

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Escuela de Ciencias Biológicas
Licenciatura en Biotecnología**

Informe Escrito Final

Actividad tripanocida de compuestos purificados de plantas del género *Hamelia* en modelos experimentales *in vitro* y establecimiento de la infección crónica con *Trypanosoma cruzi* en un modelo *in vivo*.

Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar por el grado académico de Licenciatura en Biotecnología

Pamela Alfaro Vargas: (207270296)

Mónica Baizán Rojas: (402160127)

Campus Omar Dengo

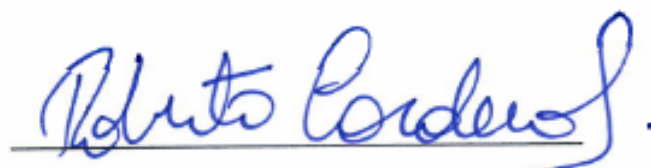
Heredia, 2021

Este trabajo de graduación fue aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biología con Énfasis en Biotecnología.



M.Sc. Bernal Morera Brenes

Representante, Decano, quién preside



Dr. Roberto Cordero Solórzano

Representante, Unidad Académica



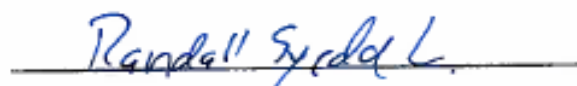
M.Sc. Andrea Urbina Villalobos

Tutora



Dr. Randall Loaiza Montoya

Asesora



M.Sc. Randall Syedd León

Invitado especial

Agradecimiento

Son muchas las personas que han contribuido al proceso y conclusión de esta Tesis. En primera instancia nos gustaría agradecer a nuestra “*alma mater*”, la Universidad Nacional de Costa Rica, que nos ha permitido formarnos con profesionales de alto nivel y nos ha ayudado a crecer personal y profesionalmente. De igual forma, queremos agradecer a nuestra tutora la M.Sc. Andrea Urbina Villalobos quien ha estado siempre anuente a apoyarnos y aconsejarnos durante todo el desarrollo del trabajo. A nuestros asesores, el Dr. Randall Loaiza Montoya, por darnos el acceso al CENIBiot y facilitarnos los recursos necesarios para la conclusión de nuestros objetivos y el Dr. Javier Alvarado Mesén, por su gran aporte en la revisión de esta tesis. A la Dra. Gaby Dolz de la Escuela de Medicina Veterinaria de la UNA por poner a nuestra disposición materiales necesarios para desarrollar nuestros experimentos, así como al Dr. Alejandro Alfaro Alarcón, patólogo de dicha Escuela por realizar los estudios histopatológicos. Al M.Sc. Roberto Avendaño Vega, investigador del CENIBiot, por su tiempo y sus consejos. Por último, gracias a todas las personas que participaron en este proyecto de manera directa o indirecta, todo pequeño aporte se ve reflejado hoy en la culminación de este trabajo.

Dedicatoria

Dedicamos esta Tesis de manera especial a nuestros padres por el apoyo incondicional que nos han brindado durante toda nuestra vida. Su amor y sacrificio nos han permitido alcanzar nuestras metas y concluir esta etapa trascendental de nuestra vida. Muchas gracias por siempre motivarnos a seguir nuestros sueños y apoyarnos en los momentos difíciles.

Índice

Miembros del tribunal.....	I
Agradecimiento.....	II
Dedicatoria.....	III
Índice.....	IV
Índice de Cuadros	VI
Índice de Figuras.....	VII
Abreviaturas o acrónimos	IX
Resumen.....	X
1. Introducción	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Justificación	6
1.3. Planteamiento del problema.....	7
1.4. Objetivos.....	7
1.4.1. Objetivo general.....	7
1.4.2. Objetivos específicos	7
2. Marco Teórico.....	8
<i>Trypanosoma cruzi</i>	8
Ciclo de vida del parásito.....	8
Ciclos de transmisión.....	9
Variabilidad intraespecífica	9
Epidemiología.....	10
Transmisión de la enfermedad de Chagas	11
Enfermedad de Chagas	11
Diagnóstico de la enfermedad.....	13
Tratamientos	14
Evaluación de la actividad tripanocida contra amastigotos	15
Plantas del género <i>Hamelia</i>	17
3. Marco Metodológico.....	19
Parásitos para infección <i>in vitro</i>	19
Células.....	19
Compuestos para análisis.....	20
Modelo de infección <i>in vitro</i> de la enfermedad de Chagas en células 3T3	20
Infección celular inicial.....	20
Modelo de infección celular <i>in vitro</i> para obtención de tripomastigotos infectantes	21
Cuantificación de la infección celular.....	21

Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad tripanocida de compuestos purificados de <i>Hamelia</i> sp.....	22
Actividad citotóxica de compuestos purificados de <i>Hamelia</i> sp. contra células 3T3 y Vero.	22
Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad de compuestos purificados de <i>Hamelia</i> sp. contra amastigotos	23
Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad de compuestos purificados de <i>Hamelia</i> sp. contra epimastigotos	24
Criterios de selectividad.....	24
Caracterización genética de la cepa ALF y Oso de <i>T. cruzi</i>	25
Parásitos para infección <i>in vivo</i>	26
Ratones para infección <i>in vivo</i>	26
Modelo murino de infección crónica de la enfermedad de Chagas	27
Infección de ratones	27
Determinación de las parasitemias.....	28
Pruebas histopatológicas.....	28
Pruebas moleculares para detección de ADN de <i>T. cruzi</i> tisular	29
4. Resultados.....	30
Infección de células 3T3 con tripomastigotos de <i>T. cruzi in vitro</i>	30
Infección celular inicial.....	30
Modelo de infección celular <i>in vitro</i> para obtención de tripomastigotos.....	32
Cuantificación de la infección celular.....	33
Evaluación del efecto citotóxico de compuestos purificados de <i>Hamelia</i> sp. sobre células 3T3 y Vero.....	34
Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad tripanocida de compuestos purificados de <i>Hamelia</i> sp. contra amastigotos intracelulares de la cepa ALF y Dm28c.....	37
Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad citotóxica de los compuestos purificados de <i>Hamelia</i> sp. contra epimastigotos.	40
Caracterización genética de la cepa ALF y Oso de <i>T. cruzi</i>	42
Modelo murino de infección crónica de la enfermedad de Chagas.	46
Infección de ratones	46
Determinación de las parasitemias.....	46
Pruebas histopatológicas.....	48
Pruebas moleculares para detección de ADN de <i>T. cruzi</i> tisular	52
5. Discusión.....	54
6. Conclusiones	65
7. Recomendaciones	66
8. Referencias.....	68
9. Anexos	81

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Concentración de parásitos de cada cepa de <i>T. cruzi</i> . inyectados a ratones.....	27
Cuadro 2. Ciclo de vida y modelo de infección <i>in vitro</i> con dos cepas distintas de <i>T. cruzi</i> en células 3T3.....	34
Cuadro 3. IC50 e índice de selectividad (IS) obtenidos a partir de ensayos de citotoxicidad realizados en células 3T3 y epimastigotos, más actividad tripanocida realizados contra amastigotos intracelulares.	42
Cuadro 4. Alteraciones histopatológicas en el corazón de ratones C57BL/6 infectados con tripomastigotos de <i>T. cruzi</i> de la cepa ALF con tres concentraciones diferentes	49
Cuadro 5. Alteraciones histopatológicas en el corazón e intestino de ratones C57BL/6 infectados con tripomastigotos de <i>T. cruzi</i> de la cepa Dm28c.	51

Índice de Figuras

Figura 1. Curva de infección de la cepa Dm28c en células 3T3.	31
Figura 2. Curva de infección de la cepa ALF en células 3T3.....	32
Figura 3. Promedio de tripomastigotos/mL obtenido 8 y 15 días p.i para la cepa Dm28c y ALF en células 3T3.....	33
Figura 4. Promedio de amastigotos por célula 72 horas p.i para cada cepa.	34
Figura 5. Efecto de c1 sobre la viabilidad celular de las células Vero E6 y 3T3 después de 72 horas de incubación.	35
Figura 6. Efecto de c1, c2, c3 sobre la viabilidad de la línea celular 3T3 después de 72 horas de incubación.	36
Figura 7. Efecto de c1 sobre el porcentaje de infección en células 3T3 y Vero E6.	37
Figura 8. Promedio de amastigotos por célula después de 72 horas de incubación con c1.....	38
Figura 9. Efecto de c2 y c3 sobre el porcentaje de infección celular después de 72 horas de incubación.	39
Figura 10. Promedio de amastigotos por célula después de 72 horas de incubación con c2 y c3.	40
Figura 11. Efecto de c1, c2, y c3 sobre la viabilidad de epimastigotos después de 48 horas de incubación con cada compuesto.....	41
Figura 12. Productos de amplificación de la secuencia 18S rADN de ADN aislado de dos cepas costarricenses de <i>T. cruzi</i>	43
Figura 13. Árbol filogenético de máxima verosimilitud construido con 28 secuencias previamente depositadas en el GenBank de DTUs diferentes y las secuencias de la cepa ALF y Oso.	44
Figura 14. Alineamiento múltiple de secuencias de una región del gen 18S rADN de <i>T. cruzi</i> de diferentes DTUs realizado con el programa Mega X	45
Figura 15. Parasitemia promedio en ratones C57BL/6 infectados con tripomastigotos de <i>T. cruzi</i> de la cepa ALF en distintas concentraciones.	47
Figura 16. Parasitemia promedio en ratones C57BL/6 infectados con tripomastigotos de <i>T. cruzi</i> de la cepa Dm28c en distintas concentraciones.....	48

Figura 17. Amplificación por PCR del fragmento de 330 pb de kADN de *T. cruzi* (cepa ALF) en tejido cardíaco de ratones C57BL/6 infectados con tripomastigotos..... 52

Figura 18. Amplificación del fragmento de 667 pb de la secuencia 18S rADN de *T. cruzi* (cepa ALF) mediante PCR anidada, en tejido cardíaco de ratones C57BL6 infectados con tripomastigotos..... 53

Figura 19. Amplificación por PCR del fragmento de 330 pb de kADN de *T. cruzi* (cepa Dm28c) en tejido cardíaco de ratones C57BL/6 infectados con tripomastigotos..... 53

Abreviaturas o acrónimos

AD	Atrio derecho
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AI	Atrio Izquierdo
Bnz	Benznidazole
BSA	Albúmina de suero bovino
CC ₅₀	Concentración citotoxicidad media
CENIBiot	Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas
CICUA	Comité Institucional para el Cuido y Uso de los Animales
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTU	Unidad discreta de tipificación
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
SFB	Suero fetal bovino
HAI	Hemaglutinación indirecta
HE	Hematoxilina & Eosina
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IS	Índice de selectividad
kb	Kilobase
LIT	Infusión de hígado y triptona
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nfx	Nifurtimox
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PBS	Buffer de fosfato Salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
p.i	Post infección
r ²	Coefficiente de determinación de Pearson
trip/cul	Tripomastigoto por cultivo
trip/mL	Tripomastigoto por mililitro
u.a.F	Unidades arbitrarias de Fluorescencia
UNA	Universidad Nacional de Costa Rica
VD	Ventrículo derecho
VI	Ventrículo izquierdo
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

Resumen

La tripanosomiasis americana es una enfermedad prevalente y potencialmente mortal causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi* que representa un grave problema de salud pública en 21 países de Latinoamérica. Los tratamientos disponibles son ineficientes y producen efectos secundarios severos, por lo que surge la necesidad de estudiar nuevas terapias eficientes contra esta enfermedad. En investigaciones preliminares se observó una actividad antiparasitaria de interés en fracciones no purificadas provenientes de plantas de *Hamelia* sp, a partir de esto, en este trabajo se establecieron modelos de infección celular *in vitro* y se evaluó el efecto tripanocida de tres compuestos extraídos de *Hamelia* sp. Para esto se infectaron líneas celulares de mamífero con tripomastigotos y se evaluó la concentración IC₅₀ de tres compuestos hidroalcohólicos (c1-c3) mediante ensayos de citotoxicidad anti-amastigoto. El compuesto c3 fue el más potente contra amastigotos, y el que tuvo mejor selectividad con células y epimastigotos. Las cepas de *T. cruzi* utilizadas en este estudio se analizaron según su unidad discreta de tipificación (DTU) mediante la amplificación y secuenciación de la región de rADN 18S el árbol filogenético ubicó a las cepas como TcI. Además, se desarrolló un modelo de infección crónica de Chagas en ratones C57BL/6 que será fundamental para la evaluación *in vivo* de los efectos terapéuticos de compuestos que sean seleccionados en la fase *in vitro*.

1. Introducción

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad endémica de 21 países latinoamericanos en los que representa un grave problema de salud pública, y debido a las intensas migraciones internacionales, también se ha esparcido a otros continentes. Existen dos drogas que se utilizan en el tratamiento de esta enfermedad, sin embargo, éstas poseen efectos secundarios muy severos y su efectividad es limitada ya que solo se cura un 70% de los pacientes en la etapa inicial de la enfermedad conocida como fase aguda y en la fase crónica un 10-20% (Arias et al., 2017; M. da Silva et al., 2016; Izumi, Ueda-Nakamura, Dias Filho, Veiga Júnior, & Nakamura, 2011). Los pacientes en la fase crónica, tienden a desarrollar miocardiopatía progresiva o trastornos de motilidad del esófago y el colon; para esta fase aún no existe un tratamiento determinado ni efectivo a largo plazo (Ribeiro, Nunes, Teixeira, & Rocha, 2012).

Dependiendo de la fase de la enfermedad se pueden encontrar diferentes estadios del parásito, los tripomastigotos son el estadio infeccioso, que se encuentran en la sangre del hospedero y en el insecto vector y los amastigotos que son el estadio reproductivo intracelular, y que producen la fase crónica de la enfermedad. (de Fuentes-Vicente et al., 2018; W. De Souza, De Carvalho, & Barrias, 2010).

La bioprospección de metabolitos secundarios tripanocidas en modelos *in vitro* e *in vivo* es una valiosa herramienta para el desarrollo de fármacos más efectivos y seguros. Este trabajo es un estudio preliminar para la evaluación y selección de compuestos purificados con actividad antiparasitaria mediante infecciones celulares *in vitro* y el desarrollo de un modelo crónico de la enfermedad de Chagas en murinos.

1.1. Antecedentes

El doctor Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, un reconocido médico investigador brasileño, logró identificar por primera vez tripanosomas en la sangre de una niña en 1909 (Telleria & Tibayrenc, 2017). El asoció el agente etiológico (el cual llamó *Trypanosoma cruzi* en honor a su mentor Oswaldo Cruz) con el vector (insectos de la familia Reduviidae), identificó los principales reservorios, y describió los mecanismos de infección, así como las

manifestaciones clínicas agudas de los primeros casos humanos (Rassi, Rassi, & Marcondes de Rezende, 2012).

Esta enfermedad es endémica del continente americano y es transmitida principalmente por los vectores triatomínicos a animales por casi 10 millones de años; se ha encontrado ADN de *T. cruzi* en momias de 9000 años de antigüedad en el norte de Chile y en el sur de Perú (Aufderheide et al., 2004). También se ha encontrado evidencia de la domiciliación de vectores tal como *Triatoma infestans*, en poblaciones Incas y de Chinchorros de la época precolombina, indicando una gradual introducción de la transmisión selvática a la doméstica, que desde hace 200-300 años se ha acelerado debido a los efectos de la deforestación por la agricultura, la crianza de ganado, y la creación de rutas de transporte como ferrocarriles y carreteras. Esto ha provocado la pérdida de la principal fuente de alimentación (sangre de animales silvestres) y la dispersión del vector hacia aglomeraciones humanas, estableciendo un nuevo ciclo de infección entre animales domésticos y humanos (Schmunis & Yadon, 2010).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), esta enfermedad aún persiste en el continente americano, se estima que hay entre 7 y 8 millones de personas infectadas en el mundo y se reportan 56 000 casos nuevos por año y un total de 12 000 muertes anuales y con alrededor de 70 millones de personas en riesgo de infección (Carvalho et al., 2017). Desde 1970 el tratamiento común contra esta patología han sido el Nifurtimox (Nfx) y el Benznidazole (Bnz). Estos fármacos son 70% efectivos durante la fase aguda donde la forma parasitaria prevaleciente son tripomastigotos sanguíneos y 20% cuando se trata la fase crónica donde prevalece la forma intracelular de amastigotos (Arias et al., 2017; Izumi et al., 2011). Además, se ha comprobado que son muy tóxicos para las células de mamíferos, causando graves efectos secundarios como neuropatías periféricas, anorexia, náuseas, vómito y reacciones neurológicas como ansiedad y desorientación, entre otros (Carvalho, Goldenberg, & Campos de Carvalho, 2017; Coura & Viñas, 2010).

En la última década se han buscado nuevas alternativas para tratar la tripanosomiasis americana, incluyendo la síntesis de análogos de los fármacos ya existentes. Se han diseñado y sintetizado análogos del nitrofurano, los cuales funcionan similar al Nfx, inhibiendo enzimas conservadas en los tripanosomátidos. Los resultados muestran que estos análogos funcionan mejor y son menos tóxicos que el Nfx (Arias et al., 2017). Además, se ha probado la acción antiparasitaria de fármacos existentes como derivados de compuestos triazólicos los cuales,

inhiben la síntesis del ergosterol en el parásito y parecía ser un prometedor medicamento para esta enfermedad (Urbina, 2009). Sin embargo, aunque estos compuestos demostraron tener actividad curativa en modelos murinos, manifestaron una falta de actividad antiparasitaria sostenida en ensayos clínicos (Urbina, 2017), enfatizando en la necesidad latente de continuar la búsqueda de nuevos compuestos activos contra *T. cruzi*.

Los beneficios de los productos naturales han sido objeto importante de estudio, varios de ellos han confirmado la actividad antiparasitaria contra *T. cruzi* de extractos provenientes de diferentes plantas, siendo una alternativa muy prometedora. Izumi et al (2011), han evaluado al menos 18 especies de plantas extrayendo, compuestos activos que han resultado efectivos para eliminar el parásito *in vitro*. Además, se ha demostrado la actividad antiparasitaria de extractos etanólicos de la planta *Physalis angulata L* contra *T. cruzi*, que reduce la carga parasitaria al inducir mecanismos de muerte celular en el hospedero obligado, y reduce la agresividad de la fase aguda en modelos murinos (Meira et al., 2015).

También, se ha evaluado la actividad tripanocida y efecto citotóxico *in vitro* de compuestos naturales y sintéticos de β -carbolicinas, los cuales son alcaloides con conocidas propiedades biológicas que inducen una respuesta inhibitoria dependiente de la dosis contra los tres estadios de *T. cruzi*, una reducción tanto del número de células infectadas como de parásitos internalizados y mostrando baja toxicidad sobre las células (Valdez et al., 2009). Así mismo, se han realizado extracciones de biflavonoides y xantonas de la corteza y de la raíz de *Garcinia livingstonei* con actividad tripanocida *in vitro*, pero que mostraron un efecto citotóxico sobre las células de mamíferos (Mbwambo et al., 2006).

En Costa Rica se analizó el efecto tripanocida de cinco venenos de serpientes costarricenses contra dos cepas de *T. cruzi* demostrando disminución en el número de parásitos, pero con efectos citotóxicos, inducción de apoptosis y necrosis celular (Castillo-Vigil et al., 2008). Otros esfuerzos en nuestro país perseguían aislar y analizar distintas fracciones no purificadas de la planta *Hamelia patens*, responsables de la actividad específica anti-amastigotos *in vitro*. (Loaiza, R. comunicación personal, 28 de mayo de 2018).

Otros grupos de investigación han desarrollado modelos *in vivo* en murinos para tratar la miocardiopatía chagásica crónica trasplantando células derivadas de la médula ósea a ratones, estas células migran al corazón de los ratones provocando la reducción de la inflamación y de la fibrosis intestinal las cuales, son patologías comunes de esta enfermedad (Garcia-Silva et al.,

2014; Soares et al., 2004). Otros tratamientos incluyen el factor estimulante de colonias de granulocitos (Macambira et al., 2009), que induce la regeneración del miocardio, mejorando la función cardíaca y produciendo la apoptosis de células inflamatorias del miocardio (Soares et al., 2004). También, se han empleado células madre de ratón las cuales, inyectadas en ratones infectados previamente con *T. cruzi*, logran reducir la parasitemia, la inflamación y la fibrosis a nivel cardíaco (Mello et al., 2015).

Los modelos *in vitro* son el primer paso para la detección de drogas, ya que permiten la evaluación rápida y simultánea de compuestos, diferenciando entre activos y no activos (Fonseca-Berzal, Arán, Escario, & Gómez-Barrio, 2018). Es importante analizar la actividad que un compuesto tiene empleando diferentes estadios del parásito y líneas celulares porque se puede calcular la ventana terapéutica y el índice de selectividad que posee (Alonso-Padilla et al., 2015).

Existen varias metodologías que tienen un alto grado de sensibilidad y que cuantifican de manera efectiva esta actividad, como lo son los ensayos de citotoxicidad *in vitro* para medir el posible efecto de un compuesto en cultivos celulares utilizando epimastigotos, estadio reproductivo del parásito que se encuentra en el reservorio hematófago y que crece fácilmente en medios semi sintéticos en el laboratorio (Laverrière, Cazzulo, & Alvarez, 2012). La tinción con Giemsa o Hematoxilina & Eosina (HE) permite medir la cantidad de parásitos intracelulares presentes en un cultivo celular y facilita obtener criterios de selección de compuestos, tales como la baja citotoxicidad sobre células y si reduce o elimina la carga parasitaria intracelular (Fonseca-Berzal et al., 2018; Nefertiti et al., 2018).

Los ensayos *in vivo* constituyen una fase posterior en los ensayos preclínicos, implican una amplia variedad de modelos animales que intentan simular el curso de la enfermedad de Chagas en humanos, y solo pasan a esta fase aquellos compuestos que obtuvieron muy buenos resultados *in vitro* y que cumplieron con los criterios de selectividad escogidos (Fonseca-Berzal et al., 2018; Mateus et al., 2019). Estos modelos conllevan un proceso de validación que intenta reproducir y establecer fases específicas de la enfermedad, permitiendo la evaluación de tales compuestos en la fase de interés, ya sea aguda o crónica (Chatelain & Konar, 2015).

Trypanosoma cruzi es un parásito heterogéneo que se clasifica en siete grupos denominados unidades discretas de tipificación (DTUs), estas unidades permiten diferenciar las cepas según su genotipo o linaje (Dorn et al., 2017; Fonseca-Berzal et al., 2018), aunque se ha

reportado heterogeneidad entre cepas de un mismo linaje (Llewellyn et al., 2009; Ocana-Mayorga, Llewellyn, Costales, Miles, & Grijalva, 2010; Spotorno O, Córdova, & Solari I, 2008). La determinación de la DTU provee información sobre el origen filogenético del parásito y permite comparar el comportamiento de las cepas de la misma DTU con cepas de referencia genéticamente similares (Abrás et al., 2017). Esto es importante para los estudios de infectividad *in vitro* e *in vivo* ya que la genética del parásito influye en la infectividad y virulencia de la cepa (Llewellyn et al., 2009; Ocana-Mayorga et al., 2010; Spotorno O et al., 2008). Además, con la DTU de una cepa, se pueden generar bases de datos con información útil para futuras investigaciones (Medone, Ceccarelli, Parham, Figuera, & Rabinovich, 2015).

Aunque la enfermedad de Chagas fue descubierta hace más de 100 años, todavía hay muchas preguntas sin responder considerándose esta enfermedad parasitaria como el resultado de una mezcla de interacciones complejas entre el parásito, el sistema inmune del hospedero y otros factores genéticos (Chatelain, 2017). Además, *T. cruzi* es un protozooario muy heterogéneo y complejo genéticamente, que puede desarrollar resistencia a medicamentos (Francisco et al., 2017; C. B. Scarim et al., 2018). Por esta razón, el proceso de validación de nuevos compuestos tripanocidas con baja toxicidad y eficientes es muy lento y riguroso (Bermudez, Davies, Simonazzi, Pablo Real, & Palma, 2016; Izumi et al., 2011; Sales Junior et al., 2017). A esto se suma la falta de traducción entre modelos *in vitro*, *in vivo* y ensayos clínicos, lo cual significa que los resultados de un ensayo *in vitro* no siempre se pueden reproducir en modelos *in vivo* (MacLean et al., 2018). Así mismo, muchos de los ensayos utilizan epimastigotos para evaluar la actividad *in vitro* de los compuestos y esta forma parasitaria no forma parte del cuadro clínico que se desarrolla en humanos (Izumi et al., 2008).

La iniciativa, Drugs for Neglected Diseases (DNDi), desarrolla medicamentos para enfermedades poco atendidas como el mal de Chagas y ha realizado ensayos clínicos donde utilizan fármacos antifúngicos junto con sustancias antiparasitarias. Así mismo, evaluaron la acción de azoles como el posaconazol y el ravuconazol y observaron que su efectividad era mayor que el fármaco convencional Bnz (Chatelain, 2017). A pesar, de tantas investigaciones que se han realizado, todavía existe una gran necesidad de encontrar tratamientos eficientes contra *T. cruzi* que posean altos porcentajes de efectividad y pocos efectos secundarios. Hasta el momento no se ha encontrado un compuesto capaz de curar la enfermedad de Chagas en un

100%, ni un sustituto para los fármacos existentes (Francisco, Jayawardhana, Lewis, Taylor, & Kelly, 2017; Izumi et al., 2011; C. B. Scarim et al., 2018).

Hamelia patens es una planta muy estudiada por su gran concentración de metabolitos bioactivos que poseen alto potencial farmacológico (Rong Paz, Rubio Contreras, Reyes Munguá, Aguilar, & Carrillo Inungaray, 2018), y debido a los resultados obtenidos en investigaciones anteriores usando fracciones no purificadas, responsables de la actividad específica anti-amastigotos de esta planta, surge el interés de estudiar esta y otras especies del mismo género, que además son autóctonas de Costa Rica y poco estudiadas.

1.2. Justificación

La enfermedad de Chagas afecta a más de 8 millones de personas en América Latina y miles de individuos en países como Estados Unidos y Europa (Meira et al., 2015). Además, existen millones de personas que habitan en zonas que son endémicas del vector, que corren peligro de ser infectados con este parásito y morir a causa de las patologías que se producen con el paso del tiempo (M. da Silva et al., 2016).

La OMS la clasifica como una enfermedad desatendida por parte de gobiernos e instituciones sanitarias y que persiste en las sociedades más pobres y marginadas (D.A. Álvarez et al., 2016), de áreas rurales lejanas, a menudo en conflicto, es de poca prioridad en salud pública y descuidada en las políticas gubernamentales (Dorn et al., 2017; Ribeiro et al., 2012).

Desde su identificación, la enfermedad de Chagas ha representado un gran reto para la comunidad científica en cuanto a su tratamiento (Arias et al., 2017., M. da Silva et al., 2016). La limitada acción de los únicos dos tratamientos actuales, sus múltiples efectos colaterales que frecuentemente llevan a interrumpir los protocolos terapéuticos y otros factores que influyen en obtener una cura exitosa de la enfermedad de Chagas, hacen urgente la necesidad de encontrar una alternativa más efectiva y mejor tolerada. No se ha logrado generar un fármaco para una terapia eficiente, menos riesgosa y sin efectos secundarios (Izumi et al., 2011). El desarrollo de nuevos fármacos es muy caro y requiere de mucho tiempo; además, las grandes compañías farmacéuticas que tienen más fondos y posibilidades de investigación han tenido poco interés en el desarrollo de nuevas drogas para esta enfermedad (Sales Junior et al., 2017).

El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar un modelo de infección *in vitro* usando cultivos celulares para analizar compuestos purificados de plantas del género *Hamelia*

sp. y seleccionar la que tenga mayor potencial tripanocida. Además, se busca establecer un modelo de infección crónica *in vivo* y analizar la influencia de los genotipos o linajes en el curso de las infecciones. Eventualmente, el resultado de esta investigación tendría impacto en el estudio farmacéutico de un posible medicamento contra la tripanosomiasis. La demostración de un compuesto purificado eficaz contra la infección de Chagas experimental justificaría estudios posteriores de farmacocinética, toxicidad y eficacia, en la búsqueda de un potencial tratamiento de utilidad clínica en humanos.

1.3. Planteamiento del problema

Estudios previos en nuestro país han detectado actividad antiparasitaria de fraccionamientos no purificados de la planta *Hamelia patens* contra amastigotos intracelulares de *T. cruzi*. Dicha actividad no ha sido analizada en otras especies de esta planta. A partir de esto, surge la siguiente pregunta: ¿Existe esta actividad antiparasitaria en compuestos purificados de extractos crudos provenientes de otras especies del mismo género?

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto tripanocida *in vitro* de compuestos purificados de plantas del género *Hamelia* contra amastigotos de *Trypanosoma cruzi* como criterio de selección para su estudio en un modelo *in vivo* en ratones.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Desarrollar un modelo de infección celular *in vitro* con *Trypanosoma cruzi* que provea las condiciones para su uso en ensayos tripanocidas con compuestos purificados de *Hamelia* sp.
2. Comparar la capacidad tripanocida *in vitro* de diferentes compuestos purificados de *Hamelia* sp. para seleccionar aquel con mayor potencia y selectividad para su uso en un modelo murino.
3. Determinar si existen diferencias en la capacidad infectante *in vitro* e *in vivo* de dos cepas costarricenses de *T. cruzi* mediante su caracterización genética.

4. Inducir la forma crónica de la enfermedad de Chagas en ratones para determinar su utilidad como modelo de infección *in vivo* para el estudio de un compuesto con potencial tripanocida.

2. Marco Teórico

Trypanosoma cruzi

La tripanosomiasis americana es una compleja enfermedad zoonótica parasitaria, causada por el parásito hemoflagelado *T. cruzi*. Un protozooario del filo *Sarcomastigophora*, subfilo *Mastigophora*, del orden *Kinetoplastida*, y de la subfamilia *Trypanosomatidae*. Es capaz de infectar animales silvestres, domésticos y seres humanos, durante etapas determinadas de su ciclo de vida, posee un flagelo y una única mitocondria que contiene un cinetoplasto (masa de ADN extranuclear que corresponde al genoma mitocondrial del parásito) (Bern, Kjos, Yabsley, & Montgomery, 2011; Rassi et al., 2012).

Ciclo de vida del parásito

Los vectores de *T. cruzi* son insectos hematófagos del orden *Hemiptera*, de la familia *Reduviidae* y de la subfamilia *Triatominae*, que adquieren el parásito en su forma de tripomastigotos (forma extracelular infectiva) cuando se alimenta de la sangre de algún hospedero vertebrado infectado, una vez en el estómago del insecto estos tripomastigotos se transforman en epimastigotos (forma extracelular reproductiva), los cuales migran hacia el intestino medio posterior del triatomo para multiplicarse. Posteriormente el epimastigoto migra hacia el recto, donde se transforman en tripomastigotos metacíclicos (forma altamente infectiva), que son expulsados a través de las heces y la orina. Generalmente, la infección del hospedero mamífero sucede mientras el insecto se alimenta, ya que éste defeca sobre la piel del hospedero y el parásito entra a través de la lesión en la piel, membranas mucosas o membranas conjuntivas (Pérez-Molina & Molina, 2017; Rassi et al., 2012).

Una vez en el hospedero vertebrado, se pueden encontrar dos formas del parásito, los tripomastigotos metacíclicos esparcen la infección por todo el cuerpo, invadiendo fibroblastos, macrófagos, células epiteliales, entre otros tipos celulares (de Fuentes-Vicente et al., 2018; W.

De Souza et al., 2010) Después de la invasión celular, los tripomastigotos se diferencian en amastigotos (forma intracelular reproductiva no mótil), se replican en el citosol de la célula hospedera por medio de división binaria y después de varios ciclos de división, se transforman en tripomastigotos altamente móviles que producen la ruptura de la célula hospedera y son liberados de vuelta a la sangre para infectar nuevas células hospederas. Este proceso de reinfección es el responsable por la amplificación del parásito en el cuerpo del mamífero hospedero y de la fase aguda de la infección que está caracterizada por altas parasitemias. (L. O. Andrade & Andrews, 2005).

Ciclos de transmisión

Existen tres ciclos básicos de transmisión de *T. cruzi*: el ciclo selvático, el peridoméstico y el doméstico. El primero sucede cuando el parásito realiza su ciclo entre especies silvestres (marsupiales, roedores, murciélagos y carnívoros) y los insectos triatominos, esta infección ocurre en zonas selváticas (Alvarado-Otegui et al., 2012; Gürtler & Cardinal, 2015). El ciclo peridoméstico, nexa entre el ciclo selvático y el doméstico, se da cuando animales como roedores, marsupiales y perros, se mueven libremente desde sus viviendas a sitios selváticos donde pueden ser infectados por un triatoma o los vectores se acercan a viviendas e infectan animales sinantrópicos y seres humanos (Macchiaverna et al., 2018). El ciclo doméstico es el que perpetúa la enfermedad en humanos, en este ciclo los triatomas infectan animales domésticos (perros, gatos, ratones, cobayos y cerdos) o humanos, ocurre más que todo en zonas rurales donde el triatoma logra invadir las viviendas (Jansen, Roque, & Xavier, 2017).

Variabilidad intraespecífica

El parásito *T. cruzi* conforma una población heterogénea compuesta de diversas cepas circulando en la naturaleza con gran variabilidad genética entre ellas, se clasifican en siete linajes diferentes, desde TcI hasta TcVI y TcBat (Dorn et al., 2017). Estas unidades discretas de tipificación (DTUs) están asociadas a distintas distribuciones geográficas, ciclos de transmisión y variaciones en los síntomas de la enfermedad. El linaje TcI es la mayor causa de la enfermedad de Chagas en el norte de Sur América y en América Central, los linajes TcII, V y VI están implicados en la incidencia de la enfermedad en el sur de Sur América (Bern et al., 2011; Burgos et al., 2010).

En Costa Rica se han descrito dos haplotipos diferentes de cepas de *T. cruzi*, uno ligado al grupo de haplotipos colombianos TcIa, asociado con infecciones en humanos y vectores domésticos. Sin embargo, en Costa Rica este genotipo se asocia a ciclos zoonóticos donde el hospedero suele ser el marsupial *Didelphis* y en este caso la infección en humanos es baja. El otro haplotipo es semejante en las secuencias de los genes miniexón a cepas de México tipificadas como TcI con una variabilidad de 2,6 % entre las secuencias comparadas (Zuriaga et al., 2012).

Epidemiología

Según la OMS, en el 2017 se registraron entre 6 y 7 millones de personas infectadas con *T. cruzi* alrededor del mundo y 70 millones de personas en riesgo de ser infectadas en 21 países de América Latina que son endémicos del vector, distribuidos desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina y Chile, incluyendo Belice, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua y Panamá, entre otros más (Carvalho et al., 2017). Es una enfermedad asociada a la pobreza y a las zonas rurales de estos países. (Ventura-Garcia et al., 2013).

Debido a las intensas migraciones de individuos infectados a zonas no endémicas, o de individuos originarios de regiones no endémicas, a lugares que sí lo son, esta enfermedad se ha convertido en un problema mundial (González-Rubio et al., 2017).

La enfermedad de Chagas constituye una carga económica pesada ya que la mortalidad temprana y las discapacidades producidas resultan en pérdidas económicas importantes. En América Latina, al año, se estiman más de 38 000 nuevos casos, con una prevalencia de 1.05%, y la carga social producida es mayor que la carga total producida por otras enfermedades tropicales como malaria y leishmaniosis (Carvalho et al., 2017). Se estiman 752 000 días laborales perdidos al año debido a muertes prematuras, y una inversión de entre \$1 y \$2 mil millones por productividad perdida en algunos países de Suramérica. A nivel mundial se estima que la carga económica de esta enfermedad alcanza los \$627 millones en costos relacionados con servicios médicos, y 10% de estos gastos afectan a países que no son endémicos de esta enfermedad (Conteh, Engels, & Molyneux, 2010).

La estigmatización de poblaciones pobres y rurales y la discriminación de individuos infectados afectan su acceso a los servicios de la salud y a las oportunidades laborales. Además,

existe estigmatización, discriminación y exclusión laboral relacionada a la enfermedad de Chagas independientemente de la presencia o ausencia de síntomas. Por esta razón, las personas con tripanosomiasis evitan hacerse pruebas de diagnóstico necesaria para aplicar a nuevos empleos y prefieren buscar oportunidades laborales en sectores más informales, lo que causa un deterioro en sus condiciones de vida (Ventura-Garcia et al., 2013).

Transmisión de la enfermedad de Chagas

El principal mecanismo de transmisión del parásito es a través de la picadura del insecto vector, ya que sus heces contienen tripomastigotos metacíclicos que pueden ingresar al cuerpo a través de lesiones en la piel, a través de los ojos, u otras membranas mucosas (Bern et al., 2011). El vector a su vez es infectado al chupar la sangre con el parásito de algún hospedero mamífero, ya sea un animal doméstico o silvestre (Raimundo, Massad, & Yang, 2010). De las 130 especies de insectos triatominos, solo algunas son vectores competentes para *T. cruzi*, como *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, y *T. dimidiata* (Rassi, Rassi, & Marin-Neto, 2010). Otros mecanismos de infección incluyen la transmisión oral, transfusiones sanguíneas, trasplante de órganos y la transmisión congénita (Benchimol Barbosa, 2006; Bern et al., 2011; Lescure et al., 2010; Pérez-Molina & Molina, 2017; Raimundo et al., 2010)

Por otro lado, la implementación de programas de control vectorial y tamizaje en bancos de sangre en algunos países de Sudamérica y en Centro América, ha logrado disminuir el riesgo de infección (Coura, 2015).

Enfermedad de Chagas

En la enfermedad de Chagas ocurren dos fases continuas, iniciando con la fase aguda seguida de la fase crónica, la cual puede ser indeterminada, cardíaca, o digestiva dependiendo del cuadro clínico del paciente (Nunes, Dones, Morillo, Encina, & Ribeiro, 2013; Ribeiro et al., 2012). En cada una de estas fases se producen múltiples daños a órganos y tejidos, estos pueden estar asociados directamente al parásito que provoca la lisis celular por la multiplicación intracelular y la subsecuente liberación de los tripomastigotos al torrente sanguíneo. Estos daños también pueden estar asociados al sistema inmune del hospedero, ocasionando el deterioro del

órgano cardiaco o digestivo, además de disfunción microvascular e isquemia (Le Loup, Pialoux, & Lescure, 2011).

La fase aguda se caracteriza por alta parasitemia y por lo general es asintomática, lo que dificulta un diagnóstico y tratamiento temprano de la infección (Nunes et al., 2013; Ribeiro et al., 2012). Esta fase se puede manifestar a cualquier edad, aunque con más frecuencia en niños, con síntomas, que pueden ser inespecíficos o imperceptibles, o fiebre, inflamación del sitio de inoculación, signo de Romaña, inflamación de los ganglios linfáticos y del hígado. La fase aguda por lo general dura entre 2 y 3 meses, periodo después del cual se reduce la parasitemia y los síntomas desaparecen. Sin embargo, en ausencia del tratamiento aproximadamente el 10% de los pacientes sintomáticos mueren a causa de encefalomielitis, insuficiencia cardíaca grave y rara vez debido a muerte súbita por arritmias cardíacas o evolucionan a la fase crónica. Un individuo no diagnosticado puede evolucionar a la fase crónica de la enfermedad (Nunes et al., 2013; Pérez-Molina & Molina, 2017; Prata, 2001; Ribeiro et al., 2012).

La enfermedad aguda severa no es tan común, ocurre en menos del 5% de los pacientes infectados con *T. cruzi* y se presenta como resultado de infección vectorial, oral o congénita cursando con miocarditis aguda, derrame pericárdico o meningoencefalitis con un riesgo de mortalidad de 0,5%. (Nunes et al., 2013; Pérez-Molina & Molina, 2017).

La fase crónica asintomática está definida por la ausencia de síntomas y respuesta inmune aparente después de la fase aguda y aproximadamente la mitad de la población presenta esta fase. Los electrocardiogramas y los exámenes radiológicos del corazón, esófago y colon son normales, la persona es inconsciente de la enfermedad, sin embargo, los individuos presentan evidencias serológicas y parasitológicas de la infección. Son pacientes con baja mortalidad, capaces de realizar cualquier tipo de actividad y de llevar una vida normal (Z. A. Andrade, 1999; Prata, 2001).

La enfermedad de Chagas crónica está caracterizada por la infiltración del parásito en las células miocárdicas de manera multifocal, diversos grados de fibrosis, parasitismo tisular constante, inflamación local por la persistencia del parásito y parasitemia baja o indetectable. Después de entre 10 y 30 años en fase crónica asintomática, entre el 30% y 40% de los pacientes entran en fase crónica desarrollando patologías asociadas a órganos (Pérez-Molina & Molina, 2017; Ribeiro et al., 2012).

La cardiopatía chagásica crónica o miocardiopatía de Chagas afecta entre 20% y 40% de los pacientes en fase crónica y representa la manifestación más severa y peligrosa de la enfermedad. Se manifiesta con insuficiencia cardíaca, arritmia, bloqueo cardíaco, tromboembolismo, apoplejía y muerte súbita, por lo general ocurren simultáneamente, lo que aumenta la complejidad y el costo del tratamiento (Ribeiro et al., 2012).

Los desórdenes esofágicos se presentan entre el 7% y 10% de los pacientes en fase crónica y el megaesófago en aproximadamente el 3% de esta población. El megacolon ocurre en el 20% de los pacientes con la forma crónica y pueden presentar estreñimiento progresivo y otros síntomas asociados (Brandt De Oliveira, Troncon, Dantas, & Meneghelli, 1998).

Diagnóstico de la enfermedad

El diagnóstico de la enfermedad toma en cuenta la fase en que podría estar el paciente estudiando los signos y síntomas clínicos, datos epidemiológicos y resultados de laboratorio que incluyen pruebas inmunológicas, parasitológicas y moleculares. (Ferrer, 2015). En la fase aguda el diagnóstico se puede realizar por observación directa del parásito en la sangre del paciente mediante exámenes de sangre fresca al microscopio, tinción de extendidos celulares y análisis de gota gruesa de sangre (Ferrer, 2015; Gomes, Lorena, & Luquetti, 2009).

En la fase crónica, los individuos son diagnosticados en base a pruebas serológicas que pueden ser difíciles de interpretar, sin embargo, las técnicas más utilizadas para la detección de esta enfermedad son la hemaglutinación indirecta (HAI), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) (Ferrer, 2015; Lescure et al., 2010).

También, existen los métodos parasitológicos indirectos que tienen como objetivo multiplicar los parásitos a partir de diferentes muestras del paciente cuando la parasitemia es muy baja o ha desaparecido. Algunos ejemplos son el xenodiagnóstico, hemocultivo e inoculación de vectores o animales sensibles a la infección, sin embargo, estas metodologías no están disponibles en laboratorios de rutina (Ferrer, 2015; Gomes, Lorena, & Luquetti, 2009).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método indirecto, más sensible que cultivos de sangre y que xenodiagnóstico y ha sido muy útil en el diagnóstico de la transmisión congénita. Sin embargo, la prueba de PCR reduce considerablemente su confiabilidad en la fase crónica, debido a que el paciente presenta baja parasitemia, por lo que aumenta el riesgo de que

la muestra tomada esté libre de ADN del parásito, obteniéndose falsos negativos (Pérez-Molina & Molina, 2017).

Para la fase crónica se emplean métodos inmunológicos que consisten principalmente en la detección de anticuerpos específicos contra el parásito como los mencionados anteriormente ELISA, HAI y IFI. Sin embargo, estas técnicas presentan una sensibilidad de entre 20% y 50% a lo que se suman reacciones cruzadas con otros parásitos que pueden ser de la misma familia, por lo que la OMS recomienda aplicar al menos dos pruebas distintas para aumentar la confiabilidad de los resultados, y en el caso de que difieran, realizar una tercera prueba (Ferrer, 2015; Gomes, Lorena, & Luquetti, 2009). En pacientes con cardiomiopatías, se realiza una electrocardiografía, en pacientes con compromiso del colon, la prueba utilizada para su diagnóstico es el enema de bario, sin embargo, la confirmación del diagnóstico es extremadamente difícil (Brandt De Oliveira et al., 1998; Pérez-Molina & Molina, 2017).

Los métodos moleculares pueden detectar el ADN del parásito en el torrente sanguíneo y en tejidos y se basan en la detección y amplificación de fragmentos específicos de ADN del genoma del parásito mediante pruebas de PCR. Algunas de las regiones utilizadas para su amplificación son el ADN satélite, la secuencia repetitiva nuclear esparcida 1025 y mini círculos del cinetoplasto, entre otros (Ferrer, 2015). Un resultado de PCR negativo no significa la cura parasitológica, más bien indica la ausencia de ADN parasitario en la muestra utilizada para realizar la prueba, mientras que un diagnóstico de PCR positivo para la detección de ADN de *T. cruzi*, podría ser útil para identificar el fracaso del tratamiento (Rassi et al., 2010).

Tratamientos

El principal objetivo del tratamiento es la eliminación del parásito y atacar los signos y síntomas de la enfermedad. Solo existen dos drogas para la aplicación en humanos, el Benznidazol (Bnz) y el Nifurtimox (Nfx) que comparten algunas características como mejor tolerancia en niños, eficiencia en la fase aguda, mayor toxicidad en adultos y diferente susceptibilidad dependiente de la cepa o DTU (Bermudez, Davies, Simonazzi, Pablo Real, & Palma, 2016; Sales Junior et al., 2017).

El Bnz es el fármaco más indicado con un mejor perfil de seguridad y eficiencia, en adultos la dosis recomendada es de 5 a 7 mg/kg por día durante 60 días, mientras que en niños de 1 a 10 años la dosis administrada es de 10 mg/kg por día durante 60 días. En el caso del Nfx

se recomienda una dosis diaria de 8 a 10 mg/kg en adultos, para adolescente de 12,5 a 15 mg/kg y en niños de 1 a 10 años es de 15 a 20 mg/kg durante 90 a 120 días (Bermudez et al., 2016; Murcia, Carrilero, Saura, Iborra, & Segovia, 2013).

Una seria limitación de estos tratamientos son los efectos secundarios que afectan hasta un 40% de los pacientes y frecuentemente conllevan a su interrupción. Algunos de los efectos adversos más comunes del Bnz son neuropatías periféricas, reacciones cutáneas que pueden ser severas, granulocitopenia y anorexia. Algunos efectos secundarios del Nfx son dolores abdominales, anorexia, náuseas, vómito, pérdida de peso y reacciones neurológicas como ansiedad, desorientación, pérdida de memoria, insomnio, espasmos, parestesias, polineuritis y convulsiones, afectando al 61% de los pacientes tratados con ese medicamento (Carvalho et al., 2017).

A pesar de los efectos secundarios, estas drogas tripanocidas son efectivas y en la fase aguda son recomendadas para todos los pacientes exceptuando mujeres embarazadas, y pueden curar la enfermedad entre un 60% a 85% de los casos. También se recomienda tratar pacientes en fase crónica que no presentan manifestaciones clínicas o síntomas cardíacos o digestivos leves, buscando prevenir o reducir la evolución de la enfermedad a formas más severas, sin embargo, el 80% de los pacientes tratados en esta fase no logran la cura parasitológica, lo que quiere decir que vivirán con el parásito por el resto de sus vidas (Britto, 2009; Carvalho et al., 2017; Le Loup et al., 2011; Murcia et al., 2013).

Evaluación de la actividad tripanocida contra amastigotos

Los modelos *in vitro* son un paso fundamental para la búsqueda de nuevas terapias antichagásicas, ya que permiten la evaluación de los compuestos excluyendo aquellos que no posean la actividad deseada. El enfoque fenotípico para la detección de inhibidores del crecimiento, aplicados directamente contra los parásitos posee la ventaja de que el organismo completo está expuesto al compuesto, incluyendo todas las dianas terapéuticas y rutas metabólicas. Sin embargo, es un enfoque de bajo rendimiento por ser muy arduo, lo que permite probar pocos compuestos a la vez (Chatelain, 2015; Field et al., 2017; Scarim et al., 2018). Realizar ensayos *in vitro* es importante ya que indican la actividad intrínseca de fármacos antiparasitarios y predicen la actividad que podría tener *in vivo*, utilizando diferentes formas del parásito y métodos cuantificables y reproducibles (Croft & Brun, 2003).

Un tratamiento antichagásico adecuado debería producir la cura parasitológica tanto en la fase crónica como en la fase aguda, ser efectiva contra diferentes linajes o DTUs y formas presentes en la infección humana, ser accesible para la población, no producir efectos secundarios y que no produzca resistencia. Y aunque los epimastigotos no son clínicamente relevantes, su mantenimiento relativamente sencillo en cultivos axénicos explica su amplia aplicación en pruebas preliminares de la actividad de compuestos (Fonseca-Berzal, Arán, Escario, & Gómez-Barrio, 2018).

Con *T. cruzi* se han realizado ensayos *in vitro* en todos sus estadios de vida (Izumi et al., 2011), sin embargo, en el desarrollo de nuevas drogas, los amastigotos son el objetivo que se persigue eliminar debido a que son la forma intracelular predominante en la fase crónica, y que ocasiona las patologías mencionadas anteriormente (Buckner, Verlinde, Flamme, & Voorhis, 1996; Croft & Brun, 2003).

La actividad de estos fármacos se puede determinar de muchas maneras, las técnicas de recuento por microscopía son muy frecuentes, como la tinción Hematoxilina & Eosina (HE) con la que se consigue fijar y teñir las células con diversos grados de infección y se puede cuantificar la concentración intracelular parasitaria con el fin de reconocer la actividad que un extracto o fármaco puede tener sobre esta forma intracelular. Es una de las técnicas más comunes utilizadas para diferenciar entre citoplasma, núcleo y matriz extracelular. La Hematoxilina tiñe los ácidos nucleicos de un color morado azulado oscuro, mientras que la Eosina, proteínas no específicas de un color rosado, de esta forma los núcleos estarán teñidos de un color azulado mientras que los citoplasmas y matriz extracelular se teñirán con distintas tonalidades de rosados (Li & Chen, 2017).

Los modelos *in vivo* también son una herramienta indispensable para la evaluación de compuestos tripanocidas, se utilizan para predecir el comportamiento de una droga en el humano (Zhang, Luo, Ding, & Lu, 2012). Además, se pueden estudiar aspectos importantes de la enfermedad como la patogenicidad del parásito (Chatelain & Konar, 2015). Estos modelos se realizan en animales como ratones, cerdos, conejos, ratas y primates (Mateus et al., 2019). Para estudiar la enfermedad de Chagas uno de los modelos *in vivo* más empleados es el murino, las cepas de ratón más utilizadas son: C57/BL6, BALB/c y Swiss (E. M. De Souza et al., 2008; Meza et al., 2014; Silva-dos-Santos et al., 2017).

El modelo *in vivo* en ratones es complejo ya que la respuesta depende de varios factores, entre ellos la cepa de ratón y la cepa de *T. cruzi* utilizada. La parasitemia, la mortalidad, el daño tisular y el desarrollo de cardiopatías pueden variar de una cepa de ratón a otro aunque la infección se realice con la misma cepa del parásito, incluso la vía de infección y la cantidad de parásitos inoculada pueden provocar cambios en la respuesta del ratón (Chatelain & Konar, 2015; Mateus et al., 2019). Por esto es importante establecer modelos *in vivo* antes de administrar la droga que se quiere evaluar.

En el caso de la enfermedad de Chagas el modelo de infección *in vivo* se debe diseñar según la fase que se quiere tratar ya sea aguda o crónica. El modelo agudo se puede establecer en los primeros días de infección, ocurre cuando la parasitemia es alta, los animales presentan signos y se da la muerte en las primeras semanas (Villalta et al., 2013). El modelo crónico toma más tiempo ya que sucede después del primer mes de infección, se determina por una disminución de la parasitemia, invasión de tejidos y la formación de nidos chagásicos, por la ausencia de signos y por la supervivencia de los animales (Guarner et al., 2001; Junqueira et al., 2017; Pérez-Molina & Molina, 2017; C. Scarim, Ribeiro, Rosa, & Chin, 2018). Para poder establecer estas fases se debe realizar una evaluación con varias cepas de ratones y del parásito para elegir cual combinación es efectiva para reproducir la fase que se quiere desarrollar (Chatelain & Konar, 2015).

Plantas del género *Hamelia*

Las plantas generalmente producen metabolitos secundarios que pueden ser utilizadas como microbicidas y pesticidas, además, debido a sus amplias actividades biológicas y medicinales también son muy utilizadas para la producción de nuevas drogas, razón por la cual los productos vegetales representan los principales agentes farmacéuticos utilizados en la medicina tradicional (Khandelwal, Sharma, Singh, & Vijayvergia, 2012).

La familia *Rubiaceae* incluye muchas plantas con gran importancia económica, ornamental y medicinal, conocida por la producción de metabolitos bioactivos que poseen altos potenciales farmacológicos. Estas plantas se pueden encontrar en prácticamente todo el mundo, aunque principalmente en los trópicos, representa el taxón más grande de la clase

Magnoliopsida, incluyendo 637 géneros y 13000 especies. A pesar de esto, esta familia posee una clasificación taxonómica compleja con tres subfamilias divididas en 43 tribus, y debido a la falta de estudios que cubran temas básicos sobre distribución geográfica, morfología, anatomía y características moleculares, todavía existen géneros y especies que no se han podido incluir en ninguna tribu. Las plantas de esta familia presentan alta diversidad de metabolitos secundarios como terpenoides, flavonoides y derivados fenólicos como los alcaloides que pueden ser de gran interés farmacológico (Martins & Nunez, 2015).

La tribu *Hamelieae*, perteneciente a la subfamilia *Rubioideae*, se caracteriza por tener inflorescencias ebracteadas y flores amarillas tetraméricas con un pistilo generalmente bicarpelado. Incluye géneros como *Hoffmannia*, *Omitelia Standl.*, *Pinarophyllon Brandegree* y *Hamelia*. Esta última comprende alrededor de 16 especies diferentes de arbustos o árboles pequeños distribuidas a través de los trópicos, incluyendo México, América Central y Sur América (Josefina & Carmela, 2017; Llamas, 2003; Martínez-Cabrera, Terrazas, & Ochoterena, 2009).

El género *Hamelia* se caracteriza por tener peciolas y tricomas unicelulares y multicelulares, hojas de diferentes tonalidades de verde, verticiladas, márgenes ondulados y venas medias de color rosado-rojizo. Sus flores son tubulares con tonos amarillos, naranjas y rojizos, ordenadas de 3 a 5 terminales, tubulares con pequeños lóbulos con forma recta y sus frutos son bolitas ovaladas rellenas de semillas (Josefina & Carmela, 2017; Llamas, 2003; Martínez-Cabrera et al., 2009).

Algunos metabolitos secundarios han sido detectados entre las especies que conforman el género *Hamelia*, como indol-monoterpenoides, alcaloides oxindoles, terpenoides y flavonoides, y son ampliamente utilizados en la medicina tradicional como analgésicos, antiinflamatorios, cicatrizantes, antioxidantes, antisépticos y antiparasitarios entre muchas otras más (Josefina & Carmela, 2017).

Algunas especies de este género son utilizadas en la etnomedicina para tratar males tales como malaria, reumatismo, gastritis, disentería, úlceras y como antihemorrágicos. También se ha observado una actividad contra *Leishmania mexicana in vitro* más potente que las principales drogas utilizadas para tratar la leishmaniasis. No existen publicaciones de su evaluación en *T. cruzi*, un parásito de la misma familia que *Leishmania* por lo que su potencial farmacéutico amerita evaluarse en este tripanosomátido. Los productos naturales representan gran fuente de

moléculas que se pueden utilizar en la producción de nuevas drogas y podrían reemplazar los medicamentos actuales que poseen con efectos secundarios severos y bajos índices de efectividad (Izumi et al., 2011; Martins & Nunez, 2015).

3. Marco Metodológico

Parásitos para infección *in vitro*

La cepa de *T. cruzi* ALF, fue aislada de un ejemplar de *Triatoma dimidiata* en Getsemaní de Heredia y la cepa Oso, aislada de sangre de un perro en Marañonal de Esparza. Ambas cepas se mantenían en medio de infusión de hígado y triptona (LIT) y fueron donadas por el Laboratorio de Zoonosis de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional de Costa Rica. La cepa Dm28c fue facilitada por el Instituto Pasteur-Montevideo de Uruguay. Estas tres cepas se mantuvieron luego en cultivo celulares, congeladas a -80°C y 5% de Dimetilsulfoxido (DMSO). Estas cepas fueron escogidas con el fin de comparar entre cepas autóctonas de Costa Rica (ALF y Oso) y una cepa de referencia (Dm28c), ampliamente utilizada en el estudio de este patógeno.

Células

La línea comercial NIH/3T3 está formada a partir de fibroblastos de embrión de ratón de la cepa NIH/Swiss. La línea comercial Vero E6 está formada por células epiteliales aisladas a partir del riñón del mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Estas líneas fueron escogidas por que son modelos ampliamente utilizados en el estudio de *T. cruzi*, y con el fin de comparar el efecto de los compuestos sobre distintos modelos celulares. Las células fueron sembradas en botellas de cultivo celular de 25cm² y mantenidas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) a 37°C y 5% de CO₂.

Compuestos para análisis

Se utilizaron tres compuestos (c1, c2 y c3) que fueron los primeros compuestos aislados y purificados en una investigación que actualmente se lleva a cabo en el Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot). Los compuestos se obtuvieron de plantas del género *Hamelia* sp., fueron extraídas con un solvente hidroalcohólico, purificados mediante cromatografía en columna y cromatografía líquida de alta eficiencia preparativa (R-035-2020-OT-CONAGEBIO, Id. 737). La pureza de los compuestos fue corroborada mediante cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Estos compuestos fueron proporcionados por el CENIBiot, por lo que los nombres de las especies y compuestos purificados son propiedad intelectual de la investigación en proceso, es información confidencial.

Modelo de infección *in vitro* de la enfermedad de Chagas en células 3T3

Infección celular inicial

Las infecciones se realizaron con las cepas ALF, Oso y Dm28c. Se sembraron 2×10^5 células en botellas de cultivo celular de 25cm^2 con DMEM al 2% de SFB para disminuir la velocidad de división celular y se dejaron incubando a 37°C y 5% de CO_2 durante 24 horas. Seguidamente se tomaron parásitos axénicos provenientes de LIT, incubados a 27°C de 1 a 2 semanas para Dm28c y de 2 a 3 semanas para ALF y Oso. Los tripomastigotos fueron contados en una cámara de Neubauer, y agregados en concentraciones conocidas a las células con el fin de tener rangos de infección de 3:1, 2:1 y 1:1 (relación parásitos: célula) para ALF y Oso, adicionando entonces 6×10^5 , 4×10^5 y 2×10^5 tripomastigotos por cultivo. Con la cepa Dm28c, las células fueron infectadas con rangos de 0.5:1, 1.5:1 y 2.5:1, utilizando entonces 1×10^5 , 3×10^5 y 5×10^5 tripomastigotos por cultivo. Las células infectadas se dejaron incubando durante 24 horas a 37°C y 5% de CO_2 , periodo después del cual se eliminaron los parásitos extracelulares restantes con lavados de buffer fosfato salino (PBS). Las células infectadas se mantuvieron al 2% de SFB, a 37°C y 5% de CO_2 . Fueron revisadas diariamente con el fin de observar el estado de las células y la presencia o ausencia de tripomastigotos en el medio de cultivo. Se realizaron conteos de tripomastigotos con cámara de Neubauer los días 7, 8, 11, 12, 14 y 18 p.i (Marisol,

Rojas, Cruz Torrico, Torrico, & Barrientos, 2015; Velazco-Gamboa Carolina, Puentes-Corredor Fabiola, Moreno-García Alberto, 1997). Los datos fueron procesados en Excel y analizados en el programa informático RStudio, con un nivel de significancia de 0,05.

Modelo de infección celular *in vitro* para obtención de tripomastigotos infectantes

Para evaluar eficientemente la actividad tripanocida *in vitro* de algún compuesto o molécula, es necesario contar con un recurso constante de tripomastigotos, utilizados para infectar y para re-infectar células, y así tener disponibilidad de parásitos semanales. Tomando esto en cuenta, fueron necesarios $1,5 \times 10^6$ tripomastigotos por mililitro (trip/mL) semanales. Para esto se realizaron nuevas infecciones sobre células 3T3 a partir de los tripomastigotos obtenidos de la infección inicial, con la cepa Dm28c se infectaron las células con un rango de 1,5:1, mientras que con la cepa ALF, las células fueron infectadas con una relación de 3:1. Las infecciones fueron monitoreadas diariamente en el microscopio de luz invertido, y los tripomastigotos extracelulares cuantificados el día 7 para la cepa Dm28c y el día 15 para la cepa ALF. Estos rangos de infección fueron escogidos a partir de los resultados obtenidos en pruebas anteriores, y los días de cuantificación fueron escogidos dependiendo de la cantidad de tripomastigotos extracelulares observados en el medio de cultivo. Los datos fueron procesados en Excel y analizados en el programa informático RStudio, con un nivel de significancia de 0,05.

Cuantificación de la infección celular

En una placa de 24 pocillos con un cubreobjetos redondo especial para cultivo celular, se sembraron 2×10^4 células 3T3 y se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Posteriormente, se procedió a infectar las células con 4×10^4 y 1×10^4 tripomastigotos de la cepa ALF y Dm28c respectivamente, incubando a 37°C y 5% de CO_2 durante 24 horas. Seguidamente, se eliminaron los tripomastigotos extracelulares no infectantes y se incubó la placa con DMEM al 2% de SFB durante 48 horas en las mismas condiciones. Una vez pasado el tiempo de incubación, se procedió a fijar las células con paraformaldehído (PFA) al 2%,

seguido de la tinción Hematoxilina & Eosina (H&E) para observar al microscopio, se contaron de manera aleatoria un máximo de 200 células por pocillo, de las cuales se contaron las células infectadas y el número de parásitos por célula. Se calculó el promedio de parásitos intracelulares y el porcentaje de células infectadas para cada cepa, este porcentaje se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ infección celular} = \frac{\text{Células infectadas}}{200} \times 100$$

Los experimentos fueron realizados por duplicado en fechas distintas y los datos fueron procesados en Excel y analizados con una prueba de ANOVA con el programa RStudio y con un nivel de significancia de 0,05.

Evaluación *in vitro* de la actividad tripanocida de compuestos purificados de *Hamelia* sp.

Actividad citotóxica de compuestos purificados de *Hamelia* sp. contra células 3T3 y Vero

Se utilizaron 3 compuestos hidroalcohólicos extraídos de las hojas de planta del género *Hamelia*, identificados como c1, c2 y c3. En una placa de 96 pocillos se sembraron 5 000 células en 100 µL de DMEM con SFB al 2% y se dejaron incubando durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂, periodo después del cual se realizó un lavado con PBS, equivalente a la infección celular, y se dejó incubando durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Seguidamente se adicionaron 100 µl de compuesto purificado por triplicado a distintas concentraciones y un control negativo (solo medio de cultivo). Además, se agregaron controles internos del experimento, doxorrubicina como control positivo y el disolvente (MeOH) de los compuestos como control negativo. Se dejó incubando durante 48 horas a 37°C y 5% de CO₂.

Después de este periodo se adicionó Alamar Blue 0,5X, un compuesto no fluorescente que por sí solo, al ser reducido dentro de las células vivas por enzimas reductoras, se convierte en un compuesto fluorescente llamado resorufina, por lo tanto, la fluorescencia observada es directamente proporcional a la cantidad de células viables (Munshi, Twining, & Dahl, 2014; Rampersad, 2012). La reacción se incubó por 2 horas y se realizó una lectura de fluorescencia en un lector de microplacas (SynergyH1) a 540/590 nm, la actividad biológica o citotoxicidad

de cada compuesto se definió como el porcentaje de viabilidad celular, el cual se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{(\text{Fluorescencia (u. a. F)} - \text{Fluorescencia en el blanco})}{\text{Fluorescencia en el control negativo}} \times 100$$

*u.a. F: Unidades arbitrarias de fluorescencia.

Los experimentos fueron realizados por duplicado en fechas distintas, los datos fueron procesados en Excel, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) en bloques, y el análisis de las curvas dosis-respuesta fueron analizados con el paquete “drc” en RStudio, con un nivel de significancia de 0,05.

Evaluación *in vitro* de la actividad de compuestos purificados de *Hamelia* sp. contra amastigotos

En una placa de 24 pocillos con un cubreobjetos redondo para adhesión celular, se sembraron 2×10^4 células en 300 μ l de DMEM y se dejaron incubando durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂, después de este periodo se realizó la infección celular utilizando rangos definidos en pruebas anteriores. Se aplicó un rango de 2:1 (parásitos por célula) para la cepa ALF y 0,5:1 para la cepa Dm28c, la placa se dejó incubando durante 24 horas bajo las mismas condiciones. Se removieron los parásitos extracelulares con lavados de PBS y se adicionaron los compuestos por duplicado a 8 concentraciones distintas, un control negativo (solo medio de cultivo) y ciclosporina como control positivo interno del experimento. Las placas fueron incubadas durante 48 horas a 37°C y 5% de CO₂, periodo después del cual se removió el medio de cultivo, se realizaron lavados con PBS y se fijaron las células con paraformaldehído al 2%. Una vez fijadas, las células fueron teñidas con la tinción H&E (Cortes et al., n.d.; Montalvo Arenas, 2010) para observar al microscopio.

Se contaron de manera aleatoria un máximo de 200 células por pocillo, de las cuales se contaron las células infectadas y los parásitos presentes en cada célula, la actividad biológica de cada compuesto se definió como el porcentaje de células infectadas, el cual se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Células infectadas} = \frac{\text{Células infectadas}}{\text{Células infectadas en el control negativo}} \times 100$$

Los experimentos fueron realizados por duplicado en fechas distintas, los datos fueron procesados en Excel, se realizó un ANOVA en bloques, y el análisis de las curvas dosis-respuesta fueron analizados con el paquete “drc” en RStudio, con un nivel de significancia de 0,05.

Evaluación *in vitro* de la actividad de compuestos purificados de *Hamelia* sp. contra epimastigotos

Se utilizaron los compuestos hidroalcohólicos anteriormente mencionados. En una placa de 96 pocillos, se adicionaron $2,5 \times 10^5$ epimastigotos en 50 μ l de medio LIT a cada pocillo omitiendo los blancos, inmediatamente se procedió a la adición de los compuestos a 8 concentraciones distintas por triplicado y un control negativo (solo medio de cultivo). Además, se agregaron controles internos del experimento, ciclosporina como control positivo y el disolvente de los compuestos como control negativo (Búa, Ruiz, Potenza, & Fichera, 2004; Cupello et al., 2011). La placa se dejó incubando a 27°C durante 48 horas, después de este periodo se adicionó Alamar Blue a una concentración de 1X y se dejó incubando a 27°C durante 6 horas, periodo después del cual se procedió a realizar una lectura de fluorescencia a 540/590 nm, la actividad biológica de cada compuesto se definió como el porcentaje de epimastigotos viables, el cual se obtuvo con la siguiente formula:

$$\% \text{ Epimastigotos viables} = \frac{(\text{Fluorescencia} - \text{Fluorescencia en el blanco})}{\text{Fluorescencia en el control negativo}} \times 100$$

Los experimentos fueron realizados por duplicado en fechas distintas, los datos fueron procesados en Excel, se realizó un ANOVA en bloques, y el análisis de las curvas dosis-respuesta fueron analizados con el paquete “drc” en R Studio, con un nivel de significancia de 0,05.

Criterios de selectividad

El índice de selectividad (IS) es un parámetro ampliamente aceptado y utilizado para expresar la eficacia *in vitro* de un compuesto, mide la ventana terapéutica entre la citotoxicidad y actividad antiparasitaria de un compuesto, dividiendo el valor obtenido CC₅₀ entre el IC₅₀

(Miranda et al., 2015; Sykes & Avery, 2015). Entre más alto sea el IS, más efectivo y seguro será un compuesto durante ensayos con animales, conformando de esta manera la base para realizar posteriores ensayos *in vivo*. El compuesto ideal sería aquel que posea citotoxicidad solo a concentraciones muy altas, pero que además posea actividad antiparasitaria a concentraciones muy bajas, produciendo así un alto IS y, siendo capaz de eliminar el parásito a concentraciones inferiores a su concentración citotóxica. De tal forma, los compuestos que presenten un IS mayor a 10 serán seleccionados para realizar extra-ensayos *in vitro* y proseguir con los ensayos *in vivo* (Miranda et al., 2015a).

Caracterización genética de la cepa ALF y Oso de *T. cruzi*

Para la caracterización de las dos cepas de *T. cruzi* se llevó a cabo el análisis de las unidades discretas de tipificación (DTUs) de cada cepa. Para esto se realizó la extracción de ADN genómico de cada cepa. Se tomó 1 mL del contenido del medio de cultivo LIT con parásitos en la fase logarítmica y se centrifugó a 14 000 rpm 1 minuto en una microcentrifuga (Eppendorf™5424, rotor FA-45-24-11). Seguidamente se removió el sobrenadante y se agregó 600 µl de PBS 1X estéril, se homogenizó con el vortex y se centrifugó a 14000 rpm durante 1 minuto. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se repitió el lavado con PBS 1X.

El ADN genómico de cada cepa se extrajo utilizando el Kit comercial DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo las indicaciones del fabricante. Con el ADN extraído se ejecutó una PCR anidada para amplificar una región de la secuencia 18S rADN. En la primera ronda se utilizaron los cebadores SSU4_F (5'-TGCCAGCACCCGCGGTAAT-3') y 18Sq1R (5'-CCACCGACCAAAAGCGGCCA-3'). Los cebadores para la segunda ronda fueron el SSU561F (5'-TGGGATAACAAAGGAGCA-3') y el SSU561R (5'-CTGAGACTGTAACCTCAAAGC-3') (Pinto et al., 2015).

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 20 µl, con 10 µL de DreamTaq™ PCR Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA), 4 µL de agua libre de nucleasas (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA), 1,5 µl de DMSO al 99.99%, 2µl de ADN de la muestra, 1µl de cada uno de los iniciadores a una concentración de 10 µM y 0,5 µl de albúmina de suero bovino (BSA) a una concentración de 20 mg/mL. La amplificación se realizó utilizando el perfil térmico descrito en el Anexo 5.

Como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA) y como control positivo se utilizó ADN de *T. cruzi* aislado de parásitos de la cepa Dm28c provenientes de medio LIT. Finalmente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % en buffer TAE 1X para confirmar la amplificación de las regiones de interés y se documentó mediante una fotografía realizada con una cámara digital.

Se llevó a cabo la secuenciación de los amplicones obtenidos, las secuencias se editaron utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor y se realizó un árbol de posicionamiento taxonómico empleando algoritmos filogenéticos de máxima verosimilitud y de inferencia bayesiana utilizando el programa ExaBayes. Para realizar el árbol se utilizaron como grupos externos la secuencia de *Trypanosoma erneyi* (JN040989) y *Trypanosoma dionisii* (FJ001662), para determinar la DTU las secuencias se compararon con secuencias del GenBank, National Center for Biotechnology Information (NCBI) previamente clasificadas por su DTU (Anexo 6). Finalmente, mediante un alineamiento múltiple en el programa MEGA X, se identificaron regiones conservadas e hipervariables y polimorfismos entre las cepas utilizadas en el proyecto y las cepas de referencia tomadas de la base de datos del GenBank.

Parásitos para infección *in vivo*

Tripomastigotos infectantes de las cepas ALF y Dm28c de *T. cruzi*, fueron obtenidos de un cultivo *in vitro* realizado en la línea celular 3T3 y en medio DMEM, fueron centrifugados y resuspendidos en solución salina para inyectar intraperitonealmente en ratones.

Ratones para infección *in vivo*

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 también llamados “C57 black 6”, cepa utilizada en experimentos *in vivo*. Se utilizaron machos de 1 a 2 meses. Los ratones fueron donados por el CENIBiot, los ensayos con la cepa ALF se realizaron en el bioterio del CENIBiot y los experimentos con la cepa Dm28c se ejecutaron en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Costa Rica. Estos ensayos se realizaron bajo las normas del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales (CICUA-108-17). Los ratones se

mantuvieron en el bioterio en condiciones de temperatura controlada (20-24°C), ciclos de doce horas de luz alternados con doce horas de oscuridad controlados y con alimento y agua *ad libitum*.

Modelo murino de infección crónica de la enfermedad de Chagas

Infección de ratones

Se realizaron dos infecciones independientes utilizando dos diferentes cepas de *T. cruzi*, la cepa ALF y la cepa Dm28c. Se inyectaron tripomastigotos infectantes intraperitonealmente a 9 ratones por cada cepa de *T. cruzi*. En cada ensayo se utilizaron 3 concentraciones de parásitos distintas y se infectaron 3 ratones por cada concentración.

La cantidad de parásitos inyectados para inducir la infección en los ratones fue distinta para cada cepa (Cuadro 1), estas concentraciones fueron elegidas según ensayos realizados anteriormente por la Escuela de Veterinaria de la UNA en el caso de la cepa ALF y para la cepa Dm28c se definieron según lo que reporta la literatura sobre las infecciones en modelos murinos con esta cepa (J. M. Álvarez et al., 2014; Avila, Sigman, Cohen, Millikan, & Simpson, 1991; Schmitz et al., 2014).

De la cepa ALF se inyectaron: 5×10^4 , $1,5 \times 10^4$ y $1,5 \times 10^3$ parásitos/ratón, en el caso de la cepa Dm28c se inyectaron: 1×10^4 , 1×10^5 y 1×10^6 parásitos/ratón (Cuadro 1). Los parásitos fueron inyectados en solución salina fisiológica al 0,9 %, el volumen de inyección varió dependiendo de la concentración de parásitos de 200 µl a 500 µl.

Cuadro 1. Concentración de parásitos de cada cepa de *T. cruzi* inyectados a ratones.

Cepa ALF		Cepa Dm28c	
Identificación (ID)	Parásitos/ratón	Identificación (ID)	Parásitos/ratón
A1	5×10^4	D1	1×10^4
A2		D2	
A3		D3	
A4	$1,5 \times 10^4$	D4	1×10^5
A5		D5	
A6		D6	
A7	$1,5 \times 10^3$	D7	1×10^6
A8		D8	
A9		D9	

Determinación de las parasitemias

Después de la infección se evaluó el comportamiento de los parásitos en la sangre (parasitemia) realizando el conteo de parásitos en sangre cada dos días. Para esto se extrajo sangre de la porción más distal de la cola realizando un corte superficial, se masajéo la cola desde la parte craneal a la parte caudal para colocar de 2 a 3 gotas de sangre en un portaobjetos al cual se le colocó un cubreobjetos sin presionar, finalmente se cauterizó la herida. El corte solo se realizó la primera vez, en los siguientes muestreos sólo se raspó el grano y se repitió el procedimiento anterior.

Los conteos se realizaron mediante el método de Pizzi-Brener calculando el factor de corrección (Jorge & Castro, 2000). Se contó el número total de parásitos en 50 campos, con el objetivo 40X, con el número obtenido se realizó la siguiente fórmula para obtener el número de parásitos por mililitro en cada ratón:

$$\text{Parásitos/ml} = \left(\frac{n}{50}\right) \times 45,4 \times 10^4$$

* *n*: número de parásitos contados

50: número de campos contados con el objetivo de 40X

45,4x10⁴: factor de multiplicación para extrapolar a mL

Con los datos obtenidos se elaboró una curva de parasitemia para cada infección con el fin de determinar el momento en que desaparecen los parásitos en sangre como evidencia de la conclusión de la fase aguda y eventual invasión del tejido cardíaco (fase crónica).

Pruebas histopatológicas

Una vez que el conteo de parásitos en sangre fue cero en alguna de las 3 concentraciones utilizadas se iniciaron los sacrificios para extraer el corazón y realizar los análisis histopatológicos. El primer sacrificio se realizó el día 30 post infección (p.i.) en ambos ensayos, ya que el conteo fue nulo para ALF en la concentración 1,5x10³ y para Dm28c en las concentraciones 1x10⁵ y 1x10⁶.

El segundo sacrificio se realizó el día 40 p.i. para ALF dado que, en la concentración de 1,5x10⁴ se contabilizaron cero parásitos. En el caso de la cepa Dm28c todas las concentraciones llegaron a cero el día 34 p.i., sin embargo, no se realizó el sacrificio inmediatamente porque la

fecha era muy cercana al primer sacrificio y se quiso esperar un periodo más significativo para observar cambios más marcados, por esto la extracción de órganos se realizó el día 44 p.i.

Para el tercer sacrificio se realizó un seguimiento de las parasitemias y se tomó por decisión arbitraria realizar la eutanasia cuando la concentración de parásitos en sangre se mantuviera baja (9080 parásitos/mL) o negativa por más de 10 días en alguna de las concentraciones. En el caso de ALF la parasitemia se mantuvo baja desde el día 70 p.i para todas las concentraciones y el sacrificio se realizó el día 83 p.i. Con la cepa Dm28c el sacrificio se realizó el día 52 p.i. después de que por 18 días la parasitemia se mantuviera en cero.

En las pruebas histopatológicas se evaluó el grado de inflamación, grado de necrosis y número de nidos chagásicos en el tejido cardiaco, como criterio para evaluar si se logró establecer la fase crónica (Chatelain & Konar, 2015; Meza et al., 2014; Pérez-Molina & Molina, 2017). En el caso del ensayo ejecutado con la cepa Dm28c se extrajo el intestino de los ratones para realizar pruebas de histopatología, esto porque no se encontraron parásitos en el corazón y se decidió evaluar otro órgano para descartar que el parásito tuviera un tropismo tisular diferente y estuviera presente en otros tejidos.

La eutanasia se realizó utilizando isoflurano, para inducir el adormecimiento del animal. Cuando el ratón se encontraba totalmente dormido se realizó una dislocación cervical, seguidamente se colocó al ratón sobre la tabla de disección fijando las extremidades con agujas y se extrajeron los órganos de interés. Finalmente, los órganos se colocaron en un recipiente con formalina bufferizada al 10% y se enviaron al Laboratorio de Patología de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional para su análisis.

Pruebas moleculares para detección de ADN de *T. cruzi* tisular

Se extrajo el ADN de los corazones parafinados utilizados en las pruebas histopatológicas, por tanto, se realizó un pretratamiento de la muestra mediante lavados con xilol y etanol con el fin de eliminar la parafina. Para esto, se agregaron 1 200 µl de xilol a la muestra, se agitó y se centrifugó por 5 minutos a 14 000 rpm en una microcentrífuga (Eppendorf™5424, rotor FA-45-24-11). El sobrenadante se eliminó y se adicionaron 1 200 µl de etanol al 96%, la disolución se agitó, se centrifugó en las condiciones mencionadas, y se eliminó el sobrenadante (estos lavados se realizaron por duplicado). Finalmente, la muestra se

incubó a 37°C por 15 minutos para que el etanol restante se evaporara. Después del pretratamiento se llevó a cabo la extracción de ADN mediante el Kit comercial DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Por medio de la PCR se analizó la presencia de ADN específico de *T. cruzi*, lo cual confirma la presencia del parásito en el órgano blanco. Para esta prueba se utilizaron los cebadores S35 (5'-AAATAATGTACGGG[T/G]GAGATGCATGA-3') y S36 (5'-GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT-3') que amplifican un segmento de la región variable de los minicírculos de *T. cruzi* y que generan un producto de 330pb (Ferrer, 2015). La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl con 12.5 µl de DreamTaq™ PCR Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA), 6.5 µl de agua libre de nucleasas (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA), 2µl de ADN de la muestra y 2µl de cada cebador en una concentración de 10 µM. Los controles positivo y negativo fueron los mismos que se describen anteriormente. La amplificación se realizó utilizando el perfil térmico descrito en el Anexo 7.

En los casos en que se dio la amplificación de la región variable de los minicírculos (35S y 36S) se procedió a realizar la amplificación de una región de la secuencia 18S rADN para confirmar la presencia del parásito siguiendo la metodología de la PCR anidada mencionada anteriormente.

4. Resultados

Infección de células 3T3 con tripomastigotos de *T. cruzi* *in vitro*

Infección celular inicial

A partir de epimastigotos cultivados en medio LIT, fue posible obtener tripomastigotos que lograron infectar las células 3T3. Para ambas cepas se notó la presencia de tripomastigotos extracelulares 7 días p.i. y se observó un incremento de parásitos que aumentó la cantidad de células muertas en el medio de cultivo, por lo tanto, fue necesario realizar cambios de medio cada 3 días, evitando el desprendimiento del mono capa celular.

El día 9 de conteo la cepa Dm28c poseía el doble de parásitos extracelulares que la cepa ALF y alcanzó el punto más alto de la curva cuatro días antes, con la concentración de 5×10^5

trip/cul, obteniendo un promedio de $6,64 \times 10^5$ trip/mL 14 p.i. Para el día 18, la concentración de tripomastigotos en el medio bajó a $4,825 \times 10^5$ trip/mL. Ese mismo día, las infecciones realizadas con 3×10^5 trip/cul y 5×10^5 trip/cul alcanzaron la concentración más alta de tripomastigotos en el medio de cultivo con promedios de $7,55 \times 10^5$ trip/mL y $7,05 \times 10^5$ trip/mL respectivamente, sin embargo, no existen diferencias significativas entre la concentración de trip/mL obtenidas ni en el día 14, ni en día 18 ($p > 0.05$) (Figura 1).

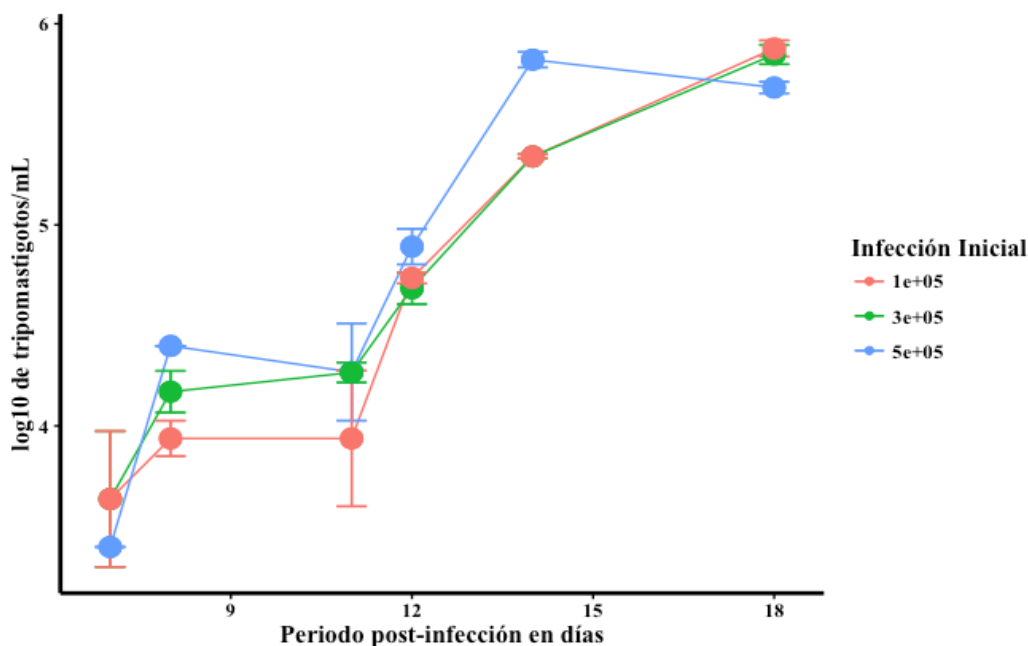


Figura 1. Curva de infección de la cepa Dm28c en células 3T3.

Con la cepa ALF, las concentraciones de 6×10^5 trip/cul y 4×10^5 trip/cul, los parásitos alcanzaron la mayor cantidad de trip/mL a los 18 días p.i. con $6,85 \times 10^5$ trip/mL y $5,775 \times 10^5$ trip/mL respectivamente, mientras que la infección realizada con 2×10^5 trip/cul logró $3,975 \times 10^5$ trip/mL 18 días p.i. Sin embargo, al igual que con la cepa Dm28c, tampoco existen diferencias significativas entre la concentración de trip/mL obtenidas diariamente ($p > 0,05$) (Figura 2).

El mismo procedimiento de infección fue realizado con la cepa Oso, sin embargo, después de 18 días p.i con observación constante, no se produjeron tripomastigotos extracelulares.

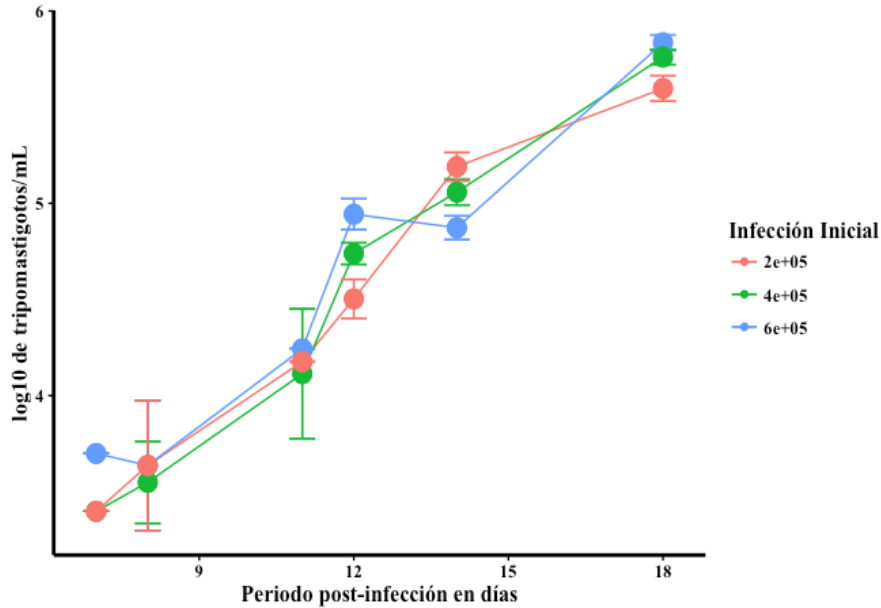


Figura 2. Curva de infección de la cepa ALF en células 3T3.

Modelo de infección celular *in vitro* para obtención de tripomastigotos

Ambas cepas lograron la liberación de concentraciones adecuadas de tripomastigotos, observándose parásitos en el medio de cultivo inicialmente entre 4 y 5 días p.i. para la cepa Dm28c, la cual alcanzó un promedio de $1,8 \times 10^6$ trip/mL 8 días p.i. mientras que con la cepa ALF se notaron parásitos inicialmente entre 8 y 9 días p.i. y alcanzó un promedio de $1,9 \times 10^6$ trip/mL 14 días p.i. (Figura 3). Ambas concentraciones fueron adecuadas para realizar todos los ensayos de infección celular (Cuadro 2).

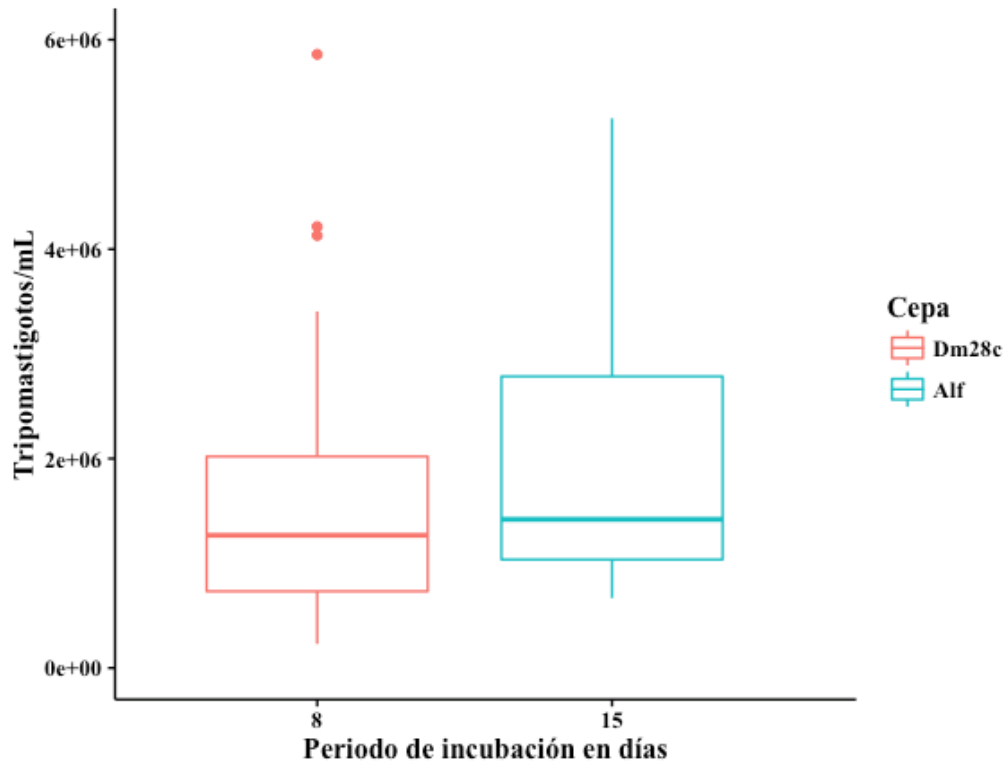


Figura 3. Promedio de tripomastigotos/mL obtenido 8 y 15 días p.i. para la cepa Dm28c y ALF en células 3T3.

Cuantificación de la infección celular

Al cuantificar la infección celular para ambas cepas se obtuvo que Dm28c posee un porcentaje de infección del 30%, mientras que la cepa ALF alcanza un porcentaje de infección del 37% 72 horas p.i. (Cuadro 2). Además, se obtuvo un promedio de amastigotos por célula de 4,74 y 1,70 para ambas cepas respectivamente (Cuadro 2). Se observó una cantidad similar de células infectadas para ambas cepas, sin embargo, la cepa Dm28c presentó mayor cantidad de parásitos por célula que la cepa ALF (Figura 4).

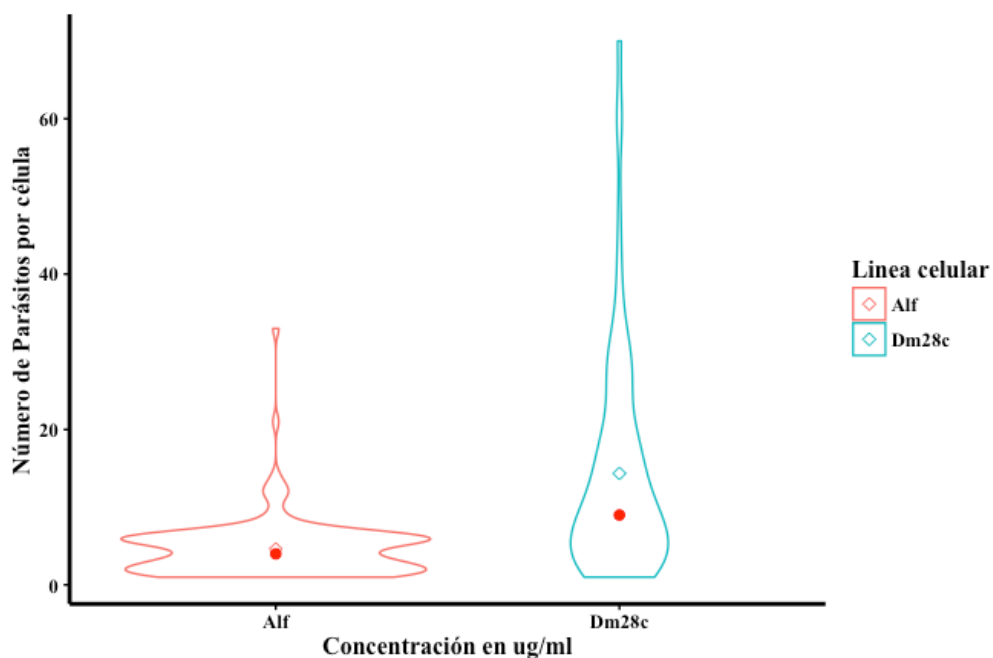


Figura 4. Promedio de amastigotos por célula 72 horas p.i .para cada cepa.

Cuadro 2. Ciclo de vida y modelo de infección *in vitro* con dos cepas distintas de *T. cruzi* en células 3T3

Cepa	Tiempo de generación de trip (días)	Obtención 1 500 000 trip/mL en días	% células infectadas	Promedio amastigotos por célula
Dm28c	4	7	30,00 ± 1,41	4,74 ± 10,65
ALF	8	15	37,00 ± 6,47	1,70 ± 3,21

Evaluación del efecto citotóxico de compuestos purificados de *Hamelia* sp. sobre células 3T3 y Vero

Se comparó el efecto de c1 sobre la línea celular Vero E6 y 3T3, y se observó un efecto anti proliferativo significativo dependiente de la concentración, con un coeficiente de determinación (r^2) de $0,97 \pm 0,02$, disminuyendo su viabilidad al 0%. Se obtuvo una CC_{50} de $39.48 \pm 0,52 \mu\text{g/mL}$ sobre Vero E6 y $53.37 \pm 0,31 \mu\text{g/mL}$ sobre 3T3, donde la CC_{50} fue significativamente menor que para Vero E6 ($p < 0,05$).

En la figura 5 se observa claramente que c1 posee mayor toxicidad sobre las células Vero E6 que sobre las células 3T3, existen diferencias significativas entre las pendientes de las curvas ($p < 0,05$) y entre los IC_{50} obtenidas, por lo que se puede decir que c1 posee un mayor efecto citotóxico sobre las células Vero E6 que sobre las células 3T3. Sin embargo, al realizar un análisis de varianzas en bloques no se observan diferencias significativas entre el efecto de c1 sobre ambas líneas celulares ($p > 0,05$).

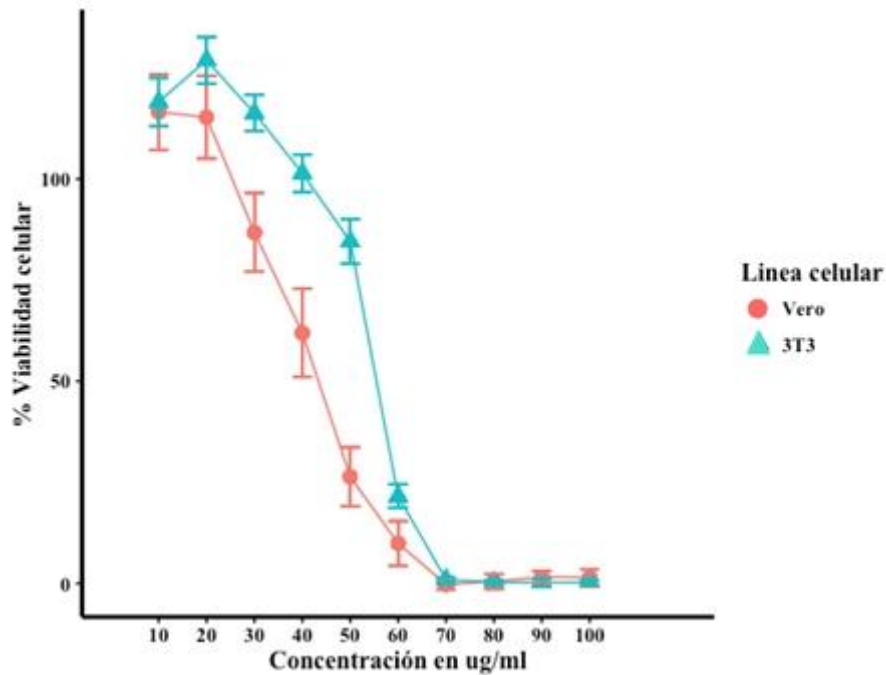


Figura 5. Efecto de c1 sobre la viabilidad celular de las células Vero E6 y 3T3 después de 72 horas de incubación.

En la figura 6 se observa el efecto anti proliferativo de c1, c2 y c3 sobre la línea celular 3T3. Se puede notar que c2 no posee efecto sobre la viabilidad celular, con un coeficiente de determinación (r^2) de $0,08 \pm 0,47$, lo cual indica que la viabilidad celular no depende de la concentración de c2 utilizada. c1 y c3 si poseen un efecto citotóxico significativo dependiente de la concentración, después de 48 horas de incubación con cada compuesto, obteniendo un r^2 de $0,95 \pm 0,04$ y $0,58 \pm 0,27$ para c1 y c3 respectivamente.

Para c1 y c3 se obtuvo una CC_{50} de $53.37 \pm 0,31 \mu\text{g/mL}$ y $77.32 \pm 4.42 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, estas concentraciones fueron comparadas y se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos ($p < 0,05$), pero también que c3 posee una

concentración IC_{50} mayor que c1, lo cual indica que c1 es más potente y eficaz que c3 sobre células 3T3.

Además, en la figura 6 se puede notar una disminución más drástica en la viabilidad celular producida por c1, especialmente a mayores concentraciones donde la viabilidad disminuye al 0%, a diferencia de c3 que a las mismas concentraciones nunca alcanza el 0% de viabilidad celular. Sin embargo, al realizar la prueba de ANOVA, no existen diferencias significativas entre el efecto de ambos compuestos ($p > 0,05$).

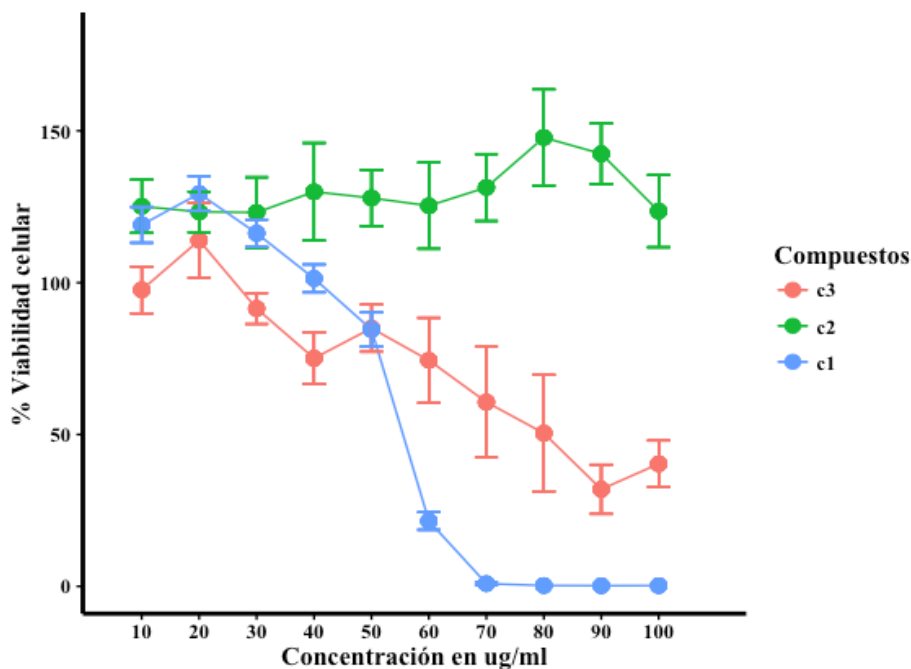


Figura 6. Efecto de c1, c2, c3 sobre la viabilidad de la línea celular 3T3 después de 72 horas de incubación.

Aunque no existe una diferencia marcada entre la actividad citotóxica de ambos compuestos, sí afectan la viabilidad de las células y este efecto es dependiente de la concentración, donde r^2 es mayor para c1 que para c3. Además, existen diferencias significativas entre las pendientes de las curvas ($p < 0,05$) y entre las concentraciones CC_{50} , donde la concentración de c3 es mayor que la concentración de c1. Los controles utilizados para estos ensayos se pueden apreciar en el anexo 1.

Evaluación *in vitro* de la actividad tripanocida de compuestos purificados de *Hamelia* sp. contra amastigotos intracelulares de la cepa ALF y Dm28c.

El compuesto c1 corresponde al primer compuesto purificado y analizado *in vitro*, razón por la cual fue probado sobre las células 3T3 con la cepa ALF, adicionalmente se repitió el mismo ensayo con las células Vero E6 infectadas por la cepa ALF. En la figura 7 se observa el efecto anti proliferativo de c1 sobre el porcentaje de células infectadas, obteniendo un r^2 de 0.82 ± 0.19 para 3T3, y de 0.70 ± 0.15 para las células Vero. Se obtuvo un IC_{50} de $36.58 \pm 2.56 \mu\text{g/mL}$ y de $35.54 \pm 6.95 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, y no existen diferencias significativas entre estos valores ($p > 0,05$). Además, al realizar un análisis de varianzas tampoco se observan diferencias significativas entre ambos modelos ($p > 0,05$).

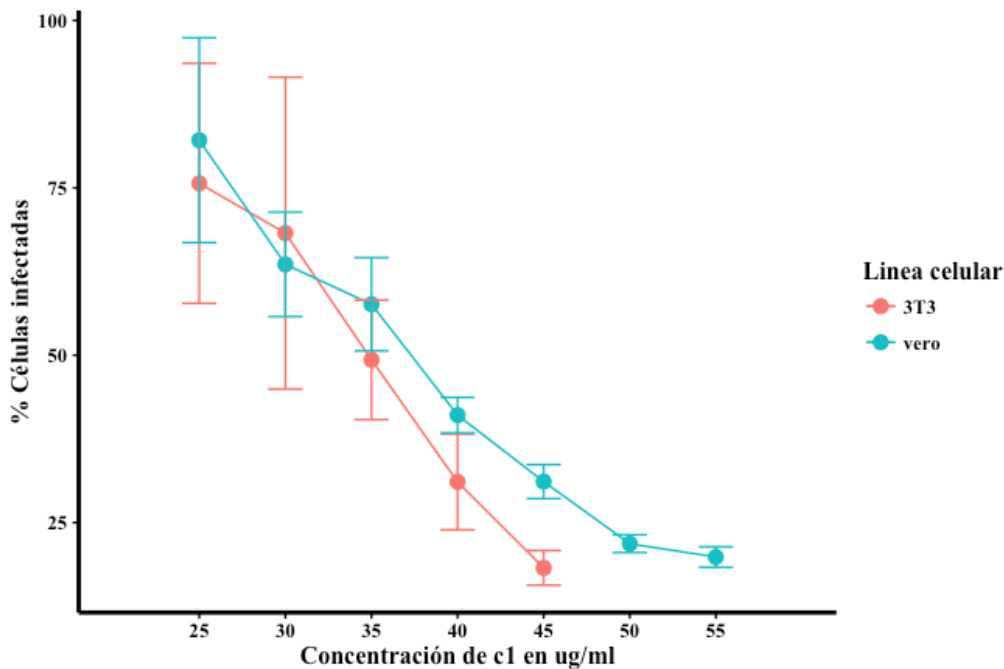


Figura 7. Efecto de c1 sobre el porcentaje de infección en células 3T3 y Vero E6.

Aunque no hay diferencias significativas en la potencia de c1 sobre las infecciones realizadas con ambas líneas celulares, se observa que las células Vero E6 poseen un promedio más alto de amastigotos intracelulares que las células 3T3, y para ambas líneas se observa una disminución de la infección celular que es dependiente de la concentración (Figura 8).

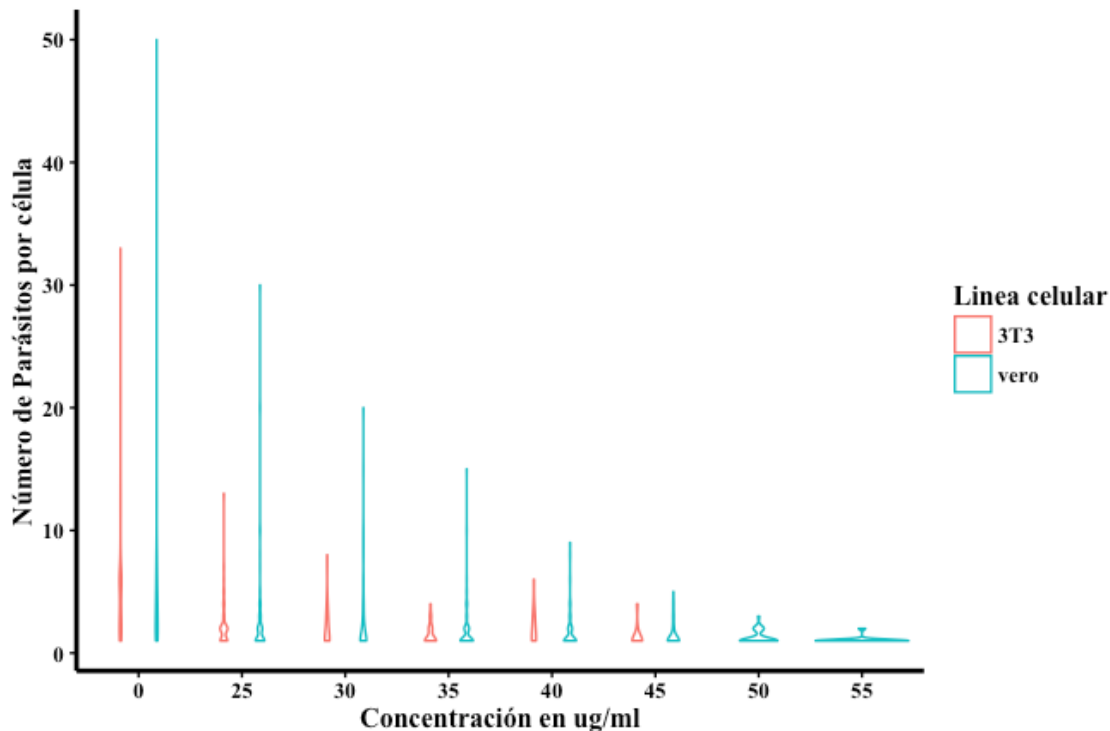


Figura 8. Promedio de amastigotos por célula después de 72 horas de incubación con c1.

Sin embargo, la cepa ALF perdió la capacidad de infectar células, por lo que se tomó la decisión de proseguir experimentos con la cepa Dm28c. En la figura 9 se observa el efecto antiproliferativo de c2 y c3 sobre el porcentaje de infección celular en las células 3T3. Ambos compuestos poseen una actividad biológica dependiente de la concentración, obteniendo un r^2 de 0.84 ± 0.11 y 0.53 ± 0.40 para cada compuesto respectivamente.

Se obtuvo una IC_{50} de $55.16 \pm 7.05 \mu\text{g/mL}$, y de $19.21 \pm 3.82 \mu\text{g/mL}$ para c2 y c3 respectivamente ($p < 0.05$), donde c3 disminuye el porcentaje de células infectadas y amastigotos intracelulares con la menor concentración. Al realizar un análisis de varianzas entre la actividad de cada compuesto, no se observa diferencias significativas ($p > 0.05$).

Aunque no haya diferencias significativas entre la actividad de los compuestos, si afectan el porcentaje de infección celular y esta actividad es dependiente de la concentración, además existen diferencias significativas entre los IC_{50} ($p < 0.05$).

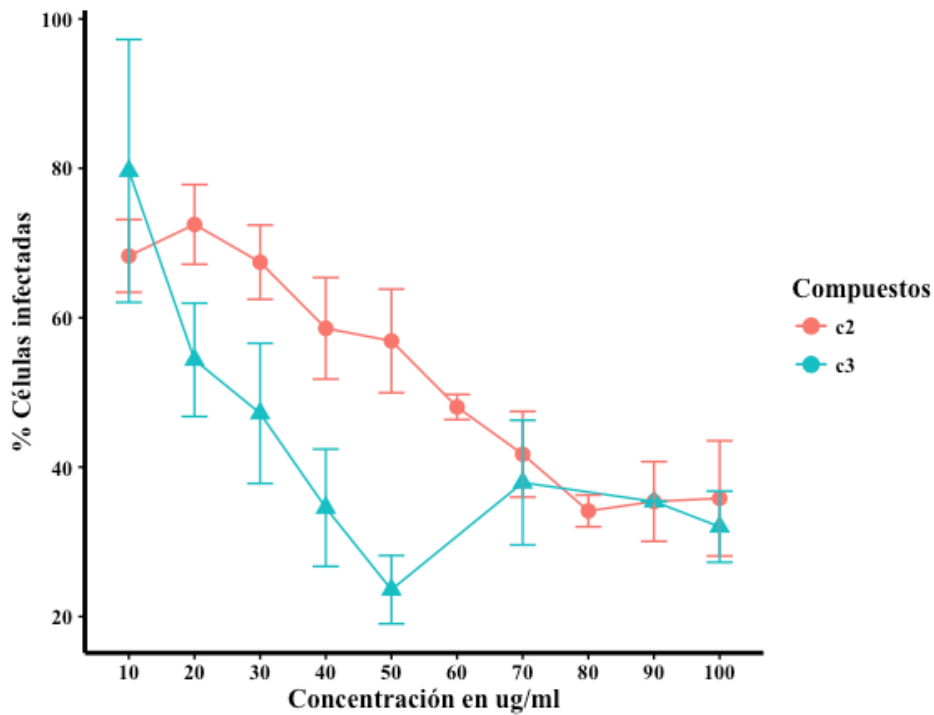


Figura 9. Efecto de c2 y c3 sobre el porcentaje de infección celular después de 72 horas de incubación en células 3T3.

En la figura 10 se puede notar como c3 disminuye la cantidad de amastigotos por célula de una manera dependiente de la concentración, a diferencia de c2, compuesto que, aunque disminuye ligeramente la cantidad de parásitos intracelulares conforme aumenta la concentración del compuesto, mantiene una alta cantidad de amastigotos por célula hasta las concentraciones más altas del compuesto. Los controles utilizados para estos ensayos se pueden apreciar en los anexos 2 y 3.

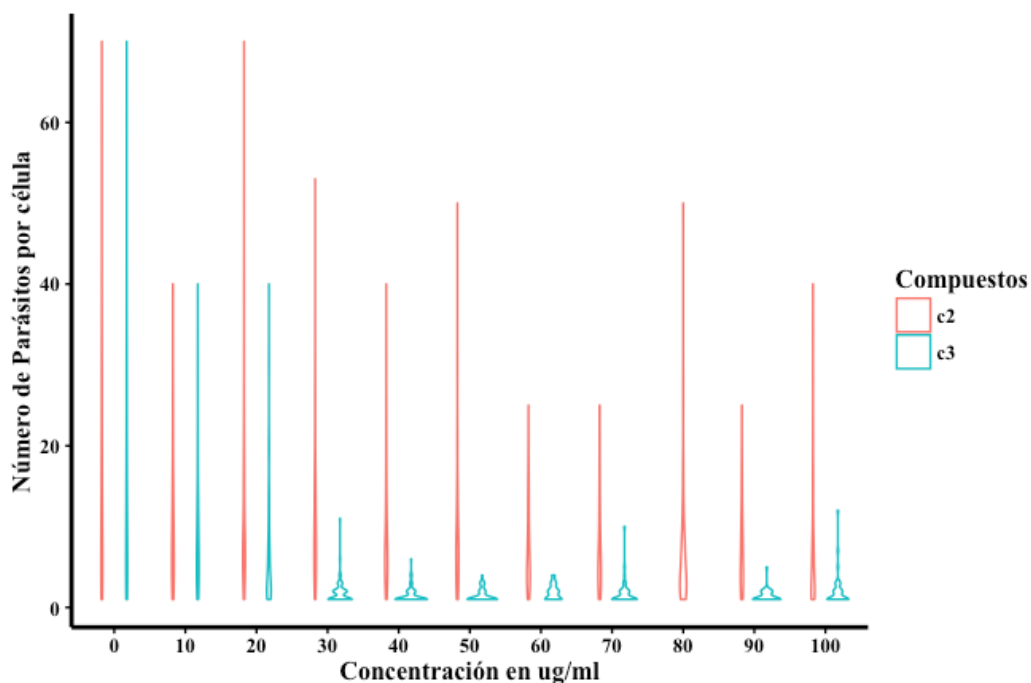


Figura 10. Promedio de amastigotos por célula a las 72 horas de incubación con c2 y c3.

Evaluación *in vitro* de la actividad citotóxica de los compuestos purificados de *Hamelia* sp. contra epimastigotos.

En la figura 11 se observa la actividad citotóxica que posee c1, c2 y c3 sobre la viabilidad de los epimastigotos de la cepa ALF (c1) y Dm28c (c2 y c3), donde se observa una clara disminución de la sobrevivencia parasitaria dependiente de la concentración, obteniendo r^2 de 0.80 ± 0.08 , 0.93 ± 0.05 , y 0.82 ± 0.10 respectivamente.

Se obtuvo el valor de IC_{50} para cada compuesto, los cuales fueron $22.47 \pm 2.58 \mu\text{g/mL}$, $35.03 \pm 11.50 \mu\text{g/mL}$, y $41.83 \pm 3.67 \mu\text{g/mL}$ para c1, c2, y c3 respectivamente ($p > 0.05$). De los tres, c1 es el más activo contra este estadio del parásito, seguido por c2 y c3. Además, en la figura 11 también se puede observar como todos los compuestos disminuyen la viabilidad parasitaria al 0% aunque, c1 es el que posee una pendiente más pronunciada ($p > 0.05$). Al realizar un análisis de varianzas con la prueba de ANOVA, no se obtuvieron diferencias significativas en la actividad de estos compuestos sobre la viabilidad de los epimastigotos. Se puede decir que c1, c2 y c3 logran disminuir el porcentaje de viabilidad parasitaria al 0% después de 48 horas de incubación, además, la actividad de estos compuestos sobre los

epimastigotos es muy similar. Los controles utilizados para estos ensayos se pueden apreciar en el anexo 4.

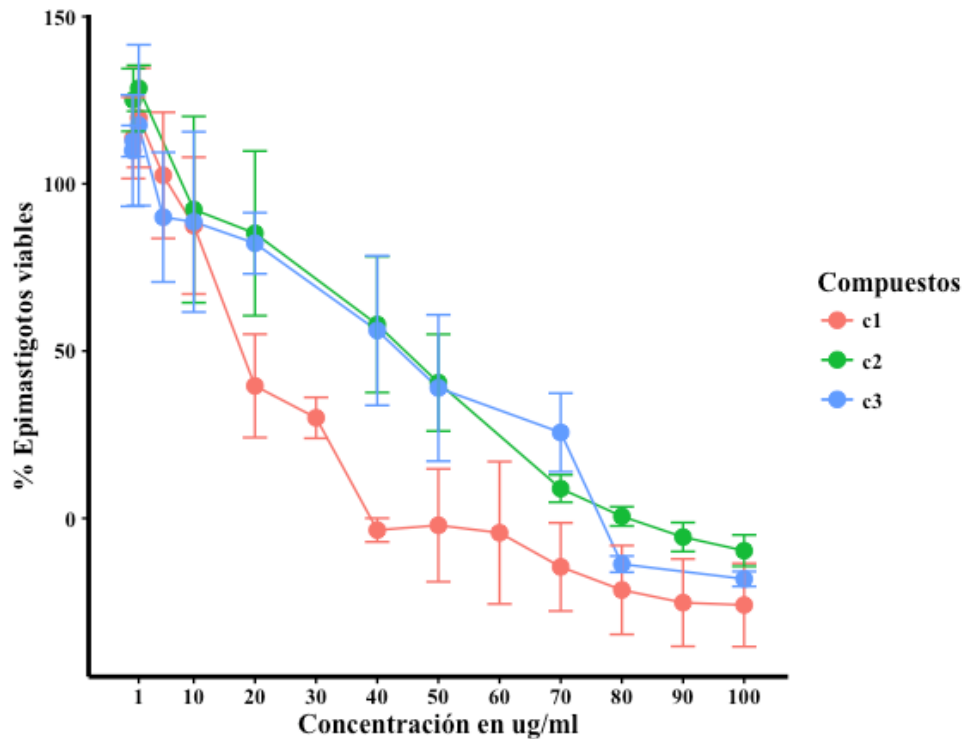


Figura 11. Efecto de c1, c2, y c3 sobre la viabilidad de epimastigotos después de 48 horas de incubación con cada compuesto.

Al analizar la selectividad de cada compuesto evaluado se observa que c1 fue el compuesto menos selectivo, obteniendo el IS más bajo entre amastigotos y células. El compuesto c2 posee mayor actividad contra los epimastigotos que contra los amastigotos, y no afecta el crecimiento celular, observándose una selectividad casi nula entre amastigotos y epimastigotos, mientras que selectividad entre amastigotos y células no se logró cuantificar ya que este compuesto no presentó citotoxicidad a las concentraciones evaluadas. Por último, c3 afecta en mayor medida a los parásitos intracelulares, seguido por los epimastigotos y las células, afectando los amastigotos dos veces más que a los epimastigotos y 4 veces más que las células (Cuadro 3).

Cuadro 3. IC₅₀ e índice de selectividad (IS) obtenidos a partir de ensayos de citotoxicidad realizados en células 3T3 y epimastigotos, más actividad tripanocida realizados contra amastigotos intracelulares.

	c1	c2	c3
IC ₅₀ contra amastigotos (µg/mL)	36.58±2.56	55.16±7.05	19.21±3.82
IC ₅₀ contra epimastigotos (µg/mL)	22.47± 2.58	35.03±11.50	41,83±3,67
CC ₅₀ contra 3T3 (µg/mL)	53.48±0.46	> 100	77.32± 4.42
Selectividad amastigotos:epimastigotos	0,6	0,6	2.1
Selectividad amastigotos:3T3	1,5	> 2	4,02

Caracterización genética de la cepa ALF y Oso de *T. cruzi*.

Los productos de PCR correspondientes a 667 pb de ambas cepas se lograron observar en el gel de agarosa entre las bandas de 1Kb y 500 pb del marcador de peso molecular, además se encuentran en la misma posición que el control positivo utilizado (Figura 12).

Se realizó un BLAST entre las secuencias ALF y Oso y se obtuvo una identidad de nucleótidos de 98.74 % (841/841 pb) entre ellas (Anexo 8, Anexo 9). Al comparar las secuencias obtenidas con la secuencia de la cepa Dm28c (AF245382), reportada con una DTU TcI, se obtuvo un alto porcentaje en la identidad de nucleótidos, 99.58 % (865/865 pb) para la cepa ALF y 98.52 % (833/833 pb) en el caso de la cepa Oso.

La cepa ALF mostró una identidad de nucleótidos de 100% (885/885 pb) con una secuencia aislada en Costa Rica (MH020170). Esta cepa fue reportada por el Laboratorio de Entomología de la Escuela de Veterinaria de la UNA, quienes trabajaron simultáneamente con la misma cepa de ALF. (Bonilla, Castro-Vásquez, Herrero-Acosta, Urbina-Villalobos, & Dolz, 2019). La cepa Oso fue aislada en el 2011 en el mismo Laboratorio, sin embargo, no se caracterizó.

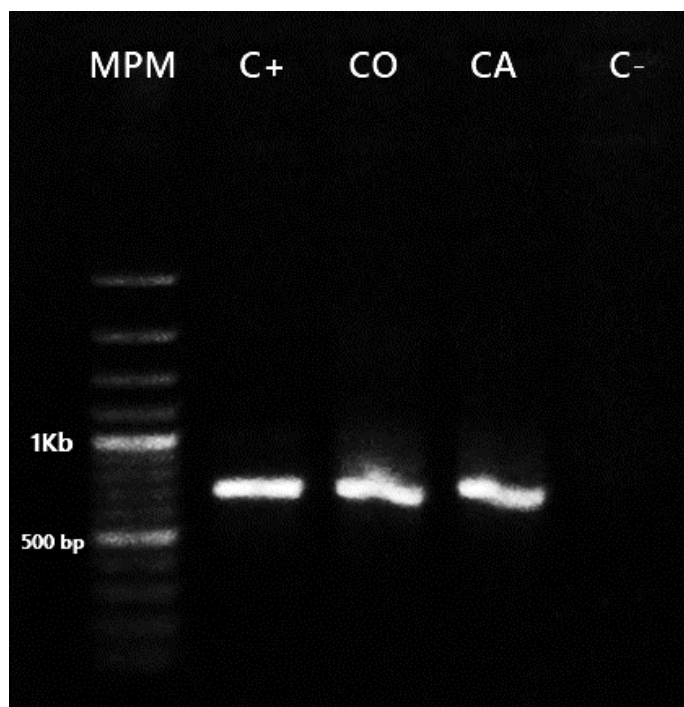


Figura 12. Productos de amplificación de la secuencia 18s rADN de ADN aislado de dos cepas costarricenses de *T. cruzi*. MPM: Marcador de peso molecular, C+: control positivo, CO: cepa Oso, CA: cepa ALF, C-: Control negativo.

Los amplicones obtenidos de las cepas ALF y Oso se secuenciaron y se alinearon con las secuencias elegidas del NCBI para realizar el estudio filogenético (Anexo 6). Según el árbol de posicionamiento taxonómico la DTU de las cepas utilizadas corresponde a TcI (Figura 13). Al confirmar con el árbol filogenético que las secuencias de las cepas son del linaje TcI, se realizó un BLAST con las secuencias elegidas del NCBI de DTU TcI, y se mostró que existe un porcentaje de identidad de nucleótidos superior al 98% entre cada una de las 2 cepas y cada cepa control (Anexo 10).

En el alineamiento completo se pueden observar las regiones conservadas en rojo, los polimorfismos en negro y los huecos en las secuencias (gaps) en azul (Figura 14). El alineamiento no presenta variables entre la región de 158pb a 389pb, en las demás regiones se puede identificar donde las bases nitrogenadas y los gaps varían según cada DTU (Anexo 11).



Figura 13.Árbol filogenético de máxima verosimilitud construido con 28 secuencias previamente depositadas en el GenBank de DTUs diferentes y las secuencias de la cepa ALF y OSO, basado en una alineación de una región del gen 18s rADN. Los colores denotan DTUs diferentes.

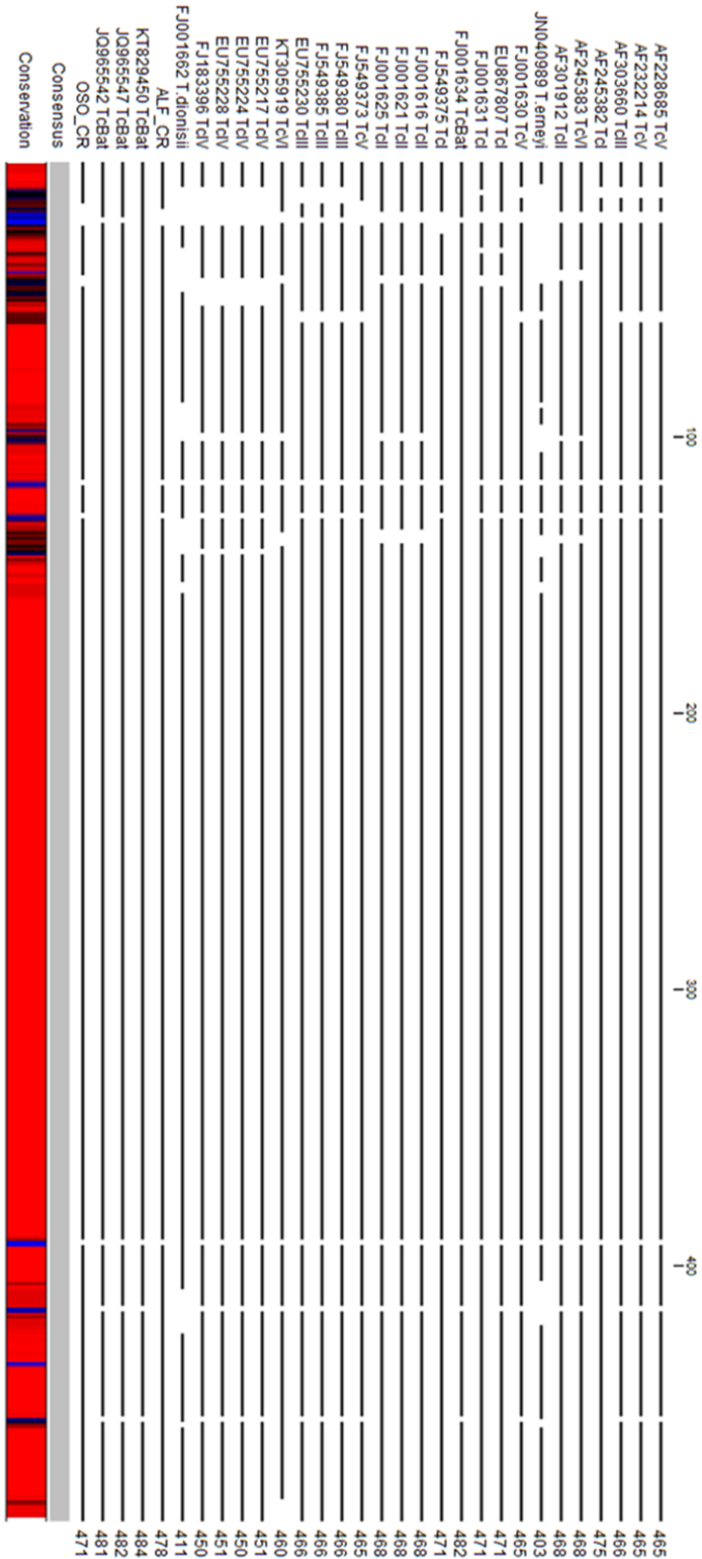


Figura 14. Alineamiento múltiple de secuencias de una región del gen 18s rADN de *T. cruzi* de diferentes DTUs realizado con el programa Mega X. El color rojo indica regiones conservadas, el negro polimorfismos y el azul los huecos en las secuencias (gaps).

Modelo murino de infección crónica de la enfermedad de Chagas.

Infección de ratones

Los ratones se infectaron con la concentración de parásitos correspondiente según la cepa de *T. cruzi* (Cuadro 1). En ninguno de los casos hubo signos clínicos de infección aguda, los ratones se mostraron saludables y mantuvieron un comportamiento normal durante todo el ensayo. El porcentaje de mortalidad en ambos casos fue del 0% durante el ensayo, 83 días para los ratones infectados con la cepa ALF y de 52 días para los ratones infectados con la cepa Dm28c.

Determinación de las parasitemias

Cepa ALF:

La aparición de parásitos en sangre se dio inicialmente al día 11 p.i. en los ratones inoculados con 5×10^4 parásitos y al día 15 se observan parásitos en sangre en los ratones infectados con $1,5 \times 10^4$ y $1,5 \times 10^3$ parásitos. La parasitemia empieza a aumentar hasta los 45-50 días p.i., a partir de este momento se reducen los parásitos en sangre. A los 60 días de la infección el número de parásitos en sangre de la concentración de 5×10^4 parásitos llega a cero y se mantiene en cero por los siguientes 23 días del ensayo. Con las otras dos concentraciones empleadas la parasitemia se mantiene entre los 10 000 y 20 000 parásitos/mL después de los 60 días, al día 70 la concentración se mantiene por debajo de 10 000 parásitos/mL hasta el día 83 que finaliza el ensayo (Figura 15).

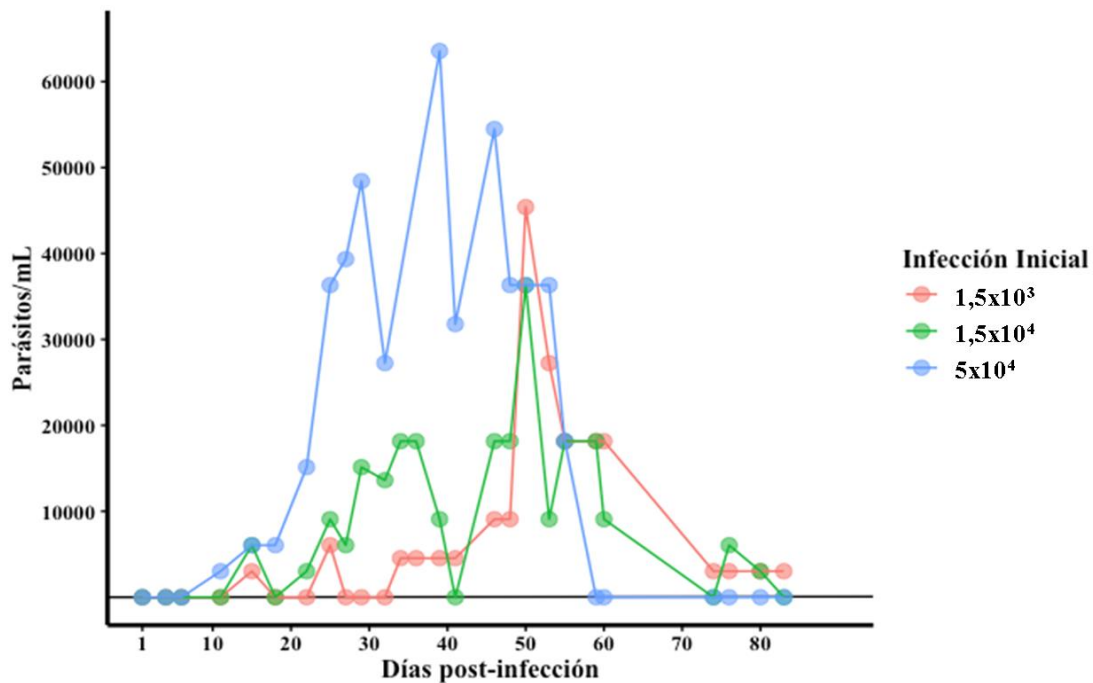


Figura 15. Parasitemia promedio en ratones C57BL/6 infectados con tripomastigotos de *T. cruzi* de la cepa ALF en distintas concentraciones.

CepaDm28c:

Los parásitos en sangre se observaron por primera vez al día 5 p.i. en los ratones inoculados con 1×10^5 y 1×10^6 parásitos, al día 8 se observan parásitos en sangre en los ratones infectados con 1×10^4 parásitos. La parasitemia aumenta hasta el día 16 y se mantiene hasta el día 20-25, después empieza a decaer hasta llegar a cero parásitos/mL al día 25 en la concentración de 1×10^5 parásitos, al día 30 en la concentración de 1×10^6 parásitos y al día 34 en los ratones infectados con 1×10^4 parásitos. A partir de que la parasitemia llega a cero con las 3 concentraciones, se mantiene negativa por 18 días más hasta el día 52 que finaliza el ensayo (Figura 16).

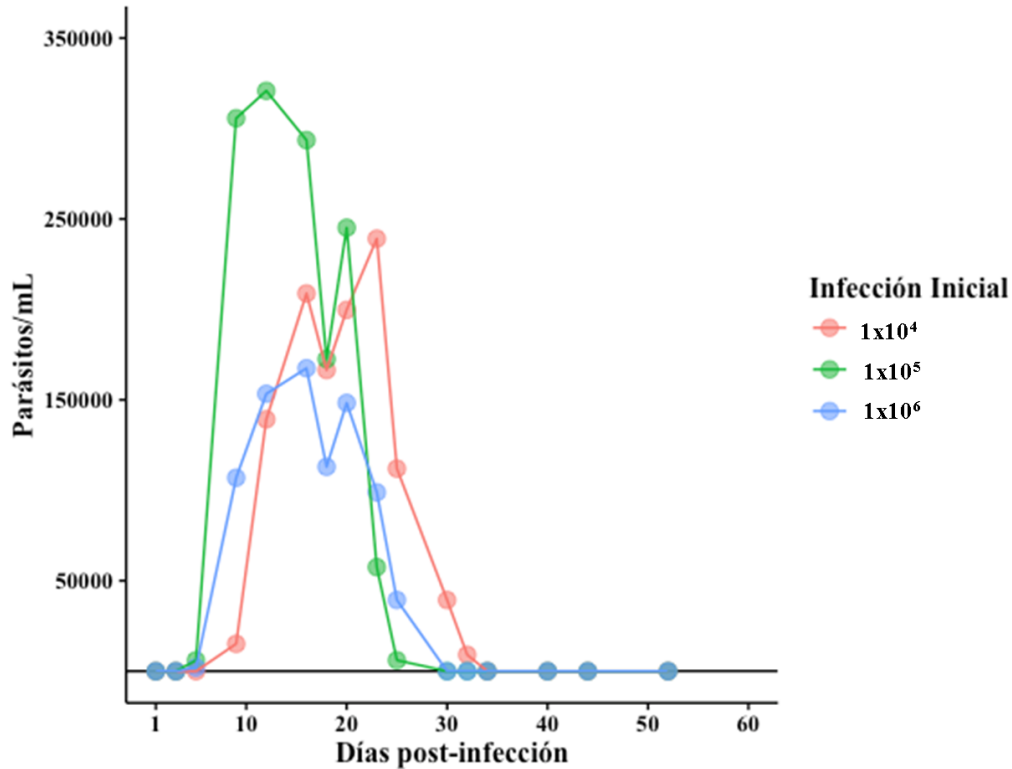


Figura 16. Parasitemia promedio en ratones C57BL/6 infectados con tripomastigotos de *T. cruzi* de la cepa Dm28c en distintas concentraciones

Pruebas histopatológicas

Cepa ALF:

La aparición de nidos chagásicos se observó desde el día 30 p.i. en el corazón de los ratones infectados con las 3 concentraciones y en dos concentraciones ($1,5 \times 10^4$ y 5×10^4 parásitos) aún había parásitos circulando en sangre en altas concentraciones. De nueve corazones solo en dos no se observó la formación de nidos (A6 y A9) correspondientes a las concentraciones de $1,5 \times 10^4$ y $1,5 \times 10^3$ parásitos. La sección del corazón más afectada y con más nidos fueron los atrios para todas las concentraciones. Además, el grado de inflamación y necrosis no se asocia directamente con la cantidad de nidos chagásicos, es decir que puede haber un grado de inflamación severo en una sección con cero nidos (A2, AD) o bien, el grado de necrosis puede estar ausente en una región con 5 nidos chagásicos (A8, AI) (Cuadro 4).

Los 3 ratones infectados con 5×10^4 parásitos mostraron entre 1 y 6 nidos en el corazón (A1, A2 y A3). El grado de inflamación varió desde ausente a severo sin importar el número de

nidos cuantificados, el tipo de inflamación fue linfocitocitario para los 3 corazones y la extensión de la inflamación fue multifocal excepto para el corazón del ratón A2 que presenta una extensión de la inflamación de tipo focal en el ventrículo izquierdo (VI). El grado de necrosis fue severo en el atrio derecho (AD) del ratón A1 con la mayor carga parasitaria (6 nidos), en los demás corazones el grado de necrosis varió desde ausente a moderado. La extensión de la necrosis fue de tipo multifocal excepto para el ventrículo derecho VD del ratón A1 que fue de tipo focal (Cuadro 4).

Para la concentración de $1,5 \times 10^3$ parásitos se produjeron nidos en dos de los tres corazones tratados (A4 y A5), en A6 no se observaron nidos. Sin embargo, este corazón presentó inflamación severa en el atrio derecho (AD) y moderada en el atrio izquierdo (AI) ambas de manera multifocal y con infiltración de tipo linfocitocitario, además, con un grado de necrosis moderada de forma multifocal en atrio derecho (AD). El grado de inflamación varió desde muy leve a severo sin importar el número de nidos cuantificados, el tipo de inflamación fue linfocitocitario para los 3 corazones y la extensión de la inflamación fue multifocal excepto para el ventrículo derecho (VD) del ratón R5 donde se dio de forma focal. El grado de necrosis fue severo para los atrios derechos (AD) con mayor carga parasitaria en los individuos A4 y A5 con 3 y 2 nidos respectivamente. La extensión de necrosis fue multifocal para todos los casos (Cuadro 4).

En los ratones tratados con $1,5 \times 10^3$ parásitos se dio la formación de nidos en dos de los tres corazones tratados (A7 y A8), en A9 no hay presencia de nidos no obstante se observa inflamación severa con infiltración de tipo linfocitocitario y de forma multifocal en ambos atrios y necrosis moderada y leve con extensión multifocal. El grado de inflamación en general varió de muy leve a severa con infiltrado linfocitocitario focal y el grado de necrosis fue de ausente a severo de forma multifocal (Cuadro 4).

Cepa Dm28c:

No se identificaron nidos chagásicos en ninguno de los tejidos estudiados. Tampoco se observaron daños severos en ninguno de los órganos solo inflamaciones leves y una inflamación moderada en el ventrículo derecho (VD) a los 44 días p.i. en el ratón D5 (Cuadro 5).

Cuadro 4. Alteraciones histopatológicas en el corazón de ratones C57BL/6 infectados con tripomastigotos de *T. cruzi* de la cepa ALF con tres concentraciones diferentes.

ID	Parásito/ ratón	P.i. (días)	Región	Nidos	Grad infl	Tipo Infil	Ext infl	Grad necr/degen	Ext necr/degen	PCR
A 1	5x10 ⁴	30	AD	6	Severo	LH	MF	Severo	MF	Positivo
			VD	0	Leve	LH	MF	Muy leve	F	
			AI	3	Moderado	LH	MF	Leve	MF	
			VI	0	Ausente	-	-	Ausente	-	
A 2	5x10 ⁴	41	AD	0	Severo	LH	MF	Leve	MF	Positivo
			VD	1	Leve	LH	MF	Ausente	-	
			AI	1	Severo	LH	MF	Leve	MF	
			VI	0	Muy leve	LH	Focal	Ausente	-	
A 3	5x10 ⁴	83	AD	1	Severo	LH	MF	Moderado	MF	Negativo
			VD	0	Leve	LH	MF	Muy leve	MF	
			AI	0	Moderado	LH	MF	Leve	MF	
			VI	0	Leve	LH	MF	Ausente	-	
A 4	1,5 x10 ⁴	30	AD	3	Severo	LH	MF	Severo	MF	Positivo
			VD	0	Leve	LH	MF	Ausente	-	
			AI	1	Severo	LH	MF	Leve	MF	
			VI	0	Muy leve	LH	MF	Ausente	-	
A 5	1,5 x10 ⁴	41	AD	2	Severo	LH	MF	Severo	MF	Negativo
			VD	0	Leve	LH	Focal	Ausente	-	
			AI	0	Severo	LH	MF	Ausente	-	
			VI	0	Muy leve	LH	MF	Ausente	-	
A 6	1,5 x10 ⁴	83	AD	0	Severo	LH	MF	Moderado	MF	Negativo
			VD	0	Muy Leve	LH	MF	Ausente	-	
			AI	0	Moderado	LH	MF	Leve	MF	
			VI	0	Leve	LH	MF	Ausente	-	
A 7	1,5x10 ³	30	AD	0	Severo	LH	MF	Severo	MF	Positivo
			VD	1	Leve	F	-	Ausente	-	
			AI	0	Severo	LH	MF	Severo	MF	
			VI	0	Muy leve	F	-	Severo	MF	
A 8	1,5x10 ³	41	AD	2	Severo	LH	MF	Leve	MF	Positivo
			VD	0	Leve	LH	MF	Ausente	-	
			AI	5	Severo	LH	MF	Ausente	-	
			VI	1	Moderado	LH	MF	Ausente	-	
A 9	1,5x10 ³	83	AD	0	Severo	LH	MF	Moderado	MF	Negativo
			VD	0	Muy Leve	LH	MF	Ausente	-	
			AI	0	Severo	LH	MF	Leve	MF	
			VI	0	Muy Leve	LH	MF	Ausente	-	

P.i: días post infección, Grad infl: grado de inflamación, Tipo Infil: tipo de infiltrado, Ext infl: extensión de la inflamación, Grad necr/degen: Grado de necrosis y degeneración, Ext necr/degen: extensión de la necrosis y degeneración, AD: Atrio derecho, VD: Ventrículo derecho, AI: Atrio izquierdo, VI: Ventrículo izquierdo, LH: Linfocitos-Histiocitos, MF: Multifocal.

Cuadro 5. Alteraciones histopatológicas en el corazón e intestino de ratones C57BL/6 infectados con tripomastigotos de *T. cruzi* de la cepa Dm28c.

ID	Parásito / ratón	P.i. (días)	Región	Nidos	Grad infl	Tipo Infil	Ext infl	PCR	Intestino
D 1	1x10 ⁴	30	AD	0	Leve	LH	F	Negativo	Colon y estómago: Inflamación linfocitocitaria con eosinófilos, leve, multifocal en capa muscular y serosa. No amastigotos
			VD	0	Leve	LH	F		
			AI	0	Leve	LH	F		
			VI	0	Leve	LH	F		
D 2	1x10 ⁴	44	AD	0	Leve	LH	MF	Negativo	Colon: Inflamación linfocitocitaria, moderada a marcada multifocal en capa muscular y serosa. No amastigotos.
			VD	0	Leve	LH	MF		
			AI	0	Leve	LH	MF		
			VI	0	Leve	LH	MF		
D 3	1x10 ⁴	52	AD	0	Leve	LH	F	Negativo	Colon: leve infiltrado linfocitocitario, focal en serosa. No amastigotos.
			VD	0	-	-	-		
			AI	0	Leve	LH	F		
			VI	0	Leve	LH	MF		
D 4	1x10 ⁵	30	AD	0	Leve	LH	MF	Negativo	Sin alteraciones significativas. No amastigotos.
			VD	0	Leve	LH	MF		
			AI	0	Leve	LH	MF		
			VI	0	Leve	LH	MF		
D 5	1x10 ⁵	44	AD	0	Leve	LH	-	Negativo	Colon: inflamación linfocitocitaria con eosinófilos, focal, en capa muscular y serosa. No amastigotos. Sin alteraciones significativas.
			VD	0	Moderada	LH	MF		
			AI	0	-	LH	F		
			VI	0	Leve	LH	F		
D 6	1x10 ⁵	52	AD	0	SAS	-	-	Negativo	Sin alteraciones significativas. No amastigotos.
			VD	0	Leve	LH	MF		
			AI	0	SAS	-	-		
			VI	0	SAS	-	-		
D 7	1x10 ⁶	30	AD	0	Leve	LH	MF	Negativo	Colon: inflamación linfocitocitaria, leve, multifocal en capa muscular y serosa. No hay presencia de amastigotos.
			VD	0	Leve	LH	MF		
			AI	0	Leve	LH	MF		
			VI	0	Leve	LH	MF		
D 8	1x10 ⁶	44	AD	0	Leve	LH	MF	Negativo	Colon: leve infiltrado linfocitocitario, multifocal, en capa muscular y serosa. No hay presencia de amastigotos.
			VD	0	Leve	LH	MF		
			AI	0	Leve	LH	MF		
			VI	0	Leve	LH	MF		
D 9	1x10 ⁶	52	AD	0	-	-	-	Negativo	Colon: inflamación linfocitocitaria focal en capa muscular y serosa. No hay presencia de amastigotos.
			VD	0	Leve	LH	-		
			AI	0	Leve	LH	F		
			VI	0	-	-	-		

P.i: días post infección, Grad infl: grado de inflamación, Tipo Infil: tipo de infiltrado, Ext infl: extensión de la inflamación, Grad necr: Grado de necrosis, Ext necr: extensión de la necrosis, AD: Atrio derecho, VD: Ventrículo derecho, AI: Atrio izquierdo, VI: Ventrículo izquierdo, LH: Linfocitos-Histiocitos, MF: Multifocal, SAS: Sin alteraciones significativas.

Pruebas moleculares para detección de ADN de *T. cruzi* tisular

Cepa ALF:

La PCR para amplificar el segmento de la región variable de los minicírculos de *T. cruzi* realizada con las muestras de ADN extraído del tejido cardíaco de los ratones, confirmó la presencia del parásito en el tejido de 5 de los 9 ratones infectados. De los siete corazones donde se detectaron parásitos por medio de los estudios histopatológicos, cinco generaron un producto de 330 pb (A1, A2, A4, A7, A8) y en dos (A3 y A5) no se dio la amplificación (Figura 17) aun cuando en los estudios histopatológicos sí se observaron parásitos en el tejido cardíaco (Cuadro 4). Las muestras A6 y A9 no amplificaron (Figura 17), estos son los únicos dos corazones en los que no se observaron amastigotos por medio de las pruebas histopatológicas (Cuadro 4).

La PCR anidada para amplificar la región de la secuencia 18S rADN dio positiva para las muestras: A1, A2, A4, A7, A8 las cuales, dieron positiva en la PCR anterior y en las pruebas histopatológicas. Las muestras A3 y A5 no amplificaron, aunque los análisis histopatológicos indicaron la presencia de parásitos en el tejido cardíaco. Las muestras A6 y A9 no amplificaron, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en las pruebas histopatológicas y la PCR anterior (Cuadro 4, Figura 18).

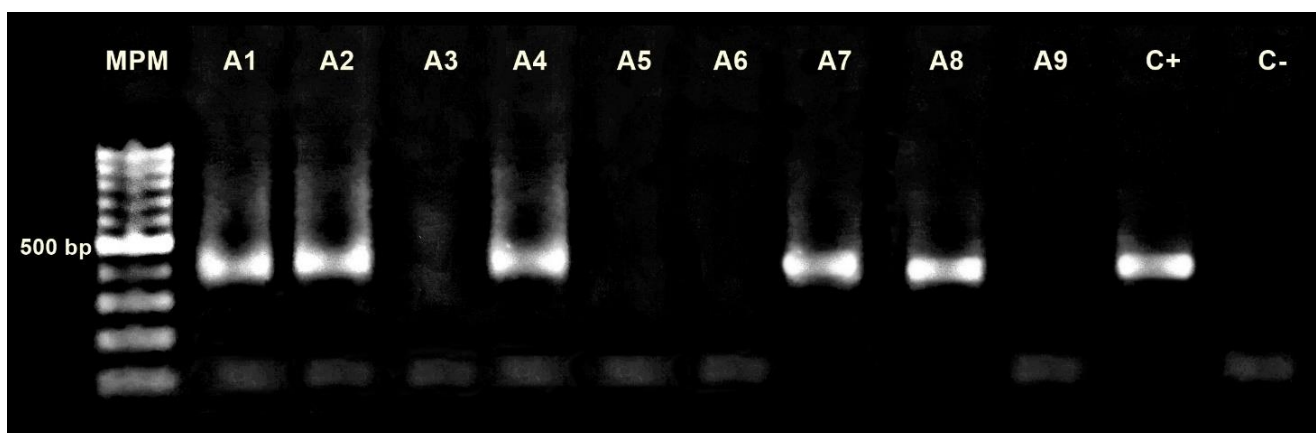


Figura 17. Amplificación por PCR del fragmento de 330 pb de kADN de *T. cruzi* (cepa ALF) en tejido cardíaco de ratones C57BL/6 infectados con tripomastigotos. MPM: Marcador de peso molecular, A1, A2, A3: ratones inyectados con 5×10^4 parásitos, A4, A5 y A6: ratones inyectados con $1,5 \times 10^4$ parásitos, A7, A8, A9: ratones inyectados con 1500 parásitos, C+: Control positivo, C-: Control negativo.

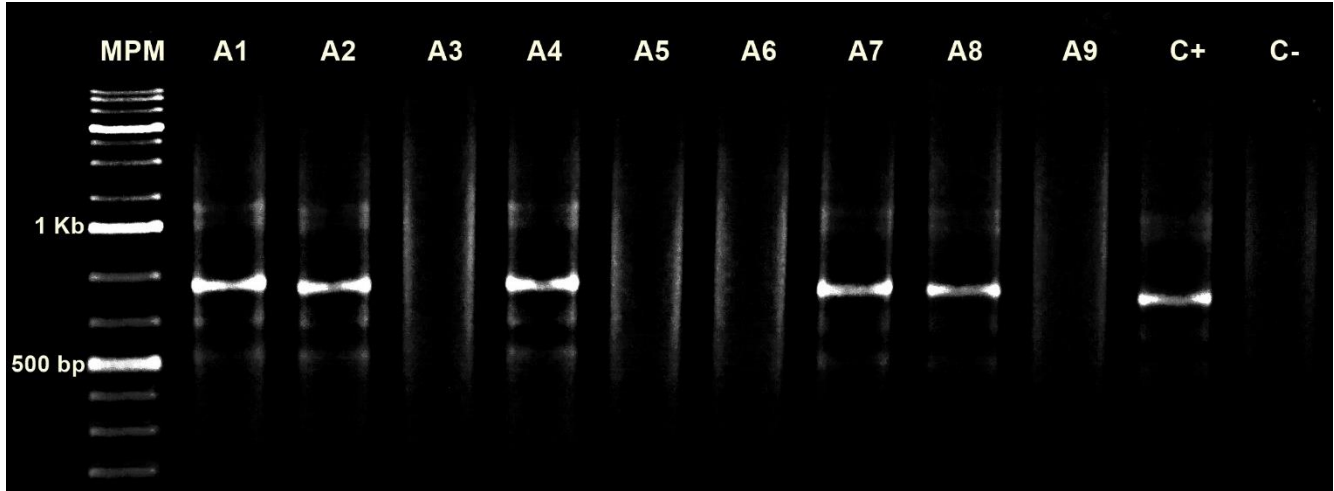


Figura 18. Amplificación del fragmento de 667 pb de la secuencia 18s rADN de *T. cruzi* (cepa ALF) mediante PCR anidada, en tejido cardíaco de ratones C57BL6 infectados con tripomastigotos. MPM: Marcador de peso molecular, A1, A2 y A3: ratones inyectados con 5×10^4 parásitos, A4, A5 y A6: ratones infectados con $1,5 \times 10^4$ parásitos, A7, A8, A9: ratones inyectados con $1,5 \times 10^3$ parásitos, C+: Control positivo, C-: Control negativo.

Cepa Dm28c:

La amplificación del segmento de la región variable de los minicírculos de *T. cruzi* fue negativa en todas las muestras de tejido cardíaco, solo amplificó el control positivo (Figura 19).



Figura 19. Amplificación por PCR del fragmento de 330 pb de kADN de *T. cruzi* (cepa Dm28c) en tejido cardíaco de ratones C57BL/6 infectados con tripomastigotos. MPM: Marcador de peso molecular, D1, D2, D3: ratones inyectados con 1×10^4 parásitos, D4, D5 y D6: ratones inyectados con 1×10^5 parásitos, D7, D8, D9: ratones inyectados con 1×10^6 parásitos, C+: Control positivo, C-: Control negativo.

5. Discusión

Los modelos de propagación de *T. cruzi in vitro* permiten su replicación, mantenimiento y la reproducibilidad de experimentos. Se utilizaron dos métodos de cultivo y diferenciación *in vitro* con dos cepas diferentes de *T. cruzi*, en primera instancia usando tripomastigotos diferenciados de epimastigotos cultivados en medio LIT los cuales fueron capaces de infectar los cultivos celulares tal como se ha demostrado en otros estudios (Bourguignon, Mello, Santos, Gonzalez, & Souto-Padron, 2006), facilitando la reproducibilidad de resultados con *T. cruzi* (Bourguignon et al., 2006). Estos resultados concuerdan con distintos estudios que también lograron la obtención de tripomastigotos a partir de epimastigotos, tanto de la cepa Dm28c como de otras cepas, logrando infectar distintas líneas celulares como la 3T3 y evidenciando la reproducibilidad del ciclo biológico de *T. cruzi* (Bourguignon et al., 2006; Hölscher et al., 2018; Marisol et al., 2015).

En segunda instancia se logró implementar modelos de infección celular con ambas cepas, a partir de tripomastigotos derivados de la primera infección celular indispensables para realizar nuevas infecciones y además obtener amastigotos intracelulares con los que se evaluó la actividad anti-amastigoto de los tres compuestos. La obtención de amastigotos en líneas celulares es fundamental para el estudio de compuestos con potencial farmacológico, ya que facilitan la continuidad y reproducibilidad de fases preliminares de estudios más amplios, y ayudan a entender los mecanismos biológicos de aquellos con potencial tripanocida (Duran-Rehbein, Vargas-Zambrano, Cuéllar, Puerta, & Gonzalez, 2014).

La cepa Dm28c alcanzó una mayor concentración de trip/mL y amastigotos por célula en menos tiempo que la cepa ALF. No solo es el promedio de amastigotos por célula mayor para la cepa Dm28c, sino que también produce mayor cantidad de parásitos en menos tiempo, demostrando que la tasa de infectividad y multiplicación es mayor para Dm28c que para ALF en modelos *in vitro*. Para la cepa Dm28c estos resultados concordaron con lo publicado donde el clon Dm28c presenta altos niveles de infectividad y proliferación en distintos tipos de células y entre distintas cepas del parásito (Contreras et al., 1988; Morales et al., 2014). Aunque las dos cepas son de la misma DTU (TcI), las diferencias observadas podían deberse a la heterogeneidad dentro de un mismo grupo relacionada con características genéticas y

biológicas, como infectividad y cinética de invasión, además de diferentes tiempos requeridos para la diferenciación intracelular del tripomastigoto a amastigoto y viceversa, y diferentes habilidades para invadir y proliferar intracelularmente (Campos et al., 2010; E. M. De Souza et al., 2003). Estas variaciones pueden influenciar la susceptibilidad a un mismo tratamiento (Ferreira et al., 2006). La población de *T. cruzi* tiene gran variabilidad intraespecífica y la resistencia a las drogas es uno de tantos aspectos a los que está relacionada esta variabilidad (J. C. V. de O. Silva et al., 2013). Es por esto que es de gran importancia analizar distintas líneas celulares y la eficiencia de infección de distintas cepas en el tamizaje de posibles drogas, ya que otorga una visión más amplia del rango de actividad de un compuesto (Lara et al., 2018). En la presente investigación, la diferencia en la tasa de infectividad y multiplicación entre las cepas evaluadas podría afectar el IC₅₀ obtenido de un mismo compuesto, siendo más eficaz para eliminar la cepa ALF, a pesar de que genera una infección menos eficiente que la cepa Dm28c.

La infección celular realizada con la cepa Oso no fue exitosa, ya que no se produjeron tripomastigotos en el medio de cultivo después de varias semanas p.i. Esto pudo deberse a los múltiples subcultivos en medio LIT probablemente debido a procesos homólogos recombinantes ocurridos durante la división celular, el parásito pudo haber entrado en estado de latencia o perdió virulencia. Este fenómeno ya ha sido demostrado en *T. cruzi* (Resende et al., 2020; Sánchez-Valdéz, Padilla, Wang, Orr, & Tarleton, 2018). Debido a esto se decidió no proseguir experimentos con la cepa Oso tanto en el modelo *in vitro* como en el *in vivo*.

En resumen, se puede decir que las células 3T3 son susceptibles a infección con ambas cepas, siendo Dm28c la cepa con mayor tasa de infectividad y multiplicación, mientras que la cepa Oso entró en estado de latencia o perdió virulencia después de un largo periodo de mantenimiento en medio LIT. Sin embargo, fue posible implementar modelos de infección *in vitro* con ALF y Dm28c, para la obtención de tripomastigotos derivados de cultivos celulares *in vitro* y para la obtención de la forma parasitaria intracelular de amastigotos

Los ensayos de citotoxicidad se utilizan para determinar si una molécula particular es capaz de matar el parásito sin dañar la célula huésped (Duran-Rehbein et al., 2014). La citotoxicidad de un compuesto y la infectividad de una cepa, pueden variar entre líneas celulares influenciando los resultados, por lo que es importante realizar ensayos en distintas líneas celulares. Como se ha mencionado, *T. cruzi* es una especie con gran variabilidad intraespecífica

y es posible que esa diversidad esté asociada a su capacidad para adaptarse y sobrevivir en diferentes hospederos influyendo en la virulencia, patogenicidad y susceptibilidad a factores externos (Ferreira et al., 2006). Por otro lado, estos ensayos funcionan como una alternativa que precede los ensayos *in vivo*, primero es necesario demostrar que el compuesto no es tóxico para las distintas líneas celulares en estudio, para lograr avanzar a modelos animales (Freshney, Capes-Davis, Gregory, & Przyborski, 2010).

Un parámetro utilizado para juzgar la potencia de un compuesto es la concentración citotóxica media (CC₅₀) o concentración inhibitoria media (IC₅₀), concentración que reduce la viabilidad celular o la infección en un 50% (Morales et al., 2014). Sin embargo, comparar solo las concentraciones IC₅₀ podría llevar a errores de interpretación de los datos ya que es relativo a las estimaciones del límite superior y límite inferior de la curva dosis-respuesta (Ritz Christian, Jensen Signe Marie, Gerhard Daniel, 2015). Se debe tomar en cuenta la concentración del compuesto que genere el máximo efecto, como criterio para seleccionar el compuesto con la mejor actividad (Chatelain, 2015).

Inicialmente se evaluó el efecto de c1 contra células 3T3 y Vero E6, con el fin de comparar resultados en ambas líneas. Tal compuesto parece ser más citotóxico sobre células Vero E6, debido a que su CC₅₀ es significativamente más baja que para la línea celular 3T3. Aunque no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ambas curvas dosis-respuesta, por lo que se puede decir que el efecto de c1 es similar en ambas líneas celulares.

El compuesto c1, también reduce el porcentaje de infección celular y amastigotos/célula de manera dependiente de la concentración, pero sin diferencias significativas entre ambas líneas celulares, obteniendo curvas dosis-respuesta muy similares. Sin embargo, al comparar entre las cepas Dm28c y ALF, se observó que la cantidad de parásitos por célula de esta última es mayor en las células Vero E6 que en las 3T3, lo cual indica que la cepa ALF posee más virulencia en la línea celular Vero E6. Por lo anterior este modelo podría ser de mayor utilidad en el futuro para la evaluación de compuestos.

Estas diferencias podrían afectar la cinética de acción y toxicidad de un compuesto, variando la potencia, especificidad y eficacia que pueda tener en infecciones al emplear distintas líneas celulares. Sin embargo, esto es de esperar debido principalmente a la heterogeneidad

genética intrínseca de este patógeno (Duran-Rehbein et al., 2014), lo cual enfatiza la importancia de realizar evaluaciones en distintas líneas celulares.

A partir de este punto se tomó la decisión de realizar los demás experimentos solo con la cepa Dm28c, debido a que la cepa ALF perdió infectividad *in vitro*, por lo que no se podía utilizar para evaluar la actividad de los compuestos restantes. Además, se decidió realizar los experimentos restantes solo con la línea celular 3T3, ya que las células Vero E6 no se encontraban en las mejores condiciones para proseguir con experimentos.

Se logró demostrar que c2 es inocuo a las concentraciones evaluadas 48h p.i. a diferencia de c3 que reduce la viabilidad celular. Sin embargo, de los tres compuestos, c1 es el más citotóxico sobre las células 3T3. Aunque c2 y c3 disminuyen el porcentaje de amastigotos intracelulares de manera dependiente a la concentración, ninguno de los compuestos redujo la infección celular al 0% a diferencia de los ensayos de citotoxicidad celular con epimastigotos.

Analizar la eficacia y potencia de un compuesto facilita la selección de aquellos que produzcan un 100% de muerte parasitaria intracelular, es una manera de discriminar entre actividad versus potencia de un compuesto y si su finalidad es eliminar los parásitos, se debe buscar una respuesta del 100% (Chatelain, 2015). El objetivo final de las pruebas *in vitro* es probar que la inhibición selectiva de patógenos se puede lograr a concentraciones que no produzcan efectos tóxicos para las células hospederas, razón por la cual se calcula el índice de selectividad (IS) para predecir la ventana terapéutica de un compuesto (Alonso-Padilla et al., 2015).

Con base en lo anterior, se determinó la selectividad entre células y amastigotos para c1 y c3, de los cuáles c3 resultó el más selectivo con un IS de 4.02, mientras que con c2 no fue posible determinar con exactitud el IS debido a que tal compuesto no tuvo actividad citotóxica dentro de las concentraciones probadas (Chatelain, 2015; Miranda et al., 2015). C3 fue también el compuesto con mayor selectividad entre amastigotos y epimastigotos, con un IS de 2.1. La selectividad que un compuesto tenga entre amastigotos y epimastigotos puede ser de interés, ya que representaría un efecto novedoso y poco estudiado que, además, podría apuntar a nuevas dianas metabólicas para el tratamiento de la fase crónica de la enfermedad. De los tres compuestos evaluados, c3 presenta mayores IS y mayor potencia, inhibiendo mejor la proliferación parasitaria intracelular y afectando en menor medida la viabilidad celular.

Como parásitos intracelulares obligados, los amastigotos se ven forzados a tomar nutrientes de la célula hospedera para lograr un óptimo crecimiento y sobrevivencia, acoplándose a los procesos metabólicos del hospedero y modulando estas rutas para facilitar el acceso a metabolitos de gran importancia para el parásito. Esto sugiere un nivel de flexibilidad metabólico y el potencial de reprogramar las vías metabólicas hospederas para suplantar sus necesidades (Carter & Ullman, 2013; Gazos-Lopes, Martin, Dumoulin, & Burleigh, 2017; Shah-Simpson, Lentini, Dumoulin, & Burleigh, 2017). De esta manera *T. cruzi* crea complejas relaciones con su huésped mamífero, en las que entrelaza redes y crea dependencias metabólicas que pueden ser utilizadas como dianas terapéuticas. Sin embargo, tal interacción podría limitar la disponibilidad de fármacos intracitoplasmáticos o promover la toxicidad celular, por lo que en el caso de patógenos intracelulares, se debe considerar que cualquier actividad inhibitoria aparente de un compuesto podría ser el resultado de daño celular después de exponerse al compuesto (Miranda et al., 2015).

Se debe señalar que c1, c2 y c3 constituyen los primeros tres compuestos evaluados en una investigación de bioprospección que tiene como objetivo comparar la actividad y potencia de 17 compuestos extraídos y purificados a partir de plantas del género *Hamelia* sp. De los tres compuestos evaluados aquí, c1 es el único hasta el momento que se ha analizado e identificado como un alcaloide pentacíclico oxindólico que ha sido asociado a plantas de distintas especies ampliamente utilizadas en las culturas tradicionales de Sur y Centroamérica debido principalmente a sus múltiples aplicaciones medicinales (Pilarski, Filip, Wietrzyk, Kuraś, & Gulewicz, 2010; Therapies, 2009).

Aunque estos métodos para evaluar la selectividad *in vitro* de un compuesto son ampliamente aceptados, no son 100% confiables ya que, al evaluar la citotoxicidad y la actividad antiparasitaria por aparte, se omite el efecto citotóxico que la propia infección pueda tener sobre las células (Miranda et al., 2015).

En resumen, se puede concluir que fue posible comparar y confirmar la actividad tripanocida de tres compuestos distintos, de los cuales el más selectivo contra amastigotos fue el compuesto c3, se podría atribuir la actividad tripanocida observada al efecto citotóxico inflingido sobre las células por la exposición a los compuestos. Estos resultados evidencian el

buen progreso de la investigación e impulsan a purificar más moléculas de más especies del género *Hamelia* sp. y cuantificar su actividad.

Según la caracterización genética de las cepas y el árbol filogenético, las cepas utilizadas en este trabajo se clasifican según su DTU como TcI. Nuestro hallazgo de este tipo de DTU concuerda con lo reportado en la literatura. En Costa Rica ya se ha reportado la presencia del linaje TcI en perros, chinches, zarigüeyas y humanos (Bonilla, Castro-Vásquez, Herrero-Acosta, Urbina-Villalobos, & Dolz, 2019; Zuriaga et al., 2012). Además, este linaje es común encontrarlo en América, corresponde al DTU más abundante en Latinoamérica (Abrás et al., 2017; Zuriaga et al., 2012).

La cepa Dm28c que se utilizó en los ensayos *in vitro* e *in vivo*, también se clasifica como TcI (Grisard et al., 2014; Kawashita, Sanson, Fernandes, Zingales, & Briones, 2001). A pesar de que las tres cepas utilizadas en este trabajo corresponden a un mismo linaje, su comportamiento en los ensayos *in vitro* e *in vivo* fue distinto (infección y la virulencia). Estos resultados sugieren que existen diferencias dentro de una misma unidad de tipificación, como lo confirman varios autores indicando que la DTU con mayor diversidad genética es el TcI (Dorn et al., 2017; Llewellyn et al., 2009; Zingales et al., 2012).

Se conoce que la variabilidad del linaje TcI puede estar relacionada con el ciclo de transmisión de la cepa, el cual puede ser selvático o doméstico. (Llewellyn et al., 2009; Ocana-Mayorga, Llewellyn, Costales, Miles, & Grijalva, 2010; Spotorno O, Córdova, & Solari I, 2008). Es conocido que existen diferentes haplotipos del linaje TcI. Herrera et al (2007), clasificaron el linaje TcI en cuatro haplotipos distintos según polimorfismos en el gen mini-exón. Cura et al (2010), confirmó estos resultados y además indican que existe un quinto haplotipo. Además, Falla et al (2009), obtuvieron 3 haploides distintos del linaje TcI utilizando cebadores diseñados para reconocer el gen mini-exón.

Ensayos *in vitro* han demostrado que la infección y la virulencia producida en la misma línea celular por cepas de la misma DTU son diferentes probablemente producto de su variabilidad genética (Llewellyn et al., 2009; Ocana-Mayorga et al., 2010; Spotorno O et al., 2008). Por ejemplo, el proceso de internalización del parásito a las células esta mediado por varias proteínas reguladoras ubicadas en la superficie del parásito, la composición proteica va a variar según la cepa (Ramírez-Tolosa et al., 2020). También, el parásito cuenta con factores

de virulencia que le permiten evadir el sistema inmune del hospedero (Jiménez, Jaimes, Poveda, & Ramírez, 2019). Estas dos características pueden determinar el nivel de virulencia e infectividad que posee el parásito.

En el caso de los ensayos *in vivo*, se ha demostrado que existen diferencias en la infectividad de las cepas y la respuesta del individuo, empleando cepas de la misma DTU. Meza y colaboradores (2014), inocularon ratones Swiss con varias cepas de *T. cruzi* tipificadas como TcII y obtuvieron diferencias en las curvas de parasitemia y en el daño tisular.

En el presente estudio se demostró también que, siendo dos cepas del mismo linaje a concentraciones similares de parásitos inoculados, la parasitemia fue mayor con la cepa Dm28c que con la cepa ALF en los ratones C57/BL/6. Así mismo, la persistencia de parásitos sanguíneos de la cepa ALF fue mayor prolongándose hasta por 74 días con 10 000-20 000 parásitos/mL hasta el final del ensayo mientras que los ratones eliminaron los parásitos de Dm28c llegando a 0 en el día 34. Los ratones abortaron la infección en el caso de la cepa Dm28c, debido a la resistencia que ya se ha reportado en los ratones C57BL/6 contra esta cepa de *T. cruzi* (Vera, 2005). Por otro lado, la cepa ALF, mantuvo la infección y provocó la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

Los resultados de la infección *in vitro* e *in vivo* con la cepa Dm28c es muy distinta, la cepa logra infectar las células, pero no logró provocar enfermedad en los ratones. Esto sucede porque, existen diferencias entre un modelo *in vitro* y uno *in vivo*, el modelo *in vitro* se basa en la respuesta de una línea celular, es un ensayo limitado ya que no refleja una imagen total de la respuesta que da un organismo complejo. Por otro lado, los modelos *in vivo* representan un sistema biológico más realista, los resultados son multifactoriales ya que proporcionan el efecto combinado de variables de respuesta que produce el organismo como lo son su sistema inmune innato y adaptivo (Zhang et al., 2012).

En el modelo *in vivo*, la infección esta mediada por el sistema inmune del ratón mientras que las células no responden de la misma forma. Es por esto que la carga parasitaria de una misma cepa no va ser igual en el modelo *in vitro* que en el modelo murino. Canavaci et al (2010), sugieren que el crecimiento y la diseminación del parásito en el modelo *in vivo* tiende a tomar más tiempo que en los modelos *in vitro* dada a la respuesta de las células T que se produce en los modelos *in vivo* pero está ausente en el modelo *in vitro* (Canavaci et al., 2010).

En resumen, aun cuando una de las limitantes de este trabajo fue el número de cepas tanto de *T. cruzi* como de ratones, se logró confirmar que parásitos del mismo linaje se comportan diferente, *in vitro* e *in vivo*. La cepa ALF logró producir la infección en ambos modelos, por el contrario, la cepa Oso no infectó ni células ni ratones (según ensayos *in vivo* realizados en la Escuela de Veterinaria de la UNA), la cepa Dm28c, aunque infectó células, solo causó una infección transitoria en los ratones.

Conocer la DTU de una cepa de *T. cruzi* es importante ya que permite diferenciar entre las patologías que presentaría un paciente infectado. Por ejemplo, hay linajes con diferentes tropismos tisulares, como las cepas TcI que están relacionadas a cardiopatías chagásicas (Zuriaga et al., 2012). Las cepas de TcII también invaden tejido cardiaco mientras que las cepas TcIV tienen preferencia por el sistema nervioso y el cerebro (Meza et al 2014). Debido a que TcI, TcII, TcV y TcVI están frecuentemente asociadas con la infección humana, es preferible trabajar con estas cepas para ensayos de cribado de drogas (Fonseca-Berzal et al., 2018).

La unidad de tipificación TcI representa una buena opción para este tipo de investigación, como se mencionó, es uno de los linajes más asociados con la infección humana, por lo cual es ideal para utilizarla en el cribado de drogas. Sin embargo, posee la limitación de ser muy variable a nivel de DTU, por tanto, determinar las diferencias en la capacidad infectante de las cepas guiándose solo por la DTU no es eficiente, se requiere un estudio más amplio de caracterización genética y más cepas del mismo linaje de áreas geográficas diferentes.

En el modelo de infección murino, las concentraciones de parásitos utilizadas para ambas cepas no afectaron el comportamiento normal de ninguno de los ratones tratados. La apariencia física, la alimentación e ingesta de agua y los signos clínicos se mantuvieron normales durante todo el ensayo. Con la cepa ALF la parasitemia persistió hasta el final del ensayo y se dio la formación de nidos chagásicos en tejido cardiaco, lo cual, junto con la ausencia de signos y la sobrevivencia, evidenció el establecimiento de la fase crónica en los ratones. Por otro lado, con la cepa Dm28c la parasitemia se redujo a cero al mes de la infección, no volvió a aumentar y no se dio la invasión de tejidos lo que indica que los ratones abortaron la infección.

La primera fase que produce la infección de *T. cruzi* en murinos se conoce como fase aguda, perdura de 4 a 8 semanas, se caracteriza por una alta parasitemia donde todas las células

nucleadas del hospedero son blancos potenciales de la infección, puede causar la muerte del hospedero en el primer mes (Chatelain & Konar, 2015; Villalta et al., 2013). Además, esta fase genera infiltrados inflamatorios en tejidos como el colon, corazón, hígado y músculo esquelético mientras la carga de parásitos en sangre se mantiene alta (Mateus et al., 2019), también ocurre piloerección, pérdida de peso y deshidratación en los ratones, estos signos clínicos no se observaron en ninguno de los dos grupos de ratones. Con la cepa ALF, los ratones pasaron por una etapa aguda asintomática con un periodo de prepatencia de 15 días aproximadamente, luego de la cual se empiezan a observar parásitos circulando en sangre, estos aumentan su concentración hasta llegar al pico de parasitemia, pero no hubo signos clínicos de infección aguda severa ni muerte.

Si el hospedero logra sobrevivir a la fase aguda, entra a una etapa de transición de la fase aguda a crónica. En este periodo, los síntomas de la enfermedad empiezan a disminuir y el número de parásitos circulando en sangre decrece gradualmente, esto como resultado de la inducción de una respuesta inmune que consigue controlar la infección pero no eliminarla (Le Loup et al., 2011; Villalta et al., 2013). Esta transición se observó en los ratones infectados con la cepa ALF, en los que se registró un pico de parasitemia alto durante el inicio de la infección y empezó a disminuir a los 45-50 días p.i. Paralelamente, ocurrió la invasión del tejido cardiaco, a los 30 días p.i. cuando aún se encontraban tripomastigotos circulando en sangre, persistieron asintomáticos y en ese momento los ratones empezaron a desarrollar la fase a crónica.

La fase crónica se caracteriza por la presencia de *T. cruzi* en los tejidos musculares del hospedero y por generar infiltrados inflamatorios más severos que en la fase aguda, producto de la formación de nidos chagásicos en los órganos (Chatelain & Konar, 2015; Mateus et al., 2019). En los ratones infectados con la cepa ALF se dio la invasión de los tejidos desde el día 30 p.i y la parasitemia disminuyó a los 60 días p.i, y se observó que en ese momento la concentración de parásitos fue mayor en los tejidos del hospedero en forma de nidos chagásicos que en la sangre, esto confirma que se obtuvo el modelo crónico de la enfermedad (Guarner et al., 2001; Junqueira et al., 2017; Scarim et al., 2018).

Por otro lado, los análisis de parasitemia, histopatología y la ausencia de signos en ratones infectados con cepa Dm28c demostraron que el parásito solo indujo una parasitemia transitoria, no hubo hallazgos de amastigotos en corazón ni intestino por lo que no logró

producir la fase crónica de la enfermedad. La resistencia ante la cepa Dm28c ya ha sido reportada en algunos modelos murinos. Calvet et al (2004), confirmaron la resistencia de los ratones Swiss ante una infección con la cepa Dm28c concluyendo que los ratones abortan la infección aproximadamente al día 23 p.i. Además, no se observaron parásitos en tejido cardíaco ni inflamación durante la fase aguda y todos los animales infectados sobrevivieron al igual que en nuestro ensayo. A diferencia del estudio mencionado, en este trabajo además de las pruebas histopatológicas se correlacionó con la ausencia de ADN del parásito en los tejidos mediante la técnica de PCR, aunque es sabido que la ausencia de material genético no excluye infección.

En modelos murinos la mortalidad acumulada es utilizada para determinar la virulencia de la cepa (Valle-Reyes et al., 2017) por lo que, se puede concluir que la cepa Dm28c en ratones C57/BL6 no es virulenta, pues la mortalidad acumulada fue de 0%. Estos resultados coinciden con estudios que indican que la cepa Dm28c de *T. cruzi* se caracteriza por una baja virulencia y un porcentaje de mortalidad bajo en ratones C57BL/6, A.Sw y Swiss (De Melo Medeiros, Araújo-Jorge, Batista, Da Silva, & De Souza, 2010; Silva-dos-Santos et al., 2017; Vera, 2005). Sin embargo, en este estudio se trabajó con Dm28c ya que, los resultados de las pruebas *in vitro* indicaron que Dm28c es más virulenta al compararla con la cepa ALF, por lo que nos interesó observar el comportamiento de la cepa en un modelo *in vivo* confirmando lo que se ha descrito.

El porcentaje de mortalidad para la cepa ALF fue del 0% a los 83 días p.i cuando finalizó el ensayo. Sin embargo, durante este periodo ninguno de los ratones abortó la infección y en todos los casos el parásito provocó daño tisular en corazón, a pesar de que en algunos se observaron pocos o ningún nido chagásico, la inflamación y necrosis fue severa. Por esto, la virulencia de la cepa AFL en ratones C57BL/6 es mayor que la virulencia de la cepa Dm28c.

La virulencia y los niveles de parasitemia se ven afectados por causas ya mencionados y por factores externos como las condiciones ambientales y niveles de estrés del hospedero (Oliveira et al., 2018; Silva-dos-Santos et al., 2017; Valle-Reyes et al., 2017). Sin embargo, los ratones de este estudio siempre estuvieron bajo condiciones controladas.

Los ensayos histopatológicos también evidenciaron que existen diferencias en el comportamiento biológico del parásito según la cepa, al igual que se ha descrito en otros estudios (Valle-Reyes et al., 2017). El proceso de invasión cardíaca del parásito solo ocurrió en la infección realizada con la cepa ALF. En el caso de la cepa Dm28c a pesar de que se inyectó

una mayor cantidad de parásitos y la parasitemia alcanzó un mayor nivel no se dio la formación de nidos chagásicos en corazón ni en intestino. Esto concuerda el estudio de Vera (2005), donde no se observa la formación de nidos chagásicos en ninguno de los órganos estudiados en ratones C57BL/6. Se ha reportado que la cepa C57BL/6 posee algunos genes que influyen en la respuesta inmune contra la cepa Dm28c, estos genes aportan resistencia al ratón contra esta cepa (Vera, 2005).

La cepa ALF sí produjo la formación de nidos chagásicos en corazón, con excepción de dos corazones donde no se observaron nidos. Sin embargo, se evidenció daño en el tejido, con inflamación y necrosis, patologías comunes de la fase crónica de Chagas y que pueden ser producidas por la respuesta inmune del ratón (Le Loup et al., 2011). Asimismo, el daño tisular puede ser producido por la autoinmunidad la cual, activa auto-anticuerpos como respuesta inmunológica por parte del ratón ante diferentes moléculas del parásito, estos anticuerpos no son específicos y pueden reaccionar contra los tejidos del ratón (Jiménez et al., 2019). Por esto no se puede descartar una cardiopatía chagásica solo por la ausencia del parásito en el corazón (Lescure et al., 2010; Mello et al., 2015). Las lesiones en estos dos corazones fueron multifocales y severas lo que indica que posiblemente el parásito estaba iniciando el proceso de invasión tisular (Mardahl, Borup, & Nejsun, 2019; Valle-Reyes et al., 2017; Vallejo et al., 2016).

Además de la histopatología y para tener una segunda confirmación de la presencia o ausencia del parásito en los tejidos estudiados, se realizaron pruebas moleculares que detectan material genético específico de *T. cruzi* (Díaz et al., 2015; Ferrer, 2015). En el caso de la cepa ALF, de los siete corazones en los que se encontraron nidos chagásicos por histopatología dos dieron negativo en las pruebas moleculares. La extracción de ADN se realizó a partir de corazones fijados en formalina y posteriormente parafinados. Se ha reportado que los procesos de fijación y parafinación pueden desnaturalizar el ADN afectando la calidad y cantidad del material genético en la extracción. Además, el pretratamiento con xilol y etanol puede generar inhibidores de la PCR (Boos, Nobach, Failing, Eickmann, & Herden, 2019; Libório, Etges, Neves, Mesquita, & Nunes, 2005). Por estas razones, una muestra que se determinó positiva mediante histopatología puede dar negativa en la detección molecular, aparte de que la prueba PCR no es 100% sensible si contiene contaminantes.

Las pruebas moleculares con la cepa Dm28c fueron negativas en los tejidos analizados apoyando la ausencia de invasión del corazón o intestino de los individuos infectados. Incluso no hubo evidencia de daños tales como inflamación severa o necrosis en los tejidos estudiados lo que confirma una vez más que la cepa Dm28c es de baja virulencia en ratones C57/BL6(Calvet et al., 2004; De Melo Medeiros et al., 2010; Silva-dos-Santos et al., 2017; Vera, 2005).

La fase crónica está determinada por una concentración baja de parásitos en sangre, daños tisulares causados por la infiltración multifocal del parásito en las células, invasión de tejidos e inflamación local y la formación de nidos chagásicos (Pérez-Molina & Molina, 2017; Ribeiro et al., 2012; Villalta et al., 2013). Todo esto ocurrió en la infección realizada con la cepa ALF por lo tanto podemos concluir que esta cepa indujo la fase crónica de la enfermedad y eventualmente se podría utilizar para realizar ensayos *in vivo* en la cepa de ratón C57BL/6.

6. Conclusiones

Mediante la implementación de modelos de infección celular con tripomastigotos derivados de medio LIT, se logró reproducir el ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* de dos de las tres cepas evaluadas. Además, se implementaron modelos de infección *in vitro* con tripomastigotos derivados de cultivos celulares, obteniendo la concentración de tripomastigotos/mL necesarios para realizar nuevas infecciones y conseguir la forma intracelular de amastigotos

Se demostró que la cepa Dm28c posee mayor tasa de infectividad y multiplicación *in vitro* que la cepa ALF, generando la misma cantidad de tripomastigotos en el doble de tiempo en las células 3T3. La cepa Oso entró en estado de latencia o perdió virulencia después de un largo periodo de mantenimiento en medio LIT, por lo que se omitió en ensayos posteriores.

A partir de los modelos implementados se lograron determinar los ciclos de infección *in vitro* de ambas cepas, y conseguir tripomastigotos derivados de cultivos celulares, que posteriormente fueron utilizados para obtener amastigotos intracelulares y evaluar la actividad

de los compuestos de interés. También se logró determinar que la cepa ALF posee mayor tasa de infección en la línea celular Vero E6 que la línea 3T3. Además, este protocolo de infección celular puede ser extrapolado a diferentes cepas de parásitos y líneas celulares, facilitando la generación de información pertinente al rango de actividad biológica que un compuesto pueda tener.

A partir de estas infecciones fue posible llevar a cabo la cuantificación *in vitro* de actividad tripanocida. De tres compuestos evaluados, c3 fue el que tuvo mayor capacidad inhibitoria contra amastigotos y mayor IS con células y epimastigotos. En este trabajo se validó un modelo de cuantificación de la actividad biológica de distintos compuestos que, además puede ser extrapolado a distintas cepas y líneas celulares.

Mediante la caracterización genética de las cepas de *T. cruzi* se logró determinar que la DTU de ambas cepas corresponde al linaje TcI. Esta DTU es conocida por su alta variabilidad genética lo que podría explicar las diferencias observadas *in vitro* e *in vivo*. Por esto, es importante estudiar la variabilidad genética dentro de una misma DTU ya que pequeños cambios en el ADN pueden marcar diferencias en los modelos *in vitro* e *in vivo*.

Por medio de la infección en ratones C57BL/6 con una cepa autóctona de *T. cruzi* se logró establecer un modelo crónico de la enfermedad de Chagas *in vivo*. La cepa ALF generó daños tisulares, invasión de tejidos, inflamación local, formación de nidos chagásicos y una baja parasitemia al final del ensayo, además el porcentaje de mortalidad fue nulo durante el período de observación. Por esto, la cepa ALF se podría utilizar para realizar ensayos *in vivo* en los ratones de la cepa C57BL/6 en la fase crónica de la enfermedad.

7. Recomendaciones

Para el desarrollo de modelos *in vitro* se recomienda congelar alícuotas de células y parásitos de pasajes jóvenes de tal manera que se puedan descongelar cada dos o tres semanas, actualizando las infecciones y logrando disminuir la variabilidad genética ocasionada en cada

pasaje y tripsinización. Además de cambiar el medio de cultivo de las infecciones cada dos o tres días para eliminar el exceso de parásitos extracelulares que promueva el desprendimiento del monocapa celular.

Se recomienda evaluar la actividad tripanocida de todos los compuestos restantes de la investigación desarrollada en el CENIBiot, extraídos de plantas del género *Hamelia*, si alguno de esos compuestos tiene un IS alto y logra reducir o eliminar la infección, se podría evaluar su actividad en diferentes líneas celulares y otras cepas autóctonas y de referencia. Además, también se podría evaluar en modelos murinos de la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

Para un mejor estudio de la selectividad se podrían realizar ensayos por citometría de flujo marcando tanto las células como los parásitos infectivos, de tal manera que se pueda discriminar entre el efecto de la infección y la actividad o potencia del compuesto sobre la célula, en un solo ensayo que determine la verdadera selectividad tomado en cuenta el efecto de la infección sobre la viabilidad celular.

Para la caracterización de cepas de *T. cruzi* se recomienda estudiar los distintos haploides de las DTUs que se utilicen, esto para entender mejor el comportamiento de la cepa, el cual depende de su material genético. En este trabajo el número de cepas autóctonas de *T. cruzi* fue limitado, se recomienda utilizar más cepas para realizar este tipo de investigación.

Otra de las limitantes de esta investigación fue que solo estaba disponible una cepa de ratón y que el número de ratones permitido por ensayo es restringido. Por esto, para diseñar el modelo de infección crónica *in vivo* se recomienda realizar ensayos de más tiempo, con más ratones para observar cómo avanza la infección en los primeros 6 meses. Así como, utilizar diferentes vías de infección ya que se ha reportado que estos factores influyen en el desarrollo de la infección y por ende pueden determinar cuál fase de la enfermedad producirá.

En las pruebas histopatológicas se podría estudiar otros órganos como el cerebro ya que, el tropismo tisular puede variar entre cepas y entre más órganos se estudien se genera más información importante para determinar si se establece la fase crónica. Por último, si se realiza la extracción de ADN a partir de órganos parafinados es recomendable utilizar un pretratamiento eficiente que no degrade el material genético.

8. Referencias

- Abras, A., Gállego, M., Muñoz, C., Juiz, N. A., Ramírez, J. C., Cura, C. I., Schijman, A. G. (2017). Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) in Latin-American migrants in Barcelona (Spain). *Parasitology International*, 66(2), 83–88. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2016.12.003>
- Alonso-Padilla, J., Cotillo, I., Presa, J. L., Cantizani, J., Peña, I., Bardera, A. I., ... Rodriguez, A. (2015). Automated High-Content Assay for Compounds Selectively Toxic to *Trypanosoma cruzi* in a Myoblastic Cell Line. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003493>
- Alvarado-Otegui, J. A., Ceballos, L. A., Orozco, M. M., Enriquez, G. F., Cardinal, M. V., Cura, C., Gürtler, R. E. (2012). The sylvatic transmission cycle of *Trypanosoma cruzi* in a rural area in the humid Chaco of Argentina. *Acta Tropica*, 124(1), 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.06.010>
- Álvarez, D.-A., Franyuti, G.-A., Díaz, R., González, A.-M., González, D., & Vázquez-López, R. (2016). Chagas disease: Current perspectives on a forgotten disease. *Revista Médica Del Hospital General de México*. <https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2016.09.010>
- Álvarez, J. M., Fonseca, R., Borges Da Silva, H., Marinho, C. R. F., Bortoluci, K. R., Sardinha, L. R., D'Império Lima, M. R. (2014). Chagas disease: Still many unsolved issues. *Mediators of Inflammation*. <https://doi.org/10.1155/2014/912965>
- Andrade, L. O., & Andrews, N. W. (2005). The *Trypanosoma cruzi*–host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 819–823. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1249>
- Andrade, Z. A. (1999). Immunopathology of Chagas Disease. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(SUPPL. 1), 71–80. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000700007>
- Arias, D. G., Herrera, F. E., Garay, A. S., Rodrigues, D., Forastieri, P. S., Luna, L. E., ... Guerrero, S. A. (2017). Rational design of nitrofurán derivatives: Synthesis and valuation as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 125, 1088–1097. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.10.055>
- Aufderheide, A. C., Salo, W., Madden, M., Streitz, J., Guhl, F., Arriaza, B., ... Allisonk, M. (2004). A 9, 000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), 2034–2039.
- Avila, H. A., Sigman, D. S., Cohen, L. M., Millikan, R. C., & Simpson, L. (1991). Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 48(2), 211–221. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(91\)90116-N](https://doi.org/10.1016/0166-6851(91)90116-N)

- Bermudez, J., Davies, C., Simonazzi, A., Pablo Real, J., & Palma, S. (2016). Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Tropica*, *156*, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.12.017>
- Bern, C., Kjos, S., Yabsley, M. J., & Montgomery, S. P. (2011). *Trypanosoma cruzi* and chagas' disease in the united states. *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR.00005-11>
- Bonilla, M. C., Castro-Vásquez, R. M., Herrero-Acosta, M. V., Urbina-Villalobos, A., & Dolz, G. (2019). Canine trypanosomiasis in an endemic Costa Rican community: Demonstration of the active infection cycle. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, *17*(May), 100307. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100307>
- Boos, G. S., Nobach, D., Failing, K., Eickmann, M., & Herden, C. (2019). Optimization of RNA extraction protocol for long-term archived formalin-fixed paraffin-embedded tissues of horses. *Experimental and Molecular Pathology*, *110*(March), 104289. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2019.104289>
- Bourguignon, S. C., Mello, C. B., Santos, D. O., Gonzalez, M. S., & Souto-Padron, T. (2006). Biological aspects of the *Trypanosoma cruzi* (Dm28c clone) intermediate form, between epimastigote and trypomastigote, obtained in modified liver infusion tryptose (LIT) medium. *Acta Tropica*, *98*(1), 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.02.006>
- Brandt De Oliveira, R., Troncon, L. E. A., Dantas, R. O., & Meneghelli, U. G. (1998). Gastrointestinal Manifestations of Chagas' Disease. *The American Journal of Gastroenterology*, *93*(6), 884–889.
- Britto, C. C. (2009). Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: Value and limitations. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *104*(SUPPL. 1), 122–135. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900018>
- Búa, J., Ruiz, A. M., Potenza, M., & Fichera, L. E. (2004). In vitro anti-parasitic activity of Cyclosporin A analogs on *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *14*(18), 4633–4637. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2004.07.003>
- Buckner, F. S., Verlinde, C. L. M. J., Flamme, A. C. L. a, & Voorhis, W. C. V. a N. (1996). Efficient Technique for Screening Drugs for Activity against. *Microbiology*, *40*(11), 2592–2597.
- Burgos, J. M., Diez, M., Vigliano, C., Bisio, M., Risso, M., Duffy, T., ... Schijman, A. G. (2010). Molecular Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in End-Stage Chronic Chagas Heart Disease and Reactivation after Heart Transplantation. *Clinical Infectious Diseases*, *51*(5), 485–495. <https://doi.org/10.1086/655680>
- Calvet, C. M., Meuser, M., Almeida, D., Meirelles, M. N. L., & Pereira, M. C. S. (2004a). *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction: Role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression in vitro and in vivo. *Experimental Parasitology*, *107*(1), 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.04.003>

- Calvet, C. M., Meuser, M., Almeida, D., Meirelles, M. N. L., & Pereira, M. C. S. (2004b). *Trypanosoma cruzi* – cardiomyocyte interaction: role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression *in vitro* and *in vivo*, *107*, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.04.003>
- Campos, M. C. O., Salomão, K., Castro-Pinto, D. B., Leon, L. L., Barbosa, H. S., Maciel, M. A. M., & De Castro, S. L. (2010). Croton cajucara crude extract and isolated terpenes: Activity on *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, *107*(5), 1193–1204. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1988-6>
- Canavaci, A. M. C., Bustamante, J. M., Padilla, A. M., Brandan, C. M. P., Simpson, L. J., Xu, D., ... Tarleton, R. L. (2010). *In Vitro* and *In Vivo* High-throughput assays for the testing of Anti-trypanosoma cruzi compounds. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *4*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000740>
- Carter, N. S., & Ullman, B. (2013). How *trypanosoma cruzi* feasts upon its mammalian host. *Cell Host and Microbe*, *13*(1), 5–7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.01.003>
- Carvalho, A. B., Goldenberg, R. C. D. S., & Campos de Carvalho, A. C. (2017). Cell therapies for Chagas disease. *Cytotherapy*, *19*(11), 1339–1349. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.07.014>
- Castillo-Vigil, A., Randall, L., Zeledón, R., Lomonte, B., Urbina, A., & Valverde, B. (2008). Susceptibilidad de *Trypanosoma cruzi* a diferentes venenos de serpientes de Costa Rica. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, *XLVIII*(2), 135–144. Retrieved from http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S1690-46482008000200004&script=sci_arttext
- Chatelain, E. (2015). Chagas disease drug discovery: Toward a new era. *Journal of Biomolecular Screening*. <https://doi.org/10.1177/1087057114550585>
- Chatelain, E. (2017). Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? *Computational and Structural Biotechnology Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2016.12.002>
- Chatelain, E., & Konar, N. (2015). Translational challenges of animal models in chagas disease drug development: A review. *Drug Design, Development and Therapy*, *9*, 4807–4823. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S90208>
- Conteh, L., Engels, T., & Molyneux, D. H. (2010). Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. *The Lancet*, *375*(9710), 239–247. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61422-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61422-7)
- Contreras, V. T., Araujo-Jorge, T. C., Bonaldo, M. C., Thomaz, N., Barbosa, H. S., Meirelles, M. de N. S. L., & Goldenberg, S. (1988). Biological Aspects of the Dm28c clone of *Trypanosoma Cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro*, *83*(1), 123–133.
- Coura, J. R., & Viñas, P. A. (2010). Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.003>

- Croft, L. S., & Brun, R. (2003). Drugs against parasitic diseases: R&D methodologies and issues Discoveries and drug development. *World Health Organization*, 165–175. Retrieved from <http://www.cabdirect.org/abstracts/20053130009.html>
- Cupello, M. P., Souza, C. F. de, Buchensky, C., Soares, J. B. R. C., Laranja, G. A. T., Coelho, M. G. P., ... Paes, M. C. (2011). The heme uptake process in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is inhibited by heme analogues and by inhibitors of ABC transporters. *Acta Tropica*, 120(3), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.08.011>
- da Silva, M., Silva-Jardim, I., Portapilla, G. B., de Lima, G. M. A., Costa, F. C., Anibal, F. de F., & Thiemann, O. H. (2016). In vivo and in vitro auranofin activity against *Trypanosoma cruzi*: Possible new uses for an old drug. *Experimental Parasitology*, 166, 189–193. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.05.012>
- da Silva, M. T. A., Silva-Jardim, I., Portapilla, G. B., de Lima, G. M. A., Costa, F. C., Anibal, F. de F., & Thiemann, O. H. (2016). In vivo and in vitro auranofin activity against *Trypanosoma cruzi*: Possible new uses for an old drug. *Experimental Parasitology*, 166, 189–193. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.05.012>
- de Fuentes-Vicente, J. A., Gutiérrez-Cabrera, A. E., Flores-Villegas, A. L., Lowenberger, C., Benelli, G., Salazar-Schettino, P. M., & Córdoba-Aguilar, A. (2018). What makes an effective Chagas disease vector? Factors underlying *Trypanosoma cruzi* -triatomine interactions. *Acta Tropica*, 183, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.04.008>
- De Melo Medeiros, M., Araújo-Jorge, T. C., Batista, W. S., Da Silva, T. M. O. A., & De Souza, A. P. (2010). *Trypanosoma cruzi* infection: Do distinct populations cause intestinal motility alteration? *Parasitology Research*, 107(1), 239–242. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1871-5>
- De Souza, E. M., Araújo-Jorge, T. C., Bailly, C., Lansiaux, A., Batista, M. M., Oliveira, G. M., & Soeiro, M. N. C. (2003). Host and parasite apoptosis following *Trypanosoma cruzi* infection in *in vitro* and *in vivo* models. *Cell and Tissue Research*, 314(2), 223–235. <https://doi.org/10.1007/s00441-003-0782-5>
- De Souza, E. M., Meuser-Batista, M., Batista, D. G., Duarte, B. B., Araújo-Jorge, T. C., & Soeiro, M. N. C. (2008). *Trypanosoma cruzi*: Alpha-2-macroglobulin regulates host cell apoptosis induced by the parasite infection in vitro. *Experimental Parasitology*, 118(3), 331–337. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2007.09.004>
- De Souza, W., De Carvalho, T. M. U., & Barrias, E. S. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. *International Journal of Cell Biology*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/295394>
- Díaz, M. L., Leal, S., Mantilla, J. C., Molina-Berríos, A., López-Muñoz, R., Solari, A., ... González Rugeles, C. I. (2015). Acute chagas outbreaks: Molecular and biological features of *Trypanosoma cruzi* isolates, and clinical aspects of acute cases in Santander, Colombia. *Parasites and Vectors*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1218-2>

- Dorn, P. L., McClure, A. G., Gallaspy, M. D., Waleckx, E., Woods, A. S., Monroy, M. C., & Stevens, L. (2017). The diversity of the Chagas parasite, *Trypanosoma cruzi*, infecting the main Central American vector, *Triatoma dimidiata*, from Mexico to Colombia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(9), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005878>
- Duran-Rehbein, G. A., Vargas-Zambrano, J. C., Cuéllar, A., Puerta, C. J., & Gonzalez, J. M. (2014). Mammalian cellular culture models of *trypanosoma cruzi* infection: A review of the published literature. *Parasite*. <https://doi.org/10.1051/parasite/2014040>
- Ferreira, V. F., Jorqueira, A., Souza, A. M. T., da Silva, M. N., de Souza, M. C. B. V., Gouvêa, R. M., ... Bourguignon, S. C. (2006). Trypanocidal agents with low cytotoxicity to mammalian cell line: A comparison of the theoretical and biological features of lapachone derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *14*(16), 5459–5466. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.04.046>
- Ferrer, E. (2015). Artículo de Revisión Biomedicina. Técnicas Moleculares para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. *Universidad de Oriente, Venezuela*, *27*(3), 359–371. <https://doi.org/ISSN:1315-0162>
- Field, M. C., Horn, D., Fairlamb, A. H., Ferguson, M. A. J., Gray, D. W., Read, K. D., ... Gilbert, I. H. (2017, April 27). Anti-trypanosomatid drug discovery: An ongoing challenge and a continuing need. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.193>
- Fonseca-Berzal, C., Arán, V. J., Escario, J. A., & Gómez-Barrio, A. (2018). Experimental models in Chagas disease: a review of the methodologies applied for screening compounds against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, *117*(11), 3367–3380. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-6084-3>
- Francisco, A. F., Jayawardhana, S., Lewis, M. D., Taylor, M. C., & Kelly, J. M. (2017). Biological factors that impinge on Chagas disease drug development. *Parasitology*, *144*(14), 1871–1880. <https://doi.org/10.1017/S0031182017001469>
- Freshney, R. I., Capes-Davis, A., Gregory, C., & Przyborski, S. (2010). *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications*.
- Garcia-Silva, M. R., Cura Das Neves, R. F., Cabrera-Cabrera, F., Sanguinetti, J., Medeiros, L. C., Robello, C., ... Cayota, A. (2014). Extracellular vesicles shed by *Trypanosoma cruzi* are linked to small RNA pathways, life cycle regulation, and susceptibility to infection of mammalian cells. *Parasitology Research*. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3655-1>
- Gazos-Lopes, F., Martin, J. L., Dumoulin, P. C., & Burleigh, B. A. (2017). Host triacylglycerols shape the lipidome of intracellular trypanosomes and modulate their growth. *PLoS Pathogens*, *13*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006800>
- Gomes, Y. M., Lorena, V. M. B., & Luquetti, A. O. (2009). Diagnosis of Chagas disease: What has been achieved? what remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *104*(SUPPL. 1), 115–121.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900017>

- González-Rubio, M.-L., Santi-Rocca, J., Fernandez-Cortes, F., Fresno, M., Martin, D., Chillón-Marinas, C., & Gironès, N. (2017). A multi-parametric analysis of *Trypanosoma cruzi* infection: common pathophysiologic patterns beyond extreme heterogeneity of host responses. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08086-8>
- Grisard, E. C., Teixeira, S. M. R., de Almeida, L. G. P., Stoco, P. H., Gerber, A. L., Talavera-López, C., ... de Vasconcelos, A. T. R. (2014). *Trypanosoma cruzi* clone Dm28c draft genome sequence. *Genome Announcements*, 2(1), 2–3. <https://doi.org/10.1128/genomeA.e01114-13>
- Guarner, J., Bartlett, J., Zaki, S. R., Colley, D. G., Grijalva, M. J., & Powell, M. R. (2001). Mouse model for Chagas disease: Immunohistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65(2), 152–158. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.65.152>
- Gürtler, R. E., & Cardinal, M. V. (2015). Reservoir host competence and the role of domestic and commensal hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 151(1), 32–50. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.029>
- Hölscher, C., Robello, C., Müller, U., Filardy, A. A., Guimarães-Pinto, K., Oliveira Nascimento, D., ... Dosreis, G. A. (2018). *Trypanosoma cruzi* infection induces cellular stress response and senescence-like Phenotype in Murine Fibroblasts, 9, 1. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01569>
- Izumi, E., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B. P., Veiga Júnior, V. F., & Nakamura, C. V. (2011). Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. *Natural Product Reports*, 28(4), 809. <https://doi.org/10.1039/c0np00069h>
- Jansen, A. M., Roque, A. L. R., & Xavier, S. C. C. (2017). *Trypanosoma cruzi* enzootic cycle: General aspects, domestic and synanthropic hosts and reservoirs. *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition* (Second Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00012-5>
- Jiménez, P., Jaimes, J., Poveda, C., & Ramírez, J. D. (2019). A systematic review of the *Trypanosoma cruzi* genetic heterogeneity, host immune response and genetic factors as plausible drivers of chronic chagasic cardiomyopathy. *Parasitology*, 146(3), 269–283. <https://doi.org/10.1017/S0031182018001506>
- Jorge, T., & Castro, S. (2000). Parte II – Protocolos e métodos de trabalho em doença de Chagas experimental. *Doença de Chagas: Manual Para Experimentação Animal*, 368. Retrieved from <http://books.scielo.org>
- Josefina, I., & Carmela, F. A. (2017). A review from patents inspired by two plant genera: *Uncaria* and *Hamelia*. *Phytochemistry Reviews*, 16(4), 693–723. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9498-0>

- Junqueira, A., de Paula, G., Roquete, L., dos Reis, W., Melo, P., & Talvani, A. (2017). Acta Tropica The immunomodulatory effects of the Enalapril in combination with Benznidazole during acute and chronic phases of the experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 174(May), 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.07.005>
- Kawashita, S. Y., Sanson, G. F. O., Fernandes, O., Zingales, B., & Briones, M. R. S. (2001). Maximum-likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 18(12), 2250–2259. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003771>
- Khandelwal, S., Sharma, P., Singh, T., & Vijayvergia, R. (2012). Anthelmintic and antimicrobial activity of *Hamelia patens* Jacq. (Rubiaceae). *International Journal of Natural Products Research*, 1(3), 54–56.
- Lara, L. S., Moreira, C. S., Calvet, C. M., Lechuga, G. C., Souza, R. S., Bourguignon, S. C., ... Pereira, M. C. S. (2018). Efficacy of 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl- [1,4]-naphthoquinone derivatives against different *Trypanosoma cruzi* discrete type units: Identification of a promising hit compound. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 144(2018), 572–581. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.052>
- Le Loup, G., Pialoux, G., & Lescure, F. X. (2011). Update in treatment of Chagas disease. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 24(5), 428–434. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32834a667f>
- Lescure, F. X., Le Loup, G., Freilij, H., Develoux, M., Paris, L., Brutus, L., & Pialoux, G. (2010). Chagas disease: Changes in knowledge and management. *The Lancet Infectious Diseases*, 10(8), 556–570. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70098-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70098-0)
- Li, C., & Chen, T. (2017). A novel hematoxylin and eosin stain assay for detection of the parasitic dinoflagellate *Amoebophrya*. *Harmful Algae*, 62, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.12.003>
- Libório, T. N., Etges, A., Neves, C., Mesquita, R. A., & Nunes, F. D. (2005). Evaluation of the genomic DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded oral samples archived for the past 40-years, 405–410.
- Llamas, K. A. (2003). Tropical Flowering Plants: A Guide to Identification and Cultivation. Retrieved from <http://books.google.com/books?id=WxW4Scq6kU8C&pgis=1>
- Llewellyn, M. S., Miles, M. A., Carrasco, H. J., Lewis, M. D., Yeo, M., Vargas, J., ... Gaunt, M. W. (2009). Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *PLoS Pathogens*, 5(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000410>
- Macambira, S. G., Vasconcelos, J. F., Costa, C. R. S., Klein, W., Lima, R. S., Guimaraes, P., Soares, M. B. P. (2009). Granulocyte colony-stimulating factor treatment in chronic Chagas disease: preservation and improvement of cardiac structure and function. *The FASEB Journal*, 23(11), 3843–3850. <https://doi.org/10.1096/fj.09-137869>

- Macchiaverna, N. P., Enriquez, G. F., Buscaglia, C. A., Balouz, V., Gürtler, R. E., & Cardinal, M. V. (2018). New human isolates of *Trypanosoma cruzi* confirm the predominance of hybrid lineages in domestic transmission cycle of the Argentinean Chaco. *Infection, Genetics and Evolution*, 66, 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.10.001>
- Mardahl, M., Borup, A., & Nejsum, P. (2019). *A new level of complexity in parasite-host interaction: The role of extracellular vesicles*. *Advances in Parasitology* (1st ed., Vol. 104). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2019.02.003>
- Marisol, N., Rojas, C., Cruz Torrico, M., Torrico, F., & Barrientos, E. L. S. (2015). Estandarización de la técnica para la obtención de trypomastigotes en células 3T3 a partir de una cepa local de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. *Gac Med Bol*, 38(1), 6–13.
- Martínez-Cabrera, D., Terrazas, T., & Ochoterena, H. (2009). Foliar and Petiole Anatomy of Tribe Hamelieae and Other Rubiaceae ¹. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 96(1), 133–145. <https://doi.org/10.3417/2006196>
- Martins, D., & Nunez, C. V. (2015). Secondary metabolites from Rubiaceae species. *Molecules*, 20(7), 13422–13495. <https://doi.org/10.3390/molecules200713422>
- Mateus, J., Guerrero, P., Lasso, P., Cuervo, C., González, J. M., Puerta, C. J., & Cuéllar, A. (2019). An animal model of acute and chronic chagas disease with the reticulotropic Y strain of *Trypanosoma cruzi* that depicts the multifunctionality and dysfunctionality of T cells. *Frontiers in Immunology*, 10(APR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00918>
- Mbwambo, Z. H., Kapingu, M. C., Moshi, M. J., Machumi, F., Apers, S., Cos, P., Pieters, L. (2006). Antiparasitic activity of some xanthenes and biflavonoids from the root bark of *Garcinia livingstonei*. *Journal of Natural Products*, 69(3), 369–372. <https://doi.org/10.1021/np050406v>
- Meira, C. S., Guimarães, E. T., Dos Santos, J. A. F., Moreira, D. R. M., Nogueira, R. C., Tomassini, T. C. B., Soares, M. B. P. (2015). In vitro and in vivo antiparasitic activity of *Physalis angulata* L. concentrated ethanolic extract against *Trypanosoma cruzi*. *Phytomedicine*, 22(11), 969–974. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.07.004>
- Mello, D. B., Ramos, I. P., Mesquita, F. C. P., Brasil, G. V., Rocha, N. N., Takiya, C. M., Carvalho, A. B. (2015). Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells Protect Mice Infected with *Trypanosoma cruzi* from Cardiac Damage through Modulation of Antiparasite Immunity. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003945>
- Meza, S. K. L., Kaneshima, E. N., Silva, S. de O., Gabriel, M., Araújo, S. M. de, Gomes, M. L., Toledo, M. J. de O. (2014). Comparative pathogenicity in Swiss mice of *Trypanosoma cruzi* IV from northern Brazil and *Trypanosoma cruzi* II from southern Brazil. *Experimental Parasitology*, 146, 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.08.014>
- Miranda, C. G., Solana, M. E., Curto, M. de los A., Lammel, E. M., Schijman, A. G., & Alba Soto, C. D. (2015a). A flow cytometer-based method to simultaneously assess activity and

- selectivity of compounds against the intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 152(August), 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.08.004>
- Miranda, C. G., Solana, M. E., Curto, M. de los A., Lammel, E. M., Schijman, A. G., & Alba Soto, C. D. (2015b). A flow cytometer-based method to simultaneously assess activity and selectivity of compounds against the intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 152, 8–16. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.08.004>
- Morales, C. B., Giardini, M. A., Kim, H., Caio, F. H., Araujo-Junior, A. M., Schenkman, S., Freitas-Junior, L. H. (2014). Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep04703>
- Munshi, S., Twining, R. C., & Dahl, R. (2014). Alamar blue reagent interacts with cell-culture media giving different fluorescence over time: Potential for false positives. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 70(2), 195–198. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2014.06.005>
- Murcia, L., Carrilero, B., Saura, D., Iborra, M. A., & Segovia, M. (2013). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(SUPPL.1), 26–34. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(13\)70111-3](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(13)70111-3)
- Nunes, M. C. P., Dones, W., Morillo, C. A., Encina, J. J., & Ribeiro, A. L. (2013). Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. *Journal of the American College of Cardiology*. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>
- Ocana-Mayorga, S., Llewellyn, M. S., Costales, J. A., Miles, M. A., & Grijalva, M. J. (2010). Sex, subdivision, and domestic dispersal of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Southern Ecuador. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(12), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000915>
- Oliveira, M. T. De, Taciana, K., Silva, S., Neves, L. X., Jean, M., Toledo, D. O., Lana, M. De. (2018). Differential expression of proteins in genetically distinct *Trypanosoma cruzi* samples (TcI and TcII DTUs) isolated from chronic Chagas disease cardiac patients. *Parasites and Vectors*, 11(611), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3181-1> (2018)
- Pérez-Molina, J. A., & Molina, I. (2017). Chagas disease. *The Lancet*, 6736(17), 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)
- Pilarski, R., Filip, B., Wietrzyk, J., Kuraś, M., & Gulewicz, K. (2010). Anticancer activity of the *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. preparations with different oxindole alkaloid composition. *Phytomedicine*, 17(14), 1133–1139. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2010.04.013>
- Pinto, C. M., Ocaña-Mayorga, S., Tapia, E. E., Lobos, S. E., Zurita, A. P., Aguirre-Villacís, F., Perkins, S. L. (2015). Bats, trypanosomes, and triatomines in Ecuador: New insights into the diversity, transmission, and origins of *trypanosoma cruzi* and chagas disease. *PLoS ONE*, 10(10), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139999>

- Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet. Infectious Diseases*, 1(2), 92–100. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00065-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00065-2)
- Raimundo, S. M., Massad, E., & Yang, H. M. (2010). Modelling congenital transmission of Chagas' disease. *BioSystems*, 99(3), 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2009.11.005>
- Ramírez-Tolosa, G., Sosoniuk-Roche, E., Valck, C., Aguilar-Guzmán, L., Ferreira, V. P., & Ferreira, A. (2020). *Trypanosoma cruzi* Calreticulin: Immune Evasion, Infectivity, and Tumorigenesis. *Trends in Parasitology*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.01.007>
- Rampersad, S. N. (2012). Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Switzerland)*, 12(9), 12347–12360. <https://doi.org/10.3390/s120912347>
- Rassi, A., Rassi, A., & Marcondes de Rezende, J. (2012, June). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>
- Rassi, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Resende, B. C., Oliveira, A. C. S., Guañabens, A. C. P., Repolês, B. M., Santana, V., Hiraiwa, P. M., ... Machado, C. R. (2020). The Influence of Recombinational Processes to Induce Dormancy in *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10(5). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00005>
- Ribeiro, A. L., Nunes, M. P., Teixeira, M. M., & Rocha, M. O. C. (2012, October 31). Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nature Reviews Cardiology*. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2012.109>
- Ritz Christian, Jensen Signe Marie, Gerhard Daniel, S. J. C. (2015). *Dose-Response Analysis Using R*. (X. Yinglin, Ed.). Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>
- Rong Paz, J. E., Rubio Contreras, C., Reyes Munguá, A., Aguilar, C. N., & Carrillo Inungaray, Ma. L. (2018). Phenolic content and antibacterial activity of extracts of *Hamelia patens* obtained by different extraction methods. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49, 656–661. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6066736/pdf/main.pdf>
- Sales Junior, P. A., Molina, I., Maria, S., Murta, F., An Anchez-Montal, A., Salvador, F., ... Carneiro, M. (2017). Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 97(5), 1289–1303. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0761>
- Sánchez-Valdéz, F. J., Padilla, A., Wang, W., Orr, D., & Tarleton, R. L. (2018). Spontaneous dormancy protects *trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. *ELife*, 7. <https://doi.org/10.7554/eLife.34039>

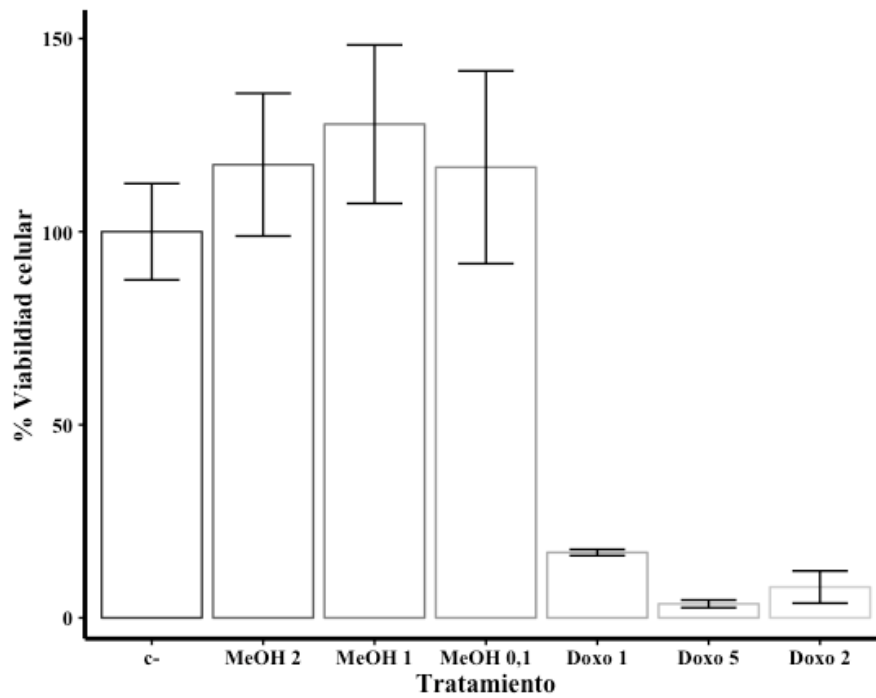
- Scarim, C. B., Jornada, D. H., Chelucci, R. C., de Almeida, L., dos Santos, J. L., & Chung, M. C. (2018). Current advances in drug discovery for Chagas disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *155*, 824–838. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.06.040>
- Scarim, C., Ribeiro, A., Rosa, J., & Chin, C. (2018). Response to different benznidazole doses in animal models of chronic phase chagas disease: A critical review. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *51*(2), 133–140. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0337-2017>
- Schmitz, V., Almeida, L. N., Svensjö, E., Monteiro, A. C., Köhl, J., & Scharfstein, J. (2014). C5a and Bradykinin Receptor Cross-Talk Regulates Innate and Adaptive Immunity in *Trypanosoma cruzi* Infection. *The Journal of Immunology*, *193*(7), 3613–3623. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302417>
- Schmunis, G. A., & Yadon, Z. E. (2010). Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica*, *115*(1–2), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.003>
- Shah-Simpson, S., Lentini, G., Dumoulin, P. C., & Burleigh, B. A. (2017). Modulation of host central carbon metabolism and in situ glucose uptake by intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *PLoS Pathogens*, *13*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006747>
- Silva-dos-Santos, D., Barreto-de-Albuquerque, J., Guerra, B., Moreira, O. C., Berbert, L. R., Ramos, M. T., Meis, J. de. (2017a). Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(4), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005507>
- Silva-dos-Santos, D., Barreto-de-Albuquerque, J., Guerra, B., Moreira, O. C., Berbert, L. R., Ramos, M. T., ... Meis, J. De. (2017b). Unraveling Chagas disease transmission through the oral route: Gateways to *Trypanosoma cruzi* infection and target tissues. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(4), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005507>
- Silva, J. C. V. de O., de Assis, G. F. M., de Oliveira, M. T., Valadares, H. M. S., do Valle, Í. F., de Paiva, N. C. N., ... de Lana, M. (2013). Molecular and biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from children from Jequitinhonha Valley, State of Minas Gerais, Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *46*(4), 433–440. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0077-2013>
- Soares, M. B. P., Lima, R. S., Rocha, L. L., Takyia, C. M., Pontes-De-Carvalho, L., Campos De Carvalho, A. C., & Ribeiro-Dos-Santos, R. (2004). Transplanted Bone Marrow Cells Repair Heart Tissue and Reduce Myocarditis in Chronic Chagasic Mice. *American Journal of Pathology*, *164*(2), 441–447. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63134-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63134-3)
- Spotorno O, A. E., Córdova, L., & Solari I, A. (2008). Differentiation of *Trypanosoma cruzi* I subgroups through characterization of cytochrome b gene sequences. *Infection, Genetics and Evolution*, *8*(6), 898–900. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.08.006>
- Sykes, M. L., & Avery, V. M. (2015). Development and application of a sensitive, phenotypic,

- high-throughput image-based assay to identify compound activity against *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 5(3), 215–228. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.10.001>
- Telleria, J., & Tibayrenc, M. (2017). *American Trypanosomiasis Chagas Disease : One Hundred Years of Research*. Retrieved from [https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=XEHQDAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=American+Trypanosomiasis,+Doença+de+Chagas:+One+hundred+years+of+research&ots=Zan6989Mo7&sig=9JIM0hXQNqlNcQ5UcyMB2iOr8Uc#v=onepage&q=American Trypanosomiasis%2C Doença de Chagas](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=XEHQDAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=American+Trypanosomiasis,+Doença+de+Chagas:+One+hundred+years+of+research&ots=Zan6989Mo7&sig=9JIM0hXQNqlNcQ5UcyMB2iOr8Uc#v=onepage&q=American+Trypanosomiasis%2C+Doença+de+Chagas)
- Therapies, A. (2009). Pharmacology and therapeutic uses of cat ' s claw. *Am J Health Syst Pharm*. 2, 66, 992–995. <https://doi.org/10.2146/ajhp080443>
- Urbina, J. A. (2009). Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(SUPPL. 1), 311–318. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900041>
- Urbina, J. A. (2017). Pharmacodynamics and Follow-Up Period in the Treatment of Human *Trypanosoma Cruzi* Infections with Posaconazole. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(2), 299–300. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.03.611>
- Valdez, R. H., Tonin, L. T. D., Ueda-Nakamura, T., Filho, B. P. D., Morgado-Diaz, J. A., Sarragiotto, M. H., & Nakamura, C. V. (2009). Biological activity of 1,2,3,4-tetrahydro-β-carboline-3-carboxamides against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 110(1), 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.11.008>
- Valle-Reyes, J. S., Melnikov, V., Dobrovinskaya, O., Rodriguez-Hernández, A., Wookee-Zea, C., Pimientel-Rodríguez, V., Espinoza-Gómez, F. (2017). Antiprotozoal drug nitazoxanide enhances parasitemia, tissue lesions and mortality caused by *Trypanosoma cruzi* in murine model. *Experimental Parasitology*, 172(2017), 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.12.013>
- Vallejo, A., Monge-Maillo, B., Gutiérrez, C., Norman, F. F., López-Vélez, R., & Pérez-Molina, J. A. (2016). Changes in the immune response after treatment with benznidazole versus no treatment in patients with chronic indeterminate Chagas disease. *Acta Tropica*, 164, 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.010>
- Velazco-Gamboa Carolina, Puentes-Corredor Fabiola, Moreno-García Alberto, P.-M. M. & P.-B. C. (1997). Adaptación de la cepa mutante de *Trypanosoma cruzi* al cultivo *in vitro* en células VERO. *Revista de La Facultad de Ciencias de La Universidad de Scientiarum*, 4(1), 83–94.
- Ventura-Garcia, L., Roura, M., Pell, C., Posada, E., Gascón, J., Aldasoro, E., Pool, R. (2013). Socio-Cultural Aspects of Chagas Disease: A Systematic Review of Qualitative Research. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002410>
- Vera, A. (2005). *DESARROLLO DE LA INFECCION CON Trypanosoma cruzi EN TRES CEPAS PURAS DE RATONES*. Universidad de Chile.

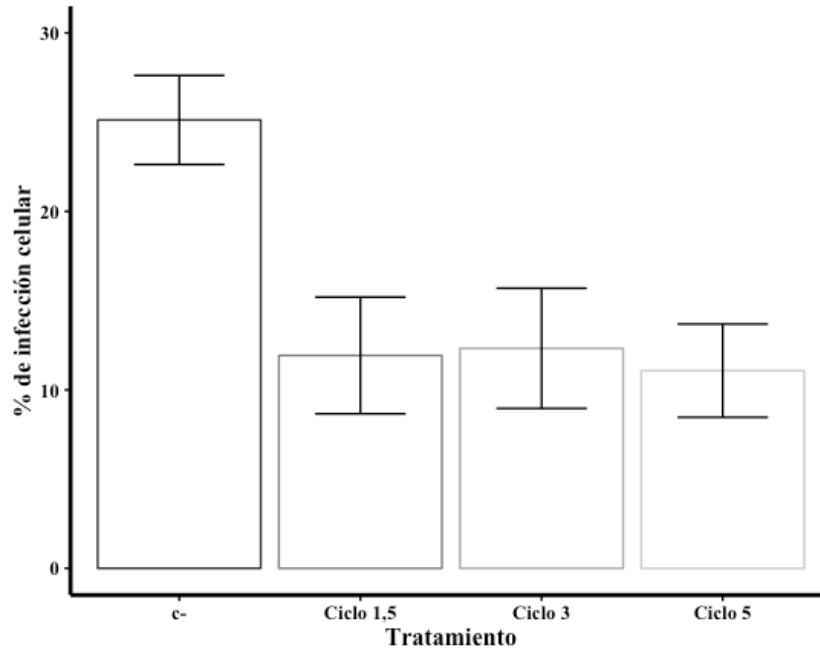
- Villalta, F., Dobish, M. C., Nde, P. N., Kleshchenko, Y. Y., Hargrove, T. Y., Johnson, C. A., Lepesheva, G. I. (2013). VNI cures acute and chronic experimental chagas disease. *Journal of Infectious Diseases*, 208(3), 504–511. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit042>
- WHO. (2010). First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. *World Health Organization*, 1–184. <https://doi.org/10.1177/1757913912449575>
- Zhang, D., Luo, G., Ding, X., & Lu, C. (2012). Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(6), 549–561. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2012.10.004>
- Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M. G., Sturm, N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>
- Zuriaga, M. Á., Blandón-Naranjo, M., Valerio-Campos, I., Salas, R., Zeledón, R., & Bargues, M. D. (2012). Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* and infection rate of the vector *Triatoma dimidiata* in Costa Rica. *Parasitology Research*, 111(4), 1615–1620. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3000-0>

9. Anexos

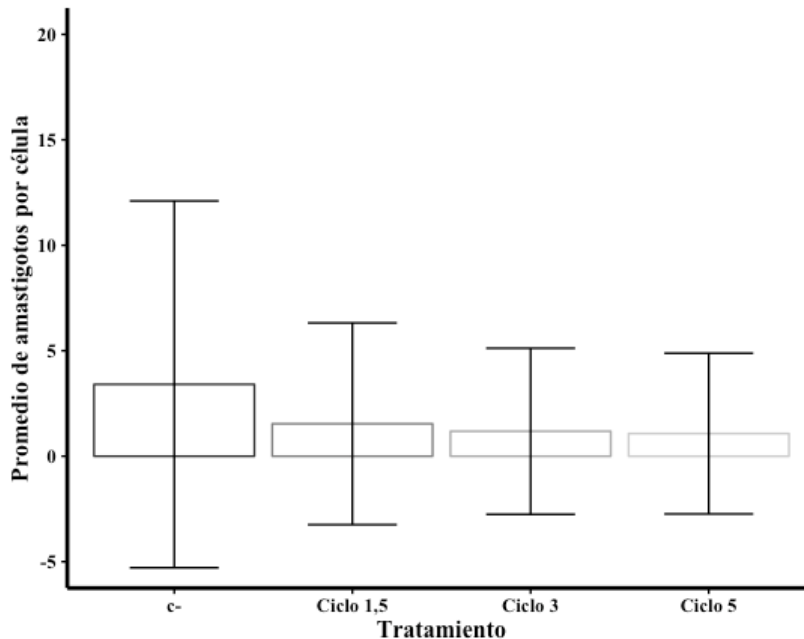
Anexo 1. Controles utilizados durante la evaluación de la actividad citotóxica. El control negativo corresponde solo a medio DMEM 2% FBS, tres concentraciones en $\mu\text{g/mL}$ distintas de MeOH, correspondiente al disolvente del compuesto, y tres concentraciones de Doxorubicina en μM como control positivo.



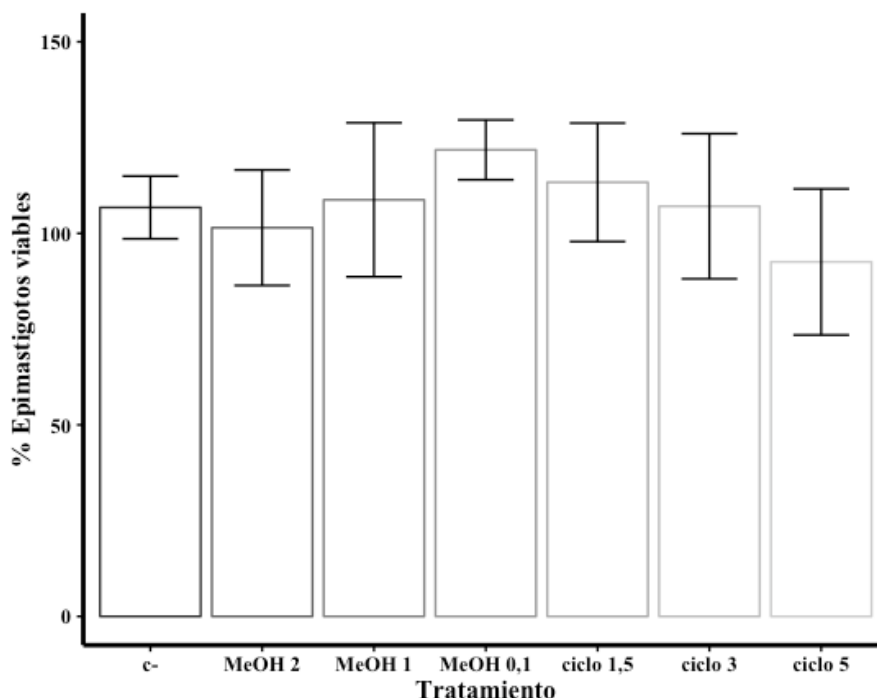
Anexo 2. Controles utilizados durante la evaluación del a actividad contra amastigotos, específicamente del porcentaje de infección celular. El control negativo corresponde solo a medio DMEM 2% de FBS y tres concentraciones de ciclosporina en $\mu\text{g}/\text{mL}$ como control positivo.



Anexo 3. Controles utilizados durante la evaluación del a actividad contra amastigotos, específicamente del número de amastigotos/célula. El control negativo corresponde solo a medio DMEM 2% de FBS y tres concentraciones de ciclosporina en $\mu\text{g}/\text{mL}$ como control positivo.



Anexo 4. Controles utilizados durante la evaluación de la actividad citotóxica contra epimastigotos. El control negativo corresponde solo a medio LIT, tres concentraciones en $\mu\text{g/mL}$ distintas de MeOH, correspondiente al disolvente del compuesto, y tres concentraciones de ciclosporina en $\mu\text{g/mL}$ como control positivo.



Anexo 5. Perfil térmico para la amplificación de un segmento del gen 18SrRNA del *T. cruzi* mediante una PCR anidada y un protocolo “touch-down”.

Ciclos	Tiempo	Temperatura I Ronda	Temperatura II Ronda
Desnaturalización inicial	2 min	95°C	95°C
2 ciclos*	30 seg	65°C	60°C
2 ciclos*	30 seg	64°C	58°C
2 ciclos*	30 seg	63°C	56°C
2 ciclos*	30 seg	62°C	54°C
2 ciclos*	30 seg	61°C	52°C
2 ciclos*	30 seg	60°C	50°C
Extensión final	5 min	72°C	72°C

*Cada ciclo tiene una etapa de desnaturalización de 15 segundos a 95°C y una extensión de 1 minuto a 72°C.

Anexo 6. Acciones del GenBank de las secuencias utilizadas para realizar las alineaciones y el árbol de posicionamiento genético.

DTU	Accesión NCBI
TcI	EU867807
	AF245382
	FJ001631
	FJ549375
TcII	AF301912
	AF301621
	FJ001625
	FJ001616
TcIII	FJ549380
	AF303660
	EU755230
	FJ549385
TcIV	FJ183396
	EU755228
	EU755217
	EU755224
TcV	AF228685
	AF232214
	FJ001630
	FJ549373
TcVI	AF245383
	KT305919
TcBat	KT829450
	JQ965547
	FJ001634
	JQ965542
Grupo externo	Accesión NCBI
<i>T. erneyi</i>	JN040989
<i>T. dionisii</i>	FJ001662

Anexo 7. Perfil térmico para la detección de *T. cruzi* mediante PCR utilizando los cebadores S35 y S36.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	5 min	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	30 seg	35 ciclos
Alineamiento	63°C	30 seg	
Extensión	72°C	30 seg	
Extensión final	72°C	10 min	1 ciclo

Anexo 8. Secuencia obtenida de la cepa ALF

TCCACACACACACGCACACTCCTTTTTTGGATGTTGTGTCTTCTGTGTGTGTGGCACT
 CGTCGCCTTTGTGGGAAATCCGTGTGGCACTTGTTTGGTGTGTTGGCAGACTTCGGT
 CTTGCCTTCACACATGTTTCACATGTGTCATGCCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGG
 AATGAAGGAGGGTAGTTCGGGGGAGAACGTACTGGTGCATCAGAGGTGAAATTCTT
 AGACCGCACCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTCAAGGATACCTTCCTCAAT
 CAAGAACCAAAGTGTGGGGATCGAAGATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGC
 AAACGATGACACCCATGAATTGGGGAGTTTTTGGTCGTAGGCGTGGTCGGGCTTGAT
 TATATTATTTTTCATCCCGTTCCTCGTCTCGCCAATGAATATATTAATTTACGTGCA
 TATTCTTTTTGGTCTTCGTTTT

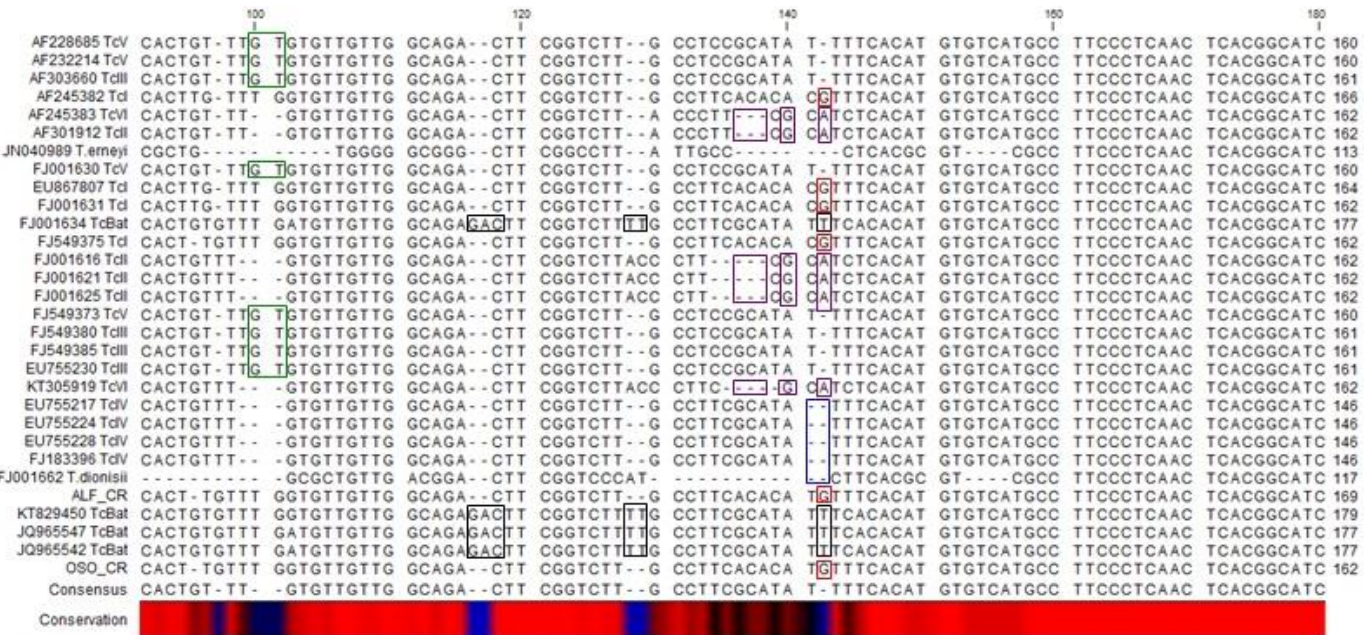
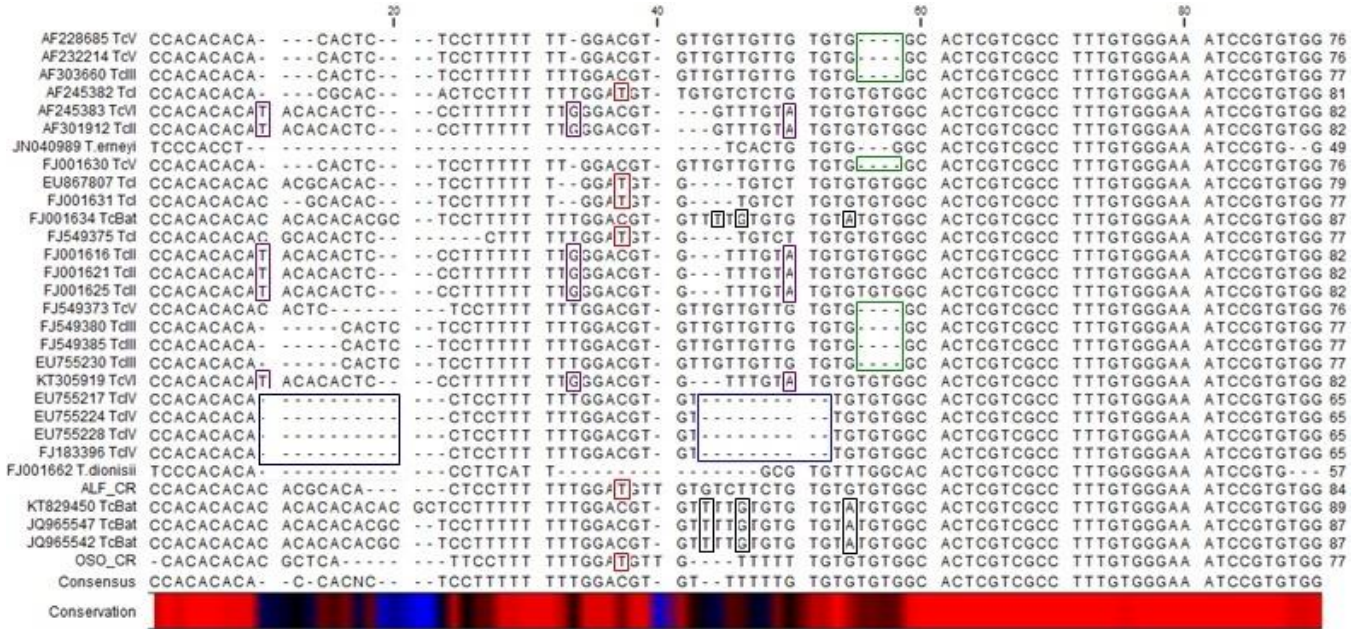
Anexo 9. Secuencia obtenida de la cepa Oso

CACACACACGCTCATTCTTTTTTGGATGTTGTTTTTTGTGTGTGGCACTCGTCGCCTT
 TGTGGGAAATCCGTGTGGCACTTGTTTGGTGTGTTGGCAGACTTCGGTCTTGCCTTC
 ACACATGTTTCACATGTGTCATGCCTTCCCTCAACTCACGGCATCCAGGAATGAAGG
 AGGGTAGTTCGGGGGAGAACGTACTGGTGCATCAGAGGTGAAATTCTTAGACCGCA
 CCAAGACGAACTACAGCGAAGGCATTCTTCAAGGATACCTTCCTCAATCAAGAACC
 AAAGTGTGGGGATCGAAGATGATTAGAGACCATTGTAGTCCACACTGCAAACGATG
 ACACCCATGAATTGGGGAGTTTTTGGTCGTAGGCGTGGTCGGGCTTGATTATATTAT
 TTTTCATCCCGTTCCTCGTCTCGCCAATGAATATATTAATTTACGTGCATATTCTTTT
 TGGTCTTCGTTTT

Anexo 10. Análisis BLAST con las secuencias obtenidas de las cepas ALF y Oso comparadas con las secuencias control elegidas del GenBank de DTU TcI.

Cepa	Accesión GenBank	Identidad de nucleótidos	Puntaje Máximo	Puntaje total	Cobertura	E valor
ALF	EU867807	98.31%	824	824	100%	0.0
ALF	AF245382	99.58%	863	863	100%	0.0
ALF	FJ001631	98.73%	837	837	100%	0.0
ALF	FJ549375	98.73%	837	837	100%	0.0
Oso	EU867807	98.31%	826	826	100%	0.0
Oso	AF245382	98.53%	835	835	99%	0.0
Oso	FJ001631	98.73%	837	837	99%	0.0
Oso	FJ549375	98.73%	837	837	99%	0.0

Anexo 11. Alineamiento múltiple de secuencias provenientes de una región del gen 18S rADN de *T. cruzi* de diferentes DTUs. Realizado con el programa Mega X. Los colores indican los polimorfismos que definen cada DTU. TcI: rojo, TcII y TcVI: morado, TcIII y TcV: verde, TcIV: azul, TcBat: negro.



	380	400	420	440						
AF228685 TcV	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGC	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	425
AF232214 TcV	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGC	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	425
AF303660 TcIII	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGC	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	426
AF245382 TcI	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGT	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTATAT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	433
AF245383 TcVI	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGT	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	427
AF301912 TcII	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGT	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	427
JN040989 T.erneyi	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGC	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	364
FJ001630 TcV	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGC	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	425
EU867807 TcI	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGT	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	429
FJ001631 TcI	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGT	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTATATTATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	429
FJ001634 TcBat	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGT	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	442
FJ549375 TcI	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGT	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTATAT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	429
FJ001616 TcII	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGT	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	427
FJ001621 TcII	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGT	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	427
FJ001625 TcII	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGT	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	427
FJ549373 TcV	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGC	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	425
FJ549380 TcIII	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGC	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	426
FJ549385 TcIII	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGC	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	426
EU755230 TcIII	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGC	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	426
EU755217 TcVI	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGT	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	427
EU755217 TcIV	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGT	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	411
EU755224 TcIV	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGT	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	411
EU755228 TcIV	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGT	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	411
FJ183396 TcV	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGT	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	411
FJ001662 T.dionisii	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGT	TTAGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	371
ALF_CR	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGT	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTATAT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	436
KT829450 TcBat	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGT	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	444
JQ965547 TcBat	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGT	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	442
JQ965542 TcBat	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGT	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	442
OSO_CR	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGT	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTATAT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	429
Consensus	ACACCCATGA	ATTGGGGAGT	TTTTGGTCGT	--AGGCGTGG	TGGGCTTGA	TTAT--TATT	TTTCATCCCG	TTCC-TCGTC	TGGCCAATGA	

Conservation



	480	480			
AF228685 TcV	ATAT--TAAA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT 465
AF232214 TcV	ATAT--TAAA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT 465
AF303660 TcIII	ATAT--TAAA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT 466
AF245382 TcI	ATATAT	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT 475
AF245383 TcVI	ATAT-TAAA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT 468
AF301912 TcII	ATAT-TAAA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT 468
JN040989 T.erneyi	ATATC--AA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGCCCTCGTT	CT 403
FJ001630 TcV	ATAT--TAAA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT 465
EU867807 TcI	ATATAT	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT 471
FJ001631 TcI	ATATAT	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT 471
FJ001634 TcBat	ATAT--TAAA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT 482
FJ549375 TcI	ATATAT	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT 471
FJ001616 TcII	ATAT-TAAA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT 468
FJ001621 TcII	ATAT-TAAA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT 468
FJ001625 TcII	ATAT-TAAA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT 468
FJ549373 TcV	ATAT--TAAA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT 465
FJ549380 TcIII	ATAT--TAAA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT 466
FJ549385 TcIII	ATAT--TAAA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT 466
EU755230 TcIII	ATAT--TAAA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTC	TT 466
KT305919 TcVI	ATAT-TAAA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTC-----	-- 460
EU755217 TcIV	ATAT--TAAA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT 451
EU755224 TcIV	ATAT--TAAA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCT--CGTT	TT 450
EU755228 TcIV	ATAT--TAAA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT 451
FJ183396 TcV	ATAT--TAAA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCT--CGTT	TT 450
FJ001662 T.dionisii	ATGAAT--AA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT 411
ALF_CR	ATATAT	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT 478
KT829450 TcBat	ATAT--TAAA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT 484
JQ965547 TcBat	ATAT--TAAA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT 482
JQ965542 TcBat	ATAT--TAAA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	T- 481
OSO_CR	ATATAT	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT 471
Consensus	ATAT--TAAA	TTTACGTGCA	TATTCITTTT	GGTCTTCGTT	TT

Conservation

