iresine diffusa* sobre la viabilidad celular de *Leishmania mexicana* y la homeostasis intracelular del Ca²⁺. *Investigación Clínica* **58**: 334-351.
- **De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I., Rizzuto, R.**(2011). A 40 KDa protein in the inner membrane is de mitochondrial calcium uniporter. *Nature.* **476**:336-340.
- **De Lima, H., Borges, R., Escobar, J., Convit, J.** (2010). Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela: un análisis clínico epidemiológico a nivel nacional y por entidad federal, 1988-2007. *Bol Mal Salud Amb.* **50**: 283-299.
- **Docampo, R., & Vercesi, A. E.** (1989). Ca²⁺ transport by coupled *Trypanosoma cruzi* mitochondria in situ. *J Biol Chem.* **264**: 108-111.
- **Docampo, R., & Moreno, S. N. J.** (1996). The role of Ca²⁺ in the process of cell invasion by intracellular parasites. *Parasit Today.* **12**: 61-65.
- **Docampo, R.** (2011). Acidocalcisomes. *Cell Calcium.* **50**:113-119.
- **Docampo, R., & Moreno, S. N.** (2001). The acidocalcisome. *Mol Biochem Parasitol* **114**:151-159.

- **Docampo, R.** (2008). estructura y función de los acidocalcisomas. *Mensaje Bioquímico*. Universidad Autónoma Nacional de México. Cd Universitaria, México, DF. (<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>). **35**: 11-23.
- **Ebada, S., Edrada, R., Lin, W., Proksch, P.** (2008). Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. *Nat Protoc* **3**:1820-1831
- **Fernández, M., Malchiodi, E., Algranati, I.** (2011). Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania Mexicana* and mammalian cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**: 86-93
- **Ferrari, M., Fornasiero, M., Isetta, A.** (1990). MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Methods.* **131**: 165-172.
- **Gallego, J.** (2006). Manual de parasitología, morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. 1 era Edición. 29-32. Barcelona, España.
- **Gaspar, D. P., Faria, V., Gonçalves, L. M., Taboada, P., Remuñán-López, C., & Almeida, A. J.** (2016). Rifabutin-loaded solid lipid nanoparticles for inhaled antitubercular therapy: Physicochemical and in vitro studies. *Int J Pharm.* **497**: 199-209.
- **Ghannoum, M., Rice, L.** (1999). Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clin Microbiol Rev.* **12**: 501-517.
- **Gordones, P., Ramírez, R., Cervino, V., Uzcanga, G., Benaim, G., Mendoza, M.,** (2017). Evidence of the presence of a calmodulin-sensitive plasma

membrane Ca²⁺-ATPase in *Trypanosoma equiperdum*. *Mol Bio Parasitol.* **213**:1–11.

- **Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y.** (1985). A new generation of calcium indicators with greatly improved fluorescent properties. *J Biol Chem.* **260**: 3440-3450.
- **Hangland, R.** (2002). Handbook of fluorescence Probes and research Products. Molecular Probes, Novena edición, Oregon, USA.
- **Herwaldt, B.** 1999. Leishmaniasis. *Lancet.* **354**: 1191-1199.
- **Hejchman, E., Ostrowska, K., Maciejewska, D., Kossakowski, J., Courchense, J. E.** (2012). Synthesis and antifungal activity of derivatives of 2- and 3-benzofurancarboxylic acids. *J Pharmacol Exp Ther.* **343**:380-388
- **Macedo-Silva, S. T. D., Oliveira Silva, T. L. A. D., Urbina, J. A., Souza, W. D., & Rodrigues, J. C. F.** (2011). Antiproliferative, ultrastructural, and physiological effects of amiodarone on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Mol Bio Inter.* 2011.
- **Mazumder, S., Mukherjee, T., Ghosh, J., Ray, M., & Bhaduri, A.** (1992). Allosteric modulation of *Leishmania donovani* plasma membrane Ca (2+)-ATPase by endogenous calmodulin. *J Bio Chem.* **267**:18440-18446.
- **Mesa, C. V., Muñoz, D. L., Echeverry, M., Velez, I. D., & Robledo, S. M.** (2010). Susceptibilidad in vitro a infección por *Leishmania* y sensibilidad a medicamentos difiere según tipo de macrófagos. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud,* **42**: 200-211.

- **Morales, M. A., Watanabe, R., Laurent, C., Lenormand, P., Rousselle, J. C., Namane, A., & Späth, G. F.** (2008). Phosphoproteomic analysis of *Leishmania donovani* pro-and amastigote stages. *Proteomics*, **8**: 350-363.
- **Moreno, S.N.J y Docampo, R.** 2003. "Calcium regulation in protozoan parasite". *Curr Opin Microbiol.* **6**: 359-364
- **Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., & Saravia, N. G.** (2005). Advances in leishmaniasis. *The Lancet*, **366**:1561-1577.
- **Nicholls, D.; & Ferguson, S.** (1994) Bioenergetics 2. Academic Press Inc; Edición: 2nd Revised Edition
- **Page, R. L., Hamad, B., & Kirkpatrick, P.** (2009). Dronedarone. *Nature Reviews Drug Discovery*, **8**: 769-771.
- **Pandey, S., Suryawanshi, S., Gupta, S., Srivastava, L.** (2005). Chemotherapy of leishmaniasis. Part II. Synthesis and bioevaluation of substituted arylketene dithioacetals as antileishmanial agents. *Eur J Med Chem.* **40**: 751-756.
- **Pigott, D. M., Bhatt, S., Golding, N., Duda, K. A., Battle, K. E., Brady, O. J., & Brownstein, J. S.** (2014). Global distribution maps of the leishmaniases. *Elife*, **3**.
- **Pinto-Martinez, A. K., Rodriguez-Durán, J., Serrano-Martin, X., Hernandez-Rodriguez, V., & Benaim, G.** (2018a) Mechanism of action of miltefosine on *Leishmania donovani* involves the impairment of acidocalcisomes function and the activation of the sphingosine-dependent plasma membrane Ca^{2+} channel. *Antimicrob Agents Chemother.*

- **Pinto-Martinez, A., Hernández-Rodríguez, V., Rodríguez-Durán, J., & Benaim, G.** (2018b). Anti-Trypanosoma cruzi action of a new benzofuran derivative based on amiodarone structure. *Exp Parasitol*.
- **Pratlong, F., Dereure, J., Ravel, C., Lami, P., Balard, Y., Serres, G. & Dedet, J. P.** (2009). Geographical distribution and epidemiological features of Old World cutaneous leishmaniasis foci, based on the isoenzyme analysis of 1048 strains. *Trop Med Int Health*, **14**: 1071-1085
- **Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Benink, H.A., Worzella, T. J., Storts, D., Reid, Y.** (2013). Minor L (Ed.), Cell Viability Assays. In: Sittampalam, G.S., Coussens, N.P., Nelson, H., et al. (Eds.). *Assay Guidance Manual* [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- **Romero Palmera, J., Praderes, G., & Calzolaio, V.** (2012). Leishmaniasis visceral. estudio clínico epidemiológico de una serie de casos en el estado Aragua. Venezuela 2000-2010. *Comunidad y Salud*, **10**.
- **Salazar, M., & Castro, E.** (2001). Leishmaniasis cutánea, mucocutánea y cutánea difusa. Revisión clínica de los casos en el Hospital Regional de Pucallpa de 1997 a 1999. *Dermatol. Peru*, **11**: 21-25.
- **Serrano, X., García, Y., Fernandez, A., Rodriguez, N., Rojas, H., Visbal, G., Benaim, G.** (2009a). Amiodarone Destabilizes Intracellular Ca²⁺ Homeostasis and Biosynthesis of Sterols in *Leishmania mexicana*. *Antimicrob Agents Chemother*. **53**:1403-10.

- **Serrano, X., Payares, G., De Lucca, M., Martínez, J., Mendoza, A., Benaim, G.** (2009b). Amiodarone and Miltefosine Act Synergistically against *Leishmania mexicana* and Can Induce Parasitological Cure in a Murine Model of Cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 5108-5113.
- **Serrano-Martín, X., Payares, G., De Lucca, M., Martínez, J.C., Mendoza-León, A., Benaim, G.**(2009b). Amiodarone and miltefosine act synergistically against *Leishmania mexicana* and can induce parasitological cure in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* **53**:5108-13
- **Sbaraglini, M., Vanrell, M., Bellera, C., Benaim, G., Carrillo, C., Talevi, A., Romano, P.** (2016). Neglected Tropical Protozoan Diseases: Drug Repositioning as a Rational Option. *Curr Top Med Chem.* **16**: 1-22.
- **Silva-Jardim, I., Thiemann, O., Anibal, F.** (2014). Leishmaniasis and Chagas disease chemotherapy: a critical review. *J Braz Chem Soc.* **25**: 1810-1823.
- **Urbina, J. A., & Docampo, R.** (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitol.* **19**: 495-501.
- **The world health Organization (WHO).** (2014). Leishmaniasis. Disponible en la página web: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> (Consulta: 5 septiembre, 2017).
- **The world health Organization report (WHO).**(2004). Changing history. <http://www.who.int/whr/2004/en/index.html> (Consulta: 5 septiembre , 2017).
- **Zerpa, O., Ulrich, M., Borges, R., Rodríguez, V., Centeno, M., Negrón, E., & Convit, J.** (2003). Epidemiological aspects of human and canine visceral

leishmaniasis in Venezuela. *Revista Panamericana de Salud Pública*, **13**: 239-245.