

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA



# **Estudio del efecto de compuestos derivados de Ftalacinas, sobre la viabilidad de *Trypanosoma cruzi* y su relación con el funcionamiento de la membrana celular.**

Presentado ante la ilustre  
Universidad Central de Venezuela  
por el **Br. Johnatan Rodríguez**,  
como requisito parcial para optar al título  
de Licenciado en Biología.

Tutor:

**Dr. Xenon Serrano-Martin**

Laboratorio de Biología y Quimioterapia de Parasitosis Tropicales (BYQPAT). Área  
de Salud. Instituto de Estudios Avanzados (IDEA-MPPEUCT).

Asesora Académica:

**Dra. Valentina Salas**

Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, UCV.

Caracas, República Bolivariana de Venezuela.  
Junio, 2016

Acta del Examen Público y Solemne del Trabajo Especial de Grado del Br. Johnatan

Roniel Rodríguez Gutiérrez.

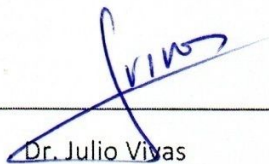
Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designad por el Consejo de Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias y la ilustre Universidad Central de Venezuela, damos fe que examinamos el Trabajo Especial de Grado del Br. Johnatan Roniel Rodríguez Gutierrez, C.I: 19.980.579, titulado: "**Estudio del efecto de compuestos derivados de Ftalacinas, sobre la viabilidad de *Trypanosoma cruzi* y su relación con el funcionamiento de la membrana celular**", el cual es requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología, mención Biología Celular. Culminada la evaluación, consideramos que dicho trabajo cumple con los requerimientos exigidos en los reglamentos respetivos, por lo cual ha sido **APROBADO**, y calificado con una puntuación de **20 puntos**. Así mismo, proponemos que este trabajo sea considerado para optar **mención honorifica** ante el Consejo de Escuela.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, al día 1 del Mes de Junio del año 2016.



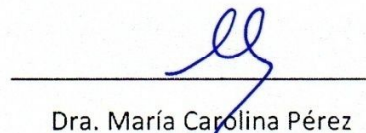
Dr. Xenón Serrano Martín

Tutor



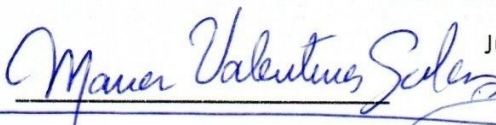
Dr. Julio Vivas

Jurado



Dra. María Carolina Pérez

Jurado



Dra. Valentina Salas

Asesora Académica

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, agradezco a mi mamá Ana Rodríguez, que a pesar de la distancia me ha apoyado siempre, su más grande ayuda ha sido creer en mí dándome fuerzas para seguir adelante. Por todos su esfuerzo y dedicación, para que yo pudiese alcanzar mi meta, por ser mi principal ejemplo de que trabajando duro se logran las cosas, de que las metas hay que definir las y hacer lo posible por cumplirlas., que no importa que tan lejano se vean los sueños que siempre seremos capaces de cumplirlos si nos lo proponemos.

A mi tío Julián Rodríguez, que más que por tan especial ayuda. Por ser mi ejemplo de que salir de casa y dejar a la familia no es fácil, pero que trae grandes recompensas. Que hacemos muchos sacrificios por un bien mayor, que sin duda alguna debemos hacer que las cosas pasen y no que nos lleguen por casualidad.

A mi Abuela, Edenma Gutiérrez por sus palabras de aliento, por siempre estar para mí, por siempre contestar mis llamadas sin importar la hora. Por ser mi ejemplo de constancia, tolerancia, paciencia y dedicación.

A toda mi familia, que de una u otra manera me demostró su apoyo y me alentó a seguir luchando y esforzándome en ser cada día mejor.

A mi tutor Xenon Serrano, un hombre y científico admirable, además de una persona increíble. Agradezco por ser mi ejemplo en este camino, que suena fácil, pero ha sido difícil. Que bajo cualquier situación no dejo de alentarme, que siempre fue un apoyo para mí.

A todo mi equipo de trabajo ByQPAT. A Yael Garcia, por siempre dar otro punto de vista, y por no perder la alegría en ningún momento. A Jaques Leañez, por sacarme de muchas dudas, por su gran ayuda a la hora de corregir errores y por su buen humor. A Jorge Nuñez, por su gran trabajo y dedicación, un investigador que ama lo que hace y que además quiere enseñarlo, un gran ejemplo a seguir. A Samuel Alfonso, por su apoyo y recomendaciones por enseñarme cosas muy útiles, y por ser tan paciente. A Ali Mijoba, por su ayuda y consejos que siempre son bienvenidos.

Un agradecimiento especial, se lo quiero dar a mis dos grandes amigas. A Ana Nuñez, por su tan especial pero muy sincero cariño, por su apoyo incondicional, por quererme como un hijo pese a tener poco tiempo conociéndome, por sus consejos y fe en mí. A Anamaria Alcalá, mi amiga y compañera de trabajo, mi apoyo principal, quien me escucho siempre, por estar para mí para reír o llorar. Gracias a ambas.

Gracias a todos, sin ayuda, sin sus granitos de arena esto no hubiese sido posible.

## Resumen.

La enfermedad de Chagas es generada por el parásito tripanosomatideo *Trypanosoma cruzi*, representando un grave problema de salud pública a nivel mundial. Particularmente en Venezuela, el principal transmisor de esta enfermedad es el insecto *Rhodnius prolixus*. No existen vacunas para esta enfermedad, por lo que el único tratamiento es la quimioterapia. Las drogas que se utilizan actualmente como primera línea son Nifurtimox® y Benznidazol®. Estas resultan costosas, altamente tóxicas y poco efectivas en la fase crónica de la enfermedad. Debido a la necesidad de desarrollar compuestos alternativos efectivos, económicos y seguros, evaluamos el potencial antiparasitario de 22 nuevos derivados de Ftalacinas producidos en nuestro país. En este sentido, se estudió la actividad citotóxica de los derivados sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* a través del ensayo colorimétrico (MTT), donde se demostró que los derivados II4I y II4m inhibieron en más de un 50% la proliferación parasitaria en una concentración de 50 µM. Seguidamente se evaluó la citotoxicidad de estos compuestos sobre células VERO, donde ambos derivados afectaron levemente la proliferación de las mismas a una concentración de 10 µM sin mostrar diferencias significativas entre los mismos, fue seleccionado el derivado II4I por presentar mayor solubilidad en DMCO y estabilidad en el tiempo. Se hizo el ensayo de dosis dependencia y en las curvas de crecimiento parasitario, donde comprobamos la existencia de un efecto dependiente de la dosis de este derivado, con un índice  $EC_{50} = 0,65 \pm 0,03 \mu\text{M}$ . Así, evaluamos el efecto del derivado seleccionado, sobre la funcionalidad de la membrana celular parasitaria. Para ello

se realizaron ensayos de osmoregulación, los cuales demostraron que el I4II afectaba los procesos de control del volumen celular parasitario. Finalmente y mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, logramos determinar que el I4II inhibió la biosíntesis de esteroides libres al afectar el funcionamiento de la enzima escualeno epoxidasa.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, Ftalacinas, Membrana Celular.

## Índice.

1. Introducción	1
1.1 Enfermedad de Chagas en el Mundo	2
1.2 Enfermedad de Chagas en Venezuela	2
1.3 Vector y transmisión de la enfermedad	4
1.4 Morfología y ciclo de vida	4
1.5 Manifestaciones clínicas	7
1.6 Tratamiento	9
1.7 Posibles blancos terapéuticos	11
1.7.1 Enzima tripanotion reductasa	11
1.7.2 Encimas glicolíticas	12
1.7.3 Organelo Acidocalcisoma	13
1.7.4 Glicoproteína Tras-sialidasa	13
1.7.5 Enzima Cistein proteasas	14
1.7.6 Biosíntesis de esteroides de membrana	14
2. Antecedentes	15
3. Objetivos	20
4. Metodologías	16
4.1. Reactivos	16
4.2. Compuestos a ensayar	16
4.3. Cultivo celular	23
4.4. Evaluación preliminar del efecto de compuestos derivados de Ftalacinas, sobre la viabilidad de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> y de células VERO: MTT	25
4.5. Evaluación del efecto antiparasitario de compuestos derivados de Ftalacinas, sobre el crecimiento de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> : curva de crecimiento, dosis respuesta y cálculo de EC <sub>50</sub> .	25
4.6. Determinación del efecto Ftalacinas, sobre el contenido de esteroides libres en <i>Trypanosoma cruzi</i> .	28
4.7. Determinación del efecto Ftalacinas, sobre la Osmoregulación en <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
4.8. Evaluación del efecto de compuestos derivados de ftalacinas, sobre la viabilidad de amastigotes intracelulares de <i>Trypanosoma cruzi</i>	30

5. Resultados-----	31
6. Discusion-----	38
7. Conclusiones-----	45
8. Bibliografía -----	39

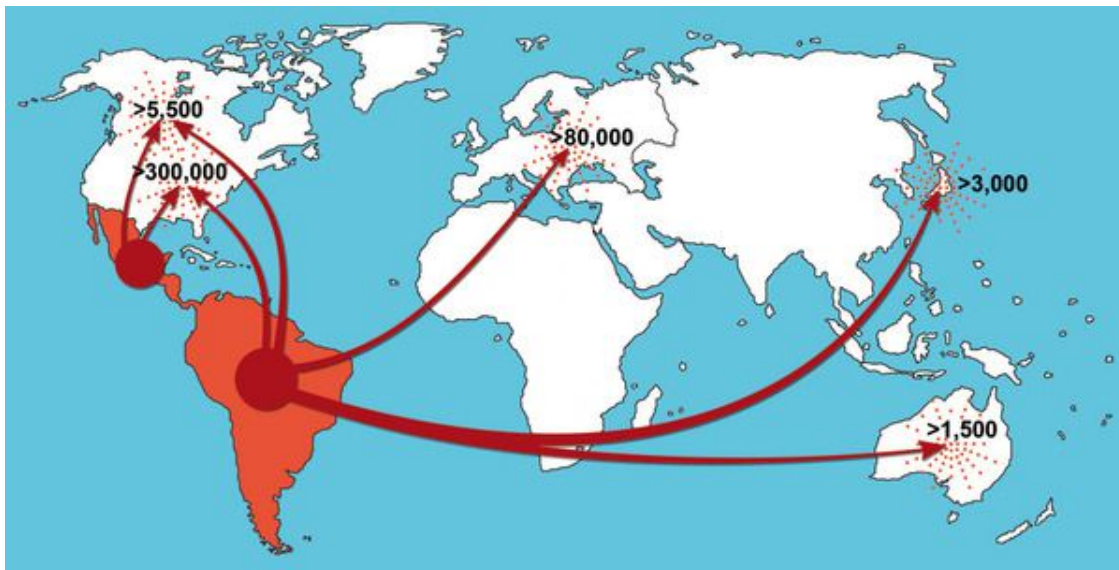


## **Introducción.**

La enfermedad de Chagas es endémica en América latina. Fue descrita originalmente por el médico brasilero Carlos Chagas en 1909. Esta enfermedad tiene como agente causal el parásito monoflagelado perteneciente al orden Kinetoplastidae, familia Trypanosomatidae, género *Trypanosoma*, especie *cruzi*. En su ciclo de vida, este parásito exhibe tres morfotipos: epimastigote, tripomastigote, amastigote. En los hospedadores invertebrados, predomina el morfotipo epimastigote que luego se transforma (natural o de manera experimental) en tripomastigote metacíclico, mientras que en los hospedadores vertebrados, se encuentra el morfotipo tripomastigote de tipo sanguíneo y amastigote intracelular. (Rey, 1991).

### **Enfermedad de Chagas en el mundo.**

También llamada tripanosomiasis americana, afecta principalmente zonas endémicas de 21 países de América Latina, sin embargo, actualmente se han observado casos en Europa, Pacífico Occidental y Estados Unidos (Figura 1). Actualmente se encuentran infectadas más de 10 millones de personas en el mundo, mientras que la población en riesgo se estima en 100 millones (O.M.S, 2014; Becerril, 2008, Perez-Aguilar y col, 2012).

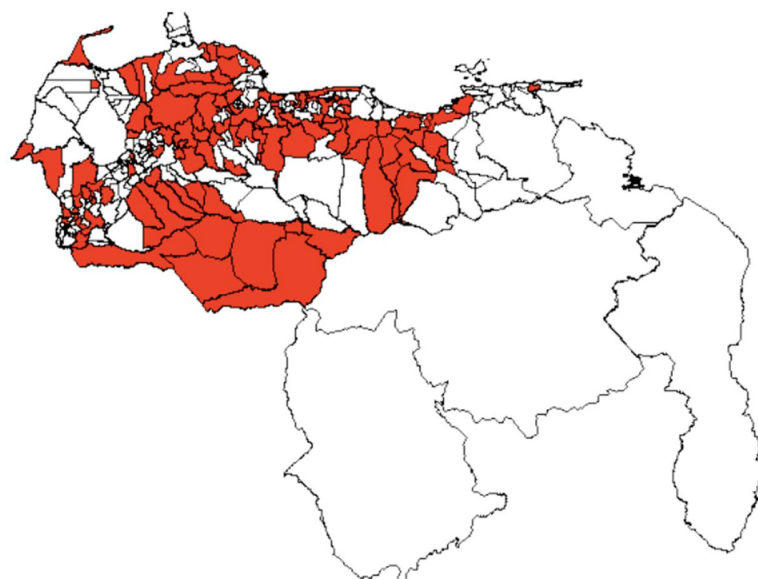


**Figura 1.** Distribución de Chagas en el mundo, desde zonas endémicas de América Latina hacia otras zonas del mundo. (Coura y Viñas, 2010).

### **Enfermedad de Chagas en Venezuela:**

La Enfermedad de Chagas se considera como un problema de riesgo para aproximadamente 6 millones de personas en Venezuela. Todo el territorio venezolano, con excepción de las regiones selvático-húmedas y aquellas cuya altitud es mayor a 2500 metros, debe ser considerado potencialmente endémico para la Enfermedad de Chagas (Figura 2). Esta tiene una amplia distribución en el país, encontrándose tanto en estados del este de Venezuela (Anzoátegui y Monagas) a bajas altitudes, como en estados occidentales de mayor altitud (Mérida, Trujillo), pasando por los estados centrales del país (Barinas, Cojedes, Portuguesa y Yaracuy) y extendiéndose hacia el Norte (Falcón); así como el Sur (Apure). Entre los estados más afectados tenemos: Trujillo, Lara, Portuguesa, Guárico y Barinas, debido a sus características geográficas de pie de monte, con zonas cafetaleras que facilitan la infestación por triatominos como *Rhodnius prolixus*, *Triatoma maculata* y *Panstrongylus geniculatus*. (Añez, y col 2004;

Carrasco y col 2015). El crecimiento demográfico y desarrollo urbano que ha invadido en los alrededores del bosque, han facilitado la interacción de las viviendas humanas con ciclos de transmisión silvestre del parásito que implica especies de triatomíneos esencialmente selváticos como *Panstrongylus geniculatus*. En ese sentido, se ha reportado que un alto porcentaje de *P. geniculatus* infectados con *T. cruzi*, así como la presencia de sangre humana en el tracto digestivo del insecto, indicando un factor riesgo importante para la transmisión de la enfermedad de Chagas. También se han reportado nuevos brotes de la enfermedad de Chagas en el país, como los episodios de transmisión oral ocurridos en la ciudad de Caracas, en los años 2007, 2009 y 2010. (Carrasco y col 2015).



**Figura 2.** Imagen de las áreas donde se han obtenido reportes que han sido afectadas en Venezuela por la enfermedad de Chagas, (Ministerio del Poder Popular para la Salud, 2010).

## **Vector y transmisión de la enfermedad.**

Un total de 180 especies de mamíferos se han reportado naturalmente infectados por *T. cruzi*, incluyendo al hombre, el cual además de padecer la enfermedad, actúa como reservorio. (Hoare, 1972; Urdaneta-Morales y Mc Lure, 1981; Noireau y col, 2009). Del mismo modo, se ha detectado la presencia del parásito en más de 140 especies de insectos estrictamente hematófagos del orden Hemiptera, familia Reduviidae, sub familia Triatominae (Barretto y Ribeiro, 1979; Dias, 2000; Carrasco y col, 2015) de los cuales, los que mayor interacción tienen con los humanos pertenecen a tres géneros: *Rhodnius*, *Panstrongylus* y *Triatoma*. En Venezuela, el principal transmisor de la enfermedad es el insecto vector *Rhodnius prolixus* que tiene una alta capacidad de invadir y reproducirse en viviendas (urbanas o rurales) que tienen condiciones para favorecer su colonización. Esta enfermedad se transmite cuando un insecto triatomo se alimenta de sangre de un mamífero infectado, ingiriendo varias veces su peso en sangre con el parásito, para luego defecar sobre la piel o las mucosas de otro mamífero depositando junto a sus excrementos, parásitos que finalmente generan la infección (Becerril, 2008.)

## **Morfología y ciclo de vida:**

El parásito *Trypanosoma cruzi* es unicelular, con un tamaño promedio de 2-20µm, dependiendo del estadio. Presenta un flagelo con o sin membrana ondulante según su morfotipo (Hoare, 1972). Además, presenta un núcleo bien definido, un mitocondrion único y gigante (12% del volumen celular) y un orgánulo único con gran valor taxonómico llamado kinetoplasto. (Vargas, 2005).

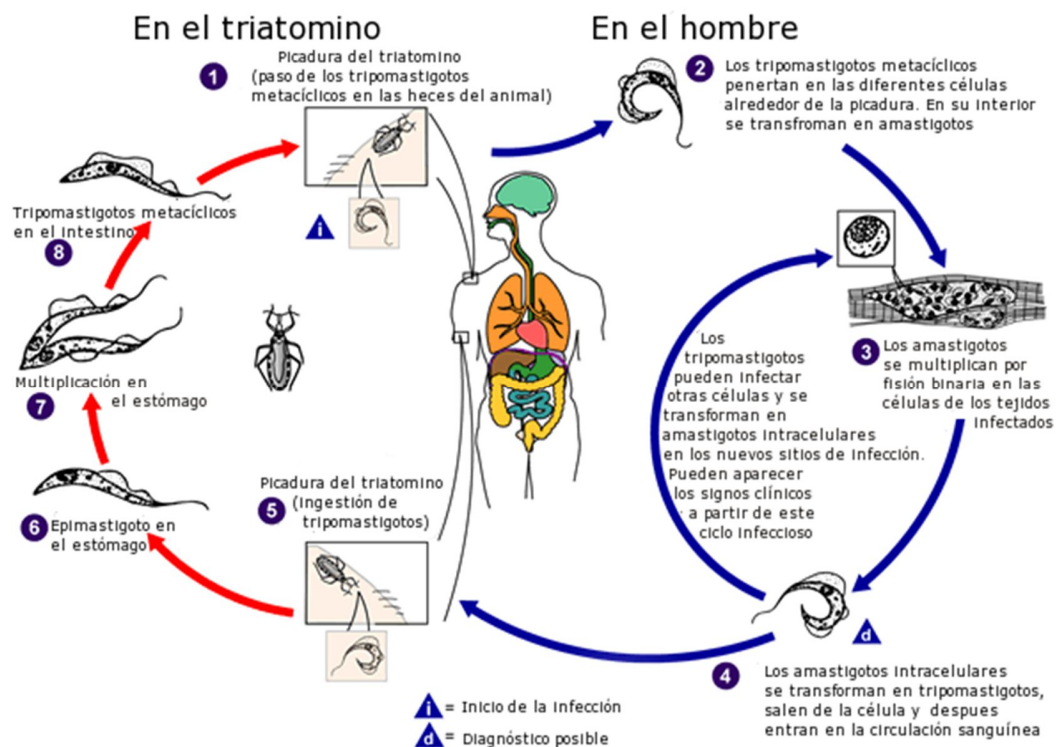
En su ciclo de vida, se observan diversos morfotipos: el tripomastigote metacíclico es flagelado, alargado, con un núcleo evidente central, kinetoplasto de gran tamaño y el blefaroplasto posterior de donde surge un flagelo, que contornea una membrana ondulante y le confiere movimiento. Este estadio presenta deficiente capacidad de reproducción y es la forma que penetra e infecta al hospedero (Tay y col, 1991; Brener, 1971).

El tripomastigote sanguíneo es flagelado, alargado, con el kinetoplasto prominente y alejado de la parte anterior del núcleo; similar al estadio anterior, puesto que también presenta flagelo y membrana ondulante. Este estadio se encuentra en la sangre del mamífero infectado y no tiene capacidad para dividirse, pero sí para invadir otras células. El epimastigote es fusiforme, con un flagelo que forma una membrana ondulante que nace del blefaroplasto. El kinetoplasto se encuentra cercano a la parte anterior del núcleo que se encuentra en posición central. Este estadio presenta división binaria longitudinal. Finalmente, el amastigote intracelular es de forma redondeada, carece de flagelo aparente y por tanto de movimiento; tiene un gran núcleo cerca del cual se encuentra el kinetoplasto a manera de disco. Tiene capacidad de multiplicación, por división binaria simple y es el responsable de los daños generados en la enfermedad, por lo que surge, como el estadio terapéuticamente importante (Tay y col, 1991; Brener, 1971)

En cuanto a su ciclo de vida como tal, este parasito presenta un ciclo heteroxeno, que requiere la presencia de un hospedador invertebrado (triatominos), en el que se desarrollan varias etapas de su ciclo biológico (Vargas, 2005). Los triatominos libres de infección, se infectan con tripomastigotes

metacíclicos al alimentarse de un hospedador mamífero infectado. Al estar dentro de su hospedador invertebrado, los tripomastigotes migran al intestino medio del insecto donde se transforman en epimastigotes flagelados, anchos, y muy móviles con una alta capacidad replicativa. (Figura 3). Allí se multiplican por fisión binaria generando nuevos epimastigotes, que migran al intestino posterior donde se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, la forma infectiva del parásito, y son excretados con las heces al momento de la picadura. El parásito logra entrar en su hospedador definitivo (el hombre u otro mamífero), por el contacto de las heces infectadas con tripomastigotes metacíclicos, con la herida de la picadura, o con alguna otra mucosa. Estas formas metacíclicas pueden invadir inmediatamente a las células o ser diseminados por la circulación a diversas zonas como el hígado, corazón, intestinos, entre otras. Al infectar la célula, se transforman en amastigotes redondeados con un flagelo externo no aparente, para luego multiplicarse intracelularmente hasta ocasionar la lisis de la célula. Una vez fuera de la célula, se transforman nuevamente en tripomastigotes sanguíneos, que continuarán circulando por torrente sanguíneo. Estos, eventualmente infectarán otras células, comenzando de nuevo el ciclo (Stevens y col., 1999a, 1999b, 2001).

Otros mecanismos de infección reportados en la literatura son: transfusiones de sangre, trasplantes, transmisión congénita, oral, contaminación accidental en laboratorios, chinches, entre otros. Además se presume que sea frecuente la ingesta de triatominos infectados por animales salvajes, como mecanismo de transmisión. (Pinto-Díaz, 2006)



**Figura 3.** Ciclo de vida de *T. cruzi*. Tomado y adaptado de la página del centro para el control y prevención de enfermedades (Tomado y traducido de <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>)

### Manifestaciones clínicas.

Regularmente, la enfermedad de Chagas presenta varias fases:

- Fase Aguda: en esta fase circulan por el torrente sanguíneo una gran cantidad de parásitos, reportándose una respuesta rápida del sistema inmune ante la agresión. Tiene un periodo de incubación de tres a diez días. Durante esta fase, los parásitos se replican intracelularmente en células epiteliales, macrófagos y fibroblastos. Una de las características de esta fase es el “chagoma de inoculación”, que no es más que un proceso inflamatorio agudo y localizado en el sitio de la infección. Cuando la

infección tiene lugar en la conjuntiva ocular, se produce una induración dolorosa y eritematosa o edema unilateral bipalpebral con adenitis reticular, conocida como el “Signo de Romaña”. Ambos signos son autolimitados y desaparecen en un periodo de 30 a 60 días. La diseminación de los parásitos puede ocurrir por vía linfática o hemática. En la primera, los ganglios periféricos cercanos al sitio de infección se endurecen y el paciente refiere el dolor al tacto. En el interior de las células ganglionares, se pueden encontrar parásitos en forma de amastigotes. Entre otros síntomas, puede presentarse: malestar general, fiebre, linfadenitis generalizada, dolores musculares, escalofríos. También pueden encontrarse otras alteraciones electrocardiográficas, como arritmias y taquicardias e incluso miocarditis. (Becerril, 2008; OMS, 2014).

- Fase indeterminada: Es una fase que puede extenderse hasta 20 años antes de presentar algún daño característico de la fase crónica. Entre los síntomas que pueden manifestarse durante esa fase se encuentran: arritmias, taquicardias y en algunos casos, puede generarse muerte súbita sin causa aparente. Generalmente se detecta la enfermedad de manera accidental (Becerril, 2008; OMS, 2014).
- Fase crónica: después de 20 o más años, se pueden manifestar signos de la enfermedad en su fase crónica. En esta fase se pueden presentar alteraciones en corazón y músculo liso, sobre todo esófago y colon. Cerca del 30% de las personas infectadas, desarrollan en la fase crónica



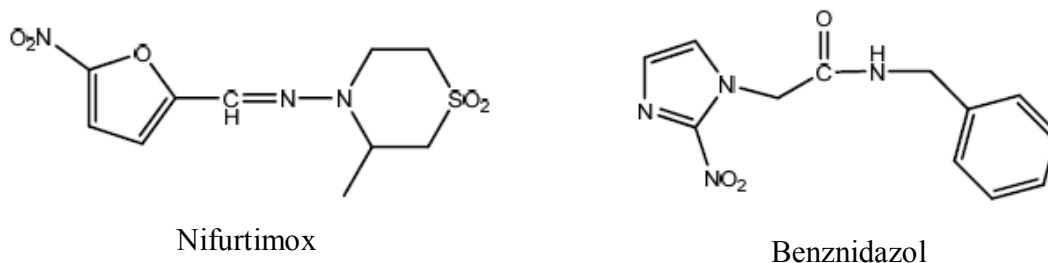
cardiopatías y alteraciones digestivas. La afección cardíaca se manifiesta como alteraciones en la conducción, producto de bloqueos en el fascículo atrioventricular y del nodo auriculoventricular. El recrecimiento ventricular resulta común. El músculo cardíaco sufre una dilatación progresiva, que lleva a una cardiomegalia visible. (Becerril, 2008; OMS, 2014).

### **Control de la enfermedad:**

Debido a la inexistencia de una vacuna certificada contra la enfermedad de Chagas, se han realizado grandes esfuerzos por prevenir la transmisión de la enfermedad a través de: (a) campañas y planes de control vectorial, (b) exigencia en centros de salud, del despistaje de la sangre donada para prevenir la infección por transfusiones sanguíneas y donación de órganos. (c) Las jornadas de pesquizaje, donde se han reportado un gran número de animales silvestres susceptibles a ser infectados por este parásito, sirviendo como reservorios y haciendo mucho más difícil su erradicación. Los planes de control, consisten en interrumpir la transmisión y lograr que la población infectada tenga acceso a la asistencia sanitaria. La Organización Mundial de la Salud ha desarrollado un plan de trabajo para los próximos 25 años, que pretende combatir esta enfermedad. Este plan, se ha basado en tres estrategias principales: control del vector, control de infección por transfusión y tratamiento quimioterapéutico (O.M.S 2014, Rassi y col, 2009). En este trabajo abogamos el punto del tratamiento.

## **Tratamiento:**

Actualmente, el tratamiento contra la Enfermedad de Chagas se basa en dos drogas principales Benznidazole y Nifurtimox (Figura 4). La droga de primera línea es un derivado de nitrofurfulidina, el Nifurtimox (Lampit<sup>®</sup>, Bayer). El mecanismo de acción de esta droga se basa e inducir el estrés oxidativo, reduciendo el grupo nitro, de radicales nitroaniónicos, lo cual conlleva a la formación de radicales libres del tipo peróxido de hidrógeno o superóxidos que impiden el desarrollo en sangre del parásito (Docampo, 1990; Becerril, 2008). La droga de segunda línea llamada Benznidazol (Rochagan<sup>®</sup>, Radani<sup>®</sup>, Roche), actúa por modificaciones covalentes de macromoléculas como ADN y ARN, proteínas y lípidos producidas por la reacción de sus derivados nitroreducidos, con estas macromoléculas (Docampo, 1990). Ambas presentan severos efectos tóxicos colaterales en el individuo como vómitos, anorexia, polineuropatías periféricas y alergias dermopáticas por lo que tienden a ser abandonadas por los pacientes (Cançado, 1999). Estos compuestos son usados en la fase aguda de la enfermedad y su efectividad es variable dependiendo de la región, probablemente debido a variaciones entre cepas de parásitos. Cabe destacar también que la detección de la enfermedad en la fase aguda sobre la forma circulante en la sangre del mamífero, suele ser complicada debido a una sintomatología poco específica que suele mimetizarse con episodios virales comunes. Además de los diversos efectos adversos mencionados, la eficiencia de estos compuestos en la forma intracelular, en la fase crónica de la enfermedad es muy baja, esto conlleva a la ausencia de un tratamiento efectivo contra la enfermedad en esta fase (Urbina y col., 1996; Urbina 2005).



**Figura 4.** Fármacos disponibles actualmente para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. (Da silva y col, 2014)

### Posibles Blancos terapéuticos:

Teniendo en cuenta los diversos efectos adversos de las drogas utilizadas para el tratamiento de la tripanosomiasis, el alto costo de los mismos, aunado a los fenómenos de resistencia parasitaria; resulta urgente el desarrollo de nuevos fármacos más eficaces, menos costoso y menos tóxicos en la lucha contra esta enfermedad. Diversos grupos de investigación en el mundo están interesados en la evaluación de drogas sintetizadas orgánicamente partiendo de estructuras previamente reportadas en la bibliografía, que han resultado bio-activas para otros organismos. Además se ha puesto énfasis en trabajar en aquellas enzimas que muestran diferencias importantes con respecto a las enzimas presentes en mamíferos o mejor aún que están ausentes en estos últimos a fin de utilizarlas como blanco terapéutico para el diseño de nuevos fármacos.

#### Enzima Tripanotión Reductasa.

La tripanotión reductasa (TR) es una enzima involucrada en el equilibrio redox en *T. cruzi*, presenta diferencias notables en la especificidad de sustrato

comparada con la glutatión reductasa del huésped mamífero. Y en conjunto con el tripanotión reemplaza al glutatión/glutatión reductasa presente en mamíferos. Es una flavoproteína dependiente de NADPH encargada de mantener a la tripanotión en su forma reducida, manteniendo un ambiente intracelular reductor (Krauth-Siegel y col, 2005). Dado que TR es una enzima clave en la defensa antioxidante del tripanosoma y está ausente en mamíferos, la misma ha sido considerada un blanco terapéutico atractivo para el desarrollo de fármacos tripanosomicidas. Se han descrito un gran número de inhibidores de TR. El grupo de inhibidores más ampliamente estudiado han sido las poliaminas, compuestos análogos al sustrato natural que inhiben TR reversiblemente. Aunque estos compuestos presentan una excelente actividad tripanosomicida *in vitro*, no se ha observado una clara correlación entre la inhibición enzimática y la actividad antiparasitaria (Li y col 2001)

#### Enzimas glicolíticas

El morfotipo amastigote de *T. cruzi*, utiliza glucosa como principal fuente de ATP, siendo esto una característica importante de su metabolismo. Es por esto que las enzimas involucradas en la glicólisis son consideradas blancos interesantes para el desarrollo de inhibidores selectivos que afecten su función metabólica. Entre estas enzimas, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la triosafosfato isomerasa (TIM) han resultado blancos terapéuticos atractivos para el desarrollo de fármacos ya que se ha visto que además de ser enzimas claves para la supervivencia del parásito, presentan diferencias estructurales importantes con las correspondientes enzimas humanas (Souza y col, 1998; Figueroa-Cortéz, 2008; Mande y col, 1994).

Se han desarrollado inhibidores potentes y selectivos para la enzima GAPDH, análogos a la adenosina, los cuales presentan una muy buena actividad *in vitro* contra amastigotes de *T. cruzi* (Kennedy y col, 2001)

#### Organelo Acidocalcisoma

Los acidocalcisomas son organelos ácidos ricos en calcio y fosfatos que se han conservado durante la evolución desde procariotas hasta eucariotas. Estos organelos están involucrados en el almacenamiento de cationes y polifosfatos, metabolismo de pirofosfato y polifosfatos, homeostasis de calcio, mantenimiento del pH intracelular y osmoregulación (Docampo y col, 2005). En los tripanosomatídeos, los acidocalcisomas poseen enzimas que presentan diferencias de las análogas en mamíferos (Docampo y Moreno, 2008). La bomba de protones vacuolar dependiente de pirofosfato V-H<sup>+</sup>-PPasa, corresponde a una de estas estructuras presentes en los acidocalcisomas de tripanosomatídeos que ha sido validada como blanco para el diseño de nuevos fármacos (Lemercier y col, 2002; Lemercier y col 2004). En 1998 Scott y col., demostraron que los análogos de pirofosfato aminometilbifosfonato (AMBP) e imidodifosfato (IDP) eran capaces de inhibir la V-H<sup>+</sup>-PPasa presente en acidocalcisomas de *T. cruzi* (Scott y col, 1998)

#### Glicoproteína Trans-sialidasa

La trans-sialidasa de *T. cruzi* (TcTS) es una glicoproteína expresada en la superficie del morfotipo tripomastigote sanguícola del parásito y liberada al medio. Los tripanosomas no son capaces de sintetizar ácido siálico y usan esta enzima para transferirlo desde sialo-glico-conjugados presentes en la sangre y otros tejidos del hospedero hacia residuos de galactosa terminales presentes en

mucinas que cubren la superficie del parásito (De Sousa, 2006; Frasch, 2000; Schenkman y col, 1993).

#### Enzimas Cistein proteasas.

Las cisteín proteasas son enzimas hidrolíticas en las que el grupo sulfidrilo de un residuo de cisteína presente en el sitio activo, actúa como nucleófilo durante la catálisis. Para los parásitos del orden Kinetoplastida las cisteín proteasas son importantes factores de virulencia y se ha comprobado que resultan esenciales para la supervivencia de estos organismos (Mottram y col, 1998). Las proteasas parasitarias participan en distintos procesos relacionados con la patogénesis de la enfermedad incluyendo invasión, migración, nutrición y evasión del sistema inmune (Lecaille y col, 2002; McKreow y col, 2006).

#### Biosíntesis de esteroides de membrana

Se ha observado que *T. cruzi* es extremadamente susceptible a los inhibidores de la biosíntesis de ergosterol debido al requerimiento, en todos los estadios de su ciclo vital, de esteroides específicos imprescindibles para la proliferación y viabilidad celular (Urbina, 2010). El ergosterol, es el principal componente de las membranas del parásito a diferencia de los humanos en el cual el principal esteroide de membrana es el colesterol. Por ello, al inhibir la síntesis de ergosterol afectamos al parásito sin perjudicar al humano infectado. Este blanco terapéutico es de especial interés en esta investigación (Urbina, 2002; Urbina y Docampo, 2003)

## **Antecedentes.**

Las membranas biológicas presentes en todas las células, proveen unaseparacion del medio externo y en los organismos eucariotas, generan una compartimentalización de la cual su funcionamiento. Estas membranas están constituidas por lípidos y proteínas, los cuales interactúan unos con otros en un medio acuoso para formar la estructura de bicapa lipídica que genera un compartimiento cerrado, flexible y con funciones celulares asociadas. La primera función de todas las bio-membranas consiste en separar el medio interno del externo; en el medio interno, se encuentran las diferentes proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes del organismo, garantizando su concentración en un pequeño volumen para que las reacciones químicas que tienen lugar dentro de la célula y los organelos.

La segunda función es regular el intercambio de materia y energía con el ambiente. La célula requiere permanentemente e un conjunto de sustancias químicas, orgánicas e inorgánicas, incluida el agua, así como sacar al ambiente productos metabólicos de desecho. Este intercambio incluye el flujo de electrones asociado a la bioenergética celular. La estructura básica de todas las membranas es el de una doble capa de lípidos, propuesta inicialmente por E. Gorter y F. Greandel en 1925. Una gran cantidad de lípidos que forman la membrana, son de naturaleza anfipática siendo un extremo de su molécula hidrofóbico, mientras que el otro extremo es hidrofóbico (Leveille y col, 1995)

Siendo las membranas tan importantes para el funcionamiento y supervivencia del parasito, y siendo el ergosterol un componente principal de las

membranas de tripanosomatideos además ausente en mamíferos. Nos concentramos en evaluar la inhibición de la biosíntesis de esteroides como un blanco muy interesante para el diseño de fármacos anti-tripanosoma (Urbina y Docampo, 2003).

Dado que la ruta de biosíntesis de esteroides es común en todas las células eucariotas, encontramos muchos fármacos que interfieren en su ruta de biosíntesis, desarrollados inicialmente para disminuir los niveles de colesterol en los humanos, demostrándose luego su efectividad en eucariotas inferiores como hongos y protozoarios patógenos. Es por ello que resultan importantes aquellos fármacos que con fines antiparasitarios inhiben la síntesis de ergosterol y análogos sin afectar la correspondiente ruta en el humano. Como ejemplo de ellos tenemos a las alilaminas como la Terbinafina, inhibidores de la escualeno epoxidasa, con la consecuente disminución del ergosterol, otro ejemplo son los azoles que inhiben la esterol aminotransferasa (Urbina, 2002). A pesar de los esfuerzos realizados se ha demostrado que estos compuestos tienen efectos supresores, pero no curativos, contra de las infecciones de *T. cruzi* en humanos o en animales experimentales, siendo incapaces de detener el progreso de la enfermedad (Urbina, 2002).

Se ha reportado el efecto anti-tripanosoma del antiarrítmico Amiodarona, planteándose como potencial alternativa a futuro. Se demostró, que esta droga inhibía la proliferación tanto de epimastigotes como amastigotes intracelulares *in vitro*, a concentraciones menores que la que se alcanzan en los tejidos a dosis terapéuticas. Se demostró también un efecto sinérgico antiproliferativo con el compuesto azólico Posaconazol, inhibidor de la 14-demetilasa cuando eran



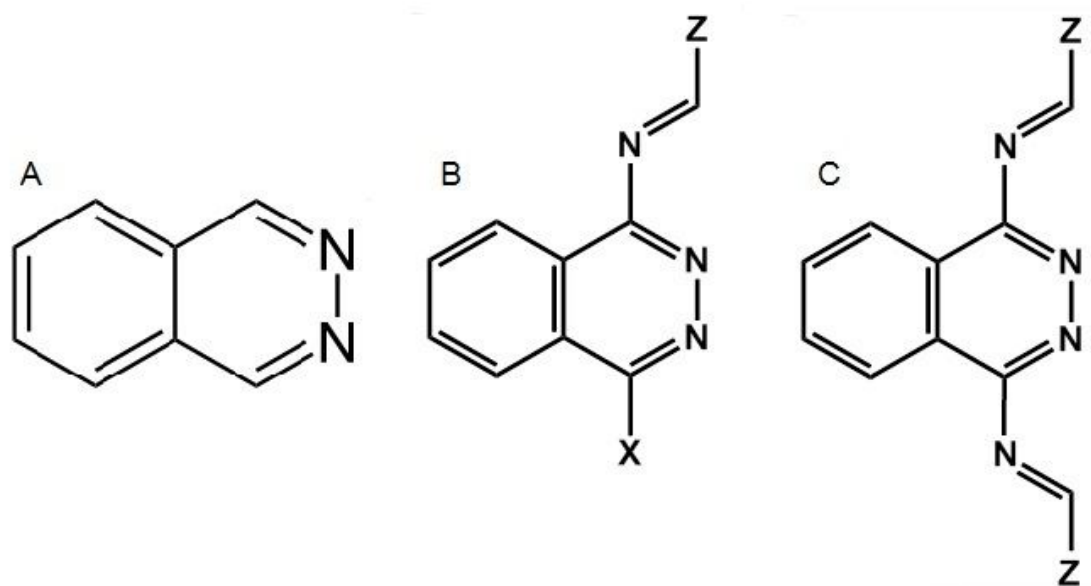
aplicadas de manera combinada, se observó la inhibición de la biosíntesis de ergosterol a nivel de la enzima oxidoescualeno ciclasa, afectandose la homeostasis de calcio intracelular de los parásitos (Benaim y col., 2006).

Por otra parte, la estructura y estado fisiológico de la membrana plasmática son fundamentales para la supervivencia de cualquier célula. En el caso de *T. cruzi* que presenta un ciclo de vida digenético, debe enfrentarse con fluctuaciones importantes en la osmolaridad externa, que se producen en el tránsito del intestino del insecto al sistema circulatorio del hospedador vertebrado. Cuando la forma infectiva del parásito sale del insecto vector a través de sus excretas altamente concentradas y entra en el hospedador mamífero, se encuentra con una menor osmolaridad. En respuesta, el parásito se hincha para rápidamente volver a su volumen inicial a través de un proceso conocido como “regulación en la disminución del volumen celular” (RVD, por sus siglas en inglés). Esta regulación va acompañada de la salida de iones inorgánicos como el  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , así como también de osmolitos orgánicos al medio extracelular. Estudios reportados sobre la respuesta de *T. cruzi* a estrés hiposmótico, han demostrado que en ambas etapas de su ciclo de vida, el parásito posee una robusta regulación en la RVD, y que más del 50% de la reversión de este volumen es modulado por la concentración de aminoácidos (Schoijet y col, 2008; Rohloff y col, 2004). Además de la liberación de iones y osmolitos, se ha reportado la liberación de agua por parte del complejo de la vacuola contráctil, como otra respuesta del parásito al estrés hiposmótico (Rohloff y col, 2004). Se ha utilizado distintos inhibidores de la RVD, por ejemplo  $\text{HgCl}_2$  o  $\text{AgNO}_3$  los cuales han demostrado tener un efecto sobre la RVD a bajas concentraciones debido que inhiben la actividad de una

aquaporina ubicada en el complejo de vacuola contráctil. Además evaluaron compuestos como chloralin y trifuralin (potentes inhibidores de los microtubulos), resultando en una disminución de la RVD (Rohloof y col, 2004).

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente mostrado, es clara la necesidad de ensayar con nuevas estructuras químicas, que puedan representar alternativas terapéuticas seguras, económicas y efectivas, para el futuro tratamiento de la Enfermedad de Chagas.

En este orden de ideas, los derivados de Ftalacinas son ejemplo de heterociclos que poseen interesantes propiedades biológicas, ya que su perfil estructural puede formar varios compuestos biológicamente activos. Estos compuestos (Figura 5) son ampliamente utilizados en química orgánica como productos intermedios, para la síntesis de numerosos y distintos compuestos



aprovechados por la industria farmacéutica actual (Nahed y col, 2011).

**Figura 5.** A. Molecula base de Ftalacina. B y C sustituciones comunes que se realizan a esta molecula para obtener los diferentes derivados. (Elaboración Propia)

Las Ftalacinas son además farmacoforos con importante actividad biológica, a saber: antialérgicos, vasodilatadores, herbicida, inhibidores de PDE4, VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) e inhibidor del receptor tirosina quinasa para el tratamiento de cáncer. Algunos fármacos ampliamente distribuidos como hidralazina, budralazina, azelastina, ponalrestat y zopolrestat son derivados de ftalacinas. Adicionalmente se ha reportado que poseen efectos anticonvulsivos, cardiotónicos, antimicrobianos, antitumorales, antihipertensivos, antitrombóticos, vasorelajantes y anti-inflamatorios (Aziz y col, 2012).

Este tipo de compuestos han demostrado tener actividad antiproliferativa tanto en *T. cruzi* como en diversas especies de *Leishmania* spp. (Sanz y col, 2008). Además, han demostrado una muy baja toxicidad sobre células VERO, comparadas con Benznidazol (Sánchez-Moreno y col., 2011a; Sánchez-Moreno y col., 2011b; Sánchez-Moreno y col., 2012).

Por todo lo anteriormente mencionado el objetivo de este estudio, fue evaluar el efecto de 22 nuevos compuestos derivados de ftalacinas sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal y Heterociclos (departamento de Química, de la Universidad Simón Bolívar, Caracas, Venezuela), sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. También es de nuestro interés estudiar la posible inhibición de la biosíntesis de esteroides y fenómenos de osmoregulación.

## Objetivos

### Objetivo General:

Evaluar el efecto de derivados Ftalacinas sobre la viabilidad de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Del mismo modo, nos planteamos estudiar el efecto de los compuestos seleccionados, así como su relación con fenómenos de osmoregulación celular y biosíntesis de esteroides.

### Objetivos específicos:

- 1 Determinar el efecto citotóxico de derivados de Ftalacinas, sobre la viabilidad de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y células VERO, mediante estimaciones con MTT.
- 2 Evaluar el efecto antiparasitario de derivados de Ftalacinas seleccionados, sobre la viabilidad de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, mediante la realización de curvas de crecimiento parasitario *in vitro*.
- 3 Analizar el efecto de derivados de Ftalacinas seleccionados, sobre el contenido de esteroides libres de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de alta resolución.
- 4 Determinar el efecto de derivados de ftalacinas sobre la osmoregulación celular, de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

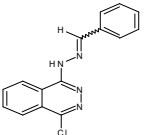
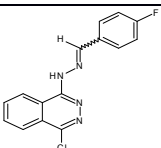
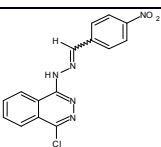
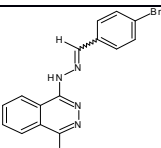
## Metodologías

### Reactivos.

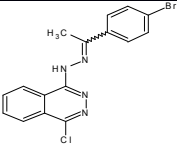
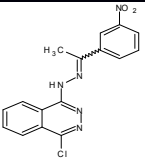
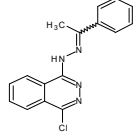
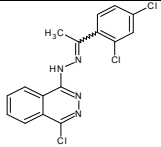
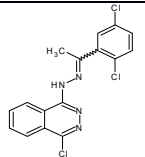
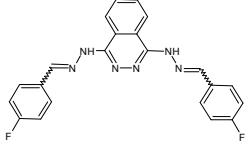
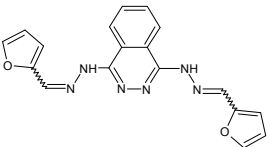
Todas las soluciones se prepararon con reactivos adquiridos en las casas comerciales SIGMA, Promega, Invitrogen, Gibco B.R.L. y BIO-RAD. Las soluciones y los materiales se esterilizaron en autoclave a 121 °C, 15 libras, durante 30 minutos.

### Compuestos a ensayar.

- Derivados de Ftalacinas:

Denominación	Estructura	Formula Molecular	Masa Molecular
II4a		C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> N <sub>4</sub> Cl	282,45
II4b		C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> ClF	300,45
II4c		C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> N <sub>5</sub> ClO <sub>2</sub>	327,45
II4d		C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> ClBr	361,45

II4e		C15H10N4Cl2	316,90
II4f		C15H10N5ClO2	327,45
II4g		C15H10N4ClBr	361,45
II4h		C15H10N4Cl2	316,90
II4k		C13H9N4ClO	272,45
II4l		C13H8N5ClO3	327,45
II4m		C13H8N5ClO2S	333,45
II5a		C16H13N4ClO	312,45
II5b		C16H12N5ClO2	3341,45

I15c		C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> ClBr	375,45
I15d		C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> N <sub>4</sub> ClO	312,45
I15e		C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> N <sub>4</sub> Cl	296,45
I15f		C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> N <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	364,45
I15g		C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> N <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>	364,45
I18b		C <sub>22</sub> H <sub>16</sub> N <sub>6</sub> F <sub>2</sub>	402,00
I18c		C <sub>18</sub> H <sub>14</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	346,00

**Tabla 1.** Derivados de Ftalacinas para la realización de pruebas biológicas anti-*T.cruzi*. Sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal y Heterociclos, Departamento de Química, Universidad Simón Bolívar-R.B de Venezuela; a cargo del Dr. Simón E. López.

### **Cultivo celular.**

Los aislados de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* se mantuvieron en frascos de cultivo (T25) con: medio de cultivo (LIT) suplementado con Hemina (20 mg/L), Suero Fetal Bovino inactivado al 10%, y se incubarán a 29°C en constante agitación (120 rpm).

Este medio contenía una solución orgánica (triptosa 15 gr/L, extracto de levadura 5 gr/L y extracto de hígado 2 gr/L) y una solución inorgánica (Glucosa 4 gr/L, NaCl 9 gr/L, KCl 0,4 gr/L y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7,5 gr/L). Además del Suero Fetal Bovino, incubado a 57°C por 45 min.

El cultivo de las células VERO, se realizó en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), suplementado con 10 % de suero fetal bovino, en frascos de cultivo (T25). El medio DMEM contiene 4,5 g/l D-glucosa, 584 mg/l L-glutamina y 3.7 g/l de bicarbonato de sodio. Este tipo celular, se mantuvo en incubadora a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> (Benaim, 2006).

Ambos medios de cultivo fueron suplementados con el coctel de antibióticos ampicilina-estreptomina (1 µg/ml), con la finalidad de prevenir posibles contaminaciones, ya que por su composición, son medios muy ricos en nutrientes colonizables por otras especies celulares distintas a la de nuestro interés.



**Evaluación preliminar del efecto de compuestos derivados de ftalacinas, sobre la viabilidad de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* y de células VERO: a través de la técnica colorimétrica MTT**

Se dispusieron en placas de 96 pozos,  $1 \times 10^6$  epimastigotes por pozo y se incubaron a 29°C por 24 horas, y se verificó su viabilidad. Posteriormente, se agregaron los compuestos a evaluar, disueltos en DMSO (0.1% final), a una concentración única de 50  $\mu$ M más un control sin droga (control negativo). Para seleccionar aquellos compuestos activos sobre epimastigotes de *T. cruzi*, se incubaron durante 72 horas luego de agregados los compuestos a evaluar y posteriormente se añadió la sal de tetrazolium (MTT) (1mg/ml), disuelto en agua destilada, incubándose por 4 horas en oscuridad. Finalmente se procedió a lisar las células con isopropanol ácido y la placa fue leída en un espectrofotómetro a 570 nm. Con la intención de evaluar su citotoxicidad sobre células VERO este mismo ensayo se realizó con modificaciones menores, agregando  $20 \times 10^3$  cel/pozo y evaluando, los compuestos seleccionados a concentraciones de 10, 50, 100 y 200  $\mu$ M (por triplicado) y Benznidazol como control positivo y un segundo control sin compuesto alguno esto. (Bompart y col., 2013; Berridge y Tan. 1993).

**Evaluación del efecto antiproliferativo de compuestos derivados de ftalacinas, sobre el crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*: curva de crecimiento, dosis respuesta y cálculo de  $EC_{50}$**

Las curvas de crecimiento a diferentes concentraciones de los compuestos seleccionados, nos permitieron observar de manera directa el impacto en el crecimiento de la población celular en cultivo, de concentraciones crecientes de los candidatos.

Posteriormente se determinó con exactitud el número de parásitos existentes en el cultivo original. Muestras del del cultivo de parásitos se diluyeron en tubos *eppendorf* a los cuales se le añadió un volumen de tampón PBS estéril, y formaldehído al 0,1 mg/mL de concentración final. Se procedió a contar en la cámara de Neubauer. La determinación de la cantidad de parásitos/mL, se realizó a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Par/ml} = \frac{\text{totaldeparasitas}}{4} \times \text{factor dedilusion} \times 10^4$$

El conteo en cámara de Neubauer nos permitió estimar a través de un conteo directo, el número de células que se encontraban en el cultivo. Conociendo el volumen de la cámara, el número de células que se encuentran en ese volumen y el volumen del cultivo, se estimó entonces, el número de células presentes por mililitro de medio.

Las curvas de crecimiento y dosis respuesta de estos parásitos en presencia y ausencia los compuestos a utilizar, se realizaron de la siguiente manera: inicialmente, se agregaron  $1 \times 10^6$  cel/mL en frascos de cultivo con 5 mL de medio LIT-hemina, suplementado con suero fetal al 10% inactivado y los antibióticos penicilina-estreptomina, según lo reportado por Serrano-Martín y col. 2006. Veinte y cuatro (24) horas después, se procedió a agregarle a cada frasco los compuestos de interés (por triplicado), disueltos en DMSO (0.1% final), o agua (dependiendo del compuesto), incluyendo un control del experimento al cual no se le agregará compuesto alguno. Se realizaron 3 experimentos independientes con cada concentración de compuesto, contándose así cada condición experimental

por triplicado, por razones estadísticas. La proliferación celular se determinó diariamente, mediante conteo directo en cámara de Neubauer, hasta alcanzar la fase estacionaria del cultivo.

Con la construcción de una curva dosis-respuesta con los datos de proliferación de la curva en fase exponencial franca de crecimiento, se determinó la concentración efectiva de compuesto que inhibe la proliferación del 50% de la población parasitaria en cultivo ( $EC_{50}$ ). Esta concentración de droga se obtuvo mediante el método de interpolación lineal propuesto por Huber y Koella (1993). Este propone tomar dos concentraciones ( $X_1$  y  $X_2$ ), de manera tal que la densidad de parásitos ( $Y_1$ ) a la concentración de droga ( $X_1$ ) (y todas las concentraciones inferiores), sea mayor que la mitad de la densidad encontrada en el control ( $Y_0$ ), y que la densidad encontrada para la concentración de droga  $X_2$  (y todas las concentraciones superiores), sea menor que la mitad de la densidad ( $Y_0$ ). El  $EC_{50}$  es determinado entonces por interpolación lineal entre las concentraciones ( $X_1$  y  $X_2$ ), mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Log } (EC_{50}): \text{Log } (X_1) + \frac{[(Y_1) - (Y_0/2)]}{Y_1 - Y_2} [\text{Log } (X_2) - \text{Log } (X_1)]$$

Este parámetro nos permitió comparar la efectividad antiparasitaria, de distintos compuestos con un criterio único.

### **Determinación del efecto Ftalacinas, sobre el contenido de esteroides libres en *Trypanosoma cruzi*.**

Inicialmente, se realizó la extracción de lípidos totales de epimastigotes de *T. cruzi* tratados con las ftalacinas seleccionadas a la concentración de EC<sub>50</sub> obtenida previamente y de epimastigotes no tratados con compuesto alguno. Brevemente, se realizaron cultivos de epimastigotes (50 mL) tratados y no tratados con los compuestos. Los cultivos se mantuvieron por 8 días a 29°C. Luego, se centrifugaron a 720g por 15min, con la finalidad de eliminar el medio de cultivo. Este procedimiento se repetirá 3 veces, resuspendiendo el sedimento de parásitos en 50 mL de solución PBS. Finalmente, se resuspendió el sedimento en una solución Cloroformo-Metanol (2:1) lo que produce la ruptura de las membranas de los parásitos y la subsecuente separación de los lípidos totales, polares y no polares (Serrano-Martín y col. 2009).

La suspensión de lípidos obtenida, fue filtrada y luego concentrada mediante un rotaevaporador a 60°C, hasta la total evaporación de la solución Cloroformo-Metanol (2:1).

Seguidamente, se procedió a resuspender los lípidos obtenidos en 1 mL de Cloroformo. Esta muestra fue corrida en una columna de ácido silícico (1,5 x 4cm), con la finalidad de separar los lípidos neutros de los polares. Se procedió luego a eluir los lípidos neutros de la columna agregando 3 volúmenes de cloroformo. Y por último se concentraron las fracciones colectadas a través de un rotaevaporador a 60°C, hasta la total evaporación de la solución de Cloroformo. Los lípidos neutros obtenidos, fueron resuspendidos en 5 mL de

cloroformo y luego fueron concentrados en atmosfera de Argón, con la finalidad de prevenir procesos de oxidación lipídica (Serrano-Martín y col, 2009).

Finalmente, se procedió inyectar 10  $\mu$ L de cada fracción obtenida en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 7890A) acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución (Agilent Technologies 5975C). Mediante los espectros de gases y masas generados para cada muestra, se determinará la naturaleza, cantidad y subsecuente acumulación, de los intermediarios presentes en la ruta de síntesis de 5-dehidroepisterol en los epimastigotes tratados con Ftalacinas, respecto a los parásitos no expuestos a compuesto alguno.

### **Determinación del efecto Ftalacinas, sobre la Osmoregulación en *Trypanosoma cruzi*:**

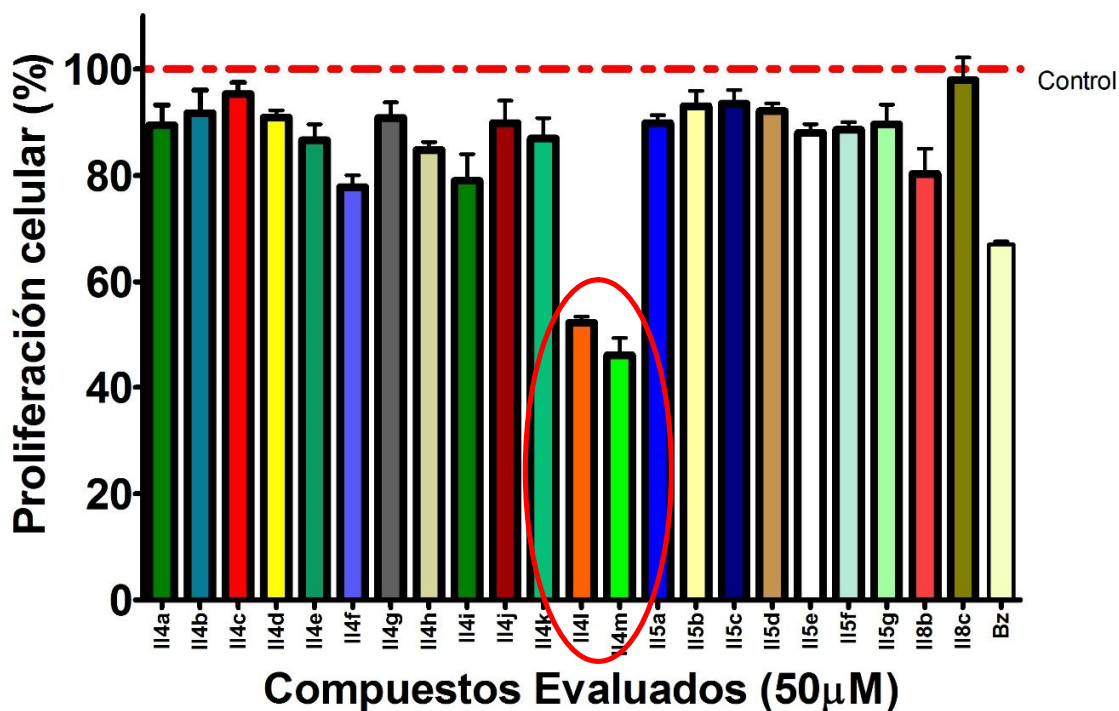
Con la finalidad de estudiar, la capacidad de osmoregulación en parásitos tratados y no tratados con los compuestos seleccionados, epimastigotes fueron recolectados a través de centrifugación a 5000 r.p.m y lavados dos veces con buffer de cloro isotónico ( ISO-Cl buffer: 137mM NaCl, 4mM KCl, 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8.5mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ , 20mM HEPES, 11mM glucosa, 1mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.8mM  $\text{MgSO}_4$ , pH: 7.4) La osmolaridad de buffer se ajustó a  $300 \pm 5$  mOsm, para luego resuspenderlos en buffer ISO-Cl a una densidad de  $1 \times 10^8$  par/ml. Seguidamente, las células fueron distribuidas en placas de 96 pozos, a razón de  $1 \times 10^8$  par/mL/pozo en un volumen total de 100 $\mu$ L/pozo, por cuadruplicado. Con la finalidad de evaluar el efecto de los compuestos sobre la capacidad de regulación

del volumen celular, se generó un estres hiposmótico agregando a cada pozo 100µL de agua estéril desionizada. Los cambios en la absorbancia, proporcionales a la expansión celular, fueron medidos cada 20 segundos, durante 10 minutos, a 550 nm usando un lector de Elisa (Schoijet y col, 2008)

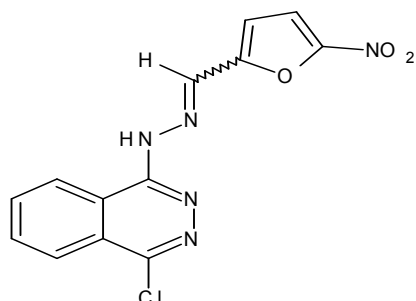
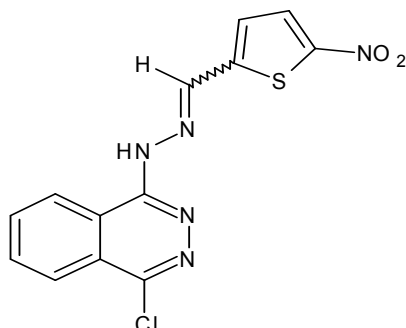
## Resultados.

### 1.-) Evaluación preliminar del efecto de compuestos derivados de ftalacinas, sobre la proliferación de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

A través de un ensayo MTT, cultivos de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* fueron puestos en presencia de 50 $\mu$ M de cada derivado, con la finalidad de evaluar la actividad de estos sobre la proliferación celular. En este sentido, los compuestos II4l y II4m mostraron una inhibición del 52% y 48% de la proliferación celular respectivamente, respecto al control sin tratamiento, representado por la línea punteada (Figura 6). Este resultado nos permitió seleccionar a los derivados II4l y II4m (Figura 7), para ser evaluados en términos a su toxicidad sobre células VERO.



**Figura 6.** Viabilidad de epimastigotes de *T cruzi*, mediante MTT (n:8), en presencia de derivado de Ftalacina. Los derivados seleccionados para próximas fases de estudio: II4l, II4m (círculo rojo). Bz: benznidazol.

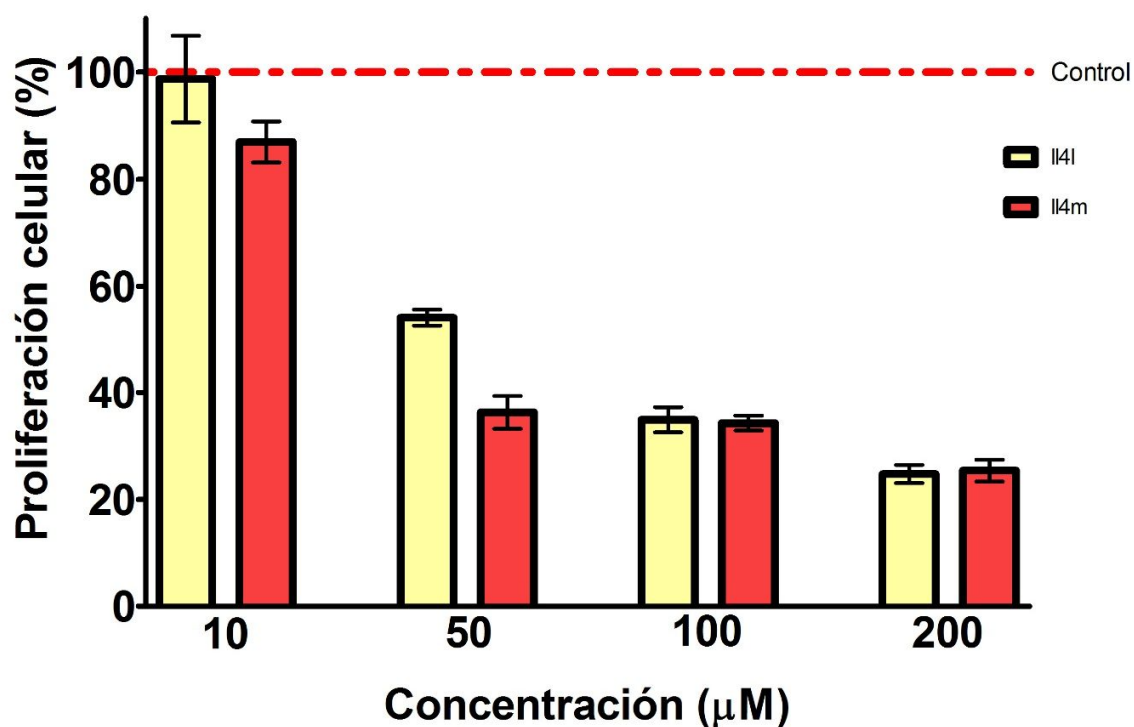
**A****B**

**Figura 7.** Estructuras de derivados de ftalacinas. **A.-** Estructura del derivado de ftalacina II4I (derivados de 1-(2-bencilidenehidracinil)-4-Cloroftalacina). **B.-** Estructura del derivado de Ftalacina II4m (derivados de (*E*)-1-cloro-4-(2-(5-nitrotiofen-2-ilmetilene)hidracinil)ftalacina). Sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal y Heterociclos, Departamento de Química, Universidad Simón Bolívar; a cargo del Dr. Simón E. López.

## **2.-) Determinación del efecto de los compuestos seleccionados sobre la proliferación de células VERO.**

Los compuestos seleccionados II4I y II4m fueron evaluados sobre células VERO en concentraciones de 10, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$ , con el fin de comprobar su posible toxicidad. A pesar de que II4I y II4m presentaron grados de toxicidad similares, fue seleccionado el derivado II4I para las siguientes fases de experimentación, por poseer mejores condiciones de solubilidad y estabilidad en el tiempo y menos toxicidad a células VERO.



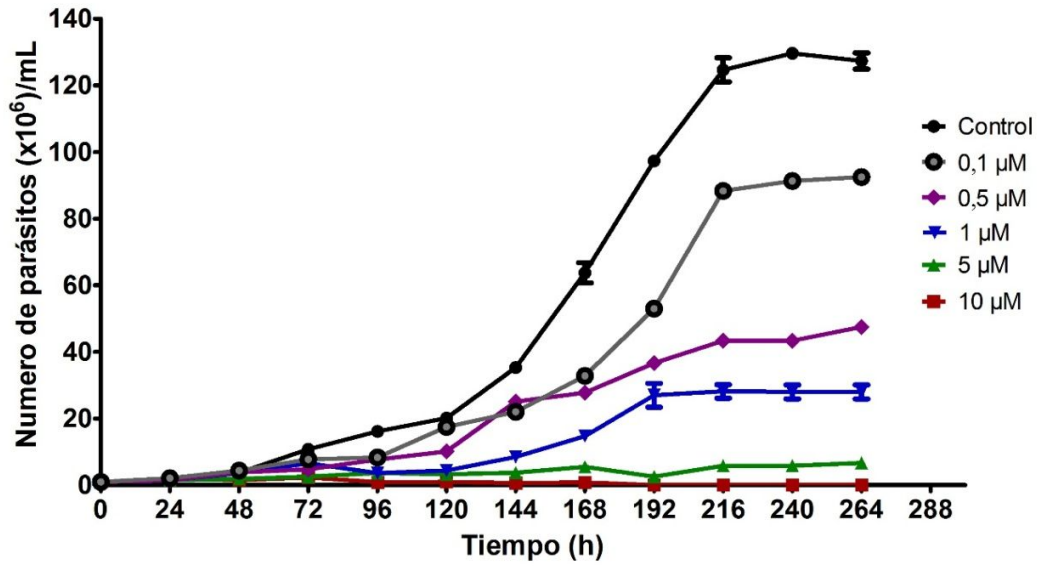


**Figura 8.** Actividad citotóxica de los compuestos derivados de ftalacinas II4I y II4m, sobre la viabilidad de células VERO mediante MTT (n:6). Compuesto seleccionado II4I, color amarillo.

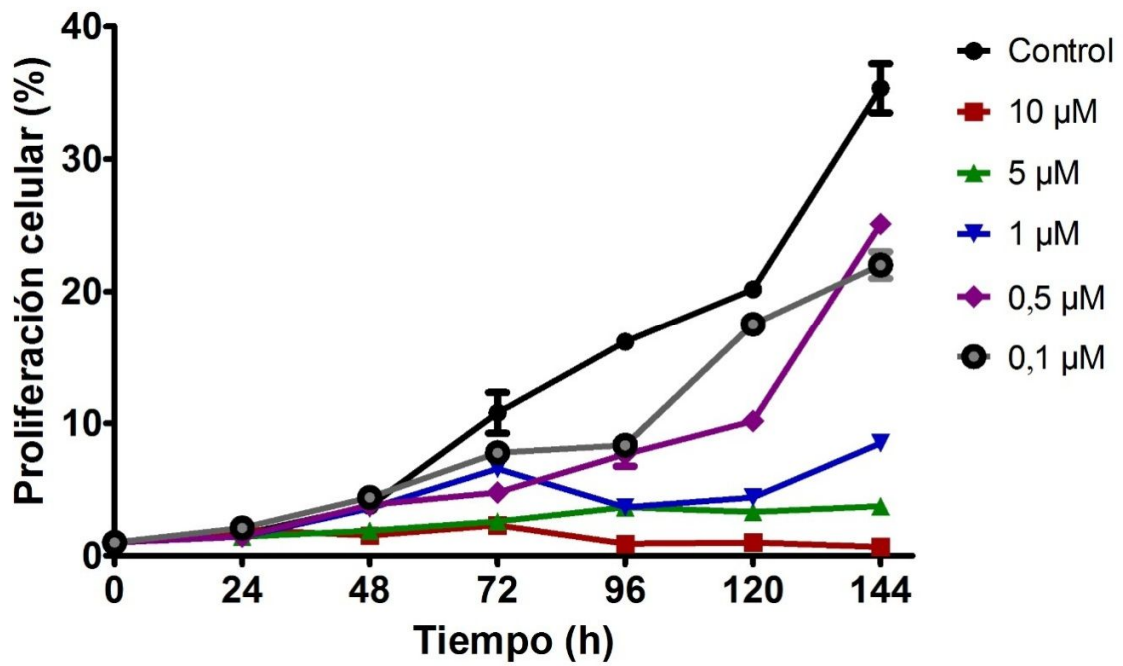
**Evaluación del efecto del Derivado II4I, sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, curvas de crecimiento.**

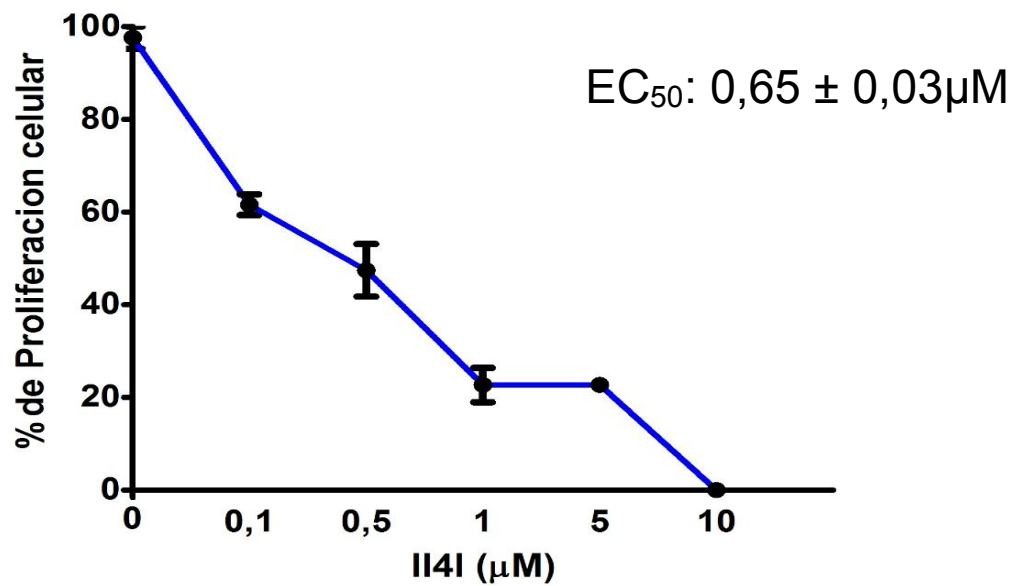
Cultivos de epimastigotes fueron sometidos a distintas concentraciones del derivado II4I, determinándose su proliferación diaria por 11 días, a través de conteo directo con cámara de Neubauer. Los resultados muestran un efecto dosis dependiente del II4I sobre la proliferación celular (Figura 9A). Con los datos de conteo a las 72h de cultivo (fase exponencial), se construyó una curva dosis respuesta con la finalidad de calcular el índice EC<sub>50</sub>. Así, determinamos que el II4I fue capaz de inhibir el 50% de la proliferación de epimastigotes en cultivo, a una concentración de  $0,65 \pm 0,03 \mu\text{M}$  (Figura 9B).

A



B





**Figura 9.** Efecto del derivado de Ftalacina II4I sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*. **A.-** Curva de proliferación celular de epimastigotes de *T. cruzi* (n:8). Se observa la evolución en el tiempo de poblaciones de parásitos, a concentraciones crecientes del derivado II4I. **B.-** Acercamiento de la curva, donde se aprecia la fase exponencial de crecimiento. **C.-** Curva dosis respuesta del compuesto II4I sobre epimastigotes de *T. cruzi*. Se puede observar el efecto dependiente de la dosis, del derivado sobre la viabilidad de epimastigotes. EC<sub>50</sub>: 0,65±0.03 µM.

## Determinación del efecto Ftalacinas, sobre el contenido de esteroides libres en *Trypanosoma cruzi*.

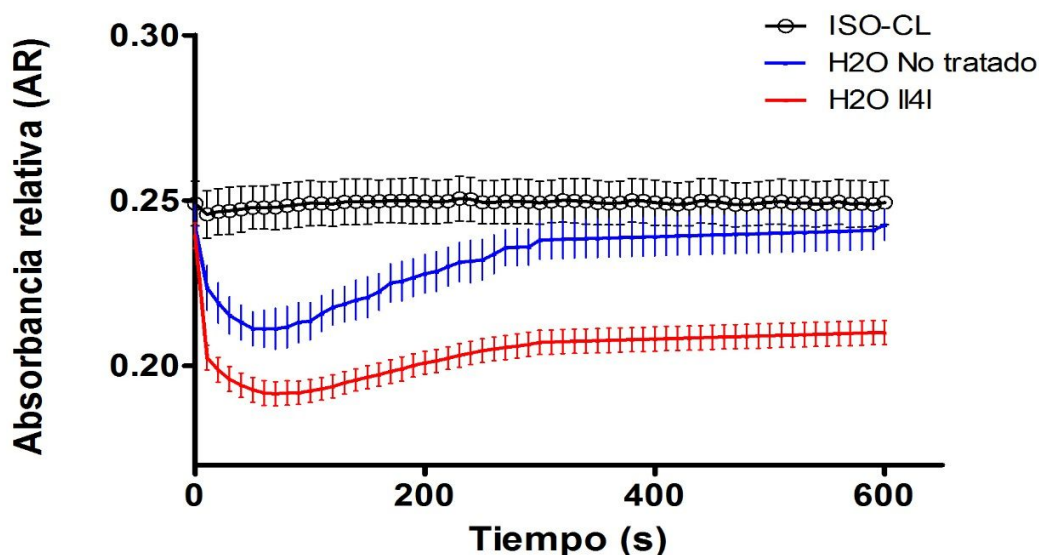
Con la finalidad de evaluar el efecto del compuesto II4I sobre el contenido de esteroides libres en *Trypanosoma cruzi*, las fracciones de lípidos neutros de epimastigotes tratados y no tratados, fueron analizadas a través de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de alta resolución. Determinamos así, que el porcentaje de masas de escualeno (intermediario) y ergosterol (producto final) en epimastigotes no tratados fue 19.86% y 5,75% respectivamente. Además se pudo determinar que el tratamiento con el compuesto II4I ( $EC_{50}$  determinado en cultivo) generó una acumulación del intermediario escualeno en más de 94%, inhibiendo en su totalidad la producción del producto final el ergosterol. (Tabla 2).

Molécula detectada	Tiempo de retención	Porcentaje de masa después del tratamiento con	
		Control	EC50 (0,65µM)
<b>Colesterol</b> (Cholesterol trimethylsilyl ether)	29,87	<b>57,87</b>	<b>5,82</b>
<b>Squalene</b> (2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene, 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-, (all-E)-)	25,14	<b>19,86</b>	<b>94,18</b>
<b>Lanosterol</b> (Lanost-8-ene-3β,7α-diol, 3-acetate)	29,58	<b>9,89</b>	<b>ND</b>
<b>Ergosterol</b> (Silane, (ergosta-5,7,22-trien-3β-yloxy)trimethyl-)	31,2	<b>5,75</b>	<b>ND</b>

**Tabla 2.** Efecto del compuesto II4I sobre el contenido de esteroides libres de *Trypanosoma cruzi*. Porcentajes de masa de los intermediarios escualeno, lanosterol y el producto final ergosterol, expuestos a una concentración de  $0,65 \pm 0,03 \mu\text{M}$  ( $EC_{50}$ ). Parámetros determinados mediante cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución.

## Determinación preliminar del efecto II4I, sobre la Osmoregulación en *Trypanosoma cruzi*:

Cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* fueron sometidos a  $0,65 \pm 0,03 \mu\text{M}$  ( $\text{EC}_{50}$ ) del derivado II4I, durante 4 días. Posteriormente se realizaron los ensayos de regulación en la disminución del volumen celular (RVD) registrando la variación en la turbidez, producto de los cambios osmóticos inducidos en los parásitos tratados y no tratados (Figura 10). Estos resultados muestran como aumenta el volumen celular de estos parásitos, cuando se induce un estrés hiposmótico evidenciado en la gráfica como, como una disminución en la absorbancia relativa tanto en parásitos tratados (curva roja) como no tratados (curva azul). Así, se observa que aquellos parásitos tratados con el  $\text{EC}_{50}$  del compuesto, experimentan además de una disminución de la absorbancia relativa más pronunciada, una total incapacidad para retomar su volumen celular natural.



**Figura 10.** Efecto del derivado II4I sobre la RVD de epimastigotes de *T. cruzi*. Control del ensayo en medio isosmótico (curva negra). Control del ensayo en medio hiposmótico sin derivado (curva azul). Ensayo con medio hiposmótico más  $\text{EC}_{50}$  del compuesto II4I (curva roja).

## Discusión.

Las estimaciones actuales de la organización mundial de la salud (OMS), indican que más de 10 millones de personas se encuentran infectadas con *Trypanosoma cruzi*. La principal vía de transmisión de este parásito es la vectorial, sin embargo se han caracterizado otras vías como la transfusión de sangre infectada, trasplacentaria madre-feto, trasplante de órganos, oral e infecciones accidentales en los laboratorios (Pérez-Aguilar y col, 2012). A pesar que se han desarrollado programas para combatir la transmisión por vía vectorial, continúa siendo un problema de salud pública (O.M.S 2014, Rassi y col, 2009, Pérez-Aguilar y col, 2012).

Lo anterior, se agudiza con la ausencia de drogas efectivas contra este parásito o por el incremento reportes de cepas naturalmente resistentes a fármacos que resultan favorables (Sánchez-Moreno y col, 2011). Los tratamientos actuales contra la enfermedad de Chagas son el nitofurano Nifurtimox (Lampit®, Bayer) y el nitroimidazol Benznidazol (Rochagan®, Radanil®, Roche). Ambas drogas resultan efectivas en la fase aguda de la enfermedad, pero sus mayores limitaciones las presenta en la fase crónica de la enfermedad con fuertes efectos secundarios, que pueden conllevar a la interrupción del tratamiento (Cançado, 1999, Urbina, 2006). Además, se ha reportado que la eficacia antiparasitaria del compuesto varía según la cepa del parásito (Andrade y col, 1992, Cançado, 1999).

En este sentido resulta urgente el desarrollo de nuevos fármacos más eficaces, menos costosos y menos tóxicos en la lucha contra esta enfermedad.

Es por ello que en este trabajo evaluamos el efecto de 22 derivados de Ftalacinas sobre la viabilidad de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, además de su toxicidad sobre células VERO. Del mismo modo, y con la finalidad de dar cuenta sobre el efecto biológico asociado, abordamos experimentalmente dos aspectos fundamentales para la sobrevivencia del parásito: contenido de esteroles libres y osmoregulación, ambos relacionados directamente el funcionamiento de la membrana celular del parásito.

En este sentido, a través del ensayo colorimétrico MTT evaluamos en qué grado estos derivados afectaban la viabilidad de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Logramos determinar que los compuestos 114l y 114m inhibieron de manera considerable, la proliferación parasitaria respecto al control no tratado. Siendo así más efectivos que la droga actualmente utilizada contra *Trypanosoma cruzi*, Benznidazol (Figura 6). Posteriormente evaluamos el efecto de estos 2 derivados sobre la viabilidad de células VERO, con la intención de determinar el grado inocuidad sobre estas células. Ambos compuestos 114m y 114l, afectaron pobremente la proliferación de estas células concordando con lo obtenido por Sanchez-Moreno y col. En 2011, donde expresan que sus derivados de Ftalacinas son poco tóxicos sobre células VERO. Teniendo en cuenta las similitudes de ambos compuestos en cuanto a actividad antiparasitaria y toxicidad sobre células VERO, se seleccionó el compuesto que 114l por poseer mejores condiciones de solubilidad y estabilidad en el tiempo.

Seguidamente, se construyó una curva de crecimiento que permitió determinar que el compuesto 114l, tiene un fuerte efecto antiparasitario sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Determinamos además que este efecto fue

dependiente de la dosis, mostrando un valor de  $EC_{50}$ :  $0,65\mu M \pm 0,3 \mu M$  (Figura 9). Lo anterior, resulta congruente con lo reportado por Sánchez-Moreno y col en 2011, los cuales diseñaron y sintetizaron una serie de derivados de 1,4-bis(alquilaminas)benzo[g]ftalazinas que presentaron actividad anti-*Trypanosoma cruzi* con valores de  $EC_{50}$  que van desde los  $13\mu M$  a los  $33\mu M$ . Considerando lo anterior, podemos decir que el derivado de Ftalacina II4I resultó ser más potente que los derivados reportados por Sánchez-Moreno.

La droga actualmente utilizada para el tratamiento contra la enfermedad de Chagas, el Benznidazol, presenta valores de  $EC_{50}$  de  $15\mu M$  (Sánchez-Moreno y col., 2011), siendo entonces el derivado Ftalacina II4I más potente con un  $EC_{50}$  hasta dos veces menor.

Habiendo caracterizado el efecto del derivado II4I sobre la viabilidad de *T.cruzi*, indagamos entonces algunos posibles mecanismos de acción los cuales en conjunto, nos permitieran explicar la acción antiparasitaria observada. Nos propusimos de esta manera, determinar el efecto del II4I sobre el contenido de esteroides libres de *Trypanosoma cruzi*.

Investigaciones adelantadas en las últimas dos décadas han demostrado que *Trypanosoma cruzi*, así como algunos hongos, requieren de esteroides específicos para la viabilidad celular y su proliferación en todos los estadios de su ciclo de vida, siendo el ergosterol el principal esteroide que compone sus membranas. Se ha determinado que inhibidores de biosíntesis de ergosterol tienen efectos supresivos en las infecciones de *Trypanosoma cruzi* en humanos (Urbina, 2002, Urbina y Docampo, 2003, Urbina, 2009). La base de la inhibición de la síntesis de esteroides consiste en que se ha demostrado que el ergosterol y



otros esteroides C-24 metil-esteroides, son únicos para este tipo de organismo y que sus funciones no pueden ser sustituidas por el colesterol o el fitoesterol, esteroides producidos por las células hospedadoras. Estas diferencias, hacen que inhibir esta ruta de síntesis pueda ser un blanco terapéutico a explotar para el desarrollo racional de fármacos, que ofrezcan una alternativa en la fase crónica de la enfermedad (Lazardi y col, 1990) y de esta forma, atacar al parásito sin afectar la célula hospedera.

Teniendo en cuenta lo anterior, se realizó un ensayo que nos permitió determinar si el compuesto II4I afectaba el contenido de esteroides libres en epimastigotes de *T. cruzi*. Observamos entonces como en parásitos no tratados (tabla 2) las cantidades naturales de los intermediarios escualeno y lanosterol fueron de 19.86% y 9,89% respectivamente, mientras que de ergosterol (producto final de esta ruta de síntesis) resultó ser 5,75%. Diversos estudios reportan cantidades similares de estos esteroides en condiciones naturales (Goad y col, 1998; Contreras y col, 1997; Liendo y col, 1998; Gerpe y col, 2008). Resalta el hecho de que luego del tratamiento con el  $EC_{50}$  de II4I, observamos una importante acumulación de intermediario escualeno en más de un 94% además de la total inexistencia de lanosterol y ergosterol. Otros estudios con derivados de allylaminas reportan también una visible acumulación de escualeno (Gerpe y col, 2009; Ryder y col, 1988). Es importante resaltar que esta acumulación de escualeno, sugiere que se está viendo afectada la actividad natural de la enzima escualeno epoxidasa, fundamental para el proceso de biosíntesis de ergosterol en estos parásitos y por ende, para su supervivencia (Gerpe A, y col 2008, Gerpe A y col, 2010; García-Torres y Pérez-Montfort, 2011)

Lo anterior, representa el primer reporte que da cuenta del efecto de este tipo de derivados, sobre la biosíntesis de esteroides en *Trypanosoma cruzi*. Sin embargo, en la bibliografía encontramos diversos estudios que vinculan la acumulación de escualeno con muerte celular en tripanosomatídeos tales como: *Trypanosoma cruzi* (Urbina y col, 1993; Urbina y col, 1998), *Leishmania mexicana* (Serrano-Martín y col, 2009) y *Leishmaniabraziliensis* (Bompart y col, 2013). Considerando todo lo anterior podemos sugerir que parte del efecto biológico de este compuesto sobre la viabilidad parasitaria, se deba a la acción sobre la biosíntesis de ergosterol.

La inhibición de la síntesis de esteroides, afecta directamente la integridad y funciones de la membrana plasmática de *Trypanosoma cruzi* (Urbina y col, 1988; Lazard, 1990; Urbina, 1997, Gerpe y col, 2010). El estado de la membrana plasmática es de vital importancia para la supervivencia de *T. cruzi* (Urbina y Docampo, 2003), especialmente si consideramos que su ciclo de vida digenético lo expone a importantes variaciones de osmolaridad externa, que debe controlar para poder sobrevivir en sus distintos hospederos.

Cuando el parásito es sometido a un medio extracelular con menor osmolaridad, se produce un fuerte ingreso de agua, debido a la alta concentración de iones que este posee el interior celular. Lo anterior provoca un aumento en el volumen intracelular del parásito, el cual es inmediatamente controlado por un proceso conocido como “regulación en la disminución del volumen celular” (RVD) (Rohloff y col, 2004). Estos procesos pueden incluir la salida de iones orgánicos como el  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , la liberación de osmolitos al medio extracelular, liberación de agua por medio del complejo de la vacuola contráctil, entre otros (Schoijet y col,

2008; Rohloff y col, 2004). Al inducir un estrés hiposmótico en los epimastigotes de *T. cruzi* se produce una fuerte entrada de agua hacia el parásito, aumento del volumen celular, el cual se ve reflejado en este experimento como una disminución de absorbancia relativa (Schoijet y col, 2008).

Teniendo en cuenta que los procesos de osmoregulación son claves para la supervivencia del parásito, nos propusimos evaluar el efecto del derivado II4I sobre la RVD de *T. cruzi*. En la figura 10, podemos observar como epimastigotes de *T. cruzi*, tratados y no tratados responden al estrés hiposmótico inducido. Podemos observar entonces como epimastigotes no sometidos a estrés hiposmótico (curva negra), no registran variaciones abruptas en su volumen intracelular, manteniéndose invariable la medición de absorbancia relativa. Seguidamente, observamos como epimastigotes sometidos a estrés hiposmótico sin añadirle II4I (curva azul), registran una disminución en la medición de la absorbancia relativa, es decir, un aumento de volumen celular para finalmente alcanzar su volumen natural. Finalmente podemos observar como aquellos epimastigotes sometidos a estrés hiposmótico y II4I (curva roja), registraron un mayor incremento del volumen intracelular, seguido de la incapacidad para retomar su volumen natural.

Este resultado, corresponde al primer reporte del efecto de derivados de ftalacinas sobre la osmoregulación en *T. cruzi*. No obstante, estudios similares como los de Rohloff y col en 2004, expresan también una rápida recuperación del volumen celular de *T. cruzi* cuando se someten a un estrés hiposmótico y como se ve afectada negativamente la regulación de su volumen cuando son tratados con  $\text{HgCl}_2$  y  $\text{AgNO}_3$ .

Con la realización de este trabajo, generamos evidencia científica, tendente a explicar el potente efecto biológico del derivado de ftalacina II4I, sobre la viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi*. Los resultados en su conjunto, demuestran el efecto antiparasitario del derivado II4I sobre *T. cruzi*, efecto este, que pareciera ser mas potente que el generado por el fármaco de primera línea Benznidazol. Logramos además demostrar que este compuesto afecta la viabilidad parasitaria, desestabilizando el normal funcionamiento de la membrana celular a dos niveles: afectación de la RVD y bloqueo de la biosíntesis de esteroides.

A futuro, resultaría interesante evaluar el efecto de estos derivados sobre amastigotes intracelulares, realizando entonces infecciones experimentales de células VERO exponiéndolas a tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*, y exponer los amastigotes que se formen al derivado. Posterior a esto deben realizarse los ensayos *in vivo*. Para ello, sería necesario ensayar el efecto de I4II sobre animales experimentales infectados con *Trypanosoma cruzi*, evaluando diversas vías de administración, posible disminución de niveles de parasitemia en sangre, porcentaje de sobrevivencia animal y posibles efectos adversos asociados. Todo lo anterior, con la intención de dar nuevos pasos en la propuesta futura de un compuesto alternativo contra la Enfermedad de Chagas, desarrollado y producido en nuestro país.

## Conclusiones.

1. El derivado de ftalacina II4I, afectó la viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi* de manera dosis-dependiente, con un  $EC_{50}$  de  $0,65 \pm 0,03\mu M$ .
2. El derivado I4II, generó un efecto parasiticida sobre epimastigotes de *T. cruzi*, más potente que el reportado para Benznidazol.
3. El derivado II4I afectó el normal funcionamiento de la enzima escualeno epoxidasa, inhibiendo la biosíntesis de ergosterol en epimastigotes de *T. cruzi*.
4. El derivado II4I desestabilizó gravemente el proceso de regulación en la disminución del volumen celular, en epimastigotes de *T. cruzi*.

## Bibliografía.

- Andrade, S.G., Marchillo, K., Stamstad, T., Conklin, R. **1992**. Specific chemotherapy of Chagas' disease: a comparison between the response in patients and experimental animals infected with the same strains. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86, 624–62
- Añez, N., Crisante, G., Rojas, A. **2004**. Update of Chagas disease in Venezuela- a review. *Mem. Inst. Osw. Cruz.* 99: 787-787.
- Aziz MA, Youssef A, Essam I. **2012**. Synthesised some annelated phthalazine derivatives and acyclo C-nucleosides from 1-chloro-4-(2, 4, 6-trimethylphenyl) phthalazine precursor, and evaluated their antimicrobial. *Turk. J. Chem.*; 36: 347–366.
- Barretto M. & Ribeiro R. **1979**. Reservatórios silvestres do *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas 1909. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 39: 25-36.
- Becerril, M. A., **2008**. *Parasitología Medica. Segunda Edicion.* Ed.MacGrawHill / Interamericaca de Editores S.A. Mexico DF, Mexico.
- Berridge M.V. and Tan A.S. **1993**. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archiv. of Biochem. and Bioph.* 303: 474-82.
- Benaim G, Sanders J., Garcia-Marchan Y., Colina C., Lira R., Caldera A., Payares G., Sanoja C., Burgos J., Leon-Rossell A., Concepcion J., Schijman A., Levin M., Oldfield E., Urbina J. **2006**. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J. Med .Chem.* 49: 892-899
- Bompard D., Núñez-Durán J., Rodríguez D., Kouznetsov V., Meléndez C., Sojo F., Arvelo F., Visbal G., Alvarez A., Serrano-Martín X., García-Marchán Y. **2013**. Anti-leishmanial evaluation of C2-aryl quinolines: Mechanistic insight on bioenergetics and sterol biosynthetic pathway of *Leishmania braziliensis*. *Bioorg. Med. Chem.* 21: 4426–4431.
- Brener Z. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **1971**; 12:171-8.

- Cançado, J.R., **1999**. Criteria of Chagas disease cure. *Mem. Inst. Osw. Cruz* 94: 331-336.
- Carrasco, H.J., Segovia, M., Londoño, J.C., Ortegoza, J., Rodríguez, M., Martínez, C. E. **2015**. *Panstrongylus geniculatus* and four other species of triatomine bug involved in the *Trypanosoma cruzi* enzootic cycle: high risk factors for Chagas's disease transmission in the Metropolitan District of Caracas, Venezuela. *Parasites & Vectors* 7:602
- Contreras, L. M., J. Vivas, and J. A. Urbina. **1997**. Altered lipid composition and enzyme activities of plasma membranes from *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes grown in the presence of sterol biosynthesis inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 53:697–704.
- Coura, J., Viñas, P. Chagas disease: a new worldwide challenge. 2010. *Nature* 465, S6–S7
- De Souza, E.M.; Oliveira, G.M.; Boykin, D.W.; Kumar, A.; Hu, Q.; Soeiro, **2006**, M.N.C. Trypanocidal activity of the phenylsubstituted analogue of furamidine DB569 against *Trypanosoma cruzi* infection in vivo. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 610-614.
- Dias J. C. 2000. Epidemiologia. pp. 48-74. En: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Eds Brener Z., Andrade Z. & Barral-Netto M. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, Brasil.
- Docampo, R.; Moreno, S.N. **2008**, The acidocalcisome as a target for chemotherapeutic agents in protozoan parasites. *Curr. Pharm. Des.* 14, 882-888.
- Docampo, R.; de Souza, W.; Miranda, K.; Rohloff, P.; Moreno, S.N. **2005**. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 251–261.
- Docampo, R. 1990. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem. Biol. Interact.* 73: 1-27.
- Frasch, AC. **2000**. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today*; 16:282-6.
- Figueroa-Cortés, A.A.; Torres-Pérez, A.; Salaiza, N.; Cabrera, N.; Escalona-Montañó, A.; Rondán, A.; Aguirre-García, M.; Gómez-Puyou, A.; Pérez-Montfort, R.; Becker, I. A **2008**.

Monoclonal antibody that inhibits *Trypanosoma cruzi* growth in vitro and its reaction with intracellular triosephosphate isomerase. *Parasitol. Res.* 102, 635-643.

- Garcia-Torres, I., Pérez-Montfort, R. **2011**. Avances de la identificación de blancos terapéuticos y el diseño racional de fármacos contra la enfermedad de Chagas. *REB.* 30(2). 68-81
- Gerpe, A.; Álvarez, G.; Benítez, D.; Boiani, L.; Quiroga, M.; Hernández, P.; Sortino, M.; Zachino, S.; González, M.; Cercetto, H. **2010**. 5-Nitrofuranes and 5-nitrothiophenes with anti-*Trypanosoma cruzi* activity and ability to accumulate squalene. *Bioorg Med Chem* 17:7500-7509
- Gerpe, A.; Álvarez, G.; Benítez, D.; Boiani, L.; Quiroga, M.; Hernández, P.; Sortino, M.; Zachino, S.; González, M.; Cercetto, H. **2009**. 5-Nitrofuranes and 5-nitrothiophenes with anti-*Trypanosoma cruzi* activity and ability to accumulate squalene. *Bioorg. Med. Chem.*, 17, 7500-7509.
- Gerpe A.; Odreman-Núñez I.; Draper P.; Boiani L.; Urbina JA.; González M.; Cercetto H. **2008**. Heteroallyl-containing 5-nitrofuranes as new anti-*Trypanosoma cruzi* agents with a dual mechanism of action. *Bioorg Med Chem* 16:569-577.
- Goad, J.L.; Berens, R.L.; Marr, J.; Beach, D. H.; Holz, G. Jr. **1989**. The activity of ketoconazole and other azoles against *Trypanosoma cruzi*: biochemistry and chemotherapeutic action in vitro. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 32 179-190
- Hoare, C. A. 1972. *The Trypanosimes of Mammals. A Zoological Monograph.* Black. Scient. Pub. (Oxford). Pp.749
- Huber W. and Koella J. 1993. A comparison of three methods of estimating EC<sub>50</sub> in studies of drug resistance in malaria parasites. *Acta Trop.* 55:257-61.
- Kennedy, K.J.; Bressi, J.C.; Gelb., M.H. A. **2001**. Disubstituted NAD<sup>+</sup> analogue is a nanomolar inhibitor of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Med. Chem. Lett.* 11, 95-98.
- Krauth-Siegel, R.L.; Bauer, H.; Schirmer, R.H. **2005**. Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: Old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 690-715.



- Lazardi, K., Urbina, J., De Souza, W. **1990**. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*.
- Leveille-Webster, C. R. and Arias, I. M. ,**1995**. The biology of P.glycoproteins. *J. Membrane Biol.* 143:89-102
- Lecaille, F.; Kaleta, J.; Brömme, D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 4459–4488.
- Lemerrier, G.; Dutoya, S.; Luo, S.; Ruiz, F.A.; Rodrigues, C.O.; Baltz, T.; Docampo, R.; Bakalara, N. A. **2002**. vacuolar-type H<sup>+</sup>-pyrophosphatase governs maintenance of functional acidocalcisomes and growth of the insect and mammalian forms of *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.*, 277, 37369-37376.
- Lemerrier, G.; Espiau, B.; Ruiz, F.A.; Viera, M.; Luo, S.; Baltz, T.; Docampo, R.; Bakalara, N. **2004**. A pyrophosphatase regulating polyphosphate metabolism in acidocalcisomes is essential for *Trypanosoma brucei* virulence in mice. *J. Biol. Chem.* 279, 3420-3425.
- Liendo, A; Lazardi, K; Urbina, JA; **1998**. In-vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the bis-triazole D0870 and its S(-) enantiomer against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 41, 197–205
- Li, Z.; Fennie, M.W.; Ganem, B.; Hancock, M.T.; Kobašlija, M.; Rattendi, D.; Bacchi, C.J.; Sullivan, M.C.O. **2001**. Polyamines with N-(3-phenylpropyl) substituents are effective competitive inhibitors of trypanothione reductase and trypanocidal agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 251-254.
- McKerrow, J.H.; Caffrey, C.; Kelly, B.; Loke, P.; Sajid, M. **2006**. Proteases in parasitic diseases. *Annu. Rev. Pathol.* 1, 497–536.
- Mottram, J.C.; Brooks, D.R.; Coombs, G.H. **1998**. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host–parasite interactions. *Curr. Opin. Microbiol.* 1, 455–460.

- Mande, S.C.; Mainfroid, V.; Kalk, K.H.; Goraj, K.; Martial, J.A.; Hol, W. G. J. **1994**. Crystal structure of recombinant human triosephosphate isomerase at 2.8 Å resolution. triosephosphate isomerase-related human genetic disorders and comparison with the trypanosomal enzyme. *Protein Sci.* 3, 810–821.
- Nahed F, Ghaffar AE, Mona A, Ghanem HM, and HM Zaki. **2011**. Synthesized and biochemical evaluation of some substituted phthalazines. *Journal of American Science*; 7 (4): 771-781.
- Noireau F., Diosque P. & Jansen A. M. **2009**. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet. Res.* 40: 26.
- Pérez-Aguilar, M.C., Alarcón, M., Araujo, S., Goncalves L. **2012**. Efecto de la infección congénita por *Trypanosoma cruzi* sobre el desarrollo intrauterino y la respuesta inmune fetal-neonatal. *Invest. Clin* 53(2):190-204
- Pinto-Dias JC. **2006**. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* y sus características bio-ecológicas, como agente de enfermedades transmitidas por alimentos. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 370-375.
- Rassi, A Jr. , Dias, J.C.P., Marin-Nieto, J.A., Rassi A. **2009**. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas disease. *Heart* ; 95:524-534
- Rey, L. **1991**. *Parasito e Doenças Parasitárias do Homem nas Americas e na Africa*. Segunda Edición, Ed. Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, Brasil.
- Rohloff, P., Montalvetti, A., Docampo, R., **2004**. Acidocalcisomes and the Contractile Vacuole Complex Are Involved in Osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *The Jour. Bio. Chem.* : 51: 52270 – 52281.
- Ryder, N. S. **1988**. Mode of action of allylamines., Sterol biosynthesis inhibitors. Pharmaceutical and agrochemical aspects. VCH Press, Ellis Harwood, Chichester, England. , In D. Berg and M. Plempel (ed.) 151-167
- Sánchez-Moreno M., Sanz A., Gómez-Contreras F., Navarro P., Marín C., Ramirez-Macias I., Rosales M., Olmo F., Garcia-Aranda I., Campayo L., Cano C., Arrebola F., Yunta M. **2011a**. In Vivo Trypanosomicidal Activity of Imidazole- or Pyrazole-Based Benzo[g]phthalazine

Derivatives against Acute and Chronic Phases of Chagas Disease. J. Med. Chem., 54, 970–979.

- Sánchez-Moreno M., Gómez-Contreras F., Navarro P., Marín C., Ramírez-Macias I., Rosales M., Olmo F., Sanz A., Campayo L., Cano C., Yunta M. **2011b**. In vitro leishmanicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* species. J Antimicrob. Chem. . 67: 387–397.
- Sánchez-Moreno, M.; Gómez-Contreras, F.; Navarro, P.; Marín, C.; Ramírez-Macías, I.; Olmo, F.; Sanz, A. M.; Campayo, L.; Cano, C.; Yunta, M. J. R. **2012**. In vitro leishmanicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against *L. infantum* and *L. braziliensis* species. J. Antimicrob. Chem., 67, 387–397.
- Sanz, A. M.; Gomez-Contreras, F.; Navarro, P.; Sanchez-Moreno, M.; Boutaleb-Charki, S.; Campuzano, J.; Pardo, M.; Osuna, A.; Cano, C.; Yunta, M. J. R.; Campayo, L. **2008**. Efficient inhibition of Fe-SOD and of *Trypanosoma cruzi* growth by benzo[g]phthalazine derivatives functionalized with one or two imidazole rings. J. Med.Chem. 51, 1962–1966.
- Scott, D.A.; de Souza, W.; Benchimol, M.; Zhong, L.; Lu, H.G.; Moreno, S.N.J.; Docampo, R. **1998**. Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. J. Biol. Chem., 273, 22151-22158.
- Schenkman S, Ferguson MA, Heise N, et al. **1993**. Mucinlike glycoproteins linked to the membrane by lysosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol; 59:293-303
- Serrano-Martin X., Payares G. and Mendoza-León A. **2006**. Glibenclamide. A blocker of  $K^+_{ATP}$  channels shows anti-leishmanial activity in experimental murine cutaneous leishmaniasis. Antimicrob. Agents Chemother. 4:72-76.
- Serrano-Martin X., Gracia-Marchan Y., Fernandez A., Rodriguez N., Rojas H., Visbal G. and Benaim G. **2009**. Amiodarone destabilizes the intracellular  $Ca^{2+}$  homeostasis and the biosynthesis of sterols in *Leishmania Mexicana*. Antimicrob. Agents Chem. 53:1403-10.

- Stevens, J. R.; Noyes, H. A.; Dover, G. A. y Gibson, W. C. **1999a**. The taxonomic Position and Evolutionary relationship between of *Trypanosoma rangeli*. *Internat. Jour. Parasitol.* 29: 747-759.
- Stevens, J. R.; Noyes, H. A.; Dover, G. A. y Gibson, W. C. **1999b**. The Ancient and Divergent Origins of the Human Pathogenic Trypanosomes *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, 118 107-116.
- Stevens, J. R.; Noyes, H. A.; Dover, G. A. y Gibson, W. C. **2001**. The Molecular Evolution of Trypanosomatidae. *Adv. Parasitol*, 48: 1-56.
- Schoijet, A.C., Miranda, K., Girard-Dias, W., De Souza, W., Flawiá, M.M., Torres, H., Docampo, R., Alonso, G., **2008**. A *Trypanosoma cruzi* Phosphatidylinositol 3-kinase (TcVps34) Is Involved in Osmoregulation and Receptor-mediated Endocytosis. *Jour. Biol. Chem.*, 283:31541 – 31550.
- Souza, D.H.F.; Garratt, R.C.; Araujo, A.P.U.; Guimaraes, B.G.; Jesus, W.D.P.; Michels, P.A. M.; Hannaert, V.; Oliva, G. **1998**. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. *FEBS Lett.*, 424, 131-135.
- Tay J, Lara R. Velazco O, Gutiérrez M. **1991**. *Parasitología Médica* 5a. ed. México; Méndez Cervantes; p. 112-22.11
- Urdaneta-Morales S. & McLure I. **1981**. Experimental infections in Venezuelan lizards by *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 38: 99-105.
- Urbina, J.A. **2010**. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Tropica.* 115, 55-68.
- Urbina, J. **2009**. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Mem Ints Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* . 104: 311-318
- Urbina, J. **2006**. Mechanisms of action of lysophospholipid analogues against trypanosomatids parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 100. Suppl. S9-S16

- Urbina, J. **2005**. Nuevos avances en el desarrollo del tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas. Grupo Científico de Trabajo sobre Enfermedad de Chagas del Programa de Investigación y Docencia en Enfermedades Tropicales (TDR) de la Organización Mundial de la Salud/Oficina Panamericana de la Salud, Buenos Aires, Argentina.
- Urbina, J. A.; Docampo, R. **2003**. Specific Chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *trends Parasitol.*, 19, 495-501.
- Urbina, J.A., **2002**. Chemotherapy of Chagas Disease. *Curr.Pharm.Design* 8,287-295.
- Urbina, J.; Payares, G.; Contreras, L.; Liendo, A.; Sanoja, C.; Molina, J.; Piras, M.; Piras, R.; Perez, N.; Winker, P.; Loebenberg, D. **1998**. Antiproliferative Effects and Mechanism of Action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: In Vitro and In Vivo Studies. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1771–1777
- Urbina, J. **1997**. Lipids biosynthesis pathways as chemotherapeutic target in kinetoplastids parasites. *Parasitology* 114, 91-9
- Urbina, J., Payares, G., Molina, J., Sanoja, C., Liendo, A., Lazard, K., Piras, M., Piras, R., Perez, N., Wincker, P., Ryley, J. **1996**. Cure of short- and long- term experimental Chagas' disease using D0870. *Science*. 273: 969-971.
- Urbina, J.; Lazard, K.; Marchan, K.; Visbal, G.; Aguirre, T.; Piras, M.; Piras, R.; Maldonado, R.A.; Payares, G.; De Souza, W. **1993**. Mevinolin (Lovastatin) Potentiates the Antiproliferative Effects of Ketoconazole and Terbinafine against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: In Vitro and In Vivo Studies. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 580-591
- Urbina, J. A. Vivas, J., Ramos H., Larralde, G., Aguilar Z., Avilan L. **1988**. Alteration of lipid order profile and permeability of plasma membranes from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes grown in the presence of ketoconazole. *Mol. Biochem. Parasitol.* 30:185-196.
- Vargas, F. **2005**. Epidemiología Molecular de la Tripanosiasis Americana (*Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*) en la Región Norte y Nororiental del Perú. Tesis Doctoral: M. Sánchez-Moreno. Universidad de Granada.

Recursos electrónicos:

- Centro de diagnostico de enfermedades.  
<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html> [Consultado 28 de Enero, 2015]
- Organización mundial de la salud. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>  
[Consultado, 28 de Enero, 2015]
- Ministerio del poder popular para la salud. <http://www.mpps.gob.ve/> [Consultado 5 de Febrero, 2015]