



UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Efecto de la Dronedarona sobre *Trypanosoma cruzi* y
Trypanosoma evansi y determinación de su
mecanismo de acción

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
por la Bachiller Vanessa Sara
Hernández Rodríguez como
requisito parcial para optar al título
de Licenciado en Biología.

Tutor: Dr. Gustavo Benaim

CARACAS, VENEZUELA
MAYO- 2012

Dedicación:

A mi madre Jesusa Rodríguez, sin ella jamás lo hubiera logrado. Por ser excelente madre y excelente persona y ayudarme en cada momento importante de mi vida. Por ayudarme con mi hijo y entender lo valioso que fue la carrera para mí.

A mi hijo Oliver Alejandro Díaz, por existir. Por hacerme una mejor persona, por ser mi impulso para cumplir las metas planteadas, porque siempre entendió que a veces no hubo tiempo para jugar y para salir. Por ser el hijo que cualquier madre quisiera tener.

A mi novio, Alexander Milano, por ser ese hombre comprensible que necesité siempre. Por ser hombre donde recostarme en cada momento difícil, por entender que a veces el tiempo no es suficiente. Por ayudarme en mis trabajos y presentaciones, especialmente en esta TESIS.

A mi abuela Rosario, papá, mis hermanos, Adela y a toda mi familia, por estar siempre conmigo y acompañarme en todo este camino.

Los amo...

Agradecimientos:

A la Dra. Nereida Parra, por ser más que una compañera del laboratorio, por ayudarme en cada experimento de esta TESIS, por enseñarme el amor hacia este mundo de la parasitología. Por ser más que una compañera, una amiga, excelente madre y excelente persona. Eres ejemplo de vida.

A mi tutor Dr. Gustavo Benaim, por siempre estar dispuesto y por su pedagogía. Por cada enseñanza, por su paciencia y por ser como es.

A todos mis compañeros de laboratorio: Lourdes Plaza, Paola Casanova, Sheira Mujica, Semer Maksoud, Adriana Mayora, May-li Silva y Adriana Pimentel.

Al bioterio del Instituto de Estudios Avanzados (IDEA) (Javier, Herman, Irma, Dra Emilia y Rogelio).

A todos mis compañeros de carrera, especialmente a Jenny De Almeida.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen.....	1
1. Introducción	3
1.1. El ion Ca^{2+} en células eucariotas.....	3
1.1.1. Canales presentes en la membrana plasmática.....	4
1.1.2. La calmodulina, principal proteína de unión al Ca^{2+}	5
1.1.3. Organelos que almacenan Ca^{2+}	7
1.2. Tripanosomatidios.....	11
1.3. <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
1.3.1. Morfología de <i>T. cruzi</i>	13
1.3.2. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	14
1.4. <i>Trypanosoma evansi</i>	15
1.4.1. Morfología ciclo de vida de <i>T. evansi</i>	18
2. Antecedentes.....	20
2.1. El mal de Chagas.....	20
2.1.1. Quimioterapia contra el mal de Chagas.....	21
2.2. Tripanosomosis equina.....	23
2.2.1 Quimioterapia contra la tripanosomosis equina.....	25
2.3. El papel del Ca^{2+} en tripanosomatidios	26
3. Objetivo general	32
3.1. Objetivos específicos.....	32
4. Materiales y Métodos	34
4.1. Experimentos <i>in vitro</i>	34

4.1.1. Obtención y mantenimiento de parásitos	34
4.1.2. Experimentos mediante métodos fluorimétricos	35
4.1.3. Evaluación del efecto de la dronedarona sobre poblaciones de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	40
4.1.4. Evaluación del efecto de la dronedarona en células Vero infectadas con amastigotes de <i>T. cruzi</i>	41
4.2. Experimentos <i>in vivo</i>	43
4.3. Porcentaje de Hematocrito.....	44

5. Resultados

5.1. Resultados de <i>T. evansi</i>	46
5.1.1 Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre la $[Ca^{2+}]_i$ de <i>T. evansi</i>	46
5.1.2. Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial de <i>T. evansi</i>	50
5.1.3. Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre los acidocalcisomas de <i>T. evansi</i>	52
5.1.4. Efecto de la dronedarona como posible agente quimioterapéutico de la tripanosomosis equina.....	54
5.1.5. Efecto de la dronedarona sobre el porcentaje de hematocrito de ratas infectadas con <i>T. evansi</i>	55
5.2. Resultados de <i>T. cruzi</i>	58
5.2.1. Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre la población de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	58
5.2.2. Efecto de la dronedarona sobre poblaciones de amastigotes de <i>T. cruzi</i>	59
5.2.3. Efecto de la dronedarona sobre la $[Ca^{2+}]_i$ de <i>T. cruzi</i>	60

5.2.4. Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial de <i>T. cruzi</i>	62
5.2.5. Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre los acidocalcisomas de <i>T. cruzi</i> ...	64
6. Discusión.....	67
7. Conclusiones.....	73
8. Bibliografía.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos reguladores de Ca^{2+} en Tripanosomatidios.....	8
Figura 2. Representacion esquemática de un acidocalcisoma.....	11
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	15
Figura 4. Tabanus sp.	18
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma evansi</i>	19
Figura 6. Distribución mundial de la enfermedad de la enfermedad de Chagas.	21
Figura 7. Trypanosomas en frotis de sangre de un hombre infectado	24
Figura 8. Respuesta de Ca^{2+} inducida por la interaccion de <i>T. cruzi</i> con células HeLa.....	27
Figura 9. Efecto de la amiodarona en la homeostasis de Ca^{2+} intracelular en amastigotes de <i>T. cruzi</i>	29
Figura 10. Efecto de la amiodarona a diferentes concentraciones en poblaciones de amastigotes y epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	30
Figura 11. Estructura molecular de la dronedarona y la amiodarona.....	31
Figura 12. Representación esquemática de la incorporación del FURA 2 a la células.....	37
Figura 13. Espectro de excitación y emisión del FURA 2	38
Figura 14. Representación esquemática del sistema de detección del Ca^{2+} mediante dos longitudes de onda de excitación.. ..	39
Figura 15. Efecto de la dronedarona sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de <i>T. evansi</i>	47
Figura 16. Efecto de la amiodarona sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de <i>T. evansi</i>	49
Figura 17. Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre el potencial electroquimico mitocondrial de <i>T. evansi</i>	51
Figura 18. Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre los acidocalcisosmas de <i>T. evansi</i>	53

Figura 19. Porcentaje de sobrevivencia de ratas infectadas con <i>T. evansi</i>	55
Figura 20. Porcentaje de hematocrito de ratas infectadas con <i>T. evansi</i>	56
Figura 21. Análisis de varianza del número de hematocrito de ratas infectadas.....	57
Figura 22. Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre la viabilidad de poblaciones de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	58
Figura 23. Efecto de la dronedarona sobre el porcentaje de infección de células Vero con amastigotes de <i>T. cruzi</i>	59
Figura 24. Efecto de la dronedarona sobre la $[Ca^{2+}]_i$ de <i>T. cruzi</i>	61
Figura 25. Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial de <i>T. cruzi</i>	63
Figura 26. Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre los acidocalcisomas de <i>T. cruzi</i>	65
Figura 27. Efecto de la dronedarona y la nigericina sobre la $[Ca^{2+}]$ de <i>T. cruzi</i>	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ca ²⁺ ATPasas reportadas en parásitos protozoarios.....	4
Tabla 2. Proteínas enlazadoras de Ca ²⁺ en parásitos protozoarios.....	7
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>T. cruzi</i>	13
Tabla 4. Clasificación taxonómica de <i>T. evansi</i>	17
Tabla 5. Drogas usadas para el tratamiento de tripanosomosis animal.....	26
Tabla 6. Condiciones de inoculación en ratas Sprague-Dawley.....	43
Tabla 7. Análisis de varianza de dos vías para el número de hematocrito.....	57

RESUMEN

La sexta parte de la población mundial está afectada por enfermedades tropicales, de las cuales las enfermedades parasitarias ocupan un lugar principal. El desarrollo de nuevas terapias en este campo ha sido lento, en parte debido a que muchas de las enfermedades parasitarias tienen su mayor incidencia en los países más pobres y, por lo tanto, el desarrollo de nuevos productos, tanto para el diagnóstico como en el tratamiento, que implican importantes inversiones, no se ha dado hasta el presente. Entre estos parásitos se encuentran los tripanosomatidios, tales como *Trypanosoma cruzi* causante de la enfermedad del Chagas.

Por otra parte la tripanosomosis equina, causada por *T. evansi*, es de gran importancia veterinaria y presenta una distribución mundial. En Venezuela esta tripanosomosis está distribuida de forma endémica y estudios realizados en la sabana venezolana indican una seroprevalencia de 80% de tripanosomosis equina en caballos de trabajo ganadero.

Los tripanosomatidios poseen una variedad de mecanismos que regulan la entrada y la salida de Ca^{2+} a estas células. Existen drogas capaces de alterar la regulación de Ca^{2+} intracelular, como la amiodarona, la cual se ha demostrado en nuestro laboratorio, que produce la disrupción de la concentración citoplasmática de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) tanto en *T. cruzi* como en *L. mexicana*, causando la muerte de estos. La dronedarona es un derivado del benzofurano que ha sido desarrollada para superar la limitación de yodo asociado a efectos adversos de la amiodarona. Nos planteamos como objetivo general de este trabajo especial de grado conocer y determinar el efecto de la dronedarona en la viabilidad de *T. cruzi* y *T. evansi* *in vivo* e *in vitro*, así como establecer su mecanismo de acción. La dronedarona ejerció un efecto sobre ambos parásitos, incrementando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, mediante la liberación de este ión desde la mitocondria y los acidocalcisomas, consecuencia de la alteración del potencial electroquímico mitocondrial y la alcalinización de los acidocalcisomas. La

dronedarona también ejerce un efecto inhibitorio en el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*. Más relevante es el efecto tripanocida ejercido sobre células de mamífero (Vero) infectadas con amastigotes de *T. cruzi*, ya que esta es la fase clínicamente relevante. En este sentido, la dronedarona promete ser un tratamiento eficaz contra el “mal de Chagas”.

Por otra parte, la dronedarona no fue efectiva como agente quimioterapéutico en ratas infectadas con *T. evansi*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El ion Ca^{2+} en células eucariotas

La concentración citosólica de Ca^{2+} de las células en reposo es de 20-50 nM, alcanzando valores cerca de un 1 μM cuando la célula es estimulada por una variedad de estímulos fisiológicos, mientras que en el medio extracelular la concentración es de aproximadamente 1mM (cuatro órdenes de magnitud mayor). Este elevado gradiente de concentración de Ca^{2+} le permite “trabajar” como un útil segundo mensajero (Benaim y col., 2002). En eucariotas el Ca^{2+} interviene en muchas funciones celulares como son, división y diferenciación celular, secreción, movilidad, metabolismo energético y en último término, la puesta en marcha del proceso de muerte celular programada o apoptosis.

Los canales de Ca^{2+} permiten el paso de este ión a favor de su gradiente electroquímico como respuesta a una despolarización de la membrana. Esta entrada de Ca^{2+} trae como consecuencia la acumulación de este catión en el interior celular. En general, en la célula, la bomba de calcio de la membrana plasmática (Ca^{2+} -ATPasa, o PMCA, de sus siglas en inglés) y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ son los sistemas responsables de mantener a largo plazo el gradiente electroquímico de Ca^{2+} (Latorre, 1996). La PMCA se encuentra en todas las células eucariotas estudiadas hasta el presente, mientras que el intercambiador es más típico de células excitables. En este sentido, la PMCA ha sido identificada en diferentes tripanosomatidios (Tabla1) (Benaim, 1993; Moreno y Docampo, 2003) mientras que el intercambiador parece no estar presente (Benaim y col., 1993).

Tabla 1 - Ca²⁺ATPasas reportadas en parásitos protozoarios (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			

1.1.1. Canales de Ca²⁺ en la membrana plasmática

Los canales de Ca²⁺ presentes en la membrana plasmática se pueden dividir en 3, los canales dependientes de voltaje, los canales dependientes de ligandos y los dependientes del vaciado de reservorios (SOCC). Estos funcionan como vía principal de entrada del Ca²⁺ en la célula. Los canales dependientes de voltaje o VGCC, permiten el flujo selectivo de iones Ca²⁺ a través del poro del canal, iniciándose una variedad de procesos intracelulares entre los que se incluyen la contracción muscular, la secreción de neurotransmisores, la expresión génica, la modulación de la excitabilidad de la membrana, el crecimiento de neuritas, etc. Los canales dependientes del vaciado de reservorio (SOCC) se activan por el agotamiento de Ca²⁺ del retículo endoplasmático. Estos juegan un papel central en la homeostasis del Ca²⁺ intracelular. De esta forma, los canales de Ca²⁺

constituyen el enlace fundamental entre las señales eléctricas de la superficie de la membrana y las respuestas bioquímicas intracelulares (Gerald, 2005).

La mayoría de los canales catiónicos controlados por ligandos que son activados por neurotransmisores excitadores, son relativamente poco selectivos y permiten el flujo de Ca^{2+} y otros iones. El más importante es el receptor de glutamato del tipo N-metil-D-aspartato que es especialmente permeable al Ca^{2+} . La activación de este receptor puede influir fácilmente una entrada de Ca^{2+} tan cuantiosa que la célula llega a morir, principalmente por la activación de proteasas dependientes de Ca^{2+} , también por apoptosis. Los canales de Ca^{2+} ligando-dependientes incluyen los receptores de glutamato y el receptor nicotínico, entre otros. Estos canales sensibles a ligandos, se pueden agrupar a su vez en dos tipos, los canales acoplados a receptores y los canales de Ca^{2+} activados por segundos mensajeros.

Existe evidencia de un receptor L-glutamato, específico para N-metil-D-aspartato en *T. cruzi* (Paveto y col., 1995). Estos receptores modulan la toma de Ca^{2+} en células neuronales. Eintracht y col. (1998) reportan que la toma de Ca^{2+} en tripomastigotes sanguíneos de *T. brucei* es regulada por una nueva vía de señalización que involucra una fosfolipasa A_2 , generación de ácido araquidónico y estimulación de los canales de Ca^{2+} presentes en la membrana plasmática. Portillo y col. (2010), reportan la existencia de un receptor nicotínico de acetilcolina en *T. evansi*, que es capaz de unirse a ligandos nicotínicos e inducir señales de Ca^{2+} .

1.1.2. La calmodulina, principal proteína de unión al Ca^{2+} .

La apertura de canales de Ca^{2+} en respuesta a estímulos externos, permite que este catión sea liberado al citosol desde los diferentes reservorios intracelulares, siendo el siguiente paso la unión del Ca^{2+} a proteínas específicas como la calmodulina (CaM), la cual sufre cambios conformacionales que le permite interactuar con distintas proteínas blanco. Entre ellas podemos citar, la adenilato ciclasa, la óxido nítrico sintetasa, proteínas del

citoesqueleto, proteínas transportadoras de Ca^{2+} y algunas protein quinasas (Carafoli, 1987; Curtis y col., 2008).

La CaM es una proteína bien estudiada, posee 148 aminoácidos. Está formada por una única cadena polipeptídica y presenta un dominio globular N-terminal y un dominio globular C-terminal unidos entre sí por un α -hélice. Cada uno de estos dominios presenta dos lugares de unión al Ca^{2+} y están formados por una conformación de 12 residuos, rodeados por dos hélices que pueden adoptar una amplia distribución de la apertura de los ángulos. La CaM es una de las proteínas reguladoras de Ca^{2+} más abundante; en *L. braziliensis* su concentración es alrededor de 20 μM , (Benaim, 1996) lo que le confiere una capacidad amortiguadora de Ca^{2+} de 80 μM , ya que cada molécula de CaM puede unirse con alta afinidad a 4 átomos de Ca^{2+} . *T. brucei* contiene tres genes que codifican para CaM, (Tschudi y col., 1985), mientras que *T. cruzi* posee ocho genes que codifican para esta proteína (Chung y Swindle, 1990). La CaM y otras proteínas de unión se han encontrado en todos los parásitos protozoarios investigados (Moreno y Docampo, 2003).

Tabla 2 - Proteínas enlazadoras de Ca²⁺ en parásitos protozoarios (Moreno y Docampo, 2003).

Ca ²⁺ -binding proteins in parasitic protozoa.			
Protozoa	Name	Accession number	Expected or demonstrated function
<i>Trypanosoma cruzi</i>	CaM*	M98551	Cell signaling
	FcaBP	D87512	Unknown
	Calreticulin	AF107115	Ca ²⁺ -store/quality control of glycoprotein folding/potent immunogen
<i>Leishmania major</i>	CaM	AL445944	Cell signaling
<i>Leishmania donovani</i>	Calreticulin	U49191	Ca ²⁺ store
<i>Trypanosoma brucei</i>	CaM	X56511	Cell signaling
	Calflagin	U06644	Unknown
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	CaM	K02944	Cell signaling
<i>Plasmodium falciparum</i>	CaM	AE014850	Cell signaling
<i>Toxoplasma gondii</i>	CaM	Y08373	Cell signaling
<i>Cryptosporidium parvum</i>	CaM	AQ842812 [†]	Cell signaling
<i>Entamoeba histolytica</i>	EhCaBP	M84155	Unknown/cytosolic
	Grainin 1	AF085196	Unknown/in granules
	Grainin 2	AF082530	Unknown/in granules
<i>Giardia lamblia</i>	CaM	AF359239	Cell signaling
<i>Trichomonas vaginalis</i>	CaM	U38786	Cell signaling

*CaM, calmodulin.
[†]Partial sequence.

1.1.3. Organelos intracelulares que almacenan Ca²⁺.

Con el fin de cumplir su función como un segundo mensajero, el Ca²⁺ intracelular debe ser finamente regulado. En efecto, esto es garantizado por la presencia de diferentes mecanismos de transporte, algunos de ellos ubicados en los organelos intracelulares y otros en la membrana plasmática (Benaim y Cervino, 2000).

Los tripanosomas poseen una red de señalización dependiente de Ca²⁺ que incluye mecanismos para el aumento de Ca²⁺ citosólico, así como también de mecanismos para regresar esta a su concentración basal. Las principales fuentes de Ca²⁺ en tripanosomatidios son el medio extracelular y ciertos organelos celulares, tales como, el retículo endoplasmático, la mitocondria y los acidocalcisomas (Figura 1).

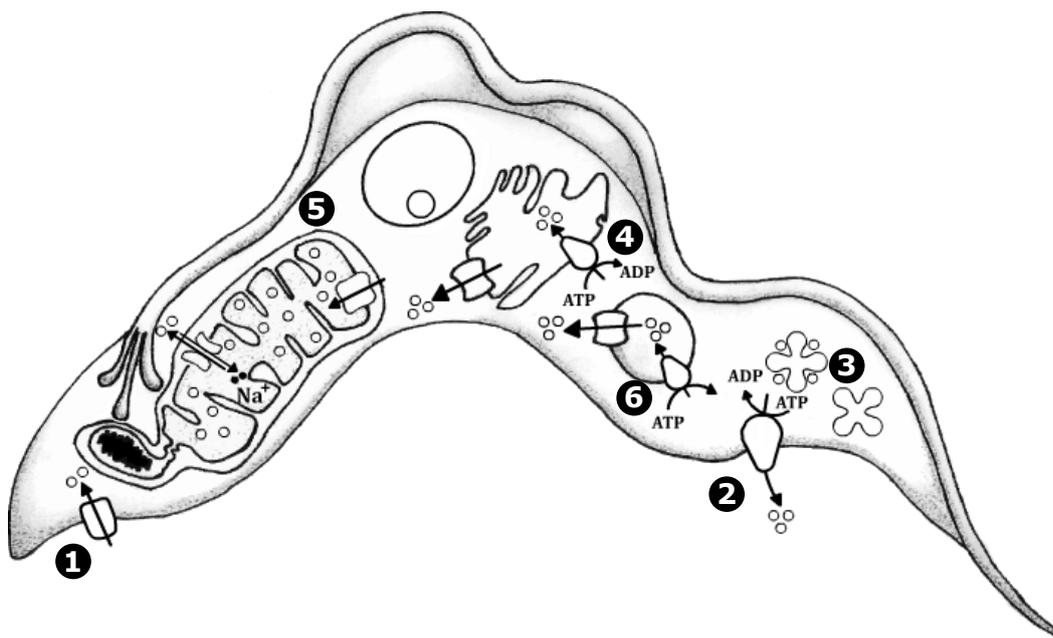


Figura 1. Mecanismos reguladores de Ca²⁺ en Tripanosomatidios. 1. Canal de Ca²⁺ no identificado (membrana plasmática), 2. PMCA (membrana plasmática), 3. Calmodulina, 4. SERCA (Retículo sarcoendoplasmático), 5. Uniporte de Ca²⁺ mitocondrial (mitocondria), 6. PMCA (acidocalcisomas) (Benaim y García, 2011).

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 (SERCA), que activamente ingresa dos iones Ca²⁺ con la hidrólisis de una molécula de ATP, disminuyendo así la concentración de Ca²⁺ citosólico (Jiménez, 2003; Lodish, 2005). En la membrana del retículo se pueden encontrar dos tipos fundamentales de receptores implicados en la liberación del Ca²⁺, los receptores de IP₃ y los receptores de rianodina. Docampo y Piganrato (1991) detectaron la presencia de fosfatidilinositol, fosfatidilinositol 4-fosfato y fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, y sus derivados, inositol fosfato, inositol 1,4-bifosfato e inositol 1,4,5-trifosfato respectivamente en epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Se ha sobre-expresado y caracterizado un gen que codifica para una Ca²⁺-ATPasa de retículo

endoplasmático en *T. brucei* (Nolan y col., 1994) y se ha reportado que la SERCA es inhibida por tapsigargina (inhibidor específico de esta Ca^{2+} -ATPasa) tanto en *T. brucei*, (Rubén y col., 1992) como en *T. evansi* (Mendoza y col., 2004). Sin embargo, Vercesi y col. (1993) reportan que hay una carencia de inhibición de la tapsigargina en *T. cruzi*. Lo que implica diferencias en estas bombas en estos tres parásitos respecto a su inhibidor específico. En este sentido distintas SERCAs han sido descritas en diferentes parásitos protozoarios (Tabla1), (Moreno y Docampo, 2003).

Otros de los organelos que almacenan Ca^{2+} son las mitocondrias. La membrana interna de la mitocondria posee sistemas de transporte de Ca^{2+} que permite el movimiento de este ión a través de esta, estableciendo un ciclo entre el Ca^{2+} citoplasmático y el intramitocondrial. El ciclo comprende un uniporte electroforético de Ca^{2+} que permite la entrada de Ca^{2+} utilizando la energía del gradiente electroquímico de protones y un sistema de contrartransporte $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ capaz de promover la salida electroneutra de iones Ca^{2+} , el cual constituye el mecanismo más importante de salida de este catión. Docampo y col. (1989), demostraron evidencia bioquímica de la existencia de transportadores de Ca^{2+} que ingresan y expulsan este catión en *T. cruzi* usando acuorinas recombinantes. Xiong y col. (1998) demostraron que la mitocondria de *T. brucei* secuestra grandes cantidades de Ca^{2+} . El transporte mitocondrial ha sido descrito en promastigotes de *L. braziliensis*, sugiriendo 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). El transporte de Ca^{2+} puede ser estimulado por fosfato inorgánico y por sustratos respiratorios tales como succinato, e inhibido por bloqueadores del transporte de electrones como antimicina A (Benaim y col., 1990; Vercesi y Docampo, 1992).

Los acidocalcisomas son organelos ácidos que acumulan gran cantidad de Ca^{2+} . La mayor cantidad de Ca^{2+} de los tripanosomatidios se encuentran en estos organelos (Docampo, 2008). En la membrana interna de este organelo ha sido descrita una Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática y se ha postulado que un intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ está

involucrado en la salida de Ca^{2+} . En los acidocalcisomas de estos parásitos se ha demostrado la presencia de una H^+ -ATPasa vacuolar, así como de un intercambiador Na^+/H^+ (Docampo, 2003). Se ha demostrado además que existe una H^+ -PPAasa en el complejo de golgi y en la membrana plasmática de *T. cruzi* (Marinez y col., 2002). A los acidocalcisomas se le han atribuido distintas funciones, fundamentalmente como depósito de cationes y fosfatos (entre estos el pirofosfato, PPI, moneda energética alternativa al ATP, presente en grandes cantidades en estos parásitos). También se han involucrado en la homeóstasis de Ca^{2+} , el mantenimiento del pH intracelular y la regulación osmótica. Así pues, se ha propuesto que el poli-P en los acidocalcisomas tiene un papel como dador de energía en varias reacciones, formando ATP a partir del fosfato terminal del poli-P, utilizando ADP. La concentración de estos compuestos disminuye rápidamente cuando las células son expuestas a estrés hipo-osmótico, mientras que la concentración aumenta cuando son sometidas a estrés hiper-osmótico, lo que indica un papel del fosfato como regulador en la adaptación de los parásitos al estrés ambiental (Ruiz y col., 2002).

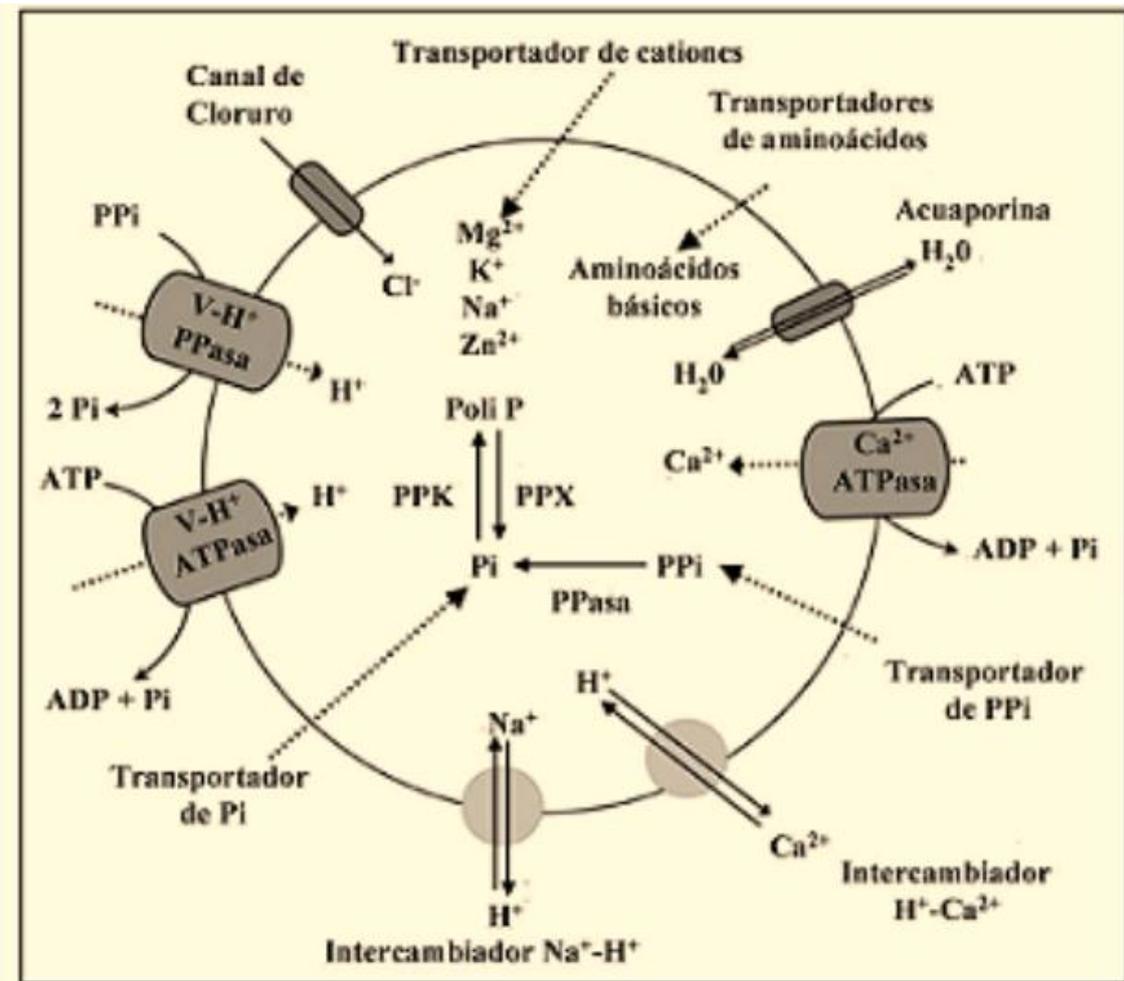


Figura 2. Representación esquemática de un acidocalcisoma. Un gradiente de protones es establecido por una ATPasa vacuolar ($V\text{-H}^+\text{-ATPasa}$) y una pirofosfatasa vacuolar ($V\text{-H}^+\text{-PPasa}$). El transporte de Ca^{2+} es realizado por una $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPasa}$. Otros transportadores incluyen intercambiadores Na^+/H^+ y $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, un canal de Cl^- y un canal de agua o acuaporina. Es posible la existencia de otros transportadores como los de aminoácidos básicos, Pi , PPI y otros cationes. La matriz es rica en PPI , poli P y en enzimas involucradas en su metabolismo [poli P quinasa (PPK), exopolifosfatasa (PPX) y pirofosfatasa (PPasa)]. No todas las enzimas y transportadores están necesariamente presentes en todos los acidocalcisomas.

1.2. Tripanosomatidios

Los Kinetoplastidas son protozoos flagelados, pertenecientes al orden Kinetoplastida que se distinguen por su morfología, que incluye la presencia de una red de ADN extranuclear, la cual constituye el ADN mitocondrial del parásito, denominado quinetoplasto.

En los parásitos de interés sanitario su ciclo evolutivo, digenético, se realiza entre un organismo vertebrado (hombre y mamíferos, los cuales constituyen los reservorios) y un insecto (Ortega y col., 2004).

De los Kinetoplastidas más importantes a nivel sanitario se encuentra la familia Trypanosomatidae que se caracterizan por poseer un único flagelo, que puede estar formando el borde de una membrana ondulante o ser libre en toda su longitud. Dentro del gran polimorfismo que presentan en sus distintos hospedadores, existen rasgos estructurales que son comunes a todos, sea el que sea el tipo de hospedador en el que desarrollan y el tipo o tipos morfológicos bajo el que evolucionan en estos hospedadores (Berenguer, 2006).

La familia trypanosomatidae incluye 8 géneros, entre ellos, Trypanosoma y Leishmania, los cuales son digenéticos e infectan a insectos invertebrados y animales vertebrados. Los tripanosomas de mamíferos se dividen en dos secciones; la sección Estercoraria y la Salivaria (Hoare, 1972). De acuerdo con el desarrollo de la infección en el vector, los tripanosomas que completan su ciclo de vida en las glándulas salivales pertenecen a la sección Salivaria, mientras que los tripanosomas que migran al extremo final del intestino del vector se incluyen dentro de la sección Estercoraria (Bula, 2007).

1.3. *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un protozooario perteneciente a la familia Trypanosomatidae (Tabla 3). Produce la tripanosomiasis americana o también conocida como mal de Chagas. Esta tripanosomiasis es un enorme problema de salud pública en todo el subcontinente sudamericano, donde millones de personas sufren de esta enfermedad, otros quedan con problemas invalidantes de por vida, y otros llegan a morir por este padecimiento (Romero, 2007).

Tabla 3-Clasificación taxonómica de *T. cruzi*.

Reino	Protista
Subreino	Protozoo
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophora
Orden	Kinetoplastida
Familia	Trypanosomatidae
Sección	Stercoraria
Genero	Trypanosoma
Especie	cruzi

Tomado de: <http://www.slideshare.net/educador23013/protozoariosengeneral>
<http://212.128.130.23/eduCommons/ciencias-biosanitarias/introduccion-a-la-protozoologia-clinica-i/contenidos/Unidad%206%20Flagelados.pdf><http://www.slideshare.net/guest8c17bc/flagelados>(Consulta: 01 de Octubre de 2011)

1.3.1. Morfología de *Trypanosoma cruzi*

Dentro de los hospedadores vertebrados e invertebrados en el *T. cruzi* tienen lugar cambios morfológicos, así como cambios en la estructura de la mitocondria, que están relacionadas con el cambio de hábitat en sus hospedadores y asociadas con las variaciones pleomórficas que sufre el parásito, paralelamente a la variación de los procesos metabólicos de tipo glicolítico a partir de los cuales obtienen la energía necesaria para su desarrollo y restantes funciones vitales (Berenguer, 2006).

Tiene tres estadios de desarrollo. El amastigote, que presenta una estructura más o menos esférica, de 2 a 3 micras de diámetro, tiene un núcleo y un quinetoplasto del cual se formará el flagelo, que está secuestrado en una bolsa. El epimastigote mide aproximadamente entre 16 a 20 μm de longitud; es fusiforme, el núcleo está en el centro, y el quinetoplasto queda contiguo y anterior al núcleo; de ahí se forma el flagelo y queda una parte en la porción anterior, empezando a aparecer otra estructura pequeña denominada

membrana ondulante. El tripomastigote presenta una estructura más alargada aún, con el extremo anterior adelgazado y con el extremo posterior engrosado, el quinetoplasto no se encuentra en el centro, sino en el extremo posterior, desde allí nace el flagelo que queda libre en la porción anterior, y una membrana ondulante que recorre toda la longitud del parásito (Olsen, 1986; Botero y Restrepo, 2006; Berenguer, 2006).

1.3.2. Ciclo de vida de *T. cruzi*

El ciclo de vida de *T. cruzi* se desarrolla en organismos diferentes (insecto vector y mamífero hospedero), (Figura 3) presentando en cada uno de ellos, una fase con dos estadios. En el vector se encuentran los epimastigotes y los tripomastigotes metacíclicos y en el hospedero mamífero se encuentran los amastigotes y los tripomastigotes sanguíneos. Los tripomastigotes sanguíneos son ingeridos por el vector al alimentarse de los mamíferos infectados, transformándose en formas cortas en el estómago del insecto, de donde migran hacia el intestino medio, donde continúan desarrollándose al encontrar un ambiente adecuado para transformarse en epimastigotes. Estos llegan a la porción posterior del intestino del vector donde evolucionan a tripomastigotes metacíclicos, forma que penetra e infecta al hospedero mamífero (Olsen, 1986; Botero y Restrepo 2006; Berenguer, 2006).

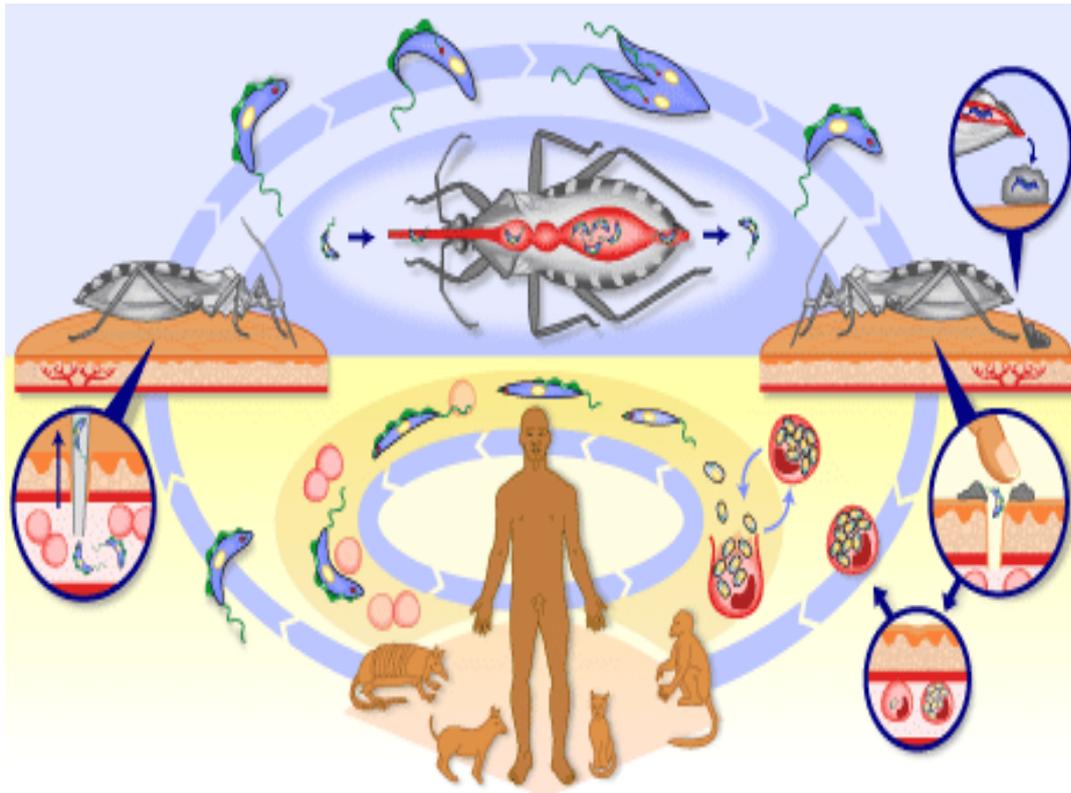


Figura 3. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Tomado de: <http://www.slideshare.net/guest8c17bc/flagelados> (Consulta: 25 de septiembre)

1.4. *Trypanosoma evansi*

El *Trypanosoma evansi* es un protozoo hemoflagelado, perteneciente a la familia Trypanosomatidae, (Tabla 4) identificado por primera vez como patógeno para los mamíferos por Evans Griffiths en 1880 en la India. En Latinoamérica se le conoce con otros nombres, como, *T. equinum* y *T. venezuelense*. Estudios taxonómicos y epidemiológicos conducidos en el siglo XX determinaron que *T. evansi* es un hemoparásito con amplia distribución mundial. Así, ha sido señalado en países del norte de África, del Medio Oriente, Asia, países europeos mediterráneos, en Centro y Sur América (Luckins, 1988). *T. evansi* no ha infectado a rebaños del continente australiano, gracias a las estrictas medidas de control y de vigilancia epidemiológica establecidas por el sector oficial de Australia, donde

consideran a este tripanosoma como una de las graves amenazas para la industria ganadera y para la fauna silvestre (Thompson y col., 2003). En Venezuela Rafael Rangel fue quien a fines de 1904 lo diagnosticó por primera vez en caballos que padecían un grave brote de tripanosomosis equina en la región El Rastro, cerca de Calabozo, estado Guárico (Roche,1978). En 1910, y usando los frotis que había preparado Rangel, el investigador francés F. Mesnil lo denominó *Trypanosoma venezuelense*, pero como lo aclara Roche (1978), no era una especie nueva de tripanosoma la que había diagnosticado Rangel en Guárico, sino al *T. evansi*, especie de hemoparásito que aun hoy 100 años después de su hallazgo por Rangel, persiste en los llanos venezolanos (Canelón y Meléndez, 2003).

Los tripomastigotes de *T. evansi* son microscópica y morfológicamente muy similares a los tripomastigotes de *Trypanosoma brucei*, un hemoparásito de bovinos y otros ruminantes, domésticos o silvestres, de la región Subsahariana de África. Sin embargo, *T. evansi* se diferencia de *T. brucei* en su biología, puesto que no puede completar un desarrollo cíclico en moscas tse-tsé, sino que *T. evansi* ha evolucionado o se ha adaptado a ser transmitido mecánicamente por otras moscas hematófagas (Tabanus, Stomoxys o Hematobia) o por murciélagos hematofogos (*Desmodus rotundus*) (Hoare, 1965; Canelón y Meléndez, 2003).

Estas características de la transmisión de *T. evansi*, indujeron a Hoare (1972) a postular que *T. evansi* evolucionó a partir de *T. brucei*, al adaptarse el primero a un modo de transmisión mecánico, perdiendo su carácter pleomorfo; es decir, *T. evansi* es un descendiente de un antiguo *T. brucei*. Esto ocurrió, según Hoare (1972), cuando caravanas de camellos del norte de África o del desierto del Sahara viajaban hacia el sur, hasta regiones subsaharianas, donde había mosca tse-tsé, las cuales infectaron a los camellos con *T. brucei*; pero al regresar los camellos con las caravanas a sus regiones del norte de África, donde no habían moscas tse-tsé, *T. brucei* fue transmitido mecánicamente por otras moscas hematófagas, adaptándose a la forma rápida y mecánica de transmisión. A partir de esas regiones del norte de África, los camellos diseminaron al nuevo tripanosoma, conocido

actualmente como *T. evansi*, hacia el Medio Oriente (Luckins, 1988; Canelón y Meléndez, 2003).

Tabla 4-Clasificación taxonómica de *T. evansi*

Reino	Protista
Subreino	Protozoo
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophora
Orden	Kinetoplastida
Familia	Trypanosomatidae
Sección	Salivaria
Genero	Trypanosoma
Especie	evansi

Tomado de: <http://www.slideshare.net/educador23013/protozoariosengeneral>
<http://212.128.130.23/eduCommons/ciencias-biosanitarias/introduccion-a-la-protozoologia-clinica-i/contenidos/Unidad%206%20Flagelados.pdf>
<http://www.slideshare.net/guest8c17bc/flagelados> (Consulta: 01 de Octubre de 2011)

La tripanosomosis causada por el *T. evansi* es la tripanosomosis patógena animal con una distribución geográfica más amplia y afecta al ganado doméstico de África, Asia, América central y Sudamérica. Se le conoce con el nombre de “mal de caderas”. En Venezuela a este tipo de tripanosomosis se le conoce como “derrengadera”. La especie hospedadora principal varía según el área geográfica, pero en particular el búfalo, el ganado vacuno, los camellos y los caballos resultan ser los más afectados, aunque también hay otros animales susceptibles. Es transmitido por la picadura de moscas hematófagas aunque en Sur y Centroamérica *T. evansi* puede ser transmitido por murciélagos hematofagos, que sirven además como reservorio y como vector (Hoare, 1972). En animales susceptibles a la enfermedad se manifiesta por fiebre, vinculada directamente a la parasitemia, junto con una

anemia progresiva, pérdida de la condición normal y decaimiento. Durante el curso de la enfermedad ocurren episodios recurrentes de fiebre y parasitemia. A menudo se observa edema, particularmente en las partes inferiores del cuerpo, como placas de urticarias y hemorragias. En Asia se han descrito abortos en los búfalos y existen indicios que la enfermedad provoca inmunodeficiencia (Arias y col., 1997; Canelón y Meléndez, 2003; Ramírez y col., 2011). La enfermedad comienza con un período de prepatencia, seguido de la fase aguda y la fase crónica. En la fase aguda de la enfermedad se producen altas parasitemias que son detectadas por métodos parasitológicos directos, mientras que en la fase crónica estos pierden sensibilidad debido a la baja parasitemia presente. En esta fase, son más sensibles y precisos los métodos serológicos, basados en la detección de anticuerpos específicos, sin embargo estos no diferencian entre infecciones activas y tratadas y no identifican al patógeno (González y col., 2006).



Figura 4. *Tabanus* sp. Tomado de: <http://www.unmsm.edu.pe/clemyp/Moscas/Imagenes/tabanussp.jpg>[http://www.influenzialpoints.com/Gallery/Horseflies Clegs and Deerflies.htm](http://www.influenzialpoints.com/Gallery/Horseflies_Clegs_and_Deerflies.htm)(Consulta: 01 de octubre 2011)

1.4.1. Morfología y ciclo de vida de *T. evansi*

La morfología de la forma sanguínea de *T. evansi* es similar a las formas sanguíneas de *T. brucei*, se trata de un tripanosoma de tamaño medio (20 a 30 μm de longitud, con un promedio: 24 μm). Su polimorfismo, sin embargo, es muy limitado y la mayoría de los

autores han descrito a *T. evansi* como un parásito monomórfico (formas delgadas). La parte libre de su flagelo es corta, de 3 a 5 micras, la membrana ondulante está muy bien desarrollada, sus movimientos son vivaces, pero en realidad abarca muy poca distancia. Cuando el quinetoplasto está presente, es pequeño (0,6 micras), se encuentra lejos del extremo posterior, y muy puntiagudo en las formas delgadas características (Desquesnes, 2004, Maudlin y col., 2004; Bowman, 2004).

El *T. evansi* no presenta cambios en su morfología en las moscas vectoras, las cuales actúan únicamente como vectores mecánicos; lo mismo el murciélago hematófago *Desmodus rotundus* en centro y Sudamérica (Figura 5). El parásito se reproduce por fisión binaria longitudinal (Romero, 2005).

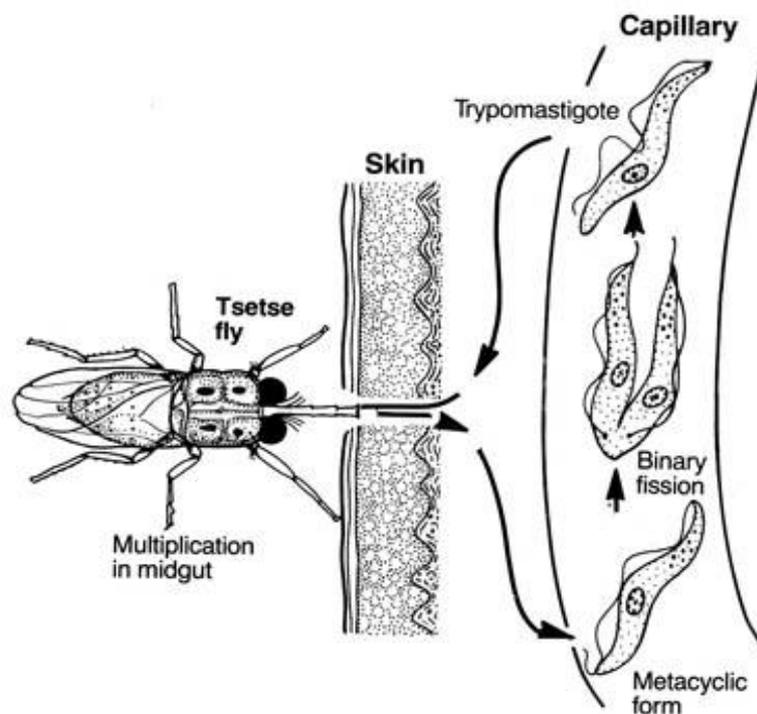


Figura 5. Ciclo de vida de *Trypanosoma evansi*. Tomado de: <http://www.vet.uga.edu/VPP/clerk/womack/index.php> (consulta: 01 de agosto de 2011).

2. ANTECEDENTES

La sexta parte de la población mundial está afectada por enfermedades tropicales, de las cuales las enfermedades parasitarias ocupan un lugar principal. El desarrollo de nuevas terapias ha avanzado poco, esto tiene que ver en parte con que muchas de las enfermedades parasitarias tienen su mayor incidencia en países más pobres y, por tanto, el desarrollo en el diagnóstico y nuevos tratamientos, que implican importantes inversiones, no se ha dado. Esta realidad es particularmente importante en América Latina, donde la incidencia de enfermedades tropicales tiene un alto impacto en términos sanitarios. Actualmente no hay vacunas disponibles para el tratamiento contra estas afecciones, y solo se dispone de unos pocos fármacos para combatirlas, los cuales son muy poco efectivos y altamente tóxicos. Además, muchos de los fármacos tienen mucho tiempo usándose y han generado cepas resistentes (FLAP, 2009).

2.1. El mal de Chagas.

Según la Organización Mundial de la Salud, la enfermedad de Chagas se encuentra principalmente en América Latina, pero en las últimas décadas se ha observado su aparición en los Estados Unidos de América, Canadá, muchos países europeos y algunos del Pacífico Occidental. Esto obedece sobre todo a la movilidad de la población entre América Latina y el resto del mundo. También puede ocurrir infección a través de transfusiones sanguíneas, transmisión vertical (transmisión a través de la placenta) o donación de órganos. A nivel mundial, se calcula que unas 10 millones de personas están infectadas, principalmente en América Latina, donde la enfermedad de Chagas es endémica. Más de 25 millones de personas están a riesgo de adquirir la enfermedad. Se calcula que en 2008 esta enfermedad mató a más de 10. 000 personas.



Figura 6. Distribución mundial de la enfermedad del Chagas. Tomado de: <http://parasitologiamicro.blogspot.com/2008/10/distribucin-geografica.html> (Consulta: 01 de octubre de 2011)

2.1.1. Quimioterapia contra el mal de Chagas.

En el caso de la enfermedad de Chagas existen fármacos para tratar esta enfermedad que tienen más de 40 años usándose, como el nifurtimox, el cual actúa por vía de la reducción del grupo “nitro” de la molécula a radicales nitroanionicos. Estos reaccionan con el oxígeno molecular generando metabolitos altamente tóxicos. Por otra parte, el benznidazol presenta un mecanismo de acción similar al nifurtimox. Estos fármacos son eficaces en un 80% de la enfermedad en fase aguda. Sin embargo, su efectividad en las etapas crónicas avanzadas es bastante limitada y conlleva numerosos efectos adversos (Urbina, 2005).

Entre los nuevos enfoques para el tratamiento contra el mal de Chagas se tienen:

- Los inhibidores específicos de la síntesis de ergosterol, necesarios para mantener la viabilidad del parásito y la capacidad de proliferación a lo largo de todo su ciclo de vida (Urbina, 2005). Es importante notar que estos parásitos así como los hongos, sintetizan ergosterol en lugar de colesterol, siendo este esteroide vital para estos organismos, por lo que inhibidores de la biosíntesis de esteroides han sido estudiado como blanco terapéutico. Como ejemplos de estos se tienen el ketoconazol, itraconazol o terbinafina. Sin embargo, se ha demostrado que no son capaces de erradicar el *T.cruzi* (McCabe, 1988). Nuevos estudios han sugerido que algunos derivados triazólicos, como el posaconazol son capaces de inducir cura parasitológica tanto en infecciones agudas como crónicas causadas por el *T.cruzi*. Los compuestos son activos por vía oral y tienen muy baja toxicidad en mamíferos. También se demostró que estos nuevos triazoles son activos *in vivo* contra cepas naturalmente resistentes a los nitrofuranos y nitroimidazoles y que tal actividad se mantiene aún cuando el hospedero vertebrado está artificialmente inmunosuprimido (Urbina y col., 1996; Molina y col., 2000). Sin embargo, estos fármacos son altamente costosos.
- Inhibidores de cisteína-proteasas, que son capaces de bloquear la proliferación tanto de la forma extracelular (epimastigotes) como de los amastigotes intracelulares, así como de impedir la metacicloogénesis (transformación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos), lo que indica que la proteína tiene funciones esenciales en el ciclo de vida del parásito (Urbina, 2005).
- Inhibidores de la síntesis del pirofosfato (PPi), los cuales están involucrados en la respuesta del parásito a estrés osmótico, así como a su mantenimiento energético.

Los bisfosfonatos, análogos metabólicos inertes del PPI, se acumulan selectivamente en *T. cruzi* y otros tripanosomatídeos (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. En este grupo de drogas se encuentran, el alendronato, risedronato, pamidronato, ibandronato, entre otras (Urbina, 2005).

- Inhibidores de la síntesis y metabolismo del tripanotion, incluyendo la tripanotion reductasa (TR) y la tripanotion sintetasa, las cuales han sido validadas genéticamente como esenciales para estos parásitos. El diseño y prueba de inhibidores específicos de la TR está en progreso y se han identificado varias familias de compuestos que son potentes inhibidores de la enzima pura y del crecimiento del *T. cruzi in Vitro* (Urbina, 2005). Otero y col. (2006) demostraron que complejos de paladio (II) con tiosemicarbazonas conteniendo nitrofuranos podrían actuar como inhibidores del crecimiento del parásito, a través de la producción de radicales libres tóxicos a través de la interacción con el ADN.

2.2. Tripanosomosis equina.

La tripanosomosis equina, causada por *T. evansi*, es de gran importancia veterinaria y presenta una distribución mundial. En Venezuela esta tripanosomosis conocida como “derrengadera” está distribuida de forma endémica, es decir, se encuentra presente en todos los estados del país con vocación ganadera, provocando en el equino pérdida de peso, fiebre, abortos, edemas y hasta la muerte. Debido a que el caballo representa un elemento de trabajo imprescindible, arreo, captura de bovinos, medio de transporte y carga, es necesario desarrollar agentes quimioterapéuticos contra esta parásito. También se ha reportado recientemente que este parásito es capaz de infectar ganado bovino (Desquesnes y col., 2009).

Estudios realizados en la sabana venezolana indican una seroprevalencia de 80% de tripanosomosis equina en caballos de trabajo ganadero (Reyna-Bello et al., 1998) y más recientemente Forlano y col.(2011) reportan una seroprevalencia de 40% de tripanosomosis equina en tres hatos del estado Apure.

En la India se ha reportado un caso de tripanosomosis por *T. evansi* en un agricultor, el cual pudo infectarse por la transmisión de la sangre de un animal infectado. Este hombre presentó una parasitemia fluctuante asociada con episodios febriles durante cinco meses. Los exámenes indicaron la presencia de un gran número de tripanosomas de la especie *T. evansi* (Figura 7), el agente causante de la tripanosomosis animal conocida como surra. La infección humana por la especie animal de *Trypanosoma evansi* suele ser imposible debido a un factor tripanolítico en el suero humano. Sin embargo, se ha demostrado que el *T. congolensis* y *T. evansi* son capaces de resistir el plasma humano en determinadas circunstancias (Joshi y col., 2005). Lai y col. (2010) reportan que existe resistencia de algunos tripanosomas al suero humano y esta resistencia incrementa en las poblaciones que son re infectivas.

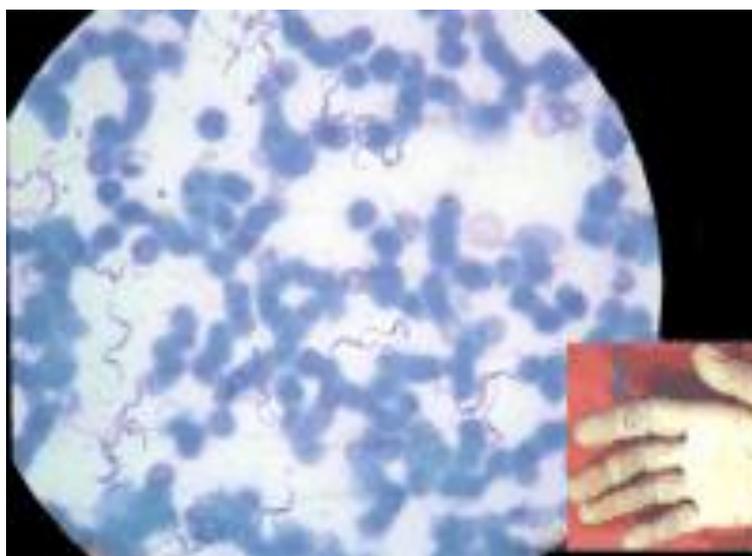


Figura 7. Tripanosomas en frotis de sangre del paciente con tinción de Giemsa. Cicatriz, (flecha) de la herida en el dedo índice derecho. Tomado de: <http://www.ajtmh.org/content/73/3/491.long>. (Consulta: 10 de Marzo de 2012)

2.2.1. Quimioterapia contra la Tripanosomosis equina.

Por el momento no se dispone de vacunas capaces de prevenir la enfermedad, debido a la capacidad del patógeno de desarrollar nuevos antígenos de superficie. La lucha contra la tripanosomosis es difícil, pues no solo los animales enfermos sino también los aparentemente sanos, son portadores de parásitos. También está la posibilidad de un recrudescimiento de la sintomatología de la enfermedad en los animales, que posiblemente van acompañados de una elevación de los niveles de parasitemia suficientes para contaminar los vectores hematófagos, siendo los tábanos los más importantes, diseminando así la infección entre los animales del área (Cuellar y Carrique, 1998).

La quinapiramina y la suramina (tabla 5) son usados como agentes terapéuticos para infecciones con *T. evansi*. Sin embargo, *T. evansi* se está volviendo resistente a los fármacos disponibles, lo que restringirá el uso de estos medicamentos en el futuro (Womack y col. 2006).

Otra de las drogas más comúnmente usadas en la ganadería es el isometamidium (trypamidium), (tabla 5) el cual se ha demostrado que no presenta una completa efectividad contra la infección, además de conllevar múltiples efectos secundarios (Benitez y col., 1984).

Por otra parte, *T. evansi*, como todos los tripanosomas africanos, tiene una capa superficial compuesta de glicoproteínas variantes de superficie (VSG), las cuales actúan como una defensa contra la inmunidad innata general y contra la inmunidad adquirida. La superficie del parásito se cubre con una capa densa de 107 moléculas de VSG unidas a la membrana plasmática por un glicosilfosfatidilinositol (GPI) de anclaje. A pesar de que el genoma contiene más de 1.000 genes para VSG, un solo gen se expresa en un momento dado. La variación de VSG ocurre espontáneamente a una velocidad elevada. Por lo tanto, cada vez que una población expresando una VSG se elimina por el sistema inmune, es sustituida por células que expresan otro VSG, dando lugar a las infecciones crónicas (Vanhamme y Pays, 1995).

Tabla 5- Drogas usadas para el tratamiento de la Tripanosomosis animal

Drogas	Nombre comercial	Modo de acción	Ventajas	Desventajas
Quinapiramida (sulfato de quinapiramida)	Antrycide	Impide unión del ARN con las proteínas de los ribosomas	Afecta el mecanismo de división del parásito	Provoca colapso cardiovascular y la muerte. Solo actúa durante la multiplicación. Únicamente disponible en África
Cloruro de isometamidio	Trypamidium	Se intercala en el ADN inhibiendo la replicación	Efectiva contra tripanosomas resistentes a otras drogas. Uso profiláctico	Provoca lesiones sobre el área de aplicación.
Suramina(Suramina hexasodium)	Metaret	Inhibe la síntesis de ADN y la movilidad celular	Retarda progresión de la enfermedad	Convulsiones, dificultad respiratoria, pérdida de la conciencia, aumento de la frecuencia cardiaca

Fuentes: (Korolkovas yBurckhalte, 1979; Romero y Quiroz, 1984; Botero y Restrepo, 2006)

2.3. El papel del Ca²⁺ en Tripanosomatidios.

En varios tripanosomatidios que infectan humanos como son *L. donovani*, *T. cruzi*, y *T. brucei* se ha evidenciado el papel del Ca²⁺ como regulador fundamental, asociado directamente con su ciclo de vida (Lammel, 1996; Stodjl, 1996; Benaim y Garcia, 2011). Este catión juega un importante papel en procesos de evasión de la respuesta inmune humoral (proceso de variación antigénica) así como también participa en la invasión celular (Voorheis, 1981; Docampo 1996; Ruiz, 1998).

Cuando entran en contacto con tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* y amastigotes de *Leishmania donovani*, las células huésped incrementan la concentración de Ca²⁺ citosólico.

También se ha descrito que existe un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular en los tripomastigotes de *T. cruzi* durante la invasión de células huésped. Tal como lo muestra la figura 8 se observa un incremento en la concentración de Ca^{2+} en las células HeLa al colocarle extractos de la proteína gp82 (asociada a la activación de cascadas de señalización y movilización de Ca^{2+}) o tripomastigotes metacíclicos, mientras que no se observa respuesta al colocar epimastigotes. Además existe también un incremento en la concentración de Ca^{2+} en los tripomastigotes más no en los epimastigotes al colocarles las células HeLa (Moreno y col., 1994; Dorta y col., 1995; Manque y col., 2003; Yoshida, 2006).

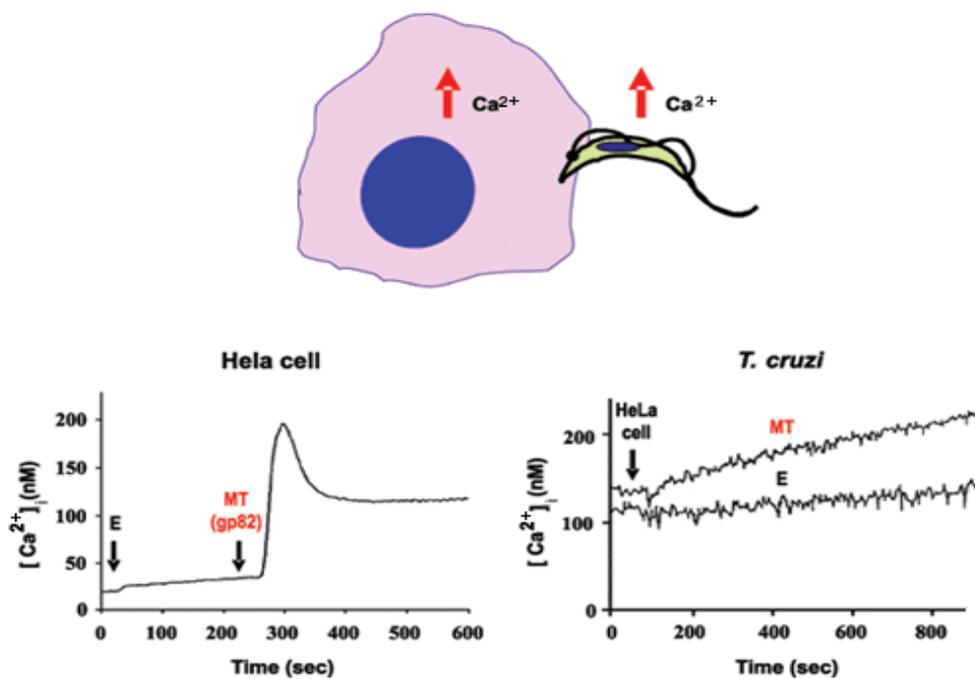


Figura 8. Respuesta de Ca^{2+} inducida por la interacción de *T. cruzi* con células HeLa.

Tomado de: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0001-37652006000100010&script=sci_arttext
(Consulta: 2 de Abril de 2012)

Tonin y col. (2011) demuestran que existe una disminución significativa de la actividad de la Ca^{2+} ATPasa del retículo (sarco)endoplasmático (SERCA) en ratas infectadas con *T. evansi* en comparación con las no infectadas. Y que además estas infecciones muestran una correlación negativa entre la Ca^{2+} ATPasa y los niveles de TBARS (determinación de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico). En base a estos resultados

se sugiere que la debilidad en las piernas y las lesiones musculares comunes en los animales infectados con *T. evansi* puede estar relacionado con una actividad reducida de la Ca^{2+} ATPasa (SERCA) y el estrés oxidativo.

La amiodarona es el fármaco más ampliamente utilizado para la restauración y el mantenimiento del ritmo sinusoidal en arritmias fibrilares. Tiene una amplia gama de efectos que podrían ser la base de su actividad terapéutica. Inhibe los canales de K^+ , Na^+ y Ca^{2+} y es antagonista de los receptores adrenérgicos α y β . Aunque es un antiarrítmico muy eficaz, su uso está limitado por las reacciones adversas que provoca. Incluyendo efectos pulmonares, hepáticos, oculares, neurológicos y por su alta toxicidad asociada a la molécula de yodo en su estructura, debido a su acumulación en la tiroides (Page y col., 2009, Velázquez, 2009).

Courchesne y col. (2003), demostraron que la amiodarona muestra amplia actividad fungicida incluyendo hongos tales como *Candida neoformans* y que puede estar actuando en la apertura de un canal de Ca^{2+} en esos patógenos y que además esta pérdida de Ca^{2+} pudiera estar involucrada en la inhibición del crecimiento y muerte de estos hongos.

Sin embargo, en nuestro laboratorio demostramos que la amiodarona en *T. cruzi* no actúa la misma vía reportada en hongos, es decir, a través de canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática sino a través de su interacción con organelos intracelulares. Específicamente se ha demostrado que la amiodarona produce la disrupción de la regulación del Ca^{2+} , alterando el potencial electroquímico mitocondrial (Benaim y col., 2006). Este mismo efecto ha sido observado en *L. mexicana*, demostrándose que también producen la alcalinización de los acidocalcisomas de estos parásitos (Serrano y col., 2009). Esta perturbación de la homeóstasis del Ca^{2+} induce la muerte del parásito. Esto se logró estudiar mediante microscopia confocal, donde células Vero infectadas con *T. cruzi* fueron marcadas con Rhod 2 y rodamina123 de manera de conocer si el incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) provenía de la mitocondria. Es importante resaltar que la amiodarona no produjo la liberación de Ca^{2+} ni alteró el potencial electroquímico mitocondrial en la célula huésped (figura 9). La amiodarona también es capaz de inhibir la

proliferación en *T. cruzi*, tanto en la forma de epimastigote como en la forma de amastigote, que es la clínicamente relevante. (Figura 10)

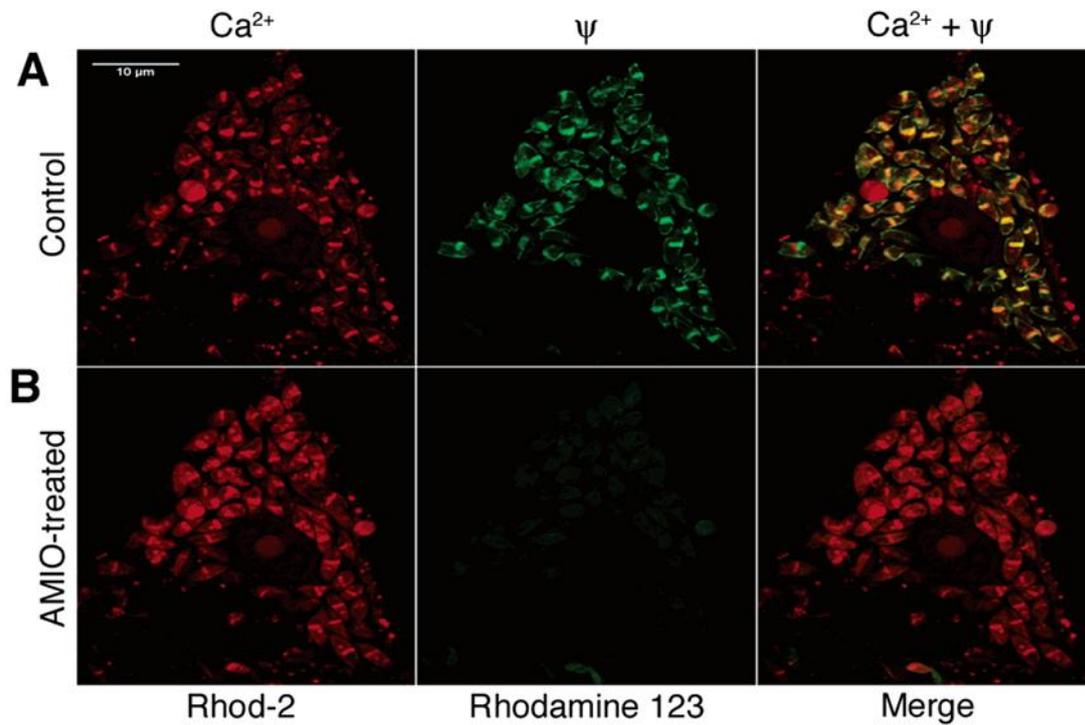


Figura 9. Efecto de la amiodarona en la homeostasis de Ca^{2+} intracelular en amastigotes de *T. cruzi*. Células Vero infectadas con *T. cruzi* fueron marcadas con Rhod-2 (rojo) y rodamina 123 (verde) para visualizar el Ca^{2+} mitocondrial y el potencial electroquímico mitocondrial, respectivamente. (A) Control de las células, (B) células tratadas con 12,5 μM de Amiodarona (AMIO) durante 20 min. Tomado de Benaim y col. 2006.

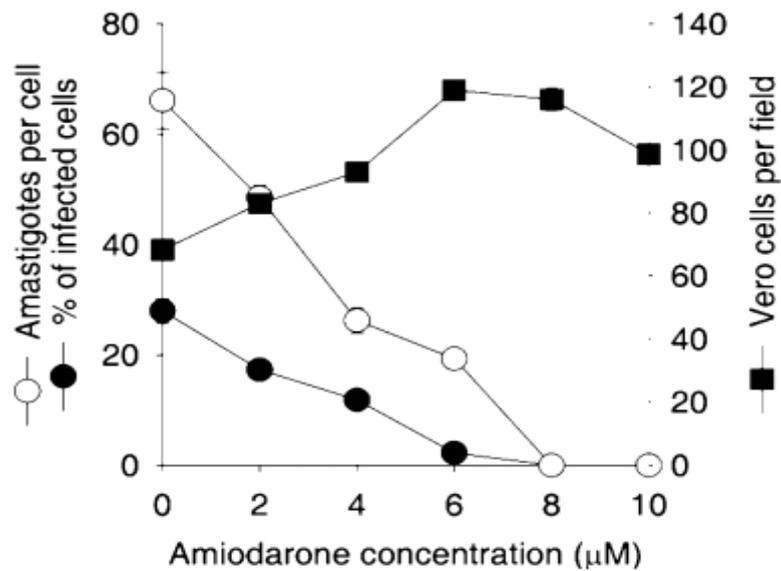
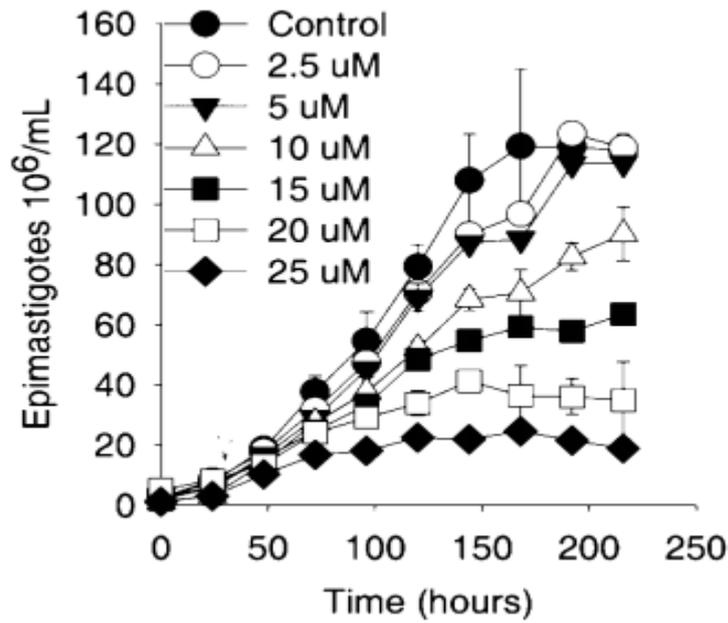


Figura 10. Efecto de la Amiodarona a diferentes concentraciones en poblaciones de amastigotes y epimastigotes de *T. cruzi*. Tomado de: Benaim y col. 2006.

La dronedarona es un derivado del benzofurano que ha sido desarrollada para superar la limitación de la presencia de yodo, asociada a efectos adversos de la amiodarona (Kathofer y col., 2006). Igualmente bloquea los canales de K^+ , Na^+ y Ca^{2+} y es antagonista de los receptores adrenérgicos α y β . Es menos liposoluble que la amiodarona debido a la presencia de un grupo metilsulfonamida, por lo que se acumula menos en los tejidos,

reduciendo la vida media de eliminación de 1-2 días, en lugar de 20 días (Velazquez, 2009; Bogdan y col., 2011).

La dronedarona está aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) de Estado Unidos de America, y reduce el riesgo de hospitalizaciones con pacientes cardiovasculares y los análisis muestran una disminución en mortalidad cardiaca en comparación con la amiodarona (Page y col., 2009).

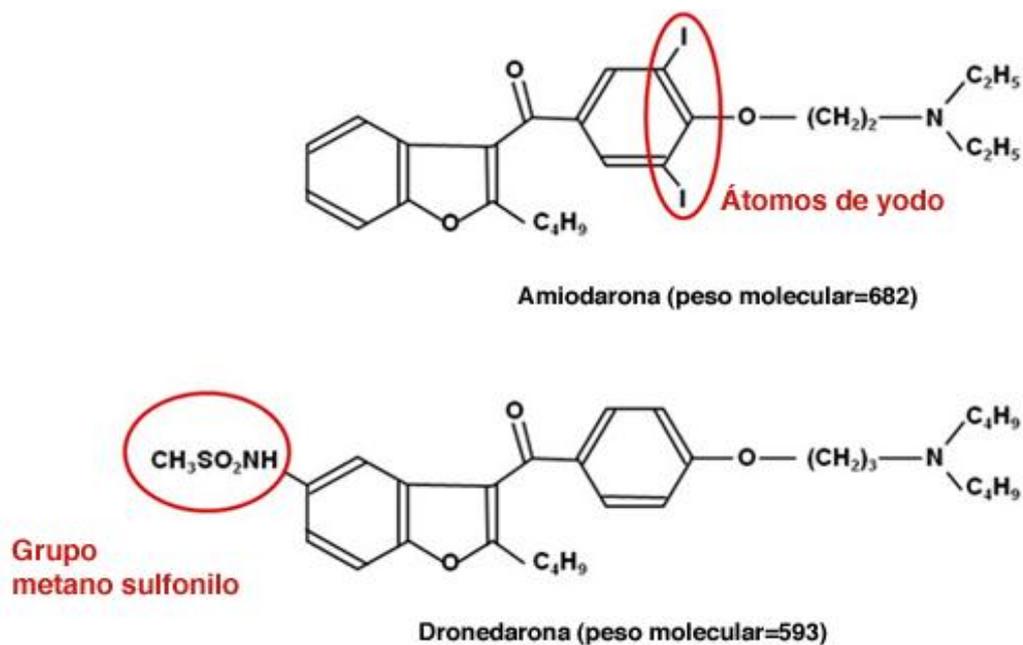


Figura 11.- Estructura molecular de la dronedarona y la amiodarona.

<http://www.fibrilacionauricularonline.es/default.aspx?idPage=4134> (Consulta: 6 de mayo 2011)

3. OBJETIVO GENERAL

Se planteó como objetivo general de este Trabajo Especial de Grado determinar el efecto de la dronedarona en la viabilidad de *T. cruzi* y *T. evansi* *in vivo* e *in vitro*, así como tratar de establecer el mecanismo de acción sobre los parásitos antes mencionados.

Además, se comparó el efecto de la dronedarona y la amiodarona en la homeostasis de Ca^{2+} intracelular, así como su efecto sobre el potencial electroquímico mitocondrial y su efecto sobre los acidocalcisomas de estos parásitos.

3.1. Objetivos específicos

- 3.1.1. Determinar el efecto de la dronedarona en la homeostasis de Ca^{2+} intracelular en *T. cruzi* y *T. evansi*.
- 3.1.2. Determinar el efecto de la dronedarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial de *T. cruzi* y *T. evansi*.
- 3.1.3. Determinar el efecto de la dronedarona sobre los acidocalcisomas de *T. cruzi* y *T. evansi*.
- 3.1.4. Evaluar el efecto de la dronedarona como posible agente quimioterapéutico en animales experimentales infectados con *T. evansi*.
- 3.1.5. Determinar el efecto de la dronedarona sobre el porcentaje de hematocrito de las ratas infectadas con *T. evansi*.
- 3.1.6. Determinar el efecto de la dronedarona sobre poblaciones de epimastigotes de *T. cruzi*.
- 3.1.7. Determinar el efecto de la dronedarona sobre células Vero infectadas con amastigotes de *T. cruzi*.

3.1.8. Comparar el efecto de la dronedarona con la amiodarona en la homeostasis de Ca^{2+} intracelular, en el potencial electroquímico mitocondrial y en los acidocalcisomas en *T. evansi* y *T. cruzi*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

- Las soluciones fueron preparadas con reactivos adquiridos por diferentes casas comerciales, entre ellas SIGMA. (St. Louis, MO) y BIO-RAD.
- Fluoróforos empleados: Fura 2-AM, Rodamina 123 y Naranja de acridina. (Molecular Probes Inc. OR)
- La amiodarona {(2-butil-3-benzofuranil)[4 - [2 - (dietilamino)-ethoxi]] 3,5-diidodofenilmetanona hidrocliclorida} SIGMA. (St. Louis, MO)
- La dronedarona fue extraída de las tabletas comerciales (Multaq®). La dronedarona se disolvió en metanol. El material insoluble se descartó mediante centrifugación.

4.1. Experimentos *in vitro*:

4.1.1. Obtención y mantenimiento de los parásitos:

Los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* se cultivaron a 29 °C, con agitación continua en medio LIT (liver Infusión- Tryptose) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado y 1% de penicila/kanamicina. El contaje se realizó mediante un método directo en una cámara de Neubauer para su utilización en la evaluación del efecto de la dronedarona y la amiodarona mediante métodos flourimétricos.

Para la obtención de *T. evansi* se utilizaron ratas blancas Sprague-Dawley, con un peso aproximado de 300 gr. y se infectaron mediante inoculación intraperitoneal con 0.3 ml. de sangre criopreservada de *T. evansi* (10^7 trip/ml). El aislado utilizado fue TEVA1, aislado venezolano proveniente de La Sabana, Edo. Apure. Estos parásitos se almacenan criopreservados en nitrógeno líquido en 1% buffer fosfato salino (PBSG) y 10% dimetilsulfoxido (DMSO).

Después de la inoculación se realizó un seguimiento diario de la parasitemia del animal mediante un corte en el extremo de la cola, de manera de obtener sangre para la observación de los parásitos al microscopio, con objetivo de 40x. Al observar la máxima parasitemia se procedió a dormir al animal en una cámara con éter y se extrajo mediante punción cardíaca la sangre con los parásitos, con una jeringa de 10 ml conteniendo Heparina sódica como anticoagulante.

Una vez obtenida la sangre se procedió a separar los tripanosomas de los componentes sanguíneos. Se centrifugó a 2000xg por 20 minutos de manera de obtener tres fases: la fase inferior correspondiente a los glóbulos rojos, la fase superior correspondiente al plasma y la fase intermedia contiene los parásitos. Se descartó el plasma y se tomó la fase intermedia, tratando de arrastrar la menor cantidad de glóbulos rojos posibles, se resuspendió en buffer fosfato glucosado (PBSG) y se purificaron los parásitos según Lanhan y Godfrey (1970) mediante una columna de intercambio aniónico, DEAE-celulosa.

La suspensión se agregó gota a gota en la columna de intercambio aniónico previamente equilibrada con varios volúmenes de PBSG (hasta obtener un pH 8) y una vez eluidos los parásitos purificados se centrifugaron a 700xg por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el "pellet" en un volumen de PBSG. Los parásitos se conservaron en hielo para su posterior experimentación.

4.1.2. Experimentos mediante métodos fluorimétricos:

Para la determinación del efecto de la dronedarona en la $[Ca^{2+}]_i$, se realizaron mediciones fluorimétricas mediante el uso de un fluoróforo específico para este catión, el Fura 2. En el caso de epimastigotes de *T. cruzi* se centrifugaron 500 μ l de parásitos a una concentración de 1.5×10^6 a 0,6 xg por 2 min. de manera de eliminar el medio. El sobrenadante fue descartado y el "pellet" se resuspendió en PBSG. Posteriormente se

procedió a cargar los parásitos con 2 μM de Fura 2-AM en presencia de 2.4 μM de ácido plurónico y 2.4 μM de probenidol durante 12 horas en agitación constante a 29 °C.

La idea de usar Fura 2-AM es debido a que es la forma acetoximetilester, el cual es un compuesto lipofílico, por lo que es permeable. Una vez que el compuesto atraviesa la membrana celular de los parásitos, el Fura 2-AM es hidrolizado intracelularmente por las esterasas inespecíficas de la célula, transformando al compuesto en su forma no lipofílica y sensible al Ca^{2+} , por ende no puede cruzar las membranas y permanece en el citoplasma. Además, esta es la forma fluorescente del compuesto. Dentro de las células cada molécula de Fura 2 puede unir un único ión calcio, por lo tanto, esta unión es proporcional a la concentración de Ca^{2+} citosólica dentro de un cierto rango (Figura 12).

Para la carga de *T. evansi* se tomó igualmente una concentración de 1.5×10^6 parásitos/ml conservados en frío luego de la purificación y se incubaron a 37° por 45 min, en presencia de 2 μM de Fura 2-AM, 2.4 μM de ácido plurónico y 2.4 μM de probenidol. Posteriormente se procedió a lavar dos veces los parásitos bajo las mismas condiciones anteriores, descartando el sobrenadante, y resuspendiendo en Buffer Tyrode Ca^{2+} (145 mM, NaCl, 4 mM, KCl, 2 mM, MgCl_2 , 1.8 mM, CaCl_2 , 10 mM Hepes, 11 mM glucosa) en presencia de 2.4 μM de ácido plurónico y 2.4 μM de probenidol. Posteriormente se colocaron los parásitos en una cubeta de cuarzo, la cual se colocó en un espectrofluorímetro, con agitación a 37 °C.

Una vez dentro del fluorímetro se colocaron los distintos efectores mediante el empleo de una jeringa Hamilton.

Para calcular la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se utilizó la ecuación propuesta por Grynkiewicz y col., 1985.

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

Siendo K_d la constante de afinidad del Fura 2 por Ca^{2+} (224nm), R_{\min} el valor en R más bajo en ausencia de calcio (en presencia de EGTA), R_{\max} el mayor valor en R en presencia de exceso de calcio, F_{\min} el mayor valor que se encuentra luego de añadir EGTA (0 Ca^{2+}), F_{\max} el menor valor que se encuentra luego de añadir digitonina.

Los efectores utilizados en este experimento fueron:

Dronedarona 10 μ M, Amiodarona 10 μ M, Digitonina (permeabiliza la membrana), EGTA (Quelante de Ca²⁺)

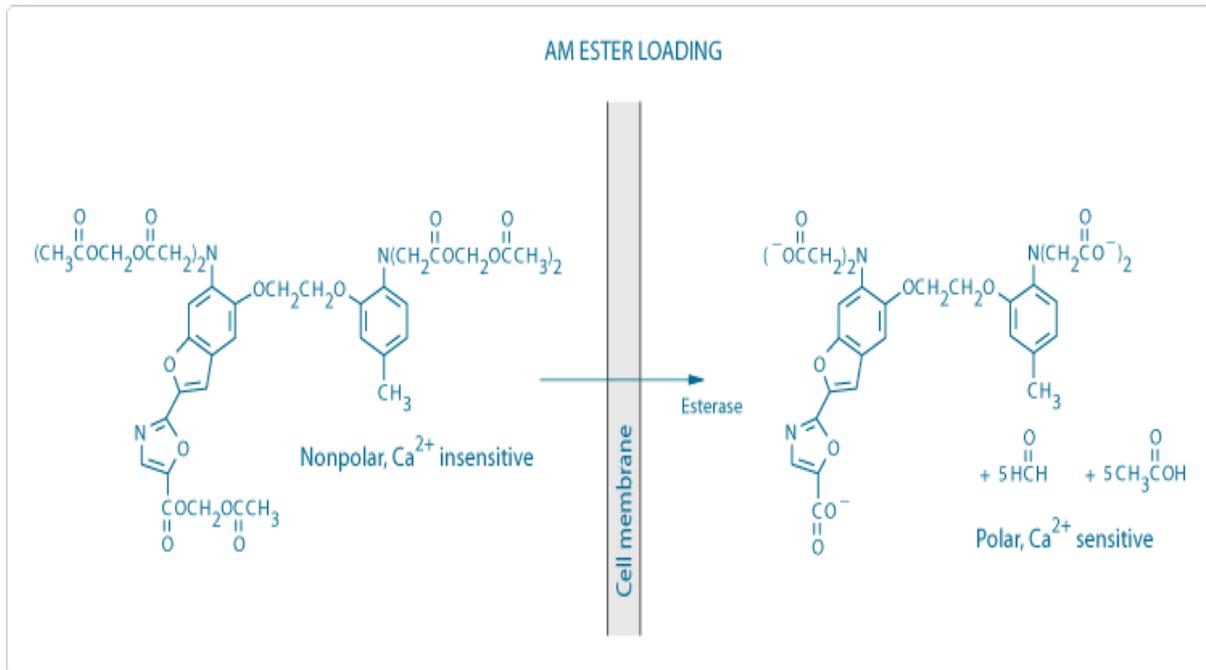


Figura 12. Representación esquemática de la incorporación del Fura 2 a la célula. Tomado de: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Technical-Notes-and-Product-Highlights/Loading-and-Calibration-of-Intracellular-Ion-Indicators.html> (Consulta: 20 de marzo 2011)

El Fura 2 muestra un espectro de excitación que cambia con los diferentes niveles de Ca²⁺. La intensidad de la fluorescencia máxima es emitida a 510 nm tras la excitación con diferentes longitudes de onda como se observa en la figura 12, en la cual se varía la concentración de Ca²⁺. La fluorescencia emitida aumenta con concentraciones crecientes de Ca²⁺ para la excitación a 340nm y disminuye con la excitación a 380nm (Figura 12).

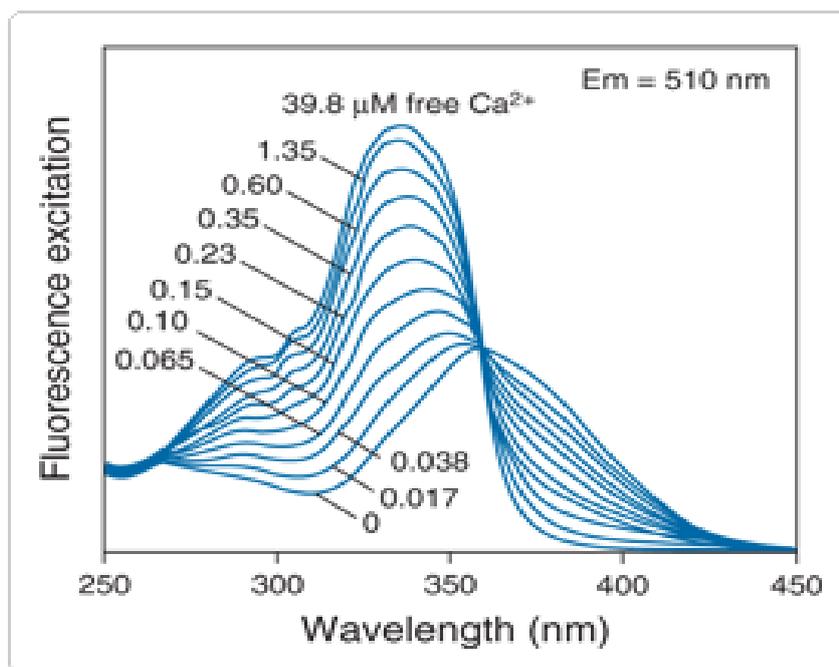


Figura 13. Espectro de excitación y emisión del Fura 2 en el rango de concentración de Ca^{2+} desde 0 hasta 39.8 μm . Tomado de: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Indicators-for-Ca2-Mg2-Zn2-and-Other-Metal-Ions/Fluorescent-Ca2-Indicators-Excited-with-UV-Light.html> (Consulta: 05 de marzo de 2011)

El fluorímetro utilizado fue un PerkinElmer LS55. Este consta básicamente de una fuente de luz la cual se hace incidir en un “chopper” que separa la luz en sus dos longitudes de onda de excitación del Fura 2 unido a Ca^{2+} (340 nm) y Fura 2 libre (380 nm). Estos luego son combinados nuevamente mediante un combinador de rayos, el cual los hace incidir sobre la muestra. La muestra por su parte emite a 510 nm, lo cual es detectado por un tubo fotomultiplicador (P.M.T.) y posteriormente al centro de control y adquisición de datos, lo cual ofrece el registro del experimento y una data numérica. Un esquema representativo del sistema experimental se muestra en la siguiente figura:

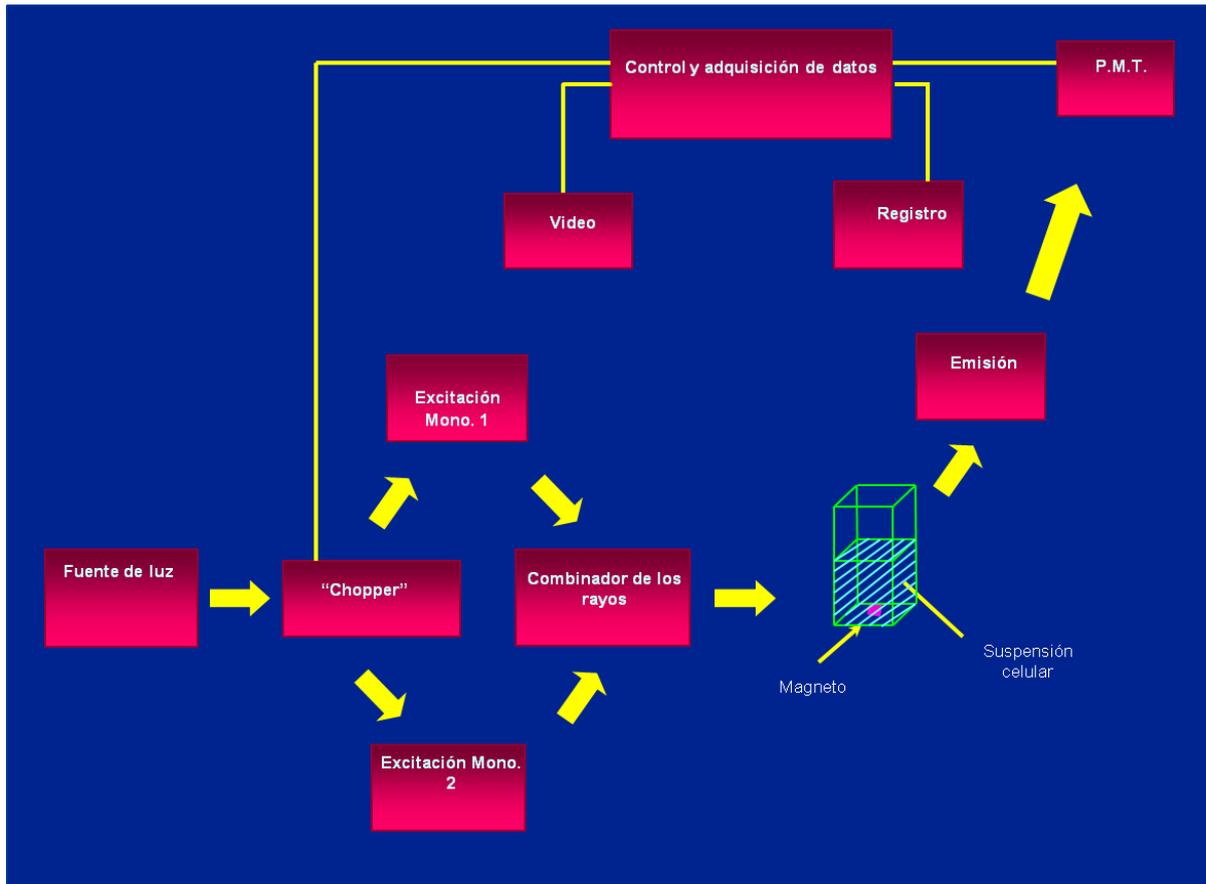


Figura 14. Representación esquemática del sistema de detección de Ca^{2+} mediante dos longitudes de onda de excitación. PTM: foto multiplicador.

Para la determinación del efecto de la dronedarona en el potencial electroquímico mitocondrial se colocaron los parásitos a una concentración de $1,5 \times 10^6$ parásitos/ml en Buffer de carga (130 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 2 mM KH_2PO_4 , 20 mM Tril-HCl) con $10 \mu\text{M}$ del fluoróforo rodamina 123, y se cargaron por 45 minutos a 29°C para *T. cruzi* y 37°C para *T. evansi* en agitación continua. La rodamina 123 se intercala entre la membrana interna y la membrana externa de la mitocondria siguiendo la diferencia de potencial electroquímico mitocondrial. Terminado el tiempo de carga, se centrifugaron los parásitos en suspensión, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el "pellet" en $500 \mu\text{l}$ de buffer de carga (este procedimiento se realizó dos veces). Posteriormente se

colocaron en una cubeta de cuarzo en el fluorímetro HITACHI F-7000 con agitación continua a 37 °C para *T. evansi* y 29 °C para *T. cruzi*.

Los efectores utilizados en este experimento fueron:

Dronedarona 10µM, Amiodarona 10 µM y FCCP 1µM(desacoplador de la cadena transportadora de electrones) como control.

Para la determinación del efecto de la dronedarona sobre los acidocalcisomas se procedió de la misma manera, pero empleando el fluoróforo naranja de acridina, a una concentración final de 2 µM, por 5 minutos en agitación continua a 29°C para *T. cruzi* y 37°C para *T. evansi*. La naranja de acridina es un fluoróforo, el cual tiene la capacidad de acumularse en compartimientos ácidos, como los acidocalcisomas, la acumulación de este en los acidocalcisomas es medida siguiendo la extinción de la fluorescencia emitida a 530 nm.

Los efectores utilizados en este experimento son:

Dronedarona 10µM, Amiodarona 10 µM y nigericina 1 µM(Intercambiador de protones) como control.

Para los experimentos realizados con rodamina 123 y naranja de acridina, se empleó un fluorímetro HITACHI F-7000, que tiene la particularidad de presentar los filtros de luz que se necesitan para excitar estos fluoróforos, así como para registrar la longitud de onda emitida para ambos. Para ambos fluoróforos la longitud de onda de excitación corresponde a 488 nm, mientras que la emisión se monitorea a 530 nm. Los distintos efectores se colocaron en la cubeta con parásitos, mediante una jeringa Hamilton.

4.1.3. Evaluación del efecto de la dronedarona sobre poblaciones de epimastigotes de *T. cruzi*.

De manera de evaluar la susceptibilidad de las poblaciones de epimastigotes a diferentes concentraciones de dronedarona, estos se mantuvieron en medio LIT suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado y 1% de penicila/kanamicina. Se evaluó el efecto de la dronedarona y la amiodarona a diferentes concentraciones (1, 5 y 10

μM). El conteo se realizó en una cámara de Neubauer. La concentración inicial de parásitos fue 10^6 parásitos/ml. Se determinó el IC_{50} con el programa Prisma GraphPad 5.0.

4.1.4. Curva de infección: Modificado de Benaim y col. 2006

Primer Día- Siembra de células:

- Se identificaron placas de 6 pozos con los datos de cada condición. Se colocó un cubre objeto en cada pozo.
- Se tripsinizaron las células Vero y se colocaron en un tubo tipo “falcon” de 15 ml. Se añadió 1 ml de medio DMEM a este tubo por cada 2 ml. de células recuperadas.
- Se añadió 1 ml de DMEM en cada pozo y se agregó 50 μl de cultivo celular en cada pozo.
- Se dejaron incubando por un día.

Segundo Día- infección:

- Se tomaron del medio de cultivo de células infectadas para obtener tripomastigotes y se colocaron en tubos tipo “falcon” de 15 ml.
- Se centrifugó a 4 °C a 6 xg por 5 min.
- Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de DMEM al “pellet” y se resuspendió.
- Se tomaron 10 ml de esa suspensión y se colocaron en una cámara de Neubauer para el conteo.
- Se determinó la concentración de parásitos y se determinó el volumen necesario de cultivo de parásitos que se debe agregar a cada pozo con infección para obtener una proporción de 10 parásitos/célula.
- Se añadió el volumen calculado de parásitos a los pozos correspondientes.

- Se incubaron por 24 horas a 37°C, 5% CO₂ para permitir la infección.

Tercer Día- Adición de dronedarona:

- Se retiró el medio de cada pozo y se añadió medio nuevo y la droga a la concentración correspondiente en los diferentes pozos. Se dejaron incubando por 24 horas a 37°C, 5% CO₂.

Cuarto Día- Lavado:

- Se retiró el medio de cada pozo y se lavó cada uno con 1 ml de PBS.
- Se añadió 2 ml de DMEM.
- Se dejó incubando a 37 °C con 5% CO₂ por 72 horas.

Quinto Día- Observación

- Se retiró el medio de cada pozo y se lavó cada pozo con 1 ml de PBS.
- Se fijó la célula al cubreobjetos con metanol al 100% y se dejó secar por unos minutos.
- Se tiñeron las células con azul de Giemsa. Se utilizó ácido acético 1% para aclarar y ajustar el color.
- Una vez teñida se fijó cada cubreobjeto a una lámina portaobjetos con gelatina al 2%.
- Se procedió a contar en un microscopio de inmersión, a una magnificación de 100X.

Se determinó el IC₅₀ con el programa Prisma GraphPad 5.0.

4.2. Experimentos *in vivo*:

Con el objeto de evaluar el efecto de la dronedarona como agente quimioterápico para la tripanosomosis causada por *T. evansi*, se utilizaron 28 ratas Sprague-Dawley con un peso aproximado de 300 grs., como animales experimentales y fueron infectadas con el aislado El Frio, aislado venezolano proveniente del Hato El Frio en el municipio Mantecal del Distrito Muñoz, Estado Apure. La distribución se realizó de la siguiente manera:

Tabla 6- Condiciones de inoculación en ratas Sprague Dawley

Grupo	Nº de ratas inoculadas	Parásitos por rata	Dosis de dronedarona (mg/kg/día)
Control infección	4	1parásito/gr	0
Experimental 1	4	1parásito/gr	5 mg/kg
Experimental 2	4	1parásito/gr	10 mg/Kg
Experimental 3	4	1parásito/gr	20 mg/kg
Experimental 4	4	1parásito/gr	50 mg/Kg
Experimental 5	4	1 parásito/gr	100 mg/Kg
Control infección	4	-----	100 mg/Kg

La infección se realizó con parásitos recién extraídos de un ratón previamente infectado con el aislado El Frio. Se obtuvieron de este ratón 150×10^6 parásitos/ml por lo que se inocularon 93 μ L de estos parásitos diluidos en 207 μ L de PBSG. La dronedarona se diluyó en PBSG a la concentración deseada, este tratamiento se administró diariamente de forma oral.

Se evaluó el efecto de la droga mediante observación diaria, llevando un control del número de sobrevivientes y/o número de muertes presentes en cada grupo. Se determinó el porcentaje de “sobrevivida” mediante la ecuación: ratones vivos / ratones iniciales x 100.

4.3. Porcentaje de hematocrito:

Uno de los primeros diagnósticos presuntivos en animales con signos de anemia son las enfermedades producidas por hemoparásitos. Para conocer el porcentaje de hematocrito de los animales infectados y el efecto de la droga en cada uno de los grupos descritos en la metodología anterior se utilizó la técnica de centrifugación de microhematocrito o método de Woo, utilizado también para el diagnóstico de la tripanosomosis animal. Esta se basa en la separación de los componentes de la muestra de sangre dependiente de su gravedad específica.

Se recogieron 54 µl de sangre fresca mediante un corte en el extremo de la cola de la rata, y se colocaron en tubos “eppendorf” con 6 µl de EGTA, posteriormente se colocaron en tubos capilares y se selló uno de los extremos de cada tubo. Se centrifugó a 750 xg por 10 min. la sangre contenida en los tubos capilares. Se determinó con la ayuda de una regla la longitud de los glóbulos rojos, del plasma y el total en cada capilar, de manera de conocer el porcentaje de hematocrito de cada individuo presente en cada grupo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de hematocrito} = (\text{Longitud de glóbulos rojos (cm)} / \text{sangre extraída (cm)}) \times 100$$

Esta medición se realizó interdiariamente, a partir del primer día de tratamiento de la droga.

De manera de conocer el efecto de la droga en el tiempo, sobre el porcentaje de hematocrito y la sobrevivencia en los distintos grupos de tratamiento (5, 10, 20, 50 y 100 mg/Kg) se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, de manera de contrarrestar los dos factores: concentración de la droga y tiempo. Para los cálculos se utilizó el programa Statistix 8.0.

5. RESULTADOS

5.1. Resultados de *T. evansi*:

5.1.1. Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en *T. evansi*.

Previamente se ha demostrado que la amiodarona produce la disrupción de la regulación del Ca^{2+} en *T. cruzi* (Benaim y col., 2006), y *L. mexicana*. (Serrano y col., 2006), induciendo la muerte del parásito. Como se explicó anteriormente la dronedarona es un análogo de la amiodarona que ha sido desarrollada para superar los efectos adversos que la amiodarona conlleva. Tomando en cuenta esto se procedió a determinar el efecto de la dronedarona (10 μ M) sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en *T. evansi* y comparar el efecto de esta droga con su análogo, amiodarona (10 μ M). Para ello los parásitos fueron cargados con el fluoróforo Fura 2 y se determinó la $[Ca^{2+}]_i$ mediante la ecuación de Grynkiewicz y col., 1985. Se observa en la figura 15A que la dronedarona produce un incremento bifásico en la $[Ca^{2+}]_i$ en *T. evansi*, cuya segunda fase se mantiene en el tiempo.

De manera de determinar si el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ proviene de los organelos intracelulares o del medio extracelular, se realizaron los experimentos en ausencia de Ca^{2+} extracelular (2 mM de EGTA). Como se puede observar en la figura 15B al agregar la dronedarona el comportamiento es similar al anterior, por lo que este incremento es consecuencia de la liberación de Ca^{2+} de los organelos intracelulares.

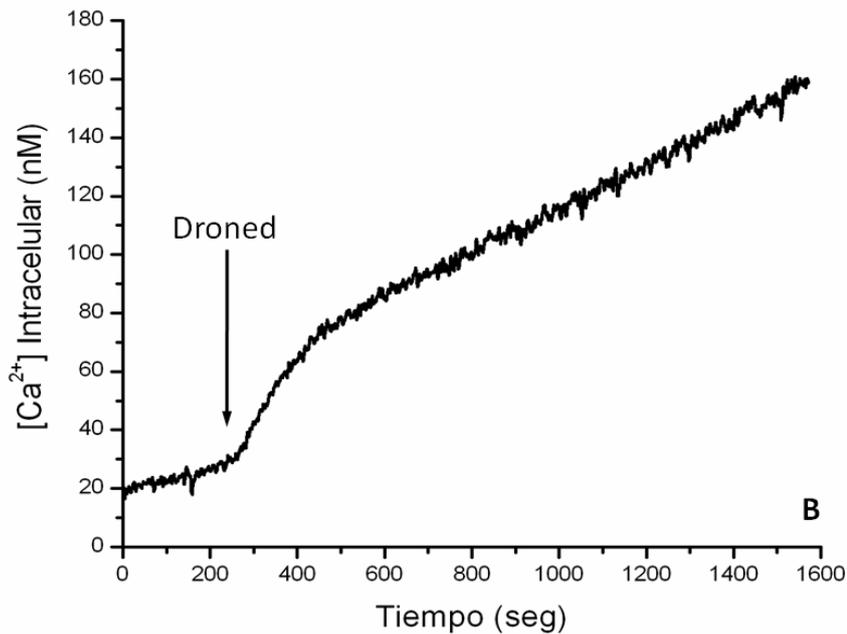
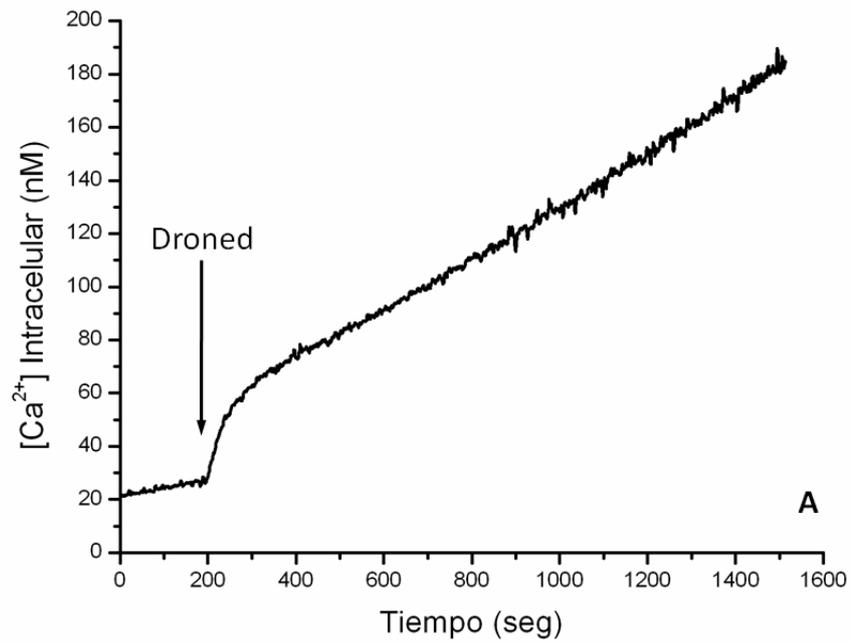


Figura 15. Efecto de la dronedarona sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en *T. evansi*. Los parásitos fueron cargados con Fura 2 como se indica en "Materiales y Métodos". (A) Efecto de la dronedarona (10 μ M) sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en presencia de 2 mM de Ca^{2+} externo. (B) Efecto de la dronedarona sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en ausencia de Ca^{2+} externo (EGTA 2 mM).

De manera de comparar el efecto de la dronedarona con la amiodarona se cargaron igualmente los parásitos con el fluoróforo Fura 2. Se puede observar que al agregar la amiodarona (10 μM) ocurre un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Figura 16A). Al incubar los parásitos en ausencia de Ca^{2+} (2 mM de EGTA) también se observó un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Figura 16B), por lo que al igual que la dronedarona, la amiodarona produce una liberación del ión desde los organelos celulares. Sin embargo, al comparar el efecto de ambas drogas, se puede observar que el incremento bifásico en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que se observa en presencia de dronedarona, no se observa con amiodarona.

Otra observación que surge de ambos resultados es el incremento en el nivel de ruido que ocurre en ambos casos en la medida que avanza el experimento. Este aumento en el ruido podría estar asociado a la muerte del parásito con la concomitante pérdida de permeabilidad de la membrana plasmática y la consecuente entrada inespecífica de Ca^{2+} .

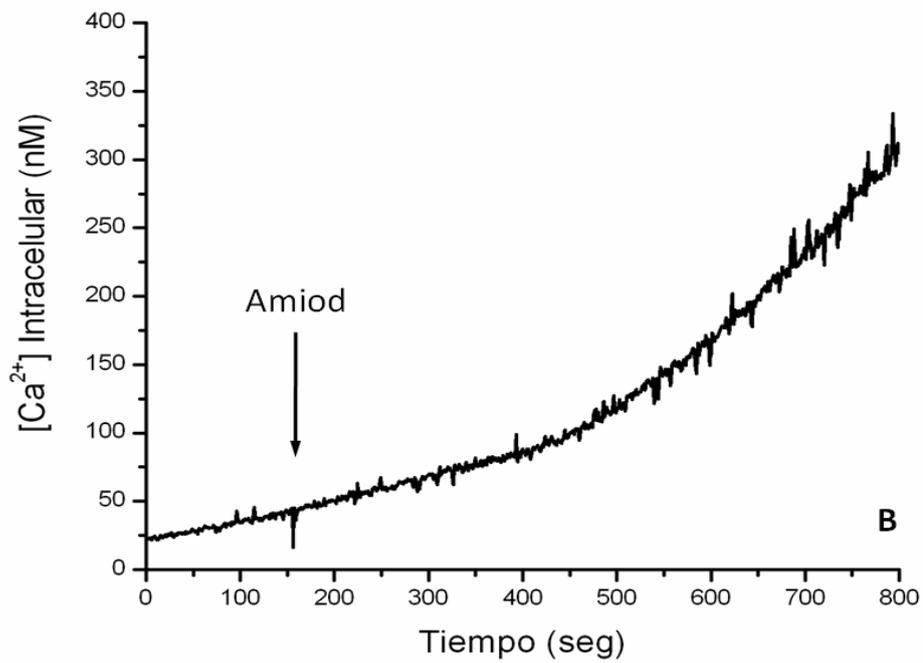
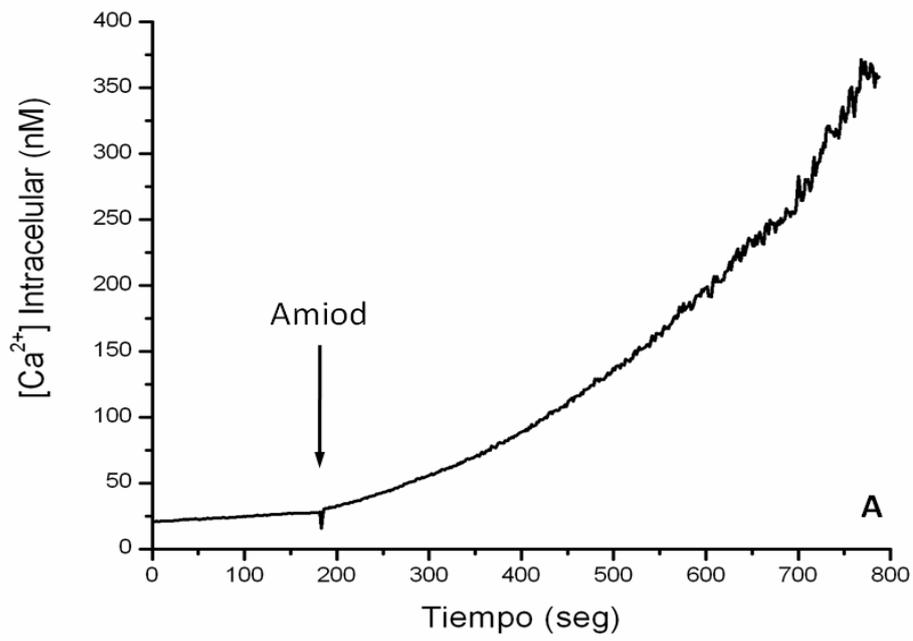


Figura 16. Efecto de la amiodarona en la $[Ca^{2+}]_i$ en *T. evansi*. Los parásitos fueron cargados con Fura 2. (A) Efecto de la amiodarona (10 μ M) sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en presencia de 2 mM de Ca^{2+} externo. (B) Efecto de la amiodarona sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en ausencia de Ca^{2+} externo (EGTA 2 mM).

5.1.2. Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial de *T. evansi*.

Para evaluar el efecto de la dronedarona (10 μ M) y la amiodarona (10 μ M) sobre el potencial electroquímico mitocondrial se incubaron los parásitos con el fluoróforo rodamina 123, de manera que se pueda hacer el seguimiento de cambios en el potencial electroquímico mitocondrial en el tiempo. Se puede observar en las figura 17A que tanto la dronedarona (curva azul) como la amiodarona (curva negra) ejercen un efecto en el potencial electroquímico mitocondrial de *T. evansi*. Esto se observa como un aumento en la fluorescencia a través del tiempo al colocar estas drogas.

También se observa que la dronedarona tiene un efecto más rápido que la amiodarona en la desestabilización del potencial electroquímico mitocondrial. La amiodarona presenta una respuesta más lenta y con un comportamiento bifásico. Después de un tiempo ambas curvas llegan al mismo nivel.

El FCCP es un protonóforo, desacoplante de la fosforilación oxidativa, de la cadena respiratoria. Al añadir este compuesto no hubo variación significativa en la fluorescencia, lo que demuestra que tanto la dronedarona como la amiodarona ya habían colapsado previamente todo el potencial electroquímico existente en la mitocondria.

Al realizar el experimento añadiendo previamente el protonóforo (figura 17B), se puede observar como aún luego de añadir el FCCP, ambas drogas ejercen un ulterior efecto sobre el potencial electroquímico mitocondrial. Es importante observar que al igual que en el experimento anterior(figura 16A), la dronedarona presenta un efecto más rápido que la amiodarona en la desestabilización del potencial electroquímico mitocondrial.

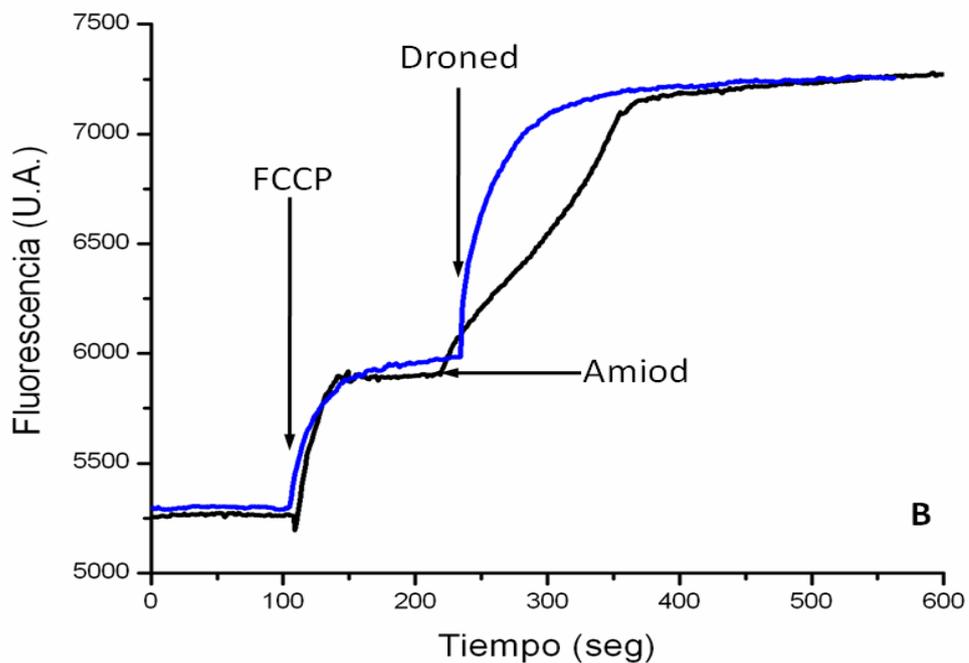
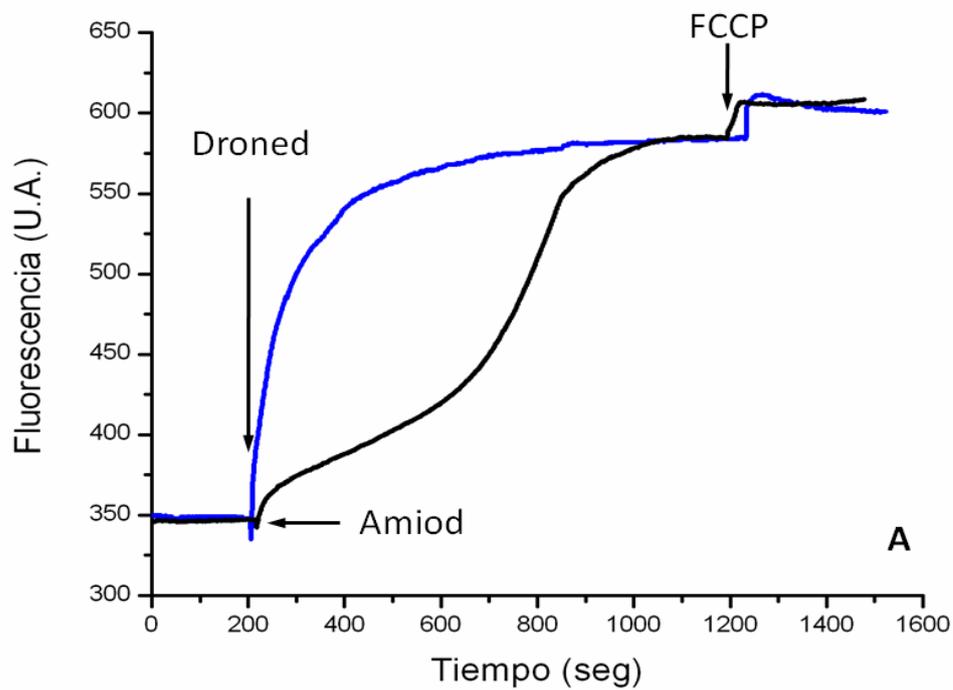


Figura 17. Efecto de la dronedarona y la amiodarona en el potencial electroquímico mitocondrial de *T. evansi*. Los parásitos fueron incubados con Rodamina 123. (A) Efecto de la dronedarona (10 μM) y la amiodarona (10 μM) sobre el potencial electroquímico mitocondrial. (B) Efecto de la dronedarona y la amiodarona luego de añadir FCCP (1 μM) sobre el potencial electroquímico mitocondrial.

5.1.3. Efecto de la dronedarona y amiodarona sobre los acidocalcisomas de *T. evansi*.

Para evaluar el efecto de la dronedarona y al amiodarona sobre los acidocalcisomas se incubaron los parásitos con el fluoróforo naranja de acridina, el cual, como se mencionó, se compartamentaliza en los organelos ácidos. La liberación de este fluoróforo de los acidocalcisomas es visualizada como un incremento en la fluorescencia.

En la figura 18A se observa que al agregar la dronedarona (10 μ M) (curva azul) y la amiodarona (10 μ M) (curva negra) ocurre un incremento de la fluorescencia en el tiempo, la cual se estabiliza. Al agregar nigericina (1 μ M), la cual intercambia K⁺ por H⁺ conllevando a la alcalinización de los acidocalcisomas, se observa un pequeño aumento en la señal de fluorescencia, ya que tanto la dronedarona como la amiodarona habían logrado alcalinizar estos organelos. Más aun al realizar el experimento de manera inversa (figura 18B), se puede observar como la dronedarona resulta ser más potente que este intercambiador (nigericina), al igual que su análoga, amiodarona. También se puede observar que la dronedarona tiene un efecto algo más rápido que la amiodarona, consistente con los experimentos anteriores.

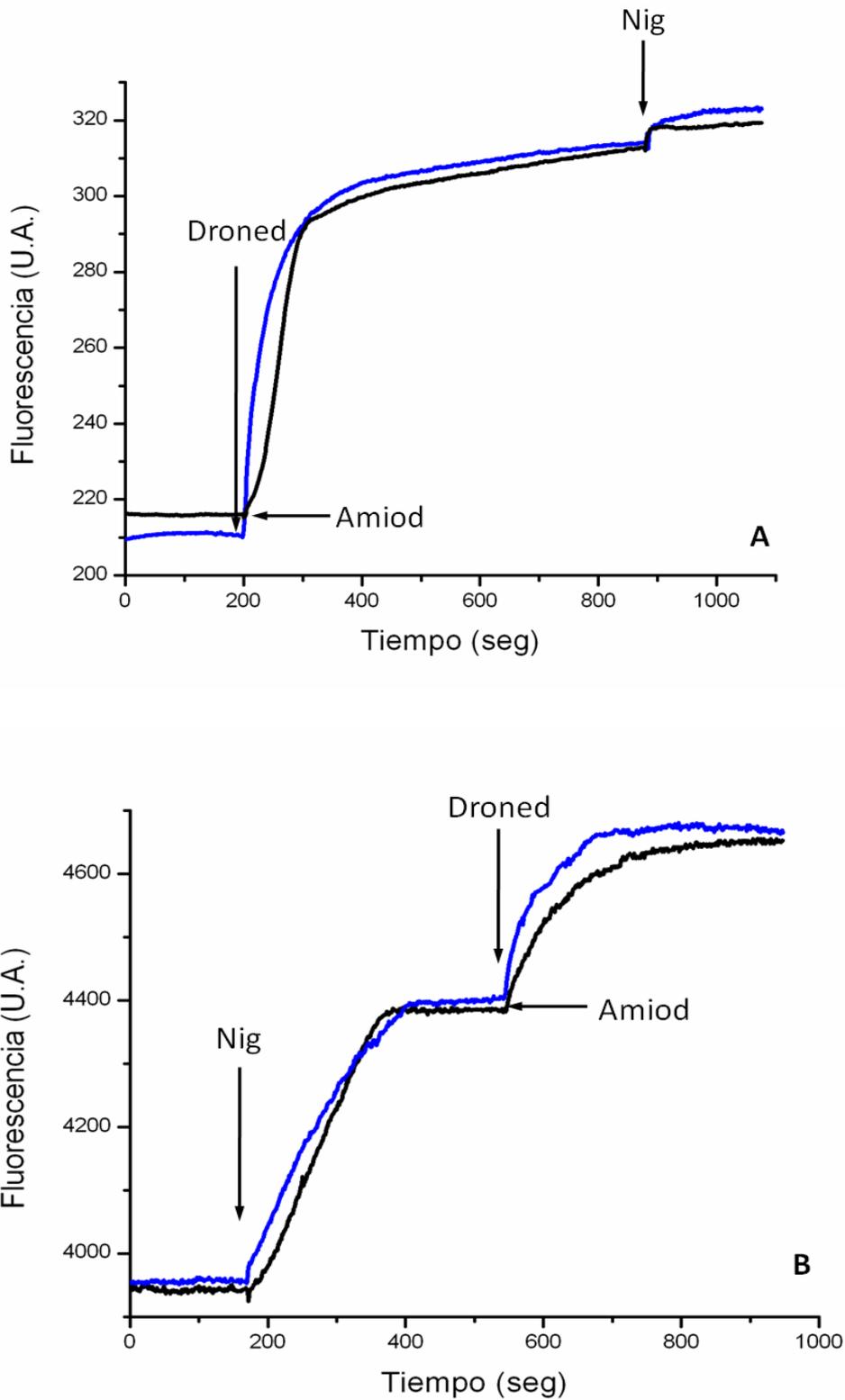


Figura 18. Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre los acidocalcisomas de *T. evansi*. Los parásitos fueron incubados con Naranja de acridina. (A) Efecto de la dronedarona (10 μM) y la amiodarona (10 μM) sobre los acidocalcisomas. (B) Efecto de la dronedarona y la amiodarona luego de añadir nigericina (1 μM) sobre los acidocalcisomas.

5.1.4. Efecto de la dronedarona como posible agente quimioterapéutico en la tripanosomosis equina.

Para evaluar el efecto de la droga en las ratas infectadas como posible agente quimioterapéutico se determinó el porcentaje de sobrevida de estos animales experimentales. Como se puede observar en estos experimentos, la dronedarona no protege significativamente a las ratas infectadas con estos parásitos, ya que todas mueren infectadas, aun a las más altas dosis de la droga. La sobrevida se comenzó a evaluar, desde el primer día de tratamiento. Como se puede observar en la figura 19, para el grupo control (Control, color azul) el cual no tenía tratamiento, los animales comenzaron a morir el día 9 de tratamiento, llegando a 0% de sobrevida el día 30. Para el tratamiento con menor dosis (5 mg/Kg,) se observa que la sobrevida al igual que el grupo control, comienza a disminuir el día 9 de tratamiento, alcanzando el 0% de sobrevida el día 21 de tratamiento. En el grupo con dosis de 10 mg/Kg la sobrevida disminuye el día 11 y alcanza el 0% de sobrevida el día 28 de tratamiento. El porcentaje de sobrevida para el grupo de 20 mg/Kg comienza a decaer el día 12, alcanzando el 0% de sobrevida el día 33 de tratamiento. El grupo correspondiente a 50 mg/Kg presenta un comportamiento similar al grupo anterior. Sin embargo, el porcentaje de sobrevida se mantuvo hasta el día 38 de tratamiento, llegando a ser el grupo con el último animal en morir. En el grupo correspondiente a 100 mg/Kg se observa que el porcentaje de sobrevida comienza a disminuir el día 12 de tratamiento a 75%, esto se mantiene hasta el día 22 donde disminuye a un 50% y el día 26 a un 25%, alcanzado un 0 % de sobrevida el día 30 de tratamiento. Es importante notar que para el grupo control droga (sin infección) el cual tenía la dosis de tratamiento mayor (100 mg/Kg) el porcentaje de sobrevida se mantuvo en 100%.

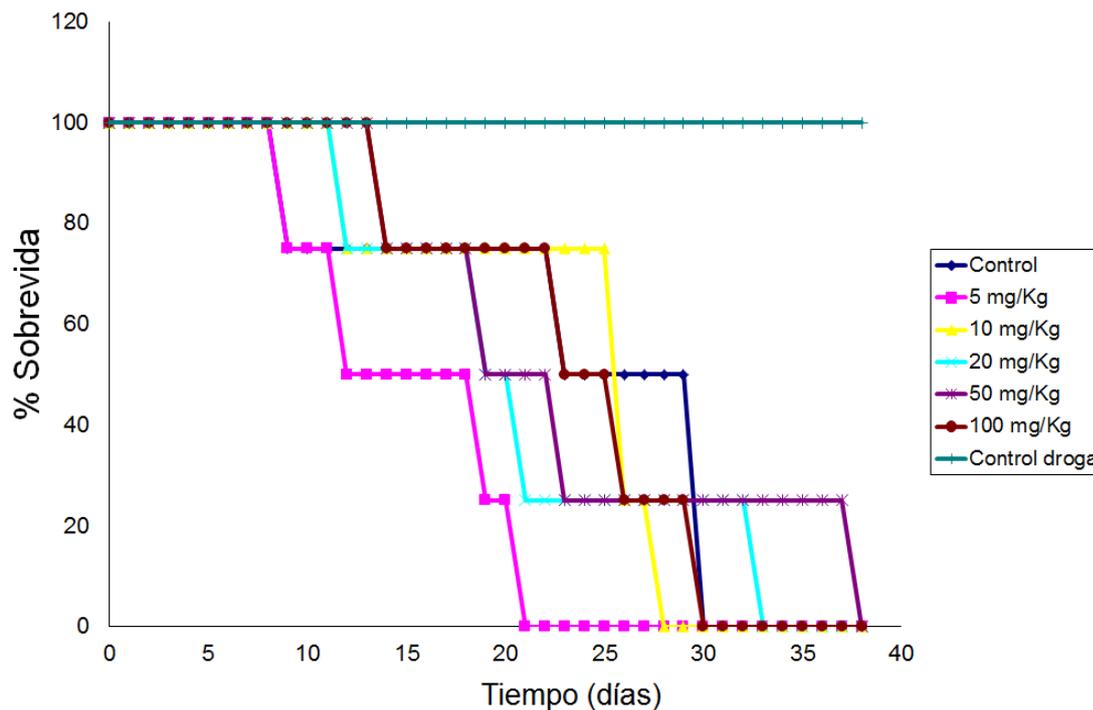


Figura 19. Porcentaje de Sobrevida de ratas infectadas con *T. evansi*. Se observa el porcentaje de sobrevida en el tiempo para los distintos tratamientos. El porcentaje disminuye en el tiempo, para todos los tratamientos, excepto para el grupo control droga, que se mantiene el 100% de sobrevida durante todo el experimento.

5.1.5. Efecto de la dronedarona sobre el porcentaje de hematocrito de ratas infectadas con *T. evansi*

De manera de conocer el efecto de la dronedarona sobre el porcentaje de hematocrito de la ratas infectadas con *T. evansi*, se utilizó la técnica de centrifugación de microhematocrito o método de Woo, que se utiliza como método diagnóstico en animales con signos de anemia producidas por hemoparásitos.

En la figura 20 se observa el efecto de la dronedarona en el porcentaje de hematocrito para el grupo control (sin tratamiento) y para cada grupo de tratamiento, observándose en ella fluctuaciones que oscilan entre 17% y 44% de hematocrito para todos los casos. Los resultados indican que el porcentaje de hematocrito en general, disminuyó para todos los grupos. Este debería aumentar en caso de que la droga produjera algún efecto curativo sobre la infección. Estos resultados son compatibles con los experimentos

de sobrevida mostrados en la figura anterior, en el cual no se evidencia ningún efecto de la droga.

De manera de evaluar estadísticamente los resultados obtenidos en el porcentaje de hematocrito para cada grupo, se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA). Este se muestra en la figura 21, donde se observa que el porcentaje de hematocrito disminuye en el tiempo. En la tabla 7 se muestran los datos obtenidos, donde con un 95% de confianza se obtiene para variable tiempo, un p de 0.000, (menor a 0.05) lo que indica que existe una variación en el porcentaje de hematocrito en el tiempo. Sin embargo, esta variación corresponde a la disminución del porcentaje.

Al evaluar el efecto de las distintas dosis de dronedarona con un 95% de confianza se obtiene un p de 0.86852, (mayor a 0.05), lo que sugiere que los tratamientos no ejercen efecto significativo sobre el porcentaje de hematocrito.

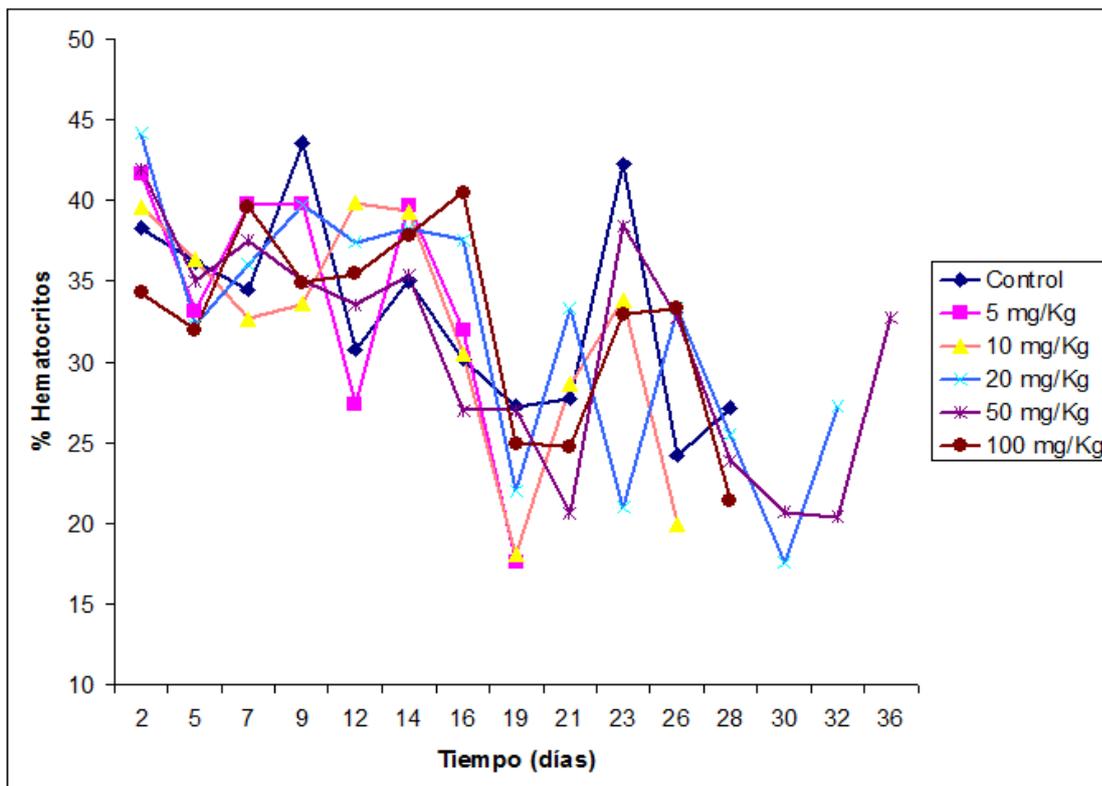


Figura 20. Porcentaje de hematocrito en ratas infectadas con *T. evansi*. Se observa en la gráfica para los distintos tratamientos con dronedarona fluctuaciones en el tiempo.

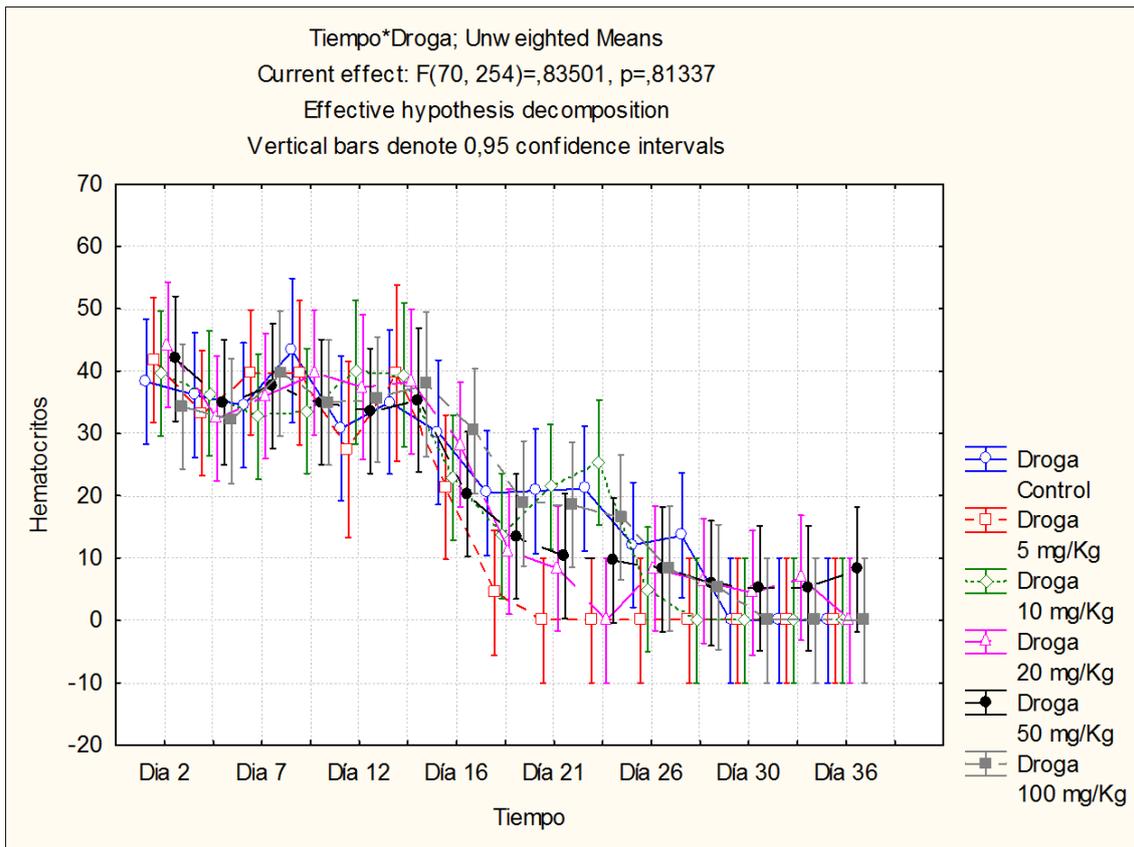


Figura 21. Análisis de varianza del número de hematocrito en el tiempo para los distintos tratamientos.

Tabla 7- Análisis de varianza de dos vías para número de hematocritos.

	SS	Degr. Of	MS	F	P
Tiempo	74335,7	14	5309,7	51,285	0,000000
Droga	1008,7	5	201,7	1,949	0,086852
Tiempo*Droga	6051,5	70	86,4	0,835	0,813366
Error	26297,2	254	103,5		

5.2. Resultados de *T. cruzi*

5.2.1. Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre la población de epimastigotes de *T. cruzi*

Poblaciones de epimastigotes (10^6 parásitos/ml) fueron expuestas a diferentes concentraciones de dronedarona y amiodarona, mientras se mantuvo un control sin droga. Se determinó su viabilidad en el tiempo durante nueve días. En la Figura 22 se puede observar un comportamiento dosis-dependiente, en el cual la máxima concentración de dronedarona, correspondiente a $10 \mu\text{M}$, logró una inhibición completa de crecimiento en esta población. Al comparar ambas drogas se puede observar que a cada concentración la dronedarona tiene un mayor efecto sobre la viabilidad de estos parásitos. El IC_{50} para estas drogas, obtenido a partir de estos resultados fue de $4.6 \mu\text{M}$.

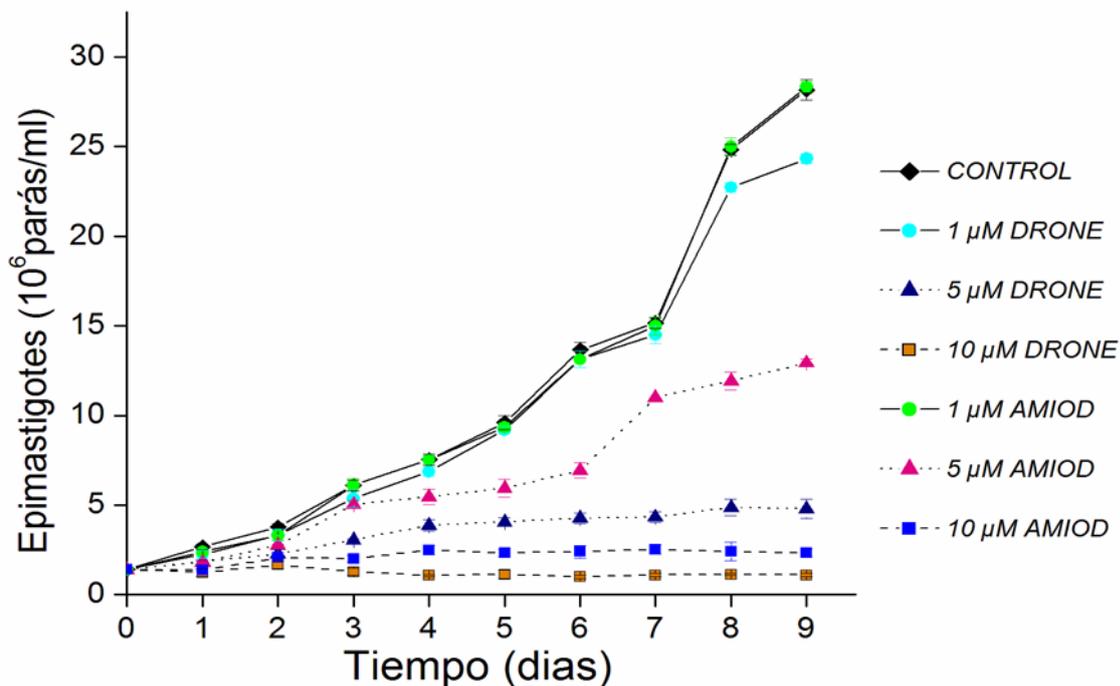


Figura 22. Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre la viabilidad de poblaciones de epimastigotes de *T. cruzi*. Epimastigotes fueron expuestos a diferentes concentraciones de ambas drogas.

5.2.2. Efecto de la dronedarona sobre la poblacion de amastigotes de *T. cruzi*

Las células Vero fueron infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi*, colocando por cada célula 10 tripomastigotes y se mantuvieron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino 1%. Se puede observar en la figura 23 que a mayor concentración de droga existe un menor porcentaje de células Vero infectadas, obteniéndose la mayor inhibición en el porcentaje de infección a 2 μM . Es importante notar que la droga a las más altas concentraciones utilizadas en este experimento no ejercieron efecto alguno sobre las células Vero. El IC_{50} obtenido en este experimento fue de 0.75 μM .

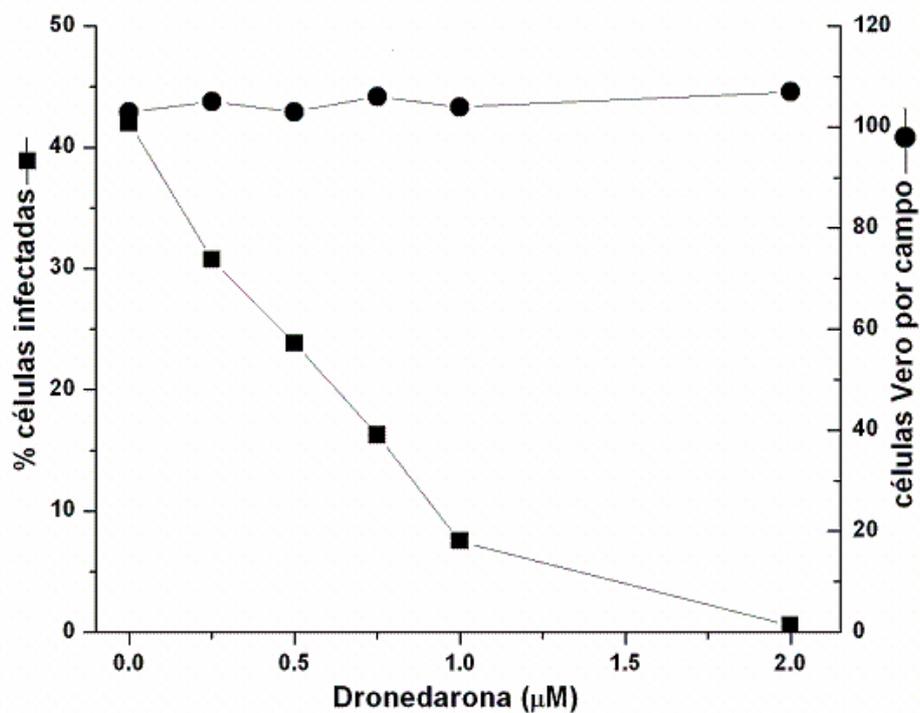


Figura 23. Efecto de la dronedarona sobre el porcentaje de infección de células Vero con amastigotes de *T. cruzi*. Las células Vero fueron expuestas a concentraciones crecientes de la droga (0-2 μM) obteniendo la mayor respuesta a la máxima concentración de la droga (2 μM).

5.2.3. Efecto de la dronedarona sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en *T. cruzi*

Los parásitos fueron incubados durante 12 horas con Fura 2-AM, para permitir que las esterases actuaran sobre el compuesto acetoximetilado. Se puede observar en la figura 24A como al agregar la dronedarona (10 μ M) se incrementa la $[Ca^{2+}]_i$ en estos parásitos, logrando estabilizarse en el tiempo. Es importante notar que existe un comportamiento bifásico en la gráfica, lo cual sugiere que se libera de dos compartimientos distintos.

De manera de conocer si el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ provenía de los organelos intracelulares o del medio extracelular, se procedió a realizar los experimentos en ausencia de Ca^{2+} (EGTA 2 mM). Se observa en la figura 24B que ocurre un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, por lo que se podría deducir que la liberación del ión proviene de dos organelos celulares y no del exterior. Además se repite el comportamiento bifásico observado en la gráfica anterior.

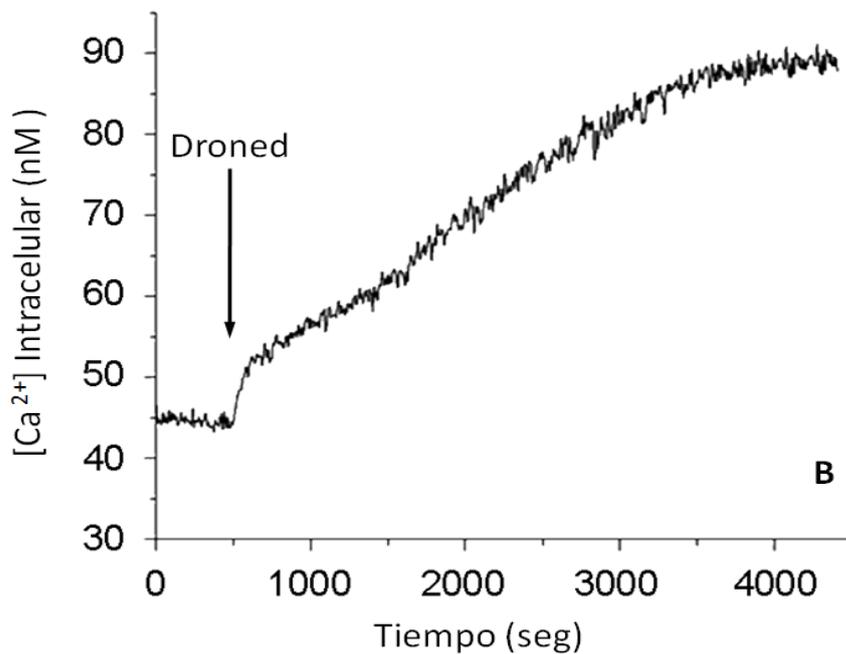
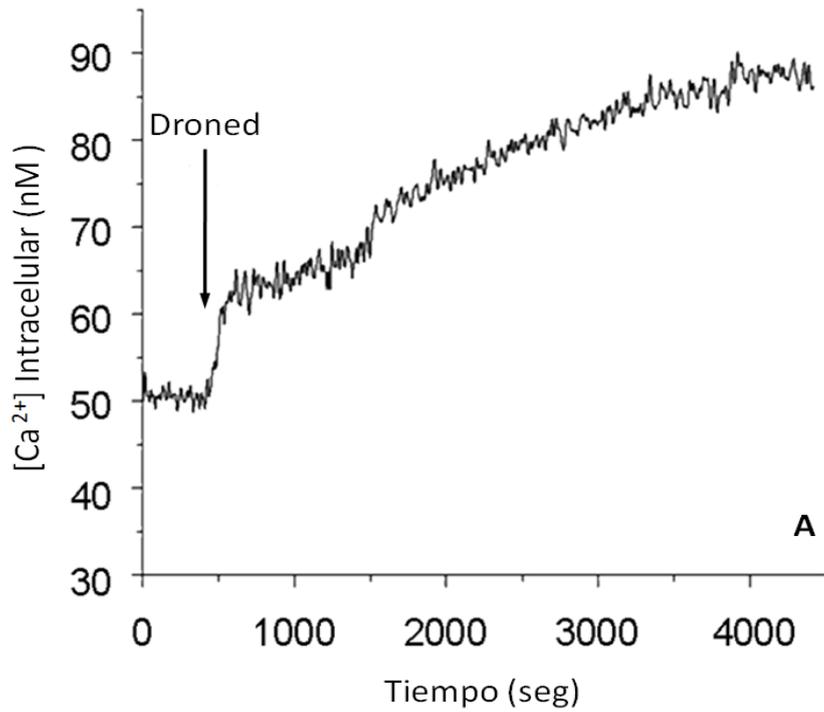


Figura 24. Efecto de la dronedarona sobre la concentración $[Ca^{2+}]_i$ en *T. cruzi*. Los parásitos fueron incubados con Fura 2-AM por 12 horas. (A) Efecto de la dronedarona (10 μ M) sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en presencia de 2 mM de Ca^{2+} . (B) Efecto de la dronedarona sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en ausencia de Ca^{2+} (2 mM EGTA).

5.2.4. Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial de *T. cruzi*

Los epimastigotes de *T. cruzi* fueron cargados con el fluoróforo rodamina 123, de manera de evaluar el efecto de la droga sobre el potencial electroquímico mitocondrial. En la figura 25A Se observa un aumento en la fluorescencia al añadir la dronedarona (10 μ M) (curva azul), la cual se estabiliza en el tiempo, así mismo se puede observar un incremento en la fluorescencia al añadir la amiodarona (10 μ M) (curva negra). Sin embargo este incremento no se da de manera tan abrupta como al agregar la dronedarona.

Al agregar FCCP, no se observa un cambio en la fluorescencia, de manera que ambas drogas ya habían logrado eliminar el potencial electroquímico mitocondrial.

Al realizar el experimento de manera inversa se observa que luego de añadir el FCCP ambas drogas lograr disminuir aún más el potencial electroquímico mitocondrial, observándose también que la dronedarona ejerce su efecto más rápidamente que la amiodarona.

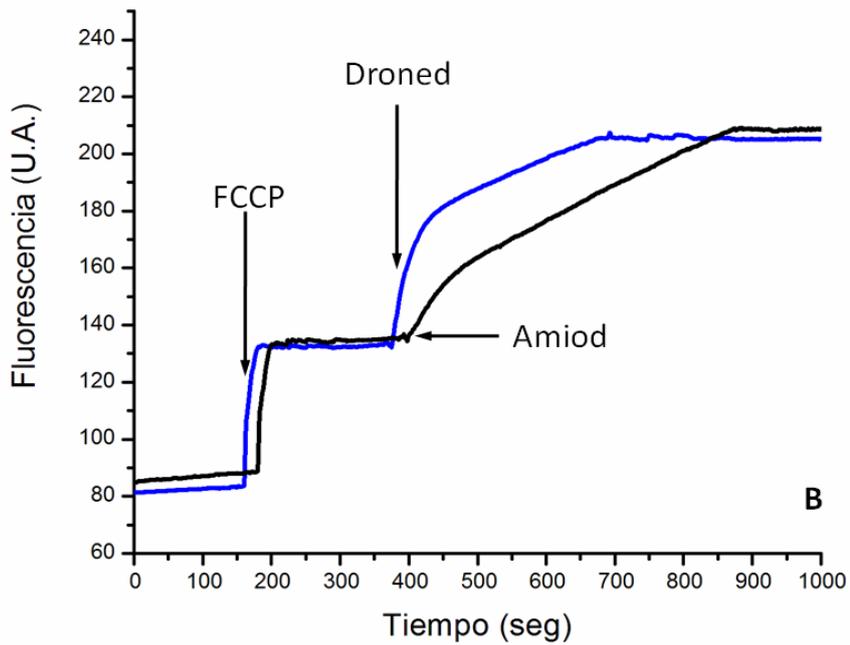
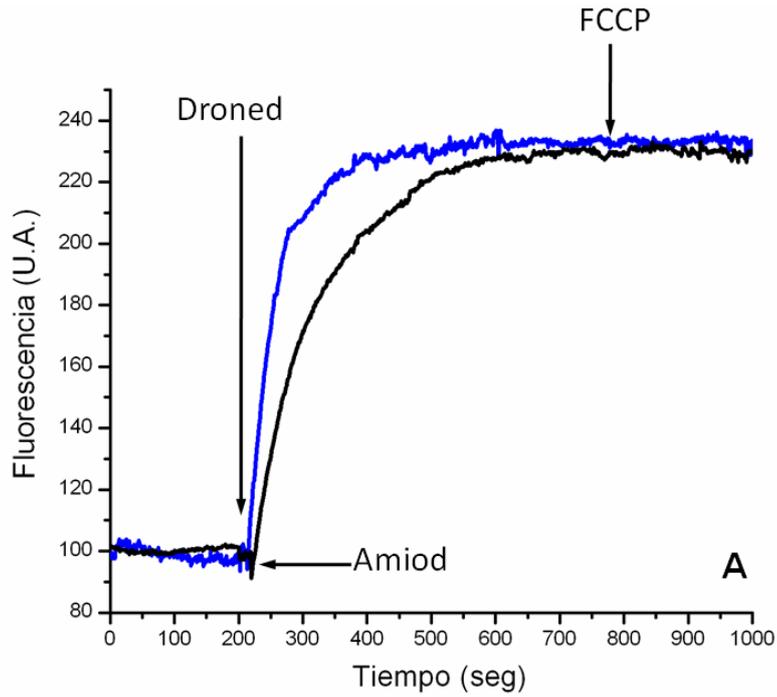


Figura 25. Efecto de la dronedarona y la amiodarona en el potencial electroquímico mitocondrial de *T. cruzi*. Los parásitos fueron incubados con Rodamina 123. (A) Efecto de la dronedarona (10 μ M) y la amiodarona (10 μ M) sobre el potencial electroquímico mitocondrial. (B) Efecto de la dronedarona y la amiodarona luego de añadir FCCP (1 μ M) sobre el potencial electroquímico mitocondrial.

5.2.5. Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre los acidocalcisomas de *T. cruzi*

Los parásitos fueron incubados con naranja de acridina. Este experimento nos permite observar el efecto de la dronedarona sobre la alcalinización de los acidocalcisomas.

En la figura 26A se observa que al agregar la dronedarona (10 μM) ocurre un incremento en la fluorescencia la cual se estabiliza en el tiempo (curva azul). Al agregar la amiodarona (10 μM) (curva negra) se observa igualmente un incremento de la fluorescencia, ya que esta droga también alcaliniza este organelo.

Se puede observar al evaluar las respuestas de los parásitos a las drogas, que la dronedarona actúa más rápidamente que la amiodarona. Al agregar la nigericina, se observa un pequeño incremento, ya que ambas drogas habían logrado alcalinizar este organelo.

Al realizar el experimento de forma inversa (25B), se observa que ocurre un incremento al agregar la nigericina. Sin embargo, al agregar la dronedarona (curva azul) y la amiodarona (curva negra), se observa aún otro incremento en la fluorescencia, ya que con la nigericina no se logró alcalinizar completamente el organelo.

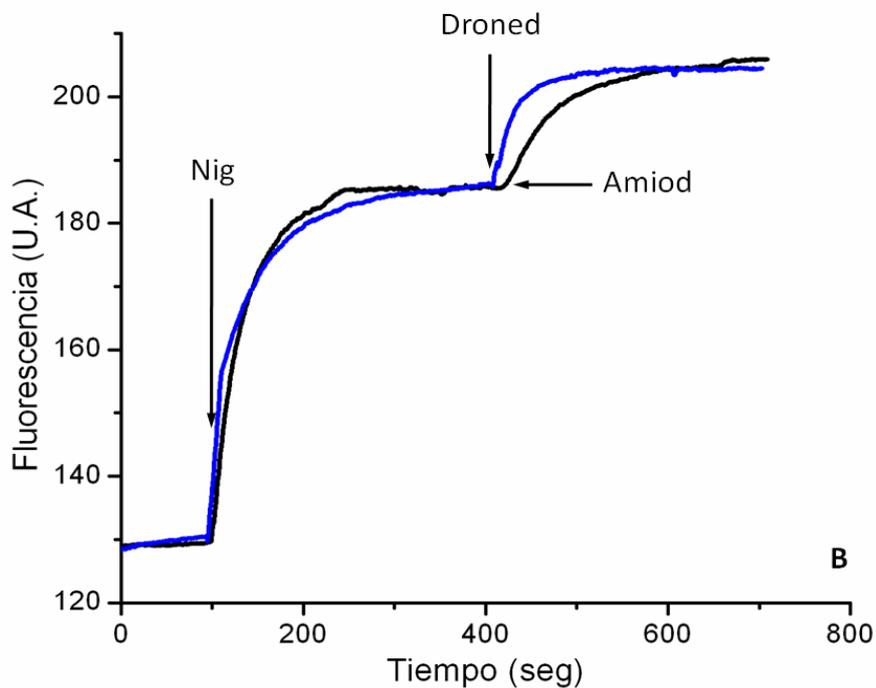
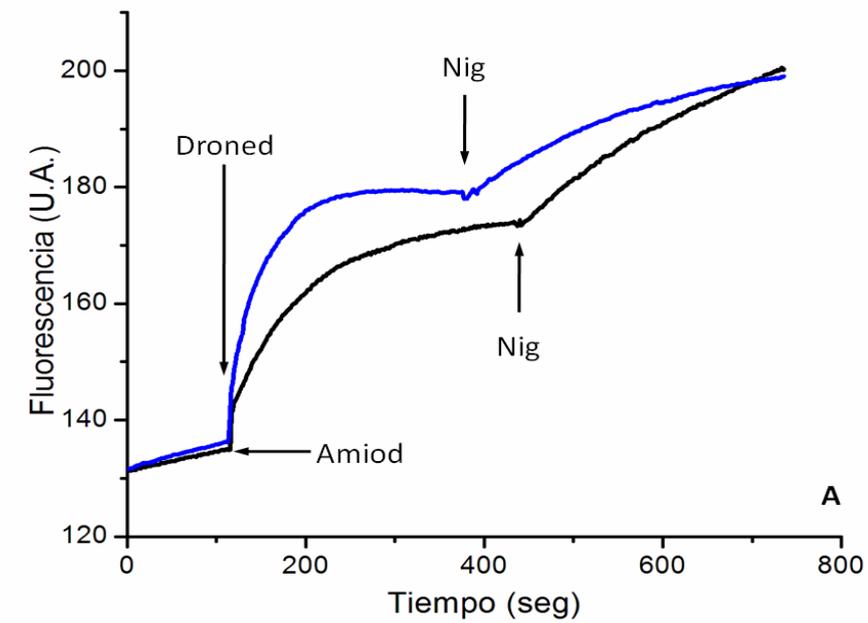


Figura 26. Efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre los acidocalcisomas de *T. cruzi*. Los parásitos fueron incubados con Naranja de acridina. (A) Efecto de la dronedarona (10 μM) y la amiodarona (10 μM) sobre los acidocalcisomas. (B) Efecto de la dronedarona y la amiodarona luego de añadir nigericina (1 μM) sobre los acidocalcisomas.

De manera de corroborar si el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ al añadir dronedarona se debía a la liberación de este ion desde los acidocalcisomas, se procedió a determinar el efecto de la nigericina sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en parásitos cargados con Fura 2. Una vez cargados y en el fluorímetro se agregó nigericina y se observó (figura 27) un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$. Posteriormente al agregar la dronedarona se observa un nuevo incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, pero de magnitud menor. Además, en este caso el comportamiento no es bifásico al agregar la droga, ya que este nuevo incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ se debe solamente a la liberación del ión desde la mitocondria.

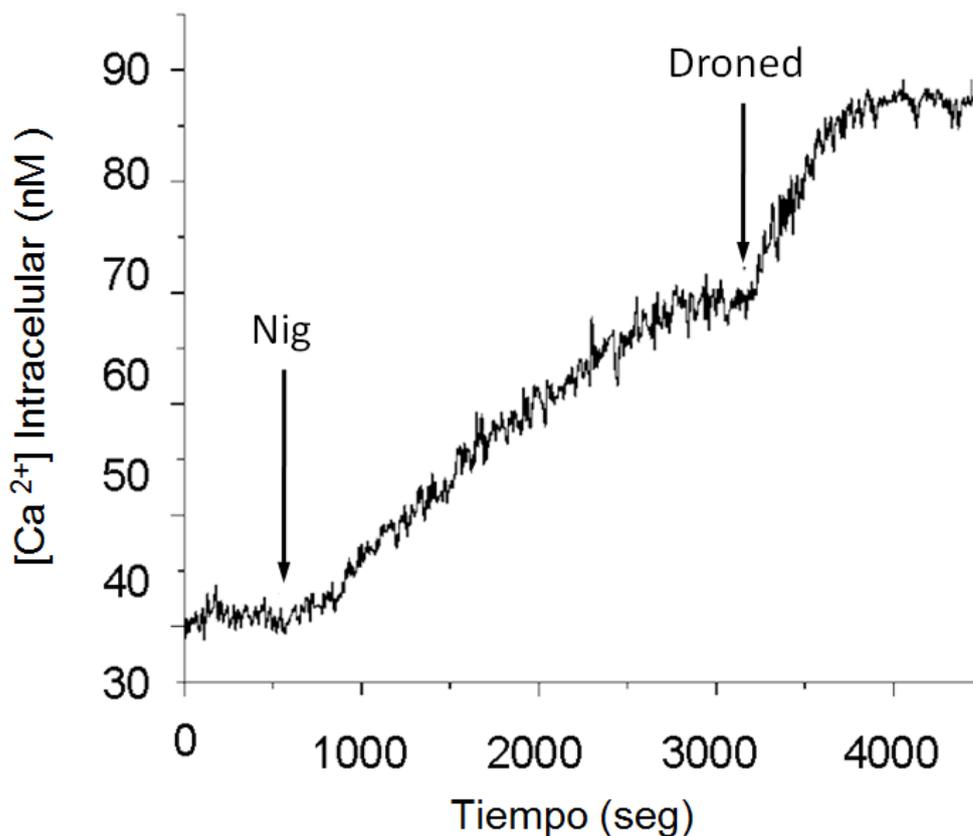


Figura 27. Efecto de la nigericina (1 μ M) y la dronedarona (10 μ M) en la homeostasis de Ca^{2+} intracelular de *T. cruzi*. Los parásitos fueron incubados con Fura 2. Se observa un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ al agregar ambos compuestos.

6. DISCUSIÓN

La tripanosomosis equina es una enfermedad parasitaria caracterizada clínicamente por anemia, y trastornos de locomoción, que afecta a una amplia variedad de animales domésticos y salvajes, produciendo considerables pérdidas económicas en la industria ganadera de países tropicales y subtropicales. En Venezuela, tanto la tripanosomiasis bovina como la equina están ampliamente difundidas en todo el territorio nacional, siendo la causa de daños directos e indirectos en la ganadería del país (Reyna-Bello y col., 1998). Por ello es de suma importancia el desarrollo de agentes quimioterapéuticos contra esta enfermedad, ya que los utilizados actualmente tienen años en el mercado y producen múltiples efectos secundarios.

Como se explicó anteriormente la amiodarona ha sido estudiada en nuestro laboratorio como posible tratamiento contra el *T. cruzi*, actuando por vía de la alteración de la $[Ca^{2+}]_i$ (Benaim y col., 2006). La amiodarona es utilizada como un antiarrítmico muy eficaz. Sin embargo, su uso se ve limitado por los efectos adversos que provoca. La dronedarona es un análogo de la amiodarona, desarrollada para superar estos efectos adversos asociados al yodo presente en su estructura, causante de mucho de los efectos secundarios. Es por ello que se planteó determinar el efecto de la dronedarona sobre *T. evansi*, tanto en experimentos *in vitro*, como en experimentos *in vivo*.

El Ca^{2+} ha sido ampliamente reconocido como un mensajero esencial en todos los eucariotas, tanto en mamíferos como en parásitos. La alteración en la homeostasis de Ca^{2+} , conduce a efectos letales que resultan en la muerte celular por apoptosis o necrosis (Benaim y García 2011).

Siendo la regulación del Ca^{2+} importante para los tripanosomatidios, se evaluó el efecto de la amiodarona y de la dronedarona sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en *T. evansi*, obteniendo que ambas drogas son capaces de incrementar la $[Ca^{2+}]_i$ en estos parásitos. Además se demostró que este incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ proviene de organelos intracelulares, en concordancia con los experimentos realizados por Benaim y col., 2006, donde la

amiodarona produjo el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ en *T. cruzi*, debido a la liberación de este ión desde compartimientos intracelulares. Sin embargo, se ha demostrado en *Saccharomyces cerevisiae* que el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la amiodarona ocurre por la entrada de este ión desde el exterior celular a través de un transportador en la membrana o por una entrada de Ca^{2+} capacitativa (Gupta y col., 2003). En este sentido fue muy interesante encontrar esta gran diferencia entre los hongos y estos parásitos.

Como se indicó, la amiodarona también incrementó la $[Ca^{2+}]_i$ en *T. evansi*. Sin embargo, la respuesta fue más lenta que la generada por la dronedarona. Probablemente la amiodarona, al ser más hidrofóbica que la dronedarona, se particiona en la membrana plasmática, lo cual retardaría su difusión a través del citoplasma y hacia los organelos blanco. Otra de las razones pudiera ser el peso molecular el cual es menor en la dronedarona (dronedarona: 593 gr/mol vs amiodarona: 682 gr/mol). Otra diferencia en cuanto al mecanismo de acción de estas drogas es que la dronedarona acusa un comportamiento bifásico respecto al incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, mientras que el efecto de la amiodarona es monotónico. Este efecto de la amiodarona en *T. evansi* resultó diferente al comportamiento de esta droga en *T. cruzi* y *L. mexicana*, parásitos en los cuales se observa un comportamiento bifásico.

Otro de los experimentos realizados consistió en determinar el efecto de la dronedarona y la amiodarona sobre el potencial electroquímico mitocondrial. La mitocondria de los tripanosomas desempeña un papel metabólico importante (Hannaert y col., 2003). Por otra parte se ha demostrado que la amiodarona produce la desestabilización del potencial electroquímico mitocondrial y la liberación de Ca^{2+} desde este organelo en *T. cruzi* (Benaim y col., 2006) y en *L. mexicana* (Serrano y col., 2006). Tanto la amiodarona como la dronedarona produjeron la alteración del potencial electroquímico mitocondrial en *T. evansi* y el efecto de ambas drogas resultó ser más potente que el FCCP. Benaim y col., 2006 demuestran mediante microscopia confocal, que la amiodarona genera un colapso del gradiente electroquímico de protones, lo cual eleva los niveles de Ca^{2+} citoplasmático por la salida del catión desde la mitocondria. En conclusión, nuestros resultados sugieren que la

amiodarona y la dronedarona también colapsan el potencial electroquímico mitocondrial, induciendo así la salida de Ca^{2+} desde la mitocondria. Sin embargo, diferente a la dronedarona, la amiodarona muestra un comportamiento bifásico en el efecto sobre el potencial electroquímico mitocondrial en *T. evansi*. Este resultado llama la atención ya que esta droga no presenta este comportamiento ni en *T. cruzi* (Benaim y col. 2006) ni en *L. mexicana* (Serrano y col. 2009a). Perrone y col., 2009 demuestran mediante la técnica de amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD) que existen diferencias pleomórficas en la mitocondrias de diferentes aislados de *T. evansi*. Es posible que dentro de las poblaciones evaluadas existieran diferencias morfológicas en la mitocondria por lo que se estarían evaluando diferentes poblaciones mitocondriales, obteniéndose la respuesta bifásica. En este sentido, la dronedarona, al actuar más rápidamente, no permitiría la visualización de estas diferencias poblacionales.

Los acidocalcisomas son organelos acídicos que fueron inicialmente definidos como tal en los tripanosomatídeos (Vercesi y col., 1994, Docampo y col., 1995), en los que se demostró la existencia de un compartimiento de Ca^{2+} sensible a nigericina, el cual es dependiente del gradiente de protones formado por una H^+ -ATPasa vacuolar.

La dronedarona produjo la alcalinización de los acidocalcisomas, al igual que la amiodarona. Sin embargo, esta última lo hace más lentamente. Ambas drogas tienen mayor efecto que la nigericina, en cuanto a la inducción de la alcalinización de este organelo.

En conclusión, se podría sugerir que el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por la dronedarona en *T. evansi*, proviene de la liberación del ión desde la mitocondria y de los acidocalcisomas.

Con el objetivo de evaluar la efectividad de la dronedarona como posible agente quimioterapéutico en la tripanosomosis equina, se diseñó un experimento con ratas infectadas con *T. evansi* a las que se les administraron diferentes concentraciones de la droga. En estos experimentos ninguna de las concentraciones de la droga utilizadas mostró efecto significativo, ya que las ratas perecieron, producto de la infección. Sin embargo, se observa que para las concentraciones correspondientes a 20 mg/Kg y 50 mg/Kg el

porcentaje de sobrevivencia se mantiene por más tiempo. A pesar de que la dronedarona tiene efecto sobre *T. evansi in vitro*, no demostró tener efecto sobre estos parásitos *in vivo*. Esto puede explicarse tomando en cuenta que estos parásitos están presentes en la circulación sanguínea, y esta droga se acumula en los tejidos, por lo que la concentración de dronedarona presente en la sangre se ve reducida.

La tripanosomosis genera en el animal anemia progresiva, la cual está relacionada con la disminución del porcentaje de hematocrito. Este porcentaje es la relación entre el volumen de glóbulos rojos con respecto a la sangre total. De manera de conocer si la droga tenía algún efecto sobre el porcentaje de hematocrito, se tomaron muestras de sangre de 24 ratas infectadas con *T. evansi*, que estaban sometidas a diferentes dosis de dronedarona. Los resultados demuestran que la droga no ejerce ningún efecto sobre el porcentaje de hematocrito, observándose que este porcentaje disminuye en el tiempo, característico de los animales que presentan tripanosomosis equina. Al realizar el análisis de varianza se obtuvo con un 95% de confianza que la dronedarona no ejerció efecto significativo sobre el porcentaje de hematocrito.

Como se mencionó anteriormente, *T. cruzi* es el parásito causante de la enfermedad del Chagas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), esta enfermedad se encuentra principalmente en América Latina, donde es endémica. A nivel mundial, se calcula que unas 10 millones de personas están infectadas con *T. cruzi* y muchas están a riesgo de contraer la enfermedad. Los tratamientos para esta enfermedad solo son efectivos en un 80% en la fase aguda de la enfermedad, mientras que su efectividad en las etapas crónicas avanzadas es bastante limitada y conlleva numerosos efectos adversos (Urbina, 2005). Es por ello que la OMS la incluye entre las “enfermedades desatendidas u olvidadas” (*neglected diseases*) y por ello es necesario el desarrollo de nuevos tratamientos.

En este sentido hemos evaluado el efecto de la dronedarona sobre la viabilidad de *T. cruzi*. Al evaluar el efecto de la dronedarona en un rango de concentraciones sobre las poblaciones de epimastigotes se obtuvo que con una concentración de 10 μ M es posible inhibir el crecimiento de estos parásitos, obteniéndose un IC₅₀ de 4.6 μ M, menor al obtenido

en trabajos previos de nuestro laboratorio, con la amiodarona ($IC_{50}= 7.9\mu M$) sobre estos parásitos (Benaim y col., 2006). Además, como hecho interesante, se observó que para cada concentración de ambas drogas la dronedarona es más potente con respecto a la viabilidad de estos parásitos.

Por otra parte, la dronedarona tuvo un efecto tripanocida en células Vero infectadas con amastigotes de *T. cruzi*, obteniéndose que con $2\mu M$ se ya no se observan células Vero infectadas. Este dato es interesante ya que representa la quinta parte de la dosis necesaria para inhibir el crecimiento de epimastigotes. Es importante resaltar que la forma amastigote es la clínicamente relevante. El estado de amastigote de *T. cruzi* está presente en la fase crónica de la enfermedad, estos amastigotes se acumulan en el corazón, lo que conlleva a la inflamación del miocardio y posteriormente a la muerte de la persona. Para este experimento el IC_{50} obtenido fue de $0.75\mu M$, mientras que el IC_{50} para la amiodarona reportado por Benaim y col., 2006 en experimentos análogos fue de $2.7\mu M$.

Como se mencionó anteriormente el Ca^{2+} es un regulador pluripotencial en numerosos procesos celulares en eucariotas y está involucrado en procesos celulares importantes en estos parásitos (Moreno y col., 1994; Dorta y col., 1995; Manque y col., 2003; Yoshida, 2006) siendo un posible blanco quimioterapéutico. Como se explicó anteriormente la amiodarona produce la disrupción de la $[Ca^{2+}]_i$ en *T. cruzi*. En este sentido se evaluó el efecto de la dronedarona en los parásitos observando un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ con comportamiento bifásico tanto en los experimentos realizados en presencia de Ca^{2+} extracelular como en los realizados en ausencia del mismo, lo que indica que el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ viene dada por la liberación de organelos intracelulares.

La dronedarona produce un efecto sobre el potencial electroquímico mitocondrial de *T. cruzi*, además este efecto es mayor que el inducido por el protonóforo FCCP, lo que demuestra la potencia de esta droga en la alteración del mismo. La amiodarona también tuvo un efecto mayor que el FCCP. Sin embargo, el efecto es más lento que el producido por la dronedarona. Estos experimentos tomados en conjunto, demuestran que parte del Ca^{2+} liberado proviene de este organelo.

También estudiamos el efecto de ambas drogas sobre los acidocalcisomas en *T. cruzi*, observando que la dronedarona es capaz de alcalinizar los mismos, al igual que la amiodarona y que este efecto es mayor que el inducido por la nigericina. Nuevamente, se pudo observar que la dronedarona actúa más rápidamente que la amiodarona, tanto antes como después de la adición de nigericina.

De manera de conocer si el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ viene dada por la liberación de este ión desde los acidocalcisomas se realizó un experimento cargando los parásitos con Fura 2. Al agregar nigericina se observa un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, lo que demuestra que en efecto este organelo es uno de los responsables del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, ya que al agregar la dronedarona se observa otro incremento proveniente de la liberación de Ca^{2+} desde la mitocondria.

Los resultados en respuesta a la droga en ambos parásitos fueron distintos, ya que aunque pertenecen a la misma familia, son de secciones diferentes. *T. cruzi* completa su ciclo de vida en la parte posterior del intestino del vector, mientras que *T. evansi* lo hace en las glándulas salivales. Por otra parte *T. cruzi* presenta tres estadios con morfologías diferentes, mientras que *T. evansi* solo presenta la forma de tripomastigote. *T. evansi* se encuentra en sangre y en linfa, mientras que *T. cruzi* se aloja en tejidos. *T. evansi* a diferencia de *T. cruzi* carece de una malla de ADN del kinetoplasto (kADN) en forma de maxicirculo (Los miembros del orden Kinetoplastida, se caracterizan por la presencia de una malla de kADN, el cual consta de hasta 10 maxicírculos y miles de minicírculos). Por lo que aunque la dronedarona ejerce un efecto sobre estos parásitos, la respuesta de estos a la droga es diferente.

La dronedarona promete ser un nuevo tratamiento contra la enfermedad del Chagas, así como de otras infecciones causadas por tripanosomatidios, como la leishmaniasis, ya que en nuestro laboratorio se ha demostrado que la amiodarona ejerce un efecto sobre el parásito causante de la misma (*Leishmania mexicana*). Además como se indicó anteriormente la dronedarona ya ha sido aprobada por la FDA y su uso como antiarritmico de uso seguro está ampliamente documentado.

CONCLUSIONES

- La dronedarona al igual que la amiodarona produce un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ tanto en *T. cruzi* como en *T. evansi*.
- La dronedarona desestabiliza el gradiente electroquímico de protones en la mitocondria de *T. cruzi* y de *T. evansi*.
- La dronedarona es capaz de alcalinizar los acidocalcisomas de *T. cruzi* y *T. evansi*.
- El incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por la dronedarona en *T. cruzi* y *T. evansi* proviene de la liberación del ión desde la mitocondria y de los acidocalcisomas.
- La dronedarona no es efectivo como agente quimioterapeutico en ratas infectadas con *T. evansi*, tanto en el porcentaje de sobrevivida como en el porcentaje de hematocrito de estos animales.
- La dronedarona ejerce un efecto inhibitorio en el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*, obteniendo la máxima inhibición a una concentración de 10 μ M de la droga.
- La dronedarona tiene efecto tripanocida sobre células de mamífero (Vero) infectadas con amastigotes de *T. cruzi*, la fase clínicamente relevante. El IC_{50} fue de 0.75 μ M y La mínima concentración inhibitoria se obtuvo con 2 μ M.
- La dronedarona promete ser un tratamiento eficaz contra el “mal de Chagas” debido a su actividad antiparasitaria.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Arias, J., García, F., Rivera, M., López, R. 1997. *Trypanosoma evansi* in Capybara from Venezuela. *J. Wildlife. Dis.* **33**: 359-361.
- Benaim, G. 1993. Homeostasis de Ca^{2+} intracelular. La calmodulina y la Ca^{2+} -ATPase de membrana plasmática de tritpanosomatidios. *Acta Cient. Venez.* **44**: 57-66.
- Benaim, G. 1996. Intracellular Calcium Signaling and Regulation in *Leishmania*. In "Molecular and Immune Mechanism in the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis" (F Tapia, G Caceres-Dittmar, MA Sanchez, Eds. RG, Landes Co., Biomedical Pub., Austin, Texas. Cap. 5. pp 89-106.
- Benaim, G., Bermudez, R., Urbina, J. 1990. Ca^{2+} transport in isolated mitochondrial vesicles from *Leishmania braziliensis* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **39**: 61-68.
- Benaim, G., Cervino, V. 2000. Intracellular Calcium Homeostasis and Signaling Trypanosomatids. *Elect. J. Pathol. Histol.* **6**: 1-11.
- Benaim, G., Garcia, C. 2011. Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishmaniasis. *Trop. Biomed.* **28**: 471-481.
- 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., Villalobos, A. 2002. Phosphorylation of Calmodulin. *Eur. J. Biochem.* **269**: 3619–3631.
- Benítez, M., Pallota, F., Arenas, E., García, J., Ruiz, A. 1984. Efecto del Isometamidium en la infección experimental por *Trypanosoma venezuelense* en ratas y equinos. *Vet. Trop.* **9**: 17 - 28.

- Berenguer, J. 2006. Manual de parasitología, morfología y biología de parásitos de interés sanitario. Publicacions I Edicions de la Universitat de Barcelona. Barcelona, España.
- Berk, A., Lodish, H. 2005. Biología Celular y Molecular. Editorial Médica Panamericana. Quinta Edición. Madrid, España.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. 2000. The versatility and universality of calcium signaling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **1**:11-21.
- Bogdan, R., Goegelein, H., Ruetten, H. 2011. Effect of dronedarone on Na⁺, Ca²⁺ and HCN channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **383**:347-56.
- Botero, D., Restrepo, M. 2006. Parasitosis humana. Cuarta Edición. Editorial Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia.
- Bowman, D. 2004. Parasitología Veterinaria de Georgi. Octava Edición. Elsevier. Madrid, España.
- Bula, C. 2007. Parasito genoma y biología. Aproximación molecular al estudio de *Trypanosoma rangeli* y su relación con *Trypanosoma cruzi*. Pontificia Universidad Javeriana. Primera edición. Bogota, Colombia.
- Canelon, J., Melendez, R. 2003. Posible Origen del *Trypanosoma evansi* en Venezuela. *Vet. Trop.* **28**:155-167.
- Carafoli, E. 1987. Intracelular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 395-433.
- Courchesne, W.E. 2002. Characterization of a novel, broad-based fungicidal activity for the antiarrhythmic drug amiodarone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **300**:195-199.
- Cuellar, A., Carrique, J. 1998. Informe sobre Investigación Epidemiológica de Trypanosomiasis en el área de San Matías y Pantanal Boliviano.
- Curtis, H., Barnes, S., Schnek, A. 2008. Biología. Editorial Med. Panamericana. Séptima Edición. Madrid, España.

- Chung SH, Swindle J. 1990. Linkage of the calmodulin and ubiquity loci in *Trypanosoma cruzi*. *NucleicAcid Res* **18**: 4561-4569.
- Deblin, T. 2004. Bioquímica. Editorial Reverte. Cuarta Edición. Barcelona, España.
- Desquesnes, M. 2004. Livestock Trypanosomoses and their Vectores in Latin America. CIRAD/OMTV OIE. France.
- Desquesnes, M., Kamyngkird, K., Pruvot, M., Kengradomkij, C., Bossard, G., Sarataphan, N., Jittapalapong, S. 2009. Antibody-ELISA for *Trypanosoma evansi*: application in a serological survey of dairy cattle, Thailand, and validation of a locally produced antigen. *Prev. Vet. Med.* **90**:233-241.
- Docampo, R. 2008. Estructura y función de los acidocalcisomas. Mensaje Bioquímico, Vol. XXXII.
- Docampo, R., Moreno, M., Vercesi, A. 1993. *Trypanosoma cruzi* 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., 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.
- Dorta ML, Ferreira AT, Oshiro ME, Yoshida N. 1995. Ca²⁺ signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. *Mol. Biochem. Parasitol.* **73**:285-289.
- Eintracht J, Maathai R, Mellors A, Ruben L. 1998. Calcium entry in *Trypanosoma brucei* is regulated by phospholipase A₂ and arachidonic acid. *Biochem. J.* **336**:659-666.

- Forlano, M., Melends, R., Canelo, J. 2011. Seropositividad a *Trypanosoma evansi* en caballos criollos infectados naturalmente en tres hatos del Estado Apure. Revista Científica, FCV-LUZ / **21**: 131–136.
- Godfraind., T. 2004. Calcium Channel Blockers. Editorial Birkhäuser. Alemania.
- Gonzales, E., González, B., González, R., Linares, N., Mijares, A., Perrone, T., Mendoza, M. 2006. Estandarización de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para el diagnóstico de la tripanosomosis animal causada por *Trypanosoma evansi*. *Agronomía Trop.* **56**: 489-493.
- Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsient, R. 1984. A New Generation of Calcium Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties. *J. Biol. Chem.* **266**: 3440-3450.
- Gupta SS, Ton VK, Beaudry V, Rulli S, Cunningham K, Rao R. 2003. Antifungal activity of amiodarone is mediated by disruption of calcium homeostasis. *J. Biol. Chem.* **278**: 28831-9
- Hangland, R. 2002. Handbook of fluorescence Probes and research Products. Editorial Molecular Probes. Novena Edition. Oregon.
- Hannaert V, Bringaud F, Opperdoes FR, Michels PA. 2003. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid. Biol. Dis.* **2**:11.
- Hoare C. 1972. Herpetosoma from man and other mammals. In *The Trypanosomes of Mammals: A Zoological Monograph*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 288-314.
- Hoare, C. 1965. Vampire bats as vectors and hosts of equine and bovine trypanosomes. *Acta Tropical.* **22**:204-216.
- Jiménez, F., Merchant, H. 2003. Biología Celular y molecular. Editorial Pearson. Primera Edición. DF México, México.
- Joshi, PP., Shegokar, VR., Powar, RM., Herder, S., Katti, R., Salkar, HR., Dani, VS., Bhargava, A., Jannin, J., Truc P. 2005. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73**:491-495.

- Kathofer, S., Thomas, D., Karle, C. 2006. The novel Antiarrhythmic Drug Dronedarone: Comparison with Amiodarone. *Cardiovascular Drug Rev.* **23**: 217-230.
- Korolkovas, A., Burckhalte, J. 1979. Compendio Esencial de química farmacéutica. . Primera Edición. Reverte. Barcelona, España.
- Lai DH, Wang QP, Li Z, Luckins AG, Reid SA, Lun ZR. 2010. Investigations into human serum sensitivity expressed by stocks of *Trypanosoma brucei evansi*. *Int. J. Parasitol.* **40**:705-10.
- Lammel, E., Barbieri, M., Wilkowsky, S., Bertini F., Isola E. 1996. *Trypanosoma cruzi*: involvement of intracellular calcium in multiplication and differentiation. *Exp. Parasitol.* **83**:240-249.
- Lanham, S., Godfrey, D. 1978. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other animals using DEAE-Celulosa. *Exp. Parasitol.* **28**:521-534
- Latorre, R. 1996. Biofísica y fisiología Celular. Editorial Universidad de Sevilla. Sevilla. España.
- Lemercier, G., Dutoya, S., Luo, S., Ruiz, F.A., Rodrigues, C.O., Baltz, T., Docampo, R., Bakalara, N. 2002. A Vacuolar-type H⁺-Pyrophosphatase Governs Maintenance of Functional Acidocalcisomes and Growth of the Insect and Mammalian Forms of *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **277**: 37369-37376.
- Luckins, A. G. 1988. *Trypanosoma evansi* in Asia. *Parasitol.Today.* **4**:137-142.
- Manque, P., Neira, I., Atayde, V., Cordero, E., Ferreira, A., Da Silveira, J., Ramirez, M., Yoshida, N. 2003. Cell Adhesion and Ca²⁺ Signaling Activity in Stably Transfected *Trypanosoma cruzi* epimastigotes Expressing the Metacyclic Stage-Specific Surface Molecule gp82. doi: 10.1128/IAI.71.3.1561-1565.2003. *Infect. Immun.* **71**:1561-1565.
- Martinez, R., Wang, Y., Benaim, G., Benchimol, M., De Souza, W., Scott, D., Docampo, R. 2002. A protonpumpingpyrophosphatase in the Golgi

apparatus and plasma membrane vesicles of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **120**:205-13.

- Maudlin, I., Holmes, P., Miles, M. 2004. The Tripanosomiasis. Editorial Cabi. London, U.K.
- McCabe, R.E. 1988. Failure of ketoconazole to cure chronic murine Chagas disease. *J. Infect. Dis.* **158**: 1408-1409.
- 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.
- Miranda, M. Evaluación Epidemiológica de la Trypanosomosis bovina en el pantanal de San Matías. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.A.G.R.M.
- Molina, J., Martins-Filho, O., Brener, Z., Romanha, A., Loebenberg, D., Urbina, J. 2000. Activity of the Triazole Derivative SCH 56592 (Posaconazole) Against Drug-Resistant Strains of the Protozoan Parasite *Trypanosoma cruzi* in Immunocompetent and Immunosuppressed Murine Hosts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 150-155.
- Morad, M., Kostyuk, P. 2001. Calcium Signaling. Editorial IOS Press. Amsterdam. Netherlands.
- Moreno, S., Docampo, R. 2003. Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:1-6.
- Moreno, S., Vercesi, A., Pignataro, O., Docampo, R. 1992. Calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. *J. Exp. Med.* **180**:1535-1540.
- Nolan, DP., Revelard, P., Pays, E. 1994. Overexpression and characterization of a gene for a Ca²⁺-ATPase of endoplasmic reticulum in *Trypanosoma brucei*. *J Biol. Chem.* **269**: 26045-26051
- Olsen, O. 1986. Animal parasites: Their Life Cycles and Ecology. Tercera Edición. Editorial Courner Dover Publications.

- Ortega, H., Lopez, M., Bula, C. 2004. KPM-11: Proteina 11 de Membrana de Kinetoplastidos. *Universitas Scientiarum*. **9**: 29-44.
- Page, R., Hamad, B., Kirkpatrick, P. 2009. Dronedarone. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **8**: 769-770.
- Paveto C, Pereira C, Espinosa J, Montagna AE, Farber M, Esteva M, Flawia MM, Torres HN.1995. The nitric oxide transduction pathway in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* **270**: 16576-16579.
- Pérez-Gordones, M., Lugo, M., Winkler, M., Cervino, V., Benaim, G. 2003. Diacylglycerol regulates the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes by direct interaction. *Arch. Biochem. Biophys.* **489**:55-61
- Perrone TM, Gonzatti MI, Villamizar G, Escalante A & Aso PM.2009. Molecular profiles of Venezuelan isolates of *Trypanosoma* sp. by random amplified polymorphic DNA method. *Vet. Parasitol.* **161**: 194-200.
- Pocock, G., Richards, C. 2005. Fisiología Humana. La base de la medicina. Segunda Edición. Editorial Elsevier. Barcelona, España.
- Portillo, R., Bruges, G., Delgado, D., Betancourt, M., Mijares, A. 2010. *Trypanosoma evansi*: Pharmacological evidence of a nicotinicacetylcholine receptor. *Exp. Parasitol.* **125**:100-105.
- Ramirez-Iglesias, J.R., Eleizade, A., Gomez-Pineros, E., Mendoza, M.2011. *Trypanosoma evansi*: A comparative study of four diagnostic techniques for trypanosomosis using rabbit as an experimental model. *Exp. Parasitol.* **128**:91-6
- Reyna-Bello A., F. García, M. Rivera, B. Sanso y P.M. ASO. 1998. Enzyme linked immune sorbent assay (ELISA) for detection of anty-*Trypanosoma evansi* equine antibodies. *Vet. Parasitol.* **80**: 149-159.
- Roche, M. 1978. Rafael Rangel: Ciencia Política en la Venezuelade principios de siglo. Monte Ávila Editores. Caracas. 259 pp.
- Rojas, H., Ramos, M., Benaim, G., Caputo, C., Dipolo, R. 2008. The activity of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger largely modulates the Ca²⁺i signal induced by hypoosmotic

stress in rat cerebellar astrocytes. The effect of osmolarity on exchange activity. *J Physiol. Sci.* **58**: 277-289.

- Romero, H. 2005. Parasitología y Enfermedades Parasitarias de animales domésticos. Editorial Limusa. DF México, México.
- 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.
- Serrano, X., García, Y., Fernández, A., Rodríguez, N., Rojas, H., Visbal, G., Benaim, G. 2009a. Amiodarone Destabilizes Intracellular Ca²⁺ Homeostasis and Biosynthesis of Sterols in *Leishmania mexicana*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 1403-10.
- Sperelakis, N. 2011. Cell Physiology Source Book: Essentials of Membrane Biophysics. Editorial Academic Press. Cuarta Edición. Londres, Inglaterra.
- Stojdl, D., Clarke, M. 1996. *Trypanosoma brucei*: analysis of cytoplasmatic Ca²⁺ during differentiation of bloodstream stages in vitro. *Exp. Parasitol.* **83**:134-146.
- Thompson, R. C. A., I. L. Owen, I. Puana, D. Banks, T.M. Davis and S. A. Reid. 2003. Parasites and biosecurity: the example of Australia. *TRENDS in Parasitol.* **19**:410-416.

- Tonin, A., Da Silva, A., Carvalho, N. 2011 . *Trypanosoma evansi*: Ca²⁺-ATPase activity and lipid peroxidation in skeletal muscle from rats experimentally infected. *Exp. Parasitol.* **128**: 377–381.
- Tschudi C, Young AS, Ruben L, Patton CI, Richards SS. 1985. Calmodulin genes in trypanosomes are tandemly repeated and produce multiple mRNAs with a common 5' leader sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 3998-4002.
- 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.
- Vanhamme, L., Pays, E. 1995. Control of gene expression in trypanosomes. *Microbial Reviews.* **59**: 223–240.
- Velazquez., Lorenzo, P. 2009. Farmacología básica y clínica. Décimo Octava Edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.
- Vercesi AE, Bernardes CF, Hoffman, ME, Gadelha FR, Docampo R. 1991. Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ. *J. Biol. Chem.* **266**: 14431-14434.
- 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.
- Womack, S., Tarpley, H., Little, S., Latimer, K. Class of 2006 (Womack), Department of Parasitology (Little), and Department of Pathology (Tarpley, Latimer), College of Veterinary Medicine, University of Georgia, Athens, GA 30602-7388.

- Xiong, ZH., Ruben, L. 1998. *Trypanosoma brucei*: the dynamics of calcium movement between the cytosol, nucleus, and mitochondrion of intact cells. *Exp. Parasitol.* **88**: 231-239.
- Yoshida Nobuko. 2006. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad. Bras. Cienc.* **78**:87-111.
- <http://parasitologiamicro.blogspot.com/2008/10/distribucion-geografica.html> (Consulta: 01 de octubre de 2011)
- <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm050691f> (Consulta 12 de Abril)
- <http://www.ajtmh.org/content/73/3/491.long>. (Consulta: 10 de Marzo de 2012)
- <http://www.fac.org.ar/fec/chagas2/llave/md5/md508/urbina.htm> (Consulta: 01 de octubre 2011)
- <http://www.fibrilacionauricularonline.es/default.aspx?idPage=4134> (Consulta: 6 de mayo 2011)
- http://www.flap2009.com/files/block_8/libroresumenesFLAP2009.pdf (Consulta: 01 de agosto 2011)
- [http://www.influentialpoints.com/Gallery/Horseflies Clegs and Deerflies.htm](http://www.influentialpoints.com/Gallery/Horseflies_Clegs_and_Deerflies.htm) (Consulta: 01 de octubre 2011)
- <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: 20 de marzo 2011)
- http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0001-37652006000100010&script=sci_arttext (Consulta 2 de Abril 2012)
- <http://www.slideshare.net/quest8c17bc/flagelados> (Consulta: 01 de Octubre de 2011)
- http://www.unmsm.edu.pe/clemyp/Moscas/Imagenes/tabanus_sp.jpg (Consulta: 01 de octubre de 2011)
- <http://www.vet.uga.edu/VPP/clerk/womack/index.php>. (Consulta: 01 de agosto 2011)

- <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/> (Consulta: 01 de octubre de 2011)
- STATISTIX ANALYTICAL SOFTWARE. Versión 8,0. 2003.