



UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Efecto de la Dronedaron sobre *Leishmania mexicana* y caracterización de su mecanismo de acción con respecto a la homeostasis de Ca^{2+} intracelular

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela por la Bachiller Paola Virginia Casanova Rosas como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor: Dr. Gustavo Benaim

CARACAS, VENEZUELA
OCTUBRE- 201

RESUMEN

La Leishmaniasis es una enfermedad parasitaria generada por algunas especies del género *Leishmania*, tales como *Leishmania mexicana*. Según la OMS, esta enfermedad representa un grave problema de salud pública ya que está distribuida en 88 países causando 57.000 muertes al año. El tratamiento de primera línea de esta enfermedad es la quimioterapia, siendo las drogas utilizadas actualmente, Pentostan y Glucantime, dos compuestos que generan una serie de efectos tóxicos a nivel cardíaco, renal y hepático en los pacientes. La anfotericina B pertenece a las drogas de segunda línea utilizada contra la leishmaniasis. Sin embargo, por sus altos costos, poca disponibilidad y toxicidad, su uso se ha visto limitado. Por otra parte, la miltefosina representa uno de los mayores avances en el tratamiento de esta enfermedad, especialmente en la India, pero su teratogenicidad y el desarrollo de cepas resistentes han reducido su rango de aplicabilidad.

En nuestro laboratorio se demostró que la amiodarona, una droga utilizada como agente antiarrítmico, genera la disrupción de la homeostasis de Ca^{2+} intracelular, ocasionando la muerte de parásitos como *T. cruzi* (Benaim y col., 2006) y *L. mexicana* (Serrano y col. 2009). Sin embargo, la amiodarona genera una serie de efectos secundarios, debido a que el yodo en su estructura se acumula en la tiroides, ocasionando toxicidad. Además, tiene efectos adversos a nivel pulmonar, neurológico y hepático.

La dronedarona es una droga aprobada por la FDA (Food and Drug Administration), que al igual que la amiodarona, es utilizada como agente antiarrítmico. Sin embargo, la dronedarona carece de yodo. Por esta razón nos hemos planteado en

este trabajo determinar el efecto *in vitro* que tiene esta droga sobre la viabilidad de *Leishmania mexicana* tanto en promastigotes como amastigotes así como el efecto que ejerce sobre la concentración de Ca^{2+} intracelular, el potencial electroquímico mitocondrial y los acidocalcisomas del parásito. Los resultados obtenidos demuestran que la dronedarona es capaz de afectar la viabilidad tanto de promastigotes como de amastigotes de *L. mexicana*, observándose un efecto dosis-dependiente. Esta droga produjo además un incremento en la concentración Ca^{2+} intracelular. También induce la desestabilización del potencial electroquímico mitocondrial y la alcalinización de los acidocalcisomas con mayor velocidad que la amiodarona. Estos resultados sugieren que la dronedarona es capaz de inducir la muerte del parásito, desestabilizando la homeostasis de Ca^{2+} intracelular, mediante la disrupción del potencial electroquímico mitocondrial y la alcalinización de los acidocalcisomas.

INDICE DE ABREVIATURAS

- $[Ca^{2+}]_i$: Concentración de calcio intracelular.
- Ca^{2+} : Ión calcio.
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium.
- DMSO: Dimetil- sulfóxido
- FCCP: Carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona.
- FDA: Food and Drug Administration.
- H^+ : Protón.
- K^+ : Ión potasio.
- LIT: Liver Infusion Tryptose (medio de cultivo).
- Na^+ : Ión sodio.
- OMS: Organización Mundial de la Salud.
- PBS: Buffer fosfato salino.
- PMCA: Ca^{2+} - ATPasa de la membrana plasmática.
- PPI: pirofosfato inorgánico.
- SERCA: Ca^{2+} - ATPasa del retículo (sarco)endoplasmático.

INDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCION | 1 |
| 1.1 El Ca ²⁺ en las células eucarióticas..... | 1 |
| 1.1.1. Organelos intracelulares que almacenan Ca ²⁺ | 2 |
| 1.2 Tripanosomatidios | 4 |
| 1.3. El género <i>Leishmania</i> | 5 |
| 1.4 Leishmaniasis..... | 9 |
| 1.4.1. Leishmaniasis en Venezuela. | 12 |
| 2. ANTECEDENTES | 14 |
| 2.1. Quimioterapia contra la leishmaniasis | 14 |
| 2.1.1 Enfoques racionales: Nuevas drogas leishmanicidas y nuevos blancos de acción. | 16 |
| 2.2 Amiodarona | 18 |
| 2.3 Dronedarona | 27 |
| 3. OBJETIVOS | 34 |
| 3.1. Objetivos específicos..... | 34 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 35 |
| 4.1 Materiales | 35 |
| 4.1.1 Reactivos..... | 35 |
| 4.1.2 Equipos..... | 35 |
| 4.3 Cultivo de los amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> y evaluación de su susceptibilidad a la droga dronedarona..... | 37 |
| 4.4 Determinación del IC ₅₀ de la dronedarona en cultivos de promastigotes y amastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> mediante el método de Huber y Koella (1993). 38 | |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 4.5 | Determinación del efecto de la dronedarona sobre la concentración de calcio intracelular Ca^{2+} en poblaciones de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> | 39 |
| 4.6 | Determinación del efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> | 43 |
| 4.7 | Determinación del efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre los acidocalcisomas de promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> | 46 |
| 5. | RESULTADOS | 48 |
| 5.1 | Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre promastigotes de <i>L. mexicana</i> | 48 |
| 5.2 | Efecto de la dronedarona sobre macrófagos infectados con amastigotes de <i>L. mexicana</i> | 50 |
| 5.3. | Efecto de la dronedarona sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en promastigotes de <i>L. mexicana</i> | 52 |
| 5.4 | Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de <i>L. mexicana</i> | 54 |
| 5.5 | Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre los acidocalcisomas de promastigotes de <i>L. mexicana</i> | 58 |
| 6. | DISCUSION | 60 |
| 7. | CONCLUSIONES | 65 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Mecanismos reguladores de Ca^{2+} en Tripanosomatidios..... | 5 |
| Figura 2. Insecto vector de la leishmaniasis <i>Phlebotomus pappatasi</i> | 6 |
| Figura 3. Insecto vector de la leishmaniasis <i>Lutzomyia longipalpis</i> | 6 |
| Figura 4. Clasificación taxonómica del género <i>Leishmania</i> del Viejo y del Nuevo mundo.. | 7 |
| Figura 5. Ciclo de vida del parásito <i>Leishmania spp.</i> | 9 |
| Figura 6. Leishmaniasis cutánea..... | 10 |
| Figura 7: Leishmaniasis mucocutánea..... | 10 |
| Figura 8. Leishmaniasis visceral..... | 11 |
| Figura 9. Distribución geográfica de leishmaniasis visceral y cutánea..... | 12 |
| Figura 10. Tasa de incidencia de leishmaniasis promedio en Venezuela en el año 2005. | 13 |
| Figura 11. Efecto de concentraciones crecientes de la amiodarona sobre poblaciones de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> | 19 |
| Figura 12. Efecto de concentraciones crecientes de amiodarona sobre poblaciones de amastigotes intracelulares de <i>T. cruzi</i> cultivados en células Vero | 20 |
| Figura 13. Efecto de la amiodarona sobre la $[Ca^{2+}]_i$ de <i>T. cruzi</i> | 21 |
| Figura 14. Efecto de la amiodarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial en células Vero infectadas con amastigotes de <i>T. cruzi</i> | 22 |
| Figura 15. Efecto de concentraciones crecientes de amiodarona sobre poblaciones de promastigotes de <i>L. mexicana</i> | 23 |
| Figura 16. Efecto de concentraciones crecientes de amiodarona sobre poblaciones de amastigotes de <i>L. mexicana</i> sobre la viabilidad de los macrófagos | 24 |
| Figura 17. Efecto de la amiodarona sobre la $[Ca^{2+}]_i$ de promastigotes de <i>L. mexicana</i> . | 25 |

| | |
|--|----|
| Figura 18. Efecto de la amiodarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial de <i>Leishmania mexicana</i> | 26 |
| Figura 19. Efecto de la amiodarona sobre los acidocalcisomas de <i>Leishmania mexicana</i> | 27 |
| Figura 20. Estructura molecular de la dronedarona y la amiodarona..... | 28 |
| Figura 21. Efecto de concentraciones crecientes de dronedarona y amiodarona sobre poblaciones de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> | 29 |
| Figura 22. Efecto de concentraciones crecientes de dronedarona sobre poblaciones de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> y sobre la viabilidad de células Vero..... | 30 |
| Figura 23. Efecto de la dronedarona sobre la $[Ca^{2+}]_i$ de <i>T. cruzi</i> | 31 |
| Figura 24. Efecto de la amiodarona y la dronedarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial de <i>T. cruzi</i> | 32 |
| Figura 25. Efecto de la amiodarona y la dronedarona sobre los acidocalcisomas de <i>T. cruzi</i> | 33 |
| Figura 26. Espectro de excitación y emisión del Fura 2 en el rango de concentración de Ca^{2+} desde 0 hasta 39.8 μ M..... | 39 |
| Figura 27. Representación esquemática de la incorporación del Fura 2 a la célula..... | 41 |
| Figura 28. Representación esquemática del sistema de detección de Ca^{2+} mediante dos longitudes de onda de excitación..... | 42 |
| Figura 29. Espectro de excitación y emisión de la rodamina 123..... | 44 |
| Figura 30. Espectro de excitación y de emisión del MitoTracker®..... | 45 |
| Figura 31. Espectro de excitación y de emisión de la naranja de acridina..... | 47 |
| Figura 32. Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre promastigotes de <i>L. mexicana</i> | 49 |
| Figura 33. Efecto de la dronedarona sobre amastigotes intracelulares de <i>L. mexicana</i> | 51 |
| Figura 34. Efecto de la dronedarona sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en promastigotes de <i>L. mexicana</i> | 53 |

| | |
|--|----|
| Figura 35. Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de <i>L. mexicana</i> | 56 |
| Figura 36: Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de <i>L. mexicana</i> | 57 |
| Figura 37. Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre los acidocalcisomas de promastigotes de <i>L. mexicana</i> | 59 |

1. INTRODUCCION

1.1 El Ca^{2+} en las células eucarióticas.

La regulación controlada de los niveles intracelulares del ión calcio (Ca^{2+}) por parte de las células es un mecanismo esencial en los procesos de transmisión de señales. Este catión cumple una gran cantidad de funciones en los seres vivos, jugando un papel crucial como segundo mensajero en todas las células eucarióticas, incluyendo las de mamíferos, plantas y organismos unicelulares (Benaim, 1996). En estas células el Ca^{2+} interviene en muchas funciones celulares como son, división y diferenciación celular, secreción, contracción muscular, metabolismo energético y otros.

La concentración citoplasmática de Ca^{2+} de las células en reposo es de 20-50 nM, mientras que en el medio extracelular la concentración es de aproximadamente 2 mM. (Benaim y col., 2002). Existen diferentes mecanismos como canales, bombas e intercambiadores, los cuales se encargan de mantener la concentración de Ca^{2+} intracelular a esta relación de cinco órdenes de magnitud por debajo de la presente en el medio externo.

La entrada de Ca^{2+} al interior celular trae como consecuencia la acumulación de este ión, debido a esto encontramos otros mecanismos de transporte especializado con la finalidad de retornar la concentración de Ca^{2+} a su nivel basal y mantener el gradiente electroquímico del Ca^{2+} en la célula. El intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, la Ca^{2+} -ATPasa en la membrana plasmática (PMCA), la Ca^{2+} -ATPasa del retículo (sarco)endoplasmático (SERCA) y el uniporte electroforético de Ca^{2+} en la mitocondria, transportan el catión al exterior celular o a los distintos reservorios intracelulares, regulándose así la entrada y salida de Ca^{2+} de la célula (Carafoli, 1987). Todos estos mecanismos, salvo el

intercambiador Na⁺/Ca²⁺ se han identificado en diferentes tripanosomatidios, incluyendo *L. mexicana* (Benaim y García, 2011).

1.1.1. Organelos intracelulares que almacenan Ca²⁺.

Uno de los reservorios de Ca²⁺ intracelular es el retículo endoplasmático con concentraciones del catión en el rango milimolar. La entrada de Ca²⁺ hacia el retículo endoplasmático es catalizada por la Ca²⁺-ATPasa de retículo (sarco)endoplasmático, que activamente ingresa dos iones Ca²⁺ con la hidrólisis de una molécula de ATP, disminuyendo así la concentración de Ca²⁺ citoplasmático (Lodish, 2005). Diversas Ca²⁺-ATPasas del tipo SERCA han sido descritas en diferentes protozoarios parásitos (tabla 1) (Moreno y Docampo, 2003).

Tabla 1 - Ca²⁺ATPasas reportadas en protozoarios parásitos (Moreno y Docampo, 2003).

| Ca ²⁺ ATPases that have been cloned and sequenced in parasitic protozoa. | | | | | |
|---|------------------------|------------------|---------------|-----------|---------------------|
| Protozoa | Name | Accession number | Type | Expressed | Function confirmed* |
| <i>Trypanosoma cruzi</i> | Tca1 | U70620 | PMCA | Yes | Yes |
| | TcSCA | AF093566 | SERCA | Yes | Yes |
| <i>Trypanosoma brucei</i> | Tba1 | M73769 | SERCA | Yes | Yes |
| | TbA1 | AY065988 | PMCA | Yes | Yes [†] |
| | TbA2 | AY065989 | PMCA | Yes | Yes [†] |
| <i>Leishmania mexicana amazonensis</i> | Lmaa1 | U70540 | SERCA | Yes | Yes |
| <i>Plasmodium falciparum</i> | PfATPase6 | X71765 | SERCA | No | No |
| | PfATP4 | AF203980 | New subclass? | Yes | Yes |
| <i>Toxoplasma gondii</i> | TgA1 | AF151372 | PMCA | Yes | Yes |
| <i>Cryptosporidium parvum</i> | CpATPase1 | U65981 | New subclass? | Yes | No |
| <i>Entamoeba histolytica</i> | Pmca [‡] | U20321 | PMCA | Yes | Yes |
| <i>Trichomonas vaginalis</i> | TVCA1 | U65066 | SERCA | No | No |
| | TVCA(2-4) [‡] | AF145282 | Unknown | No | No |
| | | AF145283 | | | |
| | | AF145279 | | | |

Se han reportado evidencias de que las SERCA en *L. amazonensis* aparentemente son un factor importante en la virulencia de estos parásitos (Rodríguez y col. 2002).

La mitocondria es otro de los organelos que almacenan Ca^{2+} . A nivel de la membrana interna mitocondrial se observa la presencia de un uniporte para Ca^{2+} el cual guía la entrada electrogénica del catión, gracias al gradiente electroquímico generado por la traslocación de protones, mientras que la salida del catión es mediada por un intercambio electroneutro de Ca^{2+} interno por H^+ o Na^+ externos. (Docampo y Vercesi, 1989; Vercesi y col., 1992; Benaim y col., 1990).

Se ha reportado en miembros de los géneros de *L. donovani* (Vercesi y col., 1992) y *T. cruzi* (Docampo y Vercesi., 1989) el transporte de Ca^{2+} a nivel mitocondrial mediante el uso de digitonina. Igualmente, se ha descrito en promastigotes de *L. braziliensis*, demostrando además que la fuerza motriz para la captación de Ca^{2+} es la energía generada a partir del potencial electroquímico mitocondrial (Benaim y col., 1990). Este sistema de transporte es estimulado por sustratos respiratorios como el succinato e inhibidos por bloqueadores de la cadena respiratoria como la antimicina A (Benaim y col., 1990; Vercesi y col.1991,1992).

Los acidocalcisomas son organelos acídicos que acumulan gran cantidad de Ca^{2+} , y son muy abundantes e importantes en tripanosomatidios. Se ha reportado que en los acidocalcisomas, el Ca^{2+} cumple una función de unir grandes cantidades de pirofosfatos (PPi, moneda energética alternativa al ATP, presente en grandes cantidades en estos parásitos). Además, se han involucrado en el mantenimiento de la osmolaridad (Docampo, 2008). Este organelo posee Ca^{2+} -ATPasas involucradas en la entrada de Ca^{2+} a su interior con alta similitud con las Ca^{2+} -ATPasas vacuolares presentes en otros eucariotes unicelulares y una H^+ -pirofosfatasa vacuolar involucrada en su acidificación (Docampo y col., 2001). Estudios fisiológicos han permitido postular la existencia de un

intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ involucrado en la salida de Ca^{2+} de estos organelos (Vercesi y col., 1996).

1.2 Tripanosomatidios

Los organismos del Orden Kinetoplastida son caracterizados por tener flagelo y una estructura intracelular única llamada kinetoplasto, conformada por una red de círculos de ADN localizado en una única gran mitocondria. Muchas especies del Orden Kinetoplastida tienen su ciclo de vida alternándose entre un organismo invertebrado y uno vertebrado. Las especies que tienen más de un hospedador, son llamados parásitos heteroxenos. Las especies heteroxenas a menudo presentan dos o más tipos morfológicos, con una de las formas presentes en el organismo vertebrado y la otra en el invertebrado. En los parásitos de interés sanitario su ciclo evolutivo, se realiza entre un organismo vertebrado (hombre y mamíferos) y un insecto (Gunn y Pitt, 2012).

La Familia Trypanosomatidae incluye organismos parásitos protozoarios del hombre, de localización en sangre y tejidos, que tienen como peculiaridad, el hecho de poseer un solo flagelo. La Familia Trypanosimatidae incluye 8 géneros, entre ellos, *Trypanosoma* y *Leishmania*, los cuales son digenéticos, es decir, infectan un vector y un hospedador definitivo, entre insectos invertebrados y animales vertebrados. (Romero, 2007).

Los tripanosomatidios poseen una red de señalización dependiente de Ca^{2+} que incluye mecanismos para el aumento de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático, así como también de mecanismos para regresar ésta a su concentración basal. Los principales organelos celulares involucrados en tripanosomatidios son el retículo endoplasmático, la mitocondria y los acidocalcisomas, antes mencionados. (Fig.1).

En estudios recientes, se ha demostrado que durante los procesos infectivos y de interacción con las células hospedadoras, se producen importantes cambios en las

concentraciones intracelulares de Ca^{2+} , tanto en *T.cruzi* (Moreno y col., 1994) como el *L. amazonensis* (Lu y col.1997).

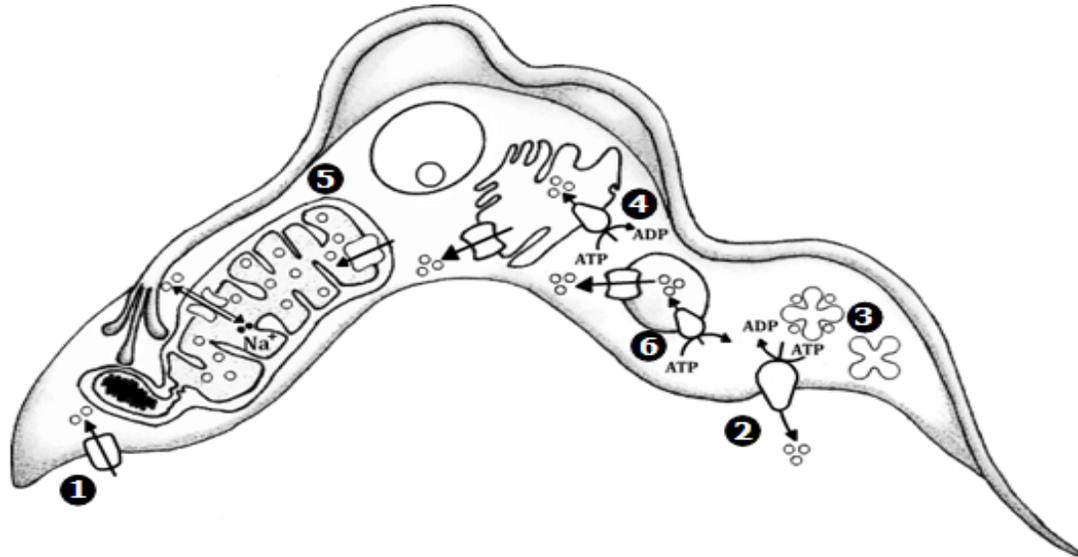


Figura 1. Mecanismos reguladores de Ca^{2+} en Tripanosomatidos. 1. Canal de Ca^{2+} no identificado (membrana plasmática), 2. PMCA (membrana plasmática), 3. Calmodulina, 4. SERCA (Retículo sarcoplasmático), 5. Uniporte de Ca^{2+} mitocondrial (mitocondria), 6. PMCA (acidocalcisomas) (Tomado de: Benaim y García, 2011).

1.3. El género *Leishmania*

El género *Leishmania* se ha caracterizado por desarrollarse en los macrófagos de una serie de hospedadores vertebrados, generando una enfermedad conocida como Leishmaniasis. Existen al menos veinte especies patógenas de *Leishmania* que son transmitidas de un hospedador a otro por la picadura de los flebótomos vectores, por lo que el desencadenamiento de la enfermedad está conformado por el vertebrado parasitado, el insecto vector, y el sujeto susceptible (Zuckermam y col., 1997).

El insecto vector pertenece a la Clase Insecta y al Orden Diptera y son conocidos como jejenes o moscas de arena. Los insectos del género *Phlebotomus* son los responsables primarios de la transmisión de la leishmaniasis en el Viejo Mundo, mientras que los del género *Lutzomyia* se encuentran en el Nuevo Mundo (Cardenas y col., 2006).



Figura 2. Insecto vector de la leishmaniasis *Phlebotomus pappatas*.

Tomado de: <http://es.wikipedia.org/wiki/Phlebotomus> (Consulta: 15 de Septiembre de 2012).



Figura 3. Insecto vector de la leishmaniasis *Lutzomyia longipalpis*.

Tomado de: <http://es.wikipedia.org/wiki/Lutzomyia> (Consulta: 15 de Septiembre de 2012).

La clasificación taxonómica de *Leishmania* es:

- Reino: Protista
- Subreino: Protozoo
- Phylum: Sarcomastigophora
- Subphylum: Mastigophora
- Clase: Zoomastigophora
- Orden: Kinetoplastida
- Familia: Trypanosomatidae

Tomado de: <http://www.slideshare.net/PabloToro/leishmaniasis-2> (Consulta: 21 de Abril de 2012)

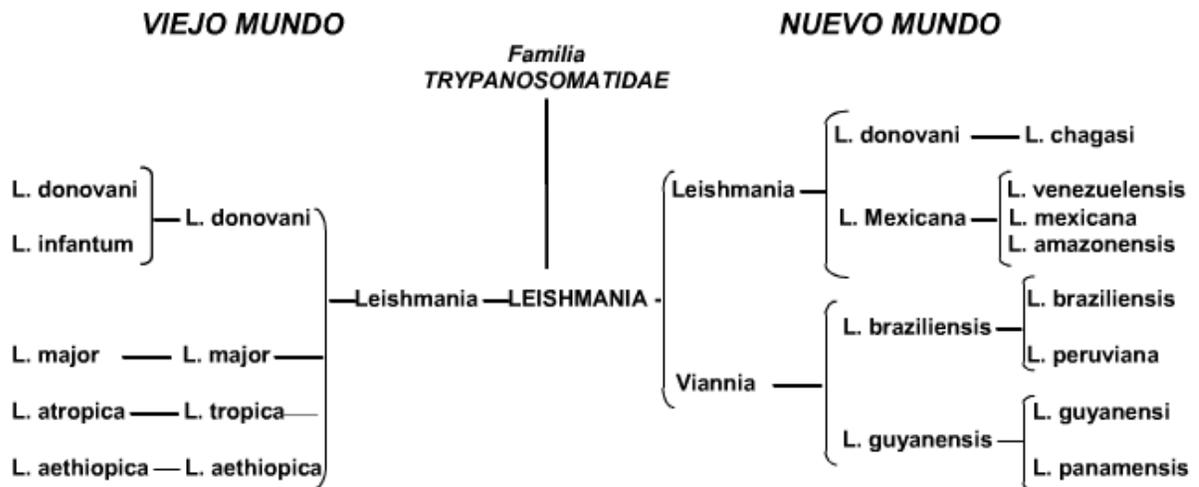


Figura 4. Clasificación taxonómica del género *Leishmania* del Viejo y del Nuevo mundo.

Tomado de: <http://www.slideshare.net/PabloToro/leishmaniasis-2> (Consulta: 21 de Abril de 2012).

1.3.1. **Morfología y ciclo de vida de *Leishmania*.**

El género *Leishmania* tiene dos formas o estadios de desarrollo, el amastigote y el promastigote. El amastigote es ovalado o esférico, posee membrana y un gran núcleo localizado en un extremo, aunque en ocasiones también se encuentra en la parte central. También incluye al kinetoplasto. El amastigote es inmóvil y mide aproximadamente de 2,5 a 3,5 micras. El promastigote es alargado y mide entre 18 y 20 micras, presenta un flagelo, tiene núcleo central y citoplasma granulado. La superficie celular está cubierta de lipofosfoglicanos. Presentan un kinetoplasto cercano al bolsillo flagelar. Se alojan en el tubo digestivo del insecto vector y es el estadio que puede mantenerse en los cultivos *in vitro* (Romero, 2007).

El ciclo de vida de éste género transcurre en un hospedador vertebrado y uno invertebrado. En el hospedador invertebrado el parásito adopta una forma de vida intracelular, que se desarrolla en el tubo digestivo del hospedador, y se encuentra en forma flagelar (promastigote); por el contrario, en el hospedador vertebrado y luego de ser fagocitados por los macrófagos, los promastigotes sufren un proceso de transformación hasta alcanzar una forma sin flagelo denominada amastigote (Alvar, 1997).

La infección del insecto ocurre cuando éste ingiere sangre de un vertebrado infectado con macrófagos parasitados por las formas amastigote, los cuales son liberados en el tracto digestivo de éste, transformándose rápidamente en promastigotes; estos se multiplican y migran hacia su probóscide donde estarán disponibles para ser inoculados al nuevo hospedador mamífero en la siguiente ingesta de sangre (Molyneux, 1987).

El insecto infectado puede inocular entre 10 y 200 promastigotes dentro de la dermis del mamífero, en cuyo interior activan el sistema del complemento que tiene como resultado la unión de la molécula CR3 (receptor de complemento tipo 3 en la superficie del macrófago), con la membrana del parásito (Castes y Tapia, 1998). Esto causa que el promastigote sea fagocitado por el macrófago. Una vez dentro de éste, los parásitos se

transforman en la forma intracelular o amastigote, estos se multiplican y eventualmente lisan los macrófagos y reinfectan otras células. El ciclo se cierra cuando otro vector ingiere macrófagos del mamífero infectado (Descoteaux y col, 1999) (Ver fig.5)

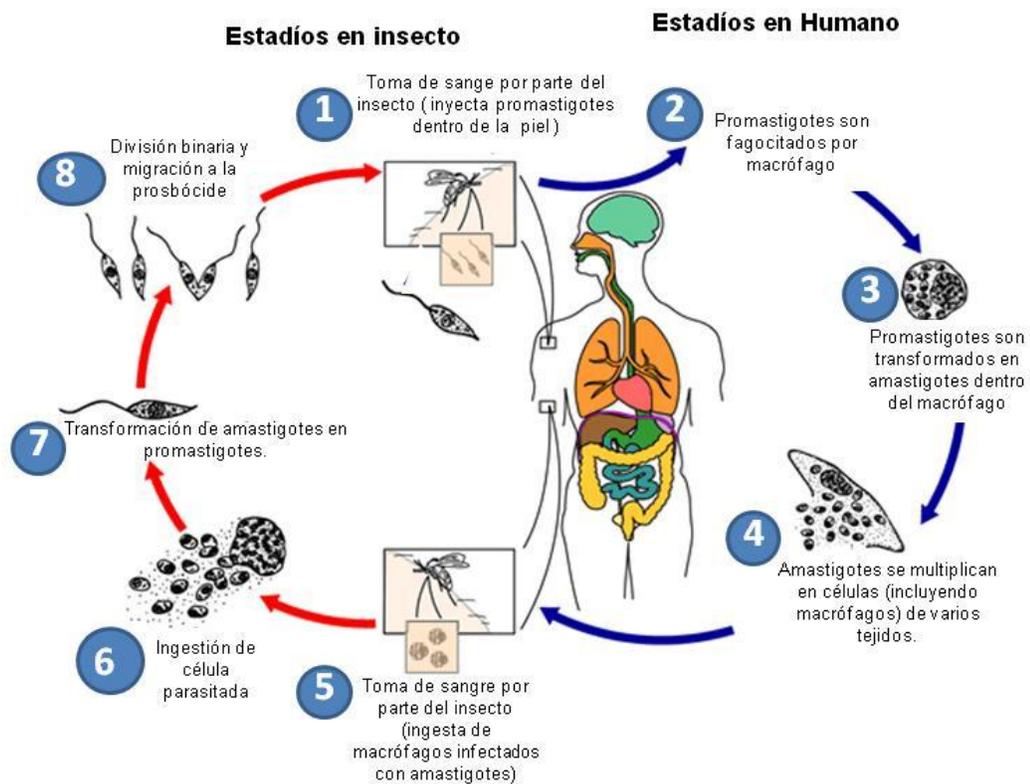


Figura 5. Ciclo de vida del parásito *Leishmania.sp* Tomado de: <http://www.kinetoplastids.com> (Consulta: 21 de Abril de 2012).

1.4 Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad de transmisión vectorial con amplio espectro clínico e importante diversidad epidemiológica. Es reconocida por la OMS como una de las enfermedades infecciosas tropicales más importantes que afecta al hombre.

Se encuentra difundida en más de 88 países, con 350 millones de personas en riesgo de infección, 12 millones de personas infectadas, registrándose cada año dos millones de casos nuevos, así como 57000 muertes reportadas al año (Desjeux, 2004).

Existen distintos tipos de leishmaniasis, entre ellas podemos encontrar la leishmaniasis cutánea que se caracteriza por la manifestación de úlceras cutáneas de evolución benigna, transmitida por especies como: *Leishmania major*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania panamensis*.



Figura 6. Lesión de leishmaniasis cutánea formando una úlcera que ha hecho metástasis. Suelen ser indoloras a menos que se presente otra infección y su complicación y falta de tratamiento puede evolucionar en leishmaniasis mucocutánea. Tomado de: <http://www.wynman.com/baylor.html> (Consulta: 15 de Septiembre de 2012).

La generación de úlceras a nivel mucocutáneo son típicas de la leishmaniasis mucocutánea y puede ser transmitidas por especies como: *Leishmania braziliensis* y *Leishmania panamensis*.



Figura 7: Individuo con lesiones crónicas en la zona otorrinolaringológica. Ocasiona dificultad para respirar y eflujos purulentos nasales en el individuo.

Tomado de: <http://www.wynman.com/baylor.html> (Consulta: 15 de Septiembre de 2012).

La forma visceral de esta enfermedad se caracteriza por la inflamación del hígado y del bazo, pudiendo ser fatal para el individuo si no es tratada a tiempo. Este tipo de leishmaniasis es transmitida por especies como: *Leishmania infantum*, *Leishmania donovani*.

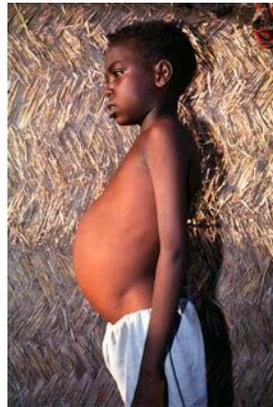


Figura 8. El individuo presenta distensión abdominal ocasionada por la inflamación del hígado y del bazo. Tomado de: <http://leishmaniasisusmp.blogspot.com/2010/05/tipos-de-leishmaniasis.html> (Consulta: 15 de Septiembre de 2012).

Un estimado de casos revela que cerca del 90% de los registros de leishmaniasis visceral están concentrados en Brasil, Etiopia, India, Nepal y Sudan. Para la leishmaniasis cutánea, Brasil, Colombia, Perú, Bolivia y Nicaragua están entre los 12 países del mundo que concentran el 90% de los casos. Este hecho está directamente relacionado con razones como: desarrollo de nuevos proyectos urbanísticos en zonas rurales donde ocurre el ciclo biológico natural del parásito y niveles agudos de malnutrición en algunas zonas endémicas de países pobres (Desjeux, 2004).

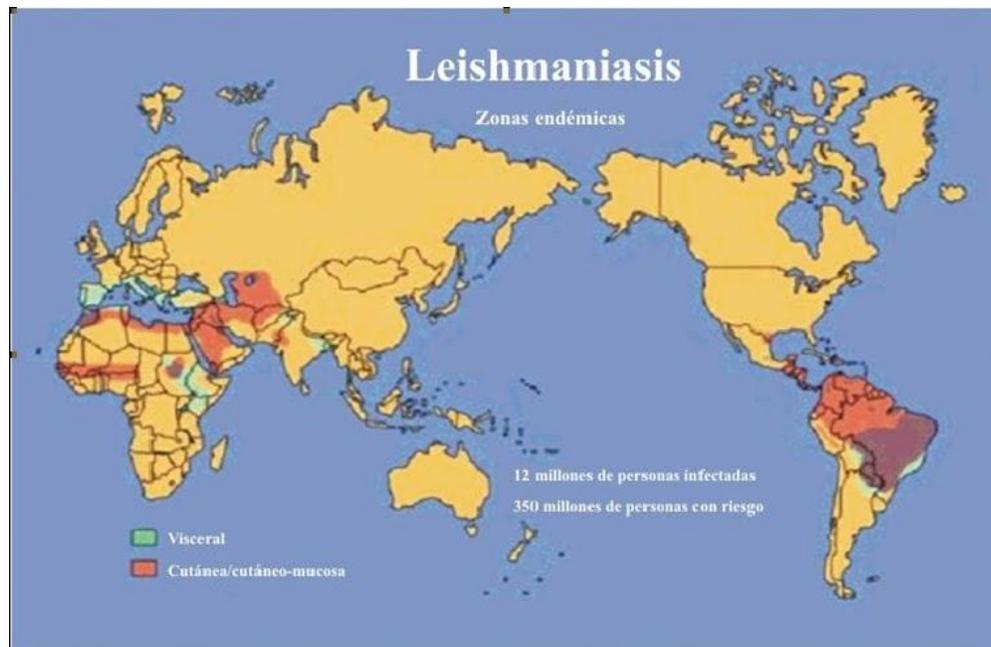


Figura 9. Distribución geográfica de leishmaniasis visceral y cutánea. Tomado de: <http://2.bp.blogspot.com/XIXZ8uF3eKA/TNvU-Kqd-PI/AAAAAAAAAw/f1vjmQNpiqU/s1600/mapa+leishmaniasis+mundial.bmp> (Consulta: 21 de Abril 2012).

1.4.1. Leishmaniasis en Venezuela.

Desde 1955 al 2002 el Ministerio de Salud registró cerca de 50.000 casos de leishmaniasis cutánea y más de 2.000 casos de leishmaniasis visceral en el país.

Las estadísticas más actuales de casos de muertes ocasionados por leishmaniasis en nuestro país son del año 2005 y para ese año la tasa de casos de leishmaniasis se ubica en un 9,97 por cada 100.000 habitantes.



Figura 10. Tasa de incidencia de leishmaniasis promedio en Venezuela en el año 2005.
Tomado de: De Lima y col., (2009)

La tendencia de casos de leishmaniasis cutánea en el país en el año 2005 están distribuidos de la siguiente forma: 98% de los casos de leishmaniasis cutánea localizada, 1% de leishmaniasis mucocutánea, 0,8% leishmaniasis intermedia y 0,2% leishmaniasis difusa. Respecto a la manifestación visceral de la enfermedad 421 casos fueron reportados entre 1996 y 2005, lo cual representa un porcentaje de incidencia de 0,0017% de habitantes (De Lima y col., 2009).

2. ANTECEDENTES

2.1. Quimioterapia contra la leishmaniasis

Es importante destacar que el estadio clínicamente relevante para los tratamientos quimioterapéuticos en *Leishmania* es el amastigote, la forma intracelular del parásito. Este sobrevive y se divide dentro de los macrófagos en un pH ácido de 4.5 -5. El ambiente ácido del macrófago influye en la homeostasis y la estrategia de obtención de nutrientes del amastigote. Además, es uno de los primeros aspectos que impide la generación de vacunas efectivas contra la leishmaniasis. La variedad de transportadores involucrados en este proceso pueden mediar la entrada y salida de las drogas, por lo que deberían jugar un papel importante en la susceptibilidad de los parásitos en el proceso quimioterapéutico (Serrano-Martin, 2010; Zilberstein y Shapiro, 1994).

Se han seleccionado una serie de drogas que constituyen los tratamientos de primera línea para la leishmaniasis, el grupo de antimoniales pentavalentes, entre los cuales están: el antimoniato de meglumina (Glucantamine) y el estibogluconato de sodio (Pentostan). Sin embargo, el mecanismo específico acción de estas drogas no ha sido caracterizado totalmente y está ampliamente demostrado que generan graves efectos secundarios a nivel renal, cardíaco y hepática (Pandey, 2005). Por otro lado, algunos pacientes no responden al tratamiento, y las distintas especies de *Leishmania* han demostrado un incremento en el desarrollo de resistencia a estos antimoniales, limitando el tratamiento (Croft y Combs, 2002; Davis y Kedzierski, 2005).

En otros casos se han utilizado drogas de tratamientos alternativos o de segunda línea, como el antibiótico poliénico anfotericina B. La anfotericina B tiene una gran actividad leishmanicida a través de la unión con los precursores de ergosterol de la membrana, seguido por la ruptura de la membrana y por lo tanto muerte del parásito. Experimentalmente es una droga mucho más potente que los antimoniales y mata a

ambas formas del parásito, extracelular e intracelular. Sin embargo, el uso de esta droga es limitado por su alta toxicidad que causa principalmente fiebre, escalofríos, flebitis, hipocalcemia, hipomagnesemia y en pocos casos nefrotoxicidad (Alvar y col., 1997).

Se han desarrollado nuevas formas de anfotericina B, asociadas a lípidos (composiciones liposomales), como el Ambison, las cuales presentan una menor toxicidad y un mayor tiempo de vida media en el plasma que la droga original, pero presentan altos costos que los hacen poco accesibles para individuos de la población (Paul, 1997; Sundar y col. 2001).

La miltefosina es un alquil-lisofosfolípido con una potente actividad leishmanicida. Sin embargo, la miltefosina presenta una serie de efectos adversos, tales como que induce teratogenicidad y potencial desarrollo de resistencia (Croft y Engel, 2006). Recientemente Urbina (2006), reporta que el mecanismo de acción de la miltefosina en mamíferos y algunos trimanosomatídios está relacionado con la desestabilización de la biosíntesis de algunos derivados de fosfatidilcolina, traducándose en un impacto importante sobre la viabilidad de las células tratadas.

Serrano y colaboradores (2009) demostraron que la miltefosina puede generar un aumento rápido de la concentración de Ca^{2+} (probablemente por la presencia de un canal de Ca^{2+} , no caracterizado aun en la membrana plasmática) y en combinación con la amiodarona tiene un efecto sinérgico sobre los amastigotes de éste parásito.

En este trabajo también se reportó el efecto de las drogas amiodarona y miltefosina sobre lesiones de ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*, obteniéndose un 90% de control de las lesiones, es decir, las lesiones provocadas por los parásitos fueron curadas y no hubo recaída y aparición de nuevas lesiones. Estos resultados fueron confirmados mediante la utilización de técnicas moleculares como PCR.

2.1.1 Enfoques racionales: Nuevas drogas leishmanicidas y nuevos blancos de acción.

En la actualidad se han determinados drogas alternativas leishmanicidas y nuevos blancos de acción. Entre estos, tenemos:

- Biosíntesis de microtúbulos: Estudios recientes demuestran que el Trifluralín es un conocido desensamblador de las estructuras microtubulares (de gran importancia por estar relacionadas directamente con los procesos de motilidad, mitosis y movimiento organelar), inhibe la proliferación de algunas especies de *Leishmania* y tiene una moderada actividad contra amastigotes, reduciendo el desarrollo de lesiones en ratones Balb/C infectados (Chan y col., 1994).
- Inhibición de las cisteín-proteasas: La importancia de las cisteín-proteasas, tanto en la multiplicación como en la virulencia de algunas especies de *Leishmania*, han sido motivo de muchas investigaciones, realizándose la validación, caracterización y modelaje de una cisteín-proteasa tipo L de *L. major* (Coombs y Mottram, 1997), permitiendo así, el estudio *in silico* de más de 15.000 compuestos contra esta cisteín-proteasa, encontrándose 69 compuestos con una apreciable actividad contra este parásito y con valores de IC₅₀ en el rango micromolar (Selzer y col., 1997).
- Inhibición de la tripanotión reductasa: El tripanotión en parásitos es un análogo de glutatión en humanos, que tiene la función de mantener el ambiente reductor intracelular. El tripanotión es mantenido en su estado reducido por la tripanotión reductasa, la cual es análoga a la glutatión reductasa, pero con diferencias sustrato-especificas en su sitio de anclaje y en su carga neta. Algunos estudios de rayos X permitieron determinar qué compuestos tricíclicos podrían significar una opción para la inhibición de esta enzima (Davis y Kedzierski, 2005). Se han identificado varias familias de compuestos que son potentes inhibidores de la enzima pura y del crecimiento del *T. cruzi in vitro* (Urbina, 2006).

- Inhibición de la síntesis de ergosterol: Estudios llevados a cabo han demostrado consistentemente que el *T. cruzi* y *L. braziliensis*, como la mayoría de los hongos y levaduras patógenas, requiere de esteroides específicos para mantener su viabilidad y capacidad de proliferación a lo largo de todo su ciclo de vida. En células de mamíferos, el esteroide de la membrana predominante es el colesterol mientras que en *Leishmania spp.*, es el 5-dehidroepisterol, lo cual indica que las enzimas involucradas en la biosíntesis de esteroides de membrana son distintas en humanos y parásitos, validando así estas enzimas como potenciales blancos de acción leishmanicida (Urbina 1997; Urbina y Docampo, 2003).

Se han realizado estudios sobre la susceptibilidad, tanto de promastigotes como de amastigotes de *Leishmania sp.*, a diversos azoles como posaconazol, ketoconazol e itraconazol. Se ha demostrado que estos compuestos inhiben la enzima 14 α -demetilasa, esencial en la ruta de la síntesis de 5-dehidroepisterol en estos parásitos, sin afectar al hospedador mamífero. El posaconazol es activo contra *Leishmania amazonensis* y *Leishmania donovani* en modelos murinos de leishmaniasis cutánea y visceral, respectivamente, siendo superior a la anfotericina B en el primer modelo pero inferior en el segundo y presentando mayor actividad oral que el ketoconazol (Urbina 2006; Al – Abdely, 1996).

- Inhibición de la síntesis del pirofosfato (PPi): Polifosfatos de cadena corta (principalmente el PPi y trifosfato inorgánico), están involucrados en la respuesta de parásitos del orden Kinetoplastida (incluyendo a los *Trypanosomatidae*) al estrés osmótico, así como en el mantenimiento energético (Docampo y Moreno, 2001). Los bisfosfonatos son análogos metabólicos inertes del PPi, que se acumulan selectivamente en *T. cruzi* y otros tripanosomatídios (probablemente por su afinidad por los acidocalcisomas) y pueden inhibir enzimas esenciales del parásito involucradas en el metabolismo del PPi o bombas de protones dependientes de PPi (Urbina, 2006).

Algunos compuestos de la familia de los bisfosfonatos son ampliamente utilizados en el tratamiento de la osteoporosis como el risedronato y el pamidronato. Rodríguez y colaboradores (2002) utilizaron pamidronato en el tratamiento de leishmaniasis cutánea generada por *L. amazonensis* en ratones BALb/C obteniéndose una cura radical de las lesiones cutáneas en los ratones.

2.2 Amiodarona

El género *Leishmania*, como se mencionó antes, tiene dos estadios distintos: La forma extracelular o promastigote y la forma intracelular o amastigote. Este hecho implica que éstos parásitos deben poseer un mecanismo muy eficiente para la regulación del Ca^{2+} en ambos estadios así como también durante su proceso de diferenciación (Benaim y García, 2011).

La amiodarona (2 – butil – 3 - benzofuranil)[4 - [2 - (dietilamino) ethoxi] - 3,5 – diiodofenil] metanona hidroclicorida) es una droga con propiedades antiarrítmicas clase III, para el tratamiento de algunas cardiomiopatías humanas. Es un potente vasodilatador cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición de canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} y bloqueo de receptores α y β adrenérgicos. Sin embargo, el yodo en su estructura está asociadas con una serie de efectos adversos, por lo cual su aplicabilidad se ha visto reducida (Schafer y col., 2010). Recientemente se le ha atribuido un potente efecto fungicida en especies como *Candida neoformans*, *Saccharomyces* y *Cryptococcus* (Courchesne y col., 2002).

Según Benaim y colaboradores (2006) la amiodarona, no actúa en *T. cruzi* por la misma vía reportada en hongos, a través de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática, sino a través de la interacción con organelos intracelulares, demostrándose que la amiodarona produce la disrupción de la homeostasis de Ca^{2+} , alterando el potencial electroquímico mitocondrial . Este resultado fue obtenido también en *L. mexicana* y

adicionalmente se demostró que esta droga produce la alcalinización de los acidocalcisomas en éstos parásitos. La amiodarona también inhibe la oxidoescualeno ciclasa, enzima clave en la síntesis de ergosterol (Benaim y col., 2006).

La amiodarona en *T. cruzi* tiene un efecto en la proliferación de epimastigotes extracelulares, obteniéndose una clara respuesta dosis-dependiente en el crecimiento de éstos parásitos (Fig. 11).

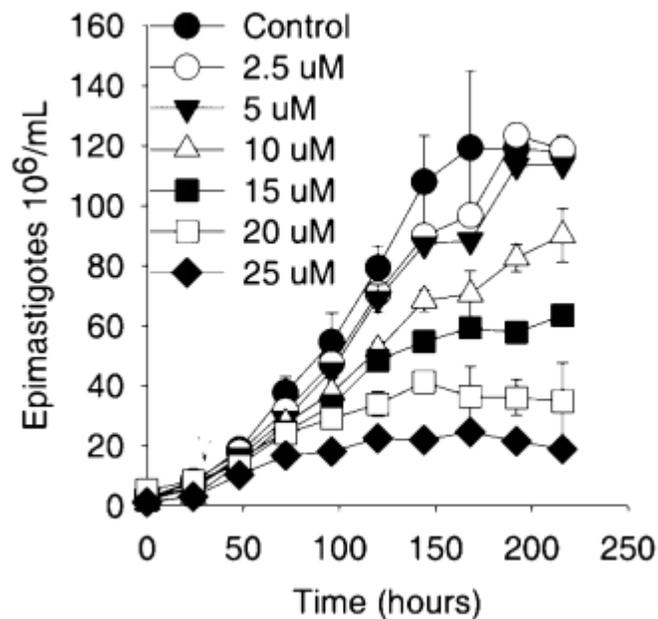


Figura 11. Efecto de concentraciones crecientes de la amiodarona sobre poblaciones de epimastigotes de *T. cruzi* (Tomado de Benaim y col., 2006).

Sobre los amastigotes intracelulares de *T. cruzi* también se observó un efecto inhibitorio incluso más potente que en los epimastigotes, disminuyendo la proporción de células Vero infectadas con el parásito y sin afectar la viabilidad de las células Vero (Fig. 12).

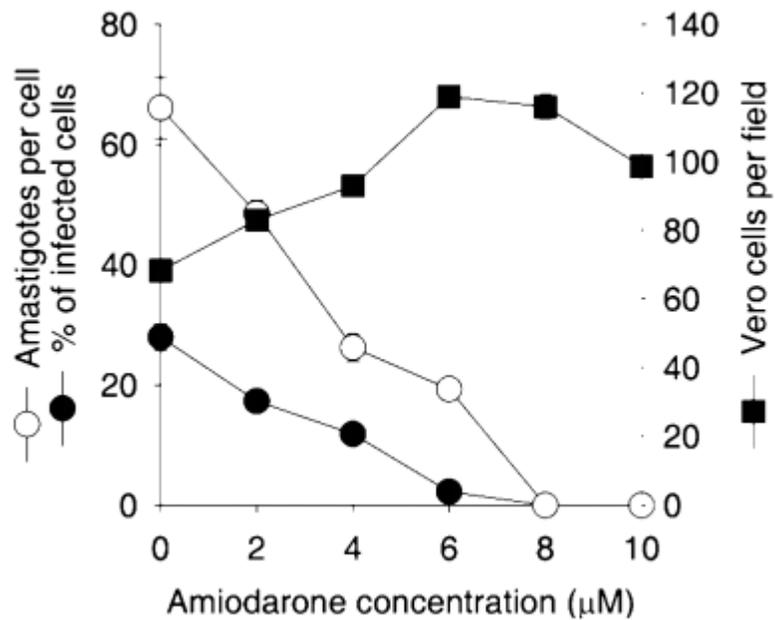


Figura 12. Efecto de concentraciones crecientes de amiodarona sobre poblaciones de amastigotes intracelulares de *T. cruzi* cultivados en células Vero (Tomado de Benaim y col., 2006).

El efecto de la amiodarona en la homeostasis de Ca^{2+} de *T. cruzi* se demostró mediante técnicas fluorimétricas con la utilización del fluoróforo FURA 2, evidenciándose el incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) en los parásitos (Fig. 13).

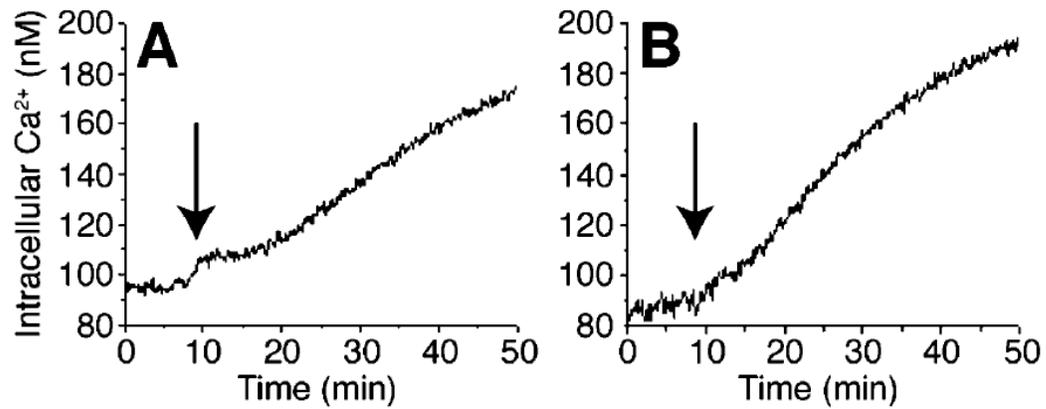


Figura 13. Efecto de la amiodarona sobre la $[Ca^{2+}]_i$ de *T. cruzi* (A) en presencia de Ca^{2+} externo y (B) en ausencia de Ca^{2+} externo (Tomado de Benaim y col., 2006).

El efecto de la amiodarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial se logró estudiar mediante microscopia confocal, donde células Vero infectadas con *T. cruzi* fueron marcadas con Rhod 2 y rodamina123, evidenciando que el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ provenía de la mitocondria (Fig.14)

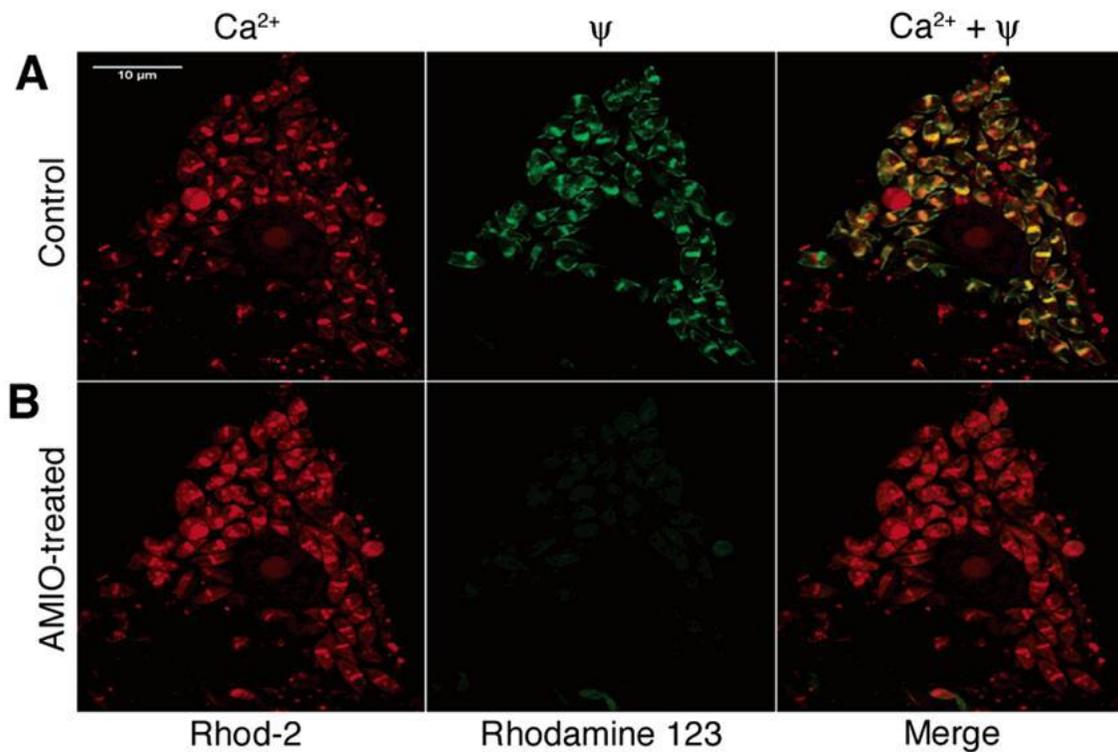


Figura 14. Efecto de la amiodarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial en células Vero infectadas con amastigotes de *T. cruzi* (Tomado de Benaim y col., 2006).

El efecto de la amiodarona en la homeostasis de Ca^{2+} ha sido demostrado también en *Leishmania mexicana* (Serrano y col., 2009). De igual manera que en *T. cruzi*, la amiodarona tiene efecto en la proliferación de promastigotes de *L. mexicana* produciendo una inhibición dosis dependiente del crecimiento (Fig. 15).

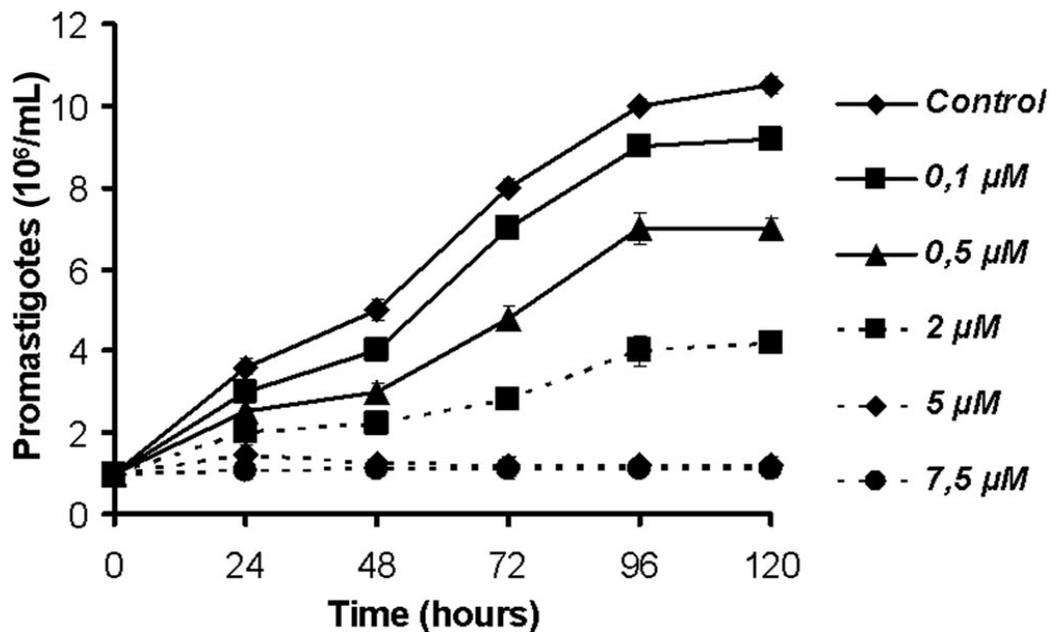


Figura 15. Efecto de concentraciones crecientes de amiodarona sobre poblaciones de promastigotes de *L. mexicana* (Tomado de Serrano y col., 2009).

Sobre los amastigotes, que es la fase clínicamente relevante, también se observó un efecto de la droga, disminuyendo la proporción de macrófagos infectados por *L. mexicana* y sin afectar la viabilidad de los macrófagos y obteniéndose un IC_{50} de 8 nM (Fig. 16)

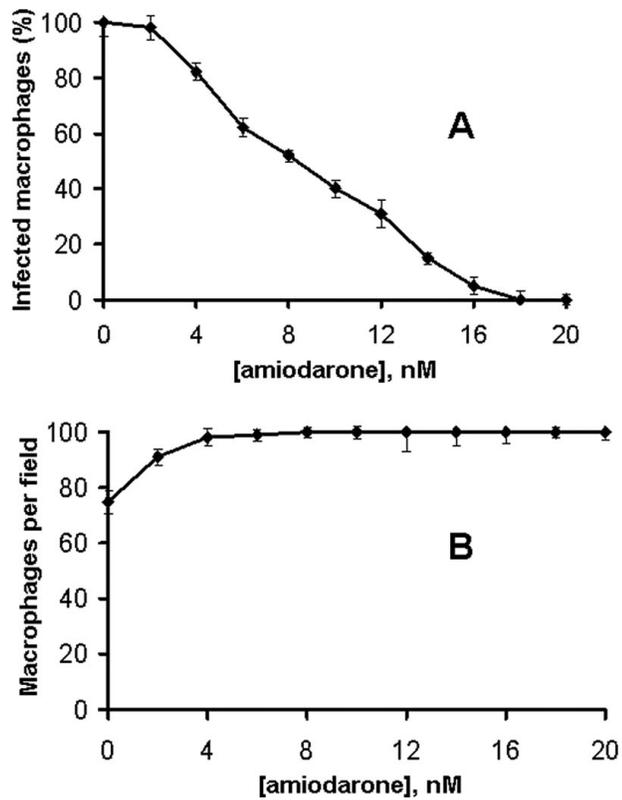


Figura 16. Efecto de concentraciones crecientes de amiodarona, (A) sobre poblaciones de amastigotes de *L. mexicana*. y (B) sobre la viabilidad de los macrófagos (Tomado de Serrano y col., 2009).

Al igual que en *T. cruzi*, la amiodarona es capaz de aumentar la $[Ca^{2+}]_i$ en *L. mexicana* al interactuar con organelos intracelulares (Fig.17).

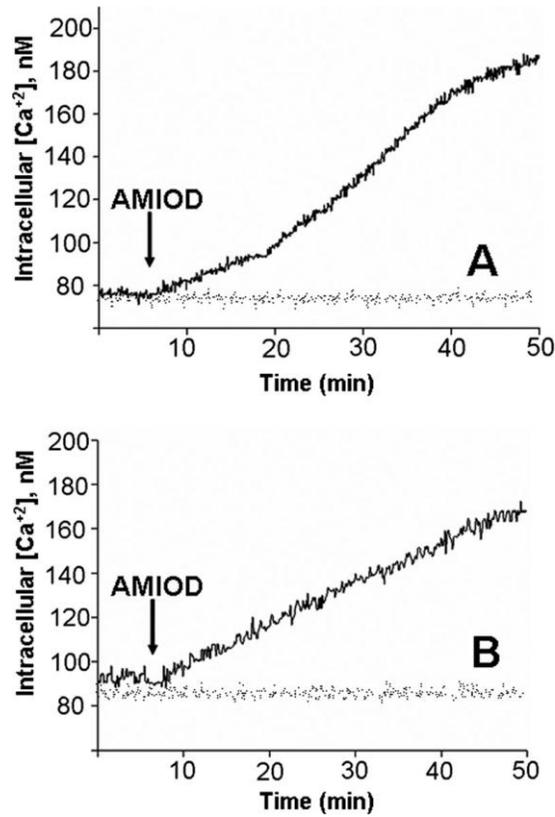


Figura 17. Efecto de la amiodarona sobre la $[Ca^{2+}]_i$ de promastigotes de *L. mexicana* en (A) presencia de Ca^{2+} extracelular y en (B) ausencia de Ca^{2+} extracelular (Tomado de Serrano y col., 2009).

El efecto de la amiodarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial se logró estudiar mediante la utilización de técnicas fluorimétricas, incubando los parásitos con rodamina 123. Los resultados evidencian el colapso electroquímico mitocondrial y una liberación de Ca^{2+} por parte de la mitocondria al citoplasma (Fig.18)

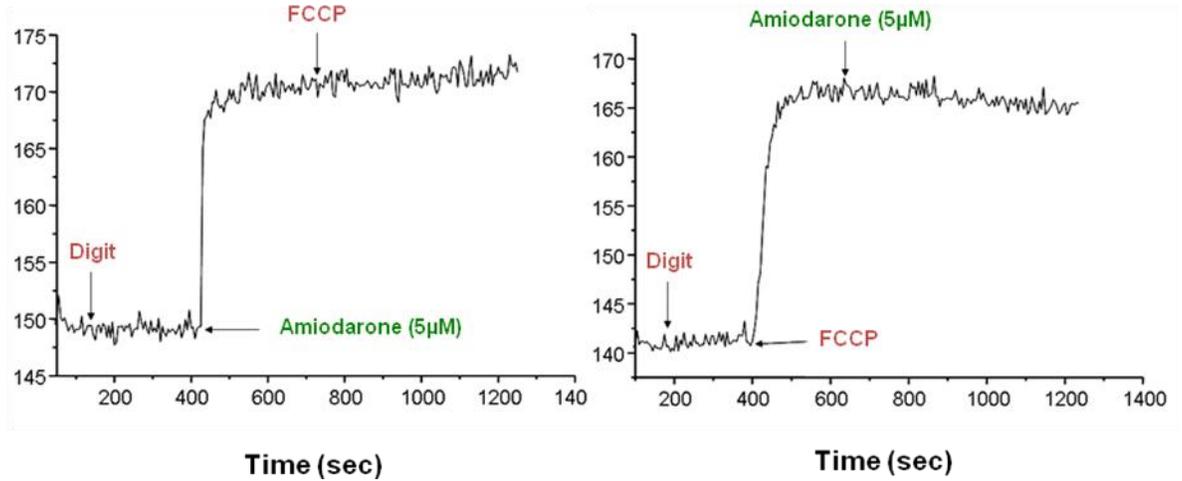


Figura 18. Efecto de la amiodarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial de *Leishmania mexicana*. (Tomado de Serrano y col., 2009).

La amiodarona también tiene un efecto sobre los acidocalcisomas de *Leishmania mexicana*, ocasionando la acidificación del mismo. Esto se logró estudiar al incubar los parásitos con el fluróforo naranja de acridina, observándose un aumento en la fluorescencia que se traduce en la alcalinización de los acidocalcisomas y la liberación de Ca^{2+} desde el interior del organelo al citoplasma (Fig. 19).

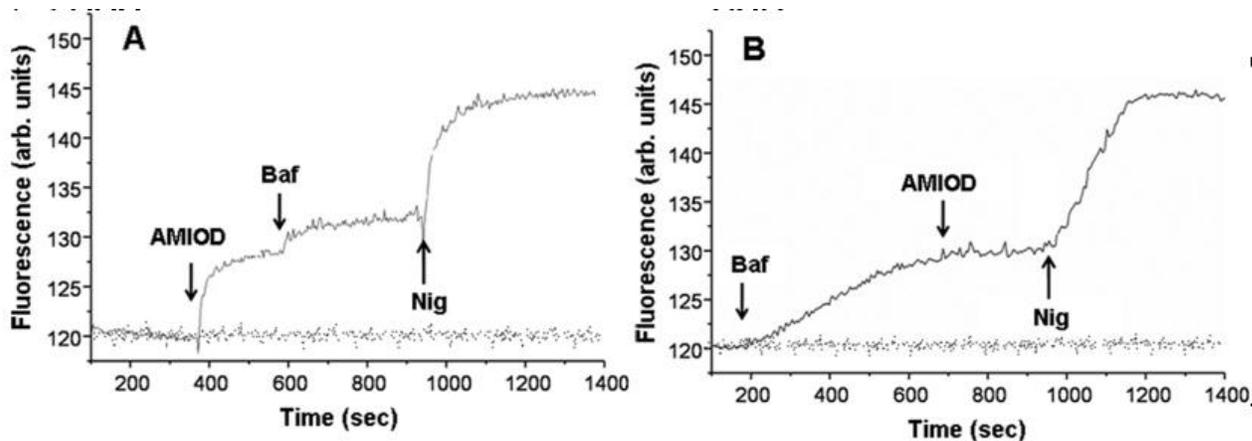


Figura 19. Efecto de la amiodarona sobre los acidocalcisomas de *Leishmania mexicana*. (Tomado de Serrano y col., 2009).

2.3 Dronedarona

La dronedarona es una droga aprobada por la FDA (Food and Drug Administration), que al igual que la amiodarona, es utilizada como agente antiarrítmico. Sin embargo, la dronedarona carece de los iones yodo que han sido asociados a los efectos secundarios de la amiodarona, a pesar de que puede ocasionar diarrea, fatiga y náuseas.

La dronedarona al igual que la amiodarona, actúa inhibiendo canales K^+ , Na^+ y Ca^{2+} y bloqueando receptores α y β adrenérgicos. Posee un grupo metilsulfonamida, que lo hace menos hidrofóbica y su tiempo de semivida es considerablemente más corto (20 - 25 horas frente a 20 – 100 días) que el de la amiodarona (Schafer y col., 2010).

Debido a que la amiodarona presenta una serie de efectos adversos tales como descontrol hormonal, disnea, descontrol pulmonar y afecciones pulmonares, se ha planteado usar la dronedarona como nuevo agente antichagásico.

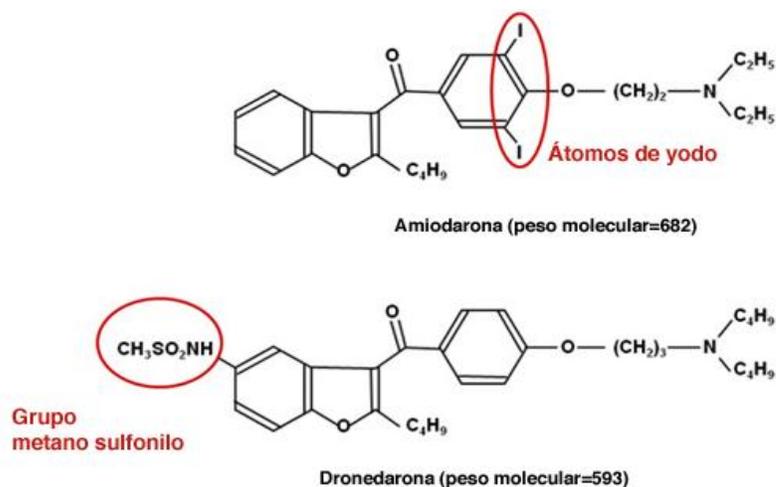


Figura 20. Estructura molecular de la dronedarona y la amiodarona.
<http://www.fibrilacionauricularonline.es/default.aspx?idPage=4134> (Consulta: 21 de abril 2012)

Benaim y colaboradores (2012) reportaron en efecto de esta nueva droga sobre la homeostasis de Ca^{2+} intracelular en *T. cruzi*, obteniendo resultados más efectivos que los obtenidos con la amiodarona.

La dronedarona produce un efecto dosis-dependiente en poblaciones de epimastigotes de *T. cruzi* con un IC_{50} de $4.6 \mu\text{M}$, menor al reportado con amiodarona de $7.9 \mu\text{M}$. Esto obviamente indica la mayor efectividad de la dronedarona, *in vitro*, como agente antiproliferativo de epimastigotes de *T. cruzi* (Fig. 21).

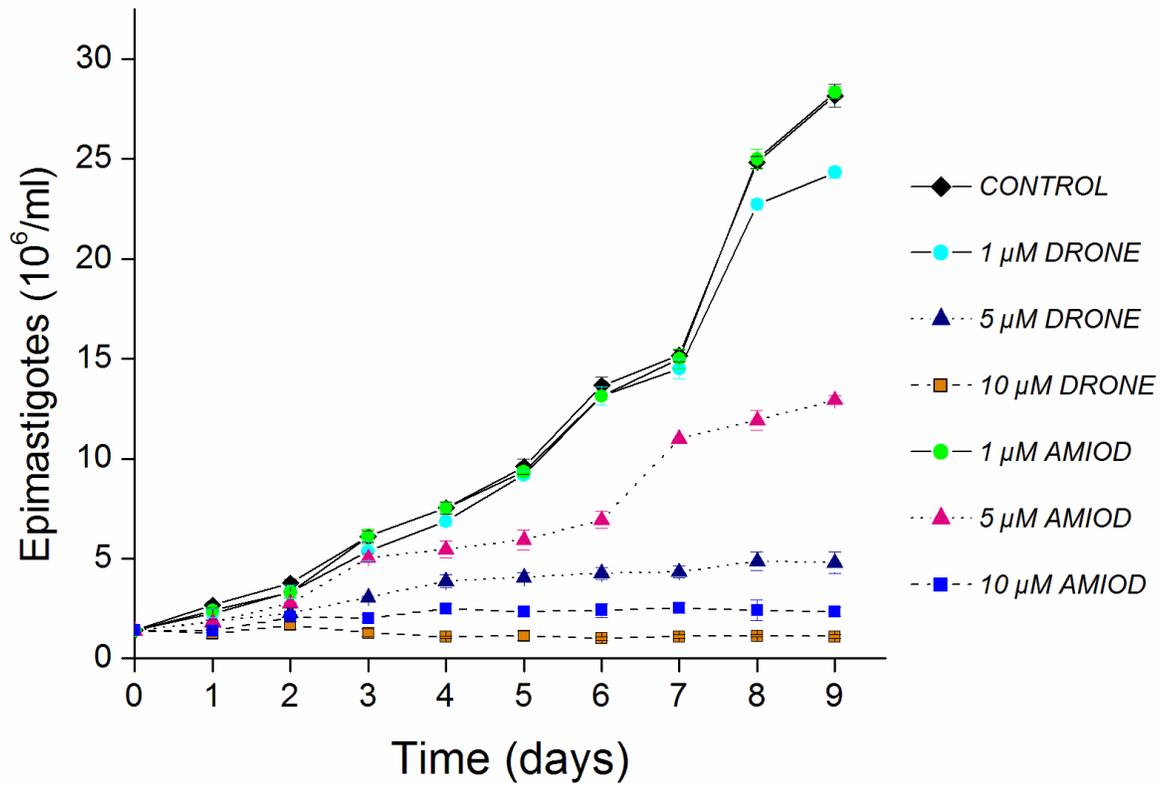


Figura 21. Efecto de concentraciones crecientes de dronedarona y amiodarona sobre poblaciones de epimastigotes de *T. cruzi* (Tomado de Benaim y col., 2012).

Sobre los amastigotes de *T. cruzi*, la dronedarona también tiene un mayor efecto al inhibir su proliferación con un IC_{50} de 0.75 μ M versus 2.7 μ M obtenido con la amiodarona y sin afectar la viabilidad de las células Vero (Fig. 22).

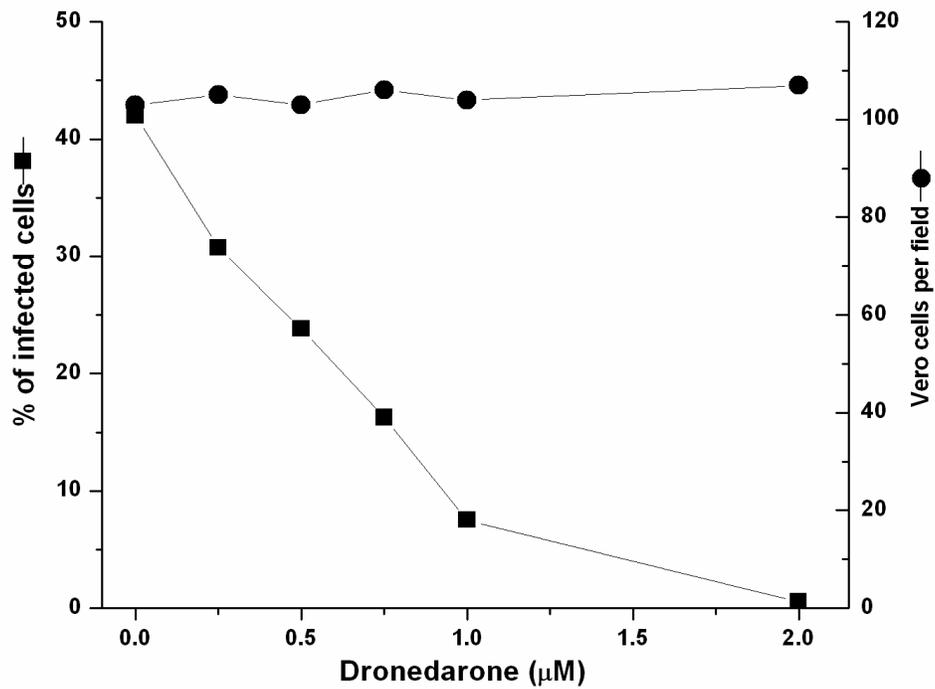


Figura 22. Efecto de concentraciones crecientes de dronedarona sobre poblaciones de epimastigotes de *T. cruzi* y sobre la viabilidad de células Vero (Tomado de Benaim y col., 2012).

Al igual que la amiodarona, la dronedarona actúa aumentando la $[Ca^{2+}]_i$ en *T. cruzi*, al interactuar con organelos intracelulares (Fig. 23).

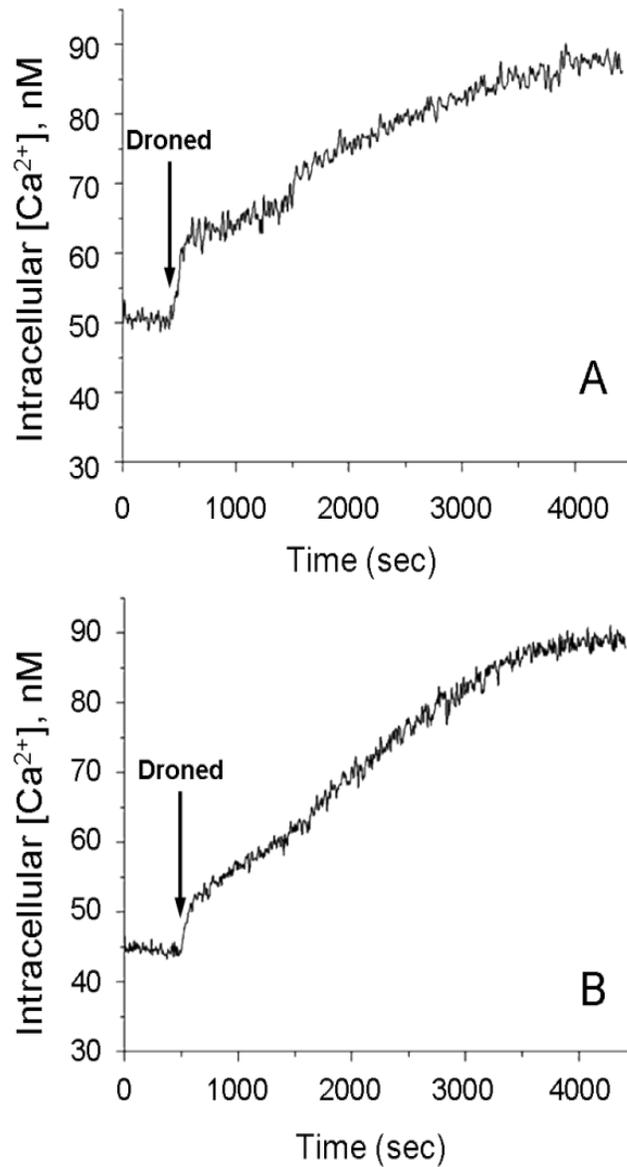


Figura 23. Efecto de la dronedarona sobre la $[Ca^{2+}]_i$ de *T. cruzi* en (A) presencia de Ca^{2+} extracelular y en (B) ausencia de Ca^{2+} extracelular (Tomado de Benaim y col., 2012).

Se reportó que la dronedarona actúa colapsando el potencial electroquímico mitocondrial de *T. cruzi* al igual que la amiodarona, pero es importante destacar que su efecto es más rápido (Fig. 24).

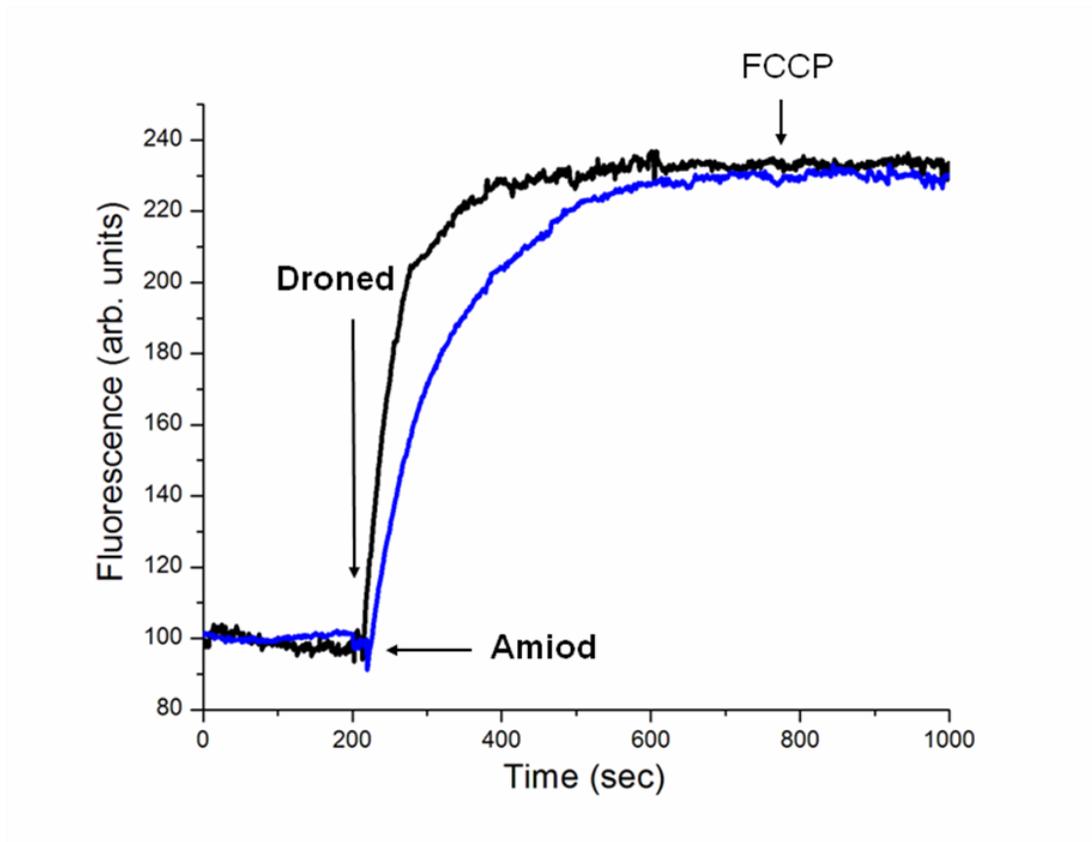


Figura 24. Efecto de la amiodarona y la dronedarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial de *T. cruzi* (Tomado de Benaim y col., 2012).

Se estudió el efecto de la dronedarona sobre los acidocalcisomas de *T. cruzi*. La dronedarona es capaz de alcalinizar los acidocalcisomas de los parásitos y nuevamente su efecto es más rápido que el de la amiodarona (Fig. 25).

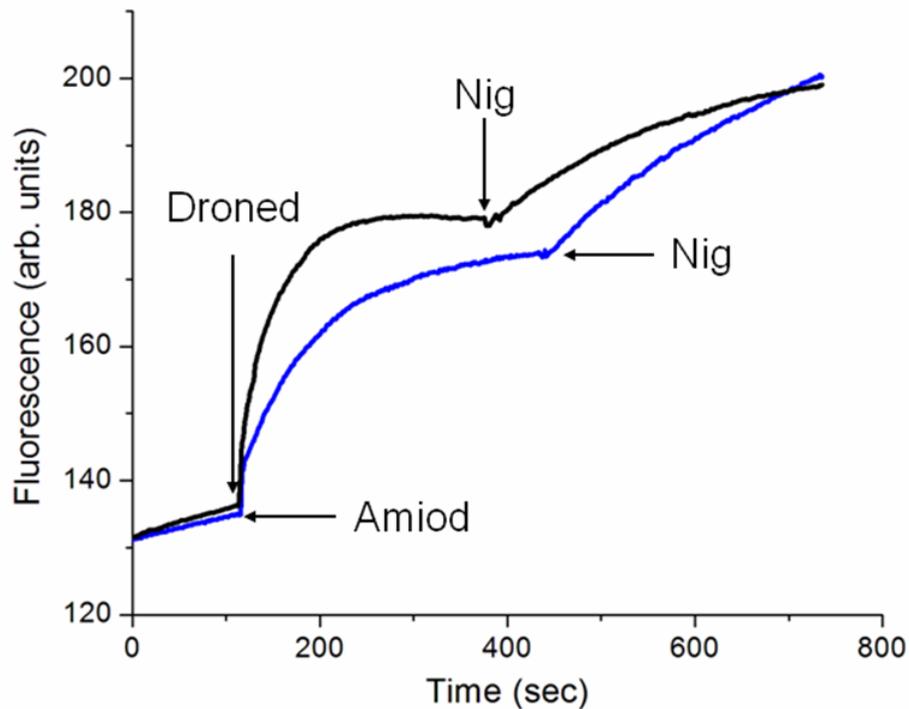


Figura 25. Efecto de la amiodarona y la dronedarona sobre los acidocalcisomas de *T. cruzi* (Tomado de Benaim y col., 2012).

Tomando en cuenta que la amiodarona tiene la capacidad de afectar la homeostasis de $[Ca^{2+}]_i$ en *T. cruzi* y en *L. mexicana* y sabiendo que la dronedarona tiene una mayor efectividad sobre epimastigotes y amastigotes de *T. cruzi*, es válido suponer que la dronedarona podría ser igualmente efectiva sobre parásitos del género *Leishmania*. Debido a esto nos hemos propuesto estudiar el efecto de ésta nueva droga sobre la homeostasis de $[Ca^{2+}]_i$ de amastigotes y promastigotes de *Leishmania mexicana*.

3. OBJETIVOS

Se plantea como objetivo general de este trabajo determinar el efecto de la dronedarona sobre la viabilidad de *L. mexicana* tanto en su forma promastigote como amastigote (en el interior de macrófagos) ya que ésta es la forma clínicamente relevante. Por lo anteriormente señalado en los antecedentes, se determinará el efecto de la dronedarona en la homeostasis de Ca^{2+} intracelular en *L. mexicana*, así como su efecto sobre el potencial electroquímico mitocondrial y su efecto sobre los acidocalcisomas de estos parásitos.

3.1. Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la dronedarona sobre poblaciones de promastigotes de *L. mexicana*.
- Determinar el efecto de la dronedarona sobre amastigotes intracelulares de *L. mexicana*.
- Determinar el IC_{50} de la dronedarona en cultivos de promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*.
- Determinar el efecto de la dronedarona sobre la homeostasis de Ca^{2+} intracelular en promastigotes de *L. mexicana*.
- Determinar el efecto de la dronedarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial en promastigotes de *L. mexicana*.
- Determinar el efecto de la dronedarona sobre los acidocalcisomas de promastigotes de *L. mexicana*.
- Comparar el efecto de la amiodarona y la dronedarona en promastigotes y sobre la homeostasis de Ca^{2+} intracelular de *L. mexicana*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Reactivos.

Las soluciones y medios de cultivo de los parásitos como el PBS y el medio Liver Infusion Tryptose (LIT) fueron preparadas con reactivos adquiridos por diferentes casas comerciales, entre ellas SIGMA (St. Louis, MO) y BIO – RAD. El Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) y el suero fetal bovino fueron adquiridos de GibcoBRL (MD, EEUU). El dimetil – sulfóxido (DMSO), el carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona (FCCP), la nigericina, la valinomicina, la penicilina y la kanamicina fueron obtenidos de SIGMA (St. Louis, MO). El Fura – 2AM, la rodamina 123, la naranja de acridina y el MitoTracker RedCMxRos (MitoTracker®) fueron adquiridos de Molecular Probes Inc. OR. La amiodarona fue obtenida de SIGMA (St. Louis, MO) y la dronedarona de pastillas comerciales Multaq®.

4.1.2 Equipos.

Los equipos utilizados fueron el fluorímetro Perkin – Elmer LS55, el flurímetro HITACHI F-7000 y el citómetro de flujo Navios de Beckman Coulter.

4.2 Cultivo de los promastigotes de *Leishmania mexicana* y evaluación de su susceptibilidad a las drogas amiodarona y dronedarona.

Los parásitos utilizados para todos los experimentos fueron *Leishmania mexicana*, cepa Bel 21.

Los promastigotes de *Leishmania mexicana* fueron cultivados a temperatura ambiente en medio Liver Infusion Tryptose (LIT) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado y 1% de penicilina (100 U/ml)/kanamicina (10.000 µg/ml), en frascos especiales de plástico. El conteo se realizó mediante conteo directo en una cámara de Neubauer. La dilución del cultivo de parásitos se llevó a cabo en placas de ELISA utilizando 10 µl de paraformaldehído al 2% y 10 µl del cultivo, luego se sembró los 20 µl de la mezcla en la cámara de Neubauer.

La susceptibilidad de promastigotes de *Leishmania mexicana* a amiodarona y dronedarona, se evaluó a través del crecimiento de los parásitos en ausencia y presencia de concentraciones crecientes de las drogas (0.1 µM, 0.5 µM, 1 µM, 5 µM y 10 µM para la dronedarona y 2.5 µM, 5 µM y 10 µM para la amiodarona) . Se tomó un inóculo inicial de 1×10^6 cel/mL y se sembró en frascos de vidrio para cultivo, previamente esterilizados, que contenían 10 ml del medio LIT suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado.

A las 24 horas, se procedió a agregar a cada frasco las diferentes concentraciones de amiodarona y dronedarona, disueltas en dimetil-sulfóxido (DMSO) y metanol respectivamente, incluyendo un control al cual no se le agregó ninguna droga, sino el vehículo (DMSO y metanol). Por cada concentración de droga se realizaron tres experimentos. La proliferación celular se determinó diariamente mediante el conteo directo en la cámara de Neubauer, hasta alcanzar la fase estacionaria del cultivo. Se procedió a calcular el título relativo de los parásitos expuestos a las concentraciones de droga para luego graficarlas y compararlas con el título control de los parásitos.

4.3 Cultivo de los amastigotes de *Leishmania mexicana* y evaluación de su susceptibilidad a la droga dronedarona.

Para la evaluación de la droga en los amastigotes intracelulares de *Leishmania mexicana* se utilizó la línea celular permanente de macrófagos J774G8. Los macrófagos fueron cultivados en Dulbecco's Modified Eagle Medium (medio DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado y se mantuvieron en a 37°C y 5 % CO₂.

La infección de los macrófagos J774G8 con amastigotes de *Leishmania mexicana* se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento:

- Se procedió a despegar los macrófagos de la superficie del contenedor de plástico en el que se encontraban mediante la utilización de removedores de células y buffer fostafo salino (PBS) estéril.
- En placas de 12 pozos se coloca un cuarto de vidrio cubreobjeto por cada pozo en condiciones de esterilidad, se agregaron 600 macrófagos por cada pozo en medio DMEM (contados previamente en la cámara de Neubauer). Seguidamente se incubaron las placas con macrófagos durante 12 horas a 37 °C y 5 % CO₂.
- Los promastigotes de *Leishmania mexicana* se lavaron dos veces con medio DMEM, para eliminar cualquier resto del medio LIT de cultivo.
- Se agregó por cada pozo el volumen de parásitos correspondientes para obtener una proporción de 10 parásitos/célula, en este caso 6000 parásitos. Seguidamente se incubaron las placas a 37 °C y 5 % CO₂.durante 12 horas.
- Se retiró el medio de cada pozo y se procedió a agregar medio DMEM fresco con las concentraciones de dronedarona previamente disuelta en metanol (5 nM 10 nM, 15 nM, 20 nM, 25 nM, 30 nM, 35 nM, y 40 nM). Seguidamente se incubaron las placas a 37 °C y 5 % CO₂.durante 96 horas.

- Una vez pasadas las 96 horas de incubación se retiró el medio de cada pozo y se lavó con PBS para eliminar cualquier residuo de macrófagos no fijados a la superficie o de promastigotes que no interactuaron con las células.
- Se fijaron las células a los vidrios cubreobjetos con metanol 100% y se dejaron secar por unos minutos. Las células fijadas se tiñeron con Giemsa y se utilizó ácido acético 1% para aclarar y ajustar el color.
- Una vez teñidas las células, se fijaron los vidrios cubreobjeto a una lámina portaobjeto con gelatina al 2% y se procedió a contar en un microscopio de luz.

Para este ensayo se realizaron controles que contenían sólo macrófagos, macrófagos con promastigotes de *Leishmania mexicana* y macrófagos con la más alta concentración de droga utilizada. Se realizaron tres experimentos independientes por cada concentración de las drogas.

Con el contaje obtenido a las 96 horas luego de agregada la droga, se procede a elaborar una curva que exprese el porcentaje de infección de los macrófagos.

4.4 Determinación del IC₅₀ de la dronedarona en cultivos de promastigotes y amastigotes de *Leishmania mexicana* mediante el método de Huber y Koella (1993).

Con la curva de crecimiento de promastigotes de *Leishmania mexicana* fue posible construir una curva dosis-respuesta en la fase exponencial del crecimiento (sexto día), tomando la densidad de promastigotes del control a este día como el 100% y la densidad de promastigotes a las distintas concentraciones de droga como porcentajes menores. Estos porcentajes fueron graficados en función de las concentraciones de droga utilizadas.

Con la construcción de esta curva fue posible determinar la concentración a la cual la droga inhibe el crecimiento del 50 % de la población de los promastigotes, para ello se

utilizó el método de interpolación lineal propuesto por Huber y Koella (1993), el cual indica tomar dos concentraciones (X_1 y X_2), tal que la densidad de parásitos Y_1 a la concentración de la droga X_1 , sea mayor que la mitad de la densidad encontrada en el control (Y_0) y que la densidad de parásitos encontrada en Y_2 para la concentración de droga X_2 , sea menor que la mitad de la densidad del control (Y_0). El IC_{50} fue obtenido por la interpolación lineal entre las dos concentraciones (X_1 y X_2) mediante la siguiente fórmula:

$$\log(EC_{50}) = \log(x_1) + \frac{y_1 - \frac{y_0}{2}}{y_1 - y_2} (\log(x_2) - \log(x_1))$$

Para la determinación del IC_{50} sobre el cultivo de amastigotes de *Leishmania mexicana* se utilizó el mismo método en la curva del porcentaje de infección en función de las concentraciones de dronedarona utilizadas.

4.5 Determinación del efecto de la dronedarona sobre la concentración de calcio intracelular Ca^{2+} en poblaciones de promastigotes de *Leishmania mexicana*.

Las mediciones de Ca^{2+} se realizaron mediante un fluorímetro, utilizando el fluoróforo Fura 2 – AM (previamente diluido en DMSO y almacenado en oscuridad a -20 °C). El Fura-2 es un indicador fluorescente de alta sensibilidad que es excitado a dos longitudes de onda, 340 nm y 380 nm, y que emite a una longitud de onda de 510 nm. Las características espectrales del Fura-2 son tales que a 340 nm la excitación se incrementa con concentraciones crecientes de Ca^{2+} mientras que a 380 nm ocurre lo contrario (Fig. 26).

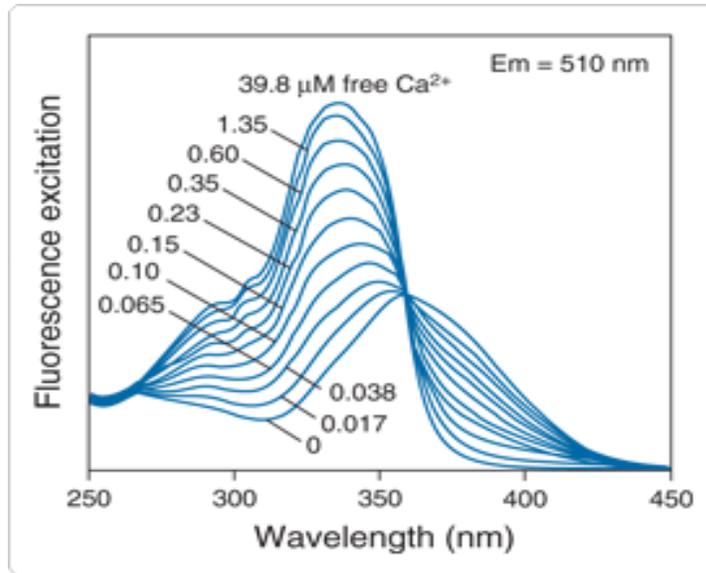


Figura 26. Espectro de excitación y emisión del Fura 2 en el rango de concentración de Ca^{2+} desde 0 hasta $39.8 \mu\text{M}$. Tomado de:

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Indicators-for-Ca2-Mg2-Zn2-and-Other-Metal-Ions/Fluorescent-Ca2-Indicators-Excited-with-UV-Light.html> (Consulta: 21 de abril 2012).

Con el objetivo de cargar los parásitos con Fura-2, se utilizó la forma de Fura-2 acetoximetilester (Fura-2 AM). Una forma esterificada, el cual es un compuesto lipofílico, permeable a la membrana celular. Una vez dentro de la célula, el Fura-2 AM, es hidrolizado por las esterasas endógenas, transformando el compuesto a su forma hidrofóbica, fluorescente y sensible al Ca^{2+} , que es incapaz de cruzar las membranas celulares y por lo tanto permanece en el citoplasma (Fig. 27)

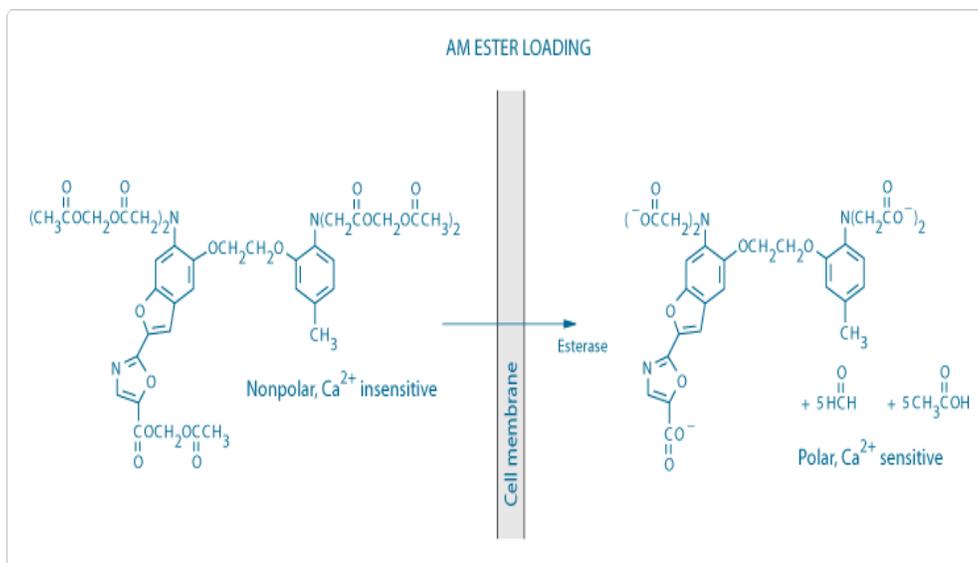


Figura 27. Representación esquemática de la incorporación del Fura 2 a la célula. Tomado de: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Technical-Notes-and-Product-Highlights/Loading-and-Calibration-of-Intracellular-Ion-Indicators.htm> (Consulta: 21 de abril 2012).

Para el cargado de *L. mexicana*, se tomó una población de $1,5 \times 10^6$ promastigotes por 1,5 mL de medio de cultivo, se colocaron en un tubo “eppendorf” y se centrifugó a 0,8 Xg por 2,5 min para eliminar el medio de cultivo, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 500 μ l de PBS glucosado, repitiendo el proceso dos veces. Seguidamente, se incubaron los parásitos con 2 μ M de Fura 2-AM, 2,4 μ M de ácido plurónico y 2,4 μ M de probenicid a 29 °C durante 1 hora en agitación constante. Una vez pasado el tiempo de incubación se realizaron dos lavados con PBS glucosado. Se colocaron los parásitos en una cubeta de cuarzo, de 1 ml de capacidad y 4mm de diámetro óptico para luego ser colocada en el fluorímetro

Los efectores utilizados en este experimento fueron: Dronedarona 10 μ M, Digitonina (permeabiliza la membrana), EGTA (quelante de Ca^{2+}).

El fluorímetro a utilizar es un Perkin – Elmer LS55 con un sistema de adquisición de datos adecuado (Fig.28).

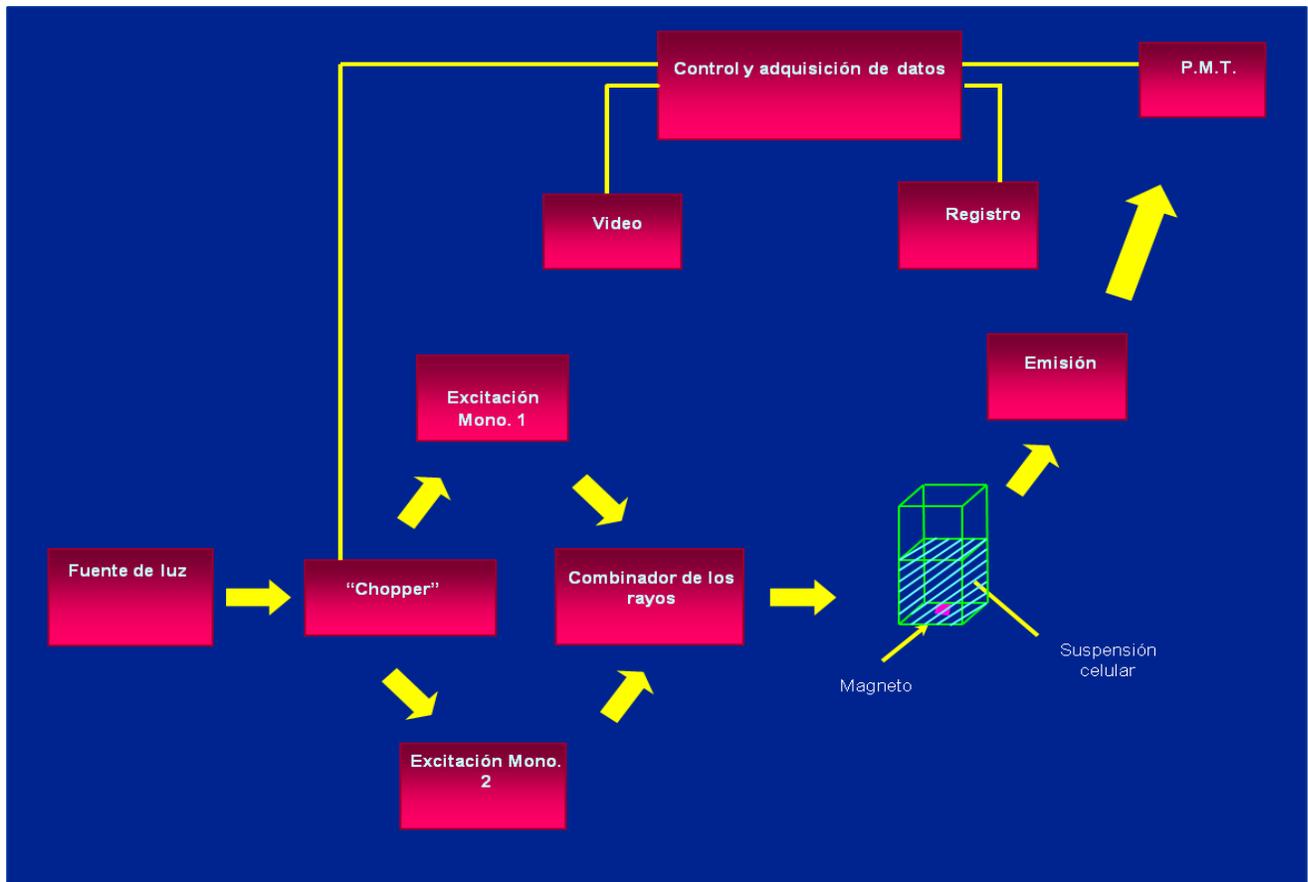


Figura 28. Representación esquemática del sistema de detección de Ca^{2+} mediante dos longitudes de onda de excitación.

Este fluorímetro consta de una fuente de luz que incide en un “chopper” en el cual se separa el haz de luz en sus dos longitudes de onda de excitación del Fura 2; 340 nm para el Fura 2 unido a Ca^{2+} y 380 nm para el Fura libre. Las longitudes de onda son luego unidas mediante un combinador de rayos que las hace incidir sobre la muestra en la cubeta de cuarzo. La muestra cargada con Fura-2 emite a 510 nm. Esta longitud de onda es recibida por el fotomultiplicador (P.T.M) y luego va al centro de control y adquisición de datos, proporcionando un registro del experimento y una data numérica visible en el monitor de la computadora acoplada al sistema.

La cubeta de cuarzo se coloca en el fluorímetro, en un sistema de laminas acopladas a un baño termocontrolado, fijado previamente a 29 °C. Los diferentes efectores se añadieron a la cubeta mediante una jeringa “Hamilton”, partiendo de soluciones concentradas con el fin de no aumentar el volumen y así evitar la dilución de la fluorescencia.

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

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \left(\frac{R - R_{\min}}{R - R_{\max}} \right) \cdot \left(\frac{F_{380\max}}{F_{380\min}} \right)$$

Donde R es la relación de fluorescencia de excitación del fura a 340/380 nm, K_d la constante de afinidad del Fura 2 por Ca^{2+} (224nm), R_{\min} el valor en R más bajo en presencia de EGTA, R_{\max} el mayor valor en R en presencia de digitonina con Ca^{2+} saturante, F_{\min} el mayor valor que se encuentra luego de añadir EGTA (O Ca^{2+}), F_{\max} el menor valor que se encuentra luego de añadir digitonina en presencia de EGTA.

4.6 Determinación del efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *Leishmania mexicana*.

En este caso se utilizó el fluoróforo Rodamina 123, el cual presenta un pico máximo del espectro de excitación en 488 nm, y un pico máximo de su espectro de emisión en 530 nm. Este fluoróforo tiene la capacidad de acumularse en la mitocondria de estos parásitos de acuerdo a la magnitud del potencial electroquímico mitocondrial, permitiéndole determinar las variaciones de este potencial electroquímico de este organelo (Fig. 29).

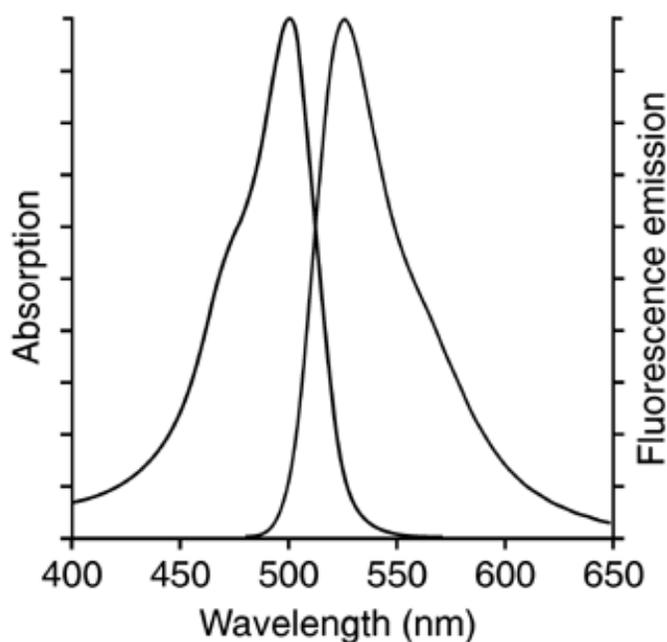


Figura 29. Espectro de excitación y emisión de la rodamina 123. Tomado de: <http://www.invitrogen.com/search/global/searchAction.action?query=rhodamine+123&resultPage=1&resultsPerPage=15>. (Consulta: 12 de septiembre 2012)

Para ello, se centrifugó en un tubo “ependorf” una población de $1,5 \times 10^6$ promastigotes por 1,5 mL de medio de cultivo se a 0,8 Xg durante 2,5 min para eliminar el medio de cultivo, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 500 μ l de PBS glucosado, repitiendo el proceso dos veces.

Los parásitos se incubaron con 20 μ M del fluoróforo rodamina 123 durante 45 minutos a 29 °C en agitación continua. Una vez terminado el tiempo de carga se centrifugaron nuevamente los parásitos y se realizaron dos lavados. Luego se procedió a agregarlos en una cubeta de cuarzo y a colocarlos en el fluorímetro, que en este caso es un Hitachi F-7000 que se encontraba en agitación constante a 29 ° C.

Los efectores utilizados en este experimento fueron: Dronedaronona 10 μ M, amiodaronona 10 μ M y FCCP 1 μ M (desacoplador de la cadena transportadora de electrones) como control.

Adicionalmente, se determinó el efecto de la dronedaronona y la amiodaronona sobre el potencial mitocondrial, mediante citometría de flujo (metodología modificada de: Figarella y col., 2005). Para ello, se tomó una densidad de parásitos de 2×10^6 de promastigotes por 1 ml y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad con 25 nM de MitoTracker®, que es un fluoróforo con un espectro de excitación de 579 nm y de emisión 599 nm (Fig. 30), el cual difunde a través de la membrana plasmática y se acumula en la mitocondria activa, dependiendo de su potencial electroquímico. Una vez que varía el potencial mitocondrial ésta molécula es capaz de cambiar su espectro de emisión. Estos cambios son monitoreados mediante un citómetro de flujo

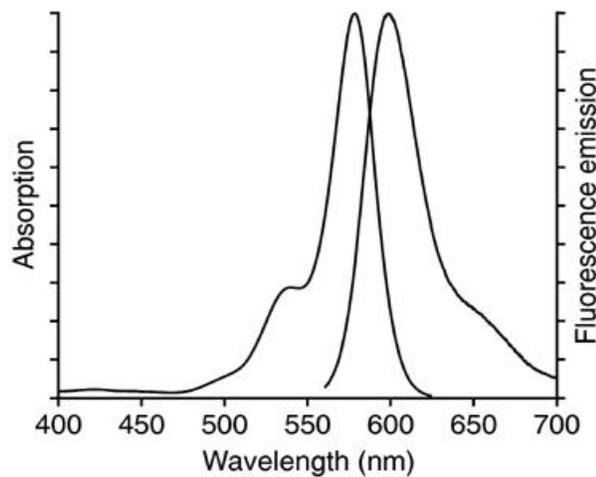


Figura 30. Espectro de excitación y de emisión del MitoTracker®. Tomado de: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/M7512?ICID=search-m7512> (Consulta: 12 de septiembre, 2012).

Después de ser incubados con el fluoróforo, los parásitos fueron centrifugados a 0,8 Xg durante 5 minutos y el sedimento se resuspendió en 500 µl de PBS, éste lavado se realizó dos veces. Los parásitos se incubaron con las drogas durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, luego se añadieron en tubos de citometría y fueron analizados por el citómetro de flujo (Beckman Coulter, Navios), con los parámetros adecuados de fluorescencia y se analizaron aproximadamente 1000 eventos.

Los efectores utilizados en este experimento fueron: Dronedaron 10 µM, amiodaron 10 µM y valinomicina 100 nM como control, preincubado con el MitoTracker®.

4.7 Determinación del efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre los acidocalcisomas de promastigotes de *Leishmania mexicana*.

Para la determinación del efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre los acidocalcisomas se procedió de la misma manera que al determinar el efecto de las drogas en el potencial mitocondrial, pero empleando el fluoróforo naranja de acridina a una concentración final de 2 µM, incubando los parásitos durante 5 minutos en agitación continua a 29° C

La naranja de acridina es un fluoróforo, el cual tiene la capacidad de acumularse en compartimientos ácidos, como los acidocalcisomas y al igual que la rodamina 123 presenta un espectro de excitación de 488 nm y uno de emisión de 530 nm. Cuando se añade algún efector que alcalinice los acidocalcisomas, la naranja de acridina sale del organelo de forma fluorescente y pudiendo ser monitoreado por el fluorímetro (Fig. 31).

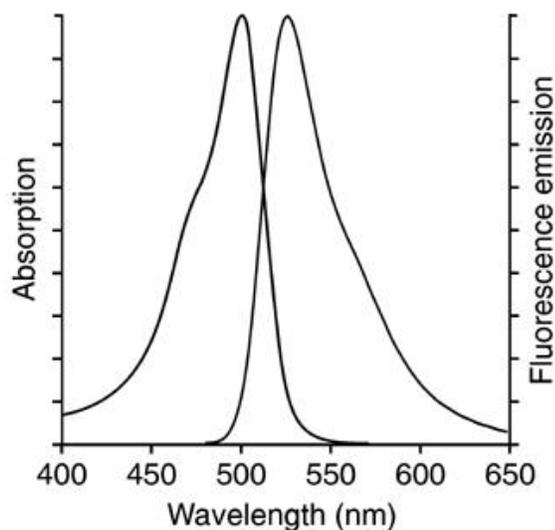


Figura 31. Espectro de excitación y de emisión de la naranja de acridina. Tomado de: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/A1301> (Consulta: 12 de septiembre, 2012).

Una vez realizados los lavados de los parásitos se procedió a colocarlos en una cubeta de cuarzo y a colocarlos en el fluorímetro, que en este caso es un Hitachi F-7000 que se encuentra en agitación constante a 29 ° C.

Los efectores a utilizar en este experimento son: Dronedarona 10 μM , amiodarona 10 μM y nigericina 1 μM como control, la cual intercambia K^+ por H^+ , lo cual conlleva a la rápida alcalinización de los acidocalcisomas.

Los distintos efectores se colocaron en la cubeta con parásitos, mediante una jeringa Hamilton.

5. RESULTADOS

5.1 Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre promastigotes de *L. mexicana*.

Con el objeto de estudiar el efecto de la dronedarona sobre promastigotes de *L. mexicana*, poblaciones de estos parásitos (10^6 parásitos/ml) fueron expuestas a concentraciones crecientes de dronedarona y amiodarona, manteniendo un grupo control sin droga. Se determinó su viabilidad en el tiempo hasta observar una fase estacionaria en el crecimiento, lo cual ocurrió a los diez días post-tratamiento. Los resultados indican (Ver fig. 32A) un efecto dosis – dependiente, observándose la inhibición máxima de crecimiento a una concentración de 5 μ M de dronedarona. Nótese además que para cada concentración de ambas drogas, la dronedarona ejerce un mayor efecto inhibitorio en el crecimiento de la población de estos parásitos.

Con la construcción de una curva dosis-respuesta se puede observar como a medida que aumenta la concentración de droga, el porcentaje de proliferación celular disminuye. Además, fue posible determinar la concentración de dronedarona capaz de inhibir el crecimiento del 50 % de la población de promastigotes (IC_{50}): 0,47 μ M (Ver fig. 32B). Comparando con el IC_{50} reportado con amiodarona de 0,90 μ M podemos determinar que la dronedarona tiene un mayor efecto que la amiodarona al inhibir el crecimiento de promastigotes de *L. mexicana*.

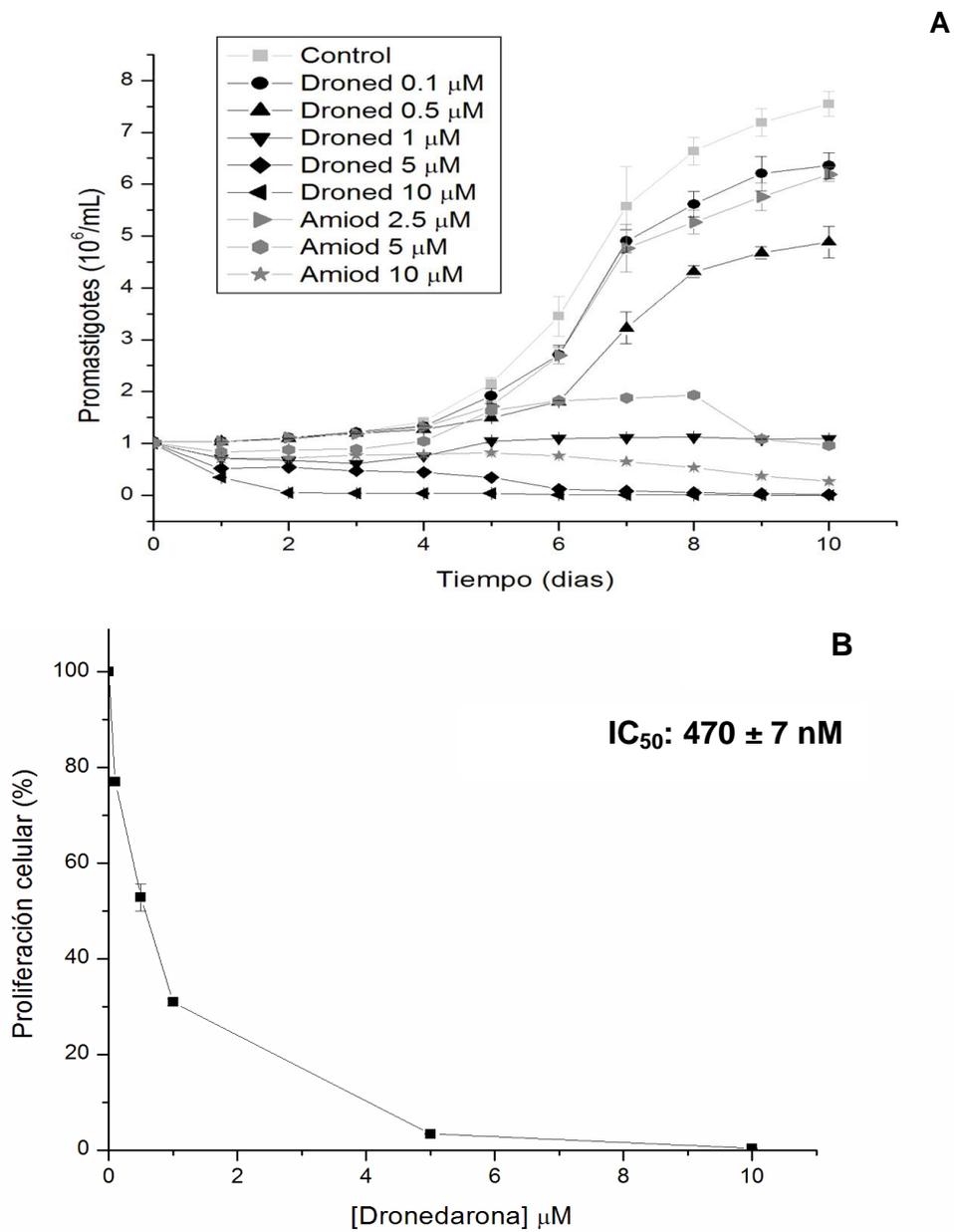


Figura 32. Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre promastigotes de *L. mexicana* (A) Los parásitos fueron sometidos a concentraciones crecientes de las drogas hasta alcanzar la fase estacionaria del cultivo (B) Curva dosis- respuesta de la proliferación celular de promastigotes de *L. mexicana* al sexto día de tratamiento en función de concentraciones crecientes de dronedarona. IC₅₀: 0,465 μM.

5.2 Efecto de la dronedarona sobre macrófagos infectados con amastigotes de *L. mexicana*.

Con la finalidad de determinar el efecto de la dronedarona sobre los amastigotes (estadío clínicamente relevante) de *L. mexicana* se infectaron macrófagos de la línea J774-G8 con promastigotes de éste parásito en una proporción de 10 promastigotes por cada macrófago y se evaluó el efecto de concentraciones crecientes de la droga.

Con la construcción de una curva de porcentaje de infección en función de las concentraciones de la dronedarona, podemos observar un efecto dosis – dependiente en el cual a medida que aumenta la concentración de la droga, disminuye el porcentaje de infección. A partir de esta curva se calculó el IC₅₀: 7,7 nM y la concentración mínima inhibitoria, la cual es de 40 nM (ver fig 33A). Es importante destacar que el número de macrófagos por campo, los cuales están expuestos a las diferentes concentraciones de la droga, es estable, por lo que la droga no ejerce efecto sobre la célula hospedadora (Ver fig. 33B).

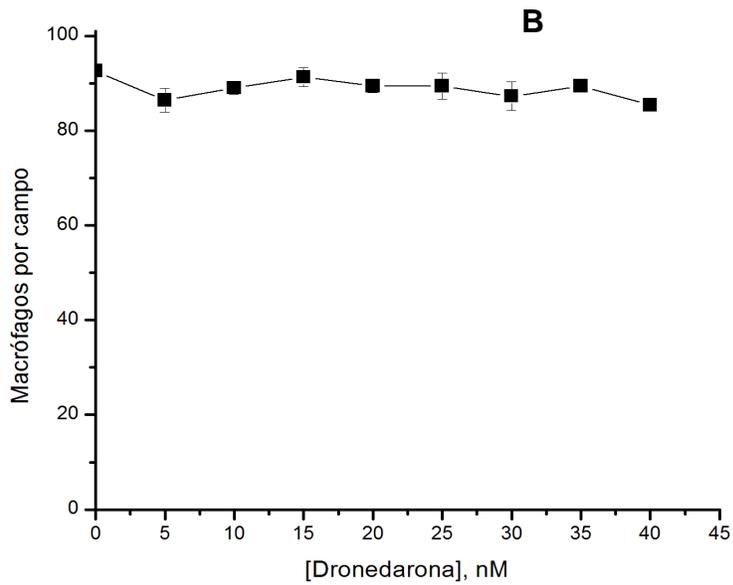
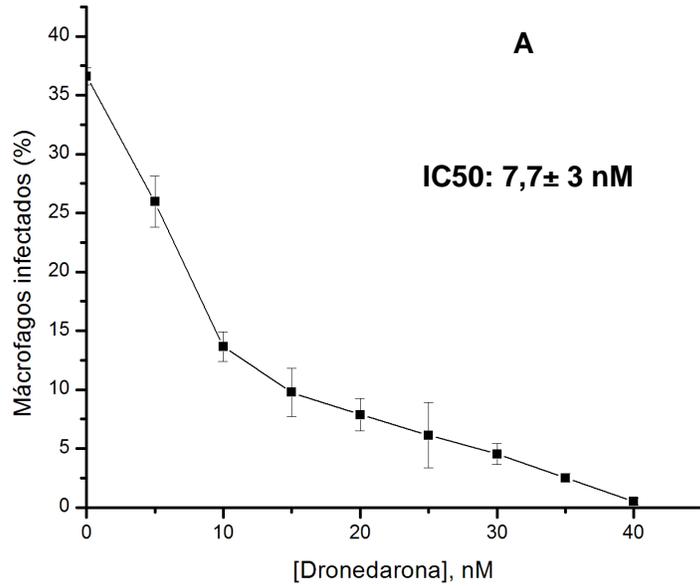


Figura 33. Efecto de la dronedarona sobre amastigotes intracelulares de *L. mexicana* (A) Los amastigotes fueron sometidos a concentraciones crecientes de la droga (B) Efecto de concentraciones crecientes de dronedarona sobre macrófagos sin infectar. Se observa un número estable de células para cada concentración.

5.3. Efecto de la dronedarona sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en promastigotes de *L. mexicana*.

Se ha demostrado previamente que la amiodarona produce la disrupción de la homeostasis del Ca^{2+} tanto en *T. cruzi* (Benaim y col., 2006) como en *L. mexicana* (Serrano y col., 2009). Recientemente se ha reportado que la dronedarona produce el mismo efecto en *T. cruzi* (Benaim y Paniz, 2012). En base a esto se procedió a determinar el efecto de esta droga sobre $[Ca^{2+}]_i$ de *L. mexicana*. Para ello se cargaron los promastigotes de con el fluoróforo Fura 2 y se observó el efecto de 10 μ M de dronedarona sobre la $[Ca^{2+}]_i$. En la figura 34A se puede observar que la dronedarona indujo un incremento bifásico en los niveles de Ca^{2+} citoplasmático de la población de promastigotes, sugiriendo que la liberación de este catión ocurre a partir de dos compartimientos intracelulares. Con la finalidad de determinar si el incremento de Ca^{2+} era debido a la liberación de este catión de algún compartimiento celular o si provenía del exterior, los parásitos fueron incubados en un buffer sin Ca^{2+} (2 mM EGTA). El resultado indica que la dronedarona incrementa la $[Ca^{2+}]_i$ a partir de compartimientos intracelulares (Ver fig. 34B).

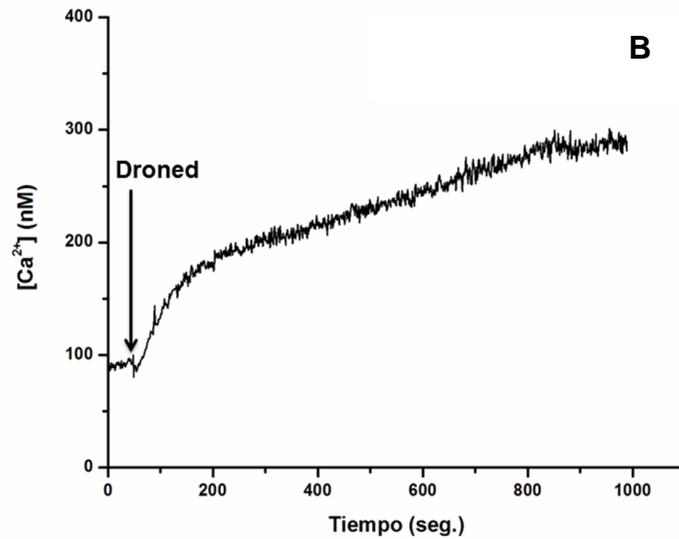
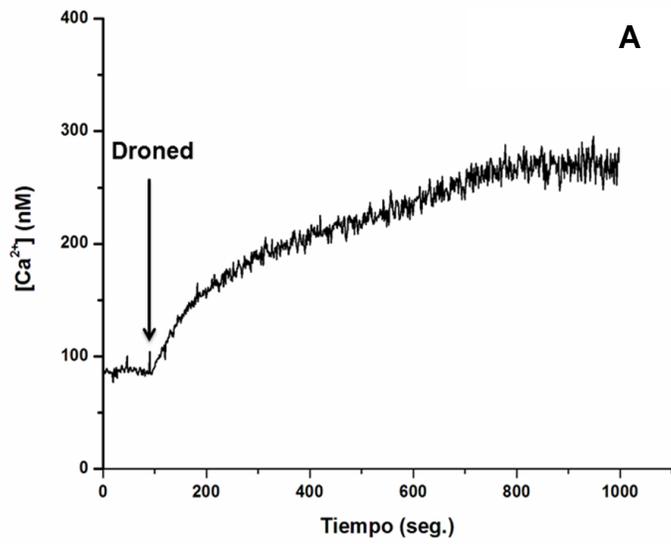


Figura 34. Efecto de la dronedarona sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en promastigotes de *L. mexicana* (A) en presencia de 2mM de Ca^{2+} externo y (B) en ausencia de Ca^{2+} externo (2 mM EGTA). La flecha indica el tiempo de adición de la dronedarona.

5.4 Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *L. mexicana*.

Con el fin de determinar el efecto de las drogas sobre el potencial electroquímico mitocondrial ($\Delta\Psi$) de promastigotes de *L. mexicana*, se utilizaron dos sistemas de medición: un fluorímetro y un citómetro de flujo.

En los experimentos del fluorímetro se incubaron los promastigotes con el fluoróforo rodamina 123. Este compuesto se caracteriza por acumularse entre las membranas de la mitocondria y cuando hay una disminución en el potencial electroquímico mitocondrial, el fluoróforo sale de la mitocondria, pudiendo así ser monitoreada por el fluorímetro.

En la figura 35A podemos observar como la fluorescencia aumenta en función del tiempo al agregar la dronedarona o la amiodarona, indicando que ambas drogas son capaces de desestabilizar el potencial electroquímico mitocondrial. Sin embargo, destaca el hecho de que al agregar la dronedarona, se observa el efecto con mayor velocidad, en comparación con la amiodarona.

El carbonilcianuro-p-trifluorometoxihidrazona (FCCP) es un protonóforo, desacoplante de la cadena transportadora de electrones de la fosforilación oxidativa, el cual fue utilizado como control positivo. En la figura 35A podemos observar como luego de añadir el FCCP no hay mucha variación en la fluorescencia, sugiriendo que las drogas colapsaron casi por completo el potencial electroquímico mitocondrial.

Al realizar el experimento de forma inversa, el FCCP tiene un efecto sobre el potencial mitocondrial al aumentar la fluorescencia. Sin embargo, al añadir las drogas se puede apreciar que éstas son capaces de desestabilizar aún mas el potencial electroquímico mitocondrial. Nuevamente la dronedarona tiene un efecto más rápido que la amiodarona (Ver fig. 35B).

En los experimentos de citometría de flujo, los promastigotes fueron incubados con el fluoróforo MitoTracker®, En éste experimento los promastigotes fueron incubados con las drogas (10 μ M) durante 15 minutos, tiempo aproximado en el cual el potencial electroquímico mitocondrial comienza a ser desestabilizado, según los experimentos anteriores (750 segundos en la figura 35A). En el histograma control (parásitos incubados sin droga) podemos apreciar la población total de promastigotes, cuyo potencial electroquímico mitocondrial no ha sido afectado. Al agregar las drogas observamos como el histograma se desplaza hacia la izquierda, comparándose con el control que permanece como una línea punteada. Esto indica que el potencial electroquímico mitocondrial de la población de parásitos ha sido desestabilizado. El control positivo utilizado fue la valinomicina (100 nM) un ionóforo capaz de transportar K^+ y colapsar el potencial electroquímico mitocondrial. Lo interesante de éste experimento es que a pesar de que la amiodarona parece tener un mayor porcentaje (33,1%) de desestabilización del potencial mitocondrial, al compararlo con la línea punteada (control negativo), el efecto se da sólo sobre una porción de la población de parásitos mientras que el efecto de la dronedarona es similar al de la valinomicina, al alterar el potencial mitocondrial de la totalidad de la población presente, pero en menor magnitud (Ver fig. 36).

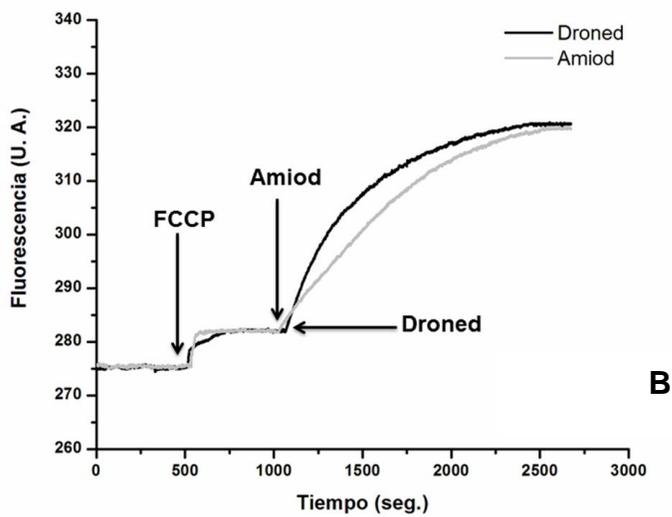
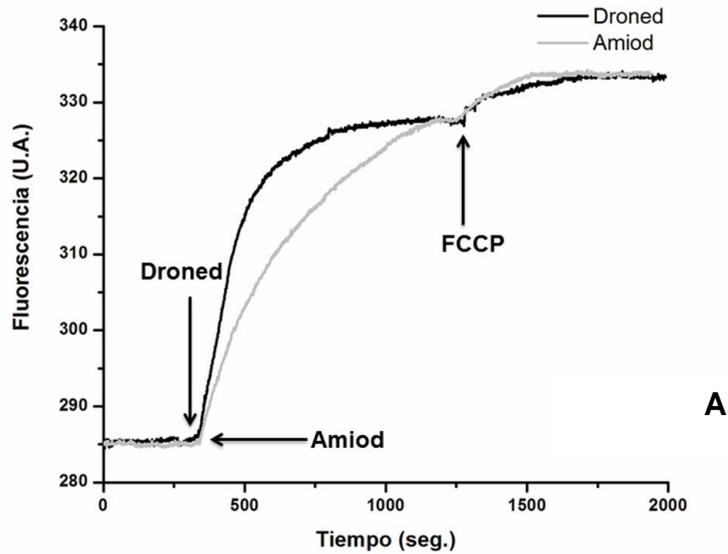


Figura 35. Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *L. mexicana* luego de incubarlas en presencia rodamina 123. (A)Efecto de la dronedarona y la amiodarona (10 μ M) sobre el potencial mitocondrial. Efecto de la dronedarona y la amiodarona luego de añadir FCCP (1 μ M).

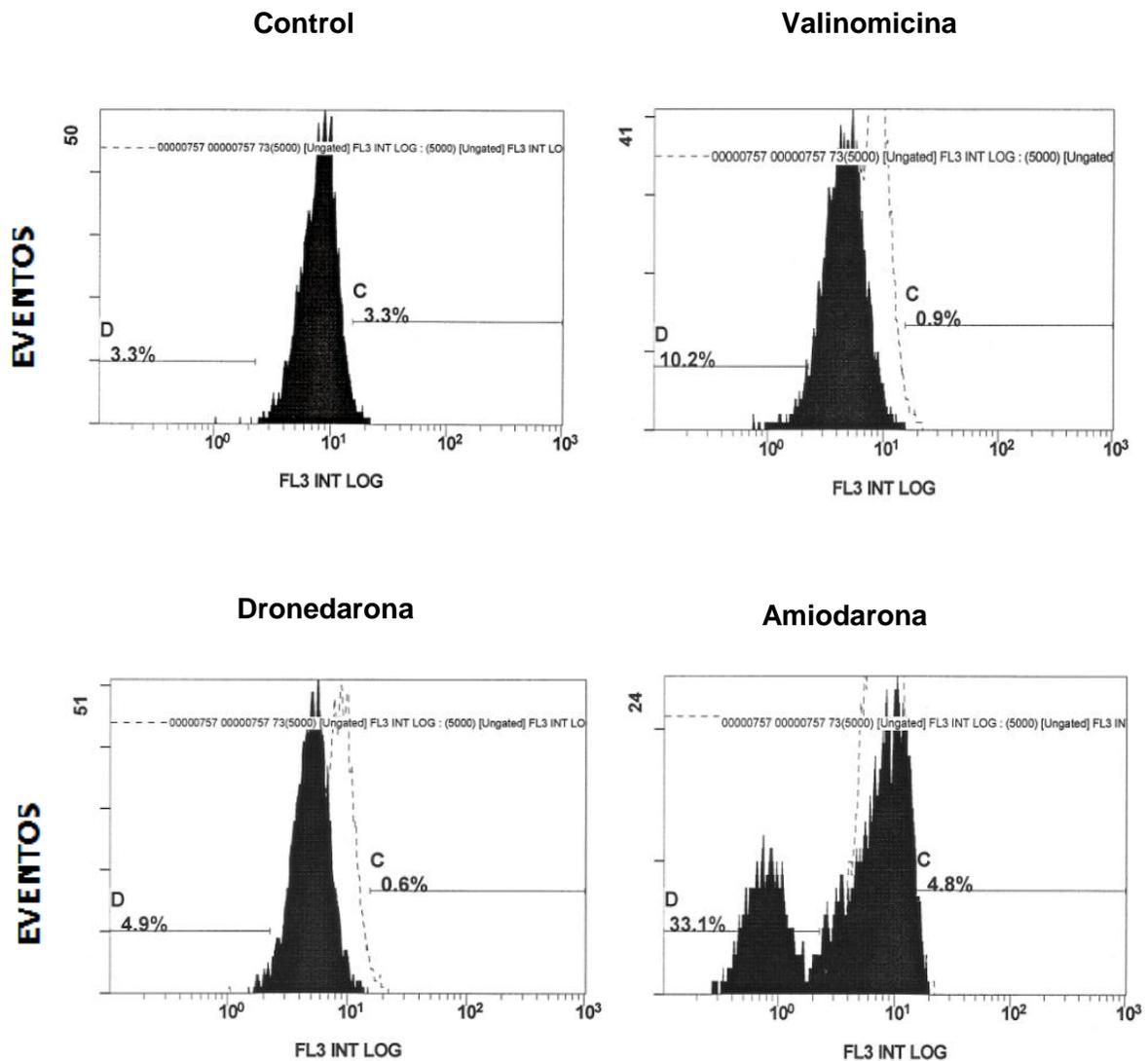


Figura 36: Efecto de la dronedrona y la amiodarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *L. mexicana*. Los parásitos fueron incubados con MitoTracker® durante 30 minutos. La incubación con las drogas (10 μ M) duró 15 minutos y con la valinomicina (100 nM) se realizó una preincubación desde que se le agregó el MitoTracker®.

5.5 Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre los acidocalcisomas de promastigotes de *L. mexicana*.

Con la finalidad de evaluar el efecto de las drogas sobre los acidocalcisomas, los promastigotes fueron incubados con el fluoróforo naranja de acridina. Recordemos que éste compuesto tiene afinidad por los organelos ácidos como los acidocalcisomas, acumulándose en ellos. La liberación de éste fluoróforo desde los acidocalcisomas, al igual que con la rodamina 123 en las mitocondrias, es visualizada como un incremento en la fluorescencia. Se puede observar como al añadir ambas drogas (10 μM) existe un aumento en la fluorescencia, asociada a la liberación del fluoróforo desde el compartimiento ácido, producto de la alcalinización del mismo (Ver fig. 37A). Al agregar nigericina (1 μM), la cual intercambia K^+ por H^+ , conllevando a la alcalinización de los acidocalcisomas, se observa un aumento en la señal de fluorescencia, ya que tanto la dronedarona como la amiodarona habían logrado alcalinizar estos organelos.

En la figura 37B se observa que al realizar el experimento de forma inversa añadiendo primero nigericina, se observa un incremento en la fluorescencia traducido en la alcalinización de los acidocalcisomas, no obstante al agregar ambas drogas nuevamente hay un incremento de la fluorescencia, indicando que las drogas son capaces aun de alcalinizar los acidocalcisomas.

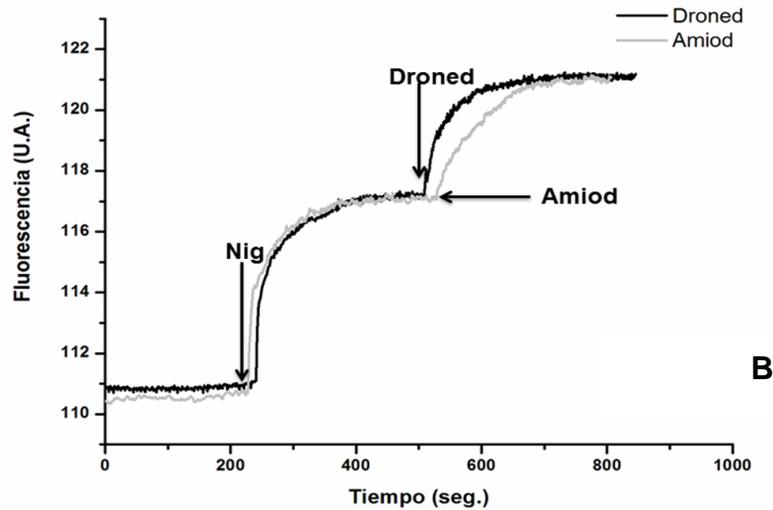
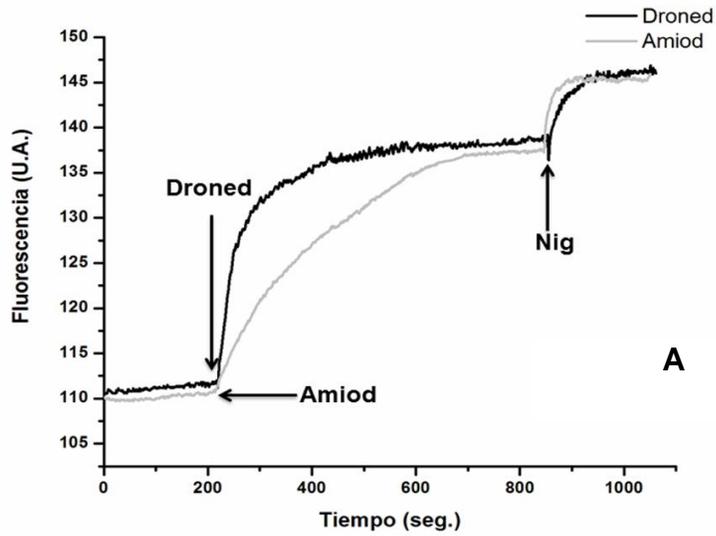


Figura 37. Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre los acidocalcisomas de promastigotes de *L. mexicana*. Los parásitos fueron incubados durante 15 minutos en presencia de naranja de acridina. (A) Se observa el efecto de las drogas (10 μ M) sobre los acidocalcisomas. (B) Efecto de la dronedarona y la amiodarona luego de añadir nigericina (1 μ M).

6. DISCUSION

El Glucantime y el Pentostan, han resultado ser poco eficientes frente al grave problema ocasionado por la Leishmaniasis, ya que el uso de estos medicamentos trae como consecuencia numerosos efectos adversos para el individuo tratado. Lo mismo ocurre con la miltefosina, fundamentalmente debido a la aparición de resistencia y a los efectos teratogénicos. Es por ésta razón que se justifica plenamente la búsqueda de nuevas drogas más efectivas, con la capacidad de afectar la viabilidad del parásito sin afectar la viabilidad del organismo hospedador.

La amiodarona es una droga utilizada como antiarrítmico en varias afecciones cardíacas. A ésta droga se le ha atribuido un potente efecto fungicida en especies como *Candida neoformans* y *Saccharomyces* (Courchesne y col., 2006). Como se mencionó antes, se ha reportado que ésta droga tiene la capacidad de afectar la viabilidad de tripanosomatidios como *T. cruzi* (Benaim y col., 2006) y *L. mexicana* (Serrano y col., 2009) pero no por la vía reportada en hongos, a través de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática, sino alterando la homeostasis de $[Ca^{2+}]_i$ de éstos parásitos al interactuar con distintos organelos intracelulares. Sin embargo, la amiodarona genera una serie de efectos secundarios por lo cual su aplicabilidad se ha visto reducida.

La dronedarona es una droga análoga a la amiodarona, la cual posee un grupo metano sulfonilo que la hace menos hidrofóbica y no posee yodo en su estructura. Recientemente Benaim y col., (2012) reportaron que la dronedarona afecta la viabilidad de *T. cruzi* al igual que la amiodarona, siendo ésta menos efectiva que la dronedarona.

En éste sentido, en éste trabajo se ha estudiado el efecto *in vitro* de la dronedarona sobre la viabilidad de *Leishmania mexicana*, uno de los principales causantes de la leishmaniasis cutánea, caracterizada por la aparición de úlceras y

lesiones en la piel del organismo hospedador, y a su vez comparar el efecto sobre éstos parásitos con la amiodarona.

Al evaluar el efecto de la dronedarona sobre poblaciones de promastigotes de *L. mexicana* fue posible determinar una respuesta dosis-dependiente sobre la viabilidad de los promastigotes, obteniéndose un IC₅₀ de 0,47 µM, menor al reportado con la amiodarona sobre estos mismos parásitos, de 0,90 µM (Serrano y col., 2009), indicando una mayor efectividad de la dronedarona sobre la viabilidad de éstos parásitos en este estadio.

Por otra parte, se estudió el efecto de la dronedarona sobre los amastigotes intracelulares de *L. mexicana*, utilizando macrófagos infectados, obteniendo una respuesta dosis-dependiente, ya que a mayores concentraciones de dronedarona se observaba que el porcentaje de infección disminuía. El IC₅₀ obtenido para éste ensayo fue de 7,7 nM, similar al reportado para la amiodarona (8 nM). Sin embargo, la concentración mínima inhibitoria para la dronedarona fue de 40 nM, el doble del reportado con amiodarona, de 20 nM. Este resultado fue inesperado, tomando en cuenta que la dronedarona fue más efectiva que la amiodarona sobre los promastigotes de *L. mexicana*. Una posible explicación, sería que la dronedarona al ser menos hidrofóbica que la amiodarona, atraviesa las membranas del macrófago con mayor dificultad, retardando la difusión de la droga hacia los amastigotes.

El papel fundamental del Ca²⁺ como segundo mensajero en las células de múltiples organismos (Lu col., 1997), hace que la regulación intracelular de éste importante catión se convierta en un blanco quimioterapéutico (Benaim y Garcia, 2011).

Se determinó el efecto de la dronedarona sobre la homeostasis de Ca²⁺ intracelular en promastigotes de *L. mexicana* y se obtuvo como resultado un incremento en la [Ca²⁺]_i, comprobándose que la dronedarona tiene la capacidad de

aumentar la concentración intracelular de este catión . Este experimento se realizó en presencia y ausencia de Ca^{2+} , obteniéndose en ambos casos la misma respuesta, indicando así, que el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ proviene de la liberación de éste desde reservorios intracelulares.

Los tripanosomatidios están caracterizados por poseer una mitocondria única gigante que ocupa hasta el 12 % del volumen total de parásito, y se ha reportado que la amiodarona afecta éste organelo al desestabilizar su potencial electroquímico, tanto en *T. cruzi* (Benaim y col. 2006) como en *L. mexicana* (Serrano y col., 2009). Conociendo que la dronedarona produce la misma respuesta en *T. cruzi* (Benaim y col., 2012; Benaim y Paniz, 2012), hemos demostrado que la dronedarona es capaz de simular éste efecto en *L. mexicana*. Cuando se comparó el efecto de la amiodarona con el de la dronedarona, se observó que, tanto sobre el potencial electroquímico mitocondrial como sobre la alcalinización de los acidocalcisomas de los promastigotes, el efecto fue más rápido cuando se usó dronedarona.

Adicionalmente, se determinó el efecto de las drogas sobre el potencial electroquímico mitocondrial mediante la utilización de un citómetro de flujo, utilizando otras condiciones experimentales. Los resultados demuestran un efecto de ambas drogas, que confirman que las dos son capaces de colapsar el potencial electroquímico de éste organelo. Lo interesante de éstos resultados es que la amiodarona desestabilizó el potencial mitocondrial en mayor magnitud, pero solo de una parte de la población total mientras que la dronedarona lo hizo sobre toda la población simulando el efecto de la valinomicina. A pesar de que la dronedarona es menos hidrofóbica que la amiodarona, la dronedarona posee un menor peso molecular. Este hecho podría explicar que la dronedarona afectara a toda la población de promastigotes, lo cual la haría penetrar con más velocidad y alcanzar los organelos blanco en un tiempo menor. Si bien la amiodarona solo afecta a una porción de la población de promastigotes,

puede sugerirse que en el tiempo que duró el experimento, ésta droga sería efectiva contra las poblaciones más sensibles de la población total, mientras que la dronedarona resultaría efectiva contra toda la población de promastigotes.

Los acidocalcisomas son organelos ácidos que acumulan gran cantidad de Ca^{2+} y son abundantes e importantes en tripanosomatidios (Docampo y Moreno, 2001). Según se ha demostrado previamente, la amiodarona alcaliniza los acidocalcisomas estimulando la liberación del Ca^{2+} intracelular desde éste organelo hacia el citoplasma, como en *L. mexicana* (Serrano y col., 2009). La dronedarona produce el mismo efecto en *T. cruzi* (Benaim y col., 2012; Benaim y Paniz, 2012). Se demostró en éste trabajo que la dronedarona induce la alcalinización de los acidocalcisomas de promastigotes de *L. mexicana*. Sin embargo, como se mencionó, la dronedarona induce un mayor incremento de la fluorescencia por unidad de tiempo, consistente con un efecto más rápido al alcalinizar los acidocalcisomas que la amiodarona.

Si bien hemos determinado que la dronedarona aumenta la concentración de Ca^{2+} intracelular en los promastigotes de *L. mexicana* al interactuar con dos organelos intracelulares y sabiendo que la alcalinización de los acidocalcisomas induce la salida del Ca^{2+} desde el interior del organelo al citoplasma, se sugiere que los acidocalcisomas son unos de los organelos con los cuales interactúa la dronedarona al desestabilizar la homeostasis de Ca^{2+} intracelular en el parásito.

Serrano y col., (2009) demostraron mediante microscopia confocal el efecto de la amiodarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial de amastigotes intracelulares, obteniendo que al colapsar este potencial ocurre una liberación de Ca^{2+} desde este organelo al citoplasma. En base a esto y sabiendo que la dronedarona también induce el colapso del potencial electroquímico mitocondrial, podemos sugerir que el otro organelo con el cual interactúa la droga al desestabilizar la homeostasis de Ca^{2+} intracelular, es la mitocondria única gigante presente en *L. mexicana*.

De acuerdo a Benaim y García, 2011, la disrupción de la homeóstasis de Ca^{2+} intracelular resulta en un efecto letal para diferentes tripanosomatideos. Los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan lo anterior, ya que la dronedarona afecta severamente la viabilidad de los promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* y paralelamente afecta la homeóstasis intracelular del Ca^{2+} .

Al comparar ambas drogas, se determinó que la dronedarona es aparentemente más efectiva que la amiodarona, en cuanto a la inhibición de la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*, y la mayor velocidad de acción sobre la mitocondria y los acidocalcisomas. Sin embargo, sobre los amastigotes intracelulares de *L. mexicana*, ambas drogas presentan una eficacia muy similar, ya que los IC_{50} son del mismo orden.

En nuestro Laboratorio se ha demostrado recientemente que la dronedarona es capaz de inhibir la oxidoescualeno ciclasa de *L. mexicana*, con un K_i inclusive mayor que sobre la misma enzima de *T. cruzi*. También se han realizado experimentos de “docking” molecular, demostrándose que la dronedarona encaja perfectamente en el sitio activo de esta enzima (Resultados no publicados). Estos experimentos demuestran que la dronedarona es capaz de afectar la síntesis de ergosterol, lo cual potenciaría los obtenidos en este trabajo sobre la homeostasis intracelular del Ca^{2+} .

Por todo lo anterior, la dronedarona promete ser una droga efectiva tanto contra la leishmaniasis. Como conclusión, recomendamos realizar experimentos *in vivo* para determinar el futuro uso de la dronedarona como tratamiento y leishmanicida.

7. CONCLUSIONES

- La dronedarona ejerce un efecto inhibitorio en la proliferación de los promastigotes de *L. mexicana* con un IC₅₀ de 0,47 μM
- La dronedarona ejerce un efecto sobre amastigotes en macrófagos infectados de *L. mexicana*. La droga inhibió la proliferación de los amastigotes con un IC₅₀ de 7,7 nM.
- La dronedarona induce un incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular en los promastigotes de *L. mexicana*, el cual ocurre a partir de la liberación de organelos citoplasmáticos.
- La dronedarona genera el colapso del gradiente electroquímico de protones en la mitocondria en promastigotes de *L. mexicana*.
- La dronedarona induce la alcalinización de los acidocalcisomas en promastigotes de *L. mexicana*.
- El efecto de la dronedarona sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana* es más efectivo que el de la amiodarona al comparar los IC₅₀ de 0,47 μM para la dronedarona y 0,9 μM para la amiodarona.
- El efecto de la dronedarona es similar al de la amiodarona sobre amastigotes intracelulares de *L. mexicana* en macrófagos, con un IC₅₀ de 7,7 nM para la dronedarona y de 8 nM reportado por Serrano y col., (2009) para la amiodarona.
- El efecto de la dronedarona es más rápido que el de la amiodarona, en cuanto a la desestabilización el potencial electroquímico mitocondrial de promastigotes de *L. mexicana*. Así mismo, en tiempos cortos, la amiodarona desestabiliza el potencial mitocondrial de una pequeña población de promastigotes, mientras que la dronedarona afecta a la población total.
- La dronedarona tiene un efecto más rápido que la amiodarona, en cuanto a la alcalinización de los acidocalcisomas de los promastigotes de *L. mexicana*.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Al- Abdely H. M. 1999. Efficacy of triazole SCH 56592 against a *leishmania amazonensis* and *leishmania donovani* in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 2910-2914.
- Alvar, J. 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus co-infection: the first 10 years. *Clinic. Microbiol. Rev.* **10**: 298-319.
- Benaim, G., Bermudez, R., Urbina, J. 1990. Ca²⁺ transport in isolated mitochondrial vesicles from *Leishmania braziliensis* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **39**: 61-68.
- Benaim, G. 1993. Homeostasis de Ca²⁺ intracelular. La calmodulina y la Ca²⁺-ATPase de membrana plasmática de tripanosomatidios. *Acta Cient. Venez.* **44**: 57-66.
- Benaim G. 1996. Intracellular calcium signaling and regulation in *Leishmania spp.* Molecular and immune mechanism in the pathogenesis of cutaneous Leishmaniasis: (F. Tapia, G. Caceres – Dittmar y M. A. Sánchez, Eds.) R.G. Landes Co., *Biomedical Pub.*, Austin, Texas. **5**: 589-106
- Benaim, G., Cervino, V. 2000. Intracellular Calcium Homeostasis and Signaling Trypanosomatids. *Elect. J. Pathol. Histol.* **6**: 1-11.
- Benaim, G., Villalobos, A. 2002. Phosphorylation of Calmodulin. *Eur. J. Biochem.* **269**: 3619–3631.
- Benaim, G., Sanders J., Garcia-Marchan, Y., Colina, C., Lira, R., Caldera, A., Payares, G., Sanoja, C., Burgos, J., Leon-Rossel A., Concepcion, J.L., Schijman, A., Levin M., Oldfield, E. and Urbina, J. 2006. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J. Med. Chem.* **49**: 892-899.

- Benaim, G., Garcia, C. 2011. Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishmaniasis. *Trop. Biomed.* **28**: 471-481.
- Benaim G., Hernandez-Rodriguez V., Mujica-Gonzalez S., Plaza-Rojas L, Silva ML., Parra-Gimenez N., Garcia-Marchan Y., Paniz-Mondolfi A., Uzcanga G (2012). In vitro anti-*Trypanosoma cruzi* activity of dronedarone, a novel amiodarone derivative with an improved safety profile. *Antimicrob Agents Chemother.* **56**(7):3720-5.
- Benaim G. and Paniz A. 2012 The emerging role of amiodarone and dronedarone in Chagas disease. *Nature.* 1-5
- Bertello L., Gonpalvez M., Collit M. and De Lederkremer R. 1995. Structural analysis of inositol phospholipids from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes forms. *Biochem. J.* **310**: 252-261.
- Carafoli, E. 1987. Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 395-433.
- Cárdenas R., Sandoval C. M., Rodríguez-Morales A. J., Franco-Paredes. C. 2006. Impact of climate variability in the occurrence of leishmaniasis in northeastern Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75**: 273-277.
- Castes M. And Tapia F. 1998. Inmunopatología de la leishmaniasis tegumentaria Americana. *Acta Científica Venezolana.* **49**: 42-56.
- Chan M. And Fong D. 1994. Plant microtubule inhibitors against trypanosomatids. *Parasitol. Today.* **10**: 448-451.
- Coombs G. and Mottran J. 1997. Leishmaniasis. *Parasitology.* **114**: 61-80.
- Courchesne, W.E. 2002. Characterization of a novel, broad-based fungicidal activity for the antiarrhythmic drug amiodarone. *J. Pharmacol Exp. Ther.* **300**: 195-199.

- Croft, S., and J. Engel. 2006. Miltefosine—discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **100**(Suppl. 1):S4–S8.
- Croft, S.L., Sundar, S., Fairlamb, A.h. (2006). Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clinic. Microb. Rev.* **19**:111-116.
- Davies C., Kaye P., Croft S. and Sundar S. 2005. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *Brit. Med. J.* **326**: 377-382.
- Davis A. and Kedzierski L. 2005. Recent advances in antileishmanial drug development. *Curr. Opin. Invest. Drugs.* **6**: 163-169.
- De Lima H., Rodriguez N., Feliciangeli M. D., Barrios M. A., Sosa A., Agrela I., Sánchez E. and Lopez O. 2009. Cutaneous leishmaniasis due to *L. chagasi/ L. infantum* in an endemic area of Guárico state, Venezuela. *Trop. Med.*
- Denny, P.W., and Smith, D.F. (2004). Rafts and sphingolipid biosynthesis in the kinetoplastid parasitic protozoa. *Mol. Microbiol.* **53**:725–733.
- Denny, P.W., Shams-Eldin, H., Price, H.P., Smith, D.F., and Schwarz, R.T. (2006). The protozoan inositol phosphorylceramide synthase: A novel drug target that defines a new class of sphingolipid synthase. *J. Biol. Chem.* **281**: 28200-28209.
- Descotaux, A. y Turco, S. (1999). Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Bio. Bioph. Acta.* **1455**:341-352.
- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Diseas.* **27**: 305-318.
- Docampo, R., Vercesi, A.E. 1989. Ca²⁺ transport by coupled *Trypanosoma cruzi* mitochondria in situ. *J. Biol. Chem.* **264**: 108-111.
- Docampo, R., Pignarato, O. 1991. The inositol phosphate/diacylglycerol signalling pathway in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* **275**: 407–411.

- Docampo, R., Moreno, M., Vercesi, A. 1993. *Trypanosomacruzi* trypomastigotes and epimastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **59**: 305-313.
- Docampo, R., Moreno, S.N.J. 1996. The role of calcium in the process of cell invasion by intracellular parasites. *Parasitol.Today* **12**: 61-66.
- Docampo, R. 2008. Estructura y función de los acidocalcisomas. Mensaje Bioquímico, Vol. XXXII.
- Figarella K. Rawer M, Uzcátegui N. L., Kubata B. K., Lauber K., Madeo F., Wesselborg S. and Duszenko M. 2005. Prostaglandin D₂ induces programmed cell death in *Trypanosoma brucei* bloodstream form. *Cell Death Different.* **12**: 335:346
- Kaneshiro E., Jayasimhulu J. and Lester R. 1986. Characterization of inositol lipids from *Leishmania donovani* promastigotes: Identification of an inositol sphingophospholipid. *J. Lipid. Res.* **27**: 1294-1303.
- Latorre, R. 1996. Biofísica y fisiología Celular. Editorial Universidad de Sevilla. Sevilla. España.
- Lux H., Heise N., Klenner T., Hart D.T. and Opperdoes F.R. 2000. Ether- lipid (alkyl-phospholipids analog) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogs in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **111**: 1-14.
- Mendoza, M., Mijares, A., Rojas, H., Colina, C., Cervino, V., Dipolo, R., Benaim, G. 2004. Evaluation of thapsigargin sensitive calcium store in trypanosomatids using *Trypanosoma evansi* as a model. *J. Parasitol.* **90**: 1181-1183.
- Molyneux, W y Killick-Kendrick, R. 1987. Leishmaniasis in Biology and Medicine. *Academic Press.* **4**:794-845.
- Moreno, S., Docampo, R. 2003. Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr. Opin. Microbial.* **6**: 1-6.

- Nagiec M.M., Nagiec E.E., Baltisberger J.A., Wells G. B., Lester R.L. and Dickson R. C. 1997. Sphingolipids synthesis as a target for antifungal drugs. Complementation of the inositol phosphorylceramide synthase defect in a mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by the AUR1 gene. *J. Biol. Chem.* **272**:9809-9817.
- Ortega, H., Lopez, M., Bula, C. 2004. KPM-11: Proteina 11 de Membrana de Kinetoplastidos. *Universitas Scientiarum.* **9**: 29-44.
- Pandey S., Suryawanshi S., Gupta S. and Srivastava L. 2005. Chemoterapy of leishmaniasis part II: synthesis and bio-evaluation of substituted arylketene dithioacetals as antileishmanial agents. *Eur. J. Med. Chem.* **40**: 751-756.
- Paul M. 1997. Activity of a new liposomal formulation of Amphotericin B against two strains of *Leishmania infantum* in a murine model. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* 1731-1734.
- Rodríguez N., Docampo R., Lu H. G. and Scott D.A. 2002. Overexpression of *Leishmania amazonensis* Ca²⁺ ATPase gen lmaa1 enhances virulence. *Cell. Microbiol.* **4**: 117-126.
- Romero, R. 2007. Microbiología y Parasitología humana. Ed. Médica Panamericana. Tercera edición. Madrid, España.
- Ruben, L., and Akins, C. 1992. *Trypanosoma brucei*: the tumor promoter thapsigargin stimulates calcium release from an intracellular compartment in slender bloodstream forms. *Exp. Parasitol.* **74**: 332-339.
- Ruiz, F.A., Rodrigues, C.O. y Docampo, R. 2001. Rapid changes in polyphosphate content within acidocalcisomes in response to cell growth, differentiation, and environmental stress in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **276**: 26114-26121.
- Ruiz, R., Favoreto, S., Dorta, M., Oshiro, M., Ferreira, A., Manque, P., Yoshida, N. 1998. Infectivity of *Trypanosoma cruzi* strains is associated with differential expression

of surface glycoproteins with differential Ca²⁺ signaling activity. *Biochem J.* **330**: 505-551.

- Schafer J. A., Kjesbo N. K., Gleason P. P. 2010. Dronedarone: Current Evidence and Future Questions. *Cardiovasc. Therapeut.* **28**: 38-47
- Selzer P. M., Chen X., Chan V. J., Cheng M., Kenyon G. L., Kuntz I. D., Sakanari J. A., Cohen F. E. and McKerrow J. H. 1997. *Leishmania major*, molecular modelling of cysteine proteases and prediction of new nonpeptide inhibitors. *Exp. Parasitol.* **87**: 212-21.
- Serrano X., Payares G., De Lucca. M., Martínez J.C., Mendoza – León A. and Benaim. 2009. Amiodarone and Miltefosine Act Synergistically against *Leishmania mexicana* and Can Induce Parasitological Cure in a Murine Model of Cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* **53**: 5108-5113.
- Serrano X., García, Y., Fernandez, A., Rodriguez, N., Rojas, H., Visbal, G., Benaim, G. 2009. Amiodarone Destabilizes Intracellular Ca²⁺ Homeostasis and Biosynthesis of Sterols in *Leishmania mexicana*. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* **53**: 1403-10.
- Serrano X. 2010. Quimioterapia contra la leishmaniasis: estado del arte, retos y nuevas propuestas desde Venezuela. RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios. 2
- Sundar S., Agrawald G., Rai M., Makharra M. and Murray H. 2001. Treatment of indian visceral leishmaniasis with single or daily infusions of low dose liposomal anphotericin B: randomized trials. *Brit, Med. J.* **323**:419-422.
- Sutterwala S., Agrawald G., Rai M., Makharra M. and Murray H. 2001. De novo sphingolipid synthesis is essential for viability, but not for transport of

glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in african trypanosomes. *Eukaryot. Cell.* **6**: 454.

- Urbina J. A. 2006. Mechanism of action of lysophospholipid analogues against trypanosomatid parasites. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **100S**: S9-S16.
- Urbina J.A. and Docampo R. 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol.* **19**: 495-501.
- 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.A., Payares G., Sanoja C., Molina J., Lira R., Brener Z. and Romanha A. 2003. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long – acting triazol TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **21**: 39-48.
- Urbina J. 2006. Biología del *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania*: Potencial para la intervención quimioterapéutica. Conferencia presentada en el curso “Host-Parasite Interactions and Vector Biology, American Society for Microbiology – Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela
- Van Voorhis, W. C. 1990. Therapy and prophylaxis of systemic protozoan infections. *Drugs* **40**:176–202.
- Vercesi A. E., Docampo R. 1992. Ca^{2+} transport by digitonin – permeabilized *Leishmania donovania*. Effect of Ca^{2+} , pentamidine and WR-6036 on mitochondrial membrane potential *in situ*. *Biochem. J.* **284**: 463-467.
- Vercesi A. E., Docampo R. and Moreno S. N. 1992. Energization – dependent Ca^{2+} accumulations in *Trypanosoma brucei* bloodstream and procyclic trypomastigotes mitochondria. *Mol. Biochem. Parasitol.* **56**: 251-257.

- Vercesi A., Bernardes C., Hoffman M., Gadelha F., Docampo R. 1991. Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma brucei* mitochondria on situ and isolated rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* **268**: 8564-8568.
- Vercesi, A.E., Docampo R. 1996. Sodium-proton exchange stimulates Ca²⁺ release from acidocalcisomes of *Trypanosoma brucei*. *Biochem J.* **315**:265-270.
- Voorheis, H., Martin, B. 1981. Characteristics of the Calcium-Mediated Mechanism Activating Adenylate Cyclase in *Trypanosoma brucei*. *Eur. J. Biochem.* **116**: 471-477.
- Voorheis, H., Martin, B. 1982. Local Anaesthetics Including Benzyl Alcohol Activate the Adenylate Cyclase in *Trypanosoma brucei* by a Calcium-Dependent Mechanism. *Eur. J. Biochem.* **123**: 371-376.
- Zhang, K., Showalter, M., Revollo, J., Hsu, F., Turk, J., Beverley, S. (2003). Sphingolipids are essential for differentiation but not growth in Leishmania. *The EMBO Journal.* **22**: 6016-6026.
- Zilberstein W. y Lainson M. 1994. The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. *Ann, Rev. Microbiol.* **48**:449-470
- Zuckerman W. and Lainson M. 1997. Evolution, classification and geographical distribution of leishmaniasis in biology and medicine. *Biol. Epidemiol.* **1**: 22-48.
- Zeledón RA. Hemoflagellates. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8434/>

Referencias electrónicas:

- <http://www.slideshare.net/PabloToro/leishmaniasis-2> (Consulta: 21 de abril 2012).
- <http://www.slideshare.net/PabloToro/leishmaniasis-2> (Consulta: 21 de abril 2012).

- <http://www.kinetoplastids.com> (Consulta: 21 de abril 2012).
- http://2.bp.blogspot.com/_XIXZ8uF3eKA/TNvU-Kqd-PI/AAAAAAAAAw/f1vjmqNpiqU/s1600/mapa+leishmaniasis+mundial.bmp (Consulta: 21 de abril 2012).
- <http://www.fibrilacionauricularonline.es/default.aspx?idPage=4134> (Consulta: 21 de abril 2012).
- <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Indicators-for-Ca2-Mg2-Zn2-and-Other-Metal-Ions/Fluorescent-Ca2-Indicators-Excited-with-UV-Light.html> (Consulta: 21 de abril 2012).
- <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Technical-Notes-and-Product-Highlights/Loading-and-Calibration-of-Intracellular-Ion-Indicators.html> (Consulta: 21 de abril 2012).
- http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=3835&Itemid=4098&lang=en(Consulta: 21 de abril 2012).
- http://www.who.int/neglected_diseases/mediacentre/WHA_60.13_Esp.pdf (Consulta: 21 de abril 2012).
- <http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=39&n=1165&m=6&e=1220> (Consulta: 21 de abril 2012).
- <http://es.wikipedia.org/wiki/Phlebotomus> (Consulta: 12 de septiembre 2012).
- <http://es.wikipedia.org/wiki/Lutzomyia> (Consulta: 12 de septiembre 2012).
- <http://www.wynman.com/baylor.html> (Consulta: 12 de septiembre 2012).
- <http://leishmaniasisusmp.blogspot.com/2010/05/tipos-de-leishmaniasis.html> (Consulta: 12 de septiembre 2012).

- <http://www.invitrogen.com/search/global/searchAction.action?query=rhodamine+123&resultPage=1&resultsPerPage=15>. (Consulta: 12 de septiembre 2012)
- <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/M7512?ICID=search-m7512> (Consulta: 12 de septiembre, 2012).
- <http://products.invitrogen.com/ivgn/product/A1301> (Consulta: 12 de septiembre, 2012).

