

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

Yetsenia M. De Gouveia^{1,2}, Vanessa Hernández-Rodríguez¹, Jessica Rodríguez-Durán¹, Alírica I. Suárez³ y Gustavo Benaim^{1,2}.

¹Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos. Instituto de Estudios Avanzados IDEA. Caracas, Venezuela.

²Laboratorio de Biofísica. Instituto de Biología Experimental IBE. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

³Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Palabras clave: *Leishmania mexicana*; Ca^{2+} ; flavonoides.

Resumen. El parásito hemoflagelado *Leishmania*, causante de la leishmaniasis, puede generar tres patrones clínicos dependiendo de la especie infectante: leishmaniasis cutánea, mucocutánea o visceral. Esta parasitosis forma parte del grupo de enfermedades tropicales más desatendidas en todo el mundo y afecta principalmente a los países más pobres. El tratamiento actual para dicha enfermedad se basa en el uso de los antimoniales pentavalentes (Glucantime® y Pentostam®), así como otras drogas de segunda línea. Sin embargo, estas drogas poseen efectos tóxicos para los pacientes y con frecuencia se observa que ocurre resistencia a las mismas. En este sentido, varios investigadores han orientado sus esfuerzos en estudiar nuevas drogas como alternativa para la cura de esta enfermedad, realizando diversos estudios con compuestos de origen natural, con el fin de conseguir una acción parasiticida con baja toxicidad en humanos. El propósito de este estudio fue observar el efecto del 5-metoxi, 6,7-metilendioxi-flavona (flavonoide 1), aislado de *Iresine diffusa* (conocida como Valeriana en nuestro país), sobre *Leishmania mexicana*. Se obtuvo un efecto inhibitorio sobre la proliferación celular y disminución del porcentaje de macrófagos infectados con amastigotes de *L. mexicana* ($\text{IC}_{50} = 1,47 \mu\text{M}$), observándose también alteración de la concentración intracelular del Ca^{2+} . De igual forma, el flavonoide 1 tuvo un efecto rápido y total sobre la disipación del potencial electroquímico mitocondrial, así como un efecto directo sobre la alcalinización de los acidocalcisomas sobre los promastigotes de estos parásitos. Los resultados permiten suge-

Autor de correspondencia: Gustavo Benaim. Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos. Instituto de Estudios Avanzados IDEA. Carretera Nacional Hoyo de la Puerta. Valle de Sartenejas. Baruta. Caracas, Venezuela. Teléfono: +58 212 9035120; Correo electrónico: gbenaim@idea.gob.ve.

rir que compuestos como estos pudieran ser líderes como nuevas estructuras químicas a ser ensayadas sobre esta enfermedad.

Effect of a methylenedioxy-flavonoid isolated from *Iresine diffusa* on the cellular viability of *Leishmania mexicana* and the intracellular homeostasis of Ca^{2+}

Invest Clin 2017; 58(4): 334 - 351

Keywords: *Leishmania mexicana*; Ca^{2+} ; flavonoids.

Abstract. The hemoflagellate parasite *Leishmania* is the cause of leishmaniasis, which depending on the infecting species, can generate three clinical patterns: cutaneous, mucocutaneous or visceral leishmaniasis. This parasitosis is one of the most neglected tropical diseases group in the world and mainly affects the poorest countries. Current treatment for this disease is based on the use of pentavalent antimonials (Glucantime® and Pentostam®) as well as other second-line drugs. However, these drugs have toxic effects for patients and frequently the parasite shows resistance. In this sense, several investigators have oriented their efforts to study new drugs as an alternative for the cure of this disease, carrying out research with several compounds of natural origin, in order to achieve a parasitocidal action with low toxicity in humans. In this work, we aimed to study the effect of 5-methoxy, 6,7-methylenedioxy-flavone (Flavonoid 1), isolated from *Iresine diffusa* (known as Valerian in our country), on *Leishmania mexicana*. We obtained an inhibitory effect on cell proliferation and decreased percentage of macrophages infected with amastigotes of *L. mexicana* ($\text{IC}_{50} = 1.47 \mu\text{M}$), also observing alteration on the intracellular Ca^{2+} concentration. Similarly, Flavonoid 1 has a rapid and total effect on the dissipation of the mitochondrial electrochemical potential, as well as a direct effect on the alkalization of the acidocalcisomes on the promastigotes of these parasites. The results suggest that the chemically modified compound could be the basis of a future treatment against this disease.

Recibido: 01-06-2017 Aceptado: 05-10-2017

INTRODUCCIÓN

La familia Trypanosomatidae comprende diferentes géneros de organismos parásitos causantes de importantes enfermedades en humanos y otros mamíferos. Uno de ellos es *Leishmania* sp, un protozooario hemoflagelado intracelular obligatorio, el cual posee dos formas: promastigote y amastigote, siendo éste último la forma

clínicamente relevante. Según la especie de *Leishmania* se puede producir una infección cutánea, mucocutánea o visceral, siendo la primera la forma más frecuente, mientras que la última es la que presenta mayor mortalidad en humanos. En Venezuela se han reportado casos para *L. mexicana* (1), la cual es el agente etiológico de la forma cutánea (2) y mucocutánea (3). Esta parasitosis se contempla dentro del grupo de

enfermedades tropicales desatendidas. En este sentido, unas 350 millones de personas están expuestas al riesgo de contraer la enfermedad en 88 países del mundo; en su mayoría se trata de personas en situación de pobreza en áreas de escasos recursos económicos o con mala distribución de sus riquezas (4).

Los tripanosomatidios poseen una red de señalización dependiente del Ca^{2+} , que incluye mecanismos para el aumento del Ca^{2+} citosólico, y también para regresar esta concentración a su nivel basal. Sin embargo, estos parásitos poseen dos estadios que dependiendo de su localización (extracelular o intracelular) encuentran una concentración de Ca^{2+} muy variable. Se ha demostrado que estos parásitos poseen mecanismos muy eficientes para la regulación de este catión durante cada uno de esos estadios y durante el proceso de diferenciación (5). El Ca^{2+} juega un papel crucial en la regulación de muchos procesos importantes para la viabilidad celular (6). A nivel de la membrana plasmática, ha sido reportado que una Ca^{2+} -ATPasa (PMCA) es estimulada por calmodulina en *T. cruzi* (7), *T. brucei* (8) y diferentes especies de *Leishmania* (9, 10). En todos estos parásitos, la regulación del Ca^{2+} citoplasmático está garantizada por la participación de tres organelos: la mitocondria gigante única, que representa el 12 % del volumen total, el acidocalcisoma -un organelo ácido dedicado a la acumulación de pirofosfatos e involucrado en la bioenergética del parásito- y el retículo endoplasmático (5). Dada la importancia del Ca^{2+} en tripanosomatidios, así como el hallazgo de importantes diferencias en los mecanismos de regulación de este catión con respecto a células de mamífero, se ha postulado que la homeóstasis intracelular del Ca^{2+} podría ser considerada como blanco terapéutico contra estos parásitos (5).

Desde el punto de vista terapéutico, los fármacos actualmente recomendados para el tratamiento de la leishmaniasis, incluye los an-

timoniales pentavalentes estibogluconato de sodio (Pentostam®) y antimoniato de meglumina (Glucantime®), los cuales tienen efectos tóxicos en el ser humano, específicamente sobre riñón, corazón e hígado (11) aunando el hecho de que algunas cepas ofrecen resistencia a los mismos. Además, se encuentran las drogas de segunda línea tales como: la anfotericina B, la pentamida, la paramomicina y la miltefosina, las cuales, al igual que los antimoniales pentavalentes, poseen efectos secundarios (12). En vista de la toxicidad de estas drogas utilizadas en la quimioterapia contra la leishmaniasis, se ha hecho necesario intensificar la investigación en la búsqueda de nuevas drogas como alternativa para la cura de esta enfermedad. Así, se han propuesto compuestos derivados de plantas, tales como los flavonoides, un grupo amplio de compuestos polifenólicos que poseen un núcleo básico de flavano con dos anillos aromáticos interconectados por un anillo heterocíclico de tres átomos de carbono. Estos compuestos se encuentran naturalmente en vegetales y frutas, siendo componentes importantes de la dieta diaria. Además, se sabe desde hace mucho tiempo que los flavonoides ejercen diversos efectos biológicos como antioxidantes, agentes anticancerígenos, antimicrobianos, etc. (13). Se han realizado muchos estudios con el fin de estudiar la actividad de flavonoides contra los protozoarios que afectan más frecuentemente a los seres humanos, tales como *Plasmodium*, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Entamoeba*, *Giardia* y *Trichomonas* (14).

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

actividad antileishmanial *in vitro* de 20 chalconas aisladas de plantas contra promastigotes de *L. donovani*, *L. infantum*, *L. enriettii* y *L. major*, y contra amastigotes de *L. donovani* en macrófagos murinos, la mayoría de los compuestos fueron activos contra el parásito extracelular con IC_{50} entre 0,07 y 2,01 $\mu\text{g/mL}$ (16). Por otro lado, flavonoides glicosidos también han sido reportados con actividad antileishmanial *in vitro*. Los más potentes fueron fisetina, 3-hidroxi-flavona, luteolina y quercetina con valores de IC_{50} de 0,6; 0,7; 0,8 y 1,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente; sólo la quercetina inhibió en un 15,3 % la infección en ratones Balb/c inoculados con *L. donovani* (17). Otros investigadores encontraron que este tipo de flavonoides poseen la capacidad para estimular mecanismos de defensa en células infectadas con *Leishmania*, ya que inducen la liberación de TNF (factor de necrosis tumoral) e IL-6, esenciales en la proliferación y diferenciación de las células inmunocompetentes (18).

Trabajos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la amiodarona, un conocido antiarrítmico (19), así como la dronedarona, su derivado menos tóxico (20), generan un colapso del gradiente electroquímico mitocondrial en *L. mexicana*, lo cual eleva los niveles de Ca^{2+} citoplasmático, debido a la salida del catión desde la mitocondria (21). Tomando en cuenta estos antecedentes, nos propusimos estudiar el efecto antiparasitario de un flavonoide aislado por primera vez de *Iresine diffusa* (una planta conocida en nuestro país como valeriana por sus propiedades sedantes) (22) y su posible mecanismo de acción sobre promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* a través de la regulación del Ca^{2+} intracelular. En el presente trabajo se demostró que el 5-metoxi, 6,7-metilendioxi-flavona (Flavonoide 1, fig. 1), tiene una relativamente alta efectividad sobre la viabilidad celular de promastigotes de estos parásitos, siendo mayor sobre amastigotes en el interior de macrófagos. También se observó que este flavonoide

incrementa la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), afectando tanto la mitocondria como los acidocalcisomas del parásito.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos utilizados

Las soluciones y medios de cultivo se prepararon utilizando reactivos provenientes de diferentes casas comerciales: SIGMA (St. Louis, MO), BIO-RAD, GibcoBRL (MD, EEUU) y Molecular Probes Inc. OR. El medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium) y el suero fetal bovino (SFB) activado fueron adquiridos de GibcoBRL (MD, EEUU). El dimetil-sulfóxido (DMSO), el carbonilcianuro-p-trifluoro,metoxi-fenil hidrazona (FCCP), la nigericina, el MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio) la penicilina y la estreptomycin se obtuvieron a través de SIGMA (St. Louis, MO). El fura 2-AM, la rodamina 123 y la naranja de acridina fueron adquiridos de Molecular Probes Inc. (OR).

El flavonoide 1 fue purificado siguiendo el protocolo descrito por Suárez y col (22). El compuesto fue disuelto en DMSO, cuya concentración nunca fue mayor al 0,05 % en todos los ensayos.

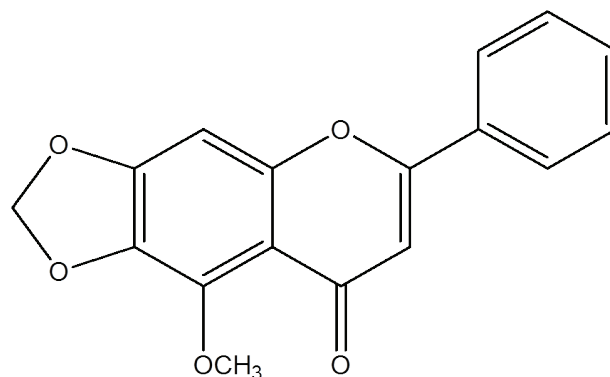


Fig. 1. Estructura química del 5-metoxi, 6,7-metilendioxi-flavona (flavonoide 1). Tomado de (22).

Cultivos celulares

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

Los macrófagos de la línea celular J774-G8 provenientes de sarcoma de ratón (23) se cultivaron en frascos T-25 con medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % SFB activado, 1 % de penicilina/estreptomicina y 1 % de L-glutamina. Los cultivos se mantuvieron a 37 °C y 7 % de CO₂. Los macrófagos murinos utilizados en el experimento de infección se cultivaron en el medio de cultivo DMEM, suplementado con 10 % de SFB inactivado por calor (60 °C, 30 min), 1 % penicilina/estreptomicina y 1 % L-glutamina.

Evaluación del crecimiento poblacional de promastigotes de *Leishmania mexicana*

La susceptibilidad de los promastigotes de *L. mexicana* al flavonoide 1 se realizó a través de la determinación del crecimiento poblacional de los parásitos en ausencia y presencia de concentraciones crecientes del compuesto. Brevemente, un inóculo inicial de 2×10^6 promastigotes/mL fue colocado en medio de cultivo LIT suplementado, en una placa de cultivo de 24 pozos. Posteriormente, se agregó a cada pozo las diferentes concentraciones del flavonoide. La proliferación celular se determinó diariamente mediante el conteo directo en una cámara de Neubauer, hasta alcanzar la fase estacionaria del cultivo. Se incluyó un control al cual no se le agregó compuesto. Seguidamente, el IC₅₀ se determinó mediante el programa GraphPad Prism 5. Para ello, se aplicó una regresión no lineal de los datos normalizados a las 48 horas de tratamiento versus el logaritmo de las concentraciones

utilizadas del compuesto.

Evaluación de la citotoxicidad sobre macrófagos J774-G8

Con el objeto de evaluar el efecto del flavonoide 1 sobre la citotoxicidad en macrófagos, se prepararon concentraciones del compuesto. Utilizando una placa de ELISA de 96 pozos, se procedió a la inoculación de 5.000 células/pozo y, posteriormente, se agregaron 10 µL de las diluciones seriadas del compuesto. Se incluyó un blanco (medio DMEM) y un control positivo (Tritón X-100 0,1 %) en cada pozo, utilizando cuatro réplicas para cada condición. Luego, la placa ELISA fue incubada en una cámara de CO₂ (7 %) por 72 horas; seguidamente, se centrifugó a 4 °C por 20 minutos a 1600 xg, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 100 µL de MTT (0,5 mg/mL en PBS). Se incubó en oscuridad por 4 horas a 37 °C, en atmósfera de CO₂ (7 %). Posteriormente, se centrifugó durante 10 minutos a 1600 xg, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 100 µL de DMSO (24). Finalmente, se realizó la lectura de la absorbancia a 570 nm en un lector de ELISA. Cabe destacar que el valor de la absorbancia obtenida con el Tritón X-100 0,1 % se restó a todas las concentraciones utilizadas del compuesto. El Tritón es un detergente no iónico que desnaturaliza las membranas celulares causando lisis celular (25). Por otra parte, el ensayo de citotoxicidad en promastigotes de *L. mexicana* se realizó siguiendo los mismos pasos descritos anteriormente, con la diferencia que se utilizó digitonina 80 µM como blanco y miltefosina 15 µM como control positivo. Se colocaron 3×10^5 parásitos/pozo en la placa de cultivo de 96 pozos.

Finalmente, el IC₅₀ se determinó mediante el programa GraphPad Prism 5, aplicando una regresión no lineal de los datos normalizados a las 72 horas de tratamiento versus el logaritmo de las concentraciones utilizadas del compues-

to. Además, el índice de selectividad (IS) se determinó como el cociente entre el IC_{50} de los macrófagos y el IC_{50} obtenido sobre los amastigotes en macrófagos infectados (26).

Infección de macrófagos con promastigotes de *Leishmania mexicana*

Para la evaluación del compuesto sobre los macrófagos infectados con amastigotes de *L. mexicana*, se procedió según el método descrito previamente (20), con modificaciones. Se colocó en una placa de cultivo de 12 pozos, una laminilla estéril de vidrio cubreobjeto por cada pozo y se agregaron 15.000 macrófagos/pozo en medio de cultivo DMEM (suplementado con SFB inactivado al 10 %, 1 % penicilina/estrep-tomicina y 1 % L-glutamina). Seguidamente, se incubaron las placas con los macrófagos durante 24 horas en una cámara, a 37 °C y 7 % de CO_2 . Transcurrido el tiempo de incubación, se agregó un volumen de parásitos para obtener una proporción de 10 parásitos/célula; es decir, $1,5 \times 10^5$ parásitos. Luego, se incubaron las placas en una cámara a 37 °C y 7 % CO_2 , durante 3 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró el medio de cada pozo y se realizó un lavado con PBS. Se añadió 1 mL de medio de cultivo DMEM, suplementado con las concentraciones del flavonoide 1 deseada por pozo. Seguidamente, se incubaron las placas en una cámara a 37 °C y 7 % CO_2 , durante 48 horas. Finalizado el período de incubación, se retiró el medio de cultivo DMEM de cada pozo y se realizó un lavado con PBS estéril, con el fin de eliminar macrófagos no adheridos a la laminilla de vidrio cubreobjeto y promastigotes que no infectaron a los macrófagos. Se fijaron los macrófagos infectados con metanol 100 % frío y se dejó secar aproximadamente 30 minutos. Los macrófagos fijados se tiñeron con el colorante Giemsa (previamente filtrado y diluido 2/3 en PBS). Finalmente, una vez teñidas las células, se fijó el vidrio cubreobjeto a una lámina portaobjeto y

se procedió a contar en un microscopio de luz, utilizando el objetivo de inmersión (100X). El conteo se realizó contando 10 macrófagos por 10 campos (100 macrófagos en total). Asimismo, el IC_{50} se determinó mediante el programa GraphPad Prism 5, aplicando una regresión no lineal de los datos normalizados las 48 horas de tratamiento versus el logaritmo de las concentraciones utilizadas del compuesto. Se realizaron tres experimentos independientes con las diferentes concentraciones del flavonoide, contándose cada condición (en cada experimento independiente) por triplicado.

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

Las determinaciones de la $[Ca^{2+}]_i$ se realizaron utilizando el derivado acetoximetilado del fura-2 (fura 2-AM), el cual es hidrolizado a fura 2 por las esterasas presentes en el citoplasma del tripanosomatidio. Así, cada molécula de fura 2 se une a un único ión Ca^{2+} presente en el citoplasma (27). Para realizar la determinación de la $[Ca^{2+}]_i$, se partió de una suspensión de parásitos (10^7 promastigotes/mL). Se centrifugó a 600 xg durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en tampón *Tyrode* (145 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 1,8 mM $CaCl_2$, 10 mM Hepes, 11 mM glucosa). Asimismo, se cargó con fura 2-AM (1 μ M), 2,4 μ L probenecid (500 mM) y 1,25 μ L ácido plurónico 10 %. Posteriormente, se incubó a 29 °C por 3 horas en agitación constante (450 rpm en un *Thermomixer Compact*) y en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó a 600 xg por 3 min y se realizaron dos lavados con tampón *Tyrode*. Luego, se añadieron 2,4 μ L de probenecid a 500 mM. Finalmente, se colocó la suspensión en una cubeta de cuarzo y se midió la respuesta en un fluorímetro *Hitachi F-7000*, con agitación constante y a 29 °C, utilizando los efectores correspondientes y en orden sucesivo,

el flavonoide 1; digitonina (40 μ M), el cual es un detergente que permeabiliza la membrana y 10 μ L de EGTA a 1 M, el cual es un quelante de Ca. Adicionalmente, para determinar la $[Ca^{2+}]_i$ en ausencia de Ca^{2+} extracelular, se realizó el mismo procedimiento mencionado previamente con la diferencia que se utilizó tampón Tyrode sin $CaCl_2$. Además, antes de la medición, se añadió EGTA en la cubeta de cuarzo a una concentración final de 2 mM. Durante la medición en el fluorímetro, pasado el tiempo de adición del compuesto, se añadió $CaCl_2$ (2 mM), luego la digitonina (40 μ M) y por último 10 μ L de EGTA a 1 M. Cabe destacar que los resultados se reportan como la relación de fluorescencia (340/380) versus tiempo (segundos). La proporcionalidad entre la relación de las fluorescencias (340/380) y la $[Ca^{2+}]_i$ ha sido descrita en la ecuación propuesta por Grynkiewicz y col en 1985 (28).

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

Posteriormente se procedió a estudiar si el flavonoide 1 tenía algún efecto sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes del parásito. Para ello se empleó el fluoróforo rodamina 123, el cual es una molécula permeante celular, catiónica, que es secuestrada y acumulada fácilmente por la mitocondria activa sin inducir efectos de citotoxicidad (27). Este fluoróforo, específico de mitocondria (29), permite la visualización del estado de potencial electroquímico de este organelo (30). La rodamina 123 posee un espectro de excitación a 488 nm y un espectro de emisión a 530 nm (30). Inicialmente, una suspensión de parásitos (10^7 promastigotes/mL) fueron cargados con 20 μ M de rodamina 123 en PBS, 1,8mM $CaCl_2$ y glucosa al 1 % (tampón de carga). Posteriormente, se incubó a 29 °C por 10 minutos en agitación constante (450 rpm en un *Thermomixer Compact*) y en oscuridad. Pasado el tiempo de in-

cubación, se centrifugó a 600 xg por 3 minutos y se realizaron dos lavados con el tampón de carga. La suspensión se agregó en una cubeta de cuarzo para su medición en el fluorímetro *Hitachi F-7000* con agitación constante y a 29 °C, utilizando los diferentes efectores. El FCCP, el cual es un protonóforo que desacopla la fosforilación oxidativa de la cadena transportadora de electrones y colapsa la diferencia de potencial electroquímico mitocondrial, se utilizó a 2 μ M, como control experimental. Finalmente, se realizó un gráfico de barras en el cual se representa los cambios de la fluorescencia en porcentaje versus las concentraciones estudiadas. Esta gráfica se realizó tomando en cuenta que la adición de los efectos generados por el FCCP a 2 μ M (seguido por la adición del flavonoide) constituye el 100 % de respuesta del sistema. La significancia estadística entre las barras, se determinó mediante la prueba *t de Student*, en la cual $p \leq 0,05$ refleja resultados estadísticamente significativos.

Determinación del efecto del flavonoide 1 sobre los acidocalcisomas de promastigotes de *Leishmania mexicana*

Con el fin de estudiar el efecto del flavonoide 1 sobre los acidocalcisomas de estos parásitos, se empleó el fluoróforo naranja de acridina, el cual se acumula en compartimientos ácidos. Si el compuesto presenta algún efecto sobre los acidocalcisomas, se observará la liberación del fluoróforo, reflejado en un aumento de la fluorescencia cuando se excita a 488 nm y se cuantifica la emisión a 530 nm (30). Inicialmente, una suspensión de parásitos (107 promastigotes/mL) fueron cargados con 5 μ M de naranja de acridina en tampón de carga utilizado anteriormente para la rodamina 123 (descrito en el párrafo anterior). Posteriormente, se incubó a 29 °C por 10 minutos en agitación constante (450 rpm en *Thermomixer Compact*) y en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó a

600 xg por 3 minutos y se realizaron dos lavados con tampón de carga. La suspensión se agregó en una cubeta de cuarzo para su medición en el fluorímetro *Hitachi F-7000* con agitación constante y a 29 °C, utilizando los efectores correspondientes: La nigericina (2 µM) (control), la cual es un ionóforo que cataliza el intercambio electroneutro de K^+/H^+ , fue utilizada para observar la alcalinización de los acidocalcisomas. Finalmente, con respecto al procesamiento de los resultados, se realizó un gráfico de barras en el cual se representa los cambios de la fluorescencia en porcentaje versus las tres concentraciones estudiadas. Dicha gráfica se realizó tomando en cuenta que la adición de los efectos generados por la nigericina a 2 µM, seguido por la adición del flavonoide 1, constituye el 100 % de respuesta del sistema. La significancia estadística entre las barras, se determinó mediante la prueba *t de Student*, en la cual $p \leq 0,05$ refleja resultados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

Efecto del flavonoide 1 sobre el crecimiento de poblaciones de promastigotes de *Leishmania mexicana*

Con el objeto de determinar el posible efecto del flavonoide 1 sobre el crecimiento de *Leishmania mexicana*, poblaciones de promastigotes de este parásito fueron expuestas a concentraciones crecientes de la droga, evaluando la proliferación celular diariamente. En la figura 2 se muestra que el compuesto tiene un efecto inhibitorio dosis-dependiente sobre la proliferación de *L. mexicana*. Se estimó un IC_{50} de 12,6 µM a las 48 horas del crecimiento celular.

Efecto citotóxico del flavonoide 1 sobre la viabilidad celular de macrófagos J774-g8 y promastigotes de *Leishmania mexicana*

Con el fin de comparar el efecto del flavonoide 1 sobre parásitos y compararlo con la célula

huésped, se determinó el efecto citotóxico del compuesto sobre la viabilidad celular de macrófagos J774-G8 y promastigotes de *L. mexicana*, mediante el uso del ensayo de MTT. Los resultados mostrados en la figura 3A indican que el compuesto posee un relativamente bajo efecto citotóxico sobre los macrófagos, observándose solo una diferencia significativa con respecto al control a partir de 50 µM ($p \leq 0,05$) y estimando un IC_{50} de 70,9 µM luego de 72 horas de incubación. En contraste, con promastigotes de *L. mexicana* se obtuvo un efecto dosis-dependiente, con un IC_{50} de 20,7 µM (fig. 3B).

Efecto del flavonoide 1 sobre macrófagos J774-G8 infectados con amastigotes de *Leishmania mexicana*

Es muy importante evaluar el efecto de una nueva droga potencial en macrófagos infectados con *L. mexicana*, ya que esta es la fase clínicamente relevante del parásito. Macrófagos murinos de la línea celular J774-G8 fueron infectados con amastigotes de *L. mexicana* y se realizó una curva de infección (fig. 4), en la cual se observan los datos normalizados del porcentaje de infección de los macrófagos en función de concentraciones crecientes del compuesto. El resultado obtenido muestra que el flavonoide 1 disminuye el porcentaje de células infectadas con amastigotes de una forma dosis-dependiente. Se calculó que a las 48 horas de exposición, el IC_{50} obtenido fue de 1,47 µM. Comparando el valor obtenido del IC_{50} sobre macrófagos (70,9 µM) con este valor, se puede calcular el índice de selectividad (IS), el cual resultó ser de 48,23, demostrándose que existe un efecto selectivo sobre los amastigotes, según la definición de IS descrita por Katsuno y col. en 2015 (26), quienes consideran selectivos a compuestos con un $IS \geq 10$.

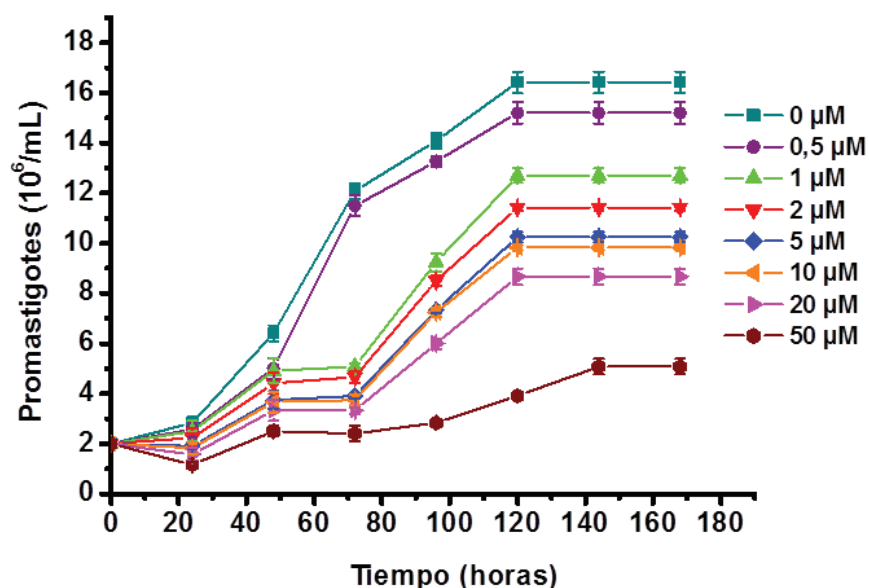


Fig.2. Efecto del flavonoide 1 sobre el crecimiento de poblaciones de promastigotes de *L. mexicana*. Los parásitos fueron sometidos a concentraciones crecientes del compuesto y se monitoreó el crecimiento hasta alcanzar la fase estacionaria del cultivo. Cada punto representa el promedio \pm DS de tres experimentos independientes.

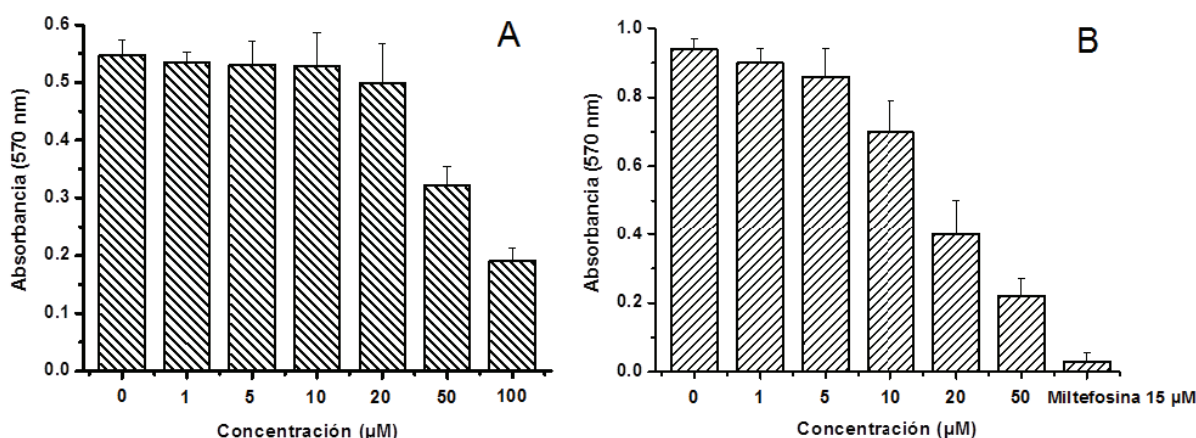


Fig.3. Efecto citotóxico del flavonoide 1 sobre la viabilidad celular de macrófagos J774-G8 y promastigotes de *L. mexicana*. Las células y los parásitos fueron tratados con concentraciones crecientes del compuesto. (A) Para el caso de las células, se utilizó como blanco el Tritón X-100 0,1 %. (B) En el ensayo con parásitos se utilizó un control negativo (ausencia del compuesto), un control positivo (miltefosina 15 µM) y como blanco la digintonina a 80 µM (ver Materiales y Métodos).

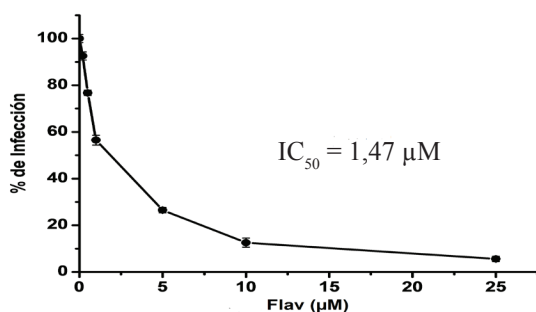


Fig. 4. Efecto del flavonoide 1 sobre macrófagos murinos infectados con amastigotes de *L. mexicana*. Los macrófagos J774-G8 infectados fueron sometidos a concentraciones crecientes del compuesto. Cada punto representa el promedio \pm DS de tres experimentos independientes.

Efecto del flavonoide 1 sobre la homeostasis intracelular del Ca^{2+} en promastigotes de *Leishmania mexicana*

Con el objeto de evaluar el efecto del flavonoide 1 sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular de promastigotes de *L. mexicana*, se empleó un método fluorimétrico utilizando el fluoróforo fura 2 para determinar cambios en la concentración de este ión, como se describió en la sección de Materiales y Métodos. De acuerdo a los resultados obtenidos, luego de la adición del compuesto (20 μM) en presencia de Ca^{2+} extracelular, se produjo un aumento en la relación de fluorescencia 340 nm/380 nm (fig. 5A), lo cual se interpreta como un aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Con el objetivo de evaluar si el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ observado era debido a una entrada del catión desde el exterior celular, o por el contrario, era producto de su liberación de compartimientos intracelulares, se repitió el experimento anterior pero en ausencia de Ca^{2+} extracelular (2 mM de EGTA). Como se puede observar (fig. 5B), el flavonoide (20 μM) es capaz de aumentar la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de una manera similar bajo ambas condiciones experimentales: en presencia y ausencia del catión. Esto indica que dicho incremento se debe a su liberación Ca^{2+}

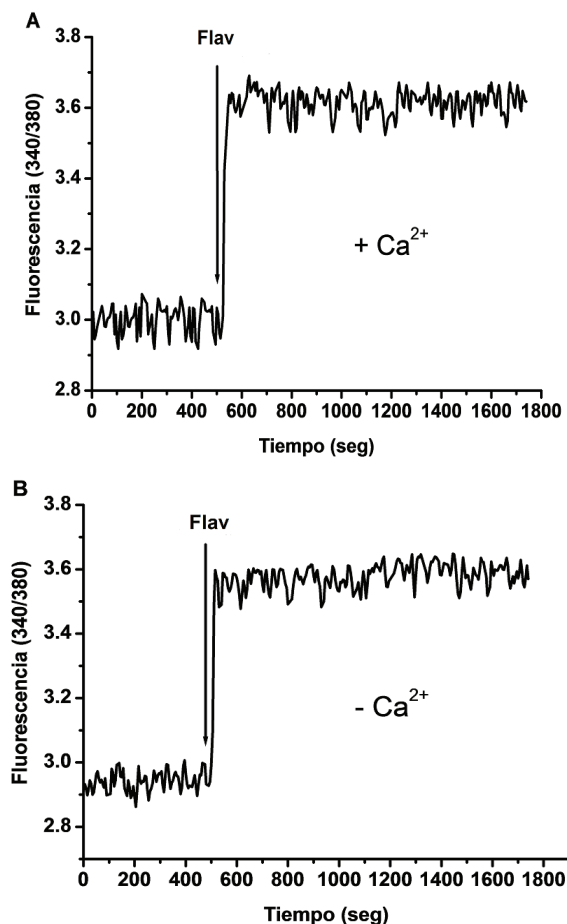


Fig. 5. Efecto del flavonoide 1 sobre la homeostasis del Ca^{2+} intracelular de promastigotes de *L. mexicana*. Los parásitos fueron cargados con fura 2. (A) Efecto del flavonoide 1 (20 μM) sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en presencia de 2 mM de Ca^{2+} extracelular. (B) Efecto del flavonoide 1 (20 μM) sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en ausencia de Ca^{2+} extracelular (2 mM de EGTA).

desde organelos intracelulares, como mitocondria y los acidocalcisomas, y no a una entrada de Ca^{2+} proveniente del exterior celular, a través de un canal o de la pérdida de la permeabilidad iónica inducida por el flavonoide 1.

Efecto del flavonoide 1 sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *Leishmania mexicana*

La mitocondria única de estos parásitos ocupa el 12 % y es capaz de acumular grandes cantidades de Ca^{2+} en su interior (21). Se empleó el fluoróforo rodamina 123, con el objeto de evaluar el efecto del flavonoide 1 sobre el potencial electroquímico mitocondrial cuyo fundamento es que la disminución del potencial electroquímico produce la liberación del fluoróforo acumulado, lo cual conlleva a un aumento en la fluorescencia. En la figura 6A se muestra el resultado obtenido sobre el aumento de la fluorescencia en función del tiempo al añadir el compuesto (20 μM), seguido por la adición del protonóforo FCCP (2 μM), utilizado como control positivo. Se observó que el flavonoide 1 genera una respuesta máxima en cuanto a la salida del fluoróforo anulando totalmente la diferencia de potencial electroquímico mitocondrial, ya que al añadir FCCP la fluorescencia se mantiene constante. Invertiendo el orden de los compuestos, se observa en la figura 6B que la adición de FCCP produce también, como era de esperarse, la salida total del fluoróforo, reflejado en el incremento en la fluorescencia.

Asimismo, se cuantificó la diferencia porcentual del aumento de la fluorescencia de la rodamina 123, en respuesta a la adición de tres concentraciones del Flavonoide 1 (5, 10 y 20 μM). Para ello, se realizó un gráfico de barras (fig. 7) en el que se visualiza el efecto variable del compuesto sobre el potencial electroquímico mitocondrial. Este resultado muestra que a una concentración de 20 μM se obtiene una respuesta cercana al 100 %, seguido del compuesto a 10 μM con un aumento de la fluorescencia del 49 % y, finalmente, 15 % para una concentración de 5 μM . Cabe destacar que el asterisco representa la diferencia significativa entre los promedios ($p \leq 0,05$).

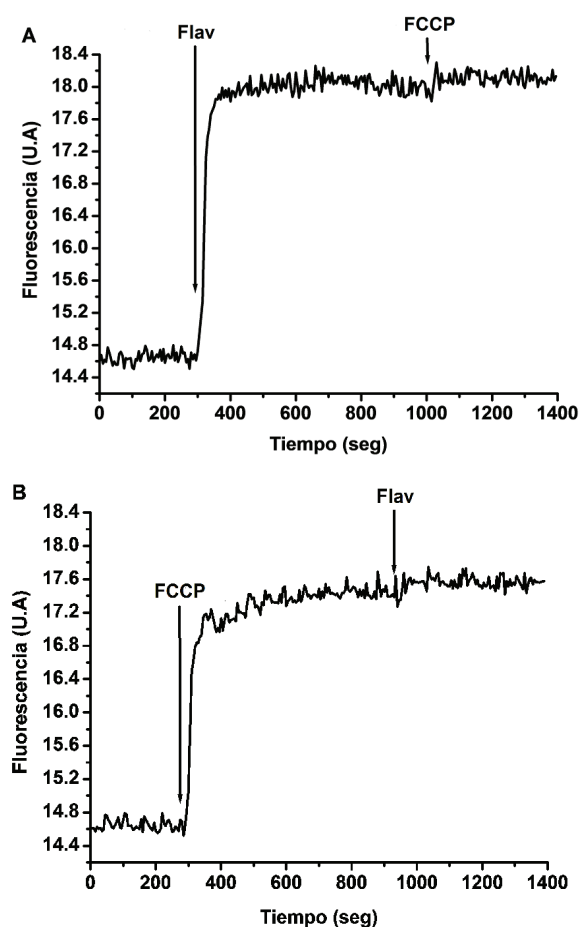


Fig. 6. Efecto del flavonoide 1 sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *L. mexicana*. Los parásitos fueron incubados en presencia de rodamina 123 (20 μM). (A) Efecto del flavonoide 1 (20 μM) seguido por la adición del FCCP (2 μM) sobre el potencial electroquímico mitocondrial. (B) Efecto del FCCP (2 μM) seguido por la adición del flavonoide 1 (20 μM) sobre el potencial electroquímico mitocondrial. (U.A): Unidades Arbitrarias.

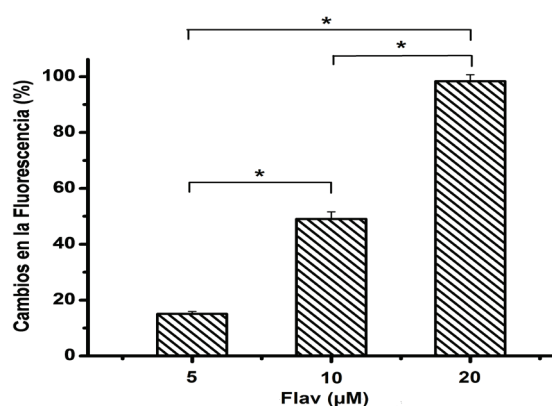


Fig.7. Efecto de diferentes concentraciones del flavonoide 1 sobre el potencial electroquímico mitocondrial. El asterisco (*) representa resultados estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$) mediante una prueba *t* de Student. Cada barra representa el promedio \pm DS de al menos tres experimentos independientes.

Efecto del flavonoide 1 sobre la alcalinización de los acidocalcisomas de promastigotes de *Leishmania mexicana*

Con el objeto de determinar el efecto de esta droga potencial sobre la alcalinización de los acidocalcisomas de estos parásitos, se utilizó un método fluorimétrico empleando el fluoróforo naranja de acridina, el cual se compartimentaliza en organelos ácidos como los acidocalcisomas, acumulándose en los mismos. La liberación de este fluoróforo, lo cual implica la alcalinización del organelo, se visualiza como un aumento en la fluorescencia.

En la figura 8A se observa que al añadir el flavonoide 1 (50 μ M) se produce un rápido y elevado aumento en la fluorescencia, seguido de un pequeño aumento inducido por la adición de nigericina, utilizado como control positivo, ya que se ha demostrado que es un ionóforo que actúa sobre los acidocalcisomas causando la alcalinización de este compartimiento. Se rea-

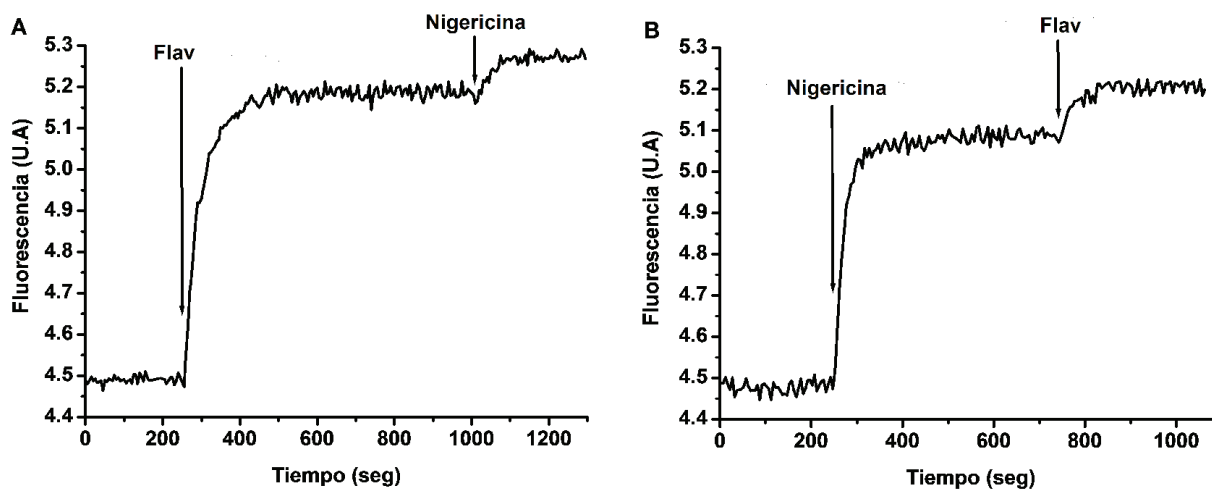


Fig.8. Efecto del flavonoide 1 sobre la alcalinización de los acidocalcisomas de promastigotes de *L. mexicana*. Los parásitos fueron cargados con naranja de acridina (5 μ M). (A) Efecto del flavonoide 1 (50 μ M) seguido por la adición de la nigericina (2 μ M), sobre el nivel ácido de los acidocalcisomas. (B) Efecto de la nigericina (2 μ M) seguido por la adición del flavonoide 1 (50 μ M). (U.A): Unidades Arbitrarias.

lizó también el experimento con la adición de los compuestos de forma inversa (fig. 8B). La nigericina (2 μ M), produce una rápida alcalinización de los acidocalcisomas. Sin embargo, no genera una respuesta máxima de la fluorescencia ya que la adición posterior del flavonoide 1 induce nuevamente un pequeño incremento en la fluorescencia.

Se determinó también la diferencia porcentual del aumento de la fluorescencia de la naranja de acridina, en respuesta a la adición de tres concentraciones del flavonoide 1 (10, 20 y 50 μ M), mediante un gráfico de barras (fig. 9) en el cual se visualiza el efecto variable del compuesto sobre la alcalinización de los acidocalcisomas. Este resultado muestra que a una concentración de 50 μ M se obtiene una respuesta de aproximadamente 90 %, seguido del compuesto a 20 μ M con un aumento de la fluorescencia del 49,8 % y, finalmente, 19,8 % para una concentración de 10 μ M. Cabe destacar que el asteris-

co representa la diferencia significativa entre los promedios ($p \leq 0,05$).

DISCUSIÓN

Las flavonas presentan acción antimicrobiana, aunque a concentraciones muy elevadas en comparación con los antibióticos (31). No obstante, se ha encontrado que algunas flavanonas en cítricos presentan actividad frente al *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Bacillus typhosus* (32). La actividad antifúngica también ha sido reportada. Este es el caso de muchos flavonoides de naturaleza lipofílica (flavonas, flavanonas e isoflavanonas) que presentan una actividad antifúngica muy considerable y que constituyen verdaderas barreras frente a los hongos patógenos (33, 34). En el presente trabajo se obtuvo una actividad antiparasitaria del flavonoide 5-metoxi, 6,7-metilendioxi-flavona sobre promastigotes de *L. mexicana*. Así, este flavonoide tiene un efecto inhibitorio dosis-dependiente sobre la proliferación de *L. mexicana*. Fonseca-Silva y col., en 2015 (35), utilizando la quercetina, la (-)-epigallocatequina 3-O-galato y la flavona apigenina, encontraron un efecto dosis-dependiente de estos compuestos sobre promastigotes de *L. amazonensis*, similar al obtenido por el flavonoide utilizado en este trabajo. Éstos investigadores obtuvieron un IC_{50} de 31,4 μ M a las 48 horas, 63 μ M a las 120 horas y 23,7 μ M a las 24 horas, para cada compuesto respectivamente. Asimismo, comparando el IC_{50} del flavonoide 1 (12,62 μ M) con el obtenido con la quercetina, ambos a las 48 horas de tratamiento, se observa que este compuesto posee una relativamente buena actividad antileishmanial sobre *L. mexicana* cuando se compara con la quercetina, ya que es de casi tres veces más potente que esta última en condiciones similares. En este mismo sentido, en un estudio realizado por Mittra y col. (36), evaluaron el efecto de la luteolina, una flavona con una fuerte actividad

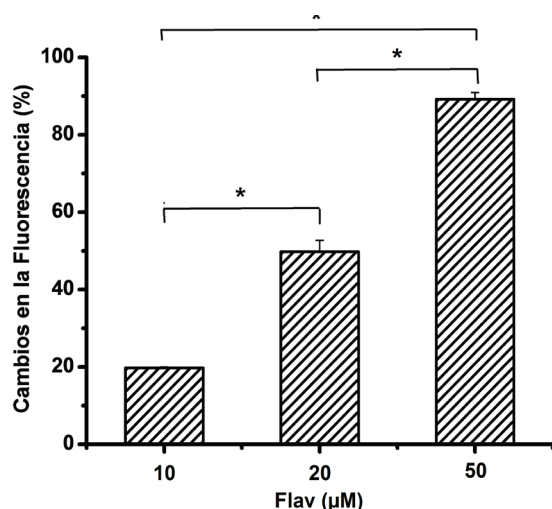


Fig.9. Efecto de diferentes concentraciones del flavonoide 1 sobre la alcalinización de los acidocalcisomas. El asterisco (*) representa resultados estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$) mediante una prueba *t de Student*. Cada barra representa el promedio \pm DS de al menos tres experimentos independientes.

antioxidante (37), y la quercetina sobre *L. donovani* obteniendo un efecto antiparasitario con un IC_{50} de 12,5 y 45,5 μM para la luteolina y quercetina, respectivamente, luego de 24 horas de tratamiento.

Los resultados obtenidos sobre macrófagos infectados con amastigotes de *L. mexicana*, el cual representa el estadio clínicamente relevante del parásito, demuestran que el compuesto los afecta de una forma dosis-dependiente. Además, se pudo observar que estas células de mamífero no se ven afectadas por el compuesto hasta alcanzar una concentración de 50 μM . Comparativamente, Inacio y col. (38), utilizando EGCG, el flavonol más abundante en el té verde (39) realizaron infecciones de macrófagos murinos con promastigotes de *L. amazonensis* por 3 horas, condiciones comparables a las del presente estudio. Luego de 72 horas de tratamiento con EGCG obtuvieron un IC_{50} de 1,6 μM sobre amastigotes intracelulares, muy similar al resultado obtenido en el presente trabajo (IC_{50} de 1,47 μM). Sin embargo, cuando repitieron el estudio pero sobre amastigotes intracelulares de *L. braziliensis* (40), obtuvieron que el compuesto tiene un IC_{50} de 3,4 μM también luego de 72 horas de tratamiento. Más recientemente, Fonseca-Silva y col. (41) estudiando la eficacia oral de apigenina contra la leishmaniasis cutánea, encontraron que el compuesto redujo el índice de infección con un IC_{50} de 4,3 μM luego de 72 horas de exposición. La apigenina también inhibió el crecimiento de *L. amazonensis* en un 71 % (después de 72 horas) utilizando una dosis de 12 μM . Además, cabe destacar que el valor de IC_{50} de apigenina contra macrófagos murinos fue de 78,7 μM , mayor al obtenido en nuestro trabajo (70,9 μM). Comparando los resultados de estos investigadores con los obtenidos en el presente trabajo, nos permite posicionar al flavonoide 1 como un buen compuesto antiparasitario. Además, estimando un índice de selectividad de 40, 23, reiteramos la potente actividad

antileishmanial y selectiva del flavonoide 1 contra amastigotes de *L. mexicana*.

Con la finalidad de determinar el posible mecanismo de acción mediante el cual el flavonoide 1 afecta la viabilidad de *L. mexicana*, se estudió su efecto sobre la $[Ca^{2+}]_i$, tomando en cuenta que se ha postulado que la disrupción de la homeostasis del Ca^{2+} intracelular tiene efectos letales en estos parásitos (5). Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que este flavonoide es capaz de incrementar rápidamente la $[Ca^{2+}]_i$ en promastigotes del parásito. Este incremento es debido a la liberación del catión desde compartimientos intracelulares, ya que se obtiene el mismo efecto al añadir el compuesto en ausencia de Ca^{2+} extracelular, lo cual excluye que el aumento observado sea debido a la apertura de un canal en la membrana plasmática o a la disrupción de la barrera de la permeabilidad iónica de la membrana por parte del flavonoide. En este sentido, se ha demostrado un efecto de flavonas aisladas de *Acanthopanax senticosus* sobre canales de Ca^{2+} tipo L mediante "patch-clamp" y sobre la $[Ca^{2+}]_i$ de miocitos ventriculares de ratón, obteniéndose un efecto cardioprotector atribuido al bloqueo parcial de este canal (42). A pesar de que se ha demostrado que en *L. mexicana* existe un análogo de este canal Ca^{2+} tipo L en la membrana plasmática (43), no se observó ningún efecto del flavonoide 1 sobre este canal, ya que, como se mencionó, el efecto observado fue similar tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} .

Con el fin de estudiar los posibles organelos intracelulares involucrados en la liberación del Ca^{2+} , y por tanto en el consecuente incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, se evaluó el efecto del compuesto sobre el potencial electroquímico mitocondrial del parásito obteniéndose un elevado efecto disipador de dicho gradiente, el cual se traduce en la liberación de la rodamina 123. La actividad desacopladora de la fosforilación oxidativa se ha reportado en las chalconas y dihidrochalconas.

nas y está asociada a la presencia de hidrógeno o hidroxilo en las posiciones 2' y 4' (44). Estos resultados apoyan el efecto desacoplador del flavonoide 1 obtenido en el presente trabajo. Se ha reportado que muchos flavonoides tienen actividad sobre la mitocondria de diversos parásitos del género *Leishmania*. Tal es el caso de quercetina sobre la mitocondria de *L. amazonensis* reportado por Fonseca-Silva y col. en el 2011 (45). Sus resultados sugieren que el compuesto está involucrado en el colapso mitocondrial por la producción de especies reactivas de oxígeno ROS (*Reactive Oxygen Species*), lo cual reduce severamente el número de parásitos. Estos mismos investigadores en otro estudio realizado más recientemente (35), demostraron el mismo efecto de ROS sobre estos promastigotes, pero utilizando la apigenina. Por otra parte, usando microscopia electrónica, Zhai y col. (46) demostraron que la licochalcona A altera la ultraestructura mitocondrial de promastigotes y amastigotes de *L. major* de una forma dependiente de la concentración y sin alterar los organelos de la célula huésped. Estos estudios en conjunto reflejan a la mitocondria como un blanco de acción de algunos flavonoides, lo cual apoya los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Con respecto al efecto del flavonoide 1 sobre los acidocalcisosomas, se obtuvo que la adición del compuesto produce un incremento en la fluorescencia, debido a la liberación de la naranja de acridina acumulada en estos organelos. A 50 μM se pudo observar que el compuesto alcaliniza casi totalmente a los acidocalcisosomas, ya que el efecto de la nigericina luego del flavonoide es muy pequeño. Cuando se invierte el orden de adición de los compuestos, se observa que la nigericina genera un rápido aumento en la fluorescencia, aunque parcial, ya que es seguido nuevamente por otro aumento inducido por el flavonoide 1 a 50 μM . La posible explicación a este comportamiento es que, sabiendo que la

nigericina es conocida por su capacidad de alcalinizar completamente los acidocalcisosomas de estos parásitos (47) y que la naranja de acridina se acumula en organelos ácidos, el compuesto podría estar actuando sobre otros organelos tales como las vacuolas ácidas y los fagolisosomas (48), generando así una liberación del fluoróforo de dichos compartimientos, lo cual se traduciría en un incremento en la fluorescencia. En todo caso, estos experimentos demuestran que los acidocalcisosomas son un blanco muy sensible para la acción de este flavonoide.

Todos estos resultados tomados en conjunto permiten sugerir que el flavonoide 1 podría constituir la base para un futuro tratamiento contra la leishmaniasis. Es un compuesto ventajoso ya que el IC_{50} sobre macrófagos infectados con amastigotes resultó ser bajo, además de ser relativamente poco tóxico para la célula huésped. Cabe destacar que el compuesto objeto de este estudio es totalmente natural y su efecto antileishmanial podría ser potenciado en un futuro modificando químicamente su estructura. Además, podría ser utilizado en conjunto con otro compuesto con propiedades leishmanicidas conocidas a fin de procurar un efecto sinérgico.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Fondo Nacional de Ciencias, Tecnología e Innovación, Venezuela (FONACIT) Proyecto 2017000274 a G.B. y el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico-Universidad Central de Venezuela (CDCH-UCV) Proyecto PG-03-8728-2013/2 a A.I.S y G.B.

REFERENCIAS

1. **Núñez J, Bompert D, Charris J, Camacho J, Rodríguez T, Visbal G, Álvarez A, García Y, Serrano X.** Efectos deletéreos del JC25 sobre la bioenergética celular y

- la biosíntesis de esteroides de *Leishmania braziliensis*. Revista Facultad de Farmacia 2012; 75: 50-58.
2. **Romero R.** Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. Editorial médica panamericana. México; 2007.
 3. **Salazar M, Castro E.** Leishmaniasis cutánea, mucocutánea y cutánea difusa. Dermatol Peru 2001; vol. 11.
 4. **OMS. 60ª Asamblea Mundial de la Salud.** Control de la leishmaniasis, 2007. Informe de la Secretaria; Resolución N° A60/10; Ginebra, Suiza.
 5. **Benaïm G, García C.** Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishmaniasis. Trop Biomed 2011; 28: 471-481.
 6. **Benaïm G.** Intracellular calcium signaling and regulation in Leishmania. Molecular and immune mechanism in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. Medical Intelligence Unit 1996; 5: 589-106.
 7. **Benaïm G, Moreno S, Hutchinson G, Cervino V, Hermoso T, Romero P, Ruiz F, de Sousa W, Docampo R.** Characterization of the plasma-membrane calcium pump from Trypanosoma cruzi. Biochem J 1995; 306: 299-303.
 8. **Benaïm G, Lopez-Estraño C, Docampo R, Moreno SNJ.** A calmodulin-stimulated Ca^{2+} pump in plasma membrane vesicles from Trypanosoma brucei; selective inhibition by pentamidine. Biochem J 1993; 296: 759-763.
 9. **Benaïm G, Romero PJ.** A calcium pump in plasma membrane vesicles from Leishmania braziliensis. Biochim Biophys Acta 1990; 1027: 79-84.
 10. **Benaïm G, Cervino V, Hermoso T, Felibertt P, Laurentin A.** Intracellular calcium homeostasis in *Leishmania mexicana*. Identification and characterization of a plasma membrane calmodulin-dependent Ca^{2+} -ATPase. Biol Res 1993; 26:141-150.
 11. **Pandey S, Suryawanshi S, Gupta S, Srivastava L.** Chemotherapy of leishmaniasis. Part II. Synthesis and bioevaluation of substituted arylketene dithioacetals as anti-leishmanial agents. Eur J Med Chem 2005; 40: 751-756.
 12. **Singh S, Sivakumar R.** Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. J Infect Chemother 2004; 10: 307-315.
 13. **Harborne J, Williams C. 2000.** Advances in flavonoids research since 1992. Phytochem 2000; 55: 481-504.
 14. **Ramírez M, Mendoza J, Arreola R, Ordaz C. 2010.** Flavonoides con actividad antiprotozoaria. Rev Mex Cienc Farm 2010; 41: 6-21.
 15. **Chen M, Zhai L, Christensen SB, Theander TG, Kharazmi A.** Inhibition of fumarate reductase in Leishmania major and L. donovani by chalcones. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 2023-2029.
 16. **Kayser O, Kiderlen AF.** *In vitro* leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones. Phytother Res 2001; 15: 148-152.
 17. **Tasdemir D, Kaiser M, Brun R, Yardley V, Schmidt TJ, Tosun F, Ruedi P.** Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *In vitro*, *in vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 1352-1364.
 18. **Ercil D, Kaloga M, Radtke OA, Sakar MK, Kiderlen AF, Kolodziej H.** O-galloyl flavonoids from Geranium pyrenaicum and their *in vitro* antileishmanial activity. Turk J Chem 2005; 29: 437-443.
 19. **Serrano X, García Y, Fernandez A, Rodríguez N, Rojas H, Visbal G, Benaïm G.** Amiodarone destabilizes intracellular Ca^{2+}

- homeostasis and biosynthesis of sterols in *Leishmania mexicana*. Antimicrob Agents Chemoter 2009b; 53: 1403-1410.
20. Benaim G, Casanova P, Hernandez-Rodriguez V, Mujica-Gonzalez S, Parra-Gimenez N, Plaza-Rojas L, Concepción JL, Liu YL, Oldfield E, Paniz-Mondolfi A, Suarez AI. Dronedarone an amiodarone analog with improved anti-*Leishmania mexicana* efficacy. Antimicrob Agents Chemoter 2014; 58: 2295-2303.
 21. Benaim G, Bermudez R, Urbina J. Ca²⁺ transport in isolated mitochondrial vesicles from *Leishmania braziliensis* promastigotes. Mol Biochem Parasitol 1990; 39: 61-68.
 22. Suárez A, Ramirez C, Palácios R, Rojas K, Delle Monache F, Tillet S. Flavonoides de *Iresine diffusa*. Revista de la Facultad de Farmacia, UCV 2016; 79 : 2-6.
 23. Murray H. Interaction of *Leishmania* with a macrophage cell line. J Exp Med 1981; 153: 1690-1695.
 24. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res 1987; 47: 936-942.
 25. Salcedo G, Trejo T, Martinez B, De Jesús A, Arenas M, Jiménez A. Establecimiento de un protocolo de permeabilización con detergentes que incrementan la eficiencia en la producción de betacianinas en cultivos de células de *Beta vulgaris*. Scielo 2009; 34: 666-671.
 26. Katsuno K, Burrows JN, Duncan K, Hooft van Huijsduijnen R, Kaneko T, Kita K, Mowbray CE, Schmatz D, Warner P, Slingsby BT. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. Nat Rev Drug Discov 2015; 14: 751-758.
 27. Hangland R. Handbook of fluorescence Probes and Research Products. Editorial Molecular Probes. Oregon; 2002.
 28. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsient R. A new generation of calcio indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem 1984; 266: 3440-3450.
 29. Benaim G, Sanders J, Garcia-Marchan Y, Colina C, Lira R, Caldera A, Payares G, Sanoja C, Burgos J, Leon-Rossel A, Concepcion JL, Schijman A, Levin M, Oldfield E, Urbina J. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. J Med Chem 2006; 49: 892-899.
 30. Serrano X, Payares G, De Lucca M, Martínez JC, Mendoza-León A, Benaim G. Amiodarone and miltefosine act synergistically against *Leishmania mexicana* and can induce parasitological cure in a murine model of cutaneous leishmaniasis. Antimicrob Agents Chemoter 2009a; 53: 5108-5113.
 31. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radic Biol Med 1996; 20: 933-956.
 32. Markham K, Mabry T. The flavonoids. Editorial Chapman and Hall. London; 1975. P 77.
 33. David P, Norton R. Browning-associated mechanism of resistance to insects in corn callus tissue. J Chem Ecol 1995; 21: 583-600.
 34. Frankel E, Waterhouse A, Terssedre P. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low density lipoprotein. J Agr Food Chem 1995; 43: 890-894.
 35. Fonseca-Silva F, Canto-Cavaleiro M, Menna R, Almeida-Amaral E. Effect of apigenin on *Leishmania amazonensis* is associated with reactive oxygen species pro-

- duction followed by mitochondrial dysfunction. *J Nat Prod* 2015; 78: 880-884.
36. **Mittra B, Saha A, Roy A, Pal C, Mandal S, Mukhopadhyay S, Bandyopadhyay S, Majumder H.** Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. *Mol Med* 2000; 6: 527-541.
37. **Boukhary R, Raafat K, Ghoneim A, Aboul M, El-Lakany A.** Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Salvia fruticose*: an HPLC determination of phenolic contents. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015.
38. **Inacio J, Canto-Cavaleiro M, Almeida-Amaral E.** *In vitro* and *in vivo* effects of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate on *Leishmania amazonensis*. *J Nat Prod* 2013; 76: 1993-1996.
39. **Steinmann J, Buer J, Pietschmann T, Steinmann E.** Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a component of green tea. *Pharmacol* 2013; 168: 1059-1073.
40. **Inacio J, Gervazoni L, Canto-Cavaleiro M, Almeida-Amaral E.** 2014. The effect of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate *in vitro* and *in vivo* in *Leishmania braziliensis*: involvement of reactive oxygen species as a mechanism of action. *Plos Negl Trop Dis* 2014; 8: e3093.
41. **Fonseca-Silva F, Inacio J, Canto-Cavaleiro M, Rubem F, Menna-Barreto S, Almeida-Amaral E.** Oral efficacy of apigenin against cutaneous leishmaniasis: involvement of reactive oxygen species and autophagy as a mechanism of action. *Plos Negl Trop Dis* 2016; 10: e0004442.
42. **Guan S, Ma J, Chu X, Gao Y, Zhang Y, Zhang X, Zhang F, Liu Z, Zhang J, Chu L.** Effects of total flavones from *Acanthopanax senticosus* on L-type calcium channels, calcium transient and contractility in rat ventricular myocytes. *Phytother Res* 2014; 29: 533-539.
43. **Benaim G, García-Marchán Y, Reyes C, Uzcanga G, Figarella K.** Identification of a sphingosine-sensitive Ca^{2+} channel in the plasma membrane of *Leishmania mexicana*. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 430: 1091-1096.
44. **Amellac A.** Inhibition of mast cell histamine release by flavonoids and bioflavonoids. *Plant Med* 1985; 64: 153-158.
45. **Fonseca-Silva F, Inacio J, Canto-Cavaleiro M, Almeida-Amaral E.** Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. *Plos One* 2011; 6: 1-7.
46. **Zhai L, Blom J, Chen M, Christensen SB, Kharazmi A.** The antileishmanial agent licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2742-2748.
47. **Vercesi A, Rodríguez C, Catisti R, Docampo R.** Presence of a Na^{+}/K^{+} exchanger in acidocalcisomes of *Leishmania donovani* and their alkalization by antileishmanial drugs. *FEBS Lett* 2000; 473: 203-206.
48. **Docampo R, Scott D, Vercesi E, Moreno S.** Intracellular Ca^{2+} storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 1995; 310: 1005-1012.