



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN JUAN**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TESIS DOCTORAL

**Caracterización química y estudio del efecto  
antiparasitario de especies de la flora nativa para tratar  
la Enfermedad de Chagas**

**AUTOR**

**Lic. Mauricio Piñeiro**

Directora  
Dra. Gabriela Feresin

Co-director  
Dr. Alejandro Tapia

**SAN JUAN  
2023**

El presente trabajo de tesis doctoral fue llevado a cabo en



Instituto de Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de San Juan



Instituto de Histología y Embriología de Mendoza, Universidad Nacional de Cuyo



Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación, Universidad de Barcelona



Instituto de Salud Global de Barcelona, Hospital Clínic de Barcelona

## AGRADECIMIENTOS

*A la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de la Universidad Nacional de San Juan por permitirme continuar con mi formación académica y de investigación.*

*Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la beca doctoral.*

*Al Programa Investigación y Desarrollo de Productos Naturales Bioactivos, al Instituto de Biotecnología y a la Facultad de Ingeniería por abrirme las puertas y brindarme un espacio, equipos e instalaciones para llevar a cabo esta ardua tarea de la tesis doctoral.*

*A la Dra. Gabriela Feresin por recibirme en su equipo de investigación, por su apoyo, predisposición y enseñanzas.*

*Al Dr. Alejandro Tapia por instruirme en el mundo de la química orgánica, por sus consejos y aportes.*

*A mis asesoras de tesis, Dra. Susana Zachino y Dra. Marianela Sanchez por guiarme durante todo el proceso.*

*Al jurado, Dra. Lorena Luna, Dra. Margarita Gutierrez y Dra. Marianela Sanchez por su dedicación, correcciones y recomendaciones que ayudaron a mejorar el manuscrito.*

*Al personal del Instituto de Histología y Embriología de Mendoza, especialmente al Dr. Miguel Sosa, Dra. Patricia Barrera y Dra. Renata Spina por su predisposición y enseñanzas.*

*Al Dr. Javier Ortiz, Dr. Jaime Bastida, Dr. Julio Alonso y Lic. Nieves Martinez por su contribución.*

*A los integrantes del Instituto de Biotecnología por compartir el día a día.*

*A Sofia y Victoria por los mates, comidas, charlas, risas...*

*A Paula Wetten por hacerme lugar en su casa durante mis estadias en Mendoza.*

*A mis amigos de la vida que siempre estan.*

*A Marilyn Molinero por todo el apoyo durante estos años*

*A mi Madre, que me formó durante toda mi vida para ser lo que hoy día soy, que me apoyó y me apoya incondicionalmente y sobretodo me enseñó que hay que ser buena persona está por encima de cualquier título. Gracias ma.*

*A mi familia que siempre está para sostenerme y ayudarme a crecer.*

*Por ultimo, a las dos personas que me bancaron todos los días de este doctorado, Denice y Faustino. Todo agradecimiento queda chico para ustedes. Gracias por el amor, la compañía y la comprensión. Vamos por más.*

## ***A Faustino***



***“No estalla como las bombas ni suena como los tiros. Como el hambre, mata callando. Como el hambre, mata a los callados: los que viven condenados al silencio y mueren condenados al olvido. Tragedia que no suena, enfermos que no pagan, enfermedad que no vende. El mal de Chagas no es negocio que atraiga a la industria farmacéutica, ni es tema que interese a los políticos ni a los periodistas. Elige a sus víctimas en el poverío. Las muere y lentamente, poquito a poco, va acabando con ellas. Sus víctimas no tienen derechos, ni dinero para comprar los derechos que no tienen. Ni siquiera tienen el derecho de saber de qué mueren”.***

**Eduardo Galeano**

## ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	10
RESUMEN .....	11
ABSTRACT .....	13
1. Capítulo I: Introducción.....	15
1.1. Enfermedad de Chagas, historia y generalidades.....	16
1.2. Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas.....	20
1.3. Transmisión de la enfermedad de Chagas. Aspectos clínicos.....	22
1.4. Tratamiento de la enfermedad de Chagas .....	24
1.5. Los insectos vectores.....	26
1.6. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	28
1.6.1. Morfología y estructura de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	29
1.6.2. Ciclo de vida .....	32
1.6.3. Nuevo ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	34
1.6.4. Diversidad de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	35
1.7. Búsqueda de moléculas líderes contra <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	36
1.7.1. Productos Naturales.....	37
1.7.2. Productos naturales con actividad contra <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	38
1.8. Justificación del problema.....	41
1.9. Objetivos .....	41
1.9.1. Objetivo general.....	41
1.9.2. Objetivos específicos.....	41
2. Capítulo II: Materiales y Métodos .....	43
2.1. Material vegetal .....	44
2.1.1 <i>Echinopsis terscheckii</i> ( <i>Trichocereus terscheckii</i> ; Hunt 2006) .....	44
2.1.2. <i>Hippeastrum aglaiae</i> , <i>H. aulicum</i> , <i>H. escoipense</i> , <i>H. glaucescens</i> , <i>H. petiolatum</i> , <i>H. puniceum</i> , <i>H. reticulatum</i> e <i>H. híbrido</i> .....	44
2.1.3. <i>Maytenus viscifolia</i> .....	44
2.1.4. <i>Seriphidium mendozanum</i> ( <i>Artemisia mendozana</i> ).....	45
2.1.5. <i>Usnea lethariiformis</i> .....	45
2.2. Obtención de extractos y fracciones .....	45
2.2.1. <i>Hippeastrum aglaiae</i> , <i>H. aulicum</i> , <i>H. escoipense</i> , <i>H. glaucescens</i> , <i>H. híbrido</i> , <i>H. petiolatum</i> , <i>H. puniceum</i> , <i>H. reticulatum</i> y <i>E. terscheckii</i> .....	45
2.2.1.1. Fracciones del EEA de <i>H. híbrido</i> .....	46
2.2.1.2. Obtención de candimina .....	46

2.2.2. <i>Maytenus viscifolia</i> .....	46
2.2.2.1. Obtención de pristimerina .....	47
2.2.3. <i>Seriphidium mendozanum</i> .....	47
2.2.4. <i>Usnea lethariiformis</i> .....	47
2.2.5. Resumen de extractos y fracciones .....	48
2.3. Fraccionamiento de extractos y aislamiento de compuestos.....	49
2.3.1. Cromatografía en capa fina (CCF).....	49
2.3.2. Cromatografía en capa fina preparativa (CCFP) .....	49
2.3.3. Cromatografía en columna (CC) .....	49
2.4. Instrumental.....	50
2.4.1. Cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS).....	50
2.4.2. Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a masas (UHPLC-MS/MS) ...	50
2.5. Actividad antiparasitaria .....	51
2.5.1. Cultivos de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	51
2.5.1.1. Epimastigotes.....	51
2.5.1.2. Tripomastigotes y amastigotes.....	52
2.5.2. Cultivos celulares .....	52
2.5.3. Actividad sobre la proliferación de epimastigotes .....	52
2.5.4. Evaluación de la viabilidad de epimastigotes .....	52
2.5.5. Actividad sobre tripomastigotes y amastigotes.....	53
2.5.6. Actividad específica sobre amastigotes.....	53
2.5.7. Estudios ultraestructurales.....	53
2.5.8. Actividad mitocondrial de epimastigotes .....	54
2.6. Citotoxicidad en células Vero y HepG2.....	54
2.7. Interacción entre compuestos para determinar sinergismo .....	54
2.7.1. Tratamiento de <i>T. cruzi</i> para la evaluación de la interacción de compuestos .....	55
2.7.2. Análisis de las interacciones .....	55
2.8. Análisis estadístico .....	56
3. Capítulo III: Resultados.....	57
Parte I: Actividad anti- <i>T. cruzi</i> .....	58
a. Extractos y compuestos sobre epimastigotes .....	58
3.1.1. Introducción .....	59
3.1.2. Efecto de Bzn y DMSO sobre la proliferación y viabilidad de epimastigotes, cepa Dm28c (DTU I).....	60
3.1.3. <i>Echinopsis terscheckii</i> .....	61

3.1.3.1. Efecto del extracto de alcaloides sobre proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	61
3.1.4. Especies del género <i>Hippeastrum</i>	62
3.1.4.1. Efecto de extractos enriquecidos en alcaloides del género <i>Hippeastrum</i> , sobre proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	62
3.1.4.2. Efecto de extractos enriquecidos en alcaloides obtenidos del género <i>Hippeastrum</i> , sobre viabilidad de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	64
3.1.4.3. <i>Hippeastrum aglaiae</i> e <i>H. híbrido</i>	65
3.1.4.3.1. Evaluación de fracciones del EEA de <i>H. híbrido</i>	66
3.1.4.4. Efecto de montanina sobre proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	68
3.1.5. <i>Maytenus viscifolia</i>	68
3.1.5.1. Efecto del extracto de <i>M. viscifolia</i> y pristimerina sobre proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	68
3.1.5.2. Efecto del extracto de <i>M. viscifolia</i> y pristimerina sobre viabilidad de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	70
3.1.6. <i>Seriphidium mendozanum</i>	71
3.1.6.1. Efecto de extractos de hojas y tallos de <i>Seriphidium mendozanum</i> sobre proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	71
3.1.6.2. Efecto de extractos de hojas y tallos de <i>Seriphidium mendozanum</i> sobre viabilidad de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	71
3.1.6.3. Evaluación de fracciones de los extractos de <i>S. mendozanum</i> frente a epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	72
3.1.7. <i>Usnea lethariiformis</i>	74
3.1.7.1 Efecto de extractos de <i>U. lethariiformis</i> sobre proliferación de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	74
3.1.7.2. Evaluación de fracciones de <i>U. lethariiformis</i> y ácido úsnico	74
3.1.8. Conclusiones	76
b. <i>Hippeastrum escoipense</i> y su alcaloide candimina	78
3.2.1. Introducción	79
3.2.2. Actividad del EEA- <i>H. escoipense</i>	80
3.2.3. Actividad de candimina aislada de <i>H. escoipense</i>	82
3.2.4. Evaluación de alteraciones morfológicas producidas por candimina sobre epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	85
3.2.5. Efecto de candimina sobre la actividad mitocondrial de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	85
3.2.6. Conclusiones	87
c. Interacción entre PNs y Bzn. Determinación de sinergismo	88
3.3.1. Introducción	89
3.3.2. Ensayo combinatorio I: EEA- <i>H. híbrido</i> , Montanina, y Bzn	89

3.3.3. Ensayo combinatorio II: Candimina y Bzn.....	94
3.3.4. Conclusiones .....	97
Parte II: Estudio químico .....	98
3.4. Introducción .....	99
a. <i>Hippeastrum</i> spp. ....	100
3.4.1.1. Caracterización química mediante GC-MS de extractos enriquecidos en alcaloides del género <i>Hippeastrum</i> .....	101
3.4.1.2. Caracterización química mediante UHPLC-MS de extractos enriquecidos en alcaloides del género <i>Hippeastrum</i> .....	103
3.4.1.3. Cuantificación de montanina.....	107
3.4.1.4. Conclusiones .....	108
b. <i>Usnea lethariiformis</i> .....	109
3.4.2.1. Caracterización química mediante UHPLC-MS de extractos y fracciones de <i>U. lethariiformis</i> .....	110
3.4.2.2. Dépsidos.....	110
3.4.2.3. Dibenzofuranos .....	111
3.4.2.3. Conclusiones .....	116
4. Capítulo IV: Discusión.....	118
Conclusiones .....	128
5. Referencias bibliográficas .....	131
6. Anexo .....	139
I. Publicaciones en revistas indexadas.....	140
II. Publicaciones en congresos.....	140

**ABREVIATURAS**

<b>Bzn</b>	Benznidazol
<b>CC</b>	Cromatografía en columna
<b>CC<sub>50</sub></b>	Concentración citotóxica media
<b>CCF</b>	Cromatografía en capa fina
<b>CCFP</b>	Cromatografía en capa fina preparativa
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria media
<b>DCM</b>	Diclorometano
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DTU</b>	Unidades discretas de tipificación
<b>EC</b>	Enfermedad de Chagas
<b>EDCMUI</b>	Extracto de diclorometano de <i>Usnea lethariiformis</i>
<b>EDCMUIi</b>	Extracto de diclorometano de <i>Usnea lethariiformis</i> insoluble en MeOH
<b>EDCMUIs</b>	Extracto de diclorometano de <i>Usnea lethariiformis</i> soluble en MeOH
<b>EEA</b>	Extracto enriquecido en alcaloides
<b>EHSm</b>	Extracto de hojas de <i>Seriphidium mendozanum</i>
<b>EMeOHUI</b>	Extracto metanólico de <i>Usnea lethariiformis</i>
<b>EMv</b>	Extracto de <i>Maytenus viscifolia</i>
<b>EP</b>	Éter de petróleo
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>ETSm</b>	Extracto de tallos de <i>Seriphidium mendozanum</i>
<b>Fa</b>	Fracción afectada
<b>GC</b>	Cromatografía gaseosa
<b>IC</b>	Índice combinatorio
<b>IS</b>	Índice de selectividad
<b>IRD</b>	Índice de reducción de dosis
<b>MA</b>	Marcha de alcaloides
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MS</b>	Espectrometría de masas
<b>Nfx</b>	Nifurtimox
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ONU</b>	Organización de las Naciones Unidas
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino
<b>PNs</b>	Productos naturales
<b>SFB</b>	Suero fetal bovino
<b>UHPLC</b>	Cromatografía líquida de ultra alta presión
<b>VP</b>	Vacuola parasitófora

## RESUMEN

La enfermedad de Chagas (EC), es endémica en 21 de 35 países de Latinoamérica y se extiende al resto del mundo. Es producida por el parásito *Trypanosoma cruzi* y representa una amenaza para la salud de 10-20 millones de personas. Para el tratamiento, benznidazol (Bzn) es la droga de elección disponible, pero produce numerosos efectos adversos y es poco eficaz en la fase crónica de la enfermedad. Existe una gran necesidad de encontrar nuevos compuestos contra *T. cruzi* que sustituyan las terapias actuales o reduzcan las dosis empleadas. Plantas y líquenes producen una variedad de metabolitos que son una fuente interesante de nuevas moléculas o compuestos, que podrían, reemplazar las terapias actuales para enfermedades infecciosas o crónicas. En este contexto, se evaluó la actividad anti-*T. cruzi* de productos naturales (extractos, fracciones y compuestos) obtenidos de *Echinopsis terscheckii*, *Hippeastrum* spp., *Maytenus viscifolia*, *Seriphidium mendozanum* y *Usnea lethariiformis*. En una primera etapa, se estudió el efecto sobre la proliferación y viabilidad de epimastigotes cepa Dm28c y se destacó el efecto tripanocida de *S. mendozanum* y el efecto tripanostático de *Hippeastrum* spp., *M. viscifolia* y *U. lethariiformis*. Además, los compuestos aislados tales como ácido úsnico, pristimerina, montanina y candimina presentaron una potente inhibición de la proliferación de epimastigotes, especialmente el alcaloide candimina evidenció intensa vacuolización, desorganización de estructuras del tipo-reservosomas y un significativo aumento en la actividad mitocondrial. En tripomastigotes y amastigotes (cepa Tulahuen- $\beta$ -galactosidasa) y en células de mamíferos (Vero y HepG2), el extracto de *H. escoipense* y candimina, mostraron especificidad sobre *T. cruzi*, donde candimina mostró mayor actividad anti-*T. cruzi* y menor citotoxicidad que Bzn. Los ensayos de combinación de los alcaloides montanina, candimina y el extracto de *H. híbrido* con Bzn, propuestos para determinar diferentes interacciones (antagónica, sinérgica o aditiva), mostraron efecto sinérgico en la combinación de montanina y Bzn, con una reducción de la dosis de Bzn alrededor de 20 veces. Por otra parte, la combinación de

candimina y Bzn mostró al menos una interacción sinérgica en cada estadio de *T. cruzi*, con efectos más marcados en amastigotes. Además, en todas las combinaciones evaluadas hubo una reducción de la dosis de Bzn. Estos resultados cobran mayor relevancia porque la combinación de candimina y Bzn resultó antagónica para las células Vero y HepG2, indicando una disminución de la citotoxicidad de ambos compuestos cuando actúan en conjunto, posicionando a candimina como un compuesto promisorio para el tratamiento de la EC.

Finalmente, en el análisis químico mediante UHPLC-MS y GC-MS de los bulbos de *Hippeastrum* spp., se identificaron 12 alcaloides, licorina y montanina fueron los de mayor prevalencia. También se identificaron los alcaloides activos contra *T. cruzi* hippeastrina, licorina, montanina y pancracina. Por otra parte, en el líquen *U. lethariiformis* se identificaron 5 compuestos fenólicos, de los cuales ácido úsnico fue el más abundante.

El conocimiento generado en este trabajo, constituye un aporte valioso y novedoso y sienta las bases para la continuidad de la temática, vinculadas a la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos frente a *Trypanosoma cruzi* y profundizar sobre el estudio de los mecanismos de acción involucrados. Adicionalmente las metodologías y procesos aplicados para determinar la efectividad de la combinación de compuestos constituyen una herramienta útil, que además puede extrapolarse a otros productos naturales con potencialidad para disminuir las dosis y efectos adversos de Bzn.



**ABSTRACT**

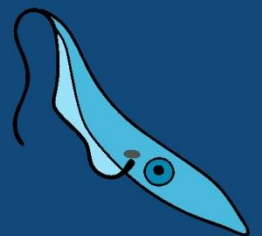
Chagas disease (CD) is endemic in 21 of 35 Latin American countries and extends to the rest of the world. It is produced by the parasite *Trypanosoma cruzi* and represents a threat to the health of 10-20 million people. For treatment, Benznidazole (Bzn) is the drug of choice available, but it produces numerous adverse effects and is not very effective in the chronic phase of the disease. There is a great need to find new compounds against *T. cruzi* that replace current therapies or reduce the doses used. Plants and lichens produce a variety of metabolites that are an interesting source of new molecules that could replace current therapies for infectious or chronic diseases. In this context, the anti-*T. cruzi* activity from natural products (extracts, fractions and compounds) obtained from *Echinopsis terscheckii*, *Hippeastrum* spp., *Maytenus viscifolia*, *Seriphidium mendozanum* and *Usnea lethariiformis* was evaluated. In a first stage, the effect on the proliferation and viability of epimastigotes (Dm28c strain) was studied, highlighting the trypanocidal effect of *S. mendozanum* and the trypanostatic effect of *Hippeastrum* spp., *M. viscifolia* and *U. lethariiformis*. In addition, isolated compounds such as candimine, montanine, pristimerin, and usnic acid showed a potent inhibition of epimastigotes proliferation, especially the alkaloid candimine showed intense vacuolation, disorganization of like-reservosomes structures and a significant increase in mitochondrial activity. In trypomastigotes and amastigotes (Tulahuen- $\beta$ -galactosidase strain) and in mammalian cells (Vero and HepG2), the *H. escoipense* extract and candimine showed specificity against *T. cruzi*. Candimine showed greater anti-*T. cruzi* and lower cytotoxicity than Bzn. Combination assays of the alkaloids montanine, candimine and the *H. hybrid* extract with Bzn, proposed to determine different interactions (antagonistic, synergistic or additivism), showed a synergistic effect in the combination of montanine with Bzn, with a reduction in the dose of Bzn about 20 times. On the other hand, the combination of candimine and Bzn showed at least one synergistic interaction in each stage of *T. cruzi*, with more marked effects in amastigotes. In addition, in all the combinations evaluated there was a reduction in the dose of Bzn.

These results are more relevant because the combination of candimine and Bzn was antagonistic for Vero and HepG2 cells, indicating a decrease in the cytotoxicity of both compounds when they act together, positioning candimine as a promising compound for the treatment of CD. Finally, in the chemical analysis by UHPLC-MS and GC-MS of the bulbs of *Hippeastrum* spp., 12 alkaloids were identified, lycorine and montanine were the most prevalent. The alkaloids active against *T. cruzi* hippeastrine, lycorine, montanine and pancracin were also identified. On the other hand, in the lichen *U. lethariiformis*, 5 phenolic compounds were identified, of which usnic acid was the most abundant.

The knowledge generated in this work constitutes a valuable and innovative contribution and lays the foundations for the continuity of the theme, linked to the search for new bioactive compounds against *Trypanosoma cruzi* and to deepen the study of the mechanisms of action involved. Additionally, the methodologies and processes applied to determine the effectiveness of the combination of compounds constitute a useful tool, which can also be extrapolated to other natural products with the potential to reduce the doses and adverse effects of Bzn.



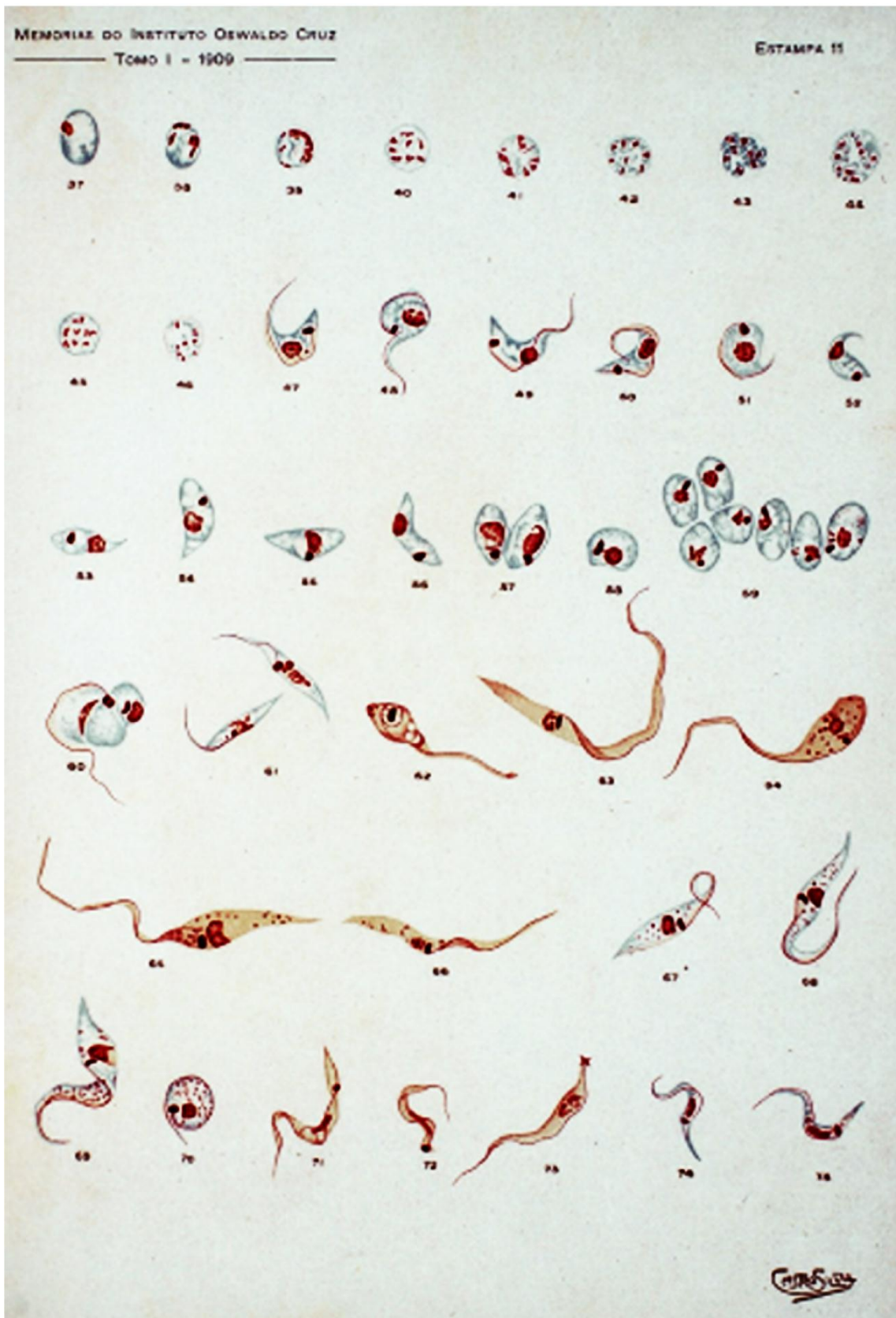
# Capítulo I Introducción



### 1.1. Enfermedad de Chagas, historia y generalidades

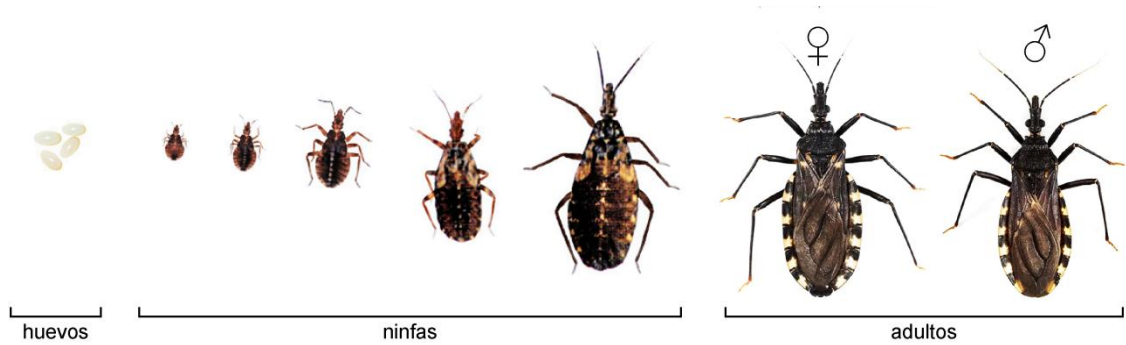
La enfermedad de Chagas (EC) es una afección parasitaria hística y hemática producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (figura 1), que afecta diversos mamíferos, entre ellos el hombre (Storino y Milei, 1994). El mecanismo más frecuente de transmisión de esta infección es a través de insectos vectores pertenecientes a diversas especies de la Familia Reduviidae, Subfamilia Triatominae, siendo el más importante en nuestro país *Triatoma infestans* (OMS, 2022) (figura 2).

En el siglo XVIII y XIX, los exploradores y naturalistas describieron diversas especies de los insectos vectores y sus comportamientos relacionados a la enfermedad. Entre estos relatos, puede mencionarse el de Charles Darwin quien, en su paso por Argentina, escribió: “No pude descansar por haberme visto atacado por un numeroso y sanguinario grupo de las grandes chinches negras de las Pampas, pertenecientes al género “Benchuca”, una especie de *Reduvius* (...) Antes de efectuar la succión son muy delgados, pero después se redondean y llenan de sangre, y en este estado se los aplasta con facilidad (...) La herida no causaba dolor” (Sanmartino, 2009; Darwin, 1845). Sin embargo, recién en el año 1909 el Dr. Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas realizó la asociación entre la enfermedad, el vector y el parásito. Mientras trabajaba en Minas Gerais, en una campaña para combatir la malaria, surgió su interés por los insectos hematófagos hallados en las viviendas precarias. En el intestino del insecto vector fue encontrado el protozoo, hoy conocido como *T. cruzi*, que debe su nombre al epidemiólogo Oswaldo Cruz, mentor del Dr. Chagas. El 14 de febrero de 1909, Chagas consultó a un paciente que sería el primer caso de la EC descrito en la literatura: una niña de 2 años, Berenice (figura 3), quien presentó fiebre alta, hepatoesplenomegalia, edema facial y presencia del parásito en sangre (Chagas, 1909).



**Figura 1.** Etapas de desarrollo de *T. cruzi* dibujadas por Carlos Chagas al momento de la descripción de la enfermedad y su agente etiológico. Tomado de Chagas (1909).





**Figura 2.** *Triatoma infestans*, ciclo de vida.



**Figura 3.** (A) Berenice: la primera paciente diagnosticada con la EC. (B) Periódico brasileño que informa sobre la historia de la EC y Berenice, diciendo: “Aquí se descubrió la EC” (izq), y: “Y este es el primer caso” (der). Fuente: Archivos del Instituto Oswaldo Cruz.

A raíz de esto, se intensificó la investigación sobre la EC en Latinoamérica, primeros reportes de la enfermedad surgen en 1913 en El Salvador (Segovia, 1913); en 1919 en Perú (Ayulo y Herrero, 1944) y en Venezuela (Tejera, 1919); en 1922 en Costa Rica (de Araujo *et al.*, 2010); en 1924 en Paraguay (de Araujo *et al.*, 2010); en 1933 en Guatemala (León-Gómez *et al.*, 1960); en 1937 en Chile (Gasic y Bertin, 1940); en 1938 en México (Mazzotti, 1940); en 1942 en Bolivia (Mazza, 1942); en 1947 en Colombia (Serpa Flórez, 2000); en 1949 en Nicaragua (de Araujo *et al.*, 2010) y en Argentina (Mazza, 1949); y 1960 en Honduras (León-Gómez *et al.*, 1960). Posteriormente, se ha encontrado ADN de *T. cruzi* en momias de Chile/Perú (Aufderheide *et al.*, 2004) y Brasil, que datan de 7050 años a.C. y 2500-5000 años a.C., respectivamente, lo que demuestra que la enfermedad existe en América Latina desde hace más de 9000 años (Araújo *et al.*, 2009; Guhl *et al.*, 1997) (figura 4).

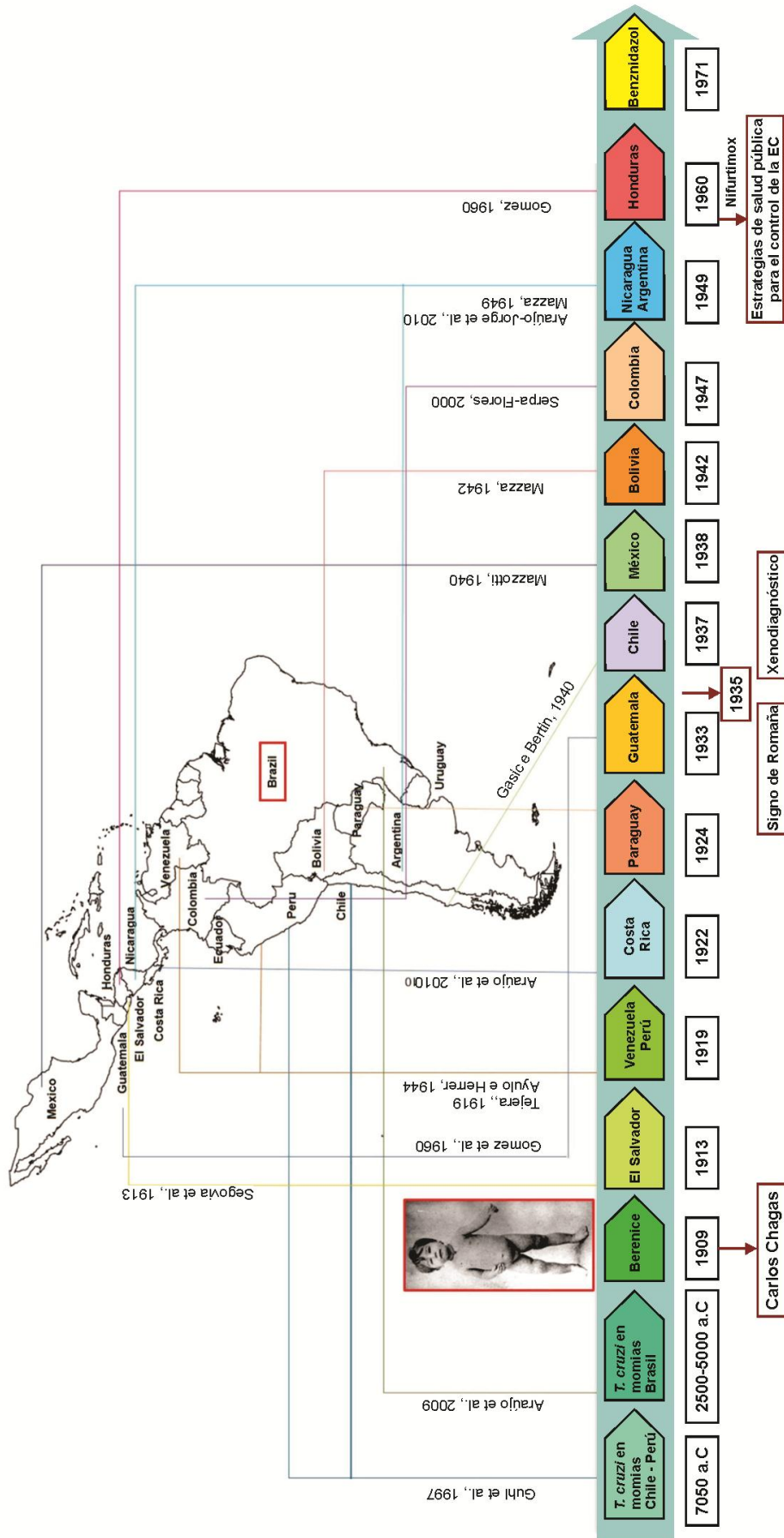


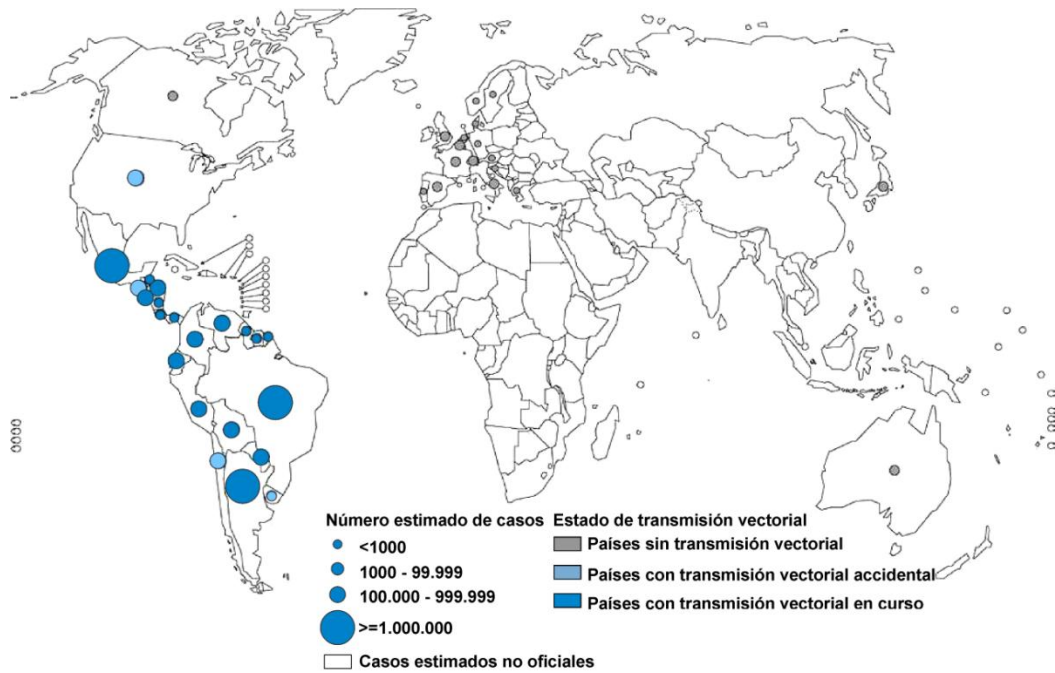
Figura 4. Cronología de la EC. Adaptado de Lidani et al. (2019).

El médico argentino Salvador Mazza centró el interés en profundizar el conocimiento acerca de esta enfermedad, tanto en la salud pública, como en la comunidad científica. Con esto redefinió la ruta de transmisión, los signos y síntomas de la fase aguda. Sin embargo, la importancia epidemiológica y el mayor interés en esta problemática, solamente llegó a consolidarse después de haberse caracterizado el cuadro clínico y el impacto médico-social de la fase crónica, ya que permitió reconocer esta enfermedad como una patología cardíaca crónica de gran extensión, así como también visualizar, que las condiciones de pobreza en las viviendas rurales tenían gran contribución a la expansión de la enfermedad. Esta tarea fue realizada por los doctores Romaña, Jörg, Dias y Laranja en las décadas de 1930 y 1940 (Sanmartino, 2009). Luego, durante la segunda mitad del siglo pasado, por las migraciones humanas, la enfermedad se trasladó a zonas urbanas. De esta forma el estado lo asumió como un verdadero problema de salud pública, lo que produjo la aparición de diferentes instituciones destinadas a su estudio, identificación, evaluación y control de la transmisión (Álvarez – Hernández *et al.*, 2016; Amieva 2014; Sanmartino 2009).

## **1.2. Aspectos epidemiológicos de la enfermedad de Chagas**

La EC es endémica en 21 de 35 países de Latinoamérica, aunque las corrientes migratorias desde esta región produjeron su diseminación hacia otros estados (de Noya y Jackson, 2020). De hecho, Estados Unidos la ha clasificado como la principal infección dentro de las 5 enfermedades consideradas desatendidas en dicho país (Malik *et al.*, 2015). Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que existen entre 6 y 7 millones de personas infectadas, además entre 65 y 100 millones están en riesgo de adquirir la enfermedad. En la figura 5 se presenta el mapa con la distribución mundial de la EC del año 2010 (OMS). Por otra parte, a esta enfermedad se le atribuyen unas 12000 muertes por año (OMS, 2022; Álvarez-Hernández *et al.*, 2016).



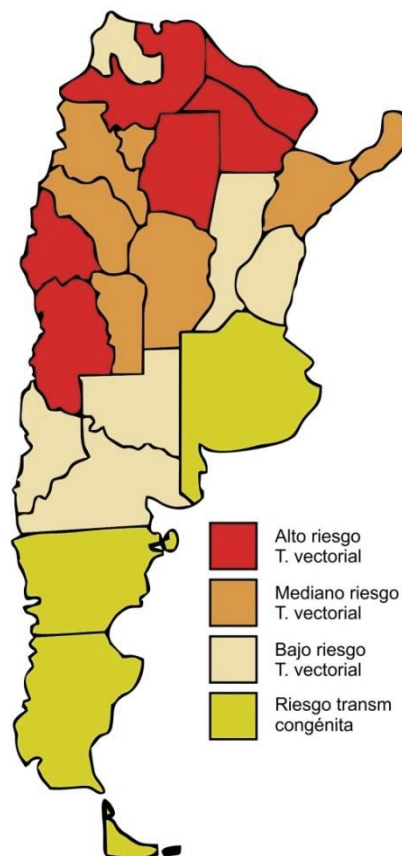


**Figura 5.** Distribución mundial de la EC. Tomado de OMS (2010).

Argentina, Brasil y México son los países que presentan mayor número de casos, mientras que los países con mayor prevalencia son Bolivia y Argentina, donde entre siete y cuatro de cada 100 personas padecen la EC, respectivamente (Amieva, 2014). La OMS (2022) ha indicado que esta enfermedad constituye uno de los principales problemas de salud pública en Latinoamérica. Si bien la prevalencia de la EC en América Latina se ha reducido en las últimas décadas, se ha observado un aumento dramático en el número de casos en países no endémicos, lo que convierte a la enfermedad en un problema de salud pública mundial. Las migraciones humanas han sido señaladas como el factor crítico para la aparición de la EC en áreas donde no se había descrito previamente (Connors *et al.*, 2016; Pinazo y Gascon, 2015). En 2017, las personas nacidas en América Latina y el Caribe representaron el segundo grupo más grande de migrantes internacionales, solo detrás de Asia, con 32 millones de personas viviendo fuera de su región de nacimiento (ONU, 2017). De estos, la mayoría vivía en América del Norte (26 millones) y Europa (5 millones) (ONU, 2017). Estados Unidos es el principal receptor de inmigrantes latinoamericanos; sin embargo, desde 2001, cuando los regímenes de visas a los EE.UU. fueron más restringidos, Europa también comenzó

a recibir inmigrantes en cantidades sustanciales. En este contexto, la EC ya se ha detectado en países no endémicos de América del Norte (Canadá y EE.UU.), Europa (principalmente España) y la Región del Pacífico Occidental (Australia, Nueva Zelanda y Japón) (Jackson *et al.*, 2014; Gascon *et al.*, 2010) (figura 5).

Con respecto a los datos epidemiológicos de Argentina, en 2017 se estimó que habrían 1.505.000 de personas infectadas, de las cuales 376.000 presentan cardiopatías de origen chagásico, y 7.300.000 personas estarían en riesgo de adquirir la enfermedad (Programa Nacional de Chagas, 2017). La provincia de San Juan, junto a Salta, Chaco, Formosa, Santiago del Estero y Mendoza, presentan un alto riesgo de contraer la enfermedad por transmisión vectorial (figura 6).



**Figura 6.** Mapa de la República Argentina. Riesgo de transmisión de la EC. Tomado de Programa Nacional de Chagas (2017).

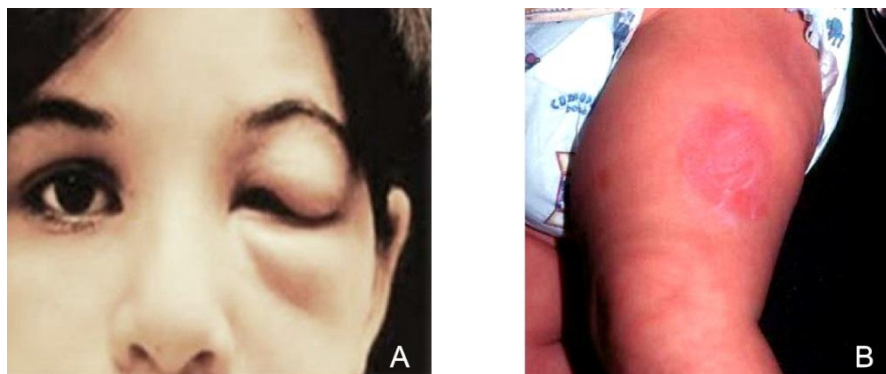
### 1.3. Transmisión de la enfermedad de Chagas. Aspectos clínicos

La forma principal de transmisión de la EC es a través de los insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae. Sin embargo, existen otros modos de transmisión como:

- Transmisión congénita, se estima que en Argentina nacen 1400 niños infectados por año.
- Transfusión sanguínea y donación de órganos
- Vía oral
- Accidentes laborales

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad progresan y se presentan en varias etapas, conduciendo a un cuadro clínico muy amplio y complejo.

- **Fase aguda:** dura entre 4-14 días y suele presentarse entre los 2 y 4 meses, desde el ingreso del parásito. Esta fase se caracteriza por ser asintomática en el 95 % de los casos. No obstante, un signo característico que se pueden presentar, si el sitio de inoculación es cercano al ojo, es el signo de Romaña. Éste se presenta como lesión indolora, bipalpebral, unilateral y periocular, que dificulta la apertura del ojo (figura 7A). Otro signo que suele presentarse, es el conocido como chagoma de inoculación, que se observa como un nódulo subcutáneo doloroso en el lugar de la picadura (figura 7B). Algunas manifestaciones sistémicas de esta fase incluyen: fiebre, astenia, mialgia, hepatoesplenomegalia, entre otras. En el caso de pacientes inmunodeprimidos, puede presentarse meningoencefalitis que puede llevar a la muerte. Por otro lado, entre el 20 y 30 % de bebés infectados nacen prematuramente o presentan fallas cardíacas, calcificaciones cerebrales, etc.



**Figura 7.** Signos de la EC en fase aguda. A: Signo de Romaña. B: Chagoma de inoculación. Tomado de OMS (2022)

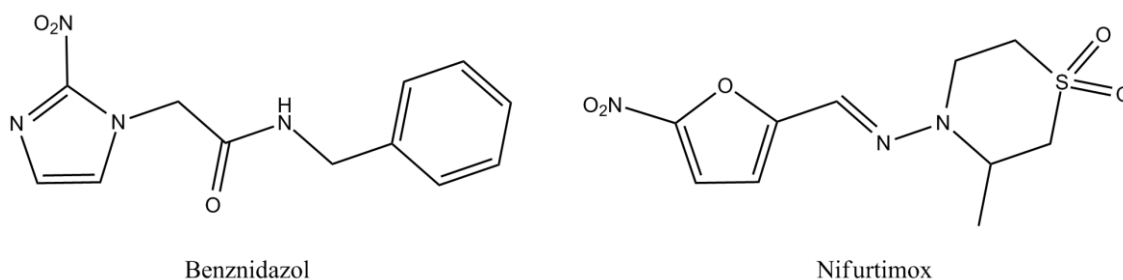
- **Fase asintomática o crónica indeterminada:** en esta etapa no se presentan síntomas, la serología y/o la parasitemia es positiva. Esta fase se mantiene durante

años en el 70 % de los pacientes (dependiendo del sistema inmunológico y la tasa de replicación de amastigotes). El 30 % restante progresa generalmente a la etapa crónica en un período de 10-30 años.

- **Fase sintomática o crónica determinada:** en esta etapa se presentan manifestaciones clínicas que se caracterizan por la presencia de complicaciones cardíacas y digestivas como megaesófago, megacolon, megayeyuno, o megaestómago, con valores de parasitemia bajos o fluctuantes. Además, se ha informado una reducción en el número de neuronas (por muerte celular) de los sistemas simpático y parasimpático, que compromete la innervación de los músculos cardíacos y del estómago, esófago, bronquios, uretra y vejiga. Además, decrece la conducción del sistema nervioso periférico. Las complicaciones cardíacas representan la principal causa de muerte, que conducen principalmente a muerte súbita y fallo cardíaco progresivo (Alvarez-Hernández *et al.*, 2016).

#### 1.4. Tratamiento de la enfermedad de Chagas

Durante los últimos 50 años, los fármacos nitroheterocíclicos benznidazol (Bzn) y nifurtimox (Nfx) (figura 8) han sido los únicos fármacos disponibles para tratar la EC (Ros-Lucas *et al.*, 2022). Ambos demostraron eficacia administrados en infecciones tempranas y son bien tolerados por los lactantes (Prata, 2001). Sin embargo, su eficacia disminuye en la etapa crónica (Alonso-Padilla *et al.*, 2019). Para el uso de estos fármacos, debe tenerse en cuenta que producen numerosos efectos adversos (alteraciones en la piel, parestesias, neuropatías periféricas, trombocitopenia y agranulocitosis, toxicidad hepática, entre otros) que conducen a la suspensión del tratamiento, al mismo tiempo que aparecen cepas resistentes (Vela *et al.*, 2021; Toledo *et al.*, 2004). A pesar de los datos epidemiológicos disponibles, la industria farmacéutica no se interesó en el desarrollo de fármacos nuevos y más efectivos. Probablemente porque esta enfermedad no representa un valor económico para el sector farmacéutico, y por esta razón es considerada por la OMS como una enfermedad "olvidada" o "desatendida", entre otras 13 (Zabala, 2012; Albajar Viñas, 2007).



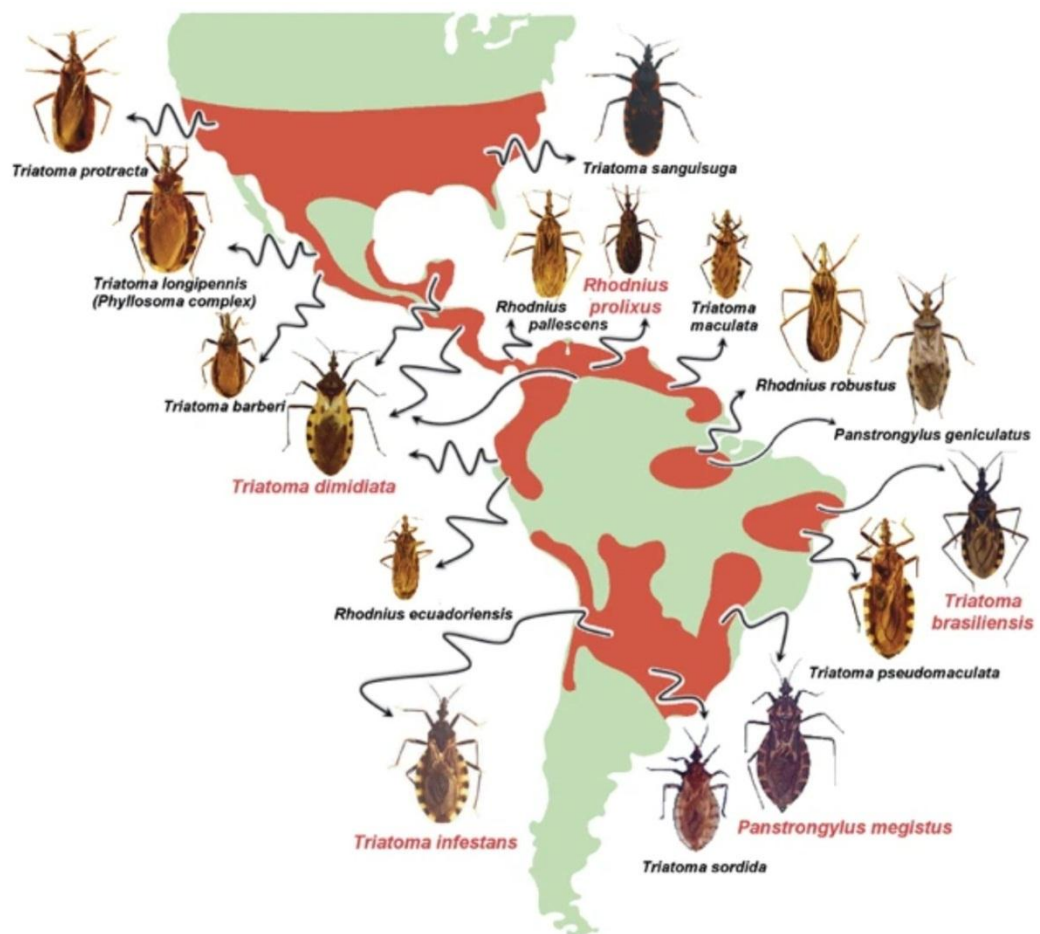
**Figura 8.** Estructuras químicas de Bzn y Nfx.

El Bzn es un compuesto derivado del 2-nitroimidazol. Su mecanismo de acción aún no fue completamente descrito, se considera un profármaco, en el que su efecto tripanocida depende de la activación enzimática por las nitrorreductasas tripanosomales tipo I, un grupo de enzimas expresadas en parásitos protozoarios, sin homólogo en mamíferos (Müller Kratz, 2018; Hall *et al.*, 2012; Wilkinson *et al.*, 2009). Estudios de metabolización del Bzn, indican que luego de varias reacciones, se reduce a una hidroxilamina, que se convierte a través de varias transformaciones no enzimáticas en dialdehído glioxal (Hall *et al.*, 2012; Wilkinson *et al.*, 2009). Este metabolito es altamente reactivo, se une a proteínas, lípidos, ADN/ARN y moléculas pequeñas como el glutatión, bloqueando la síntesis de nuevas cadenas de ADN e inhibiendo el sistema antioxidante de *T. cruzi*, así el parásito se torna altamente susceptible al daño oxidativo (Müller Kratz, 2018), sumado al incremento de la fagocitosis y liberación de interferón  $\gamma$  y de los procesos inflamatorios. Los efectos adversos provocan que entre un 12 y 42 % de los pacientes suspende el tratamiento (Sales junior *et al.*, 2017).

El Nfx es un compuesto derivado del furano, reduce los grupos nitro y forma radicales inestables como el nitroanión, el cual es altamente reactivo y da lugar a metabolitos tóxicos como peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) y anión superóxido ( $O_2^-$ ). Los efectos adversos más importantes son las alteraciones gastrointestinales (70 %), anorexia y pérdida de peso (50-70 %), dolores abdominales (12-40 %), náuseas y vómitos (15-26 %), también pueden presentarse alteraciones neurológicas (Álvarez-Hernández *et al.*, 2016).

### 1.5. Los insectos vectores

Ciento cuarenta especies de triatominos son potencialmente capaces de transmitir *T. cruzi* y se encuentran ampliamente distribuidas en América (Schofield y Galvao, 2009) (figura 9). Las especies de vectores más importantes son: *Triatoma infestans* en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay, Uruguay y Perú; *Rhodnius prolixus* en Colombia, Venezuela y Centroamérica; *T. dimidiata* en Ecuador y América Central; y *Rhodnius pallescens* en Panamá. En la parte sur de EE. UU., el insecto vector común es *Triatoma gerstaeckeri*, seguido de *T. lecticularia* y *T. sanguisuga* (Garcia et al., 2016).

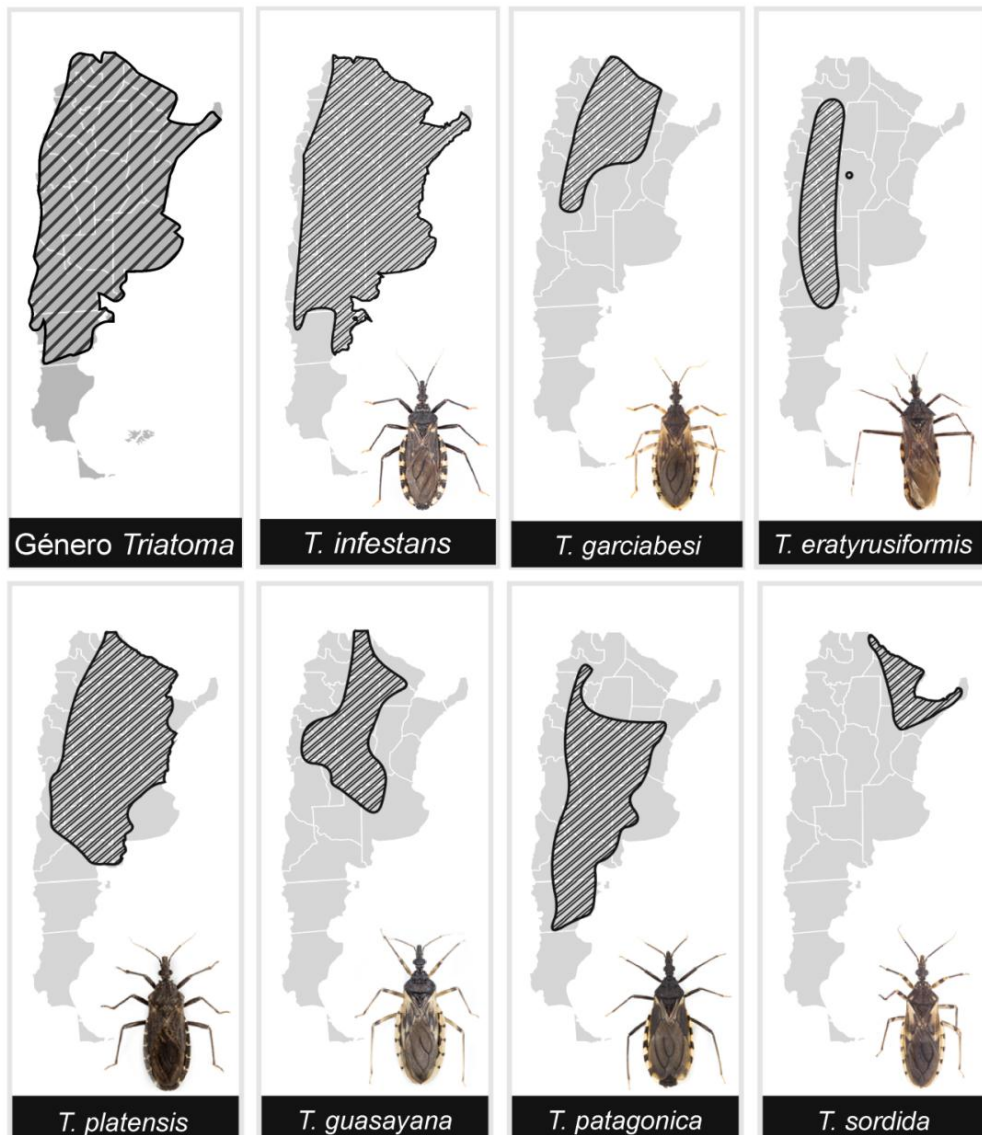


**Figura 9.** Distribución de triatominos en el continente americano. Tomado de Gourbière et al. (2012).

En Argentina, existen distintos triatominos (figura 10), pero solamente *Triatoma infestans* tiene importancia epidemiológica, ya que es el único cuyo hábitat se sitúa en medios modificados o creados por el hombre. Si bien la pobreza es un factor asociado a la presencia de estos insectos, las malas condiciones de higiene de las viviendas y alrededores resultan ser aún más importantes desde el punto de vista epidemiológico.



Estos insectos, pueden hallarse en techos de paja, grietas, entre ladrillos de paredes sin revocar y también detrás de muebles, criaderos de aves, corrales, entre otros.



**Figura 10.** Distribución de triatominos en Argentina. Modificado de Programa Nacional de Chagas (2017).

El comportamiento de estos insectos crea un escenario favorable para transmitir la enfermedad, porque permanecen inmóviles en sus refugios durante el día y atacan durante la noche, con la singularidad que son atraídos por el dióxido de carbono exhalado por la víctima y por los olores de su cuerpo. En contacto con sus presas, usan su aparato bucal para extraer sangre durante algunos minutos, simultáneamente su intestino se hincha, y defecan depositando el parásito (presente en las heces) en la picadura. Posteriormente, el rascado de la víctima favorece la entrada del parásito al torrente sanguíneo. También es posible que la presa esté previamente infectada, con

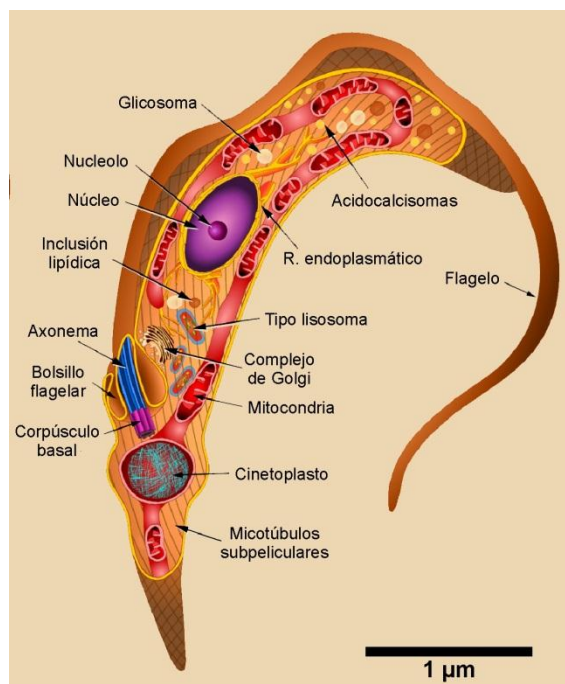
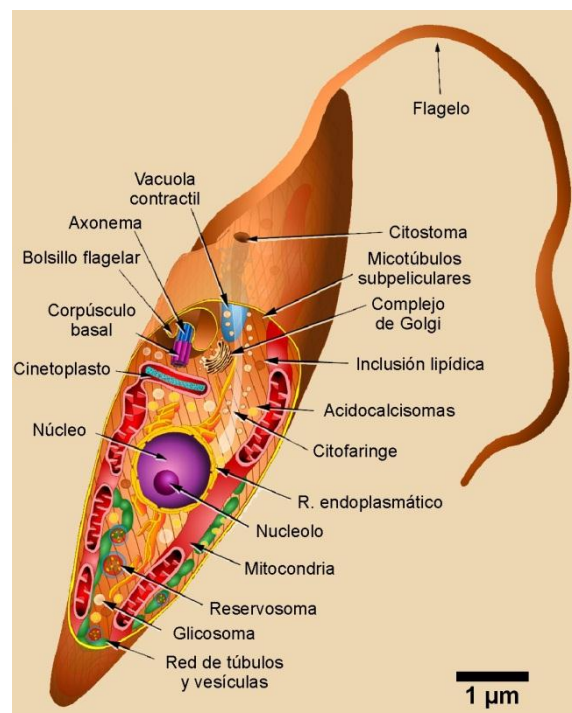
una parasitemia entonces durante la succión de *T. infestans* se infecta, de esta forma el ciclo continúa (Programa Nacional de Chagas, 2017).

### 1.6. *Trypanosoma cruzi*

*T. cruzi* es un protozoo flagelado que ha sido clásicamente descrito en función de su morfología, de la posición del núcleo y de una de sus estructuras, denominada cinetoplasto. Esta clasificación describe los siguientes estadios de *T. cruzi* (figura 11).

#### Epimastigotes

Son formas flageladas, no infectivas y replicativas presentes en el intestino y heces de huéspedes invertebrados y en cultivos axénicos del parásito. Miden 20-40  $\mu\text{m}$  de longitud y 2-5  $\mu\text{m}$  de diámetro



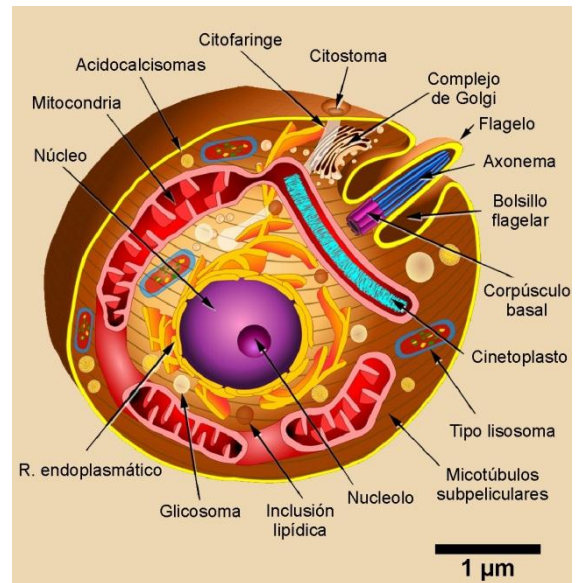
#### Tripomastigotes

Son formas flageladas infectivas y no replicativas, presentes en los huéspedes definitivos vertebrados y en el intestino y heces del insecto. Este estadio se puede observar también en la fase estacionaria de cultivos axénicos y en fase líquida de cultivos celulares como resultado de la liberación desde las células hospedadoras. Son formas alargadas que miden 20-25  $\mu\text{m}$  de longitud y 2-4  $\mu\text{m}$  de diámetro.



### Amastigotes

Son las formas infectivas e intracelulares. Durante este estadio proliferan dentro de las células de sus hospedadores definitivos. Presentan una morfología redondeada (2-5  $\mu\text{m}$  de diámetro) con flagelos incipientes.



**Figura 11.** Representación clásica de los estadios de *Trypanosoma cruzi*. Modificado de Teixeira *et al.* (2012).

#### 1.6.1. Morfología y estructura de *Trypanosoma cruzi*

Numerosos estudios han aportado información acerca de la morfología y ultraestructura de *T. cruzi*, la mayoría de ellos realizados en epimastigotes. En la figura 12, se presenta un esquema de sus características y organización.

**El núcleo.** La estructura nuclear *T. cruzi* es similar al de otras células eucarióticas, redondeado con localización central en epimastigotes y amastigotes. Sin embargo, en los tripomastigotes, el núcleo es elongado y carente de nucléolos (de Souza, 2009, 2002; Elias *et al.*, 2001)

**El flagelo.** La estructura del flagelo también se asemeja a la de otras células eucariotas, presenta una estructura de 9+2 pares de microtúbulos que nacen de un cuerpo basal de 9 tripletes de microtúbulos. La longitud del flagelo varía según su estadio, los amastigotes son quienes presentan los flagelos más cortos. Esta estructura emerge de una invaginación de la membrana plasmática que continúa con la membrana flagelar, esta zona se conoce como bolsillo flagelar, se caracteriza por la ausencia de tubos subpeliculares con diferencias en las proteínas y enzimas respecto a la membrana plasmática. Se estima que en esta región hay una elevada actividad endo y exocítica (de Souza, 2009).

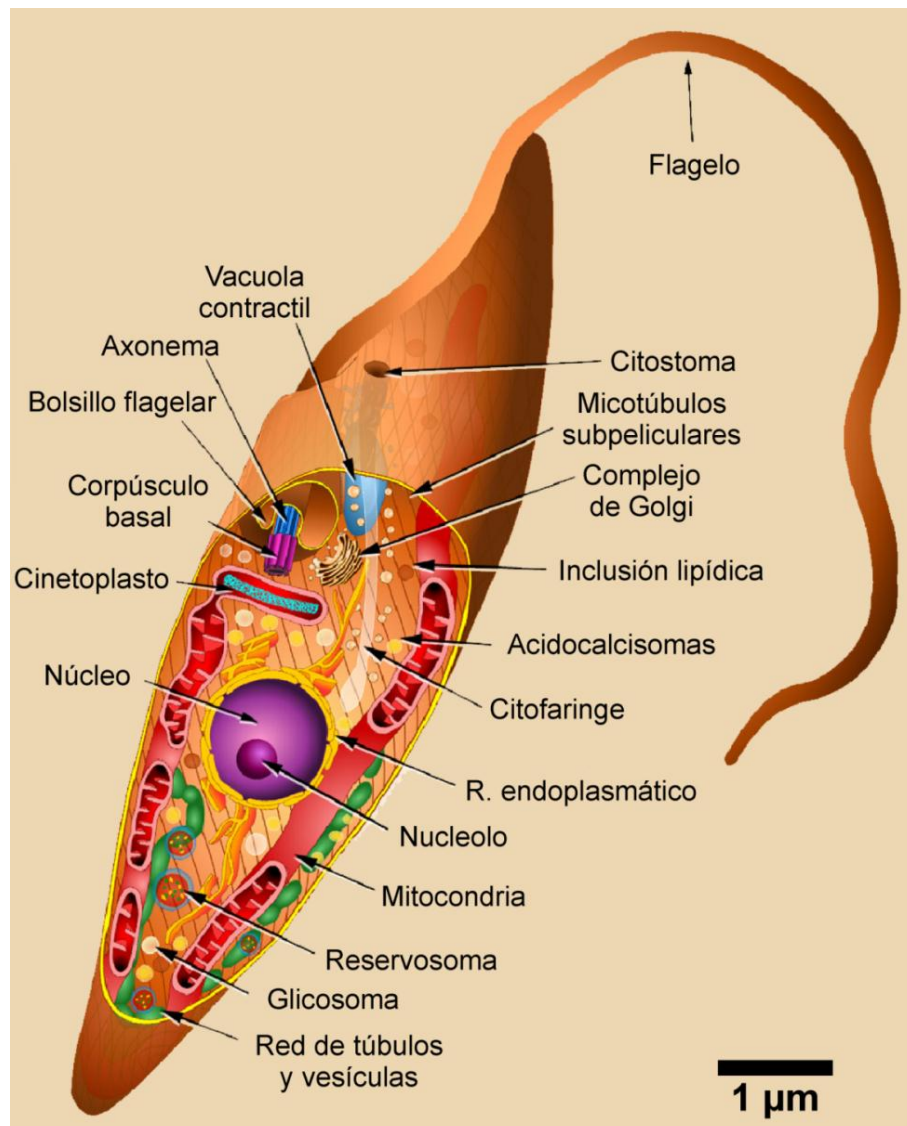


Figura 12. Organización estructural de *T. cruzi*. Epimastigotes. Tomado de Teixeira *et al.* (2012).

**El sistema de endomembranas.** *T. cruzi* tiene abundante retículo endoplasmático, que puede alcanzar la superficie celular y hacer contacto con la membrana plasmática (de Souza, 2009) y un aparato de Golgi desarrollado, desde el cual emergen vesículas de secreción que descargan su contenido en el bolsillo flagelar. La organización del sistema es similar al de otras células y se encuentra próximo al bolsillo flagelar.

**La mitocondria.** Una de las características más sobresalientes de los tripanosomátidos es la existencia de una única mitocondria que se ramifica en todo el citoplasma celular. Su ADN (conocido como k-ADN), se extiende perpendicular al eje del flagelo constituyendo una estructura densa denominada cinetoplasto (Simpson, 1972). A su vez, el cinetoplasto está formado por moléculas circulares interconectadas que

constituyen una red. Estos círculos de ADN se denominan maxicírculos (codifican ARNr y subunidades de complejos respiratorios) y minicírculos (codifican para ARNs guías, los cuales modifican los transcritos de los maxicírculos) de acuerdo a su tamaño (Shapiro y Englund 1995; Souto-Padron *et al.*, 1984). Diferentes proteínas han sido asociadas al k-ADN; tales como la topoisomerasa tipo II, ADN polimerasas, proteínas condensadoras de k-ADN (proteína “H 1 -like”), entre otras.

**Los glicosomas.** Son organelas relacionadas con los peroxisomas, que se observan al microscopio como estructuras esféricas electrodensas, dispersas al azar en el citoplasma (de Souza, 2009). Están rodeadas por una única membrana y las enzimas que contienen están relacionadas con las rutas biosintéticas de pirimidinas (Gao *et al.*, 1999), lípidos (Heise y Opperdoes, 1997; Opperdoes, 1984) y esteroides (Concepción *et al.*, 1998; Quiñones *et al.*, 2004), así como con la oxidación de los ácidos grasos (Wiemer *et al.*, 1996) y la vía de “recuperación” de las purinas (Opperdoes, 1987). Se estima que estas vías son funcionalmente distintas en los diferentes estadios de *T. cruzi*.

**Los acidocalcisomas.** Son estructuras también rodeadas por una única membrana, capaces de transportar protones y calcio. Estas estructuras están relacionadas con funciones de almacenamiento de iones (calcio, potasio, hierro, zinc, entre otros), la regulación del pH y la presión osmótica. Se estima que el almacenamiento de iones calcio representa un papel más importante en los amastigotes, en los cuales se observa un elevado número de estas organelas, ya que el ambiente intracelular en el cual se replican y diferencian, presenta bajos niveles de calcio (< 0,1 mM), en comparación con el ambiente de los tripomastigotes (Patel y Docampo, 2010).

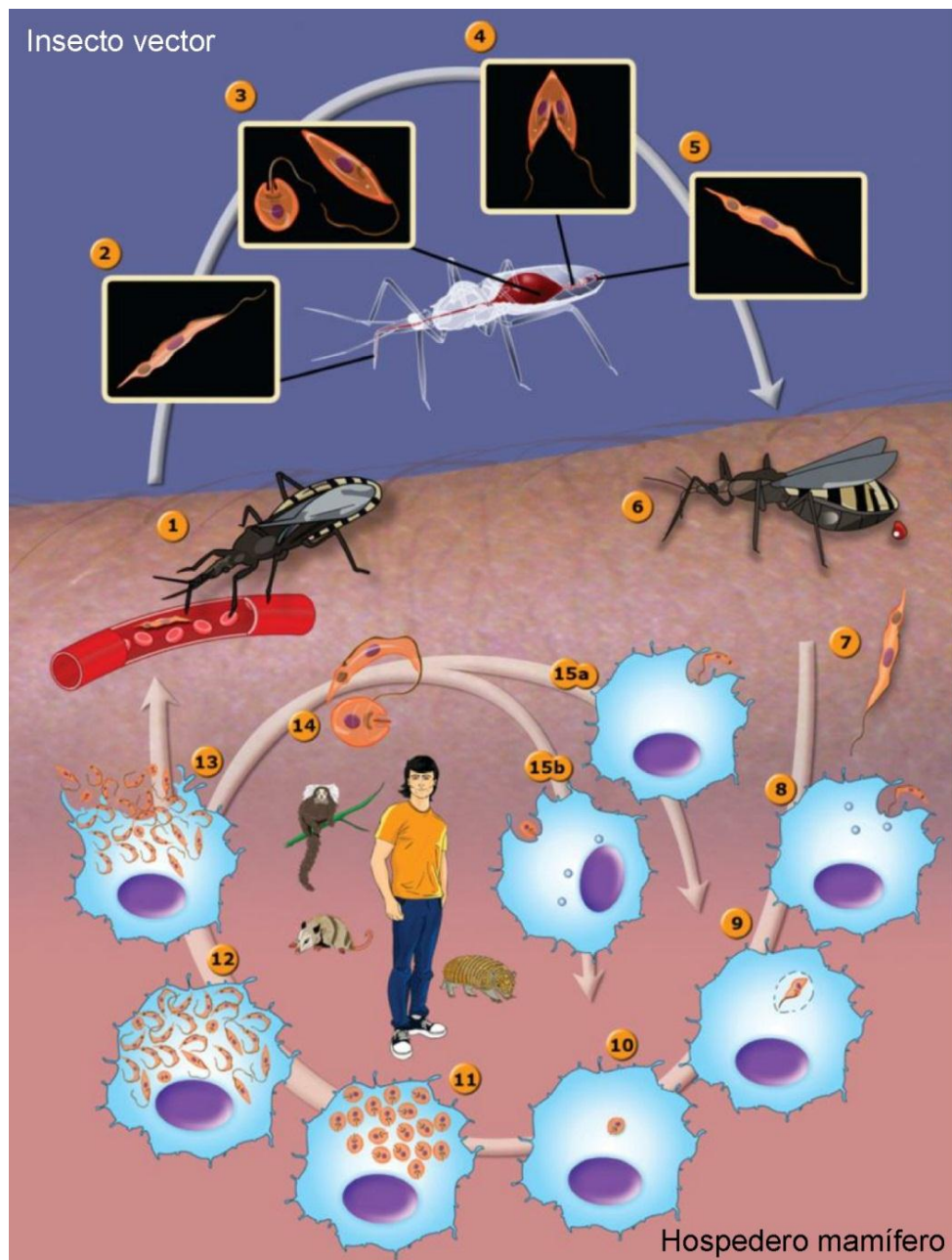
**Los microtúbulos subpeliculares.** La superficie de este protozoo está formada por una membrana plasmática y una capa interna de microtúbulos denominados túbulos subpeliculares, cuya cantidad varía con el tamaño de la célula. Estos microtúbulos se encuentran conectados entre sí y a la membrana mediante filamentos cortos, de naturaleza desconocida (de Souza, 2002). Esta asociación sería la responsable de la

rigidez y la gran resistencia de estas células. Mediante técnicas de congelado-fractura se ha revelado que la composición de la membrana plasmática no es homogénea ya que se pueden diferenciar tres dominios (de Souza, 2007), el del cuerpo celular, el flagelo y el bolsillo flagelar.

### 1.6.2. Ciclo de vida

En la figura 13 se muestra el ciclo de vida convencional de *T. cruzi*. Como se mencionó previamente, los tripomastigotes presentes en las heces de los triatomíneos (tripomastigotes metacíclicos) (5) ingresan al organismo de su huésped vertebrado a través de la herida (6-7). Luego infectan células fagocíticas (ej.: macrófagos) y no fagocíticas (ej.: epiteliales) en las vecindades del sitio de entrada (8). Luego de la invasión a la célula hospedadora, *T. cruzi* permanece durante un período de 4-5 horas dentro de una vacuola parasitófora (VP) (9). La formación de la VP demora aproximadamente dos horas. Si bien su origen no está perfectamente descrito se han detectado marcadores de la célula huésped que estarían reguladas por el mismo parásito. El ambiente ácido de la VP y la presencia de la proteína parasitaria formadora de poros (TcTOX) junto con la actividad de la enzima transialidasa, permitirían la ruptura gradual de la VP y la salida del parásito hacia el citoplasma (de Souza, 2002). Según estudios realizados en células Vero y parásitos pertenecientes al DTU I, este período demoraría aproximadamente tres horas (Stecconi-Silva *et al.*, 2003). Una vez en el citoplasma los tripomastigotes se diferencian a amastigotes que es la forma replicativa intracelular de los parásitos (10-11). La replicación, por fisión binaria, comenzaría aproximadamente 24 horas después (Burleigh y Woolsey, 2002). Otros autores sugieren tiempos más breves de duración para el ciclo intracelular. Martínez *et al.* (2010) informaron que los tripomastigotes (CL-Brenner) se observan diferenciados en amastigotes transcurridas 4 horas después de la infección, es decir que comenzarían su replicación tras 24 horas de su ingreso a la célula. Luego de numerosos ciclos de replicación las formas amastigotes se diferencian nuevamente a tripomastigotes (tripomastigotes sanguíneos) (12), finalmente las células se lisan

liberando los parásitos al torrente sanguíneo y linfático (13-14), favoreciendo la diseminación de la infección a otros tejidos (principalmente a aquellos en los que estén presentes cardiomiocitos, rbdomiocitos y leiomiocitos ya que *T. cruzi* tiene especial tropismo por estos tipos celulares) (15) o una eventual infección a nuevos triatominos (1). Dentro del insecto, *T. cruzi* pasa de su estadio de tripomastigote a epimastigote y se multiplica mediante fisión binaria (2-4) (Álvarez-Hernández *et al.*, 2016; Carabarán Lima *et al.*, 2011).



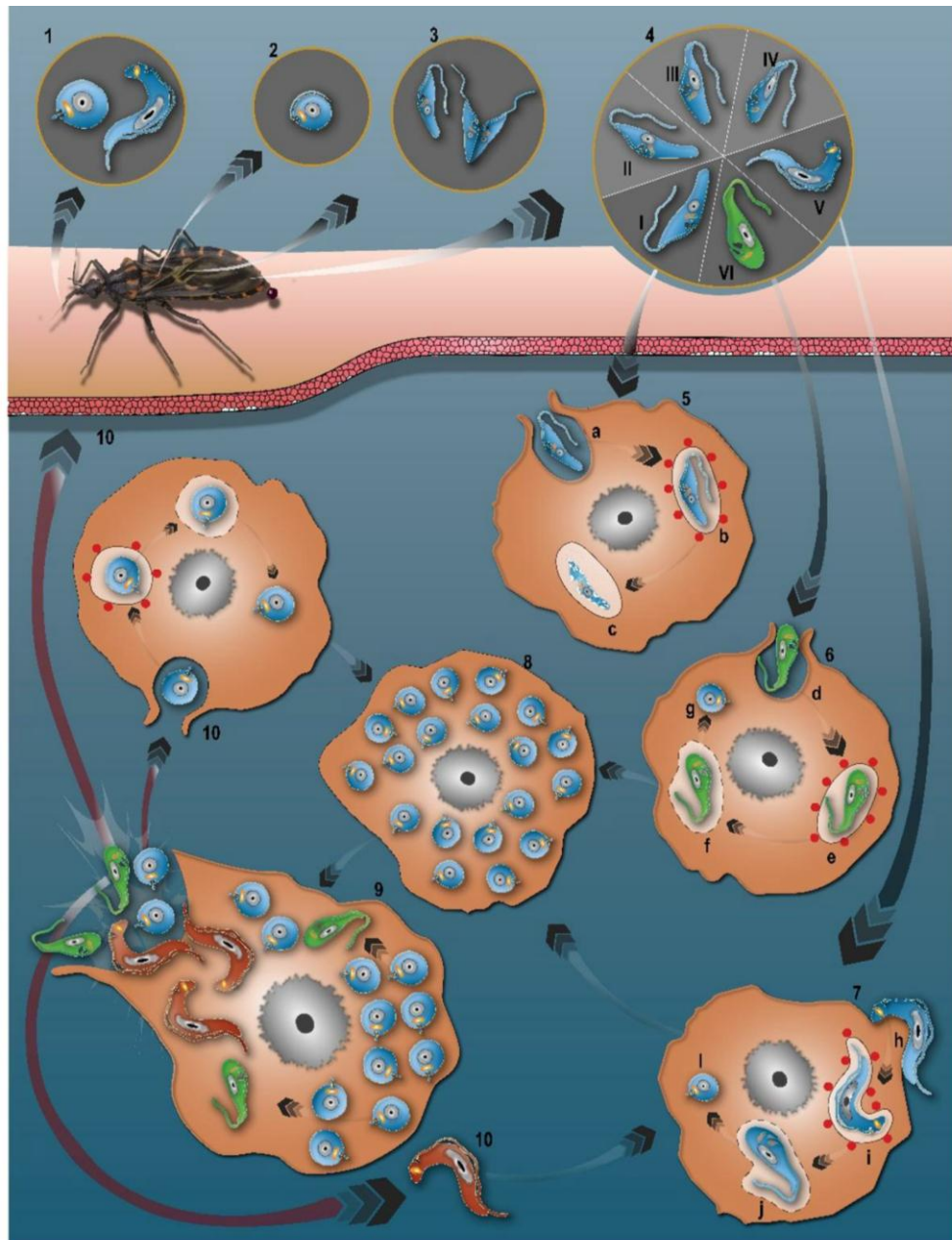
**Figura 13.** Ciclo de vida convencional de *T. cruzi*. Modificado de Teixeira *et al.* (2012).



### 1.6.3. Nuevo ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

Recientemente, de Souza y Barrias (2020) propusieron un nuevo ciclo de vida de *T. cruzi* el cual incluye, además de los estadios conocidos, a formas epimastigotes con capacidad infectiva y sugieren designarlos como “epimastigotes de transición”, puesto que presentan algunas características de epimastigote/amastigote y tripomastigote, con capacidad de infectar a ratones y células de mamíferos. El reconocimiento de la existencia de esta etapa es de gran importancia, ya que los cultivos axénicos de epimastigotes suelen considerarse no patógenos. Por lo tanto, es necesario cambiar esta visión, requiriendo un cuidado especial por parte de quienes trabajan con este protozoario para evitar infecciones accidentales en el laboratorio.

En la figura 14 se representa el nuevo ciclo de vida de *T. cruzi* propuesto por de Souza y Barrias (2020). El insecto vector pica a un huésped mamífero e ingiere tripomastigotes que se encuentran en la sangre (1). Los tripomastigotes y algunos amastigotes ingeridos se transforman en esferomastigotes (2). En el intestino del insecto las formas se diferencian en epimastigotes y comienzan el proceso de división celular (3). En la porción final del intestino, los epimastigotes se diferencian y en el momento de la excreción se liberan epimastigotes indiferenciados (I), tripomastigotes metacíclicos (V) y formas intermedias (II-IV), incluidos los epimastigotes infectivos (VI) (4). La célula huésped internaliza los epimastigotes por fagocitosis (a), se forma la VP y se fusiona con los lisosomas (b) con la posterior digestión de los epimastigotes (c) (5). Entrada de epimastigotes infectivos en la célula huésped (d), se forma la VP, se produce la fusión con los lisosomas (e), se destruye la VP (f) y los amastigotes acceden al citoplasma (g) (6). Los tripomastigotes metacíclicos infectan las células (h), se forma la VP (i), luego se rompe (j) y los amastigotes invaden el citoplasma (l) (7). Los amastigotes se multiplican en el citoplasma (8). Los amastigotes se transforman en tripomastigotes, vía epimastigotes intracelulares (9). Los amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes pueden re-infectar otras células o ser ingeridos por el vector y reproducir el ciclo nuevamente (10).

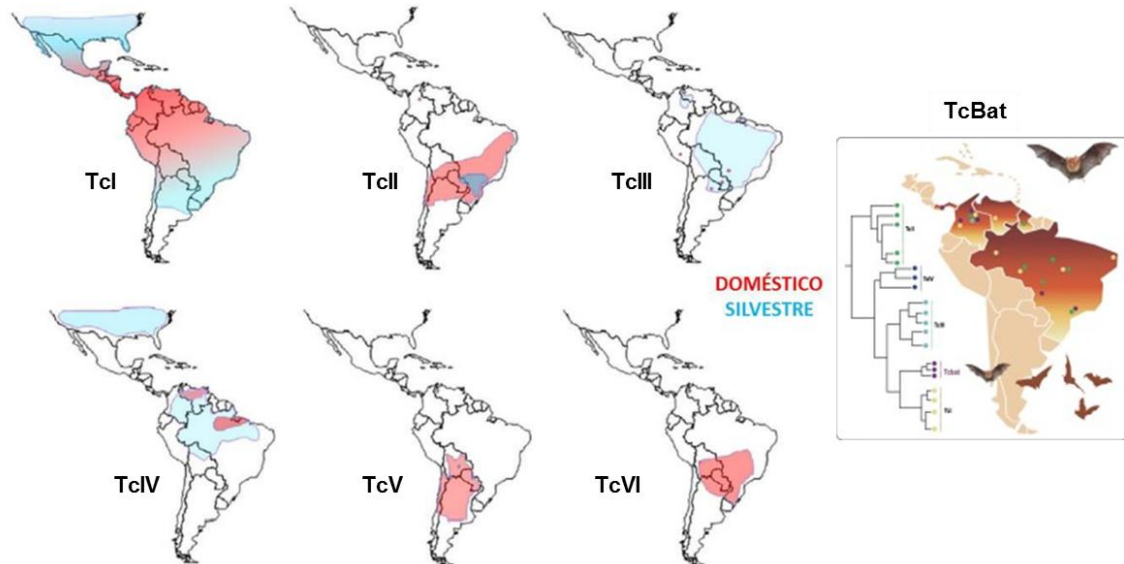


**Figura 14.** Ciclo de vida de *T. cruzi*, incluidos los epimastigotes infectivos. Tomado de de Souza y Barrias (2020).

#### 1.6.4. Diversidad de *Trypanosoma cruzi*

*T. cruzi* es un parásito que pertenece a un taxón muy heterogéneo. Se han encontrado numerosos polimorfismos genéticos y de proteínas entre las distintas cepas (Hamilton y Stevens, 2017; Pena *et al.*, 2009). Durante años se ha intentado definir e identificar los grupos más relevantes de este parásito. Actualmente *T. cruzi* se ha clasificado filogenéticamente en 7 unidades discretas de tipificación (TcI-TcVI y TcBat), entendidas

como un conjunto de poblaciones genéticamente relacionadas entre sí, identificables mediante marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos (Zingales *et al.*, 2009). En la figura 15, se presenta la distribución de los distintos DTU en Latinoamérica.



**Figura 15.** Distribución geográfica de DTU en el continente americano. Modificado de Zingales *et al.* (2009).

Esta gran diversidad biológica de *T. cruzi* implica una importante complejidad eco-epidemiológica (Miles *et al.*, 2009; Campbell *et al.*, 2004; Macedo y Pena, 1998) que, entre otros aspectos, demanda establecer una correlación entre la severidad de la infección y el linaje del parásito (Vázquez-Chagoyan *et al.*, 2011). Este aspecto, así como la relación entre los distintos linajes y la sensibilidad al Bzn y Nfx, aún no han podido ser resueltos (Vela *et al.*, 2021; Moreno *et al.*, 2010). Sin embargo, es importante señalar que los parásitos de la DTU I frecuentemente se asocian con la enfermedad aguda y crónica de los pacientes del norte de Sudamérica y a la reactivación de la enfermedad en pacientes inmunocomprometidos (Duran-Rehbein *et al.*, 2014). Además, los parásitos de este linaje son considerados resistentes a la acción del Bzn por distintos autores (Toledo *et al.*, 2003; Revollo *et al.*, 1998).

### 1.7. Búsqueda de moléculas líderes contra *Trypanosoma cruzi*

Como se hizo referencia, la EC es una parasitosis endémica en Latinoamérica que requiere de medidas de prevención y tratamientos adecuados. Las drogas actualmente



en uso, no resultan eficaces en todas las fases de la enfermedad. Para la industria farmacéutica el desarrollo de nuevos fármacos para tratar esta afección es aún lejano, puesto que no ofrece ventajas económicas importantes. Los productos de origen natural constituyen una importante herramienta en la búsqueda de nuevos principios activos.

### 1.7.1. Productos Naturales

Los productos naturales (PNs) proporcionan una importante fuente de moléculas bioactivas, representada por compuestos orgánicos provenientes del metabolismo secundario de fuentes biológicas de origen vegetal, animal, fúngico o bacteriano que se producen como mecanismo de respuesta ante las condiciones externas, tales como estrés hídrico, térmico, de superpoblación y radiación. En general son señales químicas frente a herbívoros, plagas, patógenos, así como simbiosis con otros organismos. Usualmente son moléculas pequeñas con una estructura determinada para ejercer una actividad biológica (Berkov *et al.*, 2020).

La historia de los PNs comenzó con el surgimiento de las civilizaciones humanas; el registro más antiguo que se tiene data del 2600 a.C. en la Mesopotamia, el que se refiere al uso de tabletas de arcilla impregnadas con aceites de *Cupressus sempervirens* y especies del género *Commiphora* para disminuir la tos (Newman y Cragg, 2020). De igual forma, existen documentos de civilizaciones en Egipto, China, India y Grecia que registran el uso de cientos de hierbas medicinales y sus extractos como píldoras, infusiones, ungüentos, para el tratamiento de diversas afecciones (Yeung *et al.*, 2018). Sin embargo, no fue hasta el siglo XIX, que los avances en el conocimiento científico llevaron al descubrimiento y aislamiento de compuestos puros, dando inicio a una nueva era en la medicina, donde los principios activos podían ser purificados a partir de las plantas, para administrarse en dosis precisas, independientemente de la cantidad de material vegetal (Newman y Cragg, 2020). Entre los primeros compuestos puros aislados, se menciona la digitoxina, aislada de *Digitalis purpurea*, usada para mejorar el ritmo cardíaco; el alcaloide morfina, aislado a partir de *Papaver somniferum* ampliamente utilizado como analgésico narcótico. Otro fue la

salicina, un glucósido del alcohol salicílico, aislado de la corteza del sauce blanco (*Salix alba*), que era utilizada antiguamente para tratar la fiebre y las molestias reumáticas (Zhang *et al.*, 2020). También, es bien conocido el uso de plantas medicinales para tratar enfermedades parasitarias, como por ejemplo *Remijia ferruginea* (Rubiaceae) como antipalúdico, *Artemisia nilagirica* (Asteraceae) como antihelmíntico y *Chenopodium ambrosioides* (Amaranthaceae) para el tratamiento de amebiasis (Dos Santos Silva *et al.*, 2014; Suresh *et al.*, 2011; Sukul *et al.*, 2005; Andrade-Neto *et al.*, 2003). Estos usos informados por la medicina tradicional, condujeron el aislamiento de compuestos bioactivos contra esos parásitos.

En la actualidad, más del 25 % de las drogas que produce la industria farmacéutica derivan de PNs provenientes de plantas (Berkov *et al.*, 2020). La OMS (2022), informa que el 80 % de la población mundial todavía utiliza plantas o sus derivados para tratar muchas afecciones. Newman y Cragg (2020) en su reciente revisión, considerando los fármacos aprobados para el tratamiento de enfermedades humanas entre 1981 y 2019, concluyen que los PNs o estructuras basadas en PNs continúan desempeñando un papel muy importante en el proceso de descubrimiento y desarrollo de fármacos. Algunos ejemplos que revolucionaron la industria farmacéutica son el paclitaxel, alcaloide anticancerígeno obtenido de *Taxus brevifolia*; la vinblastina, droga antimitótica y anticancerígena obtenida a partir de *Catharanthus roseus*; y la digoxina que es un glucósido cardiotónico, usado como agente antiarrítmico y que se obtiene de *Digitalis lanata* (Newman y Cragg, 2020).

### **1.7.2. Productos naturales con actividad contra *Trypanosoma cruzi***

La mayoría de la población mundial continúa utilizando medicinas tradicionales indígenas, principalmente derivadas de plantas, para tratar enfermedades (García y Cardona, 2021). El conocimiento ancestral sobre las plantas y sus componentes, se utiliza como fuente de partida para obtener nuevas drogas que resulten seguras y efectivas para el tratamiento de enfermedades. La EC transita por una fase aguda con síntomas comunes a otras enfermedades y una larga fase crónica asintomática, lo que

dificulta identificarla para diagnosticarla y así encontrar plantas medicinales de uso popular para su tratamiento. Sin embargo, la etnobotánica informa el uso de especies relacionadas con el tratamiento de la sintomatología (soplo cardíaco, fatiga, dolores, entre otros) (Muschetti *et al.*, 2014), el uso de “Boldo de la cordillera” para tratar soplo cardíaco, resultó en alquilfenoles aislados de *Oxalis erythrorhiza*, activos frente a *T. cruzi* (Feresin *et al.*, 2003). En tales casos, las plantas utilizadas para otras enfermedades protozoarias, especialmente aquellas con similitudes taxonómicas, pueden mostrar mejores resultados (Izumi *et al.*, 2011). Algunos estudios han evaluado extractos de plantas y compuestos derivados y han reportado sus efectos potenciales contra *T. cruzi*.

Los extractos polares y apolares de *Guarea polymera* (Meliaceae), *Marila laxiflora* (Clusiaceae), *Conobea scoparioides* (Scrophulariaceae), *Otoba novogranatensis* (Myristicaceae) y *Otoba parviflora* (Myristicaceae) fueron activos *in vitro* contra epimastigotes a 100 µg/mL (Weniger *et al.*, 2001).

Extractos crudos de *Handroanthus impetiginosa* (Bignoniaceae), *Ageratum conyzoides* (Asteraceae) y *Ruta graveolens* (Rutaceae), colectados en Brasil, causaron toxicidad significativa en tripomastigotes, reducción de la multiplicación de amastigotes intracelulares y en la tasa de invasión celular a 0,5 mg/mL; 0,0625 mg/mL y 0,250 mg/mL, respectivamente (Teixeira *et al.*, 2014).

Asimismo, algunos estudios con aceites esenciales han mostrado resultados prometedores. El aceite esencial/volátil de *Eugenia brejoensis* (Myrtaceae), recolectado en el estado de Pernambuco, Brasil, mostró actividad contra todas las formas del parásito con bajo efecto citotóxico en la célula huésped, y fue más selectivo para el parásito que el fármaco de referencia Bzn (Oliveira *et al.*, 2017).

En Argentina se han realizado varios estudios con plantas que tienen algún efecto tripanocida. Un estudio realizado con 32 extractos orgánicos y acuosos pertenecientes a 12 plantas medicinales argentinas mostró que solo los extractos acuosos de *Eupatorium buniifolium*, *Lippia integrifolia*, *Mulinum spinosum* y *Satureja parvifolia*

inhibieron en un 70 % o más el crecimiento de epimastigotes en ambas concentraciones probadas (100 y 10  $\mu\text{g/mL}$ ) (Sülzen *et al.*, 2006). Los extractos de hojas y flores de *Vernonanthura nebularum* y *Elephantopus mollis* mostraron un efecto contra los epimastigotes de *T. cruzi* con valores de  $\text{CI}_{50} < 2 \mu\text{g/mL}$  (Sosa *et al.*, 2020). Asimismo, las lactonas sesquiterpénicas aisladas de esos extractos mostraron valores de  $\text{CI}_{50}$  1,5  $\mu\text{M}$  mejores que los del fármaco de referencia Nfx y Bzn. Otro estudio mostró que los extractos de diclorometano de *Stevia satureiifolia* var. *satueiifolia* inhibió el crecimiento de epimastigotes en un  $90,9 \pm 1,2 \%$  a una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  (Beer *et al.*, 2016). Dos flavonoides aislados, eupatorin y 5-desmetilsinensetina, mostraron valores de  $\text{CI}_{50}$  de 0,2 y 0,4  $\mu\text{g/mL}$  contra epimastigotes de *T. cruzi* y de 61,8 y 75,1  $\mu\text{g/mL}$  contra tripomastigotes. Además, el flavonoide 5-desmetilsinensetina mostró una actividad moderada contra los amastigotes de *T. cruzi* con un valor de  $\text{CI}_{50}$  de 78,7  $\mu\text{g/mL}$  (Beer *et al.*, 2016). El extracto orgánico de *Mikania micrantha*, recolectado en la Provincia de Tucumán, mostró una inhibición del crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* de  $77,6 \pm 4,5 \%$  a una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$  (Laurella *et al.*, 2012). Otro estudio mostró que el extracto orgánico de *Smallanthus sonchifolius* fue activo contra los epimastigotes de *T. cruzi* mostrando una inhibición del crecimiento del  $95,1 \pm 0,5 \%$  a 10  $\mu\text{g/mL}$  (Frank *et al.*, 2013). Este extracto se fraccionó, se identificaron y aislaron enhidrina, uvedalina y polimatina B, que mostraron actividad tripanocida significativa contra las formas epimastigotes del parásito con valores de  $\text{CI}_{50}$  de 0,84  $\mu\text{M}$ , 1,09  $\mu\text{M}$  y 4,90  $\mu\text{M}$  y contra amastigotes con 5,17  $\mu\text{M}$ , 3,34  $\mu\text{M}$  y 9,02  $\mu\text{M}$ , respectivamente. En otro estudio *in vivo*, los ratones infectados fueron tratados en la fase aguda con enhidrina y uvedalina, y hubo una disminución significativa de parásitos circulantes (50-71 %) sin signos de hepatotoxicidad (Ulloa *et al.*, 2017). El extracto de *Habranthus brachyandrus* mostró alta actividad contra *T. cruzi* ( $\text{CI}_{50} = 0,56 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ ) y su alcaloide ismina fue específicamente activo contra el parásito ( $\text{CI}_{50} = 31,13 \pm 1,10 \mu\text{M}$ ) con baja toxicidad contra las células HepG2 ( $\text{CI}_{50} > 300 \mu\text{M}$ ), y baja actividad anti-amastigote ( $\text{CI}_{50} = 191,7 \pm 3,75 \mu\text{M}$ ) (Martinez-Peinado *et al.*, 2022). Spina *et al.*

(2018) reportaron actividad contra epimastigotes de embelina aislada de *Oxalis erythrorhiza*, y el derivado 5-O-metilembelina, obtenido por semisíntesis, que además fue activo contra amastigotes intracelulares en los que se observaron alteraciones mitocondriales, modificaciones en la actividad mitocondrial y aumento en los niveles de ROS.

### **1.8. Justificación del problema**

Los antecedentes hasta aquí presentados sumado a los numerosos efectos adversos del Bzn y Nfx, y su baja eficiencia en la etapa crónica de la enfermedad constituyen una necesidad de fármacos nuevos y eficaces para el tratamiento de la EC que puedan reemplazar las drogas actualmente en uso, o disminuir sus dosis con el fin de reducir efectos adversos. En este contexto, los productos naturales presentes en la flora nativa de Argentina, se presentan como una importante fuente de nuevas moléculas con potencial actividad para tratar la EC.

### **1.9 Objetivos**

#### **1.9.1. Objetivo general**

Establecer el potencial de especies de la flora nativa para tratar la Enfermedad de Chagas mediante la caracterización química y el estudio de la actividad antiparasitaria contra *Trypanosoma cruzi*.

#### **1.9.2. Objetivos específicos**

1. Colectar especies de plantas nativas argentinas, pertenecientes a los géneros: *Echinopsis*, *Hippeastrum*, *Maytenus* y *Seriphidium* y el líquen *Usnea lethariiformis*.
2. Preparar extractos a partir de las muestras colectadas con solventes de diferentes polaridades.
3. Evaluar la actividad antiparasitaria *in vitro* de los extractos sobre epimastigotes.
4. Realizar el fraccionamiento bioguiado, mediante la actividad antiparasitaria.

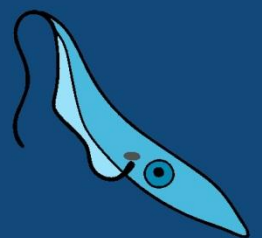
5. Caracterizar y cuantificar los compuestos activos en extractos mediante GC-MS y UHPLC-MS.
6. Aislar compuestos puros y determinar su actividad antiparasitaria.
7. Evaluar la actividad del compuesto puro sobre la proliferación, viabilidad, ultraestructura y actividad mitocondrial de epimastigotes.
8. Establecer la actividad del compuesto puro sobre formas infectivas de *T. cruzi*.
9. Determinar la citotoxicidad del compuesto puro en células de mamíferos.
10. Estudiar el efecto sinérgico de los compuestos y extractos más activos con Bzn.





# Capítulo II

## Materiales y Métodos



## 2.1. Material vegetal

### 2.1.1 *Echinopsis terscheckii* (*Trichocereus terscheckii*; Hunt 2006)

Es un cactus columnar, que crece en las zonas áridas de Argentina, de larga vida que puede alcanzar hasta 15 m de altura. Sus flores tienen forma de embudo y se muestran en posiciones apicales o laterales. Los tépalos externos son de color verde o verde rojizo, mientras que los tépalos internos son de color blanco. Los frutos son carnosos y tienen semillas negras, fotoblásticas positivas, con un rango de germinación entre 15 °C y 35 °C. Se colectó en el año 2017, en el departamento Valle Fértil, provincia de San Juan, Argentina.

### 2.1.2. *Hippeastrum aglaiae*, *H. aulicum*, *H. escoipense*, *H. glaucescens*, *H. petiolatum*, *H. puniceum*, *H. reticulatum* e *H. híbrido*

El género *Hippeastrum*, también conocido como *Amaryllis*, perteneciente a la familia *Amaryllidaceae* son plantas ornamentales con flores bulbosas. Se originó en las Américas subtropicales, desde el este de Brasil hasta los Andes centrales del sur de Perú, Argentina y Bolivia. Muchas especies de este género y sus híbridos tienen flores grandes de colores vistosos. Son nativos de América Central y del Sur, y los miembros de este género se cultivan fácilmente en las regiones tropicales y subtropicales. Hay una gran diversidad de diferentes híbridos dentro del género (Datta, 2020). *H. híbrido* es una especie que se halla hibridada de forma natural y hasta el día de la fecha no se la ha descrito taxonómicamente. Para fines prácticos, en este documento se la nombra del modo anteriormente detallado. Todas las especies del género se colectaron el Noroeste argentino entre los años 2012 y 2015.

### 2.1.3. *Maytenus viscifolia*

Es conocida como “sombra de toro”, es un arbusto inerme, de 3-7 m de alto, tronco de hasta 0,30 m, follaje persistente, verde intenso. Propio del parque chaqueño serrano y de la provincia del monte, se distribuye en Salta, Tucumán, Santiago del Estero,

Catamarca, La Rioja, Córdoba y San Juan. Se colectó en el año 2018, en el departamento Caucete, provincia de San Juan, Argentina.

#### **2.1.4. *Seriphidium mendozanum* (*Artemisia mendozana*)**

Es popularmente conocida como “ajenjo”, es una planta de uso medicinal del piedemonte andino de las provincias de Mendoza y San Juan, Argentina (Márquez, 1999). Las hojas, flores y brotes se emplean en la medicina tradicional como infusiones para tratar dolores de hígado y estómago (Bustos *et al.*, 1996). Los individuos se colectaron en el año 2017, en los departamentos Iglesia y Ullúm, en la provincia de San Juan, Argentina.

#### **2.1.5. *Usnea lethariiformis***

Esta especie es un líquen, conocido como “barba de viejo”. Se colectó en Tierra del Fuego en marzo de 2019, fue identificado por el Dr. Juan Manuel Rodríguez, especialista en el género *Usnea*, del CERNAR - FCEFyN – UNC. Instituto de Investigaciones Biológicas y Tecnológicas IIBYT (CONICET UNC). El género *Usnea* Adans. (Parmeliaceae; Ascomycetes liquenizados) es un grupo típico de líquenes fruticosos en su mayoría de color verde grisáceo pálido que crecen como mini-arbustos sin hojas. Se conocen más de 360 especies de *Usnea* en el mundo. *Usnea* fue usado para tratar varias enfermedades además de su uso histórico como tintes, cosméticos, conservantes y desodorantes.<sup>1</sup>

## **2.2. Obtención de extractos y fracciones**

### **2.2.1. *Hippeastrum aglaiae*, *H. aulicum*, *H. escoipense*, *H. glaucescens*, *H. híbrido*, *H. petiolatum*, *H. puniceum*, *H. reticulatum* y *E. terscheckii***

Bulbos de las especies de *Hippeastrum* colectadas y tallos de *E. terscheckii* se pesaron y secaron a 40 °C con corriente de aire hasta peso constante. El material vegetal seco y

---

<sup>1</sup> Nota: Todo el material vegetal fue colectado durante el período de floración, fueron identificados por el Lic. J. Márquez, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (UNSJ), Lic A. Slanis, Instituto Miguel Lillo (Tucumán), Dr. H. Huayla, Universidad de Ilo (Perú), y el MSc. G. Roitman, Facultad de Turismo y Urbanismo (UNSL). Los nombres científicos y sinonimias fueron revisados y corroborados en <http://www.theplantlist.org>, accedido en el mes de setiembre de 2022.

molido (100 g) se colocó en balón de destilación con MeOH, se maceró (3 x 200 mL), se filtró y concentró hasta obtener un extracto de consistencia semilíquida. Posteriormente se realizó la marcha de alcaloides como se describe a continuación: se agregó una solución acuosa acidificada con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 % v/v, luego se desengrasó con éter etílico (3 x 100 mL). La solución acuosa desengrasada se trató con NaOH al 20 % hasta un pH = 9-10, y se extrajo con DCM (3 x 100 mL) el extracto enriquecido en alcaloides. Luego se agregó sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró hasta evaporar el solvente por completo para dar lugar al extracto básico clorofórmico enriquecido en alcaloides (EEA).

#### **2.2.1.1. Fracciones del EEA de *H. híbrido***

A partir del EEA-*H. híbrido*, mediante cromatografía en columna Sephadex LH-20 eluída con una mezcla EP:DCM:MeOH (2:1:1) se obtuvieron 21 fracciones, las cuales se agruparon según similitud en el revelado de TLC de la siguiente forma: fracciones 1 a 10 (F1), fracciones 11 y 12 (F2), fracciones 13 y 14 (F3), fracciones 15 y 16 (F4), fracciones 17 a 19 (F5) y fracciones 20 y 21 (F6).

#### **2.2.1.2. Obtención de candimina**

El EEA-*H. escoipense* (3 g) se sometió a cromatografía en columna (50 x 3,6 cm) utilizando gel de sílice y un sistema de gradiente de DCM y MeOH como fase móvil obteniendo 25 fracciones homogéneas (F1-25). Se cristalizó candimina a partir de las F8-12.

#### **2.2.2. *Maytenus viscifolia***

A partir de 200 g de raíces secas y molidas, se realizó la extracción por maceración durante 24 h, previa sonicación por ultrasonido (30 min) con una mezcla de EP:Eter etílico en proporción 1:1. Luego se filtró el extracto y fue concentrado en evaporador rotativo hasta sequedad, obteniéndose 5,697 g de extracto (EMv) de color naranja (rendimiento porcentual de 2,85 % p/p).

### **2.2.2.1. Obtención de pristimerina**

Dos gramos de EMv fueron permeados en una columna de Sephadex LH-20 (long. col.: 40 cm, d.i.: 5 cm), eluída con una mezcla de EP:DCM:MeOH en relación 2:1:1. Se obtuvieron 34 fracciones (50 mL c/u). Luego, las fracciones 6-9 fueron permeadas sucesivamente en columna de Sephadex LH-20 (long. col.: 50 cm, d.i.: 2 cm, eluída con una mezcla de EP:DCM:MeOH en relación 2:1:1), y se obtuvo un sólido puro cristalino color naranja identificado mediante comparación por UHPLC-MS con un patrón comercial, como pristimerina.

### **2.2.3. *Seriphidium mendozanum***

Material vegetal, hojas secas y molidas (500 g) y tallos (125 g) se maceraron a temperatura ambiente, durante 72 h (x2) con EP. Luego se filtró y evaporó el solvente con evaporador rotatorio hasta peso constante. Se obtuvieron los extractos de hojas (EHSm) y tallos (ETSm).

Los extractos fueron fraccionados a través de una columna de Sephadex LH-20 (largo columna: 27 cm, d.i.: 4 cm) previamente estabilizada con EP:DCM:MeOH (2:1:1). Se obtuvieron 11 y 15 fracciones de 50 mL del EHSm y del ETSm, respectivamente. Luego se evaluaron los patrones de las fracciones por CCF, usando como fase móvil EP:AcOEt (95:5) y se combinaron las fracciones que presentaban patrones similares.

### **2.2.4. *Usnea lethariiformis***

Se colocaron 180 g (peso seco) de material y se realizaron extractos seriados a temperatura ambiente durante 72 h con DCM (x2). De este extracto se obtuvo una fase soluble en MeOH y una insoluble (EDCMUls y EDCMUIl, respectivamente). Luego, el material se filtró y se dejó secar para posteriormente macerar con MeOH durante 72 h, obteniendo un extracto metanólico (EMeOHUI). El solvente de los extractos se evaporó con evaporador rotatorio. El extracto de EDCMUls se fraccionó en columna de Sephadex LH-20 (long. col.: 40 cm, d.i.: 5 cm) eluída con una mezcla de EP:DCM:MeOH en relación 2:1:1, obteniendo 15 fracciones (40 mL c/u) (F1-F15).

## 2.2.5. Resumen de extractos y fracciones

En la tabla 1 se resumen los extractos, fracciones y compuestos obtenidos de las especies seleccionadas para evaluar frente a *T. cruzi*.

**Tabla 1.** Extractos, fracciones y compuestos, métodos de extracción y nomenclatura.

Especie	Órgano	Extracción	Fracciones	Nomenclatura	Compuesto	Observaciones
<i>E. terscheckii</i>	Tallo	MA	-	EEA-E. terscheckii		
<i>Hippeastrum</i> spp	Bulbos	MA	-	EEA-H. aglaiae, EEA-H. aulicum		
				EEA-H. escoipense, EEA-H. glaucescens		
				EEA-H. híbrido, EEA-H. petiolatum		
				EEA-H. puniceum, EEA-H. reticulatum		
<i>H. escoipense</i>	Bulbos	MA	18	EEA-H. escoipense	<b>Candimina</b>	
<i>H. híbrido</i>	Bulbos	MA	21	EEA-H. híbrido F1 (1-10), F2 (11-12), F3 (13-14), F4 (15-16), F5 (17-19), F6 (20-21)	Alcaloide mayoritario: <b>Montanina*</b>	*aislado de <i>H. argentinum</i> (Ortiz et al., 2016).
<i>M. viscolia</i>	Raíz	EP:EE	10*	EMV	<b>Pristimerina</b>	*Las fracciones no se ensayaron frente a <i>T. cruzi</i> .
<i>S. mendozanum</i>	Hojas	EP:DCM:MeOH	11	EHSm F1-F11		
	Tallo	EP:DCM:MeOH	15	ETSm F1-F15		
<i>U. lethariformis</i>	Cuerpo fructífero	DCM DCM (seriado) MeOH (seriado)	-	EDCMUls*		*Soluble en MeOH
				F1-F12		
				EDCMUli*		*Insoluble en MeOH
				EMeOHUI		
					<b>Compuesto mayoritario: Ácido úsico*</b>	*aislado de <i>Protosnea poeppigii</i> (Schmeda et al., 2008)

MA: Marcha de alcaloides

### **2.3. Fraccionamiento de extractos y aislamiento de compuestos**

Los procesos de aislamiento para las especies estudiadas, comprendieron una serie de técnicas entre las cuales se mencionan: cromatografía en capa fina (CCF), preparativa (CCFP) y líquida en columna (CC).

#### **2.3.1. Cromatografía en capa fina (CCF)**

Fueron realizadas sobre cromatofolios de gel de sílice tipo G, con indicador de luminiscencia a 254 nm, Merck y Schleicher & Schuell, F-1500/LS 254. Las placas se observaron a la luz UV-254-365 nm y fueron reveladas por exposición a vapores de yodo, con reactivo de Dragendorff y *p*-anisaldehído.

#### **2.3.2. Cromatografía en capa fina preparativa (CCFP)**

Se emplearon placas de 1 mm de espesor, Schleicher & Schuell, tipo G-1510/LS 254, sembrando en cada una de ellas entre 20 y 30 mg de muestra. La detección de los compuestos en las placas se hizo con luz UV o pulverizando uno de los bordes con el revelador apropiado.

#### **2.3.3. Cromatografía en columna (CC)**

Tanto para las columnas secas y húmedas se utilizó gel de sílice 0,063 – 0,200 nm, Merck. Las columnas cromatográficas secas fueron preparadas vertiendo lentamente gel de sílice por la parte superior y aplicando vacío en el extremo inferior. Las columnas cromatográficas húmedas se montaron vertiendo gel de sílice suspendido en el disolvente de menor polaridad y sometiendo la columna a presión. También se hicieron columnas de permeación en soporte Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals). Las columnas Sephadex LH-20 se prepararon vertiendo una suspensión de gel de Sephadex LH-20 en metanol, que previamente se dejó durante una noche en contacto con el solvente. El proceso cromatográfico se llevó a cabo utilizando como fase móvil metanol o una mezcla de disolventes compuesta por EP:DCM:MeOH (2:1:1), empleando una cantidad equivalente a tres veces el volumen muerto de la misma para



estabilizar la columna en cada caso. Previo a sembrar la muestra a separar, se la disolvió en la fase móvil (volumen máximo 5 % del volumen muerto).

## **2.4. Instrumental**

### **2.4.1. Cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS)**

Los espectros de GC-MS fueron obtenidos en un instrumento Agilent 6890N GC 5975 inert MSD operando en modo de impacto electrónico a 70 eV (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Se utilizó una columna DB5-MS (30 cm x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m). El programa de temperatura usado fue: 100–180 °C a 15 °C x  $\text{min}^{-1}$ , 1 min a 180 °C, 180–300 °C a 5 °C  $\text{min}^{-1}$  y 10 min a 300 °C. La temperatura del inyector fue de 280 °C. Se utilizó He como gas transportador a una velocidad de flujo de 0,8 mL x  $\text{min}^{-1}$ , y la relación de división (split ratio) fue 1:20 (para muestras más diluidas se aplicó un ratio de 1:5). Se calibró el índice de retención utilizando una mezcla de hidrocarburos C9–C36 Restek, cat no. 31614. Previo a la inyección, las muestras fueron disueltas en MeOH rigurosamente filtradas.

La proporción de cada compuesto presente en el extracto o fracción analizada, se expresó como porcentaje de la corriente total de iones (TIC) que llegan al detector del espectrómetro de masas. Dicha proporción, indica abundancia relativa de cada componente en la muestra, por tanto, es sólo una aproximación de la cantidad de los compuestos presentes identificados en el extracto analizado.

La identificación de los alcaloides, se realizó comparando sus patrones de fragmentación (generados por impacto electrónico) con aquellos almacenados previamente en la biblioteca de alcaloides del grupo de PNs del Dr. Jaume Bastida (Universidad de Barcelona) que cuenta con más de 600 alcaloides aislados de especies de Amarilidáceas. El análisis cualitativo se llevó a cabo a través del programa AMDIS versión 2.65. Complementariamente, se utilizó la base de datos NIST MS Search 2.0.

### **2.4.2. Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a masas (UHPLC-MS/MS)**

Se utilizó un espectrómetro de masas en tándem Xevo TQ-S (Waters Corp. Londres, Reino Unido) que sirvió como instrumento de detección se hizo funcionar en el modo de ionización negativa por electropulverización. Otras condiciones operativas fueron las siguientes: voltaje capilar: 0,8 kV, voltaje del cono: 25 V, temperatura de desolvatación 600 °C y temperatura de la fuente 150 °C. La energía de colisión se optimizó entre 10 y 30 eV para todos los análisis y se utilizó Ar como gas de colisión. La cromatografía líquida se realizó utilizando una columna UPLC C-18 (150 × 4,6 mm Acclaim, ID, 2,5 µm; Thermo Fisher Scientific, Bremen, Alemania) a 25 °C. Las longitudes de onda de detección fueron, 254, 280, 330 y 354 nm, y una matriz de fotodiodos. Los detectores se establecieron entre 200 y 800 nm. La administración de disolvente se realizó a 1 mL x min<sup>-1</sup> utilizando agua ultrapura suplementada con ácido fórmico al 1 % (A) y acetonitrilo con ácido fórmico al 1 % (B) y un programa que comenzaba con 5 % B a tiempo cero, luego se mantuvo al 5 % de B durante 5 min, luego se cambió a 30 % de B en 10 min, luego se mantuvo el 30 % de B durante 15 min, luego se pasó al 70 % de B durante 5 min, luego se mantuvo el 70 % de B durante 10 min, y finalmente retornando a B al 5 % en 10 min y manteniendo esta condición durante 12 min adicionales para lograr la estabilización de la columna antes de la siguiente inyección de 20 µL. Para el análisis, se disolvieron 5 mg del extracto en 2 mL de MeOH, se filtró a través de un Filtro de PTFE (politetrafluoroetileno) de 200 µm y se inyectaron 20 µL en el instrumento.

## **2.5. Actividad antiparasitaria**

### **2.5.1. Cultivos de *Trypanosoma cruzi***

#### **2.5.1.1. Epimastigotes**

Los epimastigotes usados de la cepa Dm28c (DTU: TcI), fueron cultivados en medio líquido de Diamond (0,1 M NaCl, 0,05 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,625 % triptosa, 0,625 % triptona y 0,625 % extracto de levadura, pH 7,2), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) inactivado (Gibco), 12,5 µg/mL de hemina y antibióticos 0,1 % (penicilina 75 U/mL y estreptomycin 75 µg/mL). La temperatura de incubación fue de 28 °C mantenida en estufa de cultivos (Spina *et al*, 2018).

### 2.5.1.2. Tripomastigotes y amastigotes

Pertencientes a la cepa Tulahuen (DTU: TcVI) que expresan  $\beta$ -galactosidasa, se mantuvieron, usando células LLC-MK2 como huéspedes, en DMEM suplementado con 2 % SFB y 1 % antibióticos (penicilina y estreptomicina).

### 2.5.2. Cultivos celulares

Los cultivos de células Vero (células epiteliales de riñón de mono verde), LLC-MK2 (células epiteliales de riñón de mono Reshus) y HepG2 (células epiteliales de hígado humano) se mantuvieron con DMEM suplementado con penicilina-estreptomicina al 1 % (100 U/mL de penicilina y 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina) y 10 % de SFB inactivado por calor a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y > 95 % de humedad (Martinez-Peinado *et al.*, 2020).

### 2.5.3. Actividad sobre la proliferación de epimastigotes

Los epimastigotes fueron incubados en medio Diamond en tubos de plástico estériles con distintas concentraciones de cada uno de los extractos y/o compuestos, a 28 °C. La concentración inicial de parásitos fue de  $3 \times 10^6$ /mL en un volumen final ajustado a 1 mL. En los experimentos los controles negativos fueron: parásitos sin tratamiento y con el diluyente de muestras dimetilsulfoxido (DMSO) y el control positivo se realizó con Bzn, la droga de referencia para tratar la EC. Se siguió el protocolo de Spina *et al.* (2018), se colectaron alícuotas cada 24 h y se suspendieron en *p*-formaldehído al 2 % en buffer fosfato salino (PBS) 1X (0,15 M NaCl, 0,02 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,017 M NaOH; pH 7,2). Luego se procedió al recuento del número de parásitos en cámara de Neubauer. Alícuotas del medio también fueron colectadas para estimar el porcentaje de parásitos móviles mediante la observación por microscopía óptica.

### 2.5.4. Evaluación de la viabilidad de epimastigotes

Se tomaron alícuotas de cada cultivo tratado, para cada tiempo de incubación, fueron colocadas en portaobjetos durante 3 minutos con eosina al 2 % en PBS (pH 7,2) y observadas en microscopio óptico. El porcentaje de células muertas (teñidas) fue determinado para cada tratamiento que se realizó por triplicado (Spina *et al.*, 2018).

### **2.5.5. Actividad sobre tripomastigotes y amastigotes**

Los extractos y compuestos se añadieron a una placa de cultivo celular de 96 pocillos a una concentración inicial de 1050 µg/mL y 125 µM, respectivamente. Se diluyeron 1:2 siguiendo un patrón de dosis-respuesta. Las células Vero y los tripomastigotes purificados se diluyeron a una concentración de  $1 \times 10^6$ /mL y se mezclaron en una relación v:v de 1:1. Luego, se agregaron 100 µL de la solución por pocillo (50.000 células Vero y tripomastigotes) (multiplicidad de infección = 1) (Martinez-Peinado *et al.*, 2020). Se incluyó Bzn como control positivo y como control negativo, los parásitos sin tratar. Las placas se incubaron durante 4 días a 37 °C, la lectura del ensayo se realizó añadiendo 50 µL por pocillo de una solución de PBS que contenía 0,25 % de NP40 y 500 µM de sustrato de clorofenol rojo-β-D-galactósido (CPRG), incubado durante 4 h a 37 °C y registrando la absorbancia a 590 nm (Martinez-Peinado *et al.*, 2020).

### **2.5.6. Actividad específica sobre amastigotes**

Se sembraron  $5 \times 10^6$  células Vero en un tubo T-175 y se cultivaron durante 24 h. Luego, las células se infectaron con  $1 \times 10^7$  tripomastigotes (multiplicidad de infección ~ 1) y el inóculo se dejó durante 18 h. Después de eso, las monocapas de células infectadas se lavaron con PBS, se separaron y se sembraron en placas de 96 pocillos, que ya contenían el extracto o el compuesto puro, a una densidad de 50.000 células/pocillo en 100 µL de medio. Se utilizó Bzn como control positivo y parásitos sin tratar como control negativo.

### **2.5.7. Estudios ultraestructurales**

Para determinar modificaciones en la ultraestructura de epimastigotes, tanto los parásitos tratados, como los no tratados, se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min y se enjuagaron con PBS al 1 % (x3). Posteriormente, los pellets con los parásitos se fijaron con glutaraldehído al 2 % en PBS durante 24 h a 4 °C. Posteriormente se incubaron con 1 % de OsO<sub>4</sub> durante 12 h y se lavaron. Se deshidrataron secuencialmente con alcohol (70 % 1 min (x2); 90 % 1 min (x2); 100 % 15 min (x3)) y

acetona (100 % 10 min (x3)), y se prefiltraron en una solución 1:1 de acetona-resina (2 h) (Spurr Low Viscosity Kit, Ted Pella). Después, los epimastigotes se centrifugaron y embebieron en resina pura por 24 h a 60 °C, para luego realizar los cortes ultrafinos con ultramicrotomo (Power Tone XL). Como contraste se usó acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras se observaron y analizaron con el microscopio electrónico de transmisión EM 900 Zeiss (Spina *et al.*, 2018).

### **2.5.8. Actividad mitocondrial de epimastigotes**

Los parásitos fueron tratados, como se mencionó en la sección 2.5.3, durante 24 y 48 h. Luego se tomaron alícuotas de 10 µL y fueron resuspendidas en *p*-formaldehído al 2 % en PBS para recuento de los parásitos. El medio de cultivo restante fue centrifugado a 3000 rpm durante 10 min. El pellet fue resuspendido en 100 µL de medio Diamond y 10 µL de MTT (5 mg/mL, Sigma-Aldrich) con fenazina metasulfato (0,22 mg/mL) en PBS durante 4 h a 28 °C en oscuridad. Posteriormente fueron centrifugados y el medio fue removido. Los cristales de formazán fueron disueltos con 100 µL de DMSO y la absorbancia fue medida a 570 nm en lector de microplacas Multiskan FC® Microplate Photometer (Thermo Scientific). La absorbancia relativa se usó como indicador de la actividad mitocondrial, por acción de la enzima succinato deshidrogenasa que reduce el MTT a formazán (Ormeño *et al.*, 2016).

### **2.6. Citotoxicidad en células Vero y HepG2**

Se sembraron células Vero y HepG2 a una densidad de 50.000 o 32.000 células/pocillo, respectivamente, en 100 µL de medio en placas de 96 pocillos pretratadas con el extracto o compuesto. Las placas se incubaron durante 4 días (células Vero) o 2 días (células HepG2) a 37 °C. A continuación, se añadieron 50 µL de una solución de PBS que contenía reactivo AlamarBlue al 10 % y las placas se incubaron durante 6 h a 37 °C antes de leer la intensidad de fluorescencia (excitación: 530 nm, emisión: 590 nm) (Martinez-Peinado *et al.*, 2020).

### **2.7. Interacción entre compuestos para determinar sinergismo**

### 2.7.1. Tratamiento de *T. cruzi* para la evaluación de la interacción de compuestos

Inicialmente se determinó el valor de la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) a las 48 horas para cada droga en *T. cruzi* y células de mamíferos. Los estudios de interacción se realizaron incubando *T. cruzi* con las siguientes combinaciones (Droga A + Droga B): montanina + EEA-*H. híbrido*, montanina + candimina, montanina + Bzn, EEA-*H. híbrido* + Bzn y candimina + Bzn; y las células de mamífero solo con candimina + Bzn. Tanto las concentraciones de la droga A como de la droga B fueron variables y se evaluaron los efectos combinados de la proporción fija de los valores de  $CI_{50}$  para cada droga (figura 16).

		Droga A					
		concentración	0	0,25 x $CI_{50}$	0,5 x $CI_{50}$	$CI_{50}$	2 x $CI_{50}$
Droga B	0	Control	a	b	c	d	e
	0,25 x $CI_{50}$	A	A + a				
	0,5 x $CI_{50}$	B		B + b			
	$CI_{50}$	C			C + c		
	2 x $CI_{50}$	D				D + d	
	4 x $CI_{50}$	E					E + e

**Figura 16.** Representación del diseño de las experiencias de combinación. Los parásitos se trataron con la droga A y la droga B solos y combinados en una ración fija durante 48 h.

### 2.7.2. Análisis de las interacciones

Para cuantificar la interacción entre las drogas, se estimó el índice combinatorio (IC) y el índice de reducción de dosis (IRD), mediante la teoría unificada, presentada por Chou y Talalay (Chou, 2010) utilizando el software CompuSyn (ComboSyn, Inc., Nueva York, NY, EE.UU.). Se utilizó el modelo mutuamente excluyente, basado en el supuesto de que las drogas actúan a través de mecanismos completamente diferentes (Roell *et al.*, 2017). Los dos fármacos se combinaron en una proporción fija de dosis que corresponden a 0,25; 0,5; 1; 2 y 4 veces la de las  $CI_{50}$  individuales. El IC se representó

en el eje y en función de la fracción afectada (Fa) en el eje x para evaluar sinergia entre combinaciones de las drogas. La Fa es un valor entre 0 y 1, donde 0 significa que el fármaco no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad celular y 1 significa que la droga produjo un efecto total sobre la disminución de la viabilidad celular. El IC es una representación cuantitativa de las interacciones farmacológicas.  $IC < 1$  indica sinergismo,  $IC = 1$  indica interacción aditiva y  $IC > 1$  indica antagonismo. El IRD es una medida adimensional de cuánto se puede reducir la dosis de cada fármaco en una combinación sinérgica en una inhibición fraccional determinada en comparación con las dosis de cada fármaco solo. Donde,  $IRD > 1$  indica una reducción de dosis favorable,  $IRD < 1$  indica una reducción de dosis desfavorable y finalmente  $IRD = 1$  indica que no hay reducción de dosis (Chou, 2006).

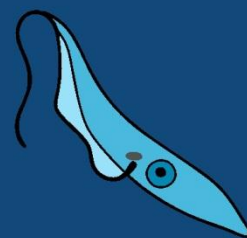
## 2.8. Análisis estadístico

Para determinar la significancia estadística de la diferencia entre los grupos tratados y el control, se usó la prueba t de Student. El efecto de cada tratamiento se analizó mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA). Los valores de absorbancia y fluorescencia se normalizaron a los controles según Peña *et al.* (2015). Los valores de  $CI_{50}$  y  $CC_{50}$  para un solo compuesto/extracto se determinaron con el software GraphPad Prism 7 (versión 7.00, 2016) utilizando un modelo de análisis de regresión no lineal (Martinez-Peinado *et al.*, 2020). Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado. Para cuantificar la interacción entre compuestos, el IC y el IRD, se estimaron mediante la teoría unificada, presentada por Chou y Talalay (Chou, 2010) utilizando el software CompuSyn (ComboSyn, Inc., Nueva York, NY, EE. UU.).





# Capítulo III Resultados

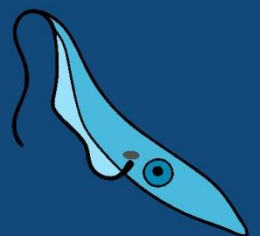




# Parte I

## Actividad anti-*T. cruzi*

### a. Extractos y compuestos sobre epimastigotes



### **3.1.1. Introducción**

La medicina tradicional ha empleado desde tiempos ancestrales diversas plantas para el tratamiento de distintas afecciones. Posteriores investigaciones han demostrado la bioactividad de muchas de sus moléculas, vinculadas a su uso en la medicina popular. De esta manera, el “screening” de extractos naturales se ha convertido en una importante herramienta en la búsqueda de nuevos agentes activos, con posibles usos terapéuticos.

En este contexto la EC, por su carácter de endémica y desatendida, demanda la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos que superen la eficacia de las drogas actualmente utilizadas para su tratamiento.

Sobre la base de estos conceptos y los antecedentes ya presentados se obtuvieron los siguientes resultados.

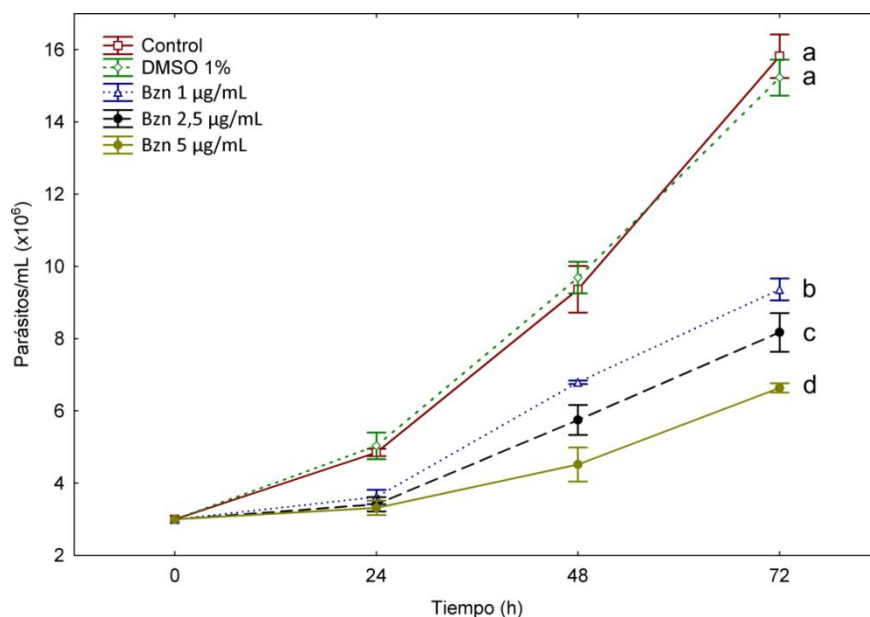
El protocolo de trabajo establecido, para la evaluación de la bioactividad de los extractos naturales se desarrolló según las siguientes etapas:

- 1- Evaluación de la acción *in vitro* de una concentración “máxima” de 100 µg/mL de extractos/compuestos sobre la proliferación de epimastigotes.
- 2- Estudio de los efectos antiproliferativos a menores concentraciones de los compuestos que resultaron activos a 10 µg/mL, para determinar su  $CI_{50}$ \*. Al mismo tiempo se realizó la evaluación de la viabilidad de epimastigotes mediante el método de exclusión de eosina.

(\*) Los resultados de extractos inactivos son presentados como tales, por lo que no se continuaron estudiando.

### **3.1.2. Efecto de Bzn y DMSO sobre la proliferación y viabilidad de epimastigotes, cepa Dm28c (DTU I)**

Para estandarizar las condiciones y la sensibilidad de la cepa Dm28c a la droga de referencia, primero se estudió la acción *in vitro* de Bzn sobre epimastigotes cultivados en medio Diamond. Alícuotas de los parásitos tratados con distintas concentraciones de Bzn (1; 2,5 y 5 µg/mL) fueron recolectadas cada 24 h, fijadas en *p*-formaldehído y contadas en cámara de Neubauer (descrito en sección 2.5.3). Todas las concentraciones de Bzn mostraron una disminución significativa en la proliferación de los epimastigotes de *T. cruzi*. La disminución fue dosis-dependiente (figura 17), con estos valores se determinó la  $CI_{50}$  de Bzn a las 48 y 72 h (tabla 2). Al mismo tiempo, la curva de tratamiento con DMSO (control de solvente) no mostró diferencias significativas respecto a la curva control (sin tratar), para todos los tiempos de incubación analizados ( $p > 0,05$ ). Los resultados que se presentan corresponden a tres ensayos por triplicado que se repitieron de manera independiente.



**Figura 17:** Efecto de Bzn sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*. Control de disolvente DMSO y un control de parásitos sin tratar. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

**Tabla 2.**  $CI_{50}$  de Bzn sobre epimastigotes de *T. cruzi*, a las 48 y 72 h.

Tiempo (h)	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
48	$4,58 \pm 0,37$
72	$2,57 \pm 0,21$

En relación a la viabilidad determinada por medio del método de exclusión de eosina, el 100% de los epimastigotes resultaron viables para todas las concentraciones de Bzn evaluadas.

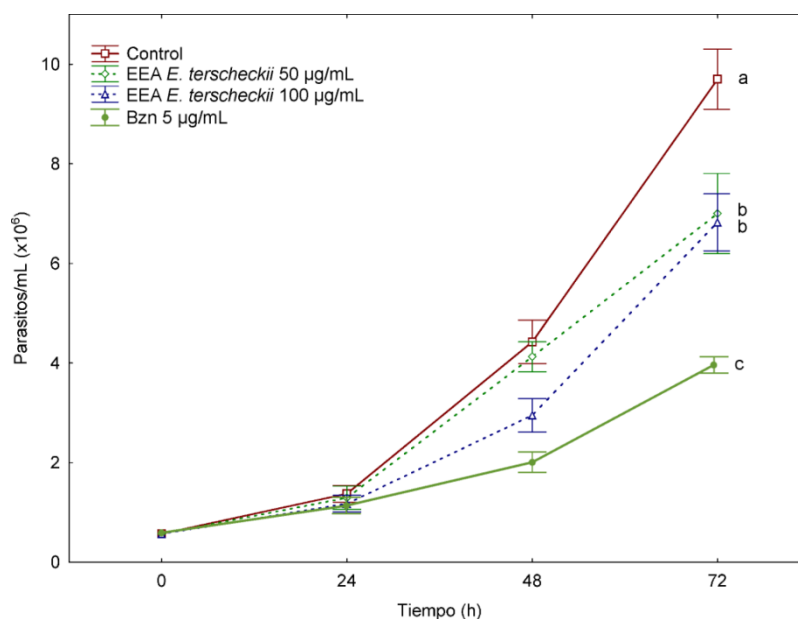
### 3.1.3. *Echinopsis terscheckii*

#### 3.1.3.1. Efecto del extracto de alcaloides sobre proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*

Para evaluar el efecto del EEA-*E. terscheckii*, se probaron dos concentraciones (50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ ) siguiendo la metodología propuesta en el apartado 2.5.3. Ambas concentraciones no mostraron diferencias significativas respecto al control negativo ( $p > 0,05$ ) para las 24 y 48 h. A las 72 h se observó una disminución significativa en el número de parásitos respecto al control (figura 18).

Si bien el EEA mostró disminución de la proliferación de los epimastigotes a las 72 h, comparado con la droga de referencia (Bzn = 5  $\mu\text{g/mL}$ ), las concentraciones fueron muy

elevadas para lograr la efectividad mencionada, por lo que se decidió no continuar con el fraccionamiento del extracto.



**Figura 18.** Efecto del EEA-*E. terscheckii* sobre epimastigotes de *T. cruzi* a concentraciones de 50 µg/mL y 100 µg/mL. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

### 3.1.4. Especies del género *Hippeastrum*

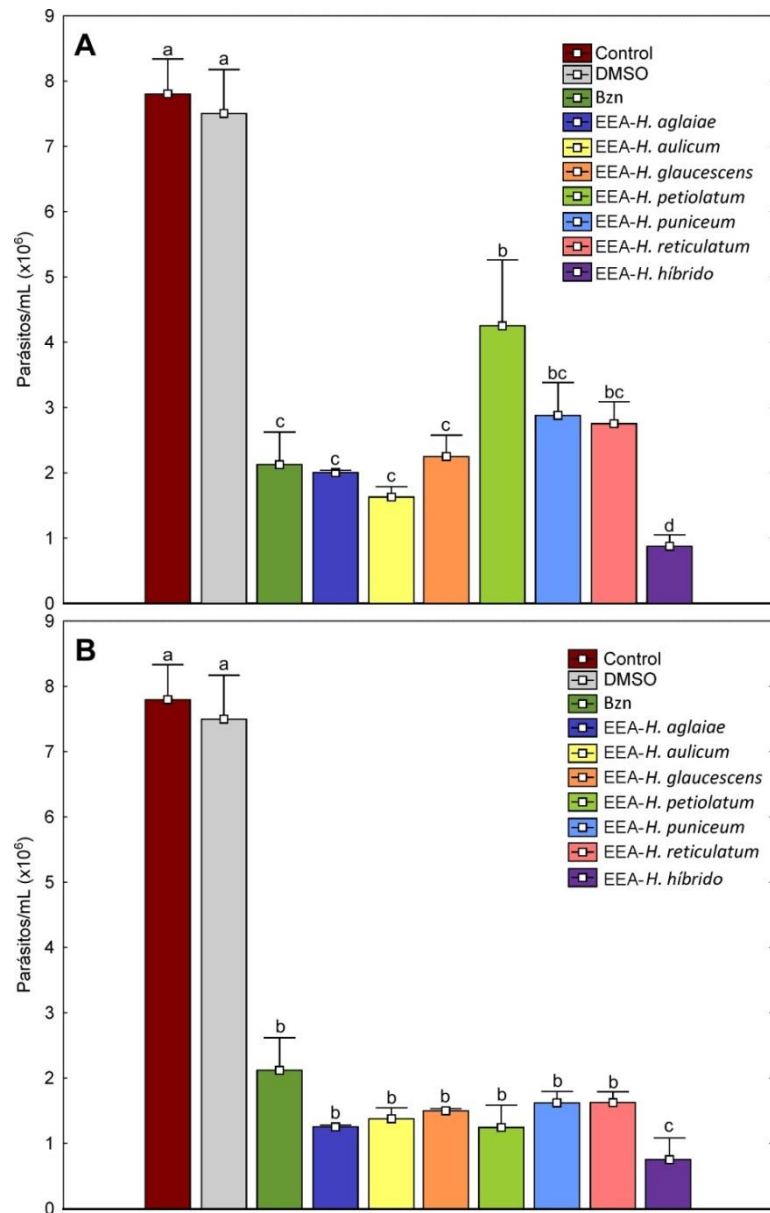
En esta sección se presentan los resultados obtenidos a partir de los EEA de las especies del género *Hippeastrum* frente a epimastigotes de *T. cruzi*.

#### 3.1.4.1. Efecto de extractos enriquecidos en alcaloides del género *Hippeastrum*, sobre proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*

Para evaluar la actividad de los EEA de las especies *H. aglaiae*, *H. aulicum*, *H. glaucescens*, *H. híbrido*, *H. petiolatum*, *H. puniceum* e *H. reticulatum*, inicialmente para el *screening* se ensayaron dos concentraciones, 10 y 50 µg/mL, frente a epimastigotes de *T. cruzi* (sección 2.5.3).

En la figura 19 se presentan los resultados a las 48 h de incubación. El tratamiento con 10 µg/mL (figura 19A) de todos los EEA mostró una disminución significativa en la proliferación de los parásitos, respecto al control negativo. El EEA que resultó más efectivo comparado con el control positivo (Bzn) fue el obtenido de los bulbos de *H. híbrido*. En cuanto a los tratamientos con 50 µg/mL de los EEA (figura 19B), todos fueron efectivos con diferencias significativas con control negativo, mientras que solo el

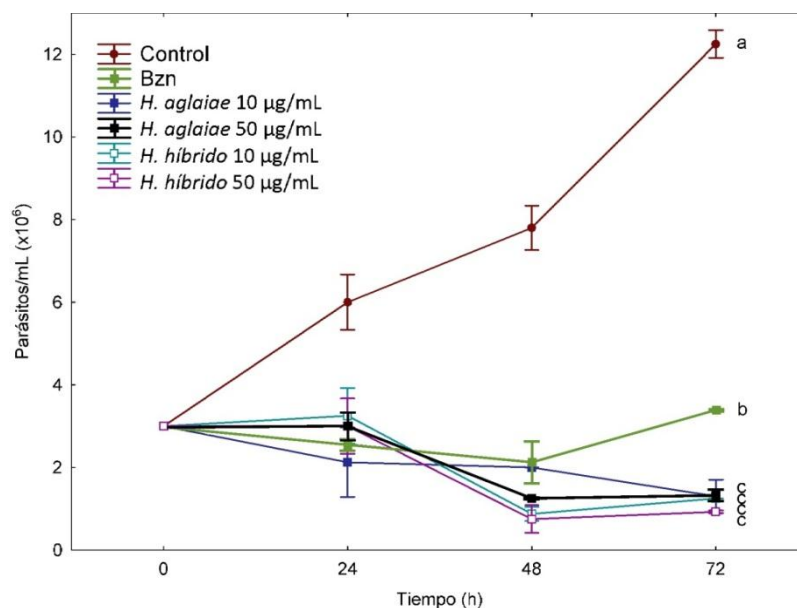
EEA-*H. híbrido* mostró diferencias significativas respecto a Bzn y a los EEA del resto de las especies de *Hippeastrum* ( $p < 0,05$ ).



**Figura 19.** Efecto de los EEA de especies del género *Hippeastrum* sobre epimastigotes de *T. cruzi* a las 48 horas a concentraciones de 10  $\mu\text{g/mL}$  (A) y 50  $\mu\text{g/mL}$  (B). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Todos los extractos de las especies de *Hippeastrum* tuvieron efecto sobre la proliferación de epimastigotes que continuó hasta las 72 h del ensayo. En la figura 20, se presentan las curvas de proliferación para los EEA-*H. aglaiae* y EEA-*H. híbrido* que fueron significativamente los más activos para ambas concentraciones evaluadas respecto al control de referencia (Bzn).





**Figura 20.** Efecto de EEA-*H. aglaiae* y EEA-*H. híbrido* sobre epimastigotes de *T. cruzi* a concentraciones de 10 µg/mL y 50 µg/mL. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.4.2. Efecto de extractos enriquecidos en alcaloides obtenidos del género *Hippeastrum*, sobre viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi*

Tal como se describió en la sección 2.5.4, se evaluó la viabilidad de epimastigotes (cepa Dm28c) tras el tratamiento con los EEA (50 µg/mL – 48 h). En la tabla 3 se presentan los resultados obtenidos. Los valores se expresan como el porcentaje de células viables. Tanto el control negativo como el positivo presentaron una viabilidad del 100 %. Es decir que Bzn, si bien produce inhibición en la proliferación de epimastigotes, no afecta su viabilidad. En cuanto a los EEA de *Hippeastrum*, todos producen disminución en la viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi*, destacándose los EEA-*H. glaucescens* y EEA-*H. puniceum* (72,88 y 80,43 %, respectivamente). De acuerdo a estos resultados, la disminución del número de epimastigotes en la curva de proliferación, no siempre está relacionada con el efecto tripanocida.

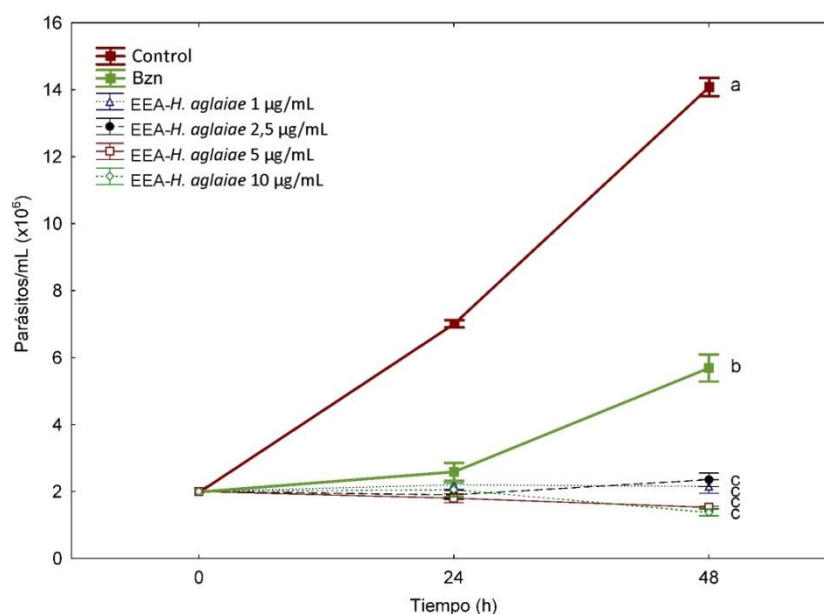
**Tabla 3.** Efecto sobre la viabilidad de los EEA del género *Hippeastrum* sobre epimastigotes de *T. cruzi*. Bzn = 5 µg/ml.

Tratamiento	Viabilidad (%)
Control	100
Bzn 5 µg/mL	100
EEA- <i>H. aglaiae</i>	84,76 ± 1,66
EEA- <i>H. aulicum</i>	83,48 ± 1,06
EEA- <i>H. glaucescens</i>	72,88 ± 1,50
EEA- <i>H. híbrido</i>	83,12 ± 1,52
EEA- <i>H. petiolatum</i>	86,12 ± 0,58
EEA- <i>H. puniceum</i>	80,43 ± 2,44
EEA- <i>H. reticulatum</i>	82,65 ± 0,90

### 3.1.4.3. *Hippeastrum aglaiae* e *H. híbrido*

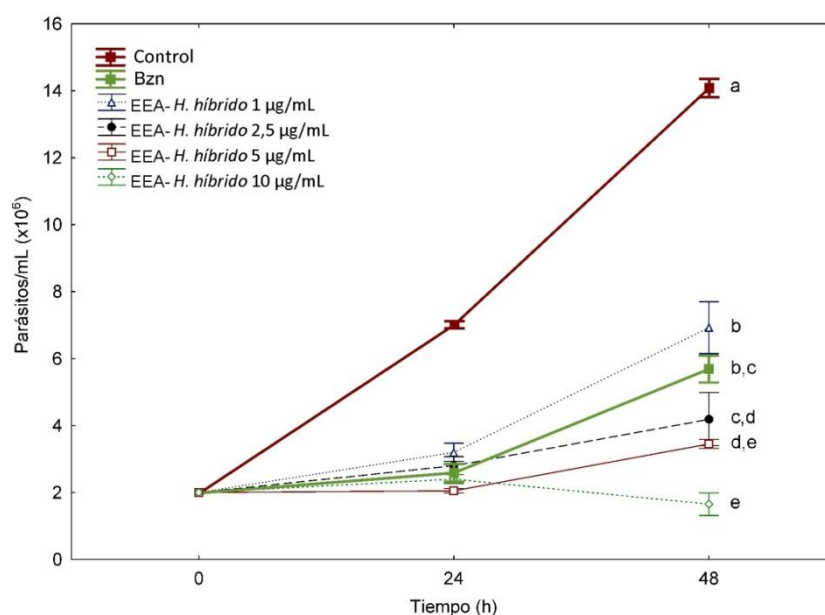
Los EEA obtenidos de *H. aglaiae* e *H. híbrido* inhibieron significativamente la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* a 10 µg/mL. Para calcular la  $CI_{50}$  se procedió a evaluar el EEA-*H. aglaiae* y EEA-*H. híbrido* a 1; 2,5; 5 y 10 µg/mL.

El EEA-*H. aglaiae* presentó a las 48 h una inhibición del 100% sobre la proliferación de *T. cruzi* para las cuatro concentraciones ensayadas (figura 21). No se observó una marcada relación dosis-dependiente.



**Figura 21.** Efecto del EEA-*H. aglaiae* sobre epimastigotes de *T. cruzi* a concentraciones de 1; 2,5; 5 y 10 µg/mL. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Por otra parte, en el análisis de los resultados del EEA-*H. híbrido* (figura 22), todas las concentraciones mostraron diferencias significativas comparadas con el control sin tratar; tanto a las 24 como a las 48 horas. La concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fue la más efectiva, mientras que a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  el efecto fue menor. Además, la proliferación de los epimastigotes fue más sensible al tratamiento con el EEA-*H. híbrido* a 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  que a Bzn.

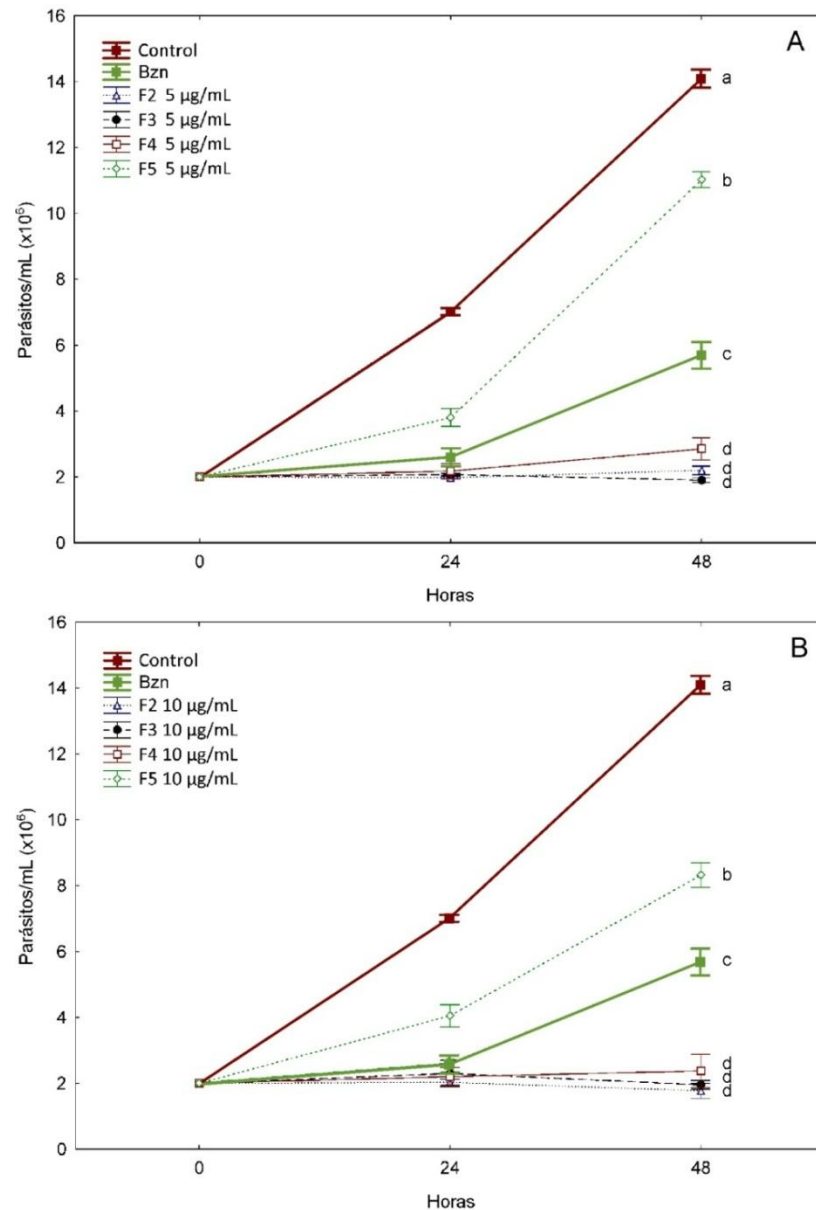


**Figura 22.** Efecto del EEA de *H. híbrido* sobre epimastigotes de *T. cruzi* a concentraciones de 1; 2,5; 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

A partir de los datos reportados con las concentraciones diferentes, se calculó la  $CI_{50}$  para los EEA de *H. aglaiae* e *H. híbrido*. De este modo, el valor obtenido fue de 0,0026 y 0,96  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente

### 3.1.4.3.1. Evaluación de fracciones del EEA de *H. híbrido*

Sobre la base de los resultados obtenidos con el EEA-*H. híbrido* y el concepto de aislamiento bioguiado, se prosigió con la evaluación de las seis fracciones obtenidas (sección 2.2.5), frente a epimastigotes de *T. cruzi* a 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (figura 23A y 23B).



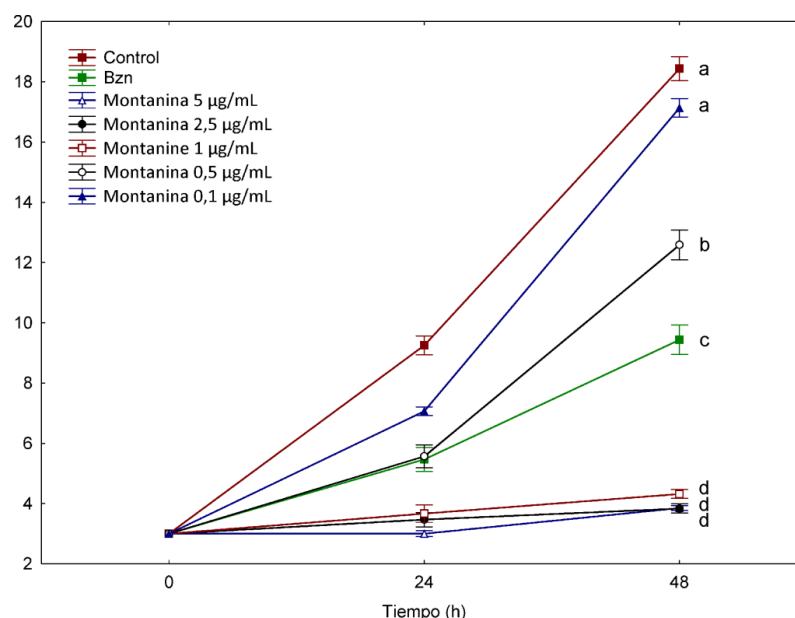
**Figura 23.** Efecto de las fracciones del EEA de *H. híbrido* sobre epimastigotes de *T. cruzi* a la concentración de 5 µg/mL (A) y 10 µg/mL (B). Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Para ambas concentraciones ensayadas (5 y 10 µg/mL), se observó una disminución notable respecto al control sin tratar para las fracciones F2, F3, F4 y F5 (F1 y F6 no presentaron diferencias; datos no mostrados). La fracción F3 fue la más activa a valores de concentración de 5 µg/mL y F2 a 10 µg/mL. Mientras que la fracción F5 fue la que menor inhibición de epimastigotes mostró para ambas concentraciones testeadas. En la cuantificación de montanina por UHPLC-MS, las fracciones F2, F3, F4 y F5 revelaron un contenido del 13,82 %, 24,76 %, 10,20 % y < 1 %, respectivamente. Estos resultados se detallan en la sección 3.4.1.3.

### 3.1.4.4. Efecto de montanina sobre proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*

El efecto antiproliferativo de las fracciones de *H. híbrido* sobre los epimastigotes de *T. cruzi* mostró relación directa con el contenido de montanina.

En esta instancia, para corroborar la acción de montanina sobre la proliferación de *T. cruzi*, se ensayó el efecto de diferentes concentraciones del alcaloide montanina (0,1, 0,5, 1,0, 2,5 y 5,0  $\mu\text{g/mL}$ ). En la figura 24 se presentan los resultados obtenidos. Se evidenció que el alcaloide montanina, muestra una potente actividad, y que el efecto fue dosis-dependiente. Todas las concentraciones de montanina (excepto 0,1  $\mu\text{g/mL}$ ) fueron más activas que Bzn (5  $\mu\text{g/mL}$ ). El valor de la  $\text{CI}_{50}$  para el alcaloide fue de 0,55  $\mu\text{g/mL}$ , diez veces más activo que Bzn.

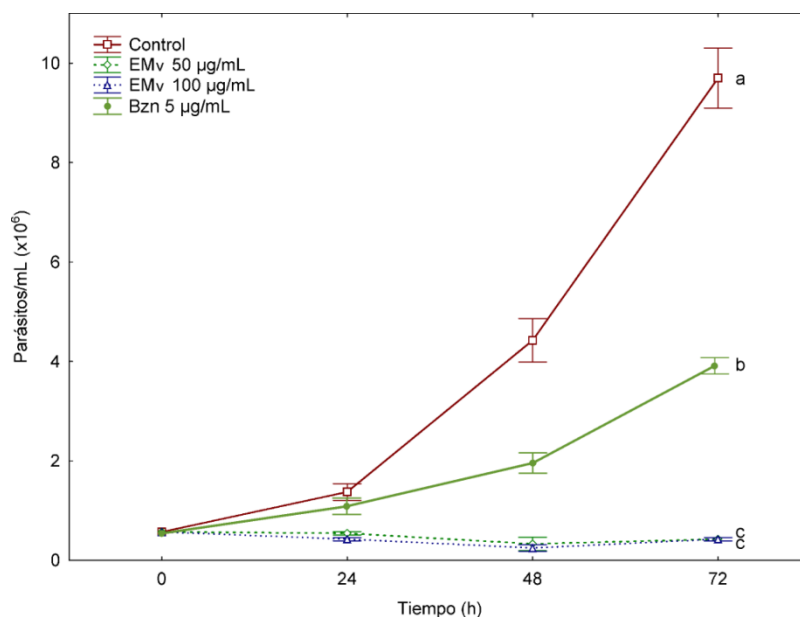


**Figura 24.** Efecto de montanina sobre proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.5. *Maytenus viscifolia*

#### 3.1.5.1. Efecto del extracto de *M. viscifolia* y pristimerina sobre proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*.

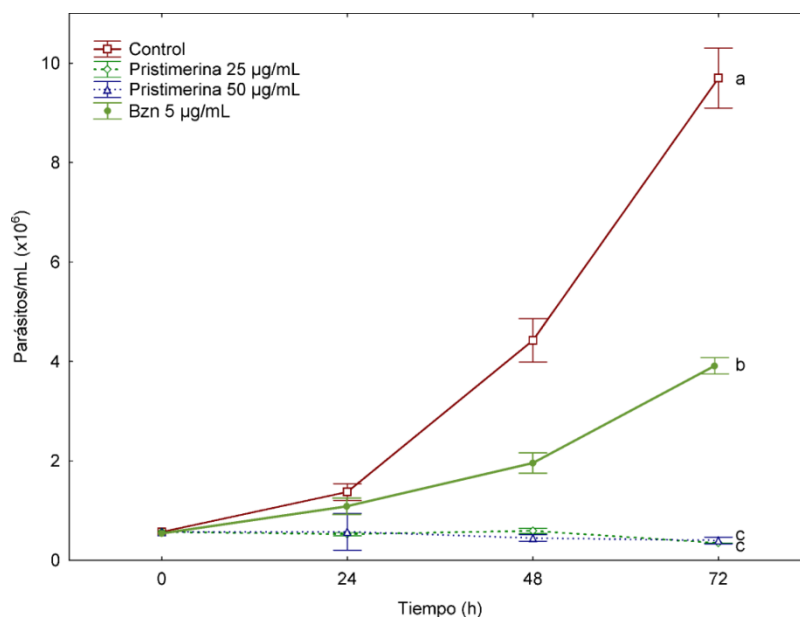
El extracto de la especie *Maytenus viscifolia* (EMv) fue evaluado sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* a dos concentraciones (50 y 100  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 72 h de incubación (figura 25).



**Figura 25.** Efecto del extracto de *Maytenus viscifolia* sobre epimastigotes de *T. cruzi* a 50 y 100 µg/mL. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

El análisis de los resultados indicó que el EMv inhibió el 100 % la proliferación de epimastigotes en todos los tiempos de incubación y para ambas concentraciones. Sobre la base del estudio químico del EMv, se aisló e identificó la quinona triterpénica pristimerina para la evaluación de su actividad.

En la figura 26, se presentan los resultados obtenidos con pristimerina a las concentraciones de 25 y 50 µg/mL. Se evidenció que pristimerina, redujo la proliferación de los epimastigotes en un 100 % a ambas concentraciones desde el primer recuento (24 h) y se mantuvo, e incluso disminuyó a las 72 h de ensayo, al igual que el EMv.



**Figura 26.** Efecto de pristinerina sobre epimastigotes de *T. cruzi* a concentraciones de 25 µg/mL y 50 µg/mL. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.5.2. Efecto del extracto de *M. viscifolia* y pristinerina sobre viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi*.

En la tabla 4, se presentan los resultados del efecto del EMv y pristinerina sobre la viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi* a las 48 h de cultivo. La viabilidad para los controles (negativo y positivo) fue del 100 %, mientras que la viabilidad por acción de EMv y pristinerina, no fue afectada, obteniendo valores cercanos al 100 %. En el caso de pristinerina se mantuvo en un 100 % a la menor dosis (25 µg/mL), mientras que cuando se duplicó la dosis (50 µg/mL), se mantuvo en un  $98,52 \pm 0,36$  %. Similar comportamiento se observó para la menor dosis de EMv (100 % de viabilidad), y cuando se duplicó fue de  $97,66 \pm 0,65$  %.

**Tabla 4.** Viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi* tratados durante 48 h con EMv y pristinerina.

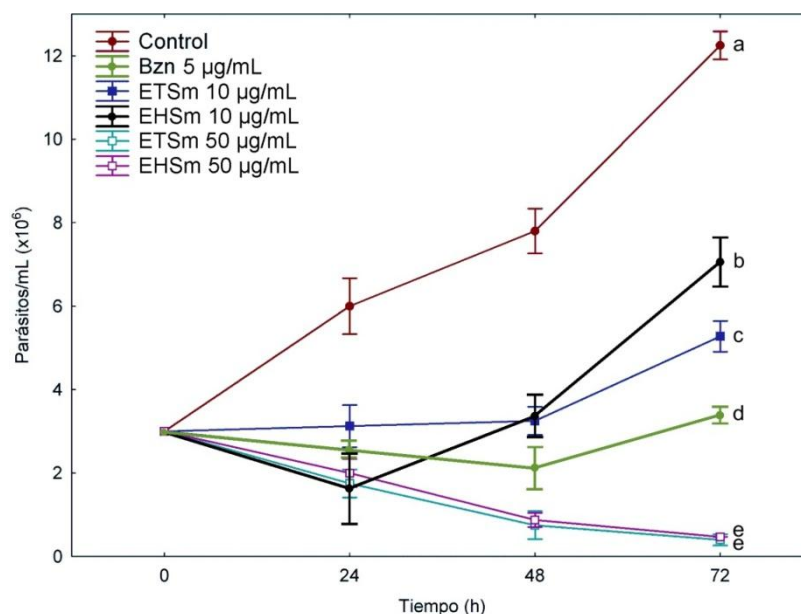
Tratamiento	Viabilidad (%)
Control	100
Bzn 5 µg/mL	100
EMV 50 µg/mL	100
EMV 100 µg/mL	$97,66 \pm 0,65$
Pristimerina 25 µg/mL	100
Pristimerina 50 µg/mL	$98,52 \pm 0,36$



### 3.1.6. *Seriphidium mendozanum*

#### 3.1.6.1. Efecto de extractos de hojas y tallos de *Seriphidium mendozanum* sobre proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*

Para evaluar el efecto de *S. mendozanum*, se trabajó con los EHSm y ETSm que fueron obtenidos como se menciona en la sección 2.2.3. Los extractos se ensayaron a concentraciones de 10 y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En la figura 27, se observa cómo ambos extractos producen una disminución significativa de la proliferación de *T. cruzi* a una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , comparado con control positivo (Bzn a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Mientras que a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sólo se observaron diferencias significativas respecto al control negativo.



**Figura 27.** Efecto de EEP de *S. mendozanum* sobre epimastigotes de *T. cruzi* a concentraciones de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

#### 3.1.6.2. Efecto de extractos de hojas y tallos de *Seriphidium mendozanum* sobre viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi*

La viabilidad de epimastigotes (cepa Dm28c) se evaluó durante 48 h con los EHSm y ETSm a una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En la tabla 5, se presentan los resultados obtenidos como el porcentaje de células viables. Ambos extractos presentaron una potente actividad tripanocida. Tanto para EHSm y ETSm la viabilidad fue menor al 1 %.

**Tabla 5.** Viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi* tratados durante 48 h con EEP de *S. mendozanum*.

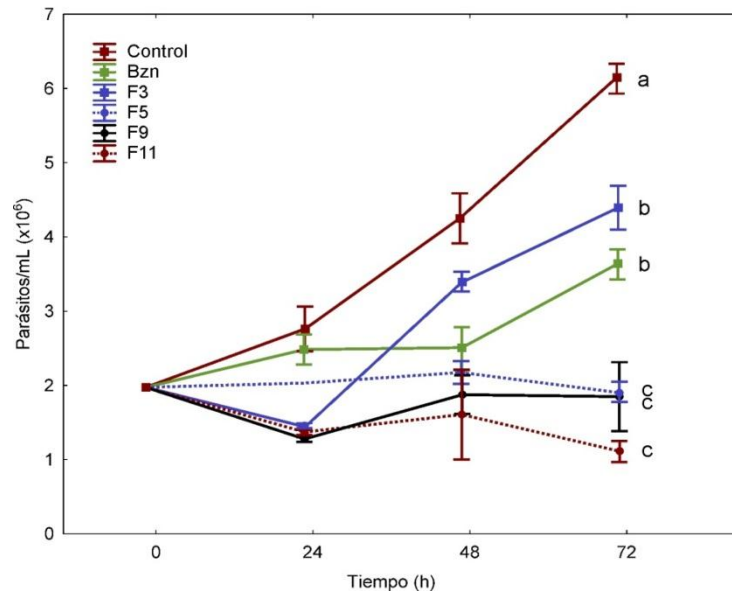
Tratamiento	Viabilidad (%)
Control	100
Bzn 5 µg/mL	100
ETSm	0,93 ± 0,03
EHSm	0,82 ± 0,4

### 3.1.6.3. Evaluación de fracciones de los extractos de *S. mendozanum* frente a epimastigotes de *T. cruzi*

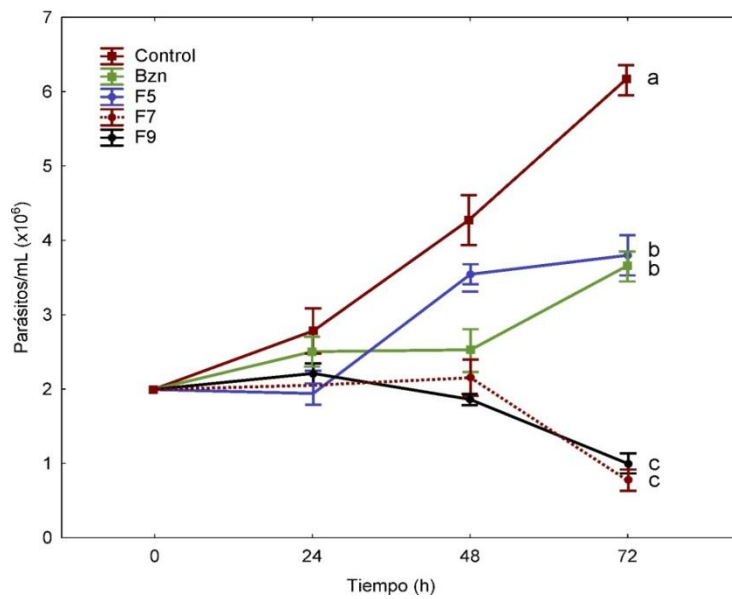
Una vez estudiada la actividad de los EHSm y ETSm, se fraccionaron ambos extractos (Sección 2.2.3.1). En este ensayo se evaluaron, a una concentración de 50 µg/mL, las fracciones F1, F3, F5, F7, F9 y F11 obtenidas del EHSm (figura 28) y las fracciones F2, F3, F5, F7 y F9 obtenidas del ETSm (figura 29).

Respecto al EHSm, las fracciones F5, F9 y F11 inhibieron la proliferación de los epimastigotes durante las 72 horas, incluso la fracción F11 produjo una disminución significativa en el número de parásitos en relación a la cantidad inicial, mientras que las fracciones F1, F3 y F7 fueron menos activas que Bzn.

Por otra parte, las fracciones del ETSm más activas fueron F7 y F9, con diferencias significativas respecto a Bzn, incluso mostraron a las 72 h una cantidad menor de parásitos respecto al número inicial.



**Figura 28.** Efecto de fracciones obtenidas del EHSm sobre epimastigotes de *T. cruzi* a 50 µg/mL. Bzn 5 µg/mL. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

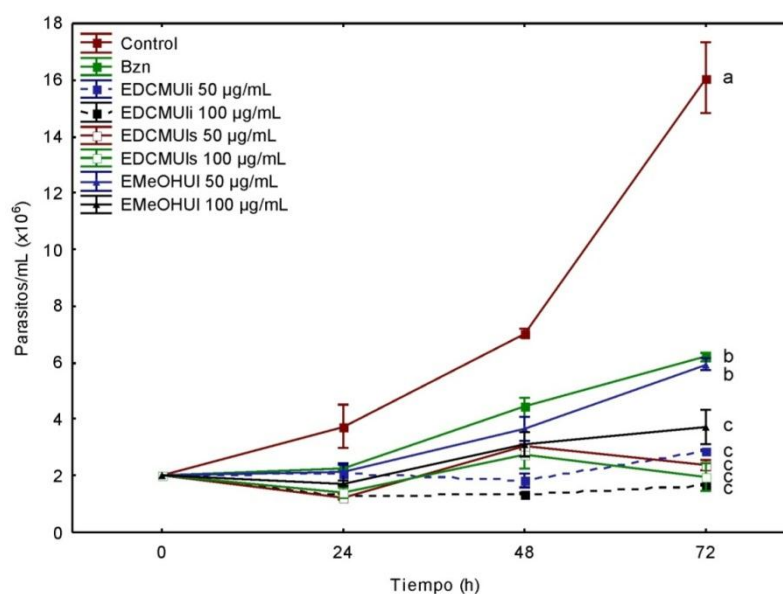


**Figura 29.** Efecto de fracciones obtenidas del ETSm sobre epimastigotes de *T. cruzi* a 50 µg/mL. Bzn 5 µg/mL. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.7. *Usnea lethariiformis*

#### 3.1.7.1 Efecto de extractos de *U. lethariiformis* sobre proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*

Para determinar el efecto de *Usnea lethariiformis*, se ensayaron los extractos seriados a partir de DCM y MeOH (ver sección 2.2.4) a dos concentraciones (50 y 100 µg/mL). En la figura 30 se observa cómo todos los tratamientos presentan diferencia significativa respecto al control negativo ( $p < 0,05$ ), siendo los EDCMUI los que afectan en mayor medida la proliferación de *T. cruzi*, con una inhibición mayor que Bzn.

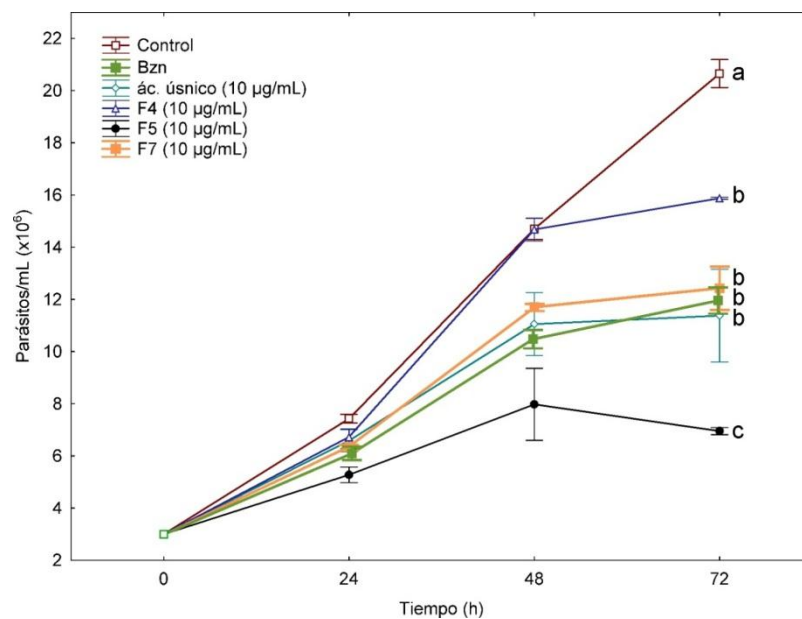


**Figura 30.** Efecto de *Usnea lethariiformis* sobre epimastigotes de *T. cruzi* a concentraciones de 50 µg/mL y 100 µg/mL. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

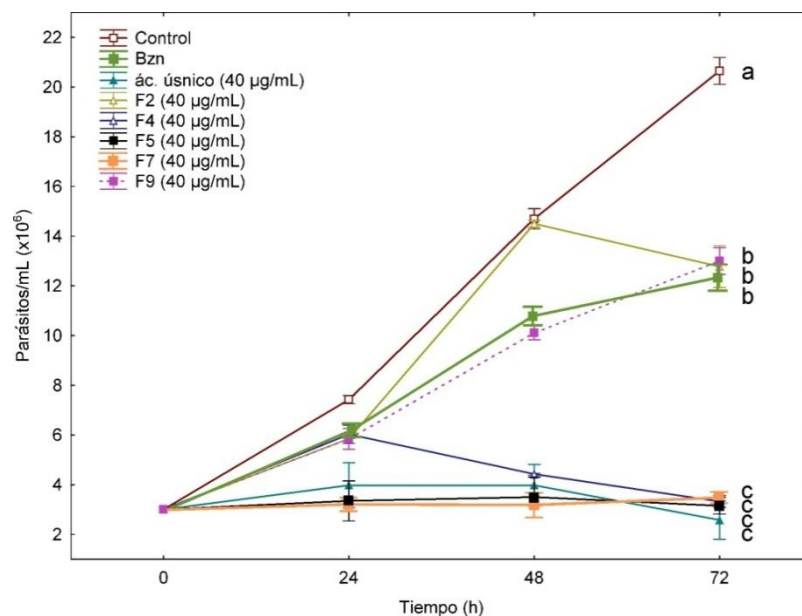
#### 3.1.7.2. Evaluación de fracciones de *U. lethariiformis* y ácido úsnico

Debido a la potente actividad frente a *T. cruzi* que presentó el EDCMUIs, se prosiguió a la evaluación de sus fracciones (ver sección 2.2.4) y de ácido úsnico, compuesto mayoritario presente en extractos y fracciones (ver sección 3.4.2). Se seleccionaron las fracciones F2, F4, F5, F7 y F9 y se ensayaron frente a epimastigotes de *T. cruzi* a concentraciones de 10 y 40 µg/mL. El efecto fue dosis-dependiente, las fracciones ensayadas a 40 µg/mL mostraron mayor efecto que las fracciones de 10 µg/mL (figura 31-32). Las fracciones F2 y F9 fueron inactivas a 10 µg/mL (datos no mostrados), mientras que a 40 µg/mL solo presentaron diferencias con el control negativo. Por otra

parte, la fracción F5 fue la más activa y la única que mostró una inhibición significativa, con respecto a Bzn, en sus dos concentraciones, presentando un efecto cercano al 100 % de inhibición a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Por último, la fracción F7 y el ácido úsnico, mostraron un patrón de inhibición similar. A la concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  no presentaron diferencias con Bzn, mientras que a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mostraron un efecto estadísticamente sin diferencias respecto a la fracción F5.



**Figura 31.** Efecto de fracciones de *Usnea lethariiformis* y ácido úsnico sobre epimastigotes de *T. cruzi* a concentraciones de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 32.** Efecto de fracciones de *Usnea lethariiformis* y ácido úsnico sobre epimastigotes de *T. cruzi* a concentraciones de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.8. Conclusiones

A partir del análisis de los resultados obtenidos en esta parte del trabajo, se puede afirmar lo siguiente:

- Los extractos y compuestos aislados de plantas y líquenes nativos fueron activos contra epimastigotes de *T. cruzi*.
- El EEA-*E. terscheckii* presentó moderada diferencia con el control negativo a elevadas concentraciones.
- Los EEA de todas las especies de *Hippeastrum* mostraron potente actividad inhibitoria frente a epimastigotes de *T. cruzi*. y moderada actividad sobre la viabilidad.
- El efecto del EEA-*H. aglaiae* y del EEA-*H. híbrido* fue incluso más activo que Bzn.
- Las fracciones del EEA-*H. híbrido* que contenían el alcaloide montanina fueron las más activas.
- El alcaloide montanina reportó inhibición sobre la proliferación de epimastigotes con una  $CI_{50} = 0,55 \mu\text{g/mL}$ , siendo mas activa que Bzn.
- El EMv y el compuesto pristimerina inhibieron el 100 % de la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*, pero sin efectos sobre la viabilidad celular.
- Los extractos apolares de *S. mendozanum*, como así también sus fracciones, registraron potente actividad tripanocida, siendo la única especie que afectó cerca del 100 % la viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi*. No se pudo continuar con el estudio de esta especie porque no se pudo acceder al material vegetal, ya que se declaró el estado de pandemia.
- Los extractos polares de *U. lethariiformis* inhibieron la proliferación de epimastigotes a concentraciones de 10 y 50  $\mu\text{g/mL}$ .

- Las fracciones F5 y F7 del EDCMUIs inhibieron la proliferación de epimastigotes con valores cercanos al 100 %.
- El ácido úsnico presentó valores similares a las fracciones activas de *U. lethariiformis*.

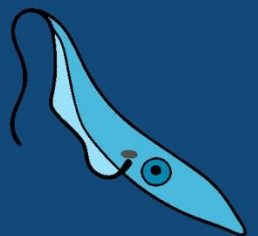




# Parte I

## Actividad anti-*T. cruzi*

### b. *Hippeastrum escoipense* y el alcaloide Candimina



### 3.2.1. Introducción

Recientemente, la pandemia de COVID-19 reforzó lo esencial que es tener moléculas disponibles para curar o, al menos, mitigar enfermedades (Chinsembu, 2020; Komolafe *et al.*, 2021). En este contexto, el descubrimiento y aislamiento de nuevos compuestos adicionales, vinculados a sus actividades biológicas, es una contribución notable a la salud humana. Entre las moléculas sintetizadas por las plantas, los alcaloides han proporcionado importantes beneficios biológicos (Cordell *et al.*, 2001).

Amaryllidoideae, una subfamilia de Amaryllidaceae, es uno de los 20 taxones de plantas que contienen los alcaloides más relevantes. Comprende más de 800 especies bulbosas perennes clasificadas en 59 géneros (Berkov *et al.*, 2020). Estas plantas sintetizan una clase consistente de alcaloides similares a la isoquinolina, conocidos como alcaloides de Amaryllidaceae, que han mostrado notables actividades farmacológicas como antiparasitario, antiproliferativo, antifúngico, citotóxico, psicofarmacológico e inhibidor de acetilcolinesterasa, entre otros (Bastida *et al.*, 2006).

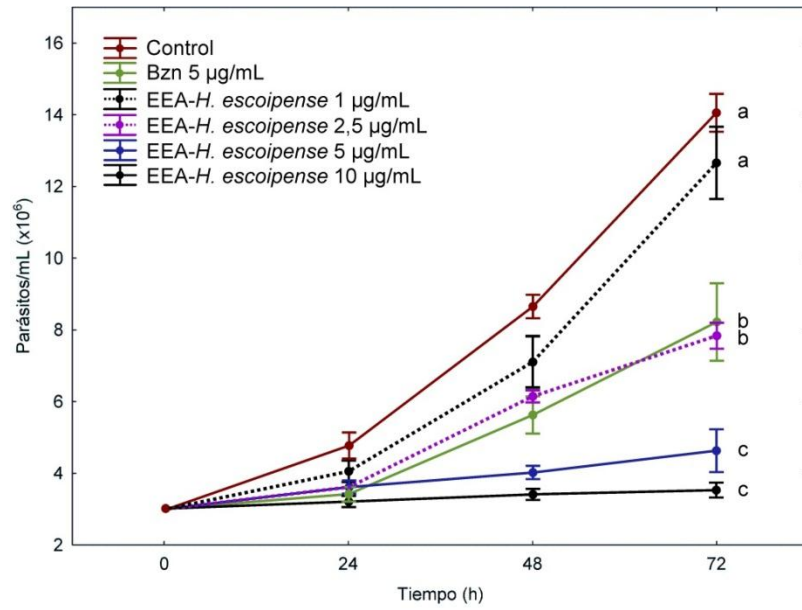
El género *Hippeastrum*, es endémico de América del Sur y se caracteriza por tener grandes bulbos, flores prominentes y coloridas. En Argentina, este género comprende diez especies ampliamente distribuidas y poco estudiadas que varían en hábitat desde áreas tropicales a subtropicales y desde el nivel del mar hasta altitudes elevadas (Zuloaga *et al.*, 2008, Slanis *et al.*, 2022, en prensa). En el noreste de Argentina, algunas especies del género son utilizadas en medicina tradicional por la comunidad indígena Toba (Ortiz *et al.*, 2016). Dieciséis alcaloides se caracterizaron por primera vez a partir de extractos de *Hippeastrum* entre 2012 y 2021, pero solo una parte de ellos se evaluó biológicamente (Tallini *et al.*, 2021). Hasta el momento, escasos alcaloides aislados exclusivamente del género *Hippeastrum* han sido ensayados frente a *T. cruzi*. Por otra parte, candimina, que se aisló por primera vez en *H. candidum* (Döpke, 1962) y luego en *H. reticulatum*, se probó contra *Trichomonas vaginalis* y se reportó que inhibe las enzimas NTPDasa y ecto-5'-nucleotidasa en mayor medida que licorina (Giordani *et*

al., 2010b). Candimina también fue activa contra *T. vaginalis*, aparentemente induciendo muerte celular por paraptosis (Giordani *et al.*, 2010a).

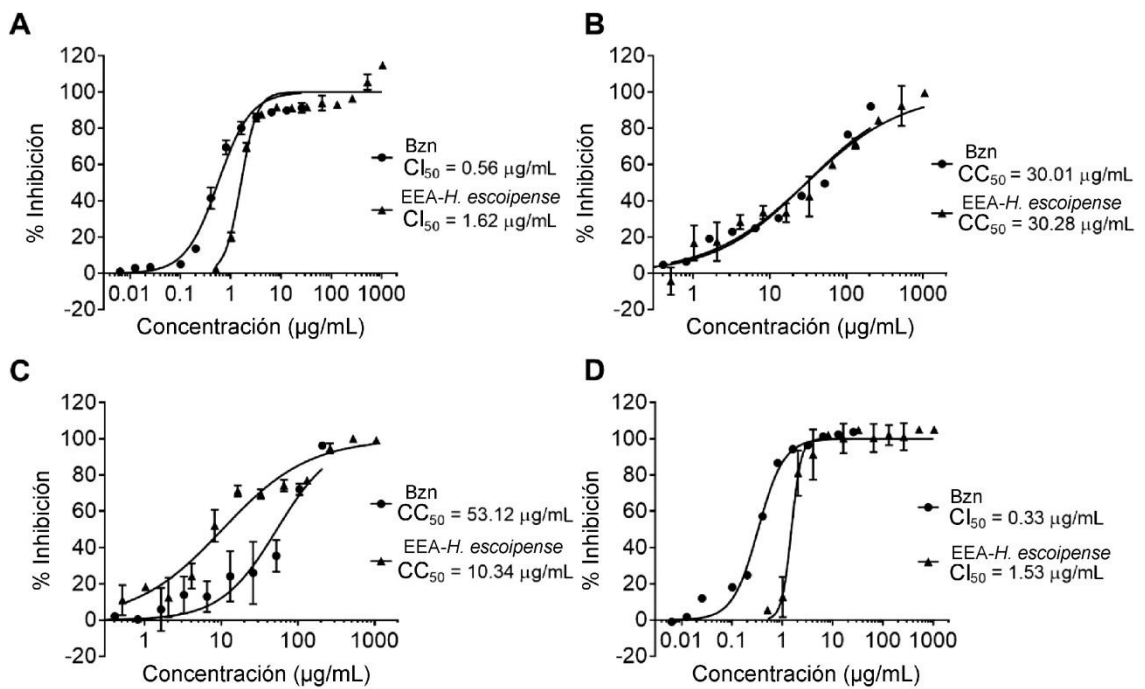
En este capítulo se evaluó la actividad anti-*T. cruzi* del EEA-*H. escoipense* y candimina. Se utilizaron parásitos de las cepas Dm28c (epimastigotes) y Tulahuen- $\beta$ -galactosidasa (tripomastigotes y amastigotes). Se trabajó con líneas celulares Vero como huésped y líneas celulares HepG2 (carcinoma de hepatocito humano) para determinar hepatotoxicidad.

### 3.2.2. Actividad del EEA-*H. escoipense*

Una vez obtenido el EEA-*H. escoipense* (ver sección 2.2.1) se evaluó su actividad frente a epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Dm28c) a concentraciones crecientes (1-10  $\mu\text{g/mL}$ ) (figura 33). Tanto la concentración de 5  $\mu\text{g/mL}$  como de 10  $\mu\text{g/mL}$ , presentaron diferencias significativas respecto a Bzn, mientras que los parásitos tratados con el EEA a 2,5  $\mu\text{g/mL}$  tuvieron un comportamiento similar al fármaco de referencia. De este modo, se obtuvo la  $\text{CI}_{50}$  del EEA-*H. escoipense* con un valor de 2,63  $\mu\text{g/mL}$ , el cual no presentó diferencias respecto a Bzn (2,14  $\mu\text{g/mL}$ ) (tabla 6). Posteriormente, se evaluó el EEA-*H. escoipense* frente a los estadios tripomastigotes+amastigotes de *T. cruzi* (cepa Tulahuen), registrando un valor de  $\text{CI}_{50}$  de  $1,62 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$  (tabla 6, figura 34A). Dada esta actividad, se progresó al ensayo de toxicidad en células Vero para evaluar su actividad específica sobre los parásitos. Se obtuvo una  $\text{CC}_{50} = 30,28 \pm 3,28 \mu\text{g/mL}$ , lo que dio como resultado un índice de selectividad (IS) de 18,72 (tabla 6, figura 34B). Se consideró un  $\text{IS} > 10$  para continuar con los ensayos (Martinez-Peinado *et al.*, 2020). Por lo tanto, se evaluó adicionalmente la toxicidad sobre células HepG2, informando un valor de  $\text{CC}_{50}$  de  $10,9 \pm 1,20 \mu\text{g/mL}$  (tabla 6, figura 34C). Finalmente, se estudió si el extracto tenía actividad específica anti-amastigote en un ensayo dirigido específicamente a esta etapa del ciclo de vida del parásito. Los amastigotes son la principal forma clínica relevante en la fase crónica de la enfermedad y, por tanto, una diana para cualquier fármaco prospectivo. El extracto mostró una  $\text{CC}_{50} = 1,42 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$  frente a amastigotes, alcanzando un IS de 21,32 (tabla 6, figura 34D).



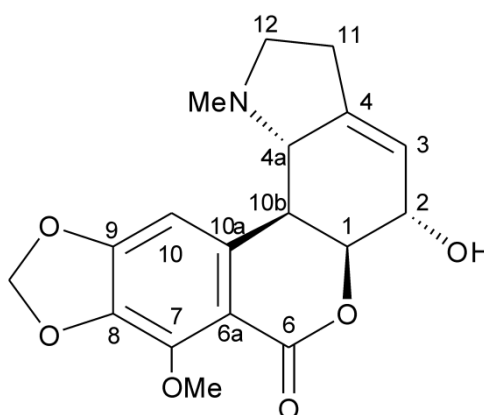
**Figura 33.** Efecto de EEA-*H. escoipense* sobre epimastigotes de *T. cruzi* a concentraciones de 1; 2,5, 5 y 10 µg/mL. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura 34.** Curvas dosis-respuesta de extracto de *H. escoipense* (triángulos) y Bzn (círculos). (A) Ensayo anti-tripomastigotes+amastigotes. (B) Ensayo de toxicidad de células Vero. (C) Ensayo de toxicidad de células HepG2. (D) Ensayo anti-amastigote.

### 3.2.3. Actividad de candimina aislada de *H. escoipense*

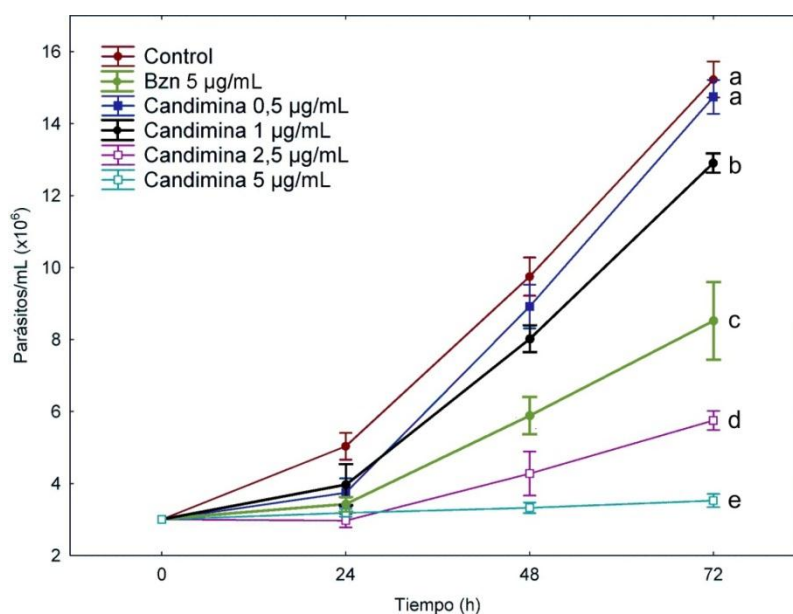
De acuerdo a los resultados obtenidos en la sección anterior, se prosiguió con el estudio del alcaloide candimina (figura 35). En una primera instancia, se evaluó su actividad sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Dm28c). Se probaron concentraciones crecientes del alcaloide, además de un control negativo (parásitos no tratados) y un control positivo (parásitos tratados con Bzn). Como se observa en la figura 36, candimina presenta un potente efecto sobre la proliferación de epimastigotes. El efecto inhibitorio observado sobre la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* fue más potente para la concentración de 14,1  $\mu\text{M}$ . Asimismo, el resultado de candimina sobre la proliferación de epimastigotes fue dependiente de la dosis. El primer día de tratamiento no se detectaron diferencias significativas entre el efecto provocado por el compuesto y el del Bzn. A las 48 h de tratamiento, en las concentraciones más altas evaluadas, candimina provocó una inhibición significativa del crecimiento del parásito, en comparación con el grupo control. Esta inhibición fue más marcada a las 72 h de incubación ( $p < 0,001$ ). De hecho, el valor de la  $\text{CI}_{50}$  de candimina fue inferior al del Bzn ( $4,28 \pm 0,47 \mu\text{M}$  vs.  $8,21 \pm 1,4 \mu\text{M}$  a las 48 h, respectivamente) (tabla 6).



**Figura 35.** Estructura química de candimina

De manera equivalente, candimina mostró en estadios de tripomastigotes+amastigotes una  $\text{CI}_{50} = 2,49 \pm 0,16 \mu\text{M}$ , que fue similarmente potente a Bzn (tabla 6, figura 37A). En cuanto a la actividad específica de candimina frente a amastigotes, se obtuvo una  $\text{CI}_{50} = 31,60 \pm 0,15 \mu\text{M}$  (tabla 6, figura 37D). Por otro lado, para el ensayo de toxicidad en células Vero, candimina reportó menor toxicidad que Bzn con una  $\text{CC}_{50} = 255,4 \pm 74,93$

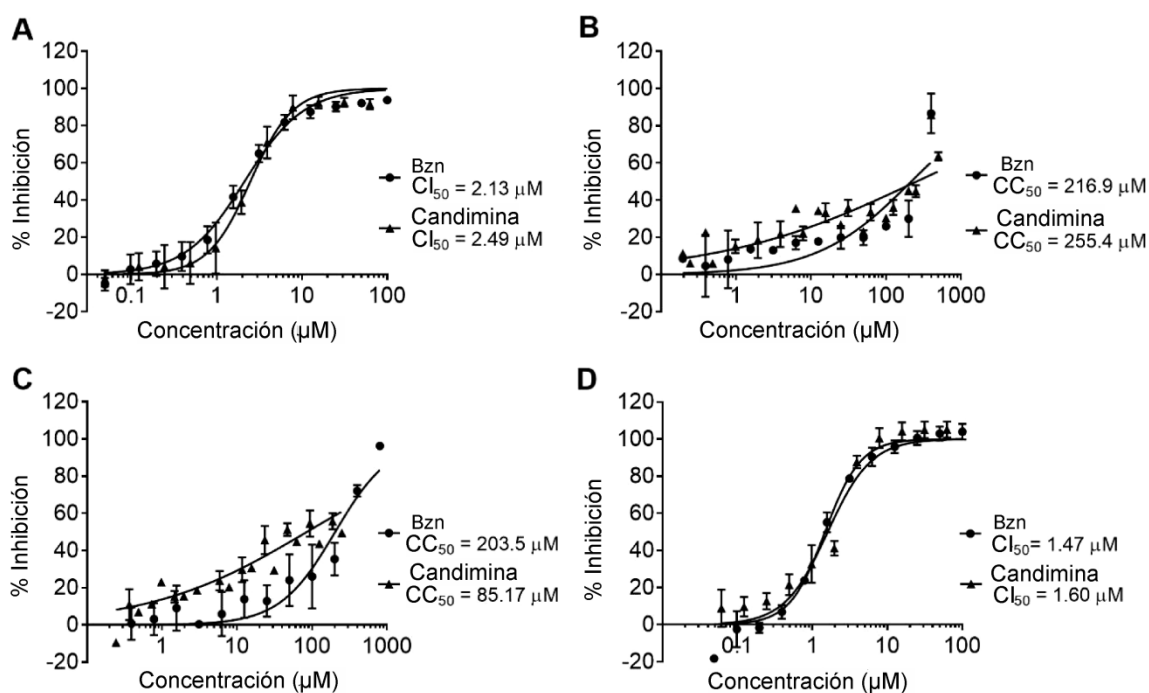
$\mu\text{M}$  (tabla 6, figura 37B). La baja toxicidad conduce a un IS = 69,67; 102,57; 159,63 para epimastigotes; tripomastigotes+amastigotes y amastigotes, respectivamente (tabla 6). Estos resultados indican que candimina tiene una actividad altamente específica contra el parásito, siendo superior al fármaco de referencia. De manera similar al extracto de *H. escoipense*, candimina mostró menos toxicidad para las células Vero que para las células HepG2 ( $\text{CC}_{50} = 255,4 \pm 74,93$  y  $\text{CC}_{50} = 85,17 \pm 15,49 \mu\text{M}$ , respectivamente). Sin embargo, para las células HepG2, candimina fue mucho menos citotóxica que el Bzn ( $\text{CC}_{50} = 85,17 \pm 15,49$  y  $\text{CC}_{50} = 203,5 \pm 25,99 \mu\text{M}$ , respectivamente) (tabla 6, figura 37C).



**Figura 36.** Efecto de candimina sobre epimastigotes de *T. cruzi* a concentraciones de 0,5; 1; 2,5 y 5  $\mu\text{g/mL}$ . Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 6.** Actividades antiparasitarias y citotóxicas de la candimina, Bzn y extracto de *H. escoipense*. (a) Concentración inhibitoria media. (b) Concentración citotóxica media. (c) Índice de selectividad. (d) Control positivo.

Extracto/ compuesto	<i>T. cruzi</i>					Toxicidad		IS <sup>c</sup>	
	Epis	Tripo + Amas	Amas	Vero	HepG2	Epis	Tripo + Amas	Amas	
	CI <sub>50</sub> <sup>a</sup>	CI <sub>50</sub> <sup>a</sup>	CI <sub>50</sub> <sup>a</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>b</sup>	CC <sub>50</sub> <sup>b</sup>				
<b>Bzn (μM)</b> <sup>d</sup>	8,21 ± 1,4	2,13 ± 0,12	1,47 ± 0,08	216,9 ± 71,69	203,5 ± 25,99	26,42	101,83	147,55	
<b>Bzn (μg/mL)</b> <sup>d</sup>	2,14 ± 0,05	0,56 ± 0,03	0,33 ± 0,02	57,06 ± 3,11	53,12 ± 6,39	26,66	101	146,18	
<b>Extracto (μg/mL)</b>	2,63 ± 0,87	1,62 ± 0,09	1,53 ± 0,09	30,28 ± 3,28	10,34 ± 1,20	11,51	18,72	21,32	
<b>Candimina (μM)</b>	4,28 ± 0,47	2,49 ± 0,16	1,60 ± 0,15	255,4 ± 74,93	85,17 ± 15,49	59,67	102,57	159,63	



**Figura 37.** Curvas dosis-respuesta de candimina (triángulos) y Bzn (círculos). (A) Ensayo anti-tripomastigotes+amastigotes. (B) Ensayo de toxicidad de células Vero. (C) Ensayo de toxicidad de células HepG2. (D) Ensayo anti-amastigote.



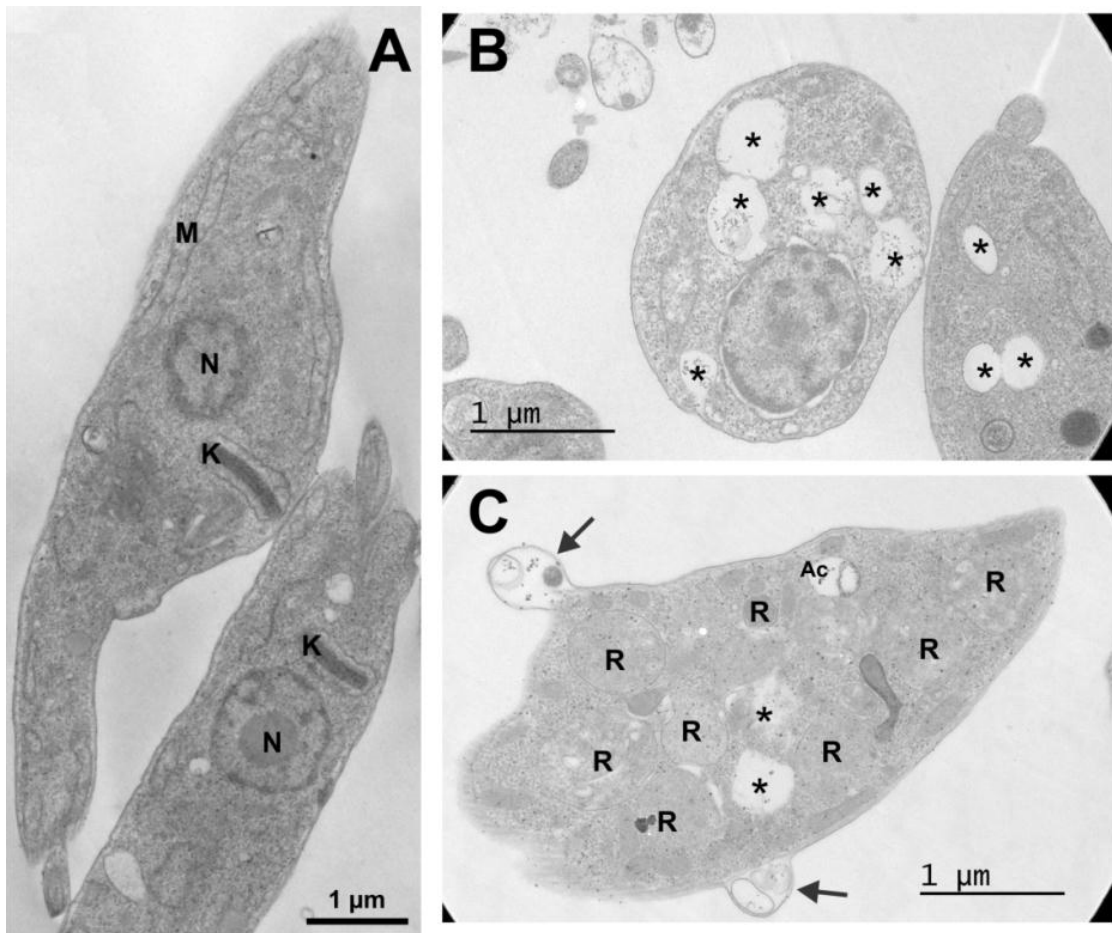
### **3.2.4. Evaluación de alteraciones morfológicas producidas por candimina sobre epimastigotes de *T. cruzi***

Para evaluar el efecto en la ultraestructura del parásito, se utilizó la microscopía electrónica de transmisión (MET) ya que es una herramienta útil y confiable en la búsqueda de las organelas blanco de la acción de compuestos naturales (Muschiatti *et al.*, 2010).

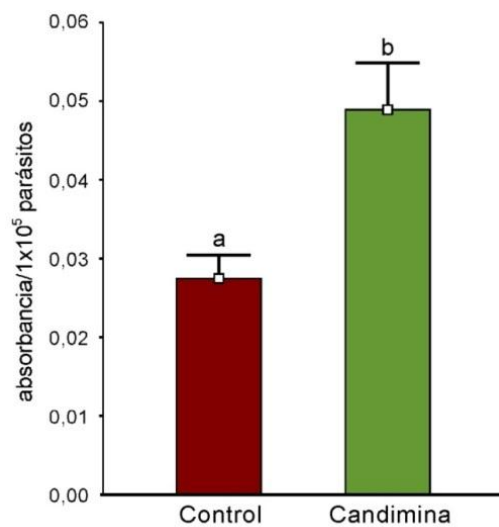
Como se describió en la sección 2.5.7, los epimastigotes de *T. cruzi* tratados con candimina (7,07 y 14,1  $\mu\text{M}$ ) durante 48 h fueron procesados para analizar si el tratamiento afectaba la ultraestructura. Las imágenes obtenidas se presentan en la figura 38, donde se observa que los parásitos tratados con 14,1  $\mu\text{M}$  de candimina presentaron elevada vacuolización, presencia de estructuras tipo-reservosomas desorganizadas en todo el citoplasma y además, burbujas en la membrana plasmática (figura 38C), mientras que los parásitos tratados con 7,07  $\mu\text{M}$  de candimina mostraron vacuolización moderada del citoplasma, sin cambios evidentes en las demás estructuras (figura 38B), comparado con el control (figura 38A).

### **3.2.5. Efecto de candimina sobre la actividad mitocondrial de epimastigotes de *T. cruzi***

El hecho de que los cinetoplastos tengan una mitocondria de una sola ramificación con una estructura de ADN denominada cinetoplasto, que no está presente en las células de los mamíferos, convierte a esta organela en un objetivo farmacológico atractivo. La actividad mitocondrial de los epimastigotes se evaluó por el método MTT después de 48 h de tratamiento con 28,3  $\mu\text{M}$  de candimina (figura 39). Según la absorbancia relativa, que se utilizó como indicador de la actividad mitocondrial, por acción de la enzima succinato deshidrogenasa que reduce el MTT a formazán, candimina induce un aumento significativo de la actividad mitocondrial de los epimastigotes de *T. cruzi* con respecto al control no tratado ( $0,059 \pm 0,006$  y  $0,047 \pm 0,005$ , respectivamente).



**Figura 38.** Microfotografía electrónica de transmisión de epimastigotes de *T. cruzi* sin tratar (A) y tratados con 7,07 (B) y 14,1  $\mu\text{M}$  (C). N: núcleo; K: cinetoplasto; M: mitocondria; R: tipo-reservosomas; Ac: acidocalcisoma \*: vacuolas; flechas negras: burbujas en la membrana citoplasmática.



**Figura 39.** Efecto de candimina (28,3  $\mu\text{M}$ ) sobre la actividad mitocondrial de epimastigotes de *T. cruzi*. \*:  $p < 0,05$ .

### 3.2.6. Conclusiones

A partir del análisis de los resultados obtenidos en esta parte del trabajo, se puede afirmar lo siguiente:

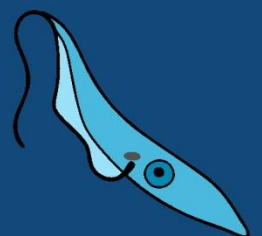
- El EEA-*H. escoipense* presenta potente actividad tripanocida frente a formas clínicas de *T. cruzi*, con moderada selectividad frente a células de mamíferos.
- Candimina presenta potente actividad tripanocida frente a los 3 estadios de *T. cruzi* con mayor índice de selectividad que el EEA-*H. escoipense* y Bzn.
- Candimina induce alteraciones en la ultraestructura de epimastigotes de *T. cruzi*. Principalmente vacuolización y desorganización intracelular.
- La actividad mitocondrial aumenta en epimastigotes tratados con candimina.



# Parte I

## Actividad anti-*T. cruzi*

c. Interacción entre PNs y Bzn  
Determinación de sinergismo



### 3.3.1. Introducción

La EC representa la segunda enfermedad con mayor prevalencia entre las enfermedades tropicales de América (OMS, 2022; Nouvellet *et al.*, 2015). Los ensayos clínicos en la última década han generado un buen nivel de evidencia para el tratamiento de la EC crónica indeterminada con Bzn (Molina *et al.*, 2014; Morillo *et al.*, 2017; Torrico *et al.*, 2018). Sin embargo, la dosis actual recomendada de Bzn es de 5–8 mg/kg por día, administrada en dos dosis por día, durante 60 días (Laboratorios Liconsa, 2022), por lo que es probable que represente la dosis y duración máxima del tratamiento. El régimen de tratamiento prolongado y la aparición frecuente de reacciones adversas a los medicamentos, principalmente dermatológicas y gastrointestinales, exigen un seguimiento continuo y pruebas de laboratorio, y son exigentes tanto para los pacientes como para el personal sanitario. No obstante, los estudios experimentales y clínicos indican que la exposición al Bzn podría reducirse sin pérdida de eficacia (Bustamante *et al.*, 2014; Álvarez *et al.*, 2020).

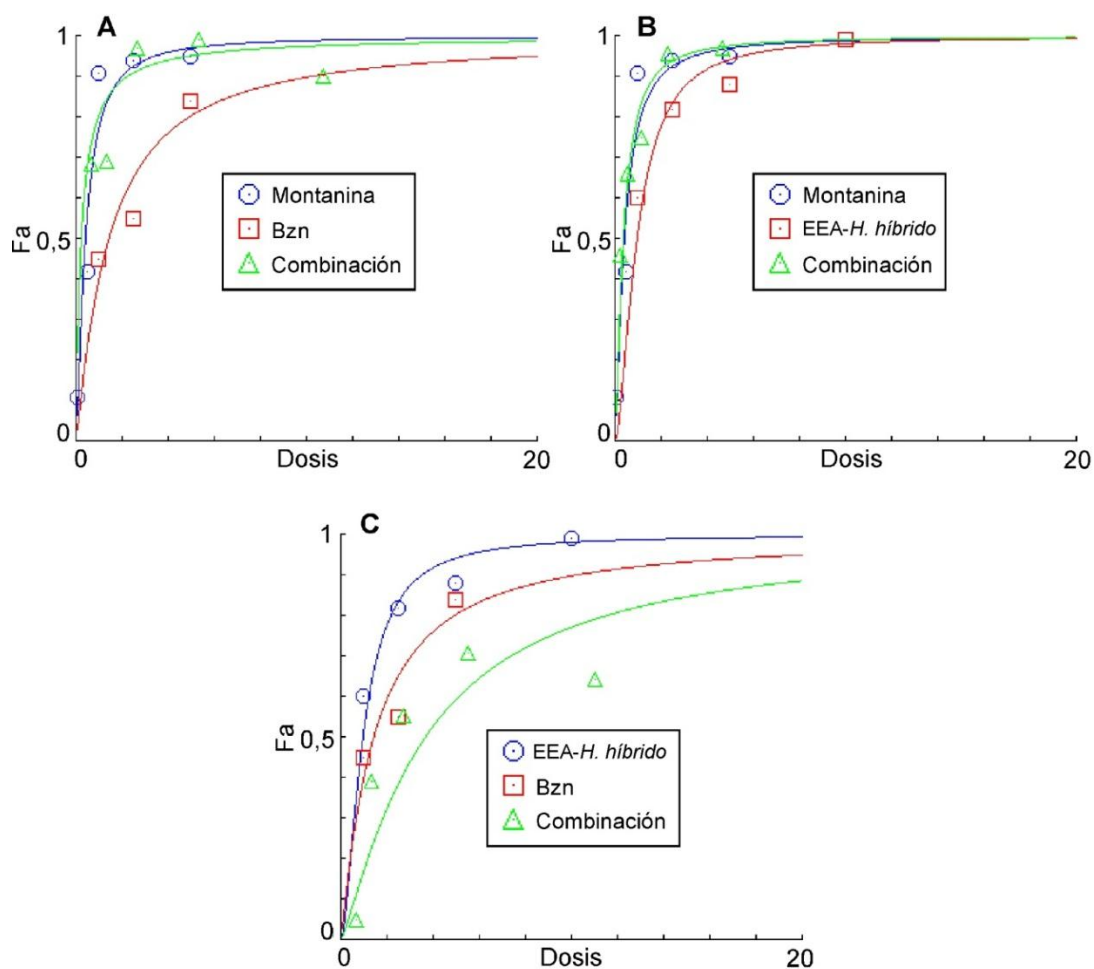
En cuanto a la EC, han crecido las evidencias a favor del uso de combinaciones de medicamentos para mejorar la eficacia y tolerancia del tratamiento. Estos estudios se centraron en la combinación de diferentes quimiotipos con diferentes puntos de acción parasitaria tratando de producir una cura completa, reducir las dosis de fármacos o disminuir la duración del tratamiento (Aguilera *et al.*, 2018; Torrico *et al.*, 2021).

Para este capítulo, sobre lo mencionado, se seleccionaron compuestos y extractos activos (descritos en capítulos previos) para proceder con los ensayos de combinación, tanto entre ellos, como así también con Bzn, con el objetivo de determinar interacciones positivas que conduzcan a efectos sinérgicos o aditivos para reducir las dosis.

### 3.3.2. Ensayo combinatorio I: EEA-H. híbrido, Montanina, y Bzn

Se diseñó un modelo que consiste en la combinación de pares de drogas (droga A + droga B). Los epimastigotes de *T. cruzi* se trataron con las drogas solas y combinadas en una proporción fija, en concentraciones de  $0,25 \times CI_{50}$ ,  $0,5 \times CI_{50}$ ,  $CI_{50}$ ,  $2 \times CI_{50}$  y  $4 \times CI_{50}$ , como se representó en la sección 2.7. Las combinaciones de montanina + EEA-H.

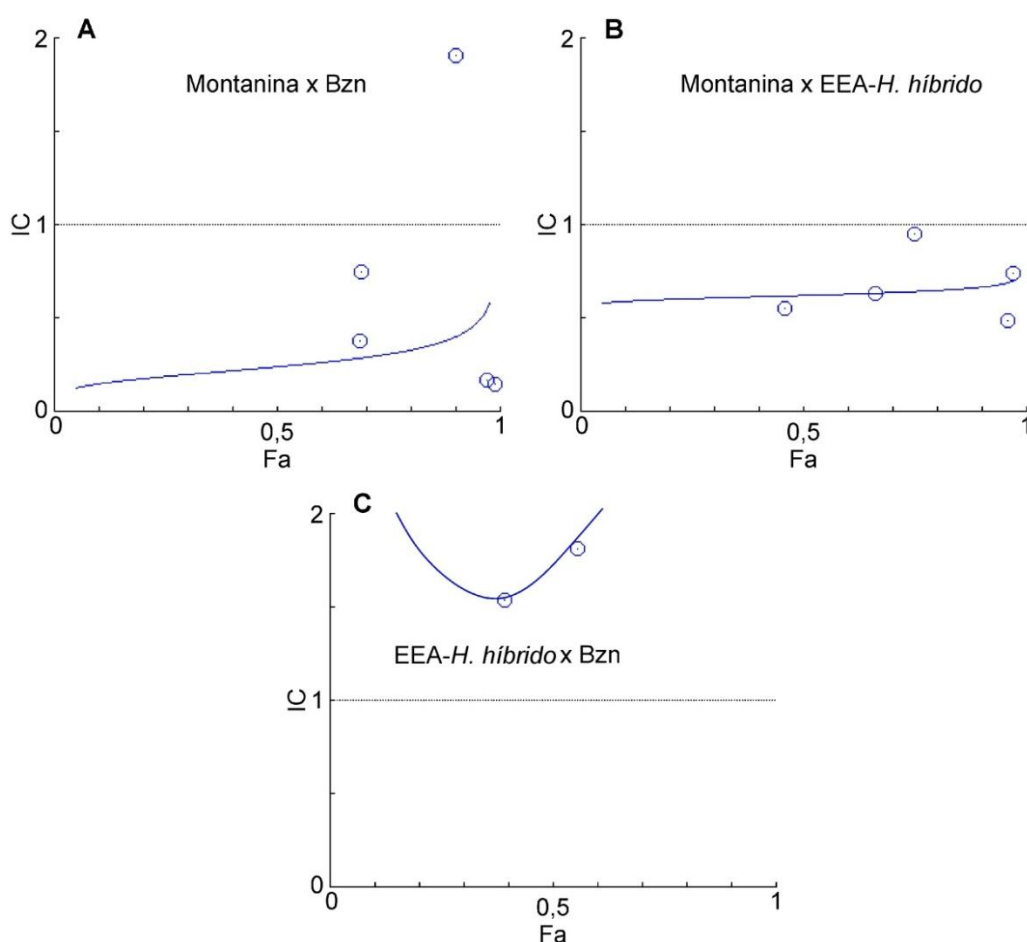
*híbrido*, montanina + Bzn y Bzn + EEA-*H. híbrido* se evaluaron frente a epimastigotes de *T. cruzi* mediante el ensayo de curva de proliferación. Las figuras 40A-C muestran la citotoxicidad para epimastigotes, dependiente de la concentración de los compuestos individuales y combinados.



**Figura 40.** Representaciones gráficas obtenidas mediante el programa CompuSyn para montanina + Bzn (A), montanina + EEA-*H. híbrido* (B) y EEA-*H. híbrido* + Bzn (C). La curva dosis-efecto demuestra la relación entre Fa y la dosis ( $\mu\text{g/mL}$ ).

Para evaluar los efectos de las combinaciones, se calculó el IC (índice combinatorio) mediante el método de Chou-Talalay (Chou, 2010). El IC se representó en el eje y como una función de Fa (fracción afectada) en el eje x, para evaluar la sinergia de la droga (figura 41). Los resultados de las combinaciones se resumen en la tabla 8. La combinación de montanina + Bzn presenta un mayor efecto de sinergismo que el resto de las combinaciones, particularmente en las interacciones de  $\text{CI}_{50}$  y  $2 \times \text{CI}_{50}$  (IC = 0,17 y 0,15, respectivamente). Esta interacción, también demostró un potente efecto en la

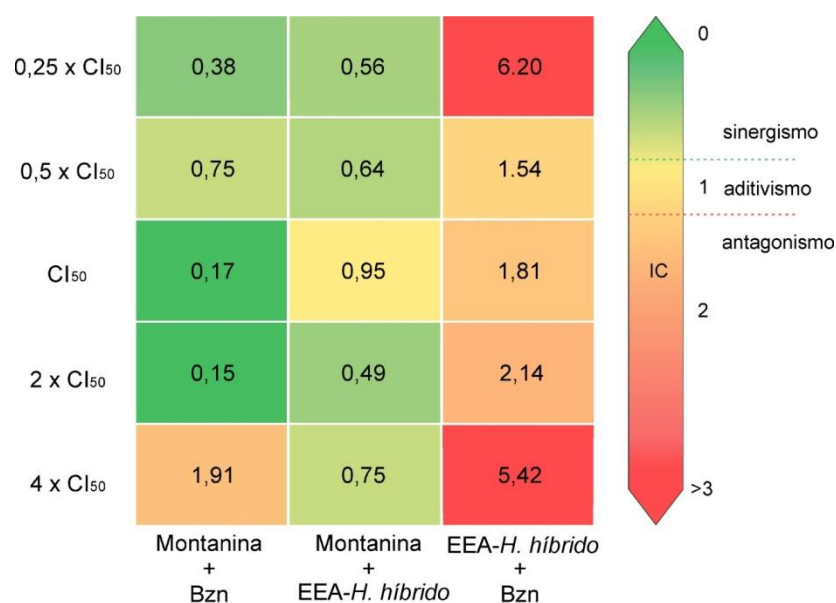
proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*, con un valor de  $F_a = 0,972$  y  $0,99$ , respectivamente. La combinación de una baja concentración de montanina + Bzn también dio como resultado un efecto sinérgico ( $IC < 1$ ) y  $F_a$  cercana a  $0,7$ . Sin embargo, la combinación de mayor concentración de montanina + Bzn ( $4 \times CI_{50}$ ) resultó en un efecto antagónico ( $IC = 1,91$ ) (tabla 7, figura 41A). Por otra parte, todas las combinaciones de montanina + EEA-*H. híbrido* mostraron una interacción sinérgica, siendo la combinación de  $2 \times CI_{50}$  (montanina =  $1,1 \mu\text{g/mL}$  + EEA-*H. híbrido* =  $1,24 \mu\text{g/mL}$ ) la de mayor efecto sinérgico ( $IC = 0,49$ ) y el de  $4 \times CI_{50}$  el de mayor efecto inhibitorio sobre la proliferación de *T. cruzi* ( $F_a = 0,972$ ) (tabla 7, figura 41B). Finalmente, EEA-*H. híbrido* + Bzn reportaron efectos antagónicos en todas sus combinaciones ( $IC = 1,54 - 6,20$ ) y un efecto antiproliferativo de bajo a moderado ( $F_a = 0,05 - 0,708$ ) (tabla 7, figura 41C).



**Figura 41.** El gráfico  $F_a$ - $IC$  representa interacciones sinérgicas, aditivas o antagónicas ( $IC < 1$ ,  $IC = 1$ ,  $IC > 1$ , respectivamente) en función de su efecto inhibitorio ( $F_a$ ). Montanina + Bzn (A), montanina + EEA-*H. híbrido* (B) y EEA-*H. híbrido* + Bzn (C).



Los valores de IC de todas las combinaciones se muestran en el mapa de calor (figura 42).

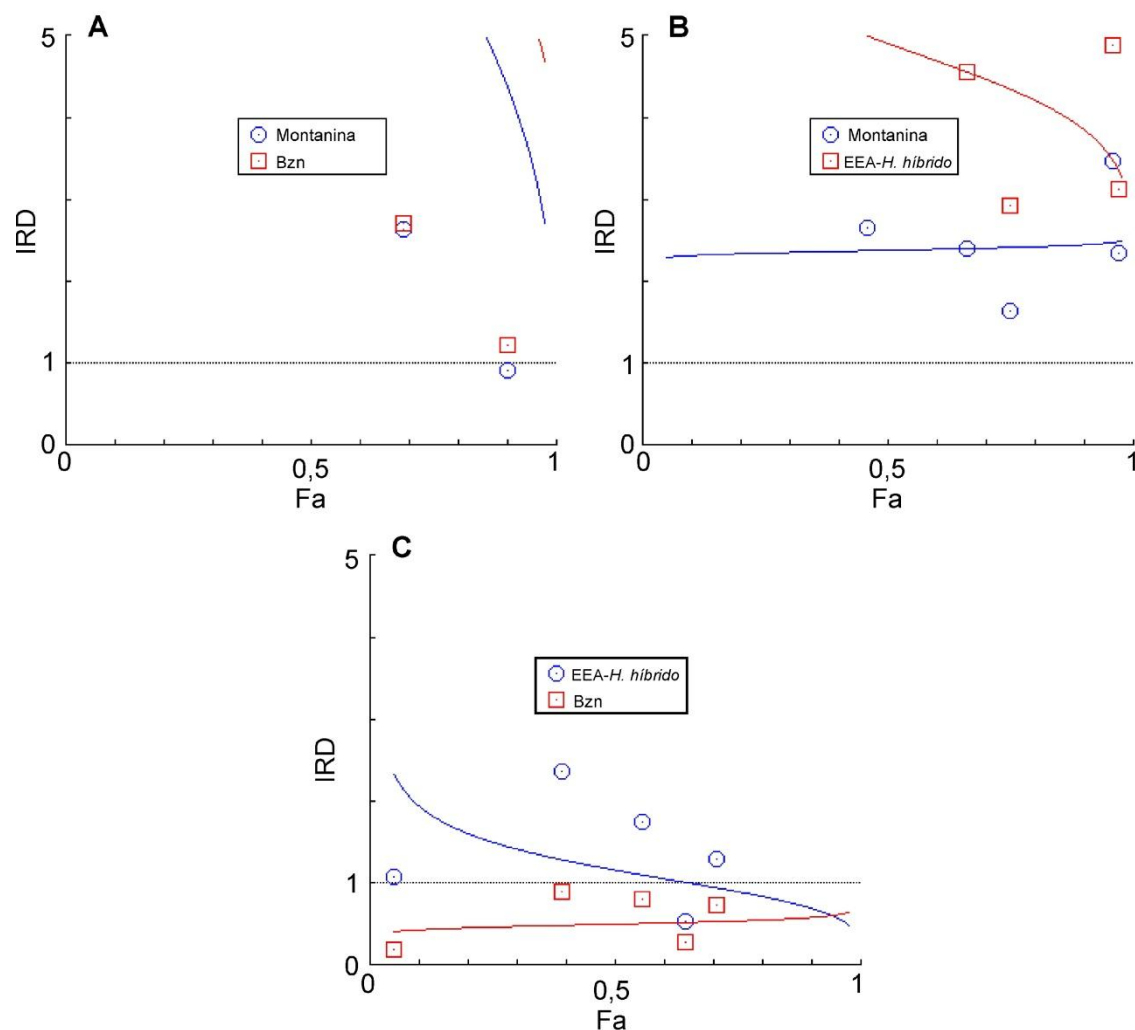


**Figura 42.** Mapa de calor a partir de valores de CI. Celdas en verde indican sinergismo ( $IC < 0,9$ ), en amarillo aditivismo ( $0,9 < IC < 1,1$ ) y en rojo-naranja antagonismo ( $IC > 1,2$ ).

Según los valores de IRD de los puntos de datos experimentales reales, todas las combinaciones de drogas sinérgicas lograron un índice de reducción de dosis favorable ( $IRD > 1$ ) (tabla 7). Montanina + Bzn alcanzó el valor más alto de IRD a una concentración de  $2 \times CI_{50}$ , reduciendo la dosis de montanina 9,9 veces y la dosis de Bzn 20,19 veces para obtener un 99 % de inhibición en la proliferación de *T. cruzi* (tabla 7, figura 43A). Otro resultado interesante ocurre con la combinación de montanina + Bzn a la concentración  $CI_{50}$ . En este caso la reducción es de 9,4 y 15,8 veces para montanina y Bzn, respectivamente, lográndose una inhibición de 97 % solo con 0,55  $\mu\text{g/mL}$  de montanina y 2,13  $\mu\text{g/mL}$  de Bzn. Además, en todas las combinaciones montanina + EEA-H. híbrido se obtuvieron valores favorables de IRD para ambos compuestos (1,63 a 5,57) (tabla 7, figura 43B). En cuanto a EEA-H. híbrido + Bzn, si bien todas las combinaciones fueron antagónicas, se logró un IRD favorable ( $IRD > 1$ ) para cuatro de las cinco concentraciones ensayadas del EEA-H. híbrido (tabla 7, figura 43C).

**Tabla 7.** Valores de IC y sus respectivos Fa e IRD para las combinaciones de montanina, EEA-*H. híbrido* y Bzn. IC en verde indica interacciones sinérgicas.

Combinación (Droga A + Droga B)	Relación $Cl_{50}$	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) (Droga A + Droga B)	Fa	IC	IRD	
Montanina + Bzn	0,25 x $Cl_{50}$	0,137 + 0,534	0,685	0,38	M = 5,18	B = 5,30
	0,5 x $Cl_{50}$	0,275 + 1,069	0,690	0,75	M = 2,63	B = 2,71
	$Cl_{50}$	0,550 + 2,139	0,972	0,17	M = 9,39	B = 15,81
	2 x $Cl_{50}$	1,100 + 4,279	0,990	0,15	M = 9,93	B = 20,20
	4 x $Cl_{50}$	2,200 + 8,558	0,903	1,91	M = 0,92	B = 1,22
Montanina + EEA- <i>H. híbrido</i>	0,25 x $Cl_{50}$	0,137 + 0,155	0,460	0,56	M = 2,65	H = 5,57
	0,5 x $Cl_{50}$	0,275 + 0,309	0,662	0,64	M = 2,40	H = 4,56
	$Cl_{50}$	0,550 + 0,619	0,750	0,95	M = 1,63	H = 2,93
	2 x $Cl_{50}$	1,100 + 1,239	0,958	0,49	M = 3,48	H = 4,87
	4 x $Cl_{50}$	2,200 + 2,479	0,972	0,75	M = 2,35	H = 3,13
EEA- <i>H. híbrido</i> + Bzn	0,25 x $Cl_{50}$	0,155 + 0,534	0,050	6,20	H = 1,07	B = 0,19
	0,5 x $Cl_{50}$	0,309 + 1,069	0,393	1,54	H = 2,37	B = 0,90
	$Cl_{50}$	0,619 + 2,139	0,555	1,81	H = 1,74	B = 0,81
	2 x $Cl_{50}$	1,239 + 4,279	0,708	2,14	H = 1,29	B = 0,73
	4 x $Cl_{50}$	2,479 + 8,558	0,643	5,42	H = 0,54	B = 0,28

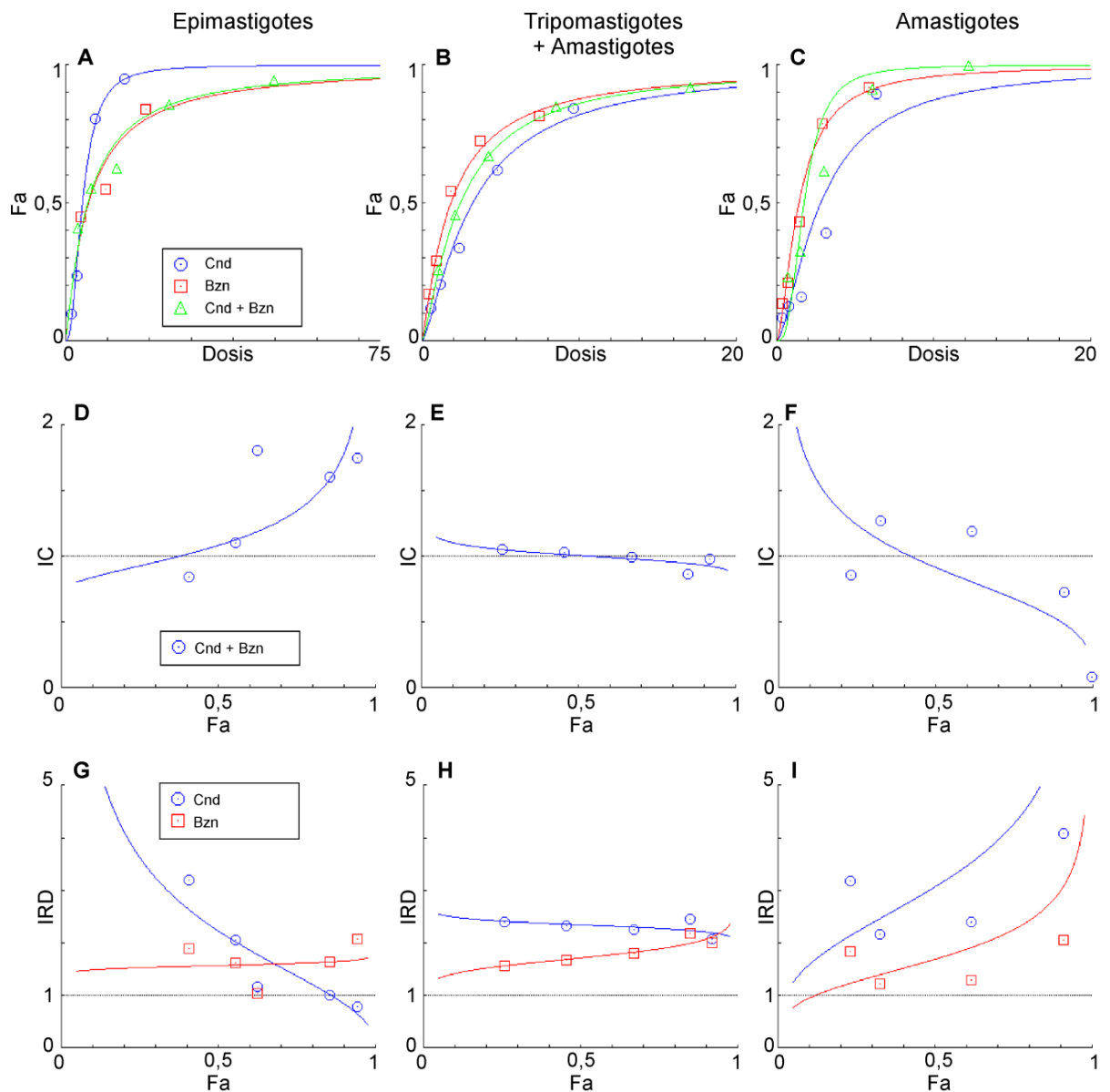
**Figura 43.** En el gráfico Fa-IRD, los puntos de datos que aparecen debajo de la línea de no reducción de dosis (DRI = 1) indican una reducción de dosis desfavorable, mientras que los que están arriba de la línea indican una reducción de dosis favorable. Montanina + Bzn (A), montanina + EEA-*H. híbrido* (B) e EEA-*H. híbrido* + Bzn (C).

### 3.3.3. Ensayo combinatorio II: Candimina y Bzn

Tras los resultados antitripanosómicos y la baja citotoxicidad de candimina en células de mamíferos (ver sección 3.2.3), se continuó con el estudio de la actividad del alcaloide en combinación con Bzn, utilizando el método de Chou-Talalay. Las figuras 44A-C muestran la citotoxicidad en función de la concentración de los compuestos individuales y combinados para epimastigotes, tripomastigotes+amastigotes y amastigotes, respectivamente.

En las formas epimastigotes, la interacción de los compuestos resultó en un efecto sinérgico ( $IC < 1$ ) solo para la combinación de  $1,07 \mu\text{M}$  de candimina y  $2,05 \mu\text{M}$  de Bzn (tabla 8, figura 44D). Sin embargo, todas las combinaciones resultaron en una reducción favorable de las dosis de Bzn (tabla 8, figura 44G). Para el cultivo de tripomastigotes+amastigotes, cuatro de cinco combinaciones mostraron una interacción de Bzn y candimina en el umbral del efecto aditivo ( $0,9 < IC < 1,1$ ), aunque para la combinación de  $2 \times CI_{50}$  ( $4,28 \mu\text{M}$  y  $3,74 \mu\text{M}$ , respectivamente) se observa un leve efecto sinérgico ( $IC = 0,867$ ) (tabla 8, figura 44E). Al igual que en los epimastigotes, todas las combinaciones mostraron una reducción favorable tanto de la dosis de Bzn como de candimina ( $IRD > 1$ ) (tabla 8, figura 44H). En el caso del ensayo específico de amastigotes, tres puntos de combinaciones mostraron una interacción sinérgica entre Bzn y candimina ( $IC < 1$ ), destacándose el combo de compuestos en la relación  $4 \times CI_{50}$  con un valor de IC igual a  $0,08$  (tabla 8, figura 44F). Además, todas las combinaciones mostraron una reducción favorable tanto de la dosis de Bzn como de candimina, con un efecto marcado a mayores concentraciones ( $IRD > 1$ ) (tabla 8, figura 44I). Finalmente, se evaluó la interacción de los compuestos en células Vero y HepG2 (líneas celulares de mamíferos). En ambos casos, todos los rangos combinatorios presentaron un efecto antagónico ( $IC > 1$ ) (tabla 8, figura 45). Por lo tanto, cuando se combinan ambos compuestos, el efecto citotóxico sobre las células de mamífero es menor que si se trataran con los compuestos individuales. Los valores de IC obtenidos de todas las

combinaciones en los diferentes tipos de células se representan en el mapa de calor de la figura 45.



**Figura 44.** Representaciones gráficas obtenidas del informe CompuSyn para candimina (Cnd) y Bzn y sus combinaciones en epimastigotes, tripomastigotes+amastigotes y amastigotes (izquierda, centro y derecha, respectivamente). (A, B, C) La curva dosis-efecto demuestra la relación entre  $Fa$  y la dosis ( $\mu M$ ). (D, E, F). El gráfico  $Fa$ -CI representa interacciones sinérgicas, aditivas o antagónicas ( $CI < 1$ ,  $CI = 1$ ,  $CI > 1$ , respectivamente) en función de su efecto inhibitorio ( $Fa$ ) (G, H, I). En el gráfico  $Fa$ -IRD, los puntos de datos que aparecen debajo de la línea de no reducción de dosis ( $IRD = 1$ ) indican una reducción de dosis desfavorable, mientras que los que están arriba de la línea indican una reducción de dosis favorable.

**Tabla 8.** Valores de IC y sus respectivos Fa e IRD para las combinaciones de candimina y Bzn. IC en verde indica interacciones sinérgicas.

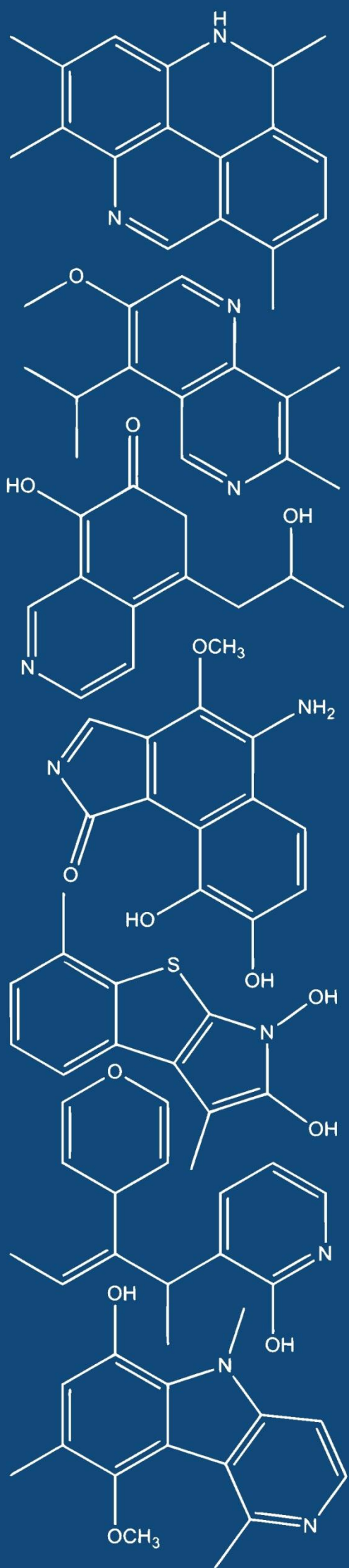
Tipo celular	Concentración ( $\mu\text{M C} + \mu\text{M B}$ )	IC	Fa	IRD	
Epimastigotes	1,07 + 2,05	0,841	0,407	C = 3,19	B = 1,89
	2,14 + 4,10	1,104	0,555	C = 2,07	B = 1,61
	4,28 + 8,21	1,812	0,625	C = 1,17	B = 1,05
	8,56 + 16,42	1,605	0,856	C = 1,01	B = 1,63
	17,12 + 32,84	1,751	0,944	C = 0,79	B = 2,07
Tripomastigotes + Amastigotes	0,60 + 0,47	1,056	0,258	C = 2,41	B = 1,56
	1,21 + 0,94	1,030	0,456	C = 2,32	B = 1,67
	2,41 + 1,87	0,999	0,670	C = 2,26	B = 1,79
	4,82 + 3,74	0,867	0,850	C = 2,45	B = 2,18
	9,64 + 7,48	0,979	0,920	C = 2,08	B = 2,01
Amastigotes	0,40 + 0,37	0,859	0,232	C = 3,18	B = 1,84
	0,80 + 0,74	1,272	0,326	C = 2,17	B = 1,23
	1,60 + 1,47	1,190	0,616	C = 2,39	B = 1,29
	3,20 + 2,94	0,731	0,912	C = 4,08	B = 2,06
	6,40 + 5,88	0,080	0,999	C = 41,52	B = 17,57
Vero	0,60 + 0,47	> 3	0,245	C = 1,03	B = 5,21E-4
	1,21 + 0,94	> 3	0,232	C = 1,28	B = 0,002
	2,41 + 1,87	> 3	0,217	C = 1,87	B = 0,01
	4,82 + 3,74	> 3	0,204	C = 2,38	B = 0,04
	9,64 + 7,48	> 3	0,217	C = 0,46	B = 0,003
HepG2	0,60 + 0,47	> 3	0,065	C = 2,1E-13	B = 0,008
	1,21 + 0,94	> 3	0,137	C = 0,59	B = 0,71
	2,41 + 1,87	1,255	0,153	C = 33,10	B = 0,82
	4,82 + 3,74	> 3	0,114	C = 8,31E-5	B = 0,048
	9,64 + 7,48	2,466	0,168	C = 414,33	B = 0,41

**Figura 45.** Mapa de calor a partir de valores de CI. Celdas en verde (IC < 0,9,) indican sinergismo, en amarillo aditivismo (0,9 < IC < 1,1) y en rojo-naranja antagonismo (IC > 1,2) entre candimina y Bzn frente a *T. cruzi* y células de mamífero.

### 3.3.4. Conclusiones

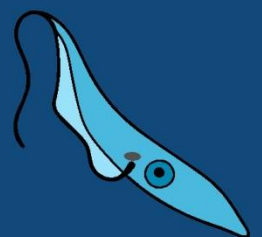
A partir del análisis de los resultados obtenidos aplicando el método Chou-Talalay, el cual es una herramienta útil para determinar el efecto combinatorio entre extractos y/o compuestos, se concluye:

- Montanina en combinación con Bzn mostró un potente efecto sinérgico, mientras que en combinación con el EEA-*H. híbrido* fue moderada
- Montanina reduce 20 veces la dosis de Bzn obteniendo un efecto inhibitorio en la proliferación de epimastigotes del 99 %.
- La combinación del alcaloide candimina con Bzn, exhibió al menos una interacción sinérgica para cada uno de los estadios de *T. cruzi*. En las formas amastigotes del parásito el efecto fue más potente.
- El efecto combinatorio de candimina y Bzn fue antagónico en las células de mamíferos, y se evidenció una disminución de la citotoxicidad, comparando cuando se ensayaron individualmente.
- Para todas las combinaciones entre candimina y Bzn, en los 3 estadios del parásito, se obtuvo una reducción de dosis favorable para Bzn, esto indicaría que estas combinaciones disminuyen la concentración de Bzn para un mismo efecto.



# Parte II

## Estudio químico





### 3.4. Introducción

Las plantas producen una variedad de metabolitos que son una fuente interesante de nuevas moléculas o compuestos, que podrían, en un futuro cercano, reemplazar las terapias actuales para enfermedades infecciosas o crónicas (Atanasov *et al.*, 2015). Los extractos totales o fracciones obtenidas de especies vegetales o sus análogos sintéticos y semisintéticos han demostrado tener un efecto beneficioso en el tratamiento de enfermedades infecciosas, y han servido como una de las principales vías para obtener nuevos compuestos (de Moraes *et al.*, 2012).

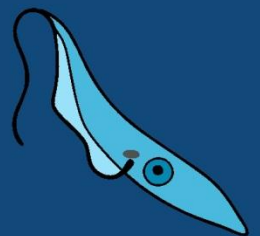
A lo largo del curso natural de la vida diaria, el conocimiento tradicional de la biodiversidad a menudo se ha transmitido de generación en generación. Este valioso conocimiento, recopilado a través de la investigación etnobotánica, es crucial para la conservación y para comprender los usos de las especies locales e indígenas (Akgul *et al.*, 2018). Hoy en día, la literatura está llena de evidencia acumulada que enfatiza la necesidad de evaluar continuamente los PNs para revelar detalles clave sobre sus valores medicinales (Mahomoodally *et al.*, 2021). De hecho, con los años, el gran crecimiento de las industrias farmacéutica, nutracéutica, cosmeceútica o alimentaria ha aumentado significativamente la demanda de PNs bioactivos (Selseleh *et al.*, 2020). Se han presentado numerosas ideas novedosas y muchas creencias tradicionales se han validado, rechazado o aceptado nuevamente. Sin embargo, incluso reconociendo la riqueza de la investigación que se está realizando, la búsqueda de nuevos fármacos a partir de plantas debería seguir siendo un desafío y una necesidad constante (Selseleh *et al.*, 2020).

Esta sección tiene como objetivo detallar la composición química de los extractos y fracciones de las especies del género *Hippeastrum*, como así también del líquen *U. lethariiformis*.



## Parte II Estudio químico

*a. Hippeastrum spp.*



### 3.4.1.1. Caracterización química mediante GC-MS de extractos enriquecidos en alcaloides del género *Hippeastrum*

El análisis mediante GC-MS de los EEA de las especies del género *Hippeastrum*, mostró la presencia de quince compuestos, de los cuales doce (figura 46) se identificaron por comparación de sus patrones de fragmentación de masa con espectros de referencia estándar a partir de una base de datos propia, índices de retención de Kovats (IR), y espectros de la base de datos NIST 05 (tabla 9). Licorina fue reportado para todas las especies, mientras que montanina para cuatro, siendo los alcaloides con mayor prevalencia.

**Tabla 9.** Principales alcaloides identificados en especies del género *Hippeastrum* mediante GC-MS.

Alcaloides	IR	[M <sup>+</sup> ]	MS	Especies
Galantamina (1)	21,322	287	286(100), 270(13), 244(24), 230(12), 216(33), 174(27), 115(12)	<i>H. híbrido</i>
Norlicoramina (2)	22,390	275	274(100), 202(10), 188(12), 178(5)	<i>H. aglaiae</i>
11,12-dehidroanhidrolicorina (3)	24,796	249	248(100), 191(10), 190(24), 189(6), 164(3), 163(7), 123(6), 95(14)	<i>H. aulicum</i> <i>H. reticulatum</i>
Montanina (4)	24,916	301	270(87), 257(37), 252(24), 229(26), 226(30), 223(29), 199(20), 185(32), 115(21)	<i>H. aglaiae</i> , <i>H. híbrido</i> <i>H. petiolatum</i> <i>H. puniceum</i>
Tazettina (5)	25.313	331	298(19), 248(15), 247(100), 201(16), 199(14), 181(13), 115(15), 71(15), 70(17)	<i>H. glauscecens</i>
m/z 264 (Tipo Narcissidina) (6)	25,592	265	264(100), 178(13), 89(10), 103(10), 266(10), 206(9), 75(6), 150(6), 177(6)	<i>H. reticulatum</i>
Panracina (7)	26,070	287	286(23), 270(19), 243(25), 223(27), 214(24), 199(32), 185(42), 128(21), 115(24)	<i>H. híbrido</i>
Hamayna (8)	26,206	287	259(15), 258(100), 242(10), 211(13), 186(15), 181(17), 128(14), 115(13)	<i>H. aulicum</i>

Licorina (9)	26,759	287	286(19), 268(24), 250(15), 227(79), 226(100), 211(7), 147(15)	<i>H. aglaiae</i> , <i>H. aulicum</i> <i>H. glauscecens</i> <i>H. híbrido</i> <i>H. petiolatum</i> <i>H. puniceum</i> <i>H. reticulatum</i>
8-O-demetilhomolicorina (10)	27,528	301	109(100), 108(22), 110(8), 82(3), 94(3), 93(2), 65(2)	<i>H. aglaiae</i> <i>H. puniceum</i> <i>H. reticulatum</i>
Hippeastrina (11)	28,620	315	96 (40), 125 (100), 315 (< 1)	<i>H. híbrido</i> <i>H. puniceum</i>
2-hidroxihomolicorina (12)	29,223	331	125 (100), 95(3), 65(2), 42(10)	<i>H. híbrido</i>
m/z 294 (Tipo Narcissidina) (13)	29,294	295	294(100), 165(16), 296(15), 152(10), 252(8), 135(8), 253(7), 166(6), 238(4)	<i>H. reticulatum</i>
m/z 280 (Tipo Narcissidina) (14)	29,805	281	280(100), 282(10), 152(5), 253(4), 252(3), 238(3), 151(3), 266(2), 103(2)	<i>H. reticulatum</i>
7-hidroxiclivonina (15)	29,857	333	178(3), 97(5), 96(64), 84(5), 83(100), 82(32), 44(3), 42(8)	<i>H. híbrido</i>

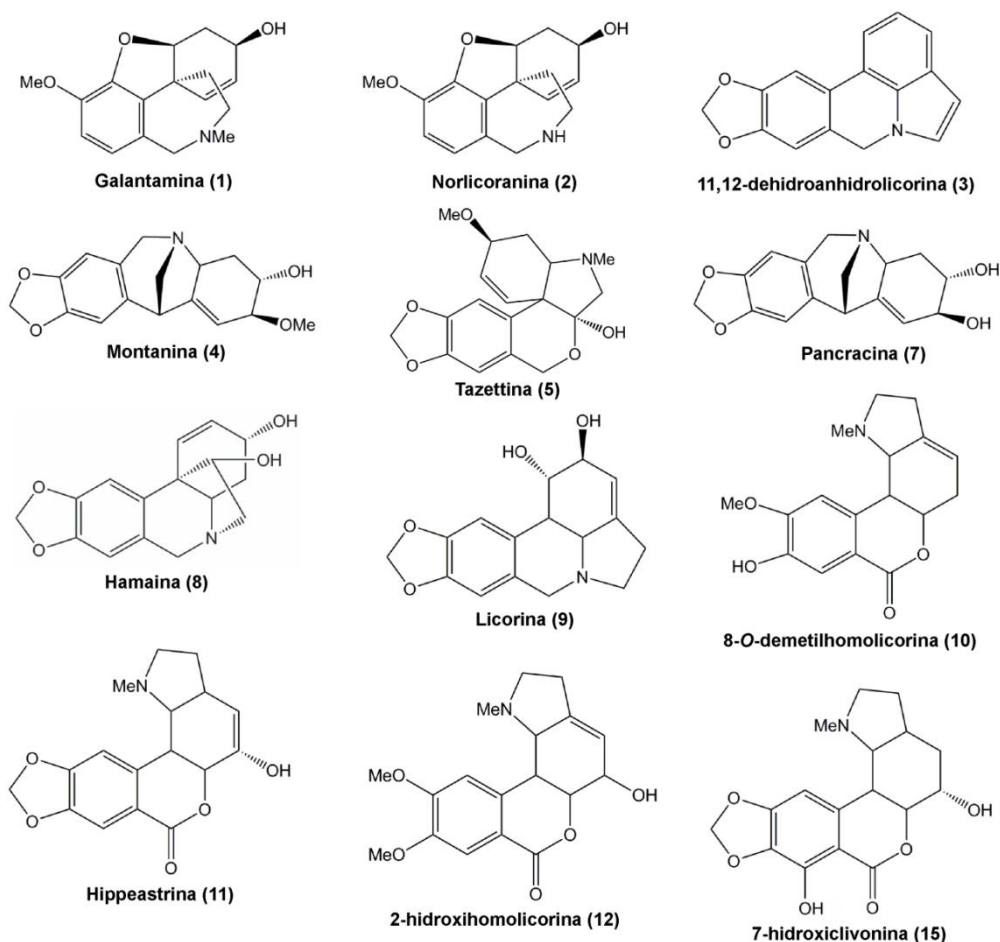
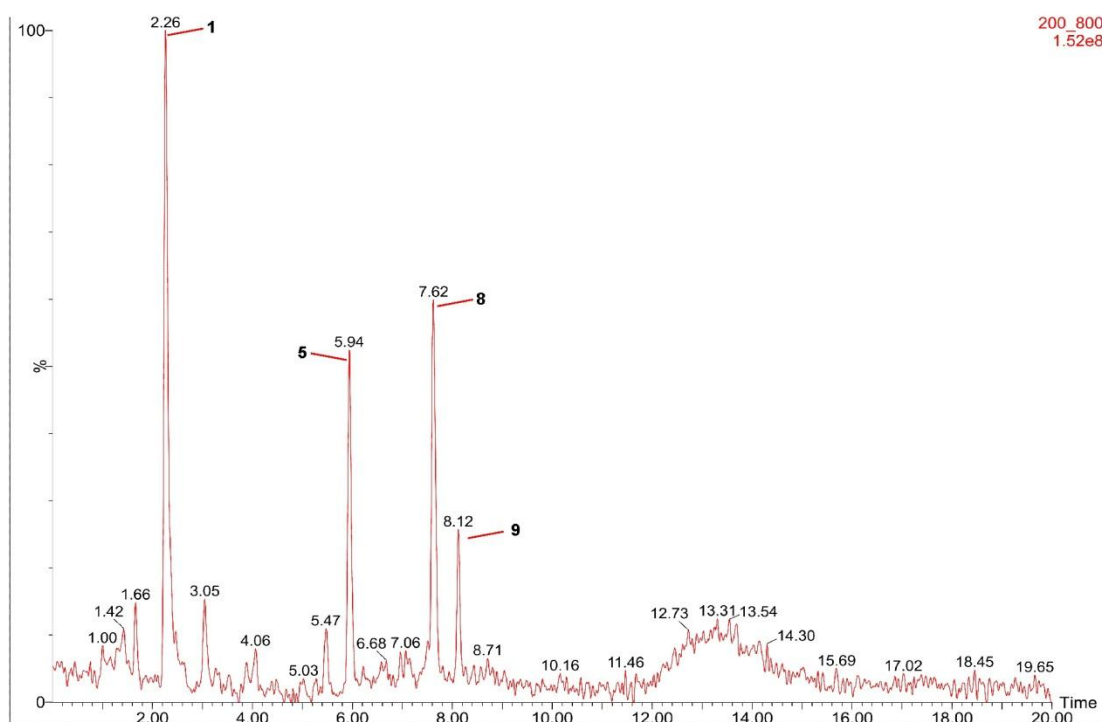
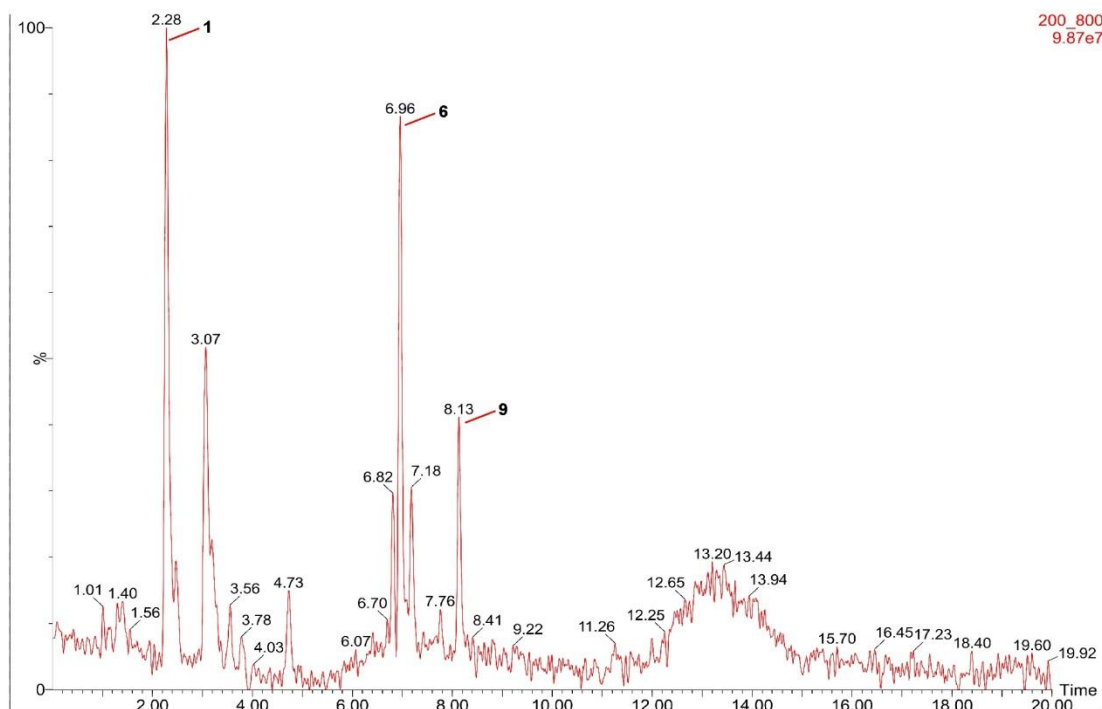


Figura 46. Estructuras químicas de los alcaloides identificados en especies del género *Hippeastrum*.

### **3.4.1.2. Caracterización química mediante UHPLC-MS de extractos enriquecidos en alcaloides del género *Hippeastrum***

En cuanto al análisis por UHPLC-MS, se destacan 10 picos de interés de acuerdo a su abundancia relativa (figura 47). Siete de los diez alcaloides se identificaron tentativamente. Los picos 1 y 8 se identificaron por comparación con estándares auténticos, mientras que los picos restantes (2, 3, 4, 5 y 10), se identificaron provisoriamente en función de sus fórmulas moleculares, patrones de fragmentación de MS y datos de la literatura. La identificación de metabolitos por UHPLC-MS es una tarea desafiante para los alcaloides de la familia Amaryllidaceae debido a la gran cantidad de isómeros.

***H. aglaiae******H. aulicum***

**Figura 47.** Cromatogramas obtenidos por UHPLC-MS. Los alcaloides identificados en los extractos fueron: **1:** licorina; **2:** hippeastrina; **3:** 7-hidroxilicivonina; **4:** 2-hidroxihomolicorina; **5:** 8-O-demetilhomolicorina; **6:** m/z 366; **7:** m/z 382; **8:** montanina; **9:** m/z 266 y **10:** tazettina.

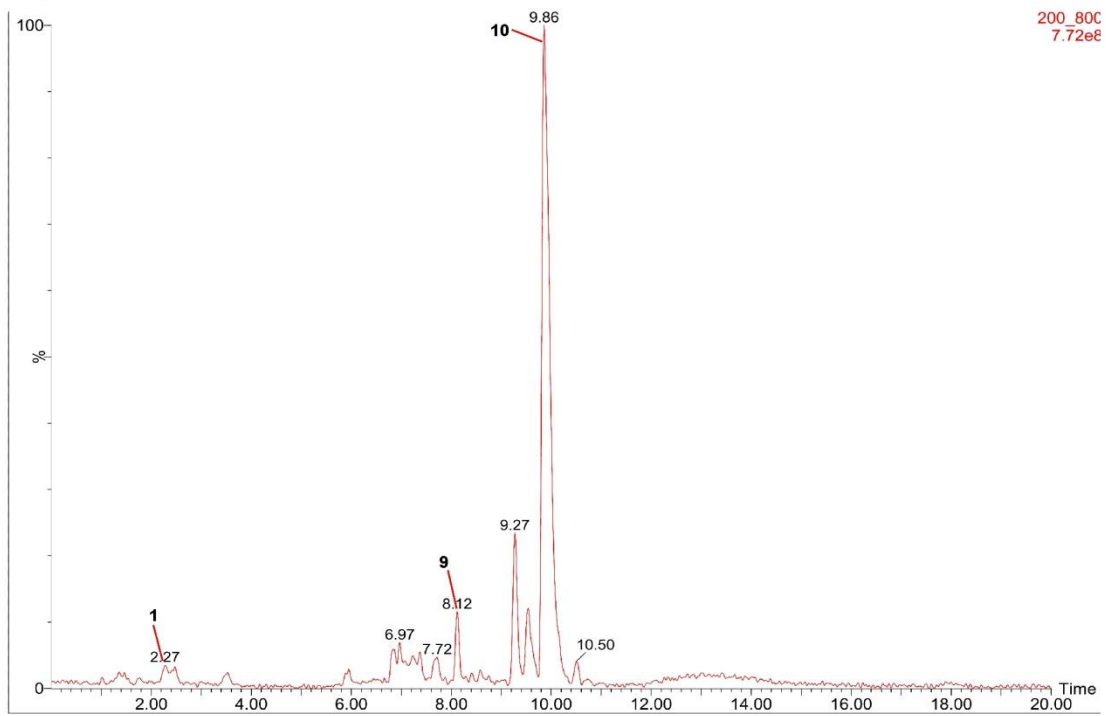
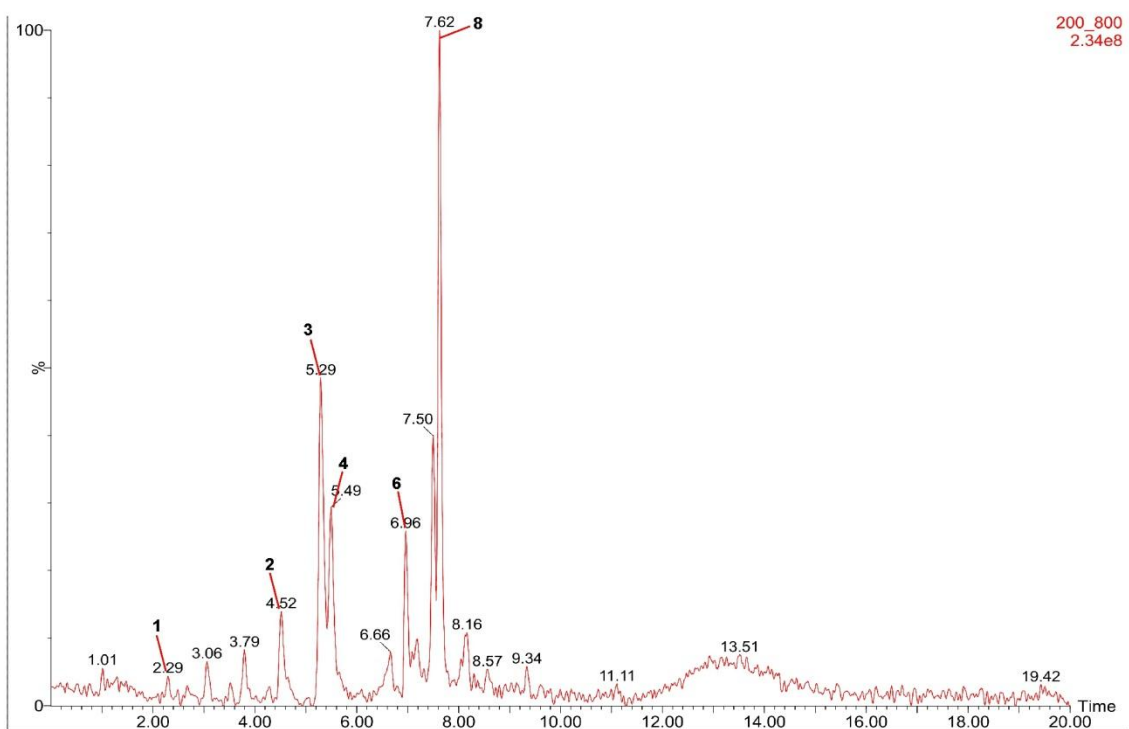
***H. glaucescens******H. hibrido***

Figura 47. Continuación.

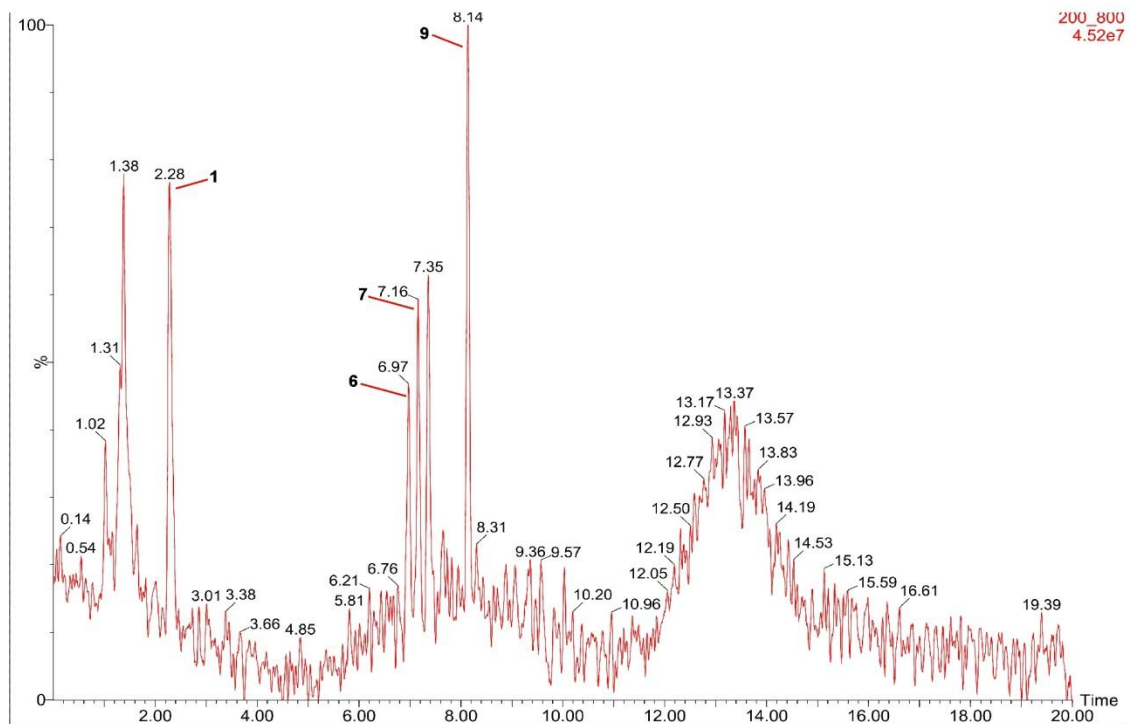
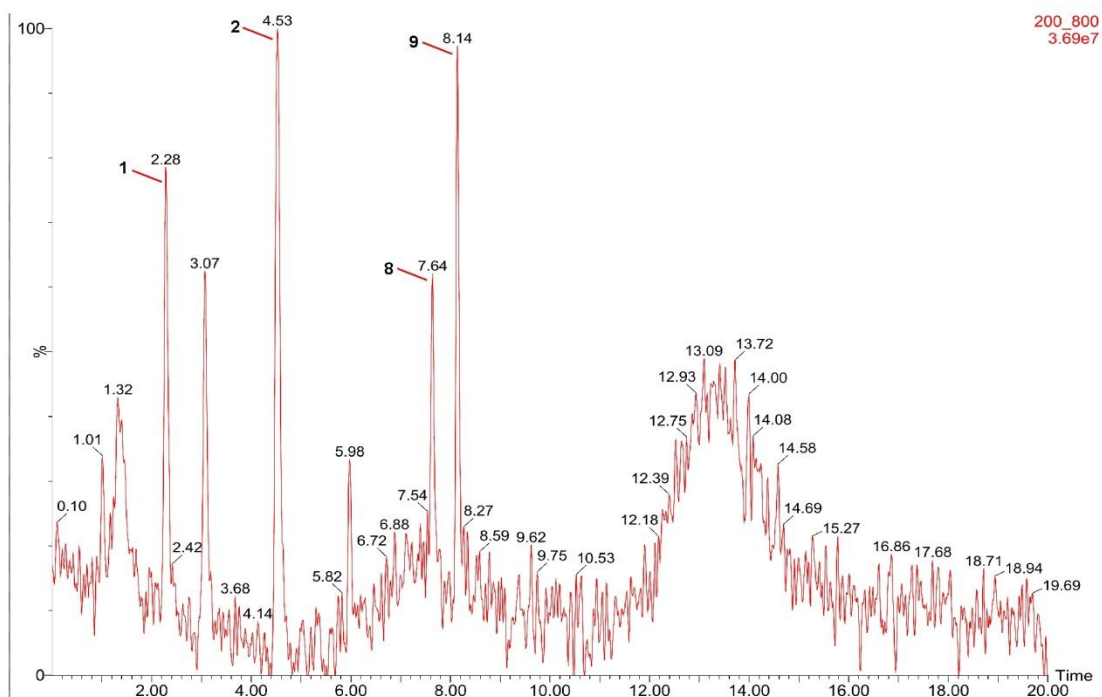
*H. petiolatum**H. puniceum*

Figura 47. Continuación.



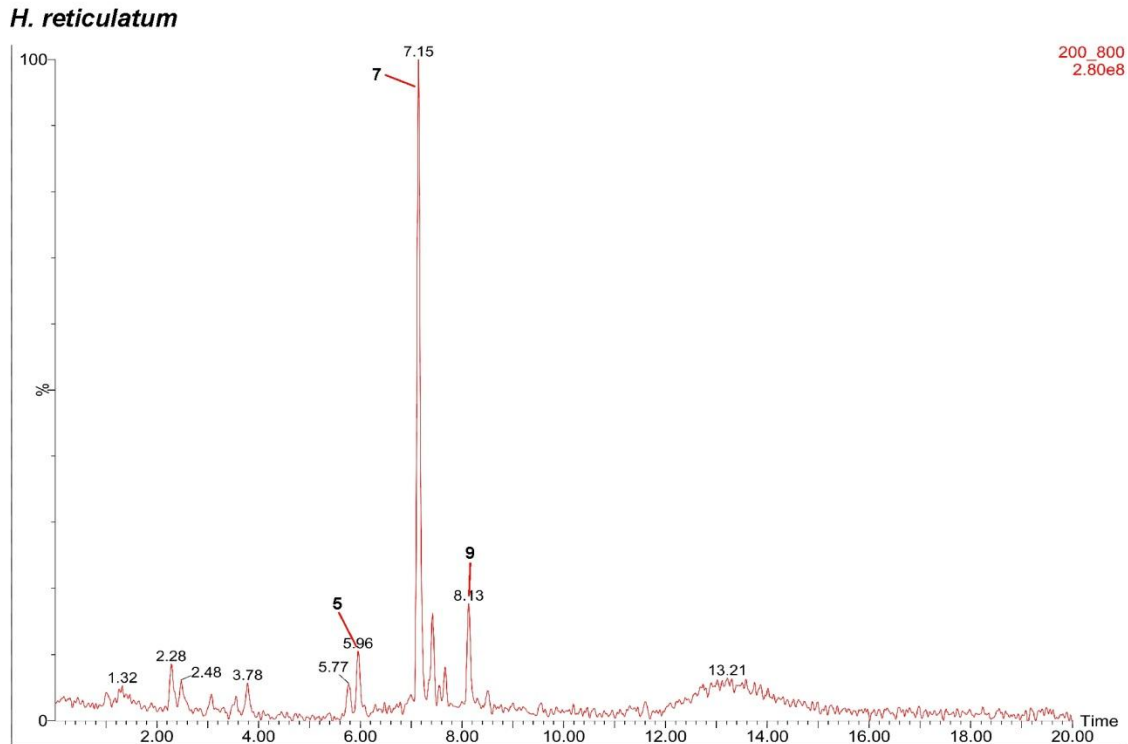


Figura 47. Continuación.

### 3.4.1.3. Cuantificación de montanina

Para cuantificar montanina en cada muestra, inicialmente se realizó una curva de calibración (figura 48), con concentraciones crecientes de montanina: 0,1; 1; 5 y 10 ppm ( $r^2 = 0,92$ ), y se realizó en el cromatógrafo ACQUITY UPLC (Waters Corp., Milford, MA) I-Class combinado con un espectrómetro de masas Xevo TQ-S.

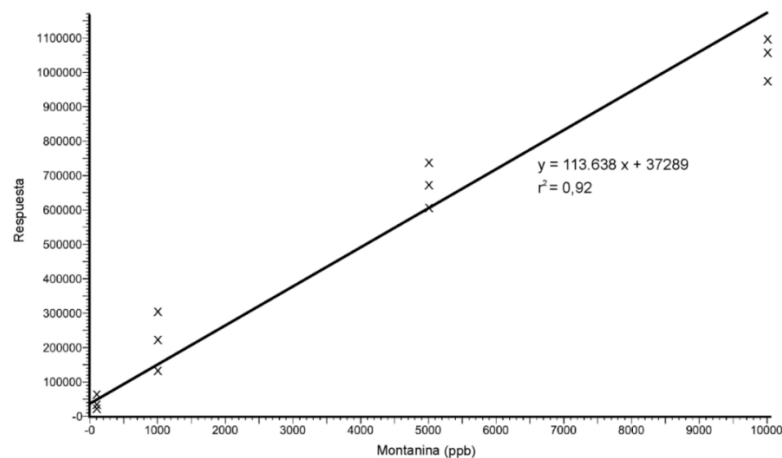


Figura 48. Curva de calibración de montanina.

Una vez obtenida la curva, se procesaron los EEA de las especies de *Hippeastrum*, como así también las fracciones de *H. híbrido* (tabla 10).

El análisis de los datos, mostró que el extracto con mayor contenido de montanina fue el obtenido a partir de los bulbos de *H. híbrido*, seguido por el EEA-*H. aglaiae* (14,34 y 4,90 %, respectivamente). En cuanto a las fracciones del EEA-*H. híbrido*, tres de las cuatro presentaron un alto contenido de montanina, siendo más abundante en la fracción 3 (24,76 %).

**Tabla 10.** Cuantificación de montanina en extractos y fracciones enriquecidas en alcaloides.

Especies/Fracciones	Montanina (%)
<i>Hippeastrum aglaiae</i>	4,90
<i>H. aulicum</i>	ND
<i>H. glaucescens</i>	ND
<i>H. híbrido</i>	14,32
<i>H. híbrido/F2</i>	13,82
<i>H. híbrido/F3</i>	24,76
<i>H. híbrido/F4</i>	10,20
<i>H. híbrido/F5</i>	<1
<i>H. petiolatum</i>	ND
<i>H. puniceum</i>	1,28
<i>H. reticulatum</i>	ND

#### 3.4.1.4. Conclusiones

A partir del análisis de los resultados obtenidos en esta parte del trabajo, se puede afirmar lo siguiente:

- Las especies argentinas del género *Hippeastrum*, son fuente de numerosos alcaloides con diversas actividades biológicas.
- Cada especie tiene una composición química particular.
- Licorina y Montanina fueron los alcaloides con mayor prevalencia.



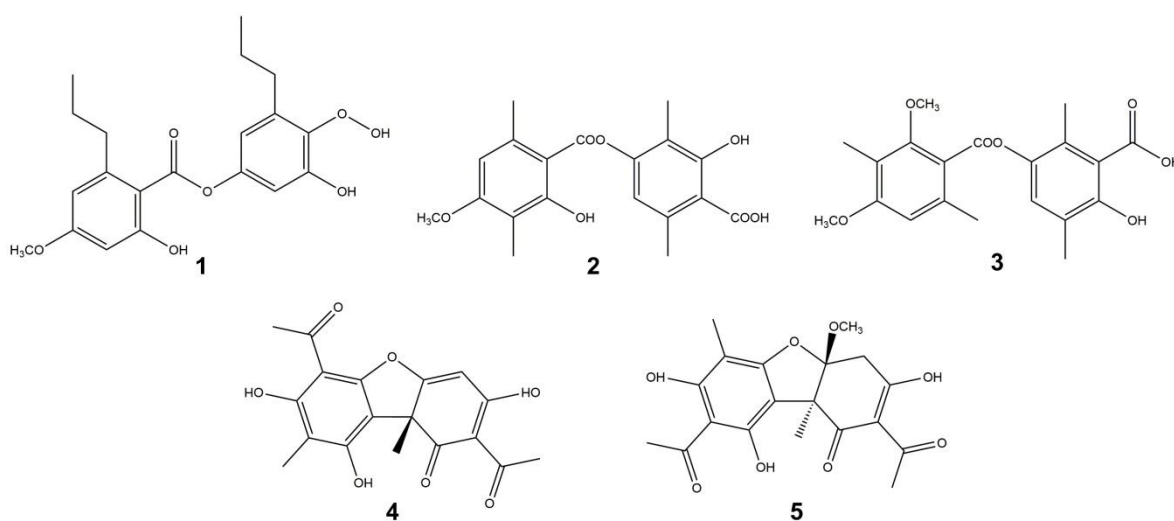
## Parte II Estudio químico

### b. *Usnea lethariiformis*



### 3.4.2.1. Caracterización química mediante UHPLC-MS de extractos y fracciones de *U. lethariiformis*

Se analizaron las muestras de los extractos EDCMUi, EDCMUs, EMeOHUI y de la fracción 5 del extracto EDCMUs. Las asignaciones de metabolitos se realizaron combinando espectros de masas completos y experimentos de MSn (masa precisa y patrón de fragmentación), tiempos de retención, comparación con los compuestos estándar y búsqueda en bases de datos públicas en línea (DNP, Mona, Reaxys y SciFinder). Los dépsidos: ácido divaricático (**1**), ácido barbático (**2**) y ácido difractaico (**3**), así como los dibenzofuranos ácido úsnico (**4**) y ácido placodiólico (**5**) se identificaron rápidamente en extractos de DCM, MeOH y en las fracciones de Sephadex bioactivas, utilizando patrones estándares disponibles (tabla 11). La figura 49 muestra las estructuras químicas de los ácidos fenólicos detectados e identificados. La identificación de la metabolómica se explica a continuación en detalle.



**Figura 49.** Dépsidos (**1-3**) y dibenzofuranos (**4, 5**) de *Usnea lethariiformis*.

### 3.4.2.2. Dépsidos

El pico con un ion  $[M - H]^-$  de  $m/z$  387,1382 fue identificado como ácido divaricático (**1**). El ion original produjo los principales iones con  $m/z = 194,9496$   $[M - H - C_{11}H_{12}O_3]^-$ , 176,9325  $[M - H - C_{11}H_{14}O_4]^-$  y 150,9483  $[C_9H_{11}O_2]^-$ , confirmando este dépsido. El compuesto con un ion  $[M - H]^-$  de  $m/z$  358,7383; que produjo iones fragmentados de

$m/z = 180,9062; 162,9865$  y  $136,9979$ ; fue identificado tentativamente como ácido barbático (**2**).

El ácido difractaico (**3**) fue identificado por su anión molecular de  $m/z = 373,3751$ . Su fragmentación dio como resultado iones con  $m/z = 328,9486; 296,9606$   $[M - H - C_2H_4O_3]^-$ ,  $281,9557; 208,9567; 165,0509$  y  $136,9751$   $[M - H - C_{12}H_{12}O_5]^-$ .

#### 3.4.2.3. Dibenzofuranos

Ácido úsnico (**4**) fue evidenciado con un ion  $[M - H]^-$  de  $m/z$  342,9167. Los principales iones hijos fueron: el pico  $[M - H - CH_3]^-$ ,  $[M - H - C_4H_3O_2]^-$  y  $[M - H - C_5H_3O_3]^-$  ( $m/z = 327,8604; 258,9390$  y  $230,9896$ ; respectivamente).

El ácido placodiólico (**5**) mostró un anión molecular de  $m/z = 375,1276$ . La fragmentación de este compuesto dio como resultado iones de  $m/z = 342,6169$   $[M - H - CH_3OH]^-$ ,  $299,0797; 258,9390$   $[M - H - C_5H_8O_3]^-$  y  $231,2895$   $[M - H - C_6H_8O_5]^-$ , soportando la identificación de este dibenzofurano.

**Tabla 11.** Principales compuestos identificados en extractos y fracción de *U. lethariiformis* mediante UHPLC-MS.

Extracto o fracción	Identificación tentativa	Masa teórica (m/z)	Masa medida (m/z)	Ion MS <sup>n</sup>
EDCMUIi (figura 50)	Ácido úsnico	343,0818	342,9746	327,7938; 258,9056; 230,9896; 83,1697
	Ácido placodiólico	375,1079	374,9765	342,6169; 299,0797; 258,9390; 231,2895; 180,2528; 82,8699
EDCMUIs (figura 51)	Ácido úsnico	343,0818	342,9898	327,8173; 258,8811; 230,9158; 82,9759
	Ácido barbático	359,1136	358,7383	180,9662; 162,9825; 136,9979
	Ácido difractaico	373,1293	373,0647	328,9486; 296,5931; 281,9387; 208,9328; 165,1217; 135,0482
	Ácido placodiólico	375,1079	375,0037	342,5246; 332, 8648; 315,1954; 301,9403; 257,1694; 235,0443; 215,0613; 134,8928
	Ácido divaricático	387,1449	387,0576	299,4164; 194,9496; 176,9325; 150,9483
EMeOHUI (figura 52)	Ácido úsnico	343,0818	343,0131	327,8014; 258,9029; 230,9416; 83,0304
	Ácido placodiólico	375,1079	374,9765	342,5125; 299,3799; 255,0130; 180,1390; 82,8378
Fracción 5 EDCMUIs (figura 53)	Ácido úsnico	343,0818	342,9143	328,0858; 259,0429; 231,0231; 82,9375
	Ácido placodiólico	375,1079	375,0223	342,4137; 332, 8559; 315,0045; 301,0392; 257,0702; 235,1125; 214,9846; 135,0900

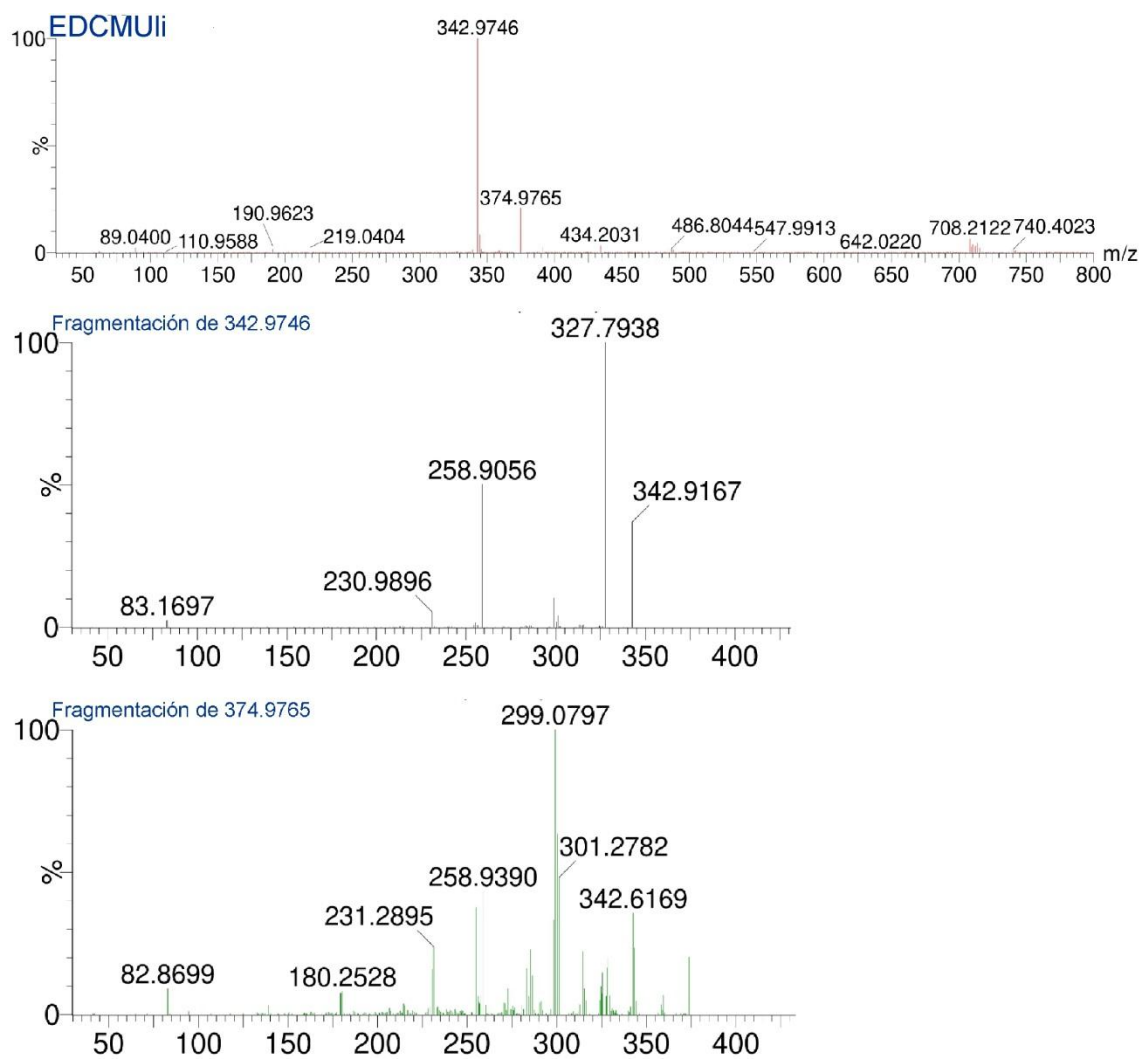


Figura 50. Espectro de masas del EDCMUI.

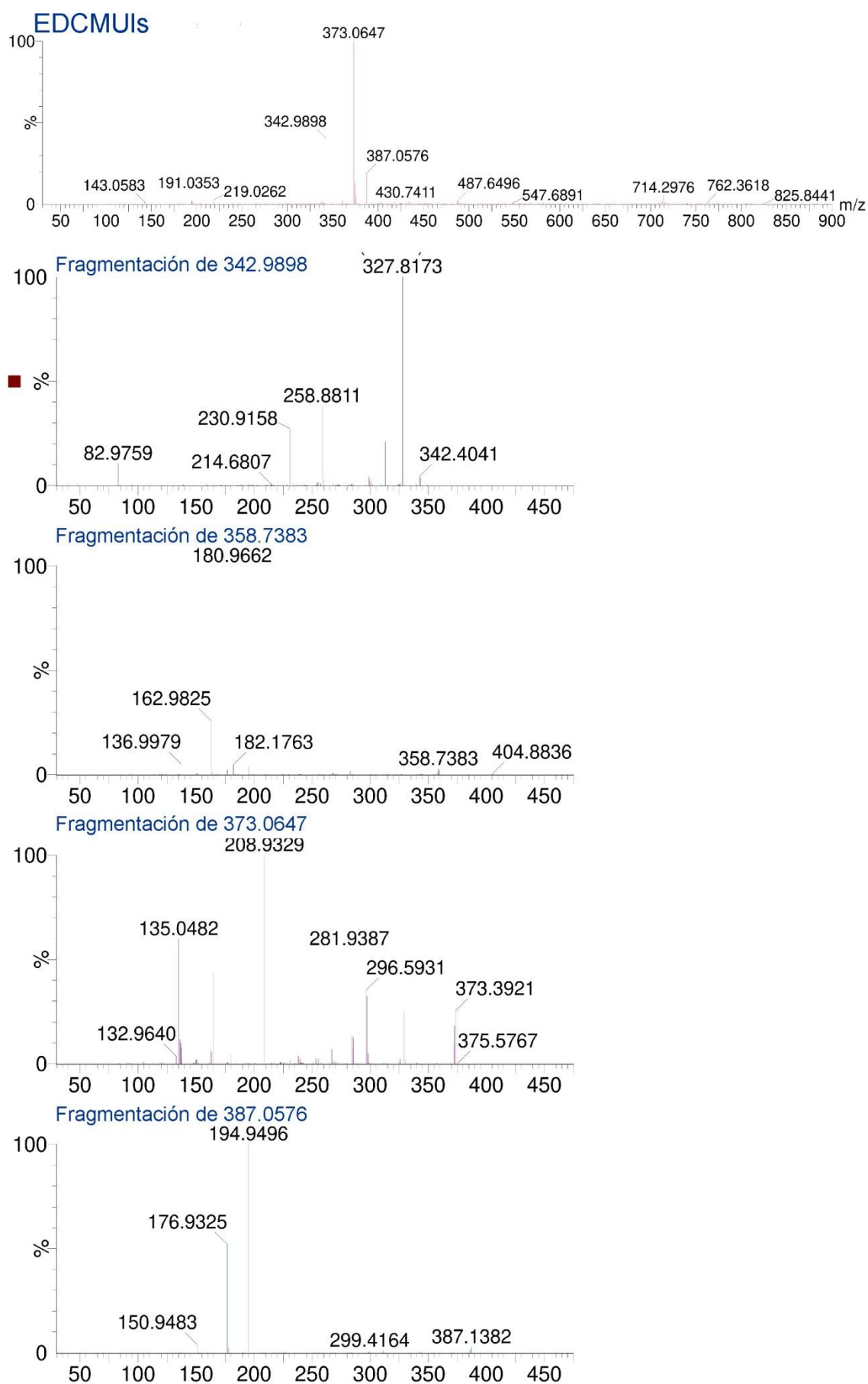


Figura 51. Espectro de masas del EDCMUIs.



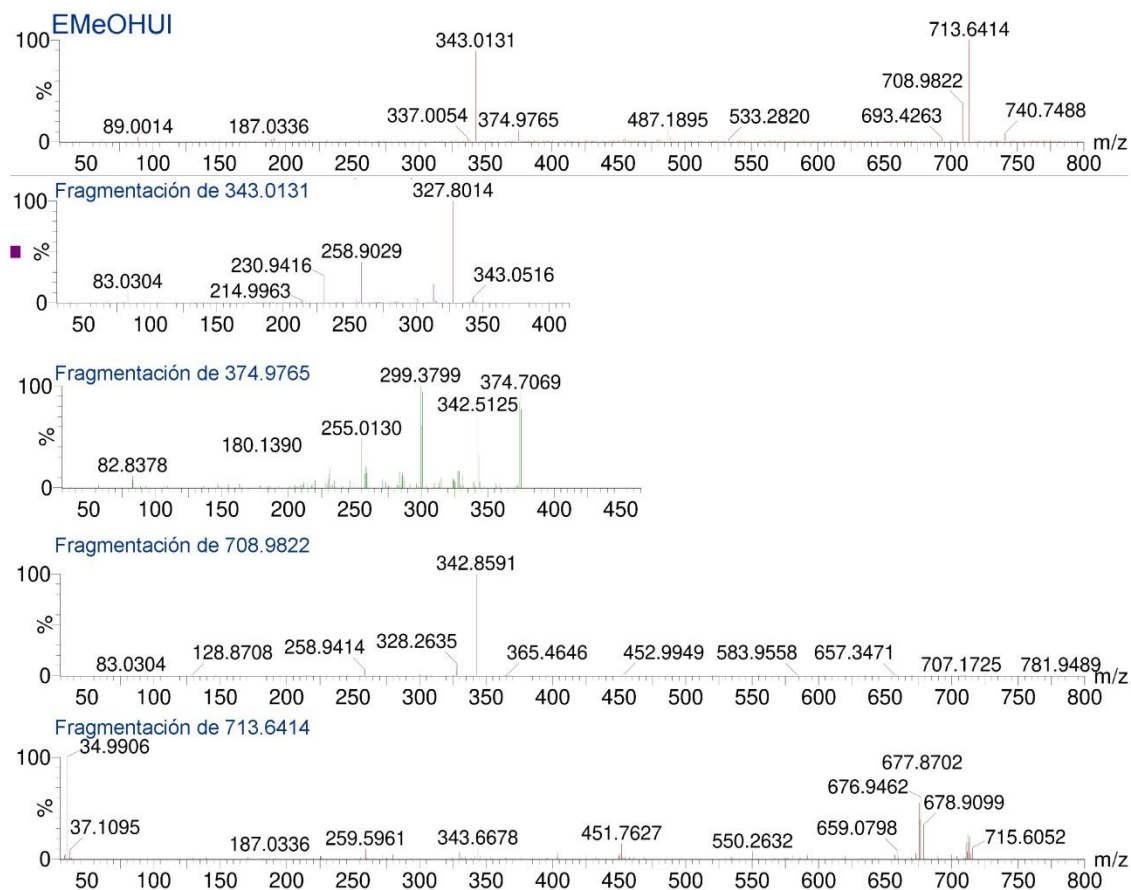
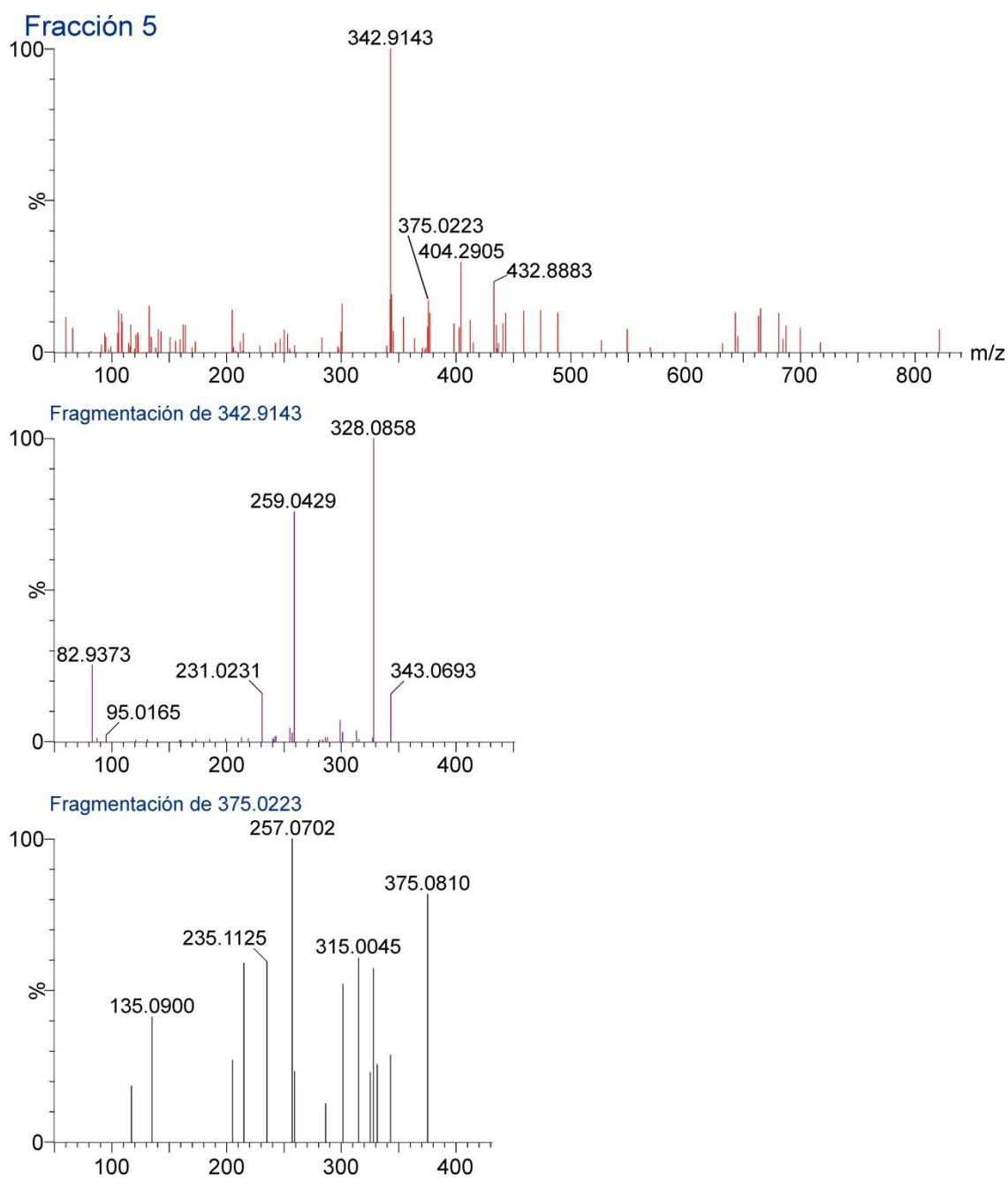


Figura 52. Espectro de masas del EMeOHUIs.



**Figura 53.** Espectro de masas de la fracción 5 del EDCMUs.

### 3.4.2.3. Conclusiones

A partir del análisis de los resultados obtenidos sobre el líquen estudiado, se puede afirmar lo siguiente:

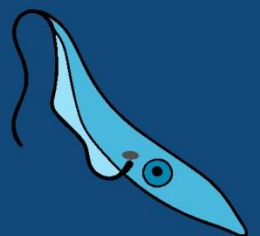
- *U. lethariiformis* posee una variedad de compuestos fenólicos potencialmente bioactivos.

- Ácido úsnico está presente en los extractos y fracciones más activas de *U. lethariiformis*.



# Capítulo IV

## Discusión



La exploración de plantas medicinales siempre ha sido importante para la salud humana y la necesidad de medicamentos de origen natural es tan amplia que se piensa que es un comportamiento evolutivo profundo (Hardy, 2021). Recientemente, la pandemia de COVID-19 ha reforzado lo esencial que es tener moléculas disponibles para curar o al menos mitigar enfermedades (Komolafe *et al.*, 2021). En este contexto, el descubrimiento y aislamiento de nuevos compuestos adicionales, vinculados a sus actividades biológicas, es una contribución notable para la salud humana. Las escasas alternativas disponibles para el tratamiento de la EC y sus efectos adversos sobre los pacientes, estimulan la búsqueda incesante de nuevas moléculas activas contra *T. cruzi*.

Los extractos y compuestos naturales aislados de plantas nativas ensayados, presentaron resultados de bioactividad relevante frente a epimastigotes de *T. cruzi*.

Solamente el EEA-*E. terscheckii* reportó baja actividad por lo que no se prosiguió con su estudio biológico. Sin embargo, el resultado aporta el primer registro de actividad anti-*T. cruzi* de una especie del género *Echinopsis*.

La actividad anti-*T. cruzi* de un compuesto o extracto se puede clasificar como tripanostática cuando solamente inhibe la proliferación de las formas replicativas, o bien puede ser tripanocida si se produce muerte celular del parásito. Además, puede presentarse un efecto combinado tripanostático y tripanocida. En este trabajo, los extractos de *S. mendozanum* (hojas y tallos) presentaron una potente actividad tripanocida frente a epimastigotes, con una mortalidad superior al 99 % de la población. Por otra parte, los EEA de las especies de *Hippeastrum* mostraron un efecto combinado tanto tripanostático como tripanocida en menor medida. En cuanto al extracto de *M. viscifolia* y su compuesto aislado pristimerina, la actividad fue solo tripanostática con una inhibición de la proliferación cercana al 100 %, sin evidencia de muerte celular. Previamente, dos Santos *et al.* (2013) reportaron actividad de pristimerina aislada de *M. ilicifolia* frente a epimastigotes de la cepa Y. Recientemente, varios expertos en el campo del descubrimiento de fármacos y la iniciativa “*Drugs for Neglected Diseases*”

publicaron un perfil que describe las características requeridas para el producto final ideal y para guiar el desarrollo de nuevos tratamientos, en el que incluyen que la actividad debe ser frente a diferentes DTUs (García y Cardona, 2021). Por otra parte, la presencia de pristimerina en las raíces de *M. viscifolia*, amplía el rango de especies de las cuales se puede obtener este triterpenoide que posee una amplia variedad de efectos biológicos y farmacológicos. Pristimerina ha ganado atención, especialmente por sus posibles actividades anticancerígenas, las cuales se han ilustrado en varias líneas de células cancerosas y modelos animales. Se encontró que pristimerina inhibe *in vitro* e *in vivo* la proliferación, supervivencia, angiogénesis y metástasis de células tumorales (Yousef *et al.*, 2017).

Los líquenes son asociaciones simbióticas entre especies fúngicas (micobiontes) y algas o cianobacterias (fotobiontes). Se conocen más de 17.000 especies y más de 800 productos de líquenes. Los polisacáridos, proteínas y metabolitos secundarios producidos por los líquenes han llamado la atención de los investigadores debido a sus actividades biológicas (Rabelo *et al.*, 2012). Respecto a la actividad anti-*T. cruzi* de *U. lethariiformis*, en este trabajo los extractos metanólicos y los de diclorometano, como así también sus fracciones, reportaron un potente efecto sobre la proliferación de epimastigotes. El análisis químico mostró la presencia de ácido úsnico en los tres extractos, así como en las fracciones bioactivas.

Desde su primer aislamiento en 1844, el ácido úsnico se ha convertido en el metabolito de líquen más estudiado y uno de los pocos disponibles comercialmente. En este trabajo de tesis, el ácido úsnico, previamente purificado del líquen *Protosnea poeppigii* (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2008), fue evaluado contra epimastigotes de la cepa Dm28c de *T. cruzi* y mostró una inhibición mayor a Bzn, el fármaco de referencia para tratar la EC, en concordancia con lo reportado por de Carvalho *et al.* (2005). Este compuesto natural ha mostrado diferentes actividades biológicas y fisiológicas tales como: antiinflamatorias, analgésicas, cicatrizantes, antioxidantes, antimicrobianas, antiprotozoarias, antivirales, larvicidas y protectoras de rayos UV, que pueden tener una

gran relevancia en farmacología y clínica (Araújo *et al.*, 2015; Manojlovic *et al.*, 2012). De acuerdo con las bioactividades informadas por otros autores, y sumando las obtenidas en este trabajo, se puede afirmar que este compuesto es en gran medida el responsable de la actividad anti-*T. cruzi* de los extractos y/o fracciones de *U. lethariiformis*. Sin embargo, la F5 del EDCMUIs produce mayor inhibición de la proliferación de *T. cruzi* que el ácido úsnico para una misma concentración (10 µg/mL). Esta actividad podría asignarse a la presencia del ácido placodiólico, identificado mediante UHPLC/MS-MS, y/u otros compuestos aún no identificados en F5, los cuales podrían tener una mayor actividad que el ácido úsnico, o bien potenciarla (el aislamiento e identificación de estas moléculas, requiere una cantidad de muestra no disponible durante este trabajo). Sin embargo, se destaca que, en este trabajo de tesis se informa por primera vez la actividad biológica de *U. lethariiformis*, como así también a su estudio químico, sentando las bases para futuros estudios de bioactividad y resaltando la importancia de hallar organismos, con compuestos activos tales como el ácido úsnico, en la biodiversidad Argentina.

El perfil químico de los EEA de las especies de *Hippeastrum* mostró un total de quince alcaloides, reportando por primera vez la presencia de 11,12-dehidroanhidrolícorina en *H. aulicum*; 8-O-demetilhomolícorina, hippeastrina y montanina en *H. puniceum* y 8-O-demetilhomolícorina en *H. reticulatum*, ampliando la lista de alcaloides previamente informados para estas especies (Soprani *et al.*, 2021; Bessa *et al.*, 2017; Tallini *et al.*, 2017). Este trabajo presenta el primer perfil de alcaloides para *H. aglaiae*, que mostró la presencia de los alcaloides 8-O-demetilhomolícorina, lícorina, montanina y norlícoramina. El EEA-*H. híbrido* reportó los alcaloides 2-hidroxihomolícorina, 7-hidroxiclivonina, galantamina, hippeastrina, lícorina, montanina y pancracina, compartiendo un gran porcentaje de alcaloides con los hallados en *H. argentinum* (Ortiz *et al.*, 2016).

En cuanto a la actividad anti-*T. cruzi*, los alcaloides identificados en los EEA, lícorina, hippeastrina y montanina han sido reportados por su efecto inhibitorio frente a las

formas amastigotes (Martinez-Peinado *et al.*, 2020), mientras que pancracina reporta actividad frente a tripomastigotes de *T. cruzi* (Labraña *et al.*, 2002). Recientemente, de Souza y Barrias (2020) propusieron un nuevo esquema del ciclo de vida de *T. cruzi*, donde se describen formas tipo epimastigotes con capacidad infectiva y proliferativa, destacando la importancia de tener en cuenta estas etapas (formas tipo epimastigotes), estableciendo que se trata de una nueva diana para el tratamiento durante el curso de la EC. Este nuevo enfoque respalda el trabajo previo desarrollado por Kessler *et al.* (2017), quienes reportaron epimastigotes diferenciados con la capacidad de infectar células de mamíferos. Con base en estos avances en la investigación de la EC, se destacan los ensayos de los EEA de las especies de *Hippeastrum* en epimastigotes de *T. cruzi*. En la literatura, los valores  $CI_{50}$  de los EEA de Amaryllidaceae han sido reportados por sus propiedades anti-*T. cruzi* con valores  $\geq 100 \mu\text{g/mL}$ . (Castañeda *et al.*, 2021; Martinez-Peinado *et al.*, 2022). Los EEA-*H. aglaiae* y EEA-*H. híbrido*, mostraron el mayor efecto inhibitorio contra la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi* con una  $CI_{50}$  inferior a la de Bzn ( $CI_{50} = 0,0026 \mu\text{g/mL}$ ,  $CI_{50} = 0,96 \mu\text{g/mL}$ , y  $IC_{50} = 4,58 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente). Además, la actividad antiproliferativa del EEA-*H. aglaiae* y del EEA-*H. híbrido* persistió incluso a las 72 h. La actividad de ambos EEA podría explicarse por la presencia de licorina y montanina, respectivamente. Para probar el compuesto responsable de la actividad del EEA-*H. híbrido* y sus fracciones, se realizó el ensayo de montanina pura frente a *T. cruzi*, mostrando una respuesta dosis-dependiente. La potente actividad de montanina ( $CI_{50} = 0,55 \mu\text{g/mL}$ ), junto a los datos de su cuantificación en los EEA y fracciones, sugiere que la presencia de montanina contribuye en gran medida al efecto inhibitorio.

Previo a este estudio, pocos extractos o compuestos obtenidos directamente de individuos del género *Hippeastrum* han sido probados contra *T. cruzi*. Por ejemplo, la mezcla de epímeros  $6\alpha$ -hidroximaritidina y  $6\beta$ -hidroximaritidina aislados de *H. reticulatum* se evaluaron frente a cuatro especies de protozoos que mostraron poca actividad con valores de  $CI_{50} = 30,68 \mu\text{g/mL}$  en *T. brucei rhodesiense*,  $CI_{50} = 66,11$



$\mu\text{g/mL}$  en *T. cruzi*,  $\text{CI}_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$  en *Leishmania donovani* y  $\text{CI}_{50} = 32,86 \mu\text{g/mL}$  en *Plasmodium falciparum*, así como baja citotoxicidad en células L6, con valores de  $\text{CC}_{50}$  superiores a  $100 \mu\text{g/mL}$  (Tallini *et al.*, 2017). En este estudio, se encontró que el EEA-*H. escoipense* afectó específicamente el crecimiento de todos los estadios de *T. cruzi*. También mostró baja toxicidad frente a células Vero y células HepG2, y fue más activo frente a amastigotes, con un valor de  $\text{CI}_{50} = 1,53 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$  y un valor de  $\text{SI} = 21,32$ . Los índices de selectividad del EEA-*H. escoipense* fueron inferiores a Bzn para todos los estadios de *T. cruzi*, sin embargo, estos resultados son superiores a los valores estipulados por Martínez-Peinado *et al.* (2020) ( $\text{SI} > 10$ ) para considerar al EEA-*H. escoipense* como un potente agente anti-*T. cruzi*. Para determinar la contribución a la actividad biológica del alcaloide principal hallado en el EEA-*H. escoipense*, candimina, se aisló y probó en los tres estadios de *T. cruzi*. Candimina mostró actividad específica contra las formas replicativas y no replicativas de *T. cruzi*. En epimastigotes, candimina evidenció un valor de  $\text{CI}_{50} = 4,28 \pm 0,47 \mu\text{M}$ , mientras que Bzn una  $\text{CI}_{50} = 8,21 \pm 1,40$ . Adicionalmente, para determinar un posible mecanismo de acción, se evaluó si candimina afectaba o modificaba la ultraestructura del parásito o afectaba la actividad mitocondrial en los epimastigotes. La microscopía electrónica ha demostrado ser una herramienta confiable e imprescindible para determinar alteraciones morfológicas y organelas diana en la investigación de nuevos fármacos para la EC (Menna-Barreto *et al.*, 2009). Luego de 48 h de tratamiento con 7,07 y 14,1  $\mu\text{M}$  de candimina, los parásitos mostraron severos cambios en su ultraestructura, como por ejemplo: intensa vacuolización, burbujas en la membrana citoplasmática y desorganización de las estructuras tipo-reservosomas, siendo estos más evidentes en el tratamiento con mayor concentración. Previamente, Giordani *et al.* (2010a) observaron alteraciones similares en *Trichomonas vaginalis* tratadas con 250  $\mu\text{M}$  de candimina durante 6 y 24 h, principalmente vacuolización en el citoplasma y en la membrana que sugieren muerte celular paraptótica. Elso *et al.* (2022) observaron desorganización de las estructuras del tipo-reservosomas en epimastigotes después de 24 h de tratamiento con

concentraciones 27  $\mu\text{M}$  para ambas moléculas (estafietina y eupatoriopicrina). En contraste, las dosis de candimina con efecto anti-*T. cruzi* fueron significativamente inferiores en las alteraciones ultraestructurales observadas. Con respecto a la cinética de la curva de crecimiento, Giordani *et al.* (2010a) informaron que candimina detiene el ciclo celular de *T. vaginalis* en la fase G2, similar efecto sobre la división celular se podría considerar para explicar la reducción en el número de epimastigotes obtenido. El hecho de que los cinetoplastidos tengan una mitocondria de una sola ramificación con una estructura de ADN llamada cinetoplasto, que no está presente en las células de los mamíferos, convierte a esta organela en un objetivo farmacológico atractivo, porque el sistema de transporte de electrones mitocondrial representa un punto crítico de fuga de electrones y la consiguiente producción de ERO en *T. cruzi* (Bombaça *et al.*, 2019; Spina *et al.*, 2018). Si bien, en los epimastigotes de *T. cruzi* tratados con candimina no se evidenciaron alteraciones morfológicas en la mitocondria por la microscopia electrónica, si se observó un aumento de la actividad mitocondrial en el ensayo de MTT en los parásitos incubados con candimina (28,3  $\mu\text{M}$ ). Este incremento en la actividad mitocondrial podría estar vinculado a un aumento en el metabolismo del parásito para tratar de evitar daño celular (Wilkinson *et al.*, 2000). Por otra parte, cuando las formas infectivas (tripomastigote+amastigote) se trataron con candimina, la actividad fue específica con valores de  $\text{CI}_{50} = 2,49 \pm 0,16 \mu\text{M}$ , mientras que la toxicidad en células Vero y HepG2 fue muy baja, que resultó en un valor alto de IS (102,57).

En el estadio amastigote, la principal forma clínica relevante en la fase crónica de la EC, candimina mostró un mejor IS que Bzn (159,63 y 147,55, respectivamente). Esto indica que candimina podría ser más tolerable para el huésped mamífero. El aumento de la actividad contra *T. cruzi* de los compuestos con presencia de uno o más grupos metoxilos está ampliamente reportado (Izumi *et al.*, 2011). En relación a esto, la potente actividad de candimina se podría asignar al sustituyente metoxilo en la posición 7 del anillo aromático. Otro alcaloide perteneciente a la familia Amaryllidaceae, hippeastrina, sin el grupo metoxilo de candimina, también evidenció actividad contra *T. cruzi*, pero

con menor efecto sobre los amastigotes y valor del IS menor para células Vero ( $CI_{50} = 3,31 \mu\text{M}$ ;  $IS = 12,7$ ) (Martinez-Peinado *et al.*, 2020), lo que indicaría que candimina es un mejor candidato anti-*T. cruzi* que hippeastrina. Adicionalmente, Souza *et al.* (2021) demostraron que la actividad anti-*T. cruzi* se puede mejorar reemplazando la funcionalidad altamente reactiva de la  $\beta$ -dicetona en la estructura de la curcumina por una adición selectiva de grupos metoxilos en los anillos aromáticos terminales. Esta configuración estructural podría facilitar la formación de radicales fenoxilos produciendo un aumento en las ERO con la participación del oxígeno del grupo metoxilo (Litwinienko y Ingold, 2004). Similarmente, en otros tripanosomátidos como *T. brucei* y *L. mexicana* se ha asignado la actividad al grupo metoxilo de los compuestos ensayados (Alotaibi *et al.*, 2021). Estos resultados posicionan a candimina como una molécula líder y agente promisorio para tratar la EC.

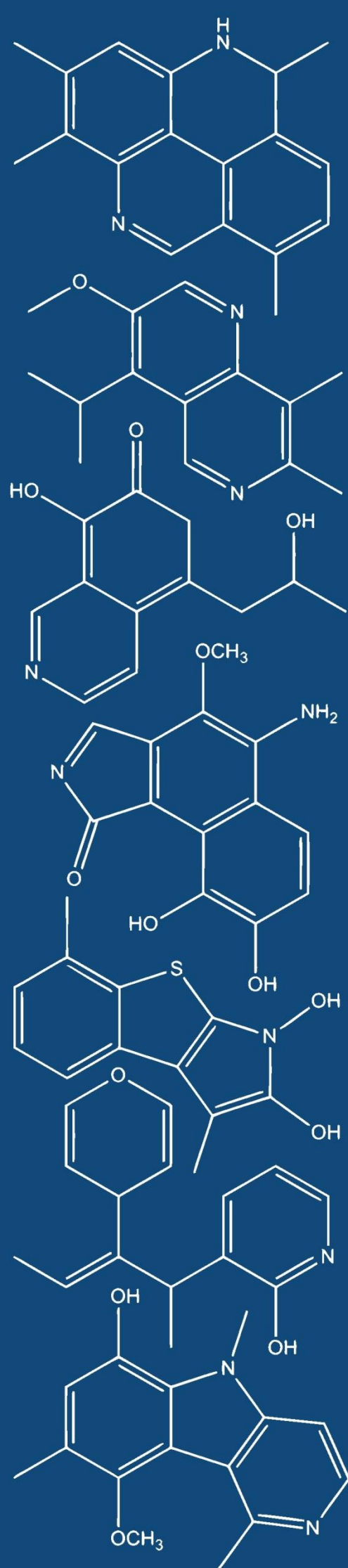
Las terapias combinadas se utilizan para tratar diversas enfermedades infecciosas, como la toxoplasmosis, la malaria, la tuberculosis, la sífilis y el sida (OMS, 2022). Las estrategias para el tratamiento de la EC se orientan a reducir los efectos secundarios que produce el Bzn (Ribeiro *et al.*, 2020; Puente *et al.*, 2018), de este modo las terapias combinadas para tratar la EC podrían ser una alternativa prometedora para mejorar la eficacia de los medicamentos al dirigirse a múltiples vías metabólicas, reduciendo la aparición y/o intensidad de los efectos secundarios y el riesgo de resistencia a los medicamentos (Hernández *et al.*, 2021). Recientemente, Santos *et al.* (2020) probaron combinar alcaloides como el carbol con Bzn, los resultados mostraron una reducción de la parasitemia en modelos murinos. En esta tesis, se destacan los resultados de sinergia obtenidos de la combinación de montanina con Bzn, donde para un efecto similar se redujo la dosis de Bzn alrededor de 20 veces. Además, montanina mostró baja tasa de citotoxicidad en células HepG2 con un valor de  $CC_{50} = 46,10 \mu\text{M}$  (Martinez-Peinado *et al.*, 2020). Estos resultados posicionan al alcaloide montanina como potenciador del efecto del Bzn, reduciendo las dosis empleadas para lograr una

inhibición cercana al 100 %. También es interesante el efecto sinérgico que produce la adición de montanina al EEA-*H. híbrido*, que principalmente contiene montanina. Sin embargo, la combinación entre el EEA-*H. híbrido* y Bzn mostró un efecto antagónico. Si bien, EEA-*H. híbrido* contiene alcaloides anti-*T. cruzi* (hippeastrina, licorina, montanina y pancracina), probablemente la interacción que resulta de estos y/o los demás presentes combinados con Bzn contrarrestan el efecto antiparasitario. Posiblemente, el *pool* de alcaloides presente en el EEA-*H. híbrido* con la adición extra de montanina mejora la actividad antiparasitaria, esto abre una ventana para futuros ensayos del efecto de la interacción entre alcaloides de la familia Amaryllidaceae contra *T. cruzi*.

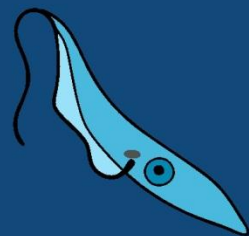
Por otra parte, la combinación de candimina y Bzn mostró al menos una interacción sinérgica en cada estadio de *T. cruzi*. En los epimastigotes la interacción sinérgica se presentó en las concentraciones combinadas más bajas. En cuanto al cultivo mixto de tripomastigotes+amastigotes, las interacciones generales de los compuestos resultaron aditivas, con un ligero sinergismo a la concentración de  $2 \times \text{Cl}_{50}$ . Por otro lado, en amastigotes destaca la combinación de concentraciones más altas,  $2 \times \text{Cl}_{50}$  y  $4 \times \text{Cl}_{50}$ , con un potente sinergismo (IC = 0,731 y 0,08, respectivamente). La latencia de los amastigotes intracelulares de *T. cruzi* en los tejidos representa un desafío en la búsqueda de nuevas terapias para la EC. Durante la fase crónica de la enfermedad, los parásitos tienen un metabolismo reducido y pueden ser menos susceptibles a la acción de los fármacos. Por lo tanto, el desarrollo de ensayos con formas de amastigotes es fundamental para el éxito de la terapia de la EC (Villalta *et al.*, 2019). Aunque el Bzn es ampliamente utilizado, una de sus principales desventajas es la aparición de efectos adversos graves. Los pacientes tratados pueden presentar exantema, edema generalizado, fiebre, polineuropatía, polineuritis y complicaciones de la médula ósea (Bern, 2011), por lo que el objetivo es reducir o eliminar la administración de Bzn. Cuando *T. cruzi* fue tratado con candimina y Bzn, algunas interacciones mostraron una potente interacción sinérgica. Sin embargo, todas las combinaciones para todos los estadios de *T. cruzi* informaron una reducción de la dosis de Bzn (IRD > 1). Candimina

resulta ser un buen candidato para combinar con Bzn y disminuir las dosis para obtener un potente efecto anti-*T. cruzi*. Además de esto, la combinación de candimina y Bzn resultó antagónica para las células Vero y HepG2, lo que indica una disminución de la citotoxicidad de ambas drogas cuando actúan en conjunto.

Hasta el momento, montanina y candimina son los primeros alcaloides aislados de plantas de la sub-familia Amaryllidoideae evaluados en combinación con Bzn, que presentaron un potente efecto inhibitorio.



# Conclusiones



Los resultados aquí presentados permiten mostrar tanto la actividad contra *Trypanosoma cruzi* de extractos y compuestos naturales aislados de especies vegetales y líquenes nativos, como la composición química. De esta manera se aportan conocimiento y hechos que contribuyen a profundizar en este tipo de estudios y al mismo tiempo motivar la conservación y preservación de la biodiversidad argentina.

- ✓ Los extractos y/o fracciones de las especies *H. aglaiae*, *H. aulicum*, *H. escoipense*, *H. glaucescens*, *H. petiolatum*, *H. puniceum*, *H. reticulatum*, *H. híbrido*, *M. viscifolia*, *S. mendozanum* y *U. lethariiformis*, como los compuestos candimina, montanina, pristimerina y ácido úsnico fueron activos frente epimastigotes de *T. cruzi*.
- ✓ *H. escoipense* y candimina evidenciaron potente actividad frente a tripomastigotes y amastigotes con valores de  $CI_{50}$  similares o inferiores a Bzn.
- ✓ Candimina además produjo alteraciones en la morfología y en el funcionamiento mitocondrial de epimastigotes a bajas concentraciones (14,1  $\mu$ M).
- ✓ La interacción entre montanina y Bzn redujo la concentración de Bzn alrededor de 20 veces.
- ✓ La combinación de candimina y Bzn logró efectos sinérgicos en todos los estadios de *T. cruzi*, destacándose frente a amastigotes, la forma dominante del parásito en la etapa crónica de la enfermedad.
- ✓ Las interacciones resultantes de la combinación entre PNs y Bzn podrían ser una estrategia alternativa para tratar la EC.
- ✓ Se identificaron 13 alcaloides en los EEA del género *Hippeastrum*, de los cuales licorina y montanina fueron los de mayor prevalencia.
- ✓ Los alcaloides identificados hippeastrina, licorina, montanina y pancracina fueron previamente informados como activos contra *T. cruzi*.
- ✓ En el liquen *U. lethariiformis* se identificaron 5 compuestos fenólicos, de los

cuales ácido úsnico fue el más abundante.

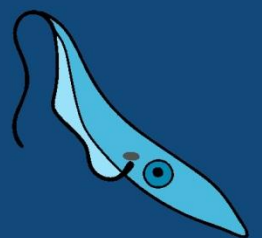
El conocimiento generado en este trabajo, constituye un aporte valioso, novedoso y sienta las bases para la continuidad de la temática, vinculada a la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos frente a *Trypanosoma cruzi* y profundizar sobre el estudio de los mecanismos de acción involucrados.

Adicionalmente, las metodologías y procesos aplicados para determinar la efectividad de la combinación de compuestos constituyen una herramienta útil, que además puede extrapolarse a otros productos naturales con potencialidad para disminuir las dosis y efectos adversos de Bzn (fármaco de referencia disponible actualmente).





# Referencias bibliográficas



1. Aguilera, E., Varela, J., Serna, E., Torres, S., Yaluff, G., Bilbao, N. V. D., González, M. 2018. Looking for combination of Bzne and *Trypanosoma cruzi*-triosephosphate isomerase inhibitors for Chagas disease treatment. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113, 153-160.
2. Akgul, A., Akgul, S., Senol, G., Yildirim, H., Secmen, O., Dogan, Y. 2018. An ethnobotanical study in Midyat (Turkey), a city on the silk road where cultures meet. *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, 14, 1– 18.
3. Albajar Viñas, P. 2007. Organización y estructura de la atención médica en la infección/EC. Lecciones aprendidas en 15 proyectos, en La EC a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral. Buenos Aires. Organización Panamericana de la Salud/Fundación Mundo Sano. <http://www.paho.org/hq/>
4. Alonso-Padilla, J., Cortés-Serra, N., Pinazo, M.J., Bottazzi, M.E., Abril, M., Barreira, F., Sosa-Estani, S., Hotez, P., Gascón, J. 2019. Strategies to enhance access to diagnosis and treatment for Chagas disease patients in Latin America. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 17(3), 145-157.
5. Alotaibi, A., Ebiloma, G.U., Williams, R., Alfayez, I.A., Natto, M., Alenezi, S., Watson, D. 2021. Activity of Compounds from Temperate Propolis against *Trypanosoma brucei* and *Leishmania mexicana*. *Molecules*, 26(13), 3912.
6. Álvarez, M.G., Ramírez, J.C., Bertocchi, G., Fernández, M., Hernández, Y., Lococo, B., Viotti, R. 2020. New scheme of intermittent Bzne administration in patients chronically infected with *Trypanosoma cruzi*: clinical, parasitological, and serological assessment after three years of follow-up. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(9), e00439-20.
7. Álvarez-Hernández, A., Franyuti-Kellya, G.A., Díaz-López-Silva, R., González-Chávez, A.M., González-Hermosillo-Cornejo, D., Vázquez-López, R. 2016. Chagas disease: Current perspectives on a forgotten disease. *Rev Med Hosp Gen Méx.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.hgmx.2016.09.010>
8. Amieva, C. 2014. El chagas en la actualidad de latinoamérica: viejos y nuevos problemas, grandes desafíos. *Aposta revista de ciencias sociales* Nº 62.
9. Andrade-Neto V.F., Brandão M.G., Stehmann J.R., Oliveira L.A., Krettli A.U. 2003. Antimalarial activity of *Cinchona*-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. *J Ethnopharmacol*, Aug; 87(2-3):253-6.
10. Araripe, J.R., Cunha e Silva, N.L., Leal, S.T., de Souza, W., Rondinelli E. 2004. *Trypanosoma cruzi*: TcRAB7 protein is localized at the Golgi apparatus in epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun* 321: 397-402.
11. Araújo, A., Jansen, A.M, Reinhard, K., Ferreira, L.F. 2009. Paleoparasitology of Chagas disease—a review. *Mem Do Inst Oswaldo Cruz*. 104: 9–16. doi: 10.1590/S0074-02762009000900004
12. Araújo, A.A.S., De Melo, M.G.D., Rabelo, T.K., Nunes, P.S., Santos, S.L., Serafini, M. R., .Gelain, D.P. 2015. Review of the biological properties and toxicity of usnic acid. *Natural product research*, 29(23), 2167-2180.
13. Atanasov, A.G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E.H., Rollinger, J.M., Schuster, D., Breuss, J.M., Bochkov, V., Mihovilovic, M.D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V.M., Stuppner, H. 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review *Biotechnol. Adv.*, 33, pp. 1582-1614
14. Aufderheide, A.C., Salo, W., Madden, M., Streitz, J., Buikstra, J., Guhl, F. 2004. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:2034–9. doi: 10.1073/pnas.0307312101
15. Ayulo, V.M., Herrero, A. 1944. Estudios sobre trypanosomiasis americana en el Perú: I. Observaciones en el departamento de Arequipa. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 3:96–117.
16. Bastida, J., Lavilla, R., Viladomat, F. 2006 Chemical and biological aspects of *Narcissus* alkaloids. In: Cordell GA (ed), *The Alkaloids: Chemistry and Physiology*. 63, Elsevier, Amsterdam 87–179
17. Beer, M.F., Frank, F.M., Elso, G., Ernesto Bivona, A., Cerny, N., Giberti, G., Malchiodi, E., Martino, V.M., Alonso, M.R., Sülsen, P., Cazorla, S.I. 2016. Trypanocidal and leishmanicidal activities of flavonoids isolated from *Stevia satereiifolia* var. *satureiifolia*, *Pharm. Biol.* 54 (10) 2188 – 2195, <https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1150304>.
18. Berkov, S.; Osorio, E.; Viladomat, F.; Bastida, J. 2020. Chemodiversity, chemotaxonomy and chemoecology of Amaryllidaceae alkaloids. 83, 113-185. In: *Alkaloids Chem Biol.*; DOI: 10.1016 / bs.alkal.2019.10.002.
19. Bern, C. 2011. Anti Trypanosomal therapy for chronic Chagas' disease *N. Engl. J. Med.*, 364, pp. 2527-2534
20. Bessa, C.D., Andrade, J.P.D., Oliveira, RS. D., Domingos, E., Santos, H., Romão, W., Bastida, J., Borges, W. S. 2017. Identification of alkaloids from *Hippeastrum aulicum* (Ker Gawl.) Herb. (Amaryllidaceae) using CGC-MS and ambient ionization mass spectrometry (PS-MS and LS-MS). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 28, 819-830.
21. Bombaça, A.C.S., Viana, P.G., Santos, A.C., Silva, T.L., Rodrigues, A.B., Guimarães, A. C. Menna-Barreto, R.F. 2019. Mitochondrial dysfunction and ROS production are essential for anti-*Trypanosoma cruzi* activity of  $\beta$ -lapachone-derived naphthoimidazoles. *Free Radical Biology and Medicine*, 130, 408-418.
22. Burleigh, B.A., Woolsey A.M. 2002. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cellular Microbiology* 4(11), 701–711.

23. Bustamante, J.M., Craft, J.M., Crowe, B.D., Ketchie, S.A., Tarleton, R.L. 2014. New, combined, and reduced dosing treatment protocols cure *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *The Journal of infectious diseases*, 209(1), 150-162.
24. Bustos, D.A., Tapia, A.A., Feresin, G.E., Ariza-Espinar, L. 1996. Ethnopharmacobotanical survey of Bauchaceta district, San Juan Province Argentina. *Fitoterapia* 67: 411–415.
25. Campbell, D.A., Westenberger, S.J., Sturm, N.R. 2004. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Curr Mol Med* 4: 549-562.
26. Carabarin Lima, A., González Vázquez M.C., Baylon Pacheco, L., Rosales Encina, J.L. 2011 EC: una enfermedad olvidada. *Elementos* 84, pp.5-11.
27. Castañeda, J.S., Suta-Velásquez, M., Mateus, J., Pardo-Rodríguez, D., Puerta, C.J., Cuéllar, A., Robles, J., Cuervo, C. 2021. Preliminary chemical characterization of ethanolic extracts from Colombian plants with promising anti- *Trypanosoma cruzi* activity. *Experimental Parasitology* 223, 108079.
28. Chagas, C. 1909. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen, n sp, agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1:159–218. doi: 10.1590/S0074-02761909000200008
29. Chinsembu, K.C. 2020. Coronaviruses and nature's pharmacy for the relief of coronavirus disease 2019. *Rev Bras Farmacogn* 30:603–621. <https://doi.org/10.1007/s43450-020-00104-7>
30. Chou, T.C. 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev* 58:621-681.
31. Chou, T.C. 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. *Cancer Res* 70: 440-446. "doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1947" (A Perspectives Article, cited 4,187 times in 966 journals).
32. Concepción, J.L., Gonzalez-Pacanowska, D., Urbina, J.A. 1998. 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase in *Trypanosoma cruzi*: subcellular localization and kinetic properties. *Arch. Biochem. Biophys.*
33. Connors, E.E., Vinet, J.M., Weeks, J.R., Brouwer, K.C. 2016. A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants. *Acta Trop.* 156:68–78. doi:10.1016/j.actatropica.2016.01.002
34. Cordell, G.A., Quinn-Beattie, M.L., Farnsworth, N.R. 2001. The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytother Res* 15:183–205. <https://doi.org/10.1002/ptr.890>
35. Datta, S. K. 2020. *Amaryllis/Hippeastrum*. *Floriculture and Ornamental Plants*, 1-27.
36. de Araujo-Jorge, T.C., Telleria, J., Rios-Dalenz, J. 2010. History of the discovery of American Trypanosomiasis (Chagas disease). In: Telleira, J., Tibayrenc, M. editors. *American Trypanosomiasis (First Edition)*. Amsterdam: Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-384876-5.00001-0
37. de Carvalho, E.A.B., Andrade, P P., Silva, N.H., Pereira, E.C., Figueiredo, R.C. 2005. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study. *Micron*, 36(2), 155-161.
38. de Moraes, J., Nascimento, C., Yamaguchi, L.F., Kato, M.J., Nakano, E. 2012. *Schistosoma mansoni*: in vitro schistosomicidal activity and tegumental alterations induced by pipartine on schistosomula. *Exp. Parasitol.*, 132, pp. 222-227
39. de Noya, B.A., Jackson Y. 2020. Chagas disease epidemiology: From Latin America to the world M.J. Pinzano-Delgado, J. Gascón (Eds.), *Chagas Disease*, Springer, Cham, Switzerland. pp. 27-36
40. de Souza, W. 2002. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*. 8, 269-285.
41. de Souza, W. 2007. Macro, micro and nano domains in the membrane of parasitic protozoa. *Parasitol Int* 56: 161-170.
42. de Souza, W. 2009. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 89-100.
43. de Souza, W., Barrias, E. S. 2020. May the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi* be infective?. *Acta Tropica*, 212, 105688.
44. Döpke, W. 1962. Alkaloids of the *Hippeastrum* type. *Archiv der Pharmazie und Berichte der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft* 295: 920-924.
45. dos Santos Silva, F., Albuquerque, U.P., Martins Costa Júnior, L., da Silva Lima, A., Borbado Nascimento, A.L., Marcelino Monteiro, J. 2014. An ethnopharmacological assessment of the use of plants against parasitic diseases in humans and animals. *Journal of Ethnopharmacology*, 155 1332–134.
46. dos Santos, V.A., Leite, K.M., da Costa Siqueira, M., Regasini, L O., Martinez, I., Nogueira, C.T., Graminha, M.A. 2013. Antiprotozoal activity of quinonemethide triterpenes from *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). *Molecules*, 18(1), 1053-1062.
47. Duran-Rehbein, G.A., Vargas-Zambrano, J.C., Cuellar, A., Puerta, C.P., Gonzalez, J.M. 2014. Mammalian cellular culture models of *Trypanosoma cruzi* infection: a review of the published literature. *Parasite* 2014, 21, 38.
48. Elias, M.C., Marques-Porto, R., Freymuller, E., Schenkman, S. 2001. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle in parallel with changes in nuclear organization. *Mol Biochem Parasitol* 112: 79-90

49. Elso, O.G., Puente, V., Barrera, P., Sosa-Escudero, M.A., Sülsen, V.P., Lombardo, M.E. 2022. Mode of action of the sesquiterpene lactones eupatoriopicrin and estafietin on *Trypanosoma cruzi*. *Phytomedicine*, 96, 153900.
50. Frank, F.M., Ulloa, J., Cazorla, S.I., Maravilla, G., Malchiodi, E.L., Grau, A., Martino, V., Catalán, v., Muschietti, L.V. 2013. Trypanocidal activity of *Smilax sonchifolius*: identification of active sesquiterpene lactones by bioassay-guided fractionation, *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2013, 627898, <https://doi.org/10.1155/2013/627898>.
51. Gao, G., Nara, T., Nakajima-Shimada, J., Auki, T. 1999. Novel organization and sequence of 5 genes encoding all 6 enzymes for de novo pyrimidine biosynthesis in *Trypanosoma cruzi*. *J. Mol. Bio.*, Volume 285, Issue 1, p 149-161.
52. Garcia, M.N., O'Day, S., Fisher-Hoch, S., Gorchakov, R., Patino, R., Feria Arroyo, T.P. 2016. One health interactions of chagas disease vectors, canid hosts, and human residents along the Texas-Mexico Border. *PLoS Negl Trop Dis.* 10:1–10. doi: 10.1371/journal.pntd.0005074
53. García-Huertas, P., Cardona-Castro, N. 2021. Advances in the treatment of Chagas disease: Promising new drugs, plants and targets. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, 112020.
54. Gascon, J., Bern, C., Pinazo, M.J. 2010. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Tropica.* 115:22–7. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.07.019
55. Gasic, G., Bertin, V. 1940. Epidemiología de la EC en Chile. *Rev Chil Pediatr.* 11:561–84.
56. Giordani, R.B., Vieira, P.B., Weizenmann, M., Rosember, D.B., Souza, A.P., Bonorino, C., de Carli, G.A., Bogo, M.R., Zuanazzi, J.A.S., Tasca, T. 2010a. Candimine-induced cell death of the amitochondriate parasite *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Natural Products* 73: 2019-23.
57. Giordani, R.B., Weizenmann, M., Rosember, D.B., de Carli, G.A., Bogo, M.R., Zuanazzi, J.A.S., Tasca, T. 2010b. *Trichomonas vaginalis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase and ecto-5'-nucleotidase activities are inhibited by lycorine and candimine. *Parasitology International* 59: 226-231.
58. Gourbière, S., Dorn, P., Tripet, F., Dumonteil, E. 2012. Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. *Heredity* 10871:190-202
59. Guhl, F., Jaramillo, C., Yockteng, R., Vallejo, G.A., Caárdenas-Arroyo, F. 1997. *Trypanosoma cruzi* DNA in human mummies. *Lancet.* 349:1370. doi: 10.1016/S0140-6736(05)63207-2
60. Hall, B.S., Wilkinson, S.R. 2012. Activation of Bzne by Trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrob Agents Chemother.* 56:115–23.
61. Hamilton, P.B., Stevens, J.R. 2017. Classification and phylogeny of *Trypanosoma cruzi*. In *American Trypanosomiasis Chagas Disease*. pp. 321-344. Elsevier.
62. Hardy, K. 2021. Paleomedicine and the evolutionary context of medicinal plant use. *Rev Bras Farmacogn* 31:1–15. <https://doi.org/10.1007/s43450-020-00107-4>
63. Heise, N., Opperdoes, F.R. 1997. The dihydroxyacetone phosphate pathway for biosynthesis of ether lipids in *Leishmania mexicana* promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology* 89 (1997) 61–72.
64. Hernández, M., Wicz, S., Caballero, E.P., Santamaría, M. H. Corral, R.S. 2021. Dual chemotherapy with Bzne at suboptimal dose plus curcumin nanoparticles mitigates *Trypanosoma cruzi*-elicited chronic cardiomyopathy. *Parasitology international*, 81, 102248.
65. Izumi, E., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Veiga Junior, V.F., Nakamura, C.V. 2011. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*, *Nat. Prod. Rep.* 28 (4) 809 – 823, <https://doi.org/10.1039/c0np00069h>.
66. Jackson, Y., Pinto, A., Pett, S. 2014. Chagas disease in Australia and New Zealand: risks and needs for public health interventions. *Trop Med Int Health.* 19:212–8. doi: 10.1111/tmi.12235
67. Kessler, R.L., Contreras, V.T., Marlière, N.P., Aparecida Guarneri, A., Villamizar Silva, L.H., Mazzarotto, G.A.C.A., Batista, M., Soccol, V.T., Krieger, M.A., Probst, C.M. 2017. Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. *Molecular Microbiology* 104(5), 712-736.
68. Komolafe, K., Komolafe, T.R., Fatoki, T.H., Akinmoladun, A.C., Brai, B., Olaleye, M.T., Akindahunsi, A.A. 2021. Coronavirus disease 2019 and herbal therapy: pertinent issues relating to toxicity and standardization of phytopharmaceuticals. *Rev Bras Farmacogn* 31:142–161. <https://doi.org/10.1007/s43450-021-00132-x>
69. Laboratorios Licons. 2022. Package insert: Bzne tablets, for oral use. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2017/209570lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/209570lbl.pdf) (2017), Accessed 15th Sep 2022
70. Labraña, J., Machocho, A.K.O., Kricsfalusy, V., Brun, R., Codina, C., Viladomat, F., Bastida, J. 2002. Alkaloids from *Narcissus angustifolius* subsp. transcarpathicus (Amaryllidaceae). *Phytochemistry* 60(8), 847-852.
71. Laurella, L.C., Frank, F.M., Sarquíz, A., Alonso, M.R., Giberti, G., Cavallaro, L., Catalán, C., Cazorla, S.I., Malchiodi, E., Martino, V., Sülsen, V. 2012. In vitro evaluation of antiprotozoal and antiviral activities of extracts from Argentinean *Mikania* species, *Scientific World J.* 121253, <https://doi.org/10.1100/2012/121253>.
72. León-Gómez, A., Flores Fiallos, A., Reyes Quesada, L., Bonilla, M., Poujol, E.R., Gómez, C. 1960. La Enfermedad de Chagas en Honduras. *Rev Med Hondureña.* 28:78–83.



73. Lidani, K.C.F., Andrade, F.A., Bavia, L., Damasceno, F.S., Beltrame, M.H., Messias-Reason, I.J., Sandri, T.L. 2019. Chagas disease: from discovery to a worldwide health problem. *Frontiers in public health*, 7, 166
74. Litwinienko, G., Ingold, K.U. 2004. Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction. 2. Resolution of the curcumin antioxidant controversy. The role of sequential proton loss electron transfer. *The Journal of organic chemistry*, 69(18), 5888-5896.
75. Macedo, A.M., Pena, S.D.J. 1998. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol Today* 14: 119-123
76. Mahomoodally, M.F., Zengin, G., Sinan, K.I., Ak, G., Sadeer, N.B., Angeloni, S., Darendelioglu, E. 2021. Two medicinal plants (*Alkanna trichophila* and *Convolvulus galaticus*) from Turkey: Chemical characterization and biological perspectives. *Chemistry & Biodiversity*, 18(10), e2100356.
77. Malik, L.H., Singh, G.D., Amsterdam, E.A. 2015. The epidemiology, clinical manifestations and management of Chagas Heart Disease. *Clinical cardiology* 38:9, 565-569.
78. Manojlovic, N.T., Vasiljevic, P.J., Maskovic, P.Z., Juskovic, M., Bogdanovic-Dusanovic, G. 2012. Chemical composition, antioxidant, and antimicrobial activities of lichen *Umbilicaria cylindrica* (L.) Delise (Umbilicariaceae). *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012:1-8. doi:10.1155/2012/452431.
79. Márquez J. 1999. Las Áreas Protegidas de la Provincia de San Juan. *Multequina* 8: 1-10.
80. Martínez, F., Márquez-Dueñas, C., Ballesteros-Rodea, G., Martínez-Calvillo, S., Maning-Cela, R. 2010. Cellular analysis of host cell infection by different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology* 126, 332-336.
81. Martínez-Peinado, N., Cortes-Serra, N., Tallini, L.R., Pinazo, M.J., Gascon, J., Bastida, J., Alonso-Padilla, J. 2021. Amaryllidaceae plants: a potential natural resource for the treatment of Chagas disease. *Parasites & vectors*, 14(1), 1-9.
82. Martínez-Peinado, N., Cortes-Serra, N., Torras-Claveria, L., Pinazo, M. J., Gascon, J., Bastida, J., & Alonso-Padilla, J. (2020). Amaryllidaceae alkaloids with anti- *Trypanosoma cruzi* activity. *Parasites & vectors*, 13(1), 1-10.
83. Martínez-Peinado, N., Ortiz, J.E., Cortes-Serra, N., Pinazo, M.J., Gascon, J., Tapia, A., Roitman, G., Bastida, J., Feresin, G.E., Alonso-Padilla, J., 2022. Anti- *Trypanosoma cruzi* activity of alkaloids isolated from *Habranthus brachyandrus* (Amaryllidaceae) from Argentina. *Phytomedicine*, 101, 154126.
84. Mazza, S. 1942. Consideraciones sobre la EC en Bolivia. *Prensa Med Arg.* 29:51.
85. Mazza, S. 1949. La EC em la republica Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 47:273-88. doi: 10.1590/S0074-02761949000100011
86. Mazzotti, L. 1940. Dos casos de EC en el estado de Oaxaca. *Gac Med Mex.* 70:417-20.
87. Menna-Barreto, R.F., Salomão, K., Dantas, A.P., Santa-Rita, R.M., Soares, M.J., Barbosa, H.S., de Castro, S.L. 2009. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. *Micron*, 40(2), 157-168.
88. Miles, M.A., Llewellyn, M.S., Lewis, M.D., Yeo, M., Baleela R., Fitzpatrick, S., Gaunt, M.W., Mauricio, I.L. 2009. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitol*, 136: 1509-1528.
89. Molina, I., Gómez i Prat, J., Salvador, F., Treviño, B., Sulleiro, E., Serre, N., Pahissa, A. 2014. Randomized trial of posaconazole and Bzne for chronic Chagas' disease. *New England Journal of Medicine*, 370(20), 1899-1908.
90. Moreno, M., D'Avila, D.A., Silva, M.N., Galvão, L.M., Macedo, A.M., Chiari, E., Gontijo, E.D., Zingales, B. 2010. *Trypanosoma cruzi* Bzne susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105, 918-924
91. Morillo, C.A., Waskin, H., Sosa-Estani, S., del Carmen Bangher, M., Cuneo, C., Milesi, R., Yusuf, S. 2017. Bzne and posaconazole in eliminating parasites in asymptomatic *T. cruzi* carriers: the STOP-CHAGAS trial. *Journal of the American College of Cardiology*, 69(8), 939-947.
92. Müller Kratz, J., Garcia Bournissen, F., Forsyth, C.J. 2018. Clinical and pharmacological profile of Bzne for treatment of Chagas disease. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 11:943-57.
93. Muschietti, L.V., Sulsen, V., Martino, V.S. 2010. *Studies in Natural Products Chemistry (Bioactive Natural Products)*, Chapter: Bioprospection of potential trypanocidal and leishmanicidal drugs: A Scientific Literature Survey over the Period 2000-2010. Att-ur-Rahman (Eds.), *Studies in Natural Products Chemistry*. Elseviers Science Publishers, pp. 297-336
94. Newman, D.J., Cragg, G.M. 2020. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* 83, 770-803
95. Nouvellet, P., Cucunubá, Z.M., Gourbiere, S. 2015. Ecology, evolution and control of Chagas disease: a century of neglected modelling and a promising future. *Advances in parasitology*, 87, 135-191.
96. Oliveira de Souza, L.I., Bezzera-Silva, P.C., do Amaral Ferraz Navarro, D.M., da Silva, A.G., Dos Santos Correia, M.T., da Silva, M.V., de Figueiredo, R. 2017. The chemical composition and trypanocidal activity of volatile oils from Brazilian Caatinga plants, *Biomed. Pharmacother.* 96 1055 - 1064, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.121.7>
97. OMS. 2010. Chagas disease American trypanosomiasis. Ginebra: WHO Ginebra
98. OMS. 2022. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).

99. Opperdoes, F.R. 1984. Localization of the initial steps in alkoxyphospholipids biosynthesis in glycosomes (microbodies) of *Trypanosoma brucei*. Federation of European Biochemical Societies Letters.
100. Opperdoes, F.R. 1987. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. Annual Review of Microbiology.
101. Ormeño, F., Barrientos, C., Ramirez, S., Ponce, I., Valenzuela, L., Sepúlveda, S., Bitar, M., Kemmerling, U., Machado, C.R., Cabrera, G., Galanti, N. 2016. Expression and the Peculiar Enzymatic Behavior of the *Trypanosoma cruzi* NTH1 DNA Glycosylase. PLoS ONE 11(6): e0157270. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0157270>
102. Ortiz, J.E., Pigni, N.B., Andujar, S.A., Roitman, G., Suvire, F.D., Enriz, R.D., Feresin, G.E. 2016. Alkaloids from *Hippeastrum argentinum* and their cholinesterase-inhibitory activities: an *in vitro* and *in silico* study. Journal of natural products, 79(5), 1241-1248.
103. Patel, S., Docampo, R. 2010. Acidic calcium stores open for business: expanding the potential for intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling. Trends Cell Biol. 20(5), 277-286.
104. Pena, S.D, Machado, C.R, Macedo, A.M. 2009. *Trypanosoma cruzi*: ancestral genomes and population structure. Mem Inst Oswaldo Cruz, 104 Suppl 1:108- 14.
105. Pinazo, M.J., Gascon, J. 2015. The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). Acta Tropica. 151:16–20. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.06.013
106. Prata, A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. The Lancet infectious diseases, 1(2), 92-100.
107. Programa nacional de Chagas. 2017. Guía para el control vectorial de la EC.
108. Puente, V., Demaria, A., Frank, F.M., Battle, A., Lombardo, M.E. 2018. Anti-parasitic effect of vitamin C alone and in combination with Bznc against *Trypanosoma cruzi*. PLoS neglected tropical diseases 12(9), e0006764.
109. Quiñones, W., Urbina, J.A., Dubourdieu, M., Concepción, J.L. 2004. The glycosome membrane of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: protein and lipid composition. Experimental Parasitology 106, Issues 3–4, p 135-149
110. Rabelo, T.K., Zeida'n-Chulia, F., Vasques, L.M., dos Santos, J.P.A., da Rocha, R.F., Pasquali M.A., Rybarczyk-Filho, J.L., Araújo, A.A.S., Moreira, J.C.F., Gelain, D.P. 2012. Redox characterization of usnic acid and its cytotoxic effect on human neuron-like cells (SH-SY5Y). Toxicol In Vitro. 26:304–314. doi:10.1016/j.tiv.2011.12.003.
111. Revollo, S., Oury, B., Laurent, J.P., Barnabé, C., Quesney, V., Carrière, V., Noël, S., Tibayrenc, M. 1998. *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. Experimental Parasitology 89, 30–39
112. Ribeiro, V., Dias, N., Paiva, T., Hagström-Bex, L., Nitz, N., Pratesi, R., Hecht, M. 2020. Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance 12, 7-17.
113. Roell, K.R., Reif, D.M., Motsinger-Reif, A.A. 2017. An introduction to terminology and methodology of chemical synergy—perspectives from across disciplines. Frontiers in pharmacology, 8, 158.
114. Ros-Lucas, A., Martínez-Peinado, N., Bastida, J., Gascón, J., Alonso-Padilla, J. 2022. The Use of AlphaFold for In Silico Exploration of Drug Targets in the Parasite *Trypanosoma cruzi*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 1006.
115. Sales Junior, P.A., Molina, I., Fonseca Murta, S.M., Sánchez-Montalvá, A., Salvador, F., Correa de Oliveira, R., Martins Carneiro, C. 2017. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. Am J Trop Med Hyg. doi: 10.4269/ajtmh.16-0761.3
116. Sanmartino, M. 2009. 100 años de Chagas (1909-2009): revisión, balance y perspectiva. Revista. Sociedad. Entomológica. Argentina<sup>®</sup> 68 (3-4) 243-252.
117. Santos, S.S., de Araujo, R.V., Giarolla, J., El Seoud, O., Ferreira, E.I. 2020. Searching for drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a review. International journal of antimicrobial agents 55(4), 105906.
118. Schmeda-Hirschmann, G., Tapia, A., Lima, B., Pertino, M., Sortino, M., Zacchino, S., Feresin, G.E. 2008. A new antifungal and antiprotozoal depside from the Andean lichen *Protousnea poeppigii*. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 22(3), 349-355.
119. Schofield, C.J., Galvão, C. 2009. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. Acta Tropica. 110:88–100. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.01.010
120. Segovia, J.C. 1913. Un caso de trypanosomiasis. Arch Hosp Rosales En San Salvador. 8:249–54
121. Selseleh, M., Ebrahimi, S.N., Aliahmadi, A., Sonboli, A., Mirjalili, M.H. 2020. Metabolic profiling, antioxidant, and antibacterial activity of some Iranian *Verbascum* L. species', Ind. Crop. Prod. 153, 112609.
122. Serpa Flórez, F. 2000. Historia de la Tripanosomiasis Americana en Colombia. Rev Med. 22:75–7.
123. Shapiro, T.A., Englund, P.T. 1995. The structure and replication of kinetoplast DNA. Annu Rev Microbiol 49: 117-143.
124. Simpson, L. 1972. The kinetoplast DNA of hemoflagellates. Int. Rev. Cytol., 32, pp 139-207.
125. Soprani, L.C., Andrade, J.P.D., Santos, V.D.D., Alves-Araújo, A., Bastida, J., Silva, C.A.G., Silveira, D., de Souza, W., Jamal, C.M. 2021. Chemical evaluation and anticholinesterase activity of *Hippeastrum puniceum* (Lam.) Kuntz bulbs (Amaryllidaceae). Brazilian Journal of Pharmaceutical

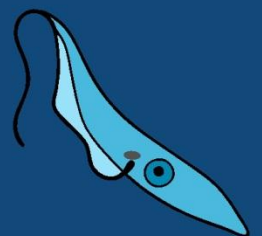
- Sciences 57: e19154.
126. Sosa, E., Salamanca Capusiri, S., Amaya, A., Bardón, A., Giménez-Turba, N., Vera, S., Borkosky, A. 2020. Trypanocidal activity of South American Vernoniae (Asteraceae) extracts and its sesquiterpene lactones, Nat. Prod. Res. 1 – 5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1739682>.
  127. Souto-Padron, T., de Souza, E., Hueser, J.E. 1984. Quick-freeze, deep-etch rotary replication of *Trypanosoma cruzi* and *Herpetomonas megaseliae*. J Cell Sci 69: 167-178.
  128. Souza, J.M., Vieira, T.M., Candido, A.C., Tezuka, D., Rao, G.S., de Albuquerque, S., Magalhães, L. 2021. *In vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* activity enhancement of curcumin by its monoketone tetramethoxy analog diveratralacetone. Current Research in Parasitology & Vector-borne Diseases, 1, 100031.
  129. Spina, R.M., Lozano, E., Barrera, P.A., Agüero, M.B., Tapia, A., Feresin, G.E., Sosa, M.A. 2018. Antiproliferative effect and ultrastructural alterations induced by 5-O-methylembelin on *Trypanosoma cruzi*. Phytomedicine, 46, 111-118.
  130. Stecconi-Silva, R.B., Andreoli, W.K., Mortara R.A. 2003. Parameters affecting cellular invasion and escape from the parasitophorous vacuole by different infective forms of *Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 98(7): 953-958.
  131. Storino, R., Milei, J. 1994. EC. Ed. Mosby-Doyma, Buenos Aires.
  132. Sukul, N.C., Ghosh, S., Sinhababu, S.P. 2005. Reduction in the number of infective *Trichinella spiralis* larvae in mice by use of homeopathic drugs. Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd. Aug; 12(4):202-5.
  133. Sülsen, V., Güida, C., Coussio, J., Paveto, C., Muschietti, L., Martino, V. 2006. *In vitro* evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine, Parasitol. Res. 98 (4) 370 – 374, <https://doi.org/10.1007/s00436-005-0060-4>.
  134. Suresh, J., Mahesh, N.M., Ahuja, J., Santilna, K.S. 2011. Review on Artemisia nilagirica (Clarke). Pamp. 2011. JBAPN 1 (2) pp 97 – 104.
  135. Tallini, L.R., Giordani, R.B., de Andrade, J.P., Bastida, J., Zuanazzi, J.A.S. 2021. Structural Diversity and Biological Potential of Alkaloids from the Genus *Hippeastrum*, Amaryllidaceae: an Update. Revista Brasileira de Farmacognosia, 1-10.
  136. Tallini, L.R., Osorio, E.H., Santos, V.D.D., Borges, W.D.S., Kaiser, M., Viladomat, F., Bastida, J. 2017. *Hippeastrum reticulatum* (Amaryllidaceae): alkaloid profiling, biological activities and molecular docking. Molecules, 22(12), 2191.
  137. Teixeira, T.L., Teixeira, S.C., da Silva, C.V., de Souza, M.A. 2014. Potential therapeutic use of herbal extracts in trypanosomiasis, Pathog. Glob. Health 108 (1) 30 – 36, <https://doi.org/10.1179/2047773213Y.0000000120>.
  138. Tejera, E. 1919. La trypanosomose americaine ou maladie de Chagas au Venezuela. Bull Soc Pathol Exot. 12:509–13.
  139. Teixeira, D. E., Benchimol, M., Crepaldi, P. H., de Souza, W. 2012. Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease.
  140. Toledo, M.J., Bahia, M.T., Veloso, V.M., Carneiro, C.M., Machado-Coelho, G.L., Alves, C.F., Martins, H.R., Cruz, R.E., Tafuri, W.L., Lana, M. 2004. Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. J Antimicrob Chemother 53: 1045–1053
  141. Toledo, M.J.O., Bahia, M.T., Carneiro, C.M. 2003. Chemotherapy with Bzne and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 47, 223–230.
  142. Torrico, F., Gascón, J., Barreira, F., Blum, B., Almeida, I. C., Alonso-Vega, C., Asada, M. 2021. New regimens of Bzne monotherapy and in combination with fosravuconazole for treatment of Chagas disease (BENDITA): a phase 2, double-blind, randomised trial. The Lancet Infectious Diseases, 21(8), 1129-1140.
  143. Torrico, F., Gascon, J., Ortiz, L., Alonso-Vega, C., Pinazo, M. J., Schijman, A., Jimenez, W. 2018. Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with Bzne and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. The Lancet Infectious Diseases, 18(4), 419-430.
  144. Ulloa, J.L., Spina, R., Casasco, A., Petray, P.V., Martino, V., Sosa, M.A., Frank, F.M., Muschietti, L.V. 2017. Germacranolide-type sesquiterpene lactones from *Smilax sonchifolius* with promising activity against *Leishmania mexicana* and *Trypanosoma cruzi*, Parasit. Vectors 10 (1) 567, <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2509-6>.
  145. United Nations. International Migration Report 2017. United Nations
  146. Vázquez-Chagoyán, J.C., Gupta, S., Garg, N.J. 2011. Vaccine development against *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease. Adv. Parasitol. 75:121–146.
  147. Vela, A., Coral-Almeida, M., Sereno, D., Costales, J.A., Barnabé, C., & Brenière, S.F. 2021. *In vitro* susceptibility of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (DTUs) to Bzne: A systematic review and meta-analysis. PLoS neglected tropical diseases, 15(3), e0009269.
  148. Villalta, F., Rachakonda, G. 2019. Advances in preclinical approaches to Chagas disease drug discovery. Expert Opin Drug Discov;(14): 1161–1174. 10.1080/17460441.2019.1652593
  149. Weniger, S., Robledo, G.J., Arango, E., Deharo, R., Aragón, V., Muñoz, J., Callapa, A., Lobstein, R. 2001. Anton, Antiprotozoal activities of Colombian plants, J. Ethnopharmacol. 78 (2 – 3) 193 – 200, [https://doi.org/10.1016/s0378- 8741\(01\)00346-4](https://doi.org/10.1016/s0378- 8741(01)00346-4).

150. Wiemer, E.A., IJst, L., van Roy, J., Wanders, R.J., Opperdoes, F.R. 1996. Identification of 2-enoylcoenzyme A hydratase and NADP(+)-dependent 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase activity in glycosomes of procyclic *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 12;82(1):107-11.
151. Wilkinson, S.R., Kelly, J.M. 2009. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Rev Mol Med.* 11:e31.
152. Wilkinson, S.R., Temperton, N.J., Mondragon, A., Kelly, J.M. 2000. Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry,* 275(11), 8220-8225.
153. Yeung, A.W.K., Heinrich M., Atanasov A.G. 2018. Ethnopharmacology—A Bibliometric Analysis of a Field of Research Meandering Between Medicine and Food Science. *Frontiers in Pharmacology.* 9: 1-15
154. Yousef, A., Hassan, B., Zhang, H.Y., Jiang, Z.Z. 2017. Anticancer potential and molecular targets of pristimerin: a mini-review. *Current cancer drug targets,* 17(2), 100-108.
155. Zabala, J.P. 2012. La enfermedad en su laberinto: avances, desafíos y paradojas de cien años del Chagas en Argentina'. *Salud colectiva,* 8 (1.1) 9-21. [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S185182652012000300002&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S185182652012000300002&script=sci_arttext)
156. Zhang, R., Ji, Y., Zhang, X., Kennelly, E.J., Long, C. 2020. Ethnopharmacology of *Hypericum* species in China: A comprehensive review on ethnobotany, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology,* 254, 1-12. ISSN 0378-8741, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112686>.
157. Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.S., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M., Schijman, A.G. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104(7):* 1051-1054.
158. Zuloaga, F.O.; Morrone, O.; Belgrano, M.J. 2008. In *Catálogo de las plantas vasculares del Cono Sur (Argentina, sur de Brasil, Chile, Paraguay, y Uruguay) Pteridophyta, Gymnospermae, Monocotyledoneae, Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. Vol. 1,* pp 1–983.





# Anexos



### I. Publicaciones en revistas indexadas durante el doctorado (2017-2023)

2023. **Piñeiro, M.**, Ortiz, J., Spina, R., Barrera, P., Sosa, M., Roitman, G., Bastida, J., Feresin, G. Antiparasitic Activity of *Hippeastrum* Species and Synergistic Interaction between Montanine and Benznidazole against *Trypanosoma cruzi*. *Microorganisms*, 11(1), 144.

2023. Ortiz, J.<sup>1</sup>, **Piñeiro, M.**<sup>1</sup>, Martínez-Peinado, N., Barrera, P., Sosa, M.A., Bastida, J., Alonso-Padilla, J., Feresin, G. Candimine from *Hippeastrum escoipense* (Amaryllidaceae): Anti-*Trypanosoma cruzi* activity and synergistic effect with benznidazole. *Phytomedicine*. <sup>1</sup>Igual contribución.

2023. Spina, R.<sup>1</sup>, **Piñeiro, M.**<sup>1</sup>, Barrera, P., Tapia, A., Sosa, M., Feresin, G. The antiparasitic effect on *Trypanosoma cruzi* of the norditerpenoid yaretol. *Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. <sup>1</sup>Igual contribución.

2023. **Piñeiro, M.**, Sanabria, E., Gonzalez, C. Protozoa and nematodes infecting *Odontophrynus occidentalis* (Berg, 1896) (Anura: Odontophrynidae) from the Monte desert of Argentina. *Zoodiversity*.

2022. Quiroga, L., Olivencia, N., Ray, M., Wetten, P., Rodriguez, Y., Aragon-Traverso, J., **Piñeiro, M.**, Sanabria, E. Diet of bullfrog tadpoles *Lithobates catesbeianus*, Shaw 1802 an invasive species from Monte Desert. *Journal of herpetology*, 56(3), 312-317.

2021. Gómez, J., Simirgiotis, M. J., Manrique, S., **Piñeiro, M.**, Lima, B., Bórquez, J., Feresin, G., Tapia, A. UHPLC-ESI-OT-MS Phenolics Profiling, Free Radical Scavenging, Antibacterial and Nematicidal Activities of “Yellow-Brown Resins” from *Larrea* spp. *Antioxidants*, 10(2), 185.

### II. Publicaciones en congresos

2022. **Piñeiro, M.**, Martínez-Peinado, N., Ortiz, J., Barrera, P., Sosa, M.A., Alonso-Padilla, J., Feresin, G.E. Synergistic anti-trypanosoma cruzi effectiveness of candimine combined with benznidazole by the chou-talalay method. XXXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo.

2021. **Piñeiro, M.**, Ortiz, J., Barrera, P., Agüero, B., Sosa, M., Tapia, A., Feresin, E. Efecto antiparasitario frente a *Trypanosoma cruzi* de extractos alcaloidicos obtenidos de

un híbrido natural del género *Hippeastrum*. XXIII Simposio Nacional de Química Orgánica.

2021. **Piñeiro, M.**, Ortiz, J., Barrera, P., Sosa, M., Tapia, A., Feresin, E. *Hippeastrum aglaiae*, fuente de alcaloides activos frente a *Trypanosoma cruzi*. XXIII Simposio Nacional de Química Orgánica.

2021. **Piñeiro, M.**, Tapia, A., Barrera, P., Sosa, M., Feresín, G., Abraham, G., Cortez Tornello, P. Efecto antiproliferativo de micropartículas cargadas con 5-O-metilembelina obtenidas por atomización electrohidrodinámica (ehda) frente a epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. IV Workshop de Polímeros Biodegradables y Biocompuestos - BIOPOLI 2020. Mar del Plata, Argentina

2019. **Piñeiro, M.**, Manrique, S., Rodríguez, J.M., Gómez, J., Barrera, P., Lima, B., Sosa, M., Tapia, A. *In vitro* trypanocidal, nematicidal and antimicrobial activities of *Usnea lethariiformis*. XXXVII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo.

2019. **Piñeiro, M.**, Lima, B., Barrera, P., Sortino, M., Márquez, J., Sosa, M., Tapia, A. *In vitro* trypanocidal and antifungal activities of *Maytenus viscifolia* Griseb (Celastraceae). XXXVII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo.

2019. **Piñeiro, M.**, Barrera, P., Ortiz, J., Sosa, M., Tapia, A., Feresin, G. Evidencia de daño de ultraestructuras de *Trypanosoma cruzi* por acción de candimina. XXII Simposio Nacional de Química Orgánica.

2019. **Piñeiro, M.**, Barrera, P., Ortiz, J., Sosa, M., Tapia, A., Feresin, G. Candimina una droga potencial para tratar la enfermedad de Chagas. II Simposio Regional de Chagas.

2018. **Piñeiro, M.**, Spina, R., Herrera Cano, N., Tapia, A., Sosa, M., Feresin, G. *In vitro* trypanocidal effect of the leaves and stems petroleum ether extract from *Artemisia mendozaana* (Asteraceae). XXXVI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo.