



“MECANISMOS DE ACCIÓN DE FLAVONOIDES NATURALES SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE EPIMASTIGOTES DE *TRYPANOSOMA CRUZI* “

Tesina de Grado de la Licenciatura en Ciencias Básicas con Orientación en
Biología

Alumna: Cano, Rocío Yasmin

Director: Dr. Lozano, Esteban Sebastián

Co- Directora: Dra. Barrera, Patricia Andrea

Año: 2019

AGRADECIMIENTOS

Antes de continuar, en primer lugar, quiero agradecer a un grupo de personas las cuales han sido un gran sostén no solo a nivel económico sino emocional y me han apoyado en la idea de irme a estudiar a otra provincia, que es mi familia. Mis padres los cuales a medida que pudieron ayudaron a que terminé en mis últimos años, a mis tíos y tías algunos cercanos otros lejanos, pero han estado siempre que les pedí ayuda. A mis abuelas que aún con problemas me dieron una mano, a mis hermanas que me han hecho disfrutar cada momento con ellas dándome respiro de mis nervios de exámenes o notas, y a mis primos con los cuales compartí varios momentos de risas sobre todo en vacaciones.

En segundo lugar, debo destacar el gran apoyo que recibí de mis amigos. Una amiga de la vida, Eliana, que siempre me tuvo presente y está cada vez que voy a Neuquén sin importar el tiempo o la distancia. Un amigo, Gonzalo, con el que compartí mis primeros años de cursado, el cual me ha tenido paciencia y fue una guía en los momentos en que quería dejar la carrera. Dos grandes compañeros que se han convertido en muy buenos amigos, Jessi y Diego, que hemos constituido un trío de estudio sin el cual no me imagino poder avanzar tan rápido en la carrera, además de ello han sido y serán un gran apoyo en el resto de los temas que no incluyen el estudio. También, debo agradecer a otras personitas que siempre estaban, Jime, Caro, Maria, Juli, Gonza y Lau.

En particular agradezco a quien conocí hace cinco años, Alexis, quien me ayudo de todas las maneras posibles, soporto mis enojos y compartió todos mis pequeños logros. En este último periodo casi que dejaba su estudio para que yo lograré mi propósito, que era tener mi tesis. Así que no es menor destacar lo que ha hecho, ya que también me ayudaba hasta en que me queden bien mis posters.

No menos importante agradezco a las autoridades de la Universidad de Cuyo, por hacer posible que, con poco haga mucho, su oferta estudiantil gratuita y laica es una de las mejores que pude tener. Asimismo, a las autoridades de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por darme la oportunidad de crecer y aprender de tan buenos docentes e investigadores durante mis años de estudio, si bien hace poco que es facultad su ambiente es confortable y hace posible una interacción directa con los docentes, lo que no tiene muchas otras facultades.

Finalmente, quiero agradecer a mi director y co-directora, por confiar en que podía hacer muchas cosas solas, por tenerme paciencia cuando me equivocaba, por contestar a mis dudas desesperadas dejando de lado sus actividades, y por tomarse el tiempo que muchas veces no tenían para enseñarme y guiarme en cómo debería realizar los ensayos. Al Instituto de Histología y Embriología de Mendoza por permitirme usar sus instalaciones para llevar a cabo mi proyecto de tesis, en particular al Laboratorio del Dr. Sosa Miguel Ángel quien no solo es un excelente profesor sino persona, el cual me brindó su apoyo en cada emprendimiento y siempre se preocupó por mi bienestar. Además, destacó la colaboración que recibí de todos los integrantes de este laboratorio, Lau, Lorena y Carolina, como también del grupo del Dr. Walter Berón.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. HISTORIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	5
1.2. HOSPEDADOR INTERMEDIO.....	7
1.2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES	7
1.2.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	9
1.3. <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	10
1.3.1. ESTADIOS DE <i>T. CRUZI</i>	11
1.3.2. ESTRUCTURAS CELULARES PARTICULARES EPIMASTIGOTE DE <i>T. CRUZI</i>	12
1.3.3. MITOCONDRIA Y LAS CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS EN LA DEFENSA FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO.....	15
1.3.4. CICLO DE VIDA.....	16
1.4. VIAS DE TRANSMISIÓN.....	17
1.5. MANIFESTACIONES CLINICAS	18
1.6. TRATAMIENTO	19
1.7. ANTECEDENTES MUNDIALES Y REGIONALES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS	20
1.8. IMPORTANCIA SOCIAL.....	22
1.9. COMPUESTOS NATURALES.....	23
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	27
2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO	28
2.2. OBJETIVOS.....	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. COMPUESTOS.....	30
3.2. CULTIVO DE PARÁSITOS	30
3.3. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN	30
3.4. ESTUDIO DE INDICES DE MORTALIDAD.....	30
3.5. DETERMINACIÓN DEL IC50.....	31
3.6. ENSAYO DE REVERSIBILIDAD	31
3.7. ESTUDIO DE BLANCOS MOLECULARES:.....	31
3.7.1. MEDICION DE LOS NIVELES DE ROS.....	31
3.7.2. ENSAYO DE MTT.....	32
3.7.3. ESTUDIOS DE MORFOLOGIA DE EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i> POR MICROSCOPIA ÓPTICA	32

3.7.4. ESTUDIOS DE MORFOLOGIA DE EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i> POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	33
3.7.5. ESTUDIO DE PATRONES PROTEICOS POR ELECTROFORESIS.....	33
3.8. ANALISIS ESTADISTICO	33
.....	34
4. RESULTADOS.....	34
4.1. ACCION DE FLAVONOIDES SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE <i>T. CRUZI</i>	35
4.2. ACCION DE FLAVONOIDES SOBRE MORTALIDAD DE <i>T. CRUZI</i>	36
4.3. ANALISIS DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS: ENSAYO DE REVERSIÓN.....	38
4.4. ESTUDIOS DE BLANCOS MOLECULARES:.....	41
4.4.1. MEDICIÓN DE NIVELES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ROS).....	41
4.4.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL.....	43
4.4.3. ESTUDIO DE MORFOLOGIA DE EPIMASTIGOTE DE <i>T. CRUZI</i> POR MICROSCOPIA OPTICA	45
4.4.4. ESTUDIO DE MORFOLOGIA DE EPIMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i> POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISIÓN.	48
4.4.5. ESTUDIOS DE PATRONES PROTEICOS POR ELECTROFORESIS.....	52
5. CONCLUSIÓN.....	54
6. REFERENCIAS.....	60

1.INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. HISTORIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Las primeras evidencias de la enfermedad de Chagas datan desde aproximadamente 9000 años atrás, a partir de registros encontrados en momias del Norte de Chile y Sur de Perú (Araujo y col. 2009; Autderheide y col. 2004; Álvarez-Hernández y col. 2016). Aunque existen relatos que dan cuenta de las picaduras de vinchucas y sus trastornos, en época de la colonización de América (Delaporte 1999), uno de los primeros estudios sobre la vinchuca corresponde a Fray Reginaldo de Lizárraga a fines del siglo XVI (Ábalos y Wygodzinsky 1951; Delaporte 1999). Asimismo, muchos exploradores y naturalistas durante sus viajes aportan datos sobre vinchucas, fue así que la primera descripción de la existencia de la enfermedad y su comportamiento, sin involucrar la interacción entre sus actores, fue aportada por Charles Darwin al describir su viaje por Mendoza (Darwin 1845).

Sin embargo, recién en 1909 con los estudios realizados por el médico brasileño Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (figura 1), se describió el agente causal, el vector y destacó síntomas que se podrían observar en humanos con la enfermedad (Chagas 1909). El hallazgo fue producto de un trabajo sobre una campaña para erradicar el malaria en Minas Gerais-Brasil, en el cual halló particular interés en estudiar la presencia de insectos hematófagos asociados a las áreas precarias (Álvarez y col. 2016; Chagas 1909; Zabala 2007). Luego de analizar el tubo digestivo de estos insectos, encontró que se desarrollaban unos protozoarios que identificó dentro del género *Schizotrypanum* (actualmente *Trypanosoma*), el cual denominó a posterior *Trypanosoma cruzi* en homenaje a su profesor Dr. Osvaldo Cruz (Sanmartino 2009; Álvarez y col. 2016).



Figura 1. Carlos Chagas (1879-1934)

En Argentina en el año 1926, el Dr. Salvador Mazza (figura 2) consiguió mostrar la gran importancia sanitaria de esta endemia retomando las investigaciones de Chagas (Castagnino 1986; Zabala 2007 y 2009), pero fue necesario que se describiera el cuadro clínico y el impacto médico-social de la fase crónica para que la comunidad científica le diera suficiente interés (Sanmartino 2009; Amieva 2014). A esto se le sumó el periodo de “la urbanización de la enfermedad” que se produjo entre 1950 y 1960, en donde hubo un aumento de migraciones desde las zonas rurales a áreas urbanas (Zabala 2009).



**Figura 2. Doctor Salvador Mazza
(1886-1946)**

A nivel global, como movimiento social, hace pocos años personas que han sido afectadas directamente por el Chagas comenzaron a constituirse como colectivos activos de reclamos y reivindicaciones (Oliveira y Costa Chaves 2012). Por lo que, en el año 2010, se nuclearon en la “Federación Internacional de Asociaciones de Personas Afectadas por la Enfermedad de Chagas” (FINDECHAGAS), esta asociación constituye una red mundial de asociaciones y equipos multidisciplinarios que pretenden reivindicar los derechos de las personas afectadas sobre la población general (Amieva 2014).

1.2. HOSPEDADOR INTERMEDIO

La enfermedad de Chagas es una enfermedad parasitaria crónica, causada por un protozoo flagelado, el *T. cruzi*, el cual requiere un vector para transmitirse al ser humano y otros animales. El vector u hospedador intermedio lo constituye un insecto denominado vinchuca (en Argentina), también llamadas chinches o triatomos (Apt y col. 2008; González-Tomé y col. 2013).

1.2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Los triatomos pertenecen a un grupo que comprende alrededor de 150 especies (Guhl 2017) dentro del orden Hemiptera, familia Reduviidae, subfamilia *Triatominae* (Ponte 1958). Particularmente se caracteriza por ser hematófago, es decir, que se alimenta de la sangre de otros animales. Para lo cual, evolutivamente desarrolló piezas bucales modificadas que les permite perforar la piel y de este modo succionar su alimento (Massarini y Schnek 2015).

En cuanto a la estructura corporal, como todos los insectos, posee tres pares de patas y cuerpo dividido en tres regiones: cabeza, tórax y abdomen (figura 3). Se destacan por ser comprimidos dorsoventralmente, lo que les permite refugiarse en lugares estrechos como grietas, cortezas, entre otros, por lo que se los suele asociar a lugares precarios (Sanmartino y col. 2015).

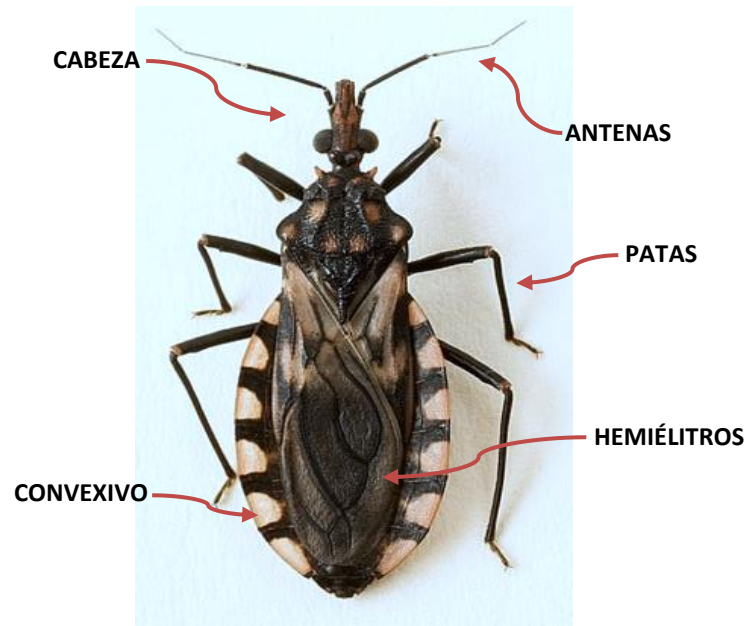


Figura 3. Partes corporales de una vinchuca

Aunque todos los triatomíneos son potenciales vectores, solo unos pocos presentan las características necesarias, como son la adaptación a la vida en viviendas humanas, corto espacio de tiempo entre alimentación y defecación, y/o una extensa distribución geográfica, entre otras (Sanmartino y col. 2015). En Argentina, *Triatoma infestans* se ha convertido en el hospedador más importante de transmisión a humanos, destacándose por su amplia distribución geográfica y su gran adaptación al ambiente humano (Massarini y Schnek 2015; Sanmartino y col. 2015).

Durante su ciclo biológico *Triatoma infestans* se pueden diferenciar por ciertas características; por ejemplo, los adultos machos tienen un largo total de 21 a 26 mm, mientras que las hembras miden de 26 a 29 mm (dimorfismo sexual) (Kettle 1990). En ambos se observan ojos grandes saltones y un cuerpo de color negro mate con bandas negras y amarillas alternadas en el borde, como se destaca en la figura 4.

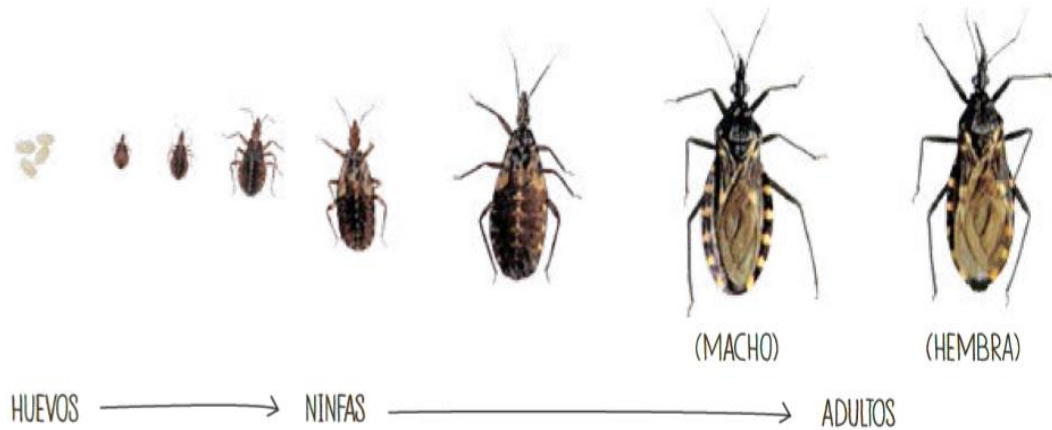


Figura 4. Ciclo de vida o estadios ninfales de *Triatoma infestans* (Sanmartino y col, 2015)

1.2.2. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

En general, las vinchucas se limitan a regiones neotropicales y neoárticas (OMS 2007), la mayoría de las cuales están distribuidas a lo largo del continente americano, con algunas pocas en Asia, África y Australia (Rychman y Archbold 1981; OMS 2013). Aun así, las que presentan mayor interés epidemiológico son las que habitan en viviendas o alrededores de zonas rurales, semi-rurales y urbanas de las regiones latinoamericanas (OPS 2013).

En Argentina como mencionamos anteriormente, *Triatoma infestans* es la principal especie transmisora, pero se pueden destacar otras cuatro; *T. guasayana*, *T. sórdida*, *T. patagónica* y *T. platensis* (Zabala 2010). A continuación, mostramos un mapa que representa la distribución potencial e histórica en comparación con una distribución actual de los tres vectores que son considerados de importancia médica en América Latina (figura 5). Estos mapas se van actualizando durante años con el aporte de profesionales biomédicos, servicios de vigilancia epidemiológica y colectas por parte de la población.

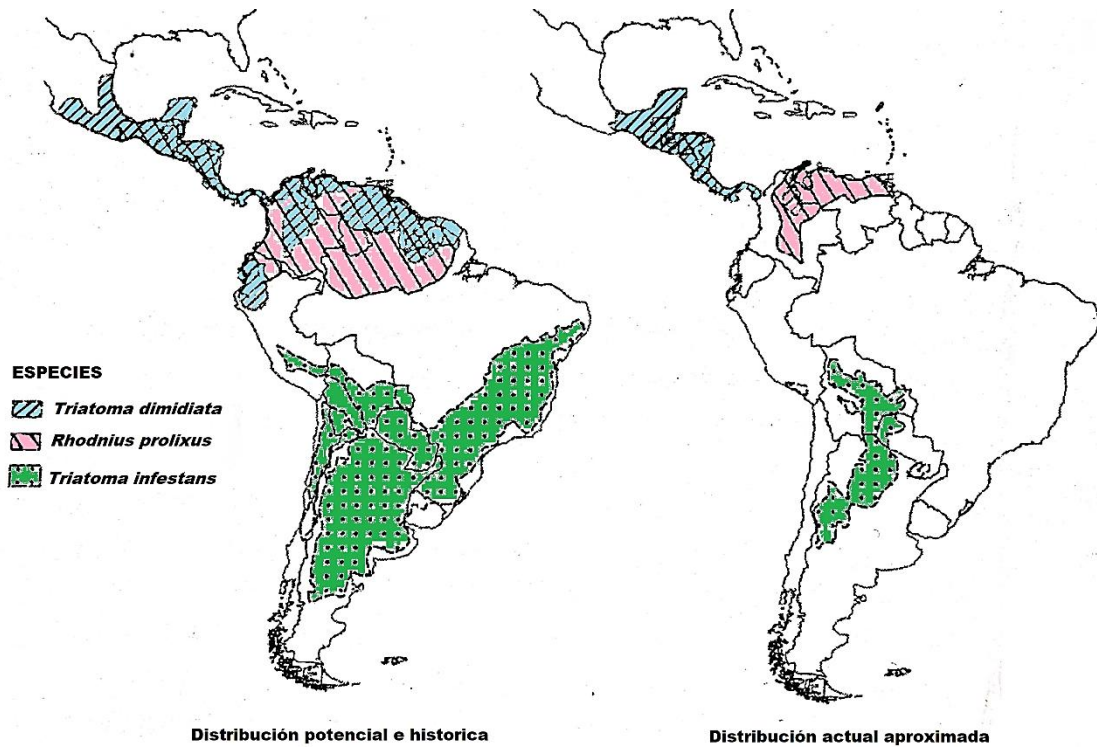


Figura 5. Mapa que representa la distribución geográfica en América Latina de tres vectores de *Trypanosoma cruzi*: *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata* y *Rhodnius prolixus* (Modificado de la ilustración realizada por Gerardo José de la Vega en Massarini y Schnek, 2015).

Entre los factores que afectan la dispersión de estos insectos podemos mencionar actividades humanas como: los cambios en el uso de la tierra, las modificaciones del paisaje, y el uso de controles químicos. Además, el calentamiento global que ofrece un aumento o disminución del nicho ecológico de estos (Gorla y Noireau 2017).

1.3. TRYPANOSOMA CRUZI

Este parásito constituye un protozoo intracelular obligado, flagelado, que pertenece al orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae*, género *Trypanosoma* y subgénero *schizotrypanum* (Ministerio de Sanidad y Política Social, 2009). De acuerdo al orden, posee un kinetoplasto, red fibrosa de ADN que está localizado en la mitocondria de la célula (Lukes y col. 2005).

Por consenso, se considera que las cepas de *T. cruzi* se dividen dentro de seis grupos (*T. cruzi* I-VI), los cuales se diferencian en términos de variabilidad genética, distribución regional y potencial para desarrollar enfermedad cardíaca o gastrointestinal (figura 6) (Guhl 2009; Zingales y col. 2009).

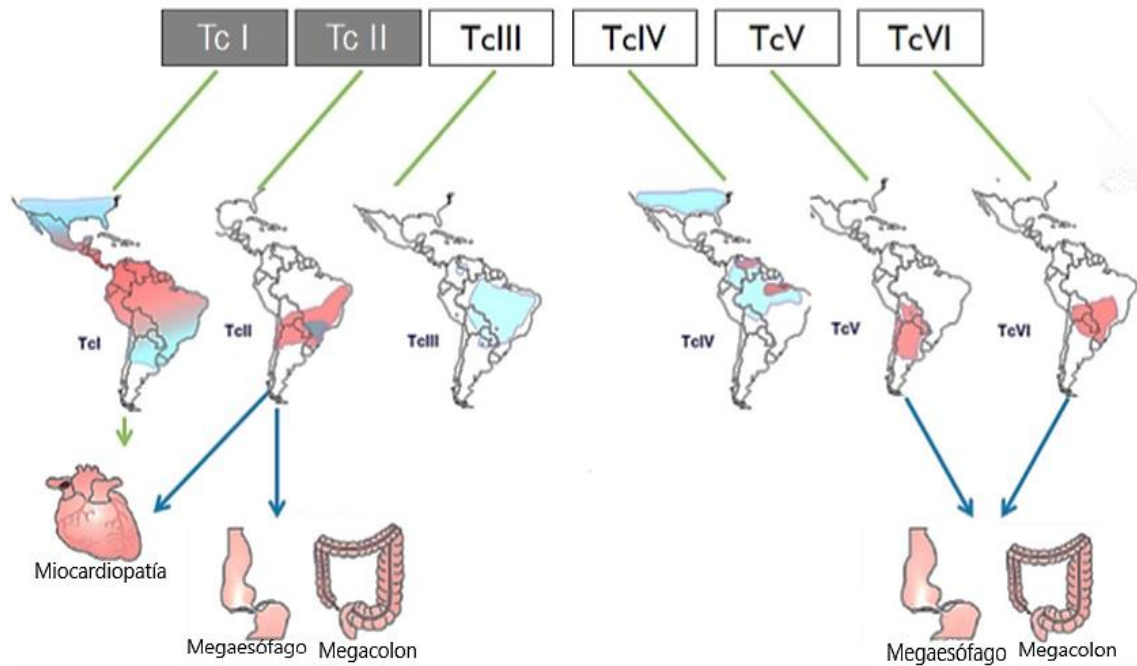


Figura 6. Distribución geográfica de cepas de *T. cruzi* y la asociación con el ciclo doméstico (rojo), selvático (celeste), y con tipo de patogénesis humana. (Imagen modificada de Guhl, 2017).

1.3.1. ESTADIOS DE *T. CRUZI*

Durante el ciclo de vida el *T. cruzi* presenta cuatro estadios morfológicos distintos, con ciertas ventajas adaptativas que les permiten desarrollarse en determinados ambientes (González y col. 2014, Bogitsh y col. 2018). Estas fases se diferencian morfológicamente por la disposición del flagelo, bolsillo flagelar y kinetoplasto (figura 7).

- 1) Amastigote: representa la única forma aflagelada con estructura ovoide, posee un diámetro de 1.5-5 μm (Kowalska y col. 2011). Debido a su capacidad infectiva, en células de vertebrados, puede replicarse seguidamente por fisión binaria (Carvalho y De Souza 1986; Ley y col. 1990).
- 2) Epimastigote: únicamente se observa en el intestino del invertebrado huésped, aunque puede mantenerse en cultivo axénico. También presenta un estadio proliferativo, pero no infectivo y flagelar, que posee un largo entre 20-40 μm . Además, en este caso la posición del kinetoplasto es anterior al núcleo celular (Souza 2009; Pena y col. 2009).

- 3) Trypomastigote: su estructura fusiforme le confiere 25 μm de largo y un diámetro de aproximadamente 2 μm (Álvarez-Hernández y col. 2016). Al contrario de los estadios anteriores, no presenta una fase proliferativa y puede ser observado en sangre o células de tejidos del vertebrado huésped. Se caracterizan por tener el kinetoplasto localizado posterior al núcleo y un flagelo que constituye una membrana ondulante sobre la superficie del cuerpo (Souza 2002; Kowalska y col. 2011). En la literatura reconocen un cuarto estadio (Trypomastigote metacíclico), en el cual, la única diferencia con el estadio anterior es que constituye la fase de diferenciación del epimastigote, que ocurre en la parte distal del intestino del insecto. Por lo cual, se puede observar en las heces y orina de invertebrado huésped, para luego ser incorporado por el hospedador final (González y col., 2014).



Figura 7. Formas de desarrollo de *Trypanosoma cruzi*: amastigote, epimastigote, tripomastigote.

1.3.2. ESTRUCTURAS CELULARES PARTICULARES EPIMASTIGOTE DE *T. CRUZI*

- Núcleo: organela que está localizada en la porción central de la célula, con un rango de 125-280 poros/célula, y que almacena el ADN genómico nuclear (Crane y Dvorak 1979; Dvorak 1982 y 1984; Monteiro y col. 2010). Solo en la fase epimastigote el ADN se condensa formando el nucleoplasma con su nucleolo, pudiendo así reconocer los cromosomas (Solari 1995; Elias y col. 2001). Los genes que codifican a proteínas se organizan en grupo de genes direccionales, similar a los operones bacterianos, y codifican aproximadamente 22.570 caracteres diferentes incluyendo 12.570 pares alélicos (Campbell y col. 2003; Arner y col. 2007).

- Kinetoplasto: se compone de ADN mitocondrial que se retiene en una membrana que recubre una vacuola dentro de la matriz mitocondrial. Este material genético comprende entre el 15-30 % del total y constituye una serie de fibrillas o red de 20.000 a 30.000 moléculas de mini círculos asociados entre sí y con largas moléculas lineales, cada una correspondiente a aproximadamente 1.440 pb. (Steinert y *col.* 1958; Riou y Delain 1969; Simpson 1972; Souza y Cavalcanti 2007). Se ubica cerca del cuerpo basal, al que se une físicamente por un conjunto de filamentos (Ogbadoiyi y *col.* 2003).
- Flagelo: emerge como una invaginación a partir del bolsillo flagelar y su largo varía de acuerdo al estado de desarrollo. Posee la estructura típica de todos los flagelos, con un patrón 9+2 de microtúbulos de axonemas. Debido a que se encuentra unido a una región del cuerpo del parásito, la onda de movimiento se propaga desde el final de este hasta esa región induciendo un movimiento al cuerpo que da la impresión visual de una membrana ondulante (De Sousa 2002).
- Glicosoma o Peroxisoma: suelen aparecer como orgánulos esféricos distribuidos por toda la célula al azar (Vickerman y Preston 1976). Están delimitados por una sola membrana, con una catalasa y oxidasa que produce peróxido de hidrogeno. Una de las funciones asociadas a los peroxisomas es la presencia de enzimas glucolíticas involucradas en la conversión de glucosa a 3-fosfoglicerato (Oppendoes y Borst 1977).
En cuanto al genoma, no posee dado que todas las proteínas funcionales en este compartimiento son codificadas por genes nucleares y post-transcripcionalmente importadas dentro de la organela (Souza 2002).
- Acidocalcisoma: vacuolas ácidas con un antiporte Ca^{+2} - H^{+} dirigido por ATP, ya que posee una bomba protón ATPasa (Vercesi y *col.* 1994). Mediante microscopía electrónica de transmisión, el orgánulo aparece vacío o con una inclusión de una capa delgada de material denso que se adhiere a la cara interna de la membrana (Docampo y *col.* 2010). Entre los elementos que se concentran podemos destacar

fosforo, magnesio, calcio, sodio y zinc, muy poco de cloro, potasio y azufre (Scott y col. 1997; Miranda y col. 2000).

Dentro de los procesos biológicos que regula son:

A) almacenamiento de Ca^{+2} , en momentos vitales del ciclo del parásito, el cual a su vez interviene en otros procesos celulares.

B) almacenaje de energía debido a la cantidad de pirofosfato inorgánico que contiene.

C) regulación del pH citoplasmático, por la bomba protón ATPasa.

D) regulación en el proceso de osmorregulación (Docampo y Moreno 1999).

- **Bolsillo flagelar:** depresión de donde emerge el flagelo, que se encuentra en la región anterior de la célula (Webster y Russel 1993). Se lo considera como un compartimento aislado del medio extracelular, debido a que es la única región sin capa de microtúbulos y posee una membrana distinta a la del cuerpo celular y el flagelo. También, han demostrado que produce una intensa actividad endocítica y exocítica (De Souza 1989).

En la figura 8, se pueden observar cada una de las organelas mencionadas y caracterizadas anteriormente. Además, se visualizan el resto de las organelas que constituyen a los epimastigotes, las cuales no han sido de relevancia para este trabajo.

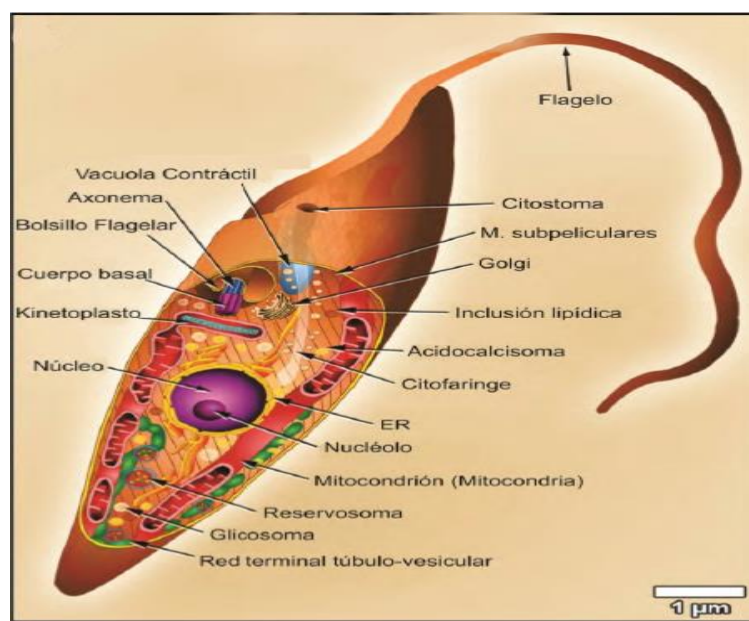


Figura 8. Dibujo derivado de micrografías electrónicas mostrando las principales organelas presentes en el epimastigote (modificado de Teixeira y col. 2012)

1.3.3. MITOCONDRIA Y LAS CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS EN LA DEFENSA FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO.

La mitocondria representa una de las organelas que ocupa la mayor parte del espacio celular del parásito. En ella el oxígeno molecular se utiliza como aceptor final de electrones y es reducido a moléculas de agua (Turrens 2003). Sin embargo, sucesivas reducciones univalentes de este oxígeno pueden generar especies reactivas de oxígeno (ROS) como, por ejemplo, O_2^- , OH y H_2O_2 .

Estos derivados moleculares al ser inestables pueden rápidamente interactuar con otros radicales libres y macromoléculas, produciendo oxidantes perjudiciales que juegan un rol crítico en el desarrollo normal y en el control de mecanismos de traducción de señal que regulan la proliferación, diferenciación y muerte celular (Dröge 2002; Finkel 2003; Turrens 2003). En particular, se ha observado que los radicales libres tienen la capacidad para oxidar proteínas, lípidos, ADN nuclear y mitocondrial por producir daño a nivel mitocondrial (Zarkovic 2003; Evans y Cooke 2004).

En las células de mamíferos la principal vía de defensa contra ROS es la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxiredoxina y glutatión peroxidasa. Además, existen otros antioxidantes no enzimáticos como son la vitamina E (α -tocoferol) y vitamina C (ascorbato) (Nordberg y Arnér 2001).

Aunque *T. cruzi* también cuenta con un sistema enzimático de defensa para sobrevivir en ambientes oxidantes, es menor, dado que no se ha detectado actividad CAT, y glutatión dependiente de selenio, y tienen baja actividad de SOD (Wilkinson y Kelly 2003; Turrens 2004). En cambio, se ha descrito la presencia de dos triparedoxinas y dos glutationes dependientes de cisteína (Wilkinson y *col.* 2000; Piacenza y *col.* 2008). De esta forma el tripanotión es la principal molécula de defensa contra el estrés oxidativo, dicha molécula es un conjugado de GSH-espermidina (Ariyanayagam y Fairlamb 2001; Krauth- Siegel y *col.* 1999; Manta y *col.* 2013).

1.3.4. CICLO DE VIDA

El ciclo biológico de *T. cruzi* incluye la infección del hospedador vertebrado y la transmisión por insectos vectores (figura 9).

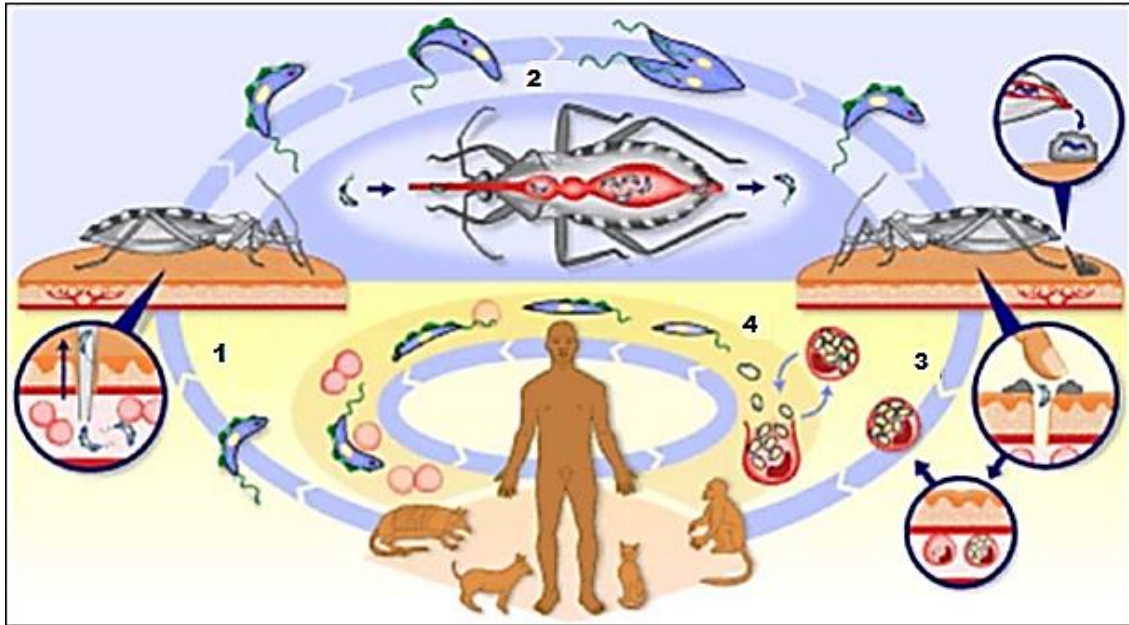


Figura 9. Ciclo biológico de *T. cruzi* (modificado de Massarini y Schnek 2015).

Como se muestra en la imagen anterior, el ciclo se inicia luego de la picadura de la vinchuca a un vertebrado huésped infectado con tripomastigotes. Una vez que el insecto ingirió a los parásitos, estos se transforman en epimastigote en su estómago (Álvarez-Hernández y col. 2016). Ya en el intestino, los epimastigotes se dividen repetidas veces por fisión binaria y pueden atacar a las células de este órgano (Zeledon y col. 1997). Una vez que los epimastigotes alcanzan el intestino posterior, se transforman en tripomastigote metacíclico infectivos que, eliminados por las heces u orina, en el momento de la picadura del vector infectan al vertebrado (Rassi y col. 2010). Su ingreso se ve facilitado por enzimas proteolíticas contenidas en la saliva del hematófago (Amino y col. 2002; Coura 2007).

Dentro del huésped definitivo, los tripanosomas son fagocitados por macrófagos presentes en la piel. Allí son incorporados en una vesícula parasitológica de la cual se escapan al citoplasma diferenciándose a amastigote, durante esta fase se dividen y se transforman a tripomastigote que lisa la célula liberándose al torrente sanguíneo. Luego, se dirigen a órganos blancos como miocardio, músculo esquelético, liso, entre otros (Andrade y Andrews 2005). Finalmente, el ciclo terminaría cuando un vector

triatomino se alimenta nuevamente de otro hospedador sano (Ministerio de Sanidad y Políticas Sociales 2009; Kowalska y col. 2011).

1.4. VIAS DE TRANSMISIÓN

En el 90% de los casos, la enfermedad de Chagas se transmite por vía vectorial. Sin embargo, existen otras vías en las que se puede transmitir el tripanosoma a humanos (Guhl 2009).

- Vía transfusional: es la que se transmite por transfusión de sangre de donantes infectados o por el uso de agujas y jeringas que hayan sido infectadas. El riesgo por una unidad de 500 ml de sangre es de 12-20% (Mitelman y col. 2011). Debido a esto, en Argentina y otros países considerados endémicos, se realizan por ley estudios específicos para descartar contaminación sanguínea. Otra vía similar es por trasplantes de órganos que, aunque se realice un control riguroso, en ocasiones personas infectadas pueden aún ser donantes (Sanmartino y col. 2015).
- Vía congénita o vertical: ocurre debido a la presencia de parasitemia durante el embarazo y es más común que ocurra si se encuentra en la fase aguda de la enfermedad (Guhl 2009; Zingales y col. 2009). Según datos, ocurre en un porcentaje entre el 1-12% de los casos, ya que varía según la cepa de *T. cruzi*, la parasitemia de la madre y la existencia de daño placentario (Náquira y Cabrera 2009; Álvarez-Hernández y col. 2016).
- Vía sexual: aunque las evidencias no son suficientes, hay estudios que revelan la transmisión de *T. cruzi* por relaciones sexuales en ratones previamente infectados que se reproducen con hembras no infectadas o viceversa. Luego, por medio de estudios parasitológicos, serológicos y moleculares se detectó la presencia del parásito en sangre, testículos u ovarios de ratones que no estaban infectados (Ribeiro y col. 2016; Gomes y col. 2019). Además, se ha observado un mayor porcentaje de parásitos presentes en semen en comparación al fluido vaginal, por lo que sugieren que el semen resultaría ser un mejor vehículo de transmisión (Ribeiro y col. 2016).

- Vía oral: se asocia a la ingesta de heces de triatomas previamente infectadas con el parásito, la utilización de utensilios para la comida contaminados o consumir carne de animales infectados. Varios casos observados en Brasil, Colombia, México, y Venezuela fueron por consumir un jugo de caña de azúcar que estaba contaminado con *T. cruzi*, como también beber suplemento de moras (açai) contaminadas, que son muy elegidos por los turistas. Esto se debe a la utilización de una higiene inadecuada en la recolección y manipulación de la materia prima, antes del macerado (Dias 2006; Silveira 2006; Instituto Nacional de Salud 2010; Santana y col. 2019).
- Por accidentes de laboratorio: generalmente les ocurre a personas que trabajan con vinchucas infectadas, medios con parásitos o en hospitales que no toman las medidas biosanitarias correctas, aun así, el porcentaje de casos registrados es del 1% (Cabello y Cabello 2008).

Es importante destacar que el Chagas no se transmite por la leche materna (no es necesario interrumpir la lactancia), ni besos o abrazos, ni por dar la mano o compartir cualquier bebida o alimento (Sanmatino y col. 2005).

1.5. MANIFESTACIONES CLINICAS

La enfermedad de Chagas presenta dos estadios, la fase aguda que es la etapa inicial y la fase crónica que puede persistir durante toda la vida del paciente.

La fase aguda se produce luego de la inoculación del parásito, con un periodo de incubación de cuatro a catorce días y duración de dos a cuatro meses. En el 95% de los casos esta fase se caracteriza por ser asintomática, aunque el otro 5% podría presentar signos y síntomas relacionados al sitio de infección o manifestaciones sistémicas. Entre ellos se destacan: signo de Romaña (cuando la vía de entrada es conjuntival) o chagoma, y más relacionado a lo sistémico fiebre, astenia, mialgias, anorexia, cefalea y miocarditis que es la principal causa de muerte durante esta fase (Asociación Colombiana de Infectología 2007; Ministerio de Salud 2011; Mitelman y col. 2011; Barbosa y Nunes 2012; OMS 2013).

La fase crónica a su vez se divide en dos; la fase asintomática o indeterminada, la cual, aunque no presente síntomas se observa parasitemia (Gastañaga y col. 2008). En

general, esta forma persiste entorno al 50-70% de los pacientes con la enfermedad, mientras que los demás casos pueden pasar a la fase sintomática a los 10-30 años luego de la infección (Apt y col. 2008; Ministerio de Salud 2011).

Por último, la fase crónica sintomática, se caracteriza por dos tipos de manifestaciones clínicas: una cardiovascular y la otra gastrointestinal con bajos o fluctuantes niveles de parasitemia. La sintomatología que se observa en pacientes enfermos, en el continente americano, depende principalmente del DTU I y II, como se observa en la figura 6 anteriormente mostrada.

El primer síntoma relacionado a una enfermedad cardiovascular ocurre entre el 10-30% de los casos y es la principal causa de mortalidad, dado que produce un fallo cardíaco progresivo (20-25%) y complicaciones tromboembólicas (10-15%) (Asociación Colombiana de Infectología 2007; Apt y col. 2008; Ministerio de Salud, 2011, Ferre y col. 2013). Las manifestaciones digestivas son menos frecuentes, aproximadamente afectan a un 10% de los infectados, desarrollando una denervación intramural parasimpática con hipertrofia de las capas musculares y progresiva pérdida de la capacidad contráctil; por lo general, han observado que ocurre a nivel del esófago y del colón (Asociación Colombiana de Infectología 2007; Apt y col. 2008; González y col. 2014, Bern 2015).

1.6. TRATAMIENTO

Hace más de cuarenta años se descubrió el uso de dos fármacos eficientes para el tratamiento contra el Mal de Chagas, Benznidazol (derivado nitroimidazol, figura 10A) y Nifurtimox (nitrofurano, figura 10B). Estas drogas han demostrado ser efectivas principalmente durante la fase aguda, y su actividad tripanocida está relacionada a la creación de radicales superóxidos que producen estrés oxidativo y, por lo tanto, muerte celular de los parásitos (Manne y col. 2013; Ventura y col. 2013).

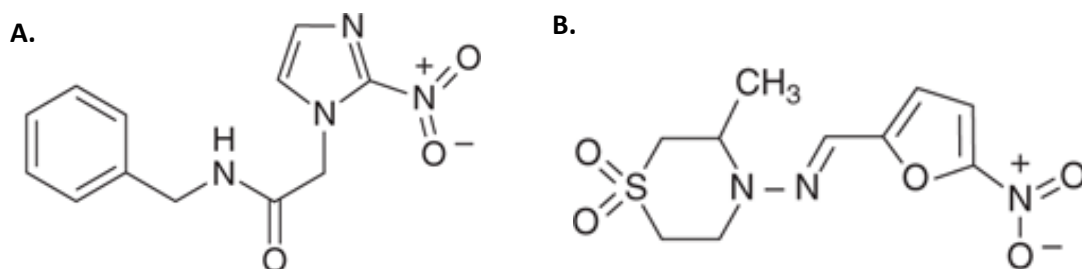


Figura 10. Estructuras químicas del Benznidazol (A) y Nifurtimox (B).

La dosis recomendada de Benznidazol en adultos es de 5-7 mg/Kg/día, repartido en 2-3 dosis durante 60 días, mientras que en niños de hasta 12 años se recomienda administrar 10 mg/Kg/día durante el mismo periodo de tiempo. La dosis máxima diaria en pacientes que pesen más de 60 kg no debe superar los 300 mg. En el caso del Nifurtimox, la dosis para el adulto es de 8-10 mg/Kg/día y en niños de 15-20 mg/Kg/día, la cual se administra vía oral y repartida entre 3-4 dosis durante 60- 90 días (Álvarez-Hernández y *col.* 2016; Salazar-Schettino y *col.* 2016).

A pesar de que el tratamiento de elección es el Benznidazol, existe un gran debate acerca de su efectividad real teniendo en cuenta la frecuencia de efectos adversos que presenta, entre los cuales hay digestivos (anorexia, vómitos, dolor abdominal) que se inician en la primera semana de tratamiento, síntomas de hipersensibilidad, erupciones cutáneas y exantema (24-50%), entre otros (Haberland y *col.* 2013). Además, alteraciones hematológicas como anemia, leucopenia, trombopenia, agranulocitosis y purpura presentes a partir de la segunda semana (Viotti y *col.* 2006; Carabarin-Lima y *col.* 2011; Duschak 2011). En cuanto al Nifurtimox, los efectos secundarios están asociados con la pérdida de peso, anorexia, irritabilidad, alteraciones del sueño, vómitos, diarrea, cefalea, convulsiones, neuropatías y psicosis (Rassi y *col.* 2009; Rassi y Luquetti 2003).

Por ello, se recomienda administrar un tratamiento complementario en función a la sintomatología presente e incluso observar el área geográfica del paciente, como también la cepa responsable de la infección (hay cepas resistentes), ya que la respuesta terapéutica se vería influenciada por estos factores (González y *col.* 2014).

1.7. ANTECEDENTES MUNDIALES Y REGIONALES DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Como se ha observado a lo largo de todo el texto, desde su descubrimiento, la enfermedad de Chagas aún continúa siendo un reto para los profesionales que se encargan de estudiarla. Esto no solo se debe a la diversidad de cepas de parásitos, sino a un “proceso de globalización” que han hecho posibles flujos migratorios desde países endémicos a los que son no endémicos (Guhl y *col.* 2000; Gascón 2005, Gascón y *col.* 2010).

Por lo tanto, como se muestra en la figura 11, en los últimos 20 años el Chagas pasó de ser un problema solamente latinoamericano a una problemática global (Briceño-León

2009; Sanmartino 2009). Así podemos observar casos de personas infectadas en distintos países de Europa, Asia y Norteamérica donde si bien no hay riesgo de transmisión vectorial, se han presentado casos positivos correspondientes a otras vías de transmisión. Debido a esto, a fines del siglo XX y principios de XXI, se implementaron controles previos a una transfusión sanguínea o donación de órganos, en países donde antes no se hacían, para evitar principalmente la transmisión vía transfusional (Briceño-León 2009).

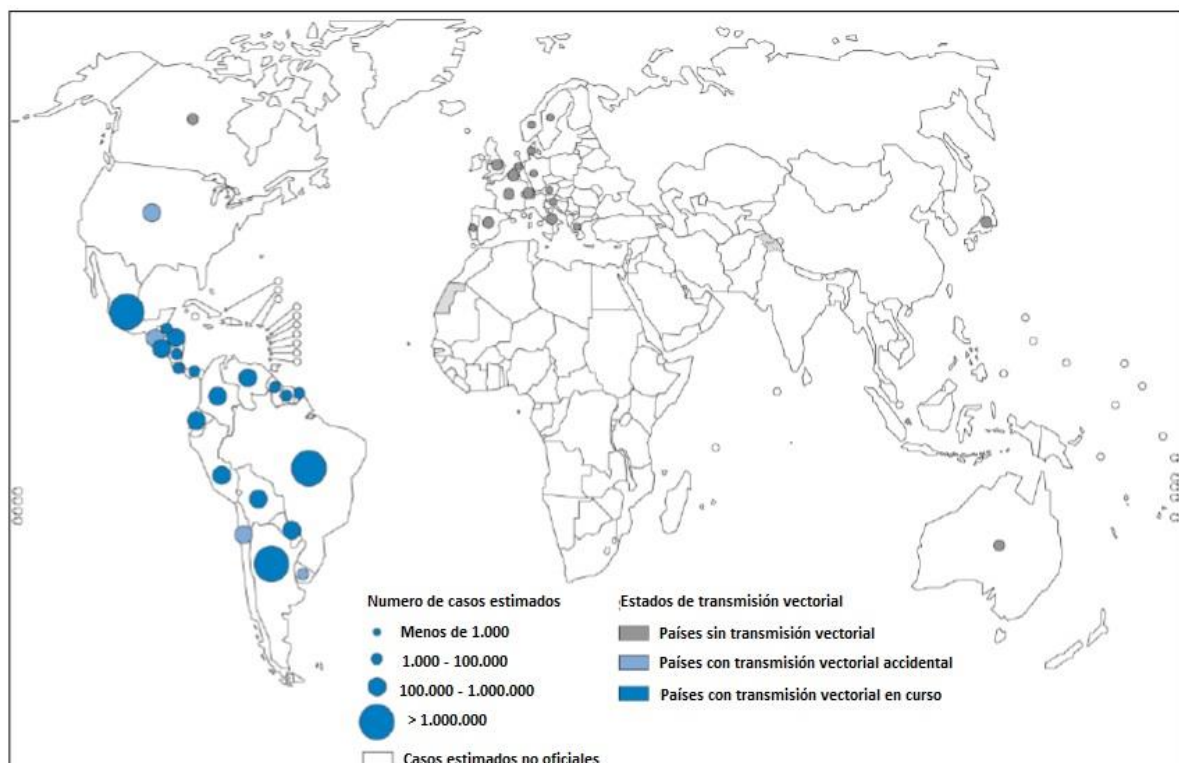


Figura 11. Mapa mundial modificado (Idioma) de la Distribución Estimada de los Casos de Chagas, (<http://gamapservr.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>).

Según la organización mundial de la salud (OMS 2013) el número de personas infectadas por el *T. cruzi* descendió de doce millones en el 2009 a siete u ocho millones en el 2013, a lo largo del mundo. La prevalencia de esta enfermedad varía según la región geográfica, y se pueden establecer cuatro patrones: baja (<1%) como México, moderada (1-5%), como Chile o Brasil, alta (5-10%) como Argentina o Colombia, y muy alta (30%) como el caso de Bolivia (Sundar y Chakravarty 2013; González y col. 2014). Particularmente, en Argentina la Organización Panamericana de la Salud (OPS 2013) estimó en el 2006, que un millón seiscientos mil personas se encuentran infectadas

con el parásito y que al menos siete millones trescientas mil están expuestas. Sin embargo, la OMS reconoce que los datos obtenidos hasta la actualidad no reflejan una verdadera magnitud del problema, ya que muchos de ellos corresponden a estudios serológicos aislados y otras a aproximaciones estadísticas que no siempre dan cuenta de la dimensión real de una región dada.

1.8. IMPORTANCIA SOCIAL

En muchos trabajos toman a la enfermedad de Chagas como un conjunto de áreas involucradas, en la cual los aspectos sociales no quedan apartados. Actualmente, el Mal de Chagas es considerado como una “Enfermedad Olvidada” (como cita Carina Perotti 2014). Esta investigadora resume el ciclo del olvido, el cual “Empieza en el paciente cuando consulta al médico, y cuando el médico no tiene esta enfermedad en cuenta, no la diagnostica. Al no haber diagnóstico, no se pide el tratamiento a los Gobiernos, los Gobiernos no piden a las farmacéuticas, al no haber demanda tampoco se invierte en investigación al respecto. Y así, se perpetúa el olvido y la desatención” (Médicos sin frontera 2018).

Sumado a ello se destaca la falta de datos reales de la enfermedad a nivel mundial (OMS 2018), y si bien existen avances científicos en cuanto a la comprensión, prevención y tratamiento, sigue muriendo gente y existiendo un gran porcentaje de personas infectadas (Amieva 2014). En solución a ello plantean crear un mayor nexo entre instituciones educativas y científicas mediante acciones de divulgación y/o transferencia que producen un intercambio de saberes entre todos los actores para un enfoque integral sobre el tema (Sanmartino y col. 2012; Amieva y col. 2013; Medone y col. 2013). Con ello se lograría una perspectiva crítica que a su vez permita la búsqueda de soluciones eficaces para cada población afectada.

Es importante destacar que, con la globalización, ya no se trata de una enfermedad meramente asociada a lo rural, sino que paso a ser un problema de todos. Esto conlleva que en varios países ya se esté llevando a cabo normativas al respecto y aplicando políticas públicas, como España y México. En Argentina, recién a fines del 2006, con la creación del “Programa Federal de Chagas”, reformulado a partir del 2008 en “Programa Nacional de Chagas”; se hizo vigencia del “Plan Nacional de Chagas 2011-2016” cuyos objetivos principales eran (Sanmartino y col. 2015):

- Alcanzar y sostener la interrupción de la transmisión vectorial de *T. cruzi* a través de la eliminación o reducción en domicilio y peridomicilio.
- Sostener la interrupción de la transmisión por transfusión y trasplantes de *T. cruzi*.
- Optimizar el diagnóstico precoz y tratamiento oportuno de la infección congénita.
- Optimizar el diagnóstico precoz y tratamiento oportuno de la infección aguda y crónica.
- Desarrollar y sostener estrategias generales y transversales a todo el programa.

1.9. COMPUESTOS NATURALES

Como mencionamos anteriormente, el tratamiento para el Chagas se basa en el uso de dos fármacos, el Benznidazol y Nifurtimox, pero aún se debate su uso dado que presentan una variedad de efectos secundarios, baja tolerabilidad, dificultad de administración y alto costo (DNDi 2015). Por esta razón, en los últimos años se ha promovido el estudio de compuestos naturales, es decir, metabolitos secundarios de plantas, como una alternativa a los actuales compuestos tripanocidas. Entre los cuales, los terpenos y flavonoides muestran ser moléculas prometedoras (Schmidt y col. 2012). Debido a que, son compuestos indispensables en una variedad de aplicaciones nutricéuticas, farmacéuticas, medicinal y cosmética; porque presentan diversas actividades biológicas tales como efectos antiinflamatorios, antitumorales y proapoptóticos (Hayashi y col. 1988; Metodiewa y col. 1997; Walker y col. 2000).

Además, existen otros compuestos naturales que poseen actividad tripanocida, incluso a bajas concentraciones, como lactonas sesquiterpénica (Brenigio y col. 2000; Jimenez-Ortiz y col. 2005), diterpenos (Sanchez y col. 2006; Lozano y col. 2012), benzoquinonas y derivados (Spina y col. 2018), entre otros (Barros de Alencar y col. 2017).

Flavonoides:

Son usados por las plantas para su crecimiento y defensa contra plagas existentes (Havsteen 2002), constituyendo uno de los principales compuestos de las partes aéreas de la mayoría de los vegetales. Ellos pertenecen a una clase de metabolito secundario que presenta una estructura polifenólica y se subdividen en diferentes

subgrupos, dependiendo del grado de insaturación y oxidación de sus anillos C y B (figura 12), en chalcones, flavones, flavonoles e isoflavones (Panche *et al.* 2016).

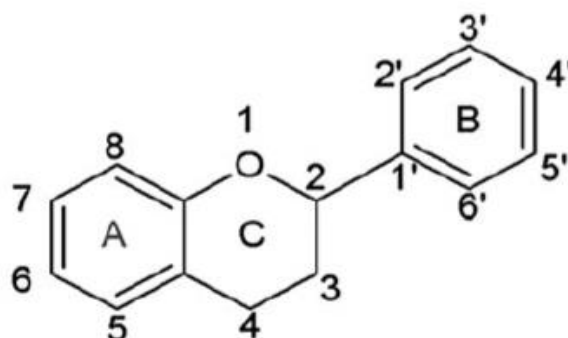


Figura 11. Estructura básica del esqueleto de flavonoides (Panche *et al.* 2016)

Estos compuestos tienen la capacidad de modular la función enzimática de células animales, y pueden ser inhibidores enzimáticos (xantina oxidasa, ciclo-oxigenasa, lipoxigenasa a fosfoinositidin-3-quinasa). Lo que, a su vez, le confiere propiedad antioxidativa, antiinflamatoria, antiproliferativa de células cancerígenas, y antimutagénica, entre otras (Middleton *et al.* 2000; Cotelle 2001).

Además, estudios recientes han reportado una variedad de flavonoides extraídos de *Stevia aristata* y *S. satureiifolia*, como hispidulina, santina, eupatorina, diclorometano, entre otros, con actividad tripanocida sobre epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*, incluso sin producir toxicidad a la célula hospedadora (Sülsen *et al.* 2007; Beer *et al.* 2016). Aunque en su investigación no identificaron un posible blanco molecular, en el cual actuaran estos compuestos.

Por otro lado, en la literatura se establece una ambigüedad en determinada actividad de los flavonoides, ya que pueden actuar tanto como antioxidante al igual que prooxidantes. Esto depende de la naturaleza electrónica y posición de los sustituyentes alrededor de los anillos de carbono, como también del recurso del radical oxígeno y del medio (acuoso o lipídico) usado (Cotelle 2001).

Se considera en general que, al tener más sustituciones OH se incrementa la actividad antioxidante, sin embargo, depende de la posición en que se lleva a cabo tal sustitución. Por ejemplo, la posición de un OH en posición 3' y 4' sumado a la presencia del doble enlace en 2-3, favorece la conjugación de los anillos aromáticos aumentando la estabilidad del radical flavonoide, lo que aumenta la capacidad antioxidante (Bors *et al.* 1990; Middleton *et al.* 2000; Burda y Oleszek 2001). En

relación al anillo B, un fenol representa un buen donador de electrones e hidrógenos a radicales libres favoreciendo la función mencionada (Cao y col. 1996), al igual que el B-catecol el cual genera un radical orto-semiquinona estable (Mora y col. 1990) que facilita la deslocalización electrónica (Arora y col. 1998).

Por el contrario, los flavonoides que poseen un anillo B pirogalol se pueden autooxidar en presencia de metales de transición o directamente generar radicales inestables que serían secuestradores de radicales libres débiles (Chan y col. 1999; Galati y col. 1999; Burda y Oleszek 2001; Galati y O'brien 2004). Este proceso de oxidación molecular o autooxidación promueve la peroxidación lipídica y rupturas del ADN, dado que suele ir acompañado de la producción de radicales libres o inhibición de enzimas que catalizan las reacciones oxido-reducción, involucrando indirectamente la producción de especies reactivas de oxígeno (Hodnick y col. 1986; Sahu y Gray 1996; Middleton y col. 2000; Awad y col. 2001).

En algunos ensayos, se ha demostrado que la capacidad de actuar como prooxidante provoca disfunción mitocondrial relacionado con un colapso en el potencial de membrana por medio de los radicales libres (Tang y Porter 1996; Bhat y Pezzuto 2002; Furukawa y col. 2003; Galati y O'brien 2004). En relación a lo mencionado en el párrafo anterior, como ejemplo de la inhibición de un proceso regulador de especies reactivas de oxígeno tenemos la actividad del glutatión y glutatión-S-transferasa, cuya acción se ve disminuida en presencia de tres flavonoides (quercetina, myricetina y kemferol), correlacionado al aumento de la concentración de los compuestos (Sahu y Gray 1996).

No obstante, cabe destacar que la O-sustitución inhibe ambas funciones: antioxidante y prooxidante (Cao y col. 1996). Particularmente, la O-metilación compromete la actividad prooxidante, dado que produce efectos estéricos que perturban la planaridad del compuesto y esto a su vez inhibe la conjugación de los anillos que disminuye la dislocación de electrones y estabilidad del radical fenoxilo (Arora y col. 1998; Dugas y col. 2000; Burda y Oleszek 2001).

Nosotros en particular estudiamos tres nuevos compuestos flavonoides, Salvigenina, Xantomicrol (figura 13.A y B) y Apigenina, (figura 14.A) pertenecientes al subgrupo de flavonas. De los cuales, los dos primeros fueron extraídos de la parte aérea de *Baccharis calliprinos* (figura 13.C) y el último de *Larrea divaricata* (figura 14.B), ambas plantas nativas de la región de cuyo. Teniendo en cuenta las estructuras químicas de

estos compuestos, consideramos que la presencia de grupos lactonas y oxidrilos contribuyen a aumentar la resonancia química, y con ello producir variaciones en los niveles de especies reactivas de oxígeno de los parásitos. Además, al variar la cantidad y tipos de sustituyentes entre los tres compuestos, esperamos observar variaciones en sus efectos.

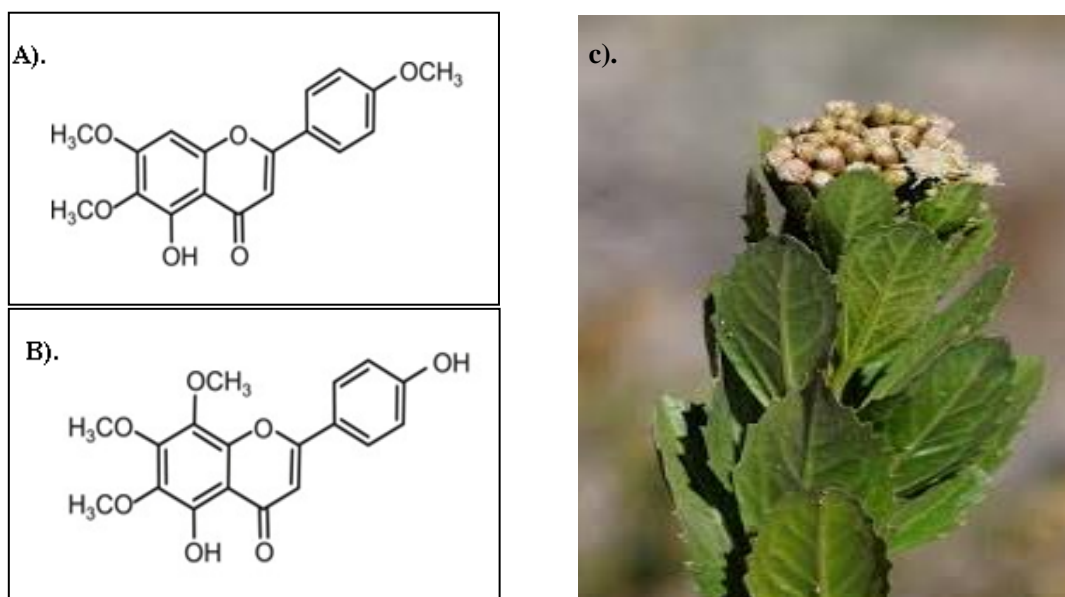


Figura 13. Estructura química de Salvigenina (A), Xantomicrol (B), e imagen de *Baccharis calliprinos* (C), planta a partir de la cual son extraídos los compuestos mostrados.

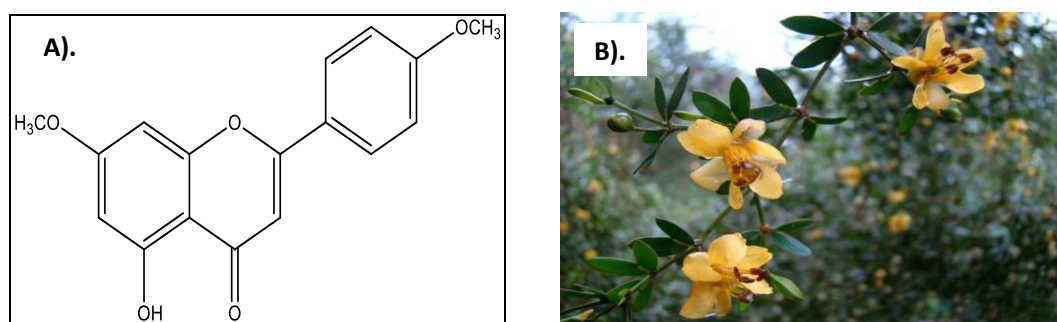


Figura 14. Estructura química de Apigenina (A) e imagen de *Larrea divaricata* (B), planta a partir de la cual es extraído el compuesto mostrado.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Dadas las estructuras químicas de los flavonoides naturales (**Apigenina, Xantomicrol y Salvigenina**), en particular sus grupos oxidrilos y lactonas, y su amplia acción sobre células de mamíferos, es posible que sea activo sobre *T. cruzi*.

2.2. OBJETIVOS

General: Estudiar el efecto de los flavonoides naturales sobre la proliferación y viabilidad de *T. cruzi*, evaluando sus posibles mecanismos de acción.

Específicos:

- Evaluar los efectos de nuevas moléculas flavonoides sobre la proliferación y viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi*, determinando los valores de IC50 de los mismos.
- Evaluar la reversibilidad del efecto antiparasitario de los tres flavonoides.
- Identificar posibles blancos moleculares de los compuestos.
- Estudiar el efecto de los compuestos sobre la morfología de los parásitos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. COMPUESTOS

Los compuestos fueron extraídos de partes aéreas de dos plantas nativas colectadas en la Provincia de San Luis. **Xantomicrol** (XML) y **Salvigenina** (SVG) fueron purificados de *Baccharis calliprinos* (Cabrera y col. 2016), mientras que **Apigenina** (AGN) de *Larrea divaricata cav* (Vogt y col. 2013). La pureza de cada compuesto es mayor al 95 % ensayada por cromatografía en capa fina y métodos espectroscópicos. Para las soluciones stock de cada compuesto, utilizamos como disolvente orgánico dimetilsulfóxido (DMSO) Merck, con 99.9% de pureza.

3.2. CULTIVO DE PARÁSITOS

Epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Dm28c, DTU I) fueron cultivados a 28°C en medio líquido Diamond (0.1 M NaCl, 0.05 M K₂HPO₄, 0.625% triptosa, 0.625% triptona, 0.625% extracto de levadura, 1:400 de hemina y 1:200 de penicilina/estreptomicina), pH 7,2, suplementado en 10 % de Suero Fetal Bovino inactivado (Internegocios), en presencia o ausencia de las concentraciones crecientes de los compuestos.

3.3. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

Se realizaron alícuotas de 3×10^6 parásitos/ml provenientes de epimastigotes de cultivos de 5-7 días (fase estacionaria), en microtubos estériles, con un volumen final de 1 ml, ajustado con medio de cultivo. Estas alícuotas fueron incubadas por 48h en ausencia (control) o presencia de los diferentes compuestos a distintas concentraciones (1, 5 y 10 µg/ml). Además, se realizaron controles positivos con benznidazol (BZN) (5 µg/ml) y negativo con DMSO (solvente). Se tomaron muestras cada 24 h. Para determinar su concentración, los parásitos fueron fijados con p-formaldehído 2% en buffer fosfato salino (PBS, NaCl 0,15 M, NaHPO₄ 20 mM, pH 7,4) y contados en cámara de Neubauer.

3.4. ESTUDIO DE INDICES DE MORTALIDAD

Las muestras obtenidas con los distintos tratamientos fueron teñidas con eosina (0.1 % de eosina en PBS), la cual tiñe de rojo a los parásitos muertos, permitiendo de este

modo obtener una relación entre parásitos vivos y muertos por medio de microscopía óptica.

3.5. DETERMINACIÓN DEL IC50

Para determinar el IC50 de los compuestos se realizaron curvas de proliferación y ensayos de mortalidad con diferentes concentraciones de los mismos, como se menciona en 3.3 y 3.4. Las concentraciones utilizadas fueron 1, 2, 5, 7, y 10 µg/ml. A partir de los datos obtenidos de los ensayos de mortalidad a las 24 h determinamos el IC50 de cada compuesto. Decidimos excluir algunas concentraciones (2, y 7 µg/ml) de las curvas de proliferación para que se puedan apreciar los resultados obtenidos y evitar superposición de líneas.

3.6. ENSAYO DE REVERSIBILIDAD

Para evaluar la reversibilidad del efecto de los diferentes compuestos sobre la proliferación de *T. cruzi*, se incubaron 3×10^6 parásitos/ml, en presencia o ausencia de las distintas concentraciones de los mismos (1, 5 y 10 µg/ml) durante 1, 3, 6, 24 y 48h. Transcurridos dichos periodos de tiempo, los tubos fueron centrifugados a 2500 rpm por 10 min para eliminar los diferentes compuestos, y adicionamos medio de cultivo fresco para continuar con el crecimiento de los parásitos. Finalmente, se tomaron las respectivas muestras para el conteo de parásitos a las 24 y 48h.

3.7. ESTUDIO DE BLANCOS MOLECULARES:

3.7.1. MEDICION DE LOS NIVELES DE ROS

En este ensayo, utilizamos la sonda 2',7'-dichlorodihydrofluoresceína diacetato (H2DCFDA) (Macedo-Silva y col., 2011), un compuesto no polar que fácilmente difunde dentro de las células, donde es hidrolizado a dichlorodihydrofluoresceína un derivado no fluorescente y de este modo es retenido dentro de las células. En presencia de un oxidante apropiado, dichlorodihydrofluoresceína se reduce a 2,7-dichlorofluoresceína altamente fluorescente. Esta sonda emite fluorescencia en presencia de una amplia variedad de ROS, es decir, radicales peroxilo ($\text{ROO}\bullet$) e hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) y el anión peroxinitrito (ONOO^-)

Realizamos alícuotas de 5×10^6 parásitos/ml en presencia o ausencia de las diferentes concentraciones de los compuestos en estudio (1, 5 y 10 µg/ml) utilizando como

control positivo de generación de ROS peróxido de hidrogeno (2 µg/ml) (H₂O₂), y BZN (5 µg/ml). Dejamos crecer durante 24h, posteriormente a cada tratamiento lo incubamos con 2,5 µg/ml de la sonda H2DCFDA por 1 hora a 28°C en oscuridad. Al finalizar el tiempo de incubación, centrifugamos a 3000 rpm durante 10 min, descartamos el sobrenadante y resuspendimos con 100 µl de PBS 1X. Por último, la fluorescencia fue medida en una microplaca fluorimétrica, con Lector Fluoroskan Ascent FL, (Thermo scientific) con longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 538 nm, respectivamente (Barrera y *col.* 2013).

3.7.2. ENSAYO DE MTT

Por medio de este ensayo pudimos determinar la función mitocondrial de los parásitos, la cual puede verse afectada por la presencia de ROS. Este estudio se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-dehidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul llamado formazán.

Para ello, llevamos a cabo el protocolo de proliferación mencionado anteriormente en el ensayo de ROS (3.6.1) con una concentración de 3x10⁶ parásitos/ml, y luego de transcurridas las 24 horas extrajimos de cada tratamiento una muestra de 100 µl para colocarla junto con 10 µl de MTT en placas de 96 pocillos. Se incubaron 4h y posteriormente, realizamos la solubilización de los cristales de formazán con una solución que contiene SDS 10 %, HCL 0,01M en PBS 1X filtrado. La medición del formazán disuelto se realizó, con un lector de placa de ELISA a 570nm.

3.7.3. ESTUDIOS DE MORFOLOGIA DE EPIMASTIGOTES DE *T. CRUZI* POR MICROSCOPIA ÓPTICA

Se tomaron muestras (10 µl) de los parásitos expuestos a los distintos tratamientos (1, 5 y 10 µg/ml) con cada compuesto a las 24 y 48h. Realizamos extendidos (frotis) sobre portaobjetos, los cuales fueron fijados con metanol y teñidos con Giemsa de acuerdo con Brengio y *col.* 2000. Por último, cada frotis fue observado con un microscopio óptico Nikon 80i.

3.7.4. ESTUDIOS DE MORFOLOGIA DE EPIMASTIGOTES DE *T. CRUZI* POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Partiendo de 5×10^6 parásitos con medio y solo con la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$ de cada compuesto (en tubos falcón de 15 ml), se los dejó crecer por 48h. Se tomaron muestras a las 24 y 48h, centrifugamos a 2500 rpm por 10 min, descartamos el sobrenadante y realizamos 3 lavados con PBS X1 centrifugando a 3000 rpm por 5 min. Al pellet final de parásitos se le adiciono 100 μl de glutaldehído 2% en PBS 1X. Fueron mantenidos a 4°C por una semana. Luego fueron post-fijados en 2% tetróxido de osmio por 2h a 4°C. Las células fueron lavadas nuevamente con PBS, deshidratadas secuencialmente en soluciones con concentraciones crecientes de acetona. Finalmente, fueron incluidas en una resina epoxi (EPON) y se realizaron cortes ultramicrofinos (5 μm) utilizando un ultramicrotomo Leica Ultracut R. Las secciones fueron contrastadas con acetato de uranilo/acetona durante 3 min, lavadas con agua destilada y luego coloreadas con citrato de plomo durante 2 min. Los cortes fueron observados a diferentes magnificaciones con un microscopio electrónico Zeiss E920.

3.7.5. ESTUDIO DE PATRONES PROTEICOS POR ELECTROFORESIS

Alícuotas de 3×10^6 parásitos en ausencia o presencia de las diferentes concentraciones (1, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$) de los compuestos. Dejamos crecer por 48h, y cada 24h tomamos muestras, centrifugando a 2500 rpm por 10 min, eliminamos el sobrenadante, lavamos con PBS 1X para posteriormente lisar con buffer de Laemmli (Tris-HCL 62,5 mM, pH 6,8, SDS 1%, DTT 10 mM, glicerol 10% y azul de bromofenol 0,01%). Las proteínas fueron analizadas en geles de poliacrilamina (8%) (SDS-PAGE) y teñidas con Coomassie Blue.

3.8. ANALISIS ESTADISTICO

Los datos obtenidos se presentan como media \pm SD. El nivel de significación estadística fue analizado por Test de Student, con un nivel de significancia de $p < 0.05$, utilizando el programa estadístico Kyplot.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. ACCION DE FLAVONOIDES SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE *T. CRUZI*

Analizamos el efecto de SVG, XML y AGN sobre la proliferación de los parásitos, utilizando concentraciones de 1, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$. Como controles utilizamos DMSO y BZN (5 $\mu\text{g/ml}$).

Como se observa en la figura 15, el tratamiento con SVG tiene efecto antiproliferativo sobre los epimastigotes de *T. cruzi*, incluso a bajas concentraciones (1 $\mu\text{g/ml}$). Además, su efecto no presenta una diferencia significativa entre las distintas dosis administradas, principalmente a las 48h, y puede apreciarse desde las 24h en adelante. A concentraciones mayores (5 y 10 $\mu\text{g/ml}$) su efecto sobre los parásitos, no fluctúa durante los tiempos evaluados.

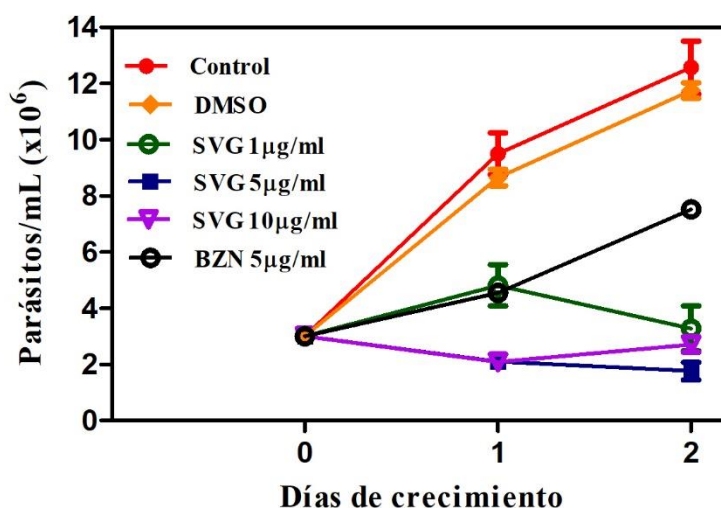


Figura 15. Efecto de SVG sobre la proliferación *in vitro* de epimastigotes de *T. cruzi* (*Dm28c*). Los valores representan el promedio (\pm SD) de las concentraciones de parásitos luego de 1 y 2 días post-tratamiento. N fue igual a 4 experimentos.

En el caso del XML (Figura 16), también tiene efecto antiproliferativo sobre los epimastigotes, independiente de la concentración suministrada. Sin embargo, el efecto es significativo a las 48 h, cuando se lo compara con el control.

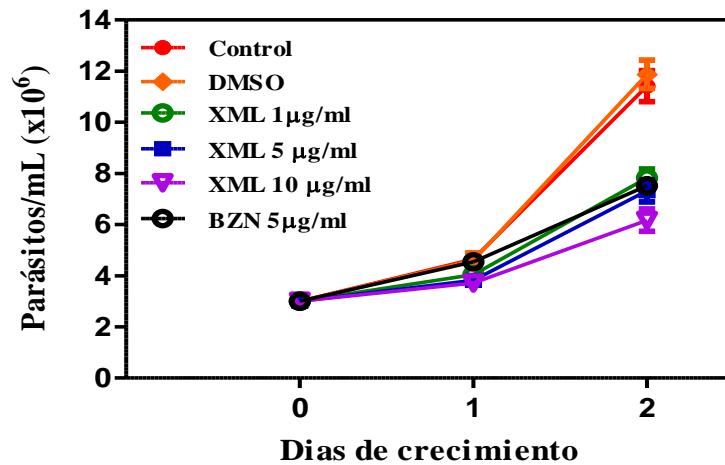


Figura 16. Efecto de XML sobre la proliferación *in vitro* de epimastigotes de *T. cruzi* (*Dm28c*). Los valores representan el promedio (\pm SD) de las concentraciones de parásitos luego de 1 y 2 días post-tratamiento. N fue igual a 4 experimentos.

Por último, con AGN (Figura 17) se observó un efecto antiproliferativo similar al de SVG, incluso a bajas concentraciones e independiente del tiempo de exposición. Además, al igual que ocurre en los otros tratamientos, hay una tendencia a tener un efecto antiproliferativo más marcado a lo que se observa con BZN a las 48h.

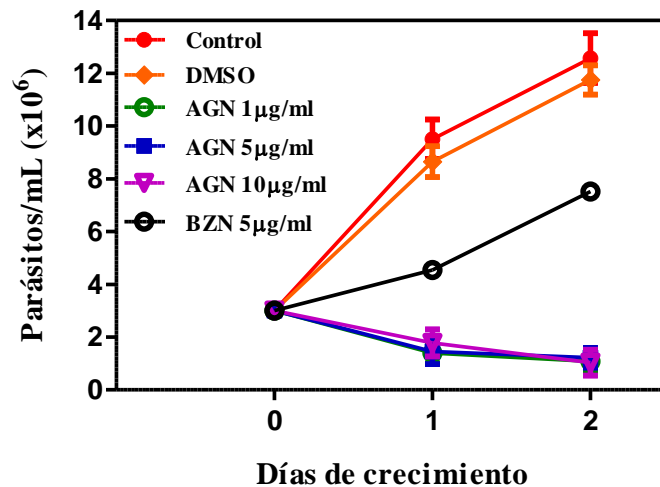


Figura 17. Efecto de AGN sobre la proliferación *in vitro* de epimastigotes de *T. cruzi* (*Dm28c*). Los valores representan el promedio (\pm SD) de las concentraciones de parásitos luego de 1 y 2 días post-tratamiento. N fue igual a 4 experimentos

4.2. ACCION DE FLAVONOIDES SOBRE MORTALIDAD DE *T. CRUZI*

Pudimos observar que el efecto de SVG sobre la mortalidad de los parásitos tratados fue dosis dependiente (Tabla 1). Con respecto a los controles se observa un claro aumento en la mortalidad de los parásitos, y en cuanto al BZN, la SVG, podría tener

una acción superior e incluso podemos ver que a las 48h con la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ llega a un 100 % de mortalidad. Ver tabla 1.

Tabla 1. Medición de mortalidad con SVG ($\mu\text{g}/\text{ml}$). Los valores representan el promedio (\pm SD) de las concentraciones.

Días de Incubación	0.0	DMSO	BZN	1	5	10
1	14.5 \pm 3.5	2.0 \pm 2.8	45.3 \pm 2.0	33.5 \pm 2.1	55.0 \pm 1.8	98.5 \pm 3.5
2	11.6 \pm 3.3	7.5 \pm 10.6	78.0 \pm 2.8	45 \pm 1.2	97.5 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0

En el ensayo con XML (Tabla 2), la mortalidad con respecto a los controles a las 24h, es mayor recién a la concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y a las 48h se puede observar aumento desde la menor concentración. Sin embargo, la acción de este compuesto en comparación al BZN no varía significativamente, y en comparación con SVG la mortalidad es menor.

Tabla 2. Medición de mortalidad con XML ($\mu\text{g}/\text{ml}$). Los valores representan el promedio (\pm SD) de las concentraciones.

Días de Incubación	0.0	DMSO	BZN	1	5	10
1	14.5 \pm 3.5	2.0 \pm 2.8	45.3 \pm 2.0	10 \pm 1.4	27.0 \pm 1.4	55.0 \pm 2.2
2	11.6 \pm 3.3	7.5 \pm 10.6	78.0 \pm 2.8	26.5 \pm 2.1	61.5 \pm 1.7	87.5 \pm 1.6

Finalmente, con AGN (Tabla 3) la mortalidad a las 24h aumenta a mayores concentraciones (5 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en relación al control. A las 48h se observa una mortalidad del 100 %, en las concentraciones mayores evaluadas con respecto al control y al tratamiento con BZN.

Tabla 3. Medición de mortalidad con AGN ($\mu\text{g}/\text{ml}$). Los valores representan el promedio (\pm SD) de las concentraciones.

Días de Incubación	0.0	DMSO	BZN	1	5	10
1	14.5 \pm 3.5	2.0 \pm 2.8	45.3 \pm 2.0	30.5 \pm 2.5	54.5 \pm 1.5	97.5 \pm 2.5
2	11.6 \pm 3.3	7.5 \pm 10.6	78.0 \pm 2.8	57.5 \pm 3.5	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.0

Como puede observarse tanto en el control (0.0) y con DMSO, los valores obtenidos corresponden a índices basales de mortalidad, ya que normalmente por escasez de nutrientes y situaciones del entorno algunos parásitos mueren. Si bien los valores del DMSO son menores, retomando las gráficas de proliferación no hay diferencia significativa.

Con estos datos, pudimos determinar el IC50 de cada compuesto (Tabla 4), que representa la concentración a la cual el compuesto inhibe el 50% del crecimiento de los parásitos. Solo con XML se necesita la mayor concentración para producir un efecto similar al de los otros compuestos con 5µg/ml.

Tabla 3. Medición del IC50 para SVG, XML y AGN.

Compuestos	IC50
SVG	5 µg/ml
XML	10 µg/ml
AGN	5 µg/ml

4.3. ANALISIS DEL EFECTO DE LOS COMPUESTOS: ENSAYO DE REVERSIÓN

Realizamos este ensayo para analizar si el efecto de SVG, AGN y XML sobre la proliferación de *T cruzi* podía revertirse cuando estos compuestos fueran eliminados del medio de cultivo. Los tiempos de exposición fueron los mencionados en 3.5.

Con SVG (Figura 18), pudimos observar un efecto antiproliferativo al menor tiempo de incubación (1h), y dicho efecto se mantiene a tiempos de exposición mayores. Por lo cual, el efecto de este compuesto no es reversible.

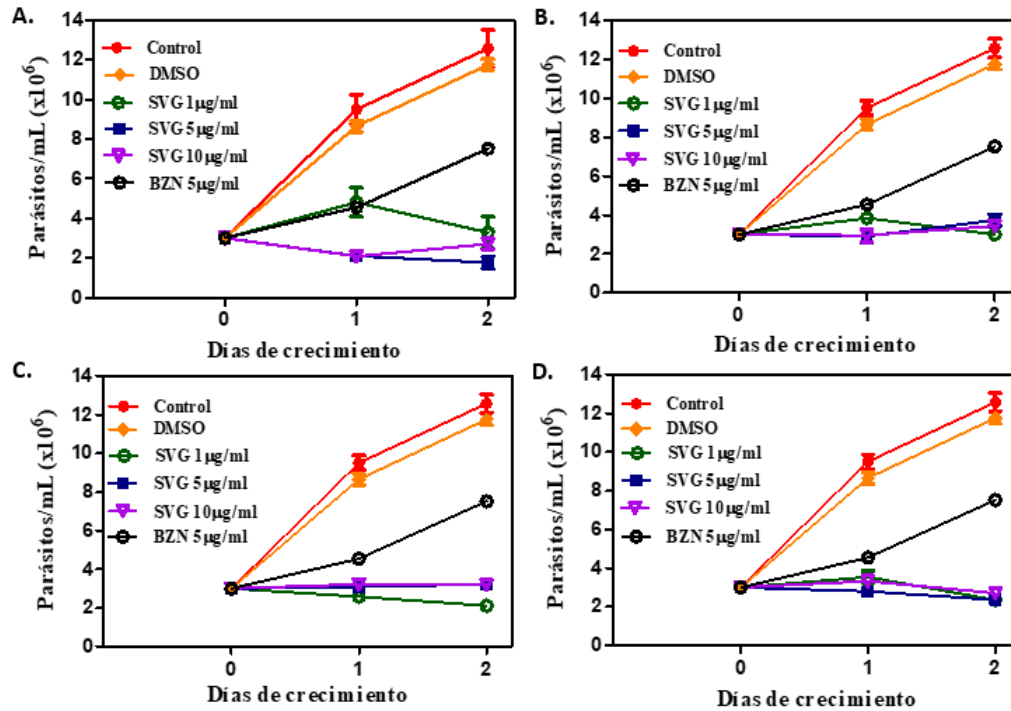


Figura 18. Ensayo de reversibilidad de SVG durante 24 y 48h (A), 1h (B), 3h (C) y 6h (D) de exposición. Los valores representan el promedio (\pm SD) de las concentraciones de parásitos luego de 1 y 2 días post-tratamiento. N fue igual a 4 experimentos

Con XML, pudimos visualizar que es necesario exponer a los epimastigotes un tiempo mínimo de 6h con el compuesto para obtener un efecto sobre la proliferación (Figura 19). Así, con un tiempo de 1 o 3h la acción, el XML podría ser reversible debido a que no estaría afectando aspectos importantes del ciclo de vida de los parásitos.

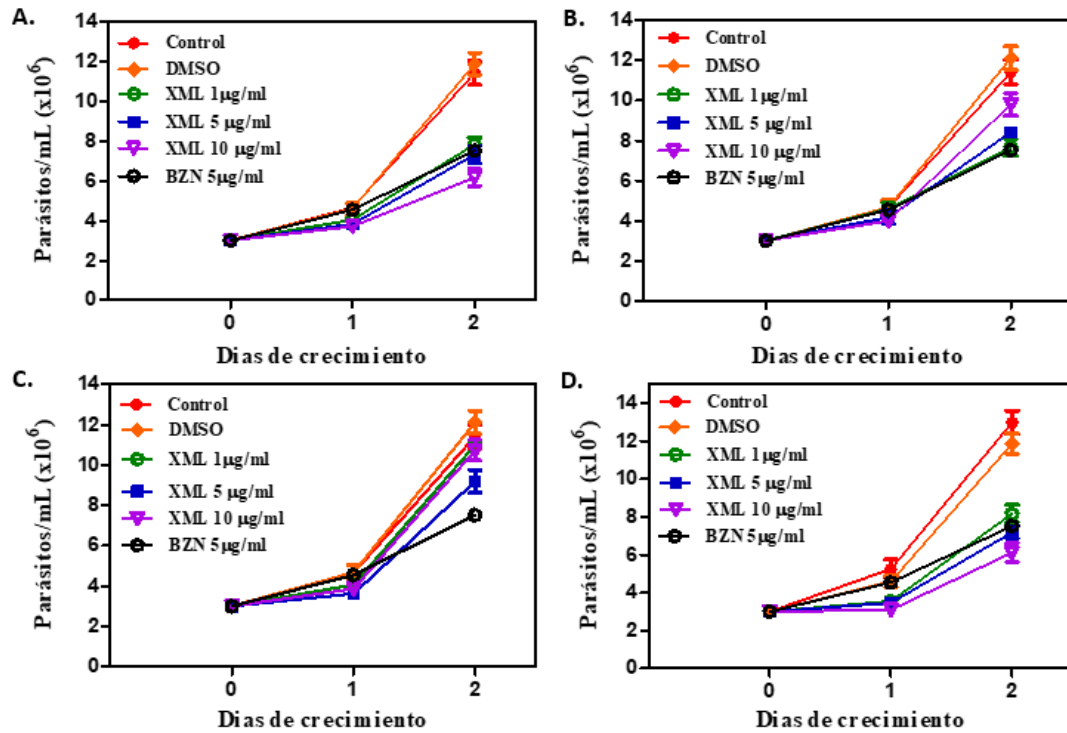


Figura 19. Ensayo de reversibilidad de XML durante 24 y 48h (A), 1h (B), 3h (C) y 6h (D) de exposición. Los valores representan el promedio (\pm SD) de las concentraciones de parásitos luego de 1 y 2 días post-tratamiento. N fue igual a 4 experimentos

Con AGN, al igual que SVG, a un menor tiempo de exposición (1h) el crecimiento de los parásitos se inhibe y se mantiene a las 3 y 6h del tratamiento, con lo cual, la acción de este compuesto no se ve revertida en eliminación de la droga post-incubación (Figura 20).

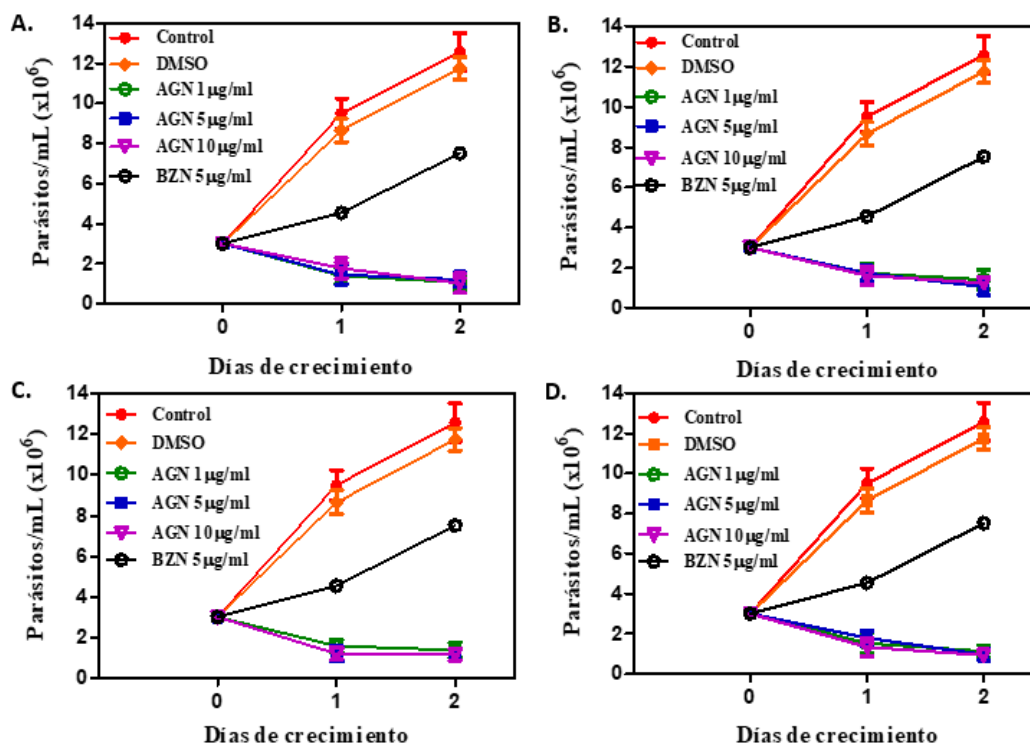


Figura 20. Ensayo de reversibilidad de AGN durante 24 y 48h (A), 1h (B), 3h (C) y 6h (D) de exposición. Los valores representan el promedio (\pm SD) de las concentraciones de parásitos luego de 1 y 2 días post-tratamiento. N fue igual a 4 experimentos

4.4. ESTUDIOS DE BLANCOS MOLECULARES:

4.4.1. MEDICIÓN DE NIVELES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO (ROS)

Hemos analizado hasta el momento a los compuestos por separado y evaluado de diferentes maneras su efecto antiproliferativo. Por lo cual, nos propusimos determinar cuáles podrían ser sus posibles blancos moleculares.

Teniendo en cuenta que *T. cruzi* posee una batería de moléculas y enzimas **exclusivas** que participan en la defensa antioxidante del parásito, esta vía sería una diana interesante de estudiar. Decidimos entonces, verificar si los compuestos podrían inducir estrés oxidativo en los parásitos. Para ello, medimos los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) post-incubación de los parásitos con los compuestos. En este ensayo, utilizamos 2',7'-diclorofluorescein diacetato (H2DCFDA), una sonda que emite fluorescencia en presencia de una amplia variedad de ROS, como se menciona anteriormente en 3.6.1, radicales peroxilo (ROO•) e hidroxilo (•OH) y el anión peroxinitrito (ONOO).

En la figura 21, se muestra la medición de ROS para SVG, donde el tratamiento produce un incremento en los niveles de ROS, dependiente de la concentración. En

comparación al tratamiento con BZN, la SVG a los 10 $\mu\text{g/ml}$ genera una acción similar. Mientras que a la concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$, la SVG ejerce una acción levemente menor, que es significativa en el caso de 1 $\mu\text{g/ml}$.

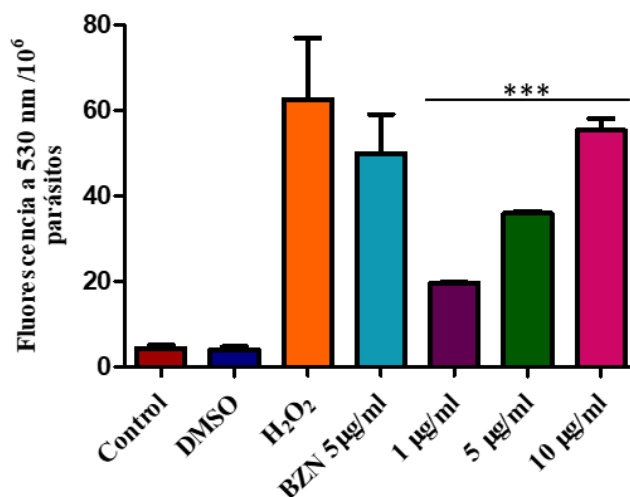


Figura 21. Medición de ROS para SVG, con el uso de la sonda H2DCFDA. Las barras representan el promedio de unidades de fluorescencia para cada caso (\pm SD) a partir de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al grupo control (***) = $p < 0.001$).

En la medición para XML, si bien tienden a elevarse los niveles de ROS, en comparación a los controles hay una leve diferencia apreciable con las concentraciones probadas. Por otro lado, se observan niveles de ROS similares a los producidos por el BZN, en cada una de las concentraciones evaluadas del XML.

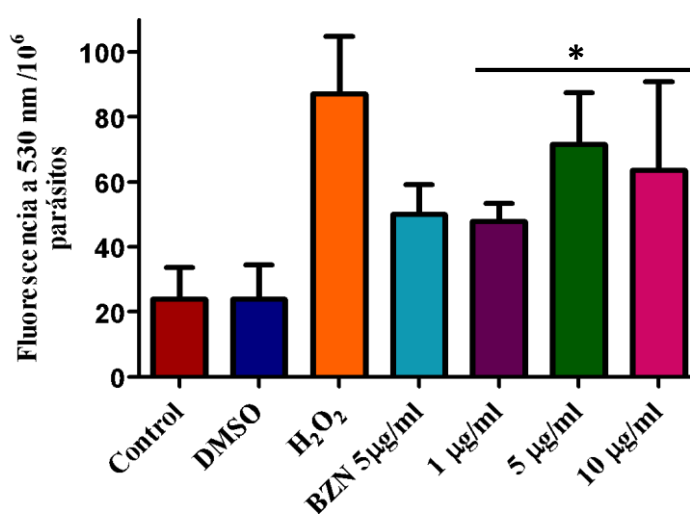


Figura 22. Medición de ROS para XML, con el uso de la sonda H2DCFDA. Las barras representan las medias de la fluorescencia \pm SD de tres independientes experimentos. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre cada grupo experimental y el grupo control ($p < 0.05$).

De forma semejante a XML, en el tratamiento con AGN a 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$, hay un incremento en los niveles de ROS con respecto a los controles. Sin embargo, en este caso, solo se observa menor producción de ROS a la concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$, en relación al tratamiento con BZN.

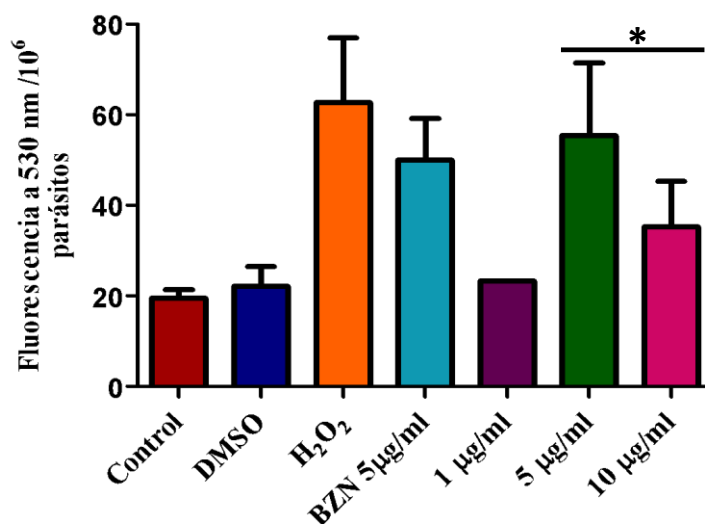


Figura 23. Medición de ROS para AGN, con el uso de la sonda H2DCFDA. Las barras representan las medias de la fluorescencia \pm SD de tres independientes experimentos. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre cada grupo experimental y el grupo control ($p < 0.05$).

Por lo tanto, inferimos que el tratamiento con los diferentes compuestos dependiendo de la concentración utilizada, podría estar inhibiendo algún sistema de eliminación de ROS o estimulando su producción y no necesariamente presentar acción prooxidante.

4.4.2. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL

La producción de ROS se correlaciona en las células con el funcionamiento mitocondrial, ya que, aunque se formen naturalmente como subproducto del metabolismo, en situaciones de estrés sus niveles pueden aumentar de gran manera y causar daños significativos a las estructuras celulares como es la mitocondria (Gupta y *col.* 2009). En base a ello, quisimos determinar si el aumento en los niveles de ROS podría afectar la actividad mitocondrial. Para medir la actividad mitocondria realizamos el ensayo de MTT.

La actividad mitocondrial con SVG disminuye en todas las concentraciones seleccionadas (1, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$), y a su vez, entre estas, no hay una diferencia significativa.

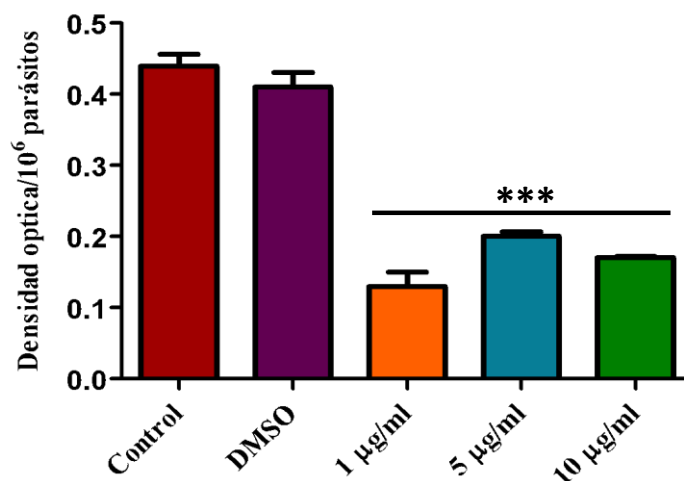


Figura 24. Medición de la actividad mitocondrial con ensayo de MTT, a distintas concentraciones de SVG. Las barras indican las medias \pm SD de tres independientes experimentos. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al grupo control (***) = $p < 0.001$).

En cambio, el compuesto XML genera disfunción mitocondrial a diferentes concentraciones. A 1 $\mu\text{g/ml}$ produce un aumento de la actividad mitocondrial, lo cual puede estar asociado a etapas tempranas de daño de la organela. Por otro lado, a los 10 $\mu\text{g/ml}$, produce una disminución de la actividad mitocondrial que podría estar asociado a un daño a nivel celular, y por ende, disminución de la viabilidad de los parásitos.

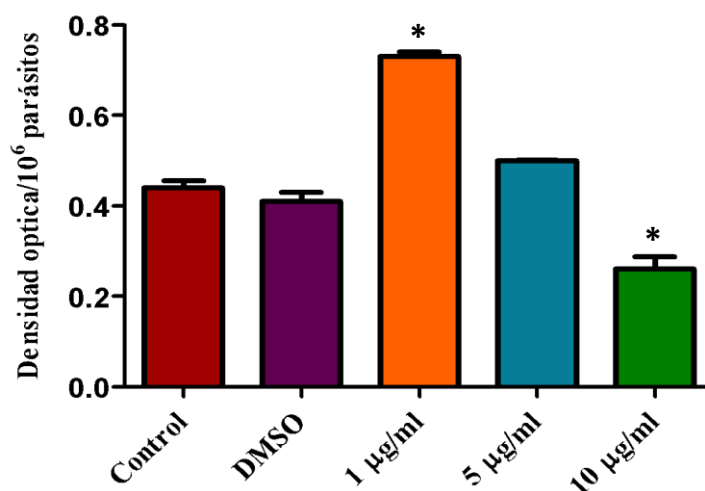


Figura 25. Medición de la actividad mitocondrial con ensayo de MTT, a distintas concentraciones de XML. Las barras indican las medias \pm SD de tres independientes experimentos. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas entre cada grupo experimental y el grupo control ($p < 0.05$).

En el caso de AGN, no afecta significativamente la actividad mitocondrial de los epimastigotes a ninguna concentración, durante el tiempo evaluado (24h).

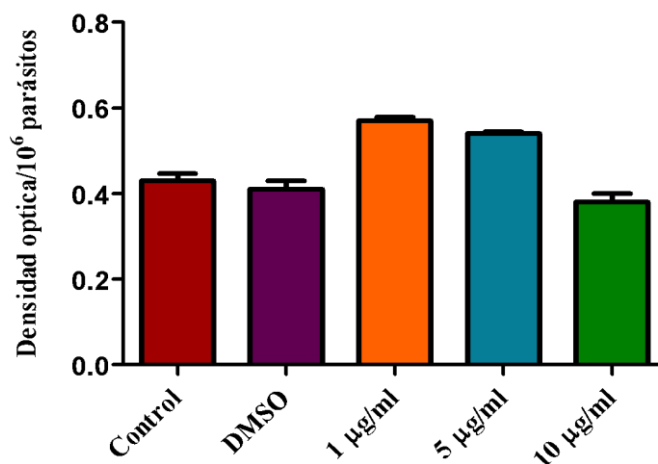


Figura 26. Medición de la actividad mitocondrial con ensayo de MTT, a distintas concentraciones de AGN. Las barras indican las medias \pm SD de tres independientes experimentos.

4.4.3. ESTUDIO DE MORFOLOGIA DE EPIMASTIGOTE DE *T. CRUZI* POR MICROSCOPIA OPTICA

Además del estudio a nivel del metabolismo de los parásitos, nos interesaba indagar si los compuestos afectan de alguna manera la morfología de los mismos. Por ello los observamos con microscopía óptica, con una previa tinción que nos permite identificar estructuras importantes para su correcto funcionamiento.

A continuación, podemos visualizar las muestras de todos los compuestos y tratamientos recolectados cada 24 h, las imágenes han sido recortadas para destacar los cambios morfológicos encontrados y marcados con flechas negras para indicar la cantidad de flagelos. Como controles se utilizaron parásitos no tratados con SVG, XML o AGN, que no presentan ninguna alteración en su morfología ni organelas visualizadas (Figura 27.A). Luego, en la figura 27.B con BZN (control positivo), a pesar de que la imagen no es del todo clara, solo se observa un aumento en producción de vacuolas citoplasmáticas, pero con el resto de las estructuras similares al control (kinetoplasto y núcleo).

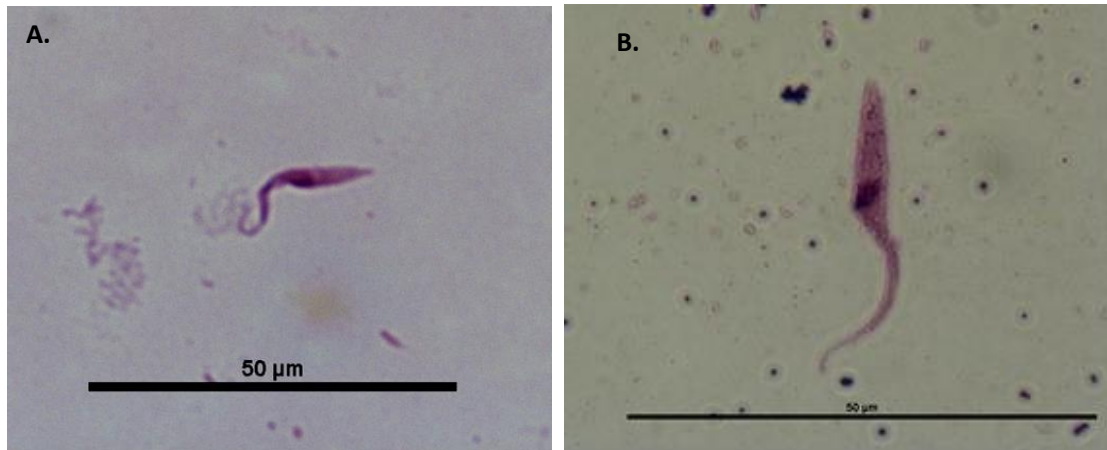


Figura 27. Imagen de microscopía óptica de epimastigotes de *T. cruzi*. Control (A) y BZN (B), magnificación: 400X y 1000X respectivamente.

En un primer caso, con SVG, los cambios en la morfología están dados por incremento en el número de flagelos aún sin proceso de división (Figura 28.B), y aumento de vacuolización (puntos blancos) que se observa principalmente en la figura 28.A. Además, pudimos ver parásitos que se asemejan a estadios de tripomastigotes con estructuras similares a flagelos (Figura 28.C).

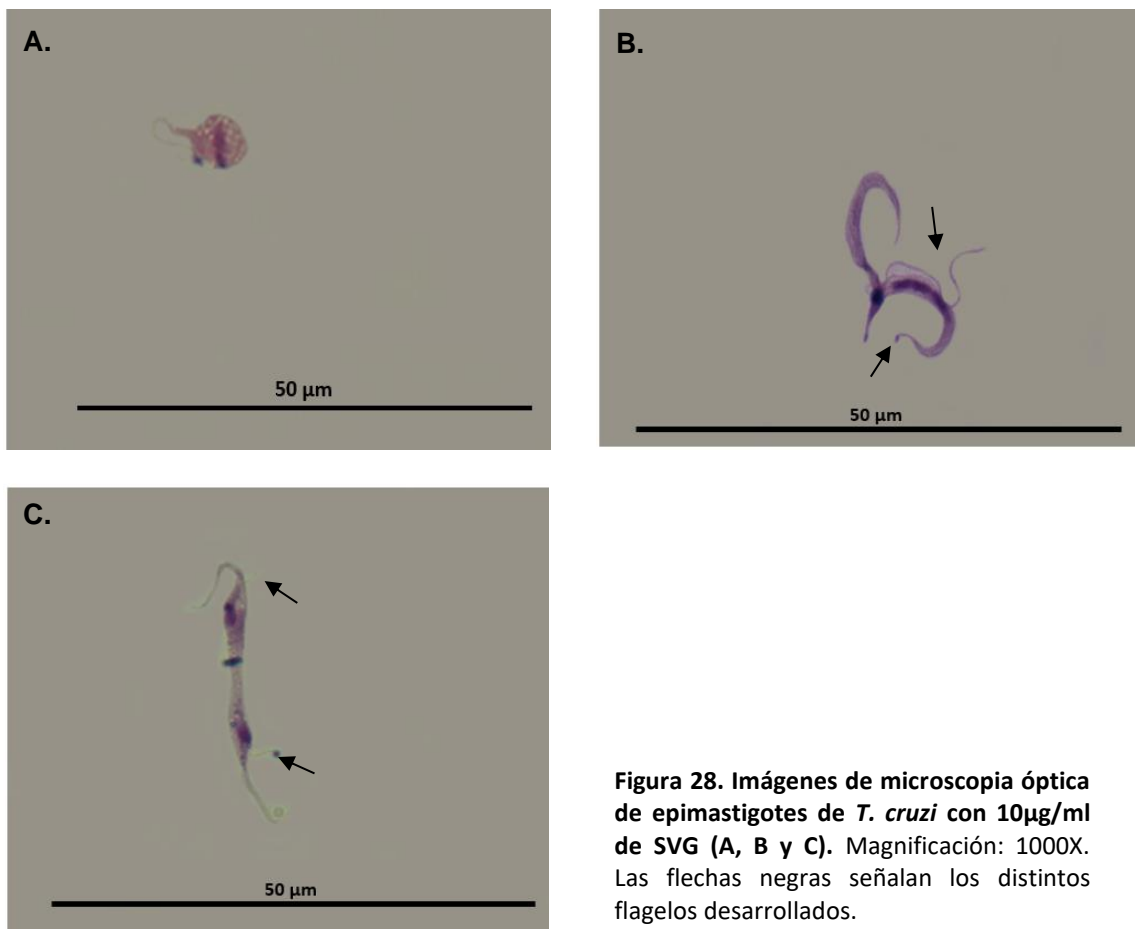


Figura 28. Imágenes de microscopía óptica de epimastigotes de *T. cruzi* con 10μg/ml de SVG (A, B y C). Magnificación: 1000X. Las flechas negras señalan los distintos flagelos desarrollados.

En las imágenes para XML (Figura 29.A y B), ambas representan un cambio en número y tamaño del flagelo, el cual sobrepasa al tamaño común del flagelo observado en el resto de los parásitos. En la figura 29.B, este cambio se combina con un proceso de división, y aunque no puede observarse, en algunos casos había gran vacuolización.

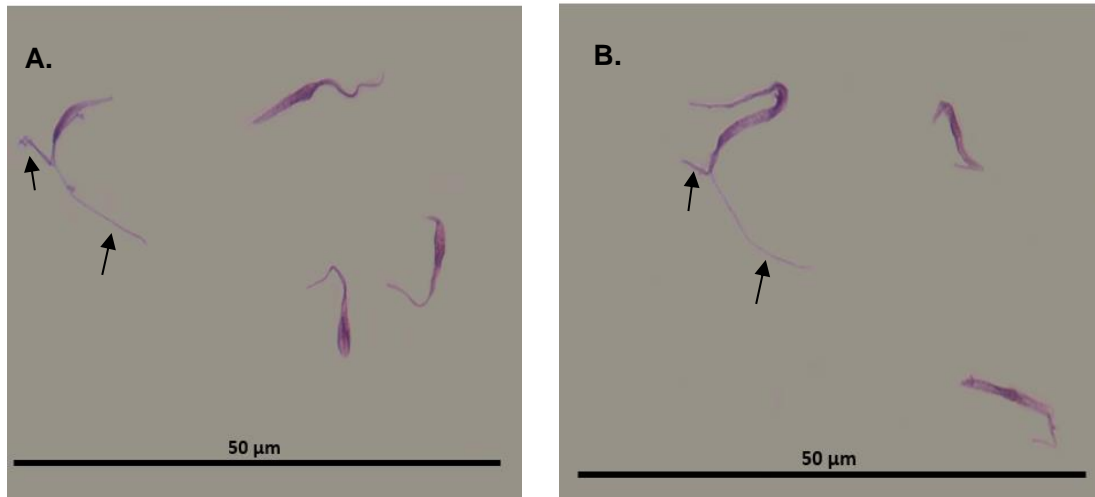


Figura 29. Microscopía óptica de epimastigotes de *T. cruzi* con 5µg/ml de XML (A y B). Magnificación: 1000X. Las flechas negras representan los distintos flagelos desarrollados.

Cuando analizamos la acción de AGN sobre la morfología de los epimastigotes, pudimos observar al igual que en los casos anteriores, cambios tanto en tamaño como número de flagelos. Particularmente, en la figura 30.A encontramos un parásito individual que posee tres flagelos de distintos tamaños, siendo el más grueso el original y los otros más finos los nuevos. En ningún caso, observamos cambios en estructuras como núcleo o kinetoplasto.

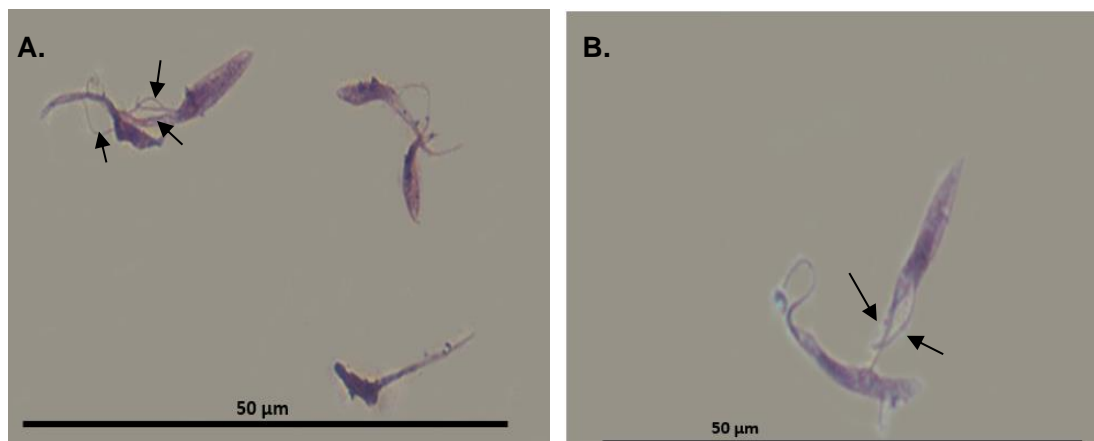


Figura 30. Microscopía óptica de epimastigotes de *T. cruzi* con 10µg/ml de AGN (A y B). Magnificación: 1000X. Las flechas negras representan los distintos flagelos desarrollados.

4.4.4. ESTUDIO DE MORFOLOGIA DE EPIMASTIGOTES DE *T. CRUZI* POR MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISIÓN.

Teniendo en cuenta los cambios observados en la morfología con microscopía óptica, nuestro objetivo fue observar con mayor detalle los cambios que se producen sobre la ultraestructura de los parásitos tratados, durante 48h, con 5 $\mu\text{g/ml}$ de SVG, XML y AGN. Como controles se utilizaron parásitos no tratados o tratados con BZN (5 $\mu\text{g/ml}$). Como puede observarse en la figura 31, los controles mostraron una estructura conservada. Membrana, morfología alargada típica de esta etapa del parásito, flagelo terminal emergiendo del bolsillo flagelar ubicado en la parte anterior del parásito, kinetoplasto con estructura típica y ubicación posterior correspondiente, algunos reservosomas, una membrana nuclear continua y un núcleo central con cromatina compactada.

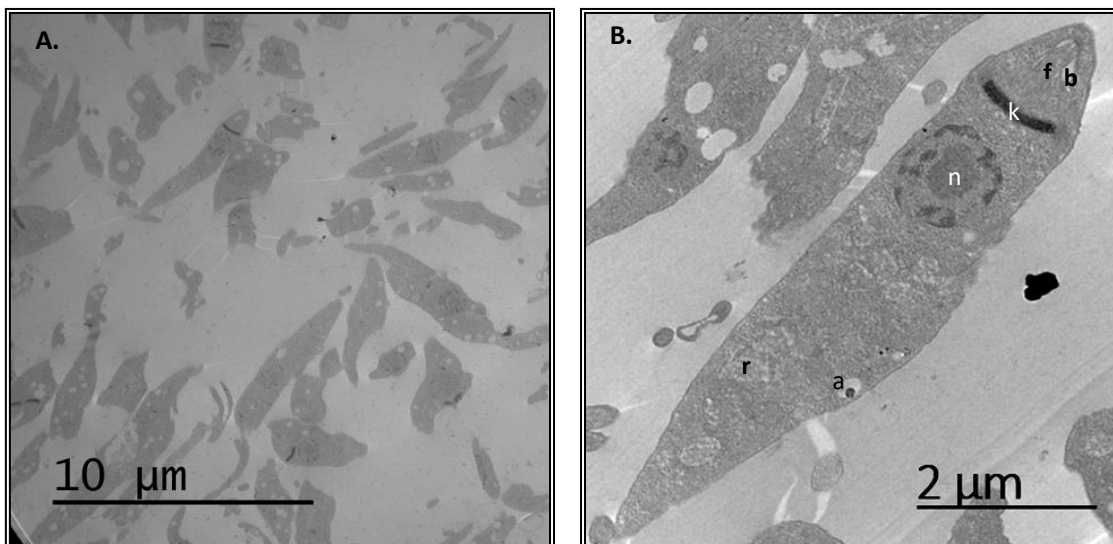


Figura 31. Microscopía electrónica de transmisión de epimastigotes de *T. cruzi*. Control con (a) acidocalcisoma, (b) bolsillo flagelar, (f) flagelo, (k) kinetoplasto, (n) núcleo y (r) reservosoma. Magnificación: (A) 3000X y (B) 12000X.

Por otro lado, los parásitos en contacto con BZN presentan estructuras celulares similares a los observados con nuestros tratamientos, como un aumento de la vacuolización citoplasmática y ampollas de membrana, pero en menor medida. A diferencia de estos, con BZN los parásitos presentan un mayor número de células en aparente proceso de lisis celular debido a una intensa vacuolización, destacada en la figura 32.

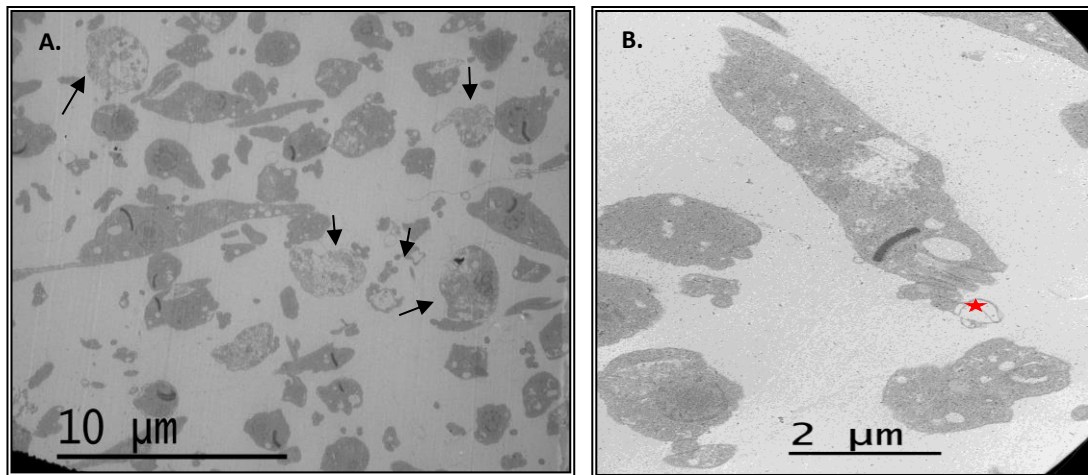


Figura 32. Microscopía electrónica de transmisión de epimastigotes de *T. cruzi* con BZN. (A) Las flechas identifican intensa vacuolización y (B) la estrella roja una ampolla de membrana. Magnificación: 3000X y 12000X respectivamente.

En las figuras 33.A-C observamos los parásitos con SVG, a partir de estas imágenes podemos destacar una desorganización del citoplasma a nivel general, un aumento de la vacuolización citoplasmática, al igual que deformaciones de la célula. También, se destaca la presencia de estructuras que aparentan ser como ampollas de membrana, las cuales aparecen esporádicamente. Y como se demarca en la figura 33.B-C, el tratamiento ocasionaría un proceso de desprendimiento de la membrana con respecto al resto del contenido citoplasmático.

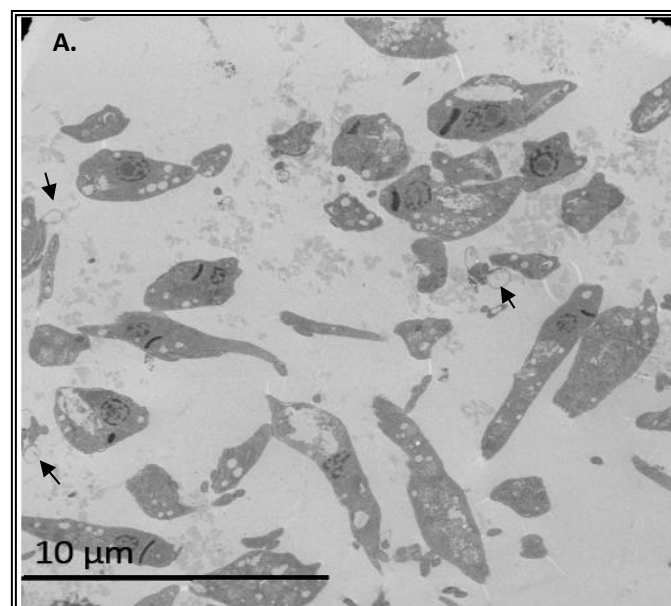


Figura 33-A. Microscopía electrónica de transmisión de epimastigotes de *T. cruzi* con SVG, magnificación: 4400X. Las flechas indican las ampollas de membranas.

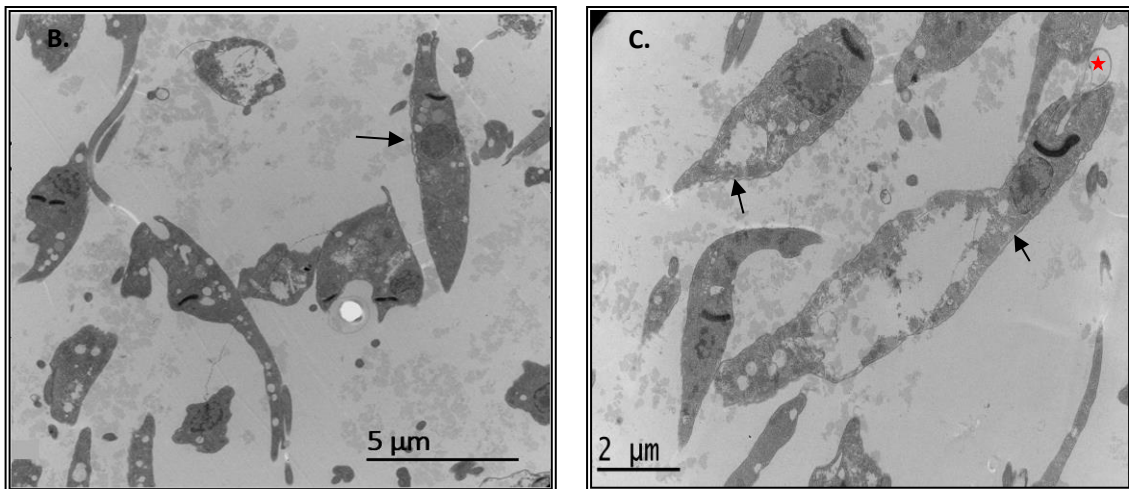


Figura 33-B, C. Microscopia electrónica de trasmisión de epimastigotes de *T. cruzi* con SVG. Magnificación: 7000X (B) y 12000X (C). Las flechas indican desprendimiento de la membrana y la estrella roja una ampolla de membrana.

En el tratamiento con XML, una particularidad es la presencia de parásitos con doble flagelos sin aparente proceso de división (Figura 34.A), lo que se observó anteriormente con microscopia óptica. Además, como se ve en la figura 34.B-D los epimastigotes en ocasiones presentan prolongaciones citoplasmáticas que se asemejan a los flagelos, pero sin tener su estructura característica. Similarmente a SVG, observamos aumento en la vacuolización citoplasmática, desprendimiento de la membrana plasmática y desarrollo de ampollas de membrana, en menor medida.

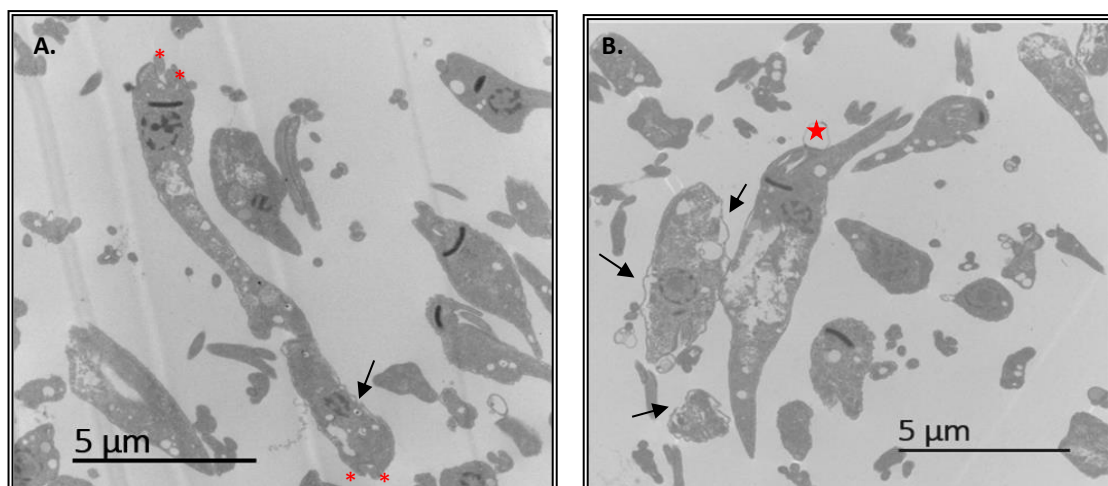


Figura 34-A, B. Microscopia electrónica de trasmisión de epimastigotes de *T. cruzi* con XML. Magnificación: 7000X. Las flechas indican desprendimiento de la membrana, la estrella roja una ampolla de membrana y el (*) rojo flagelos dobles.

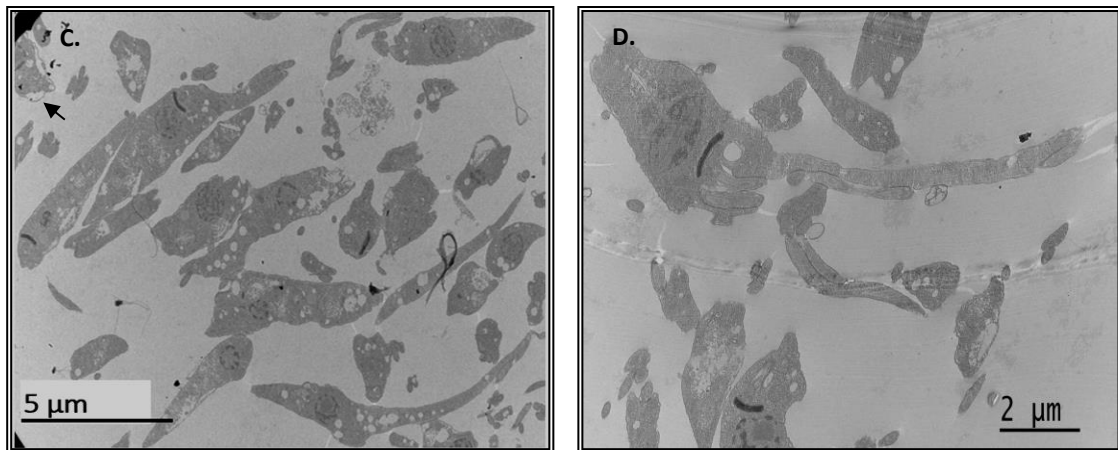


Figura 34-C, D. Microscopia electrónica de trasmisión de epimastigotes de *T. cruzi* con XML. Magnificación: 7000X (C) y 12000X (D). La flecha indica desprendimiento de la membrana.

Por ultimo, los parásitos tratados con AGN compartieron características similares a los otros compuestos en relación al aumento de la vacuolización, desprendimiento de la membrana y formaciones de ampollas de membrana (Figura 37.A-C). Sin embargo, cabe destacar que mediante un conteo aleatorio (100 parásito por tratamiento) de las imágenes obtenidas por microscopia electronica, SVG presentó un porcentaje mayor tanto en producción de vacuolas como en el desprendimiento de la membrana, aunque no resulto ser significativamente menor a AGN y XML. El XML posee el menor porcentaje en desarrollar ambas estructuras, y a diferencia de los otros tratamientos, estos porcentajes se asemejan a los observados con BZN. En relación al control, hay un incremento significativo de las características mencionadas con los tratamientos de SVG y AGN, mientras que con XML solo hay una diferencia significativa en el porcentaje de vacuolización (Figura 36).

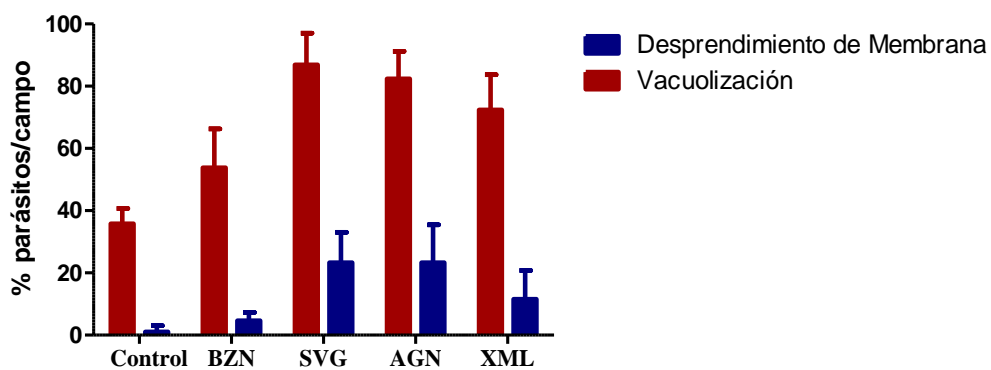


Figura 36. Porcentaje de vacuolización citoplasmática y desprendimiento de membrana de epimastigotes de *T. cruzi* control, con BZN, SVG, AGN y XML. Las barras indican las medias \pm SD de 10 campos elegidos al azar de imágenes de MET.

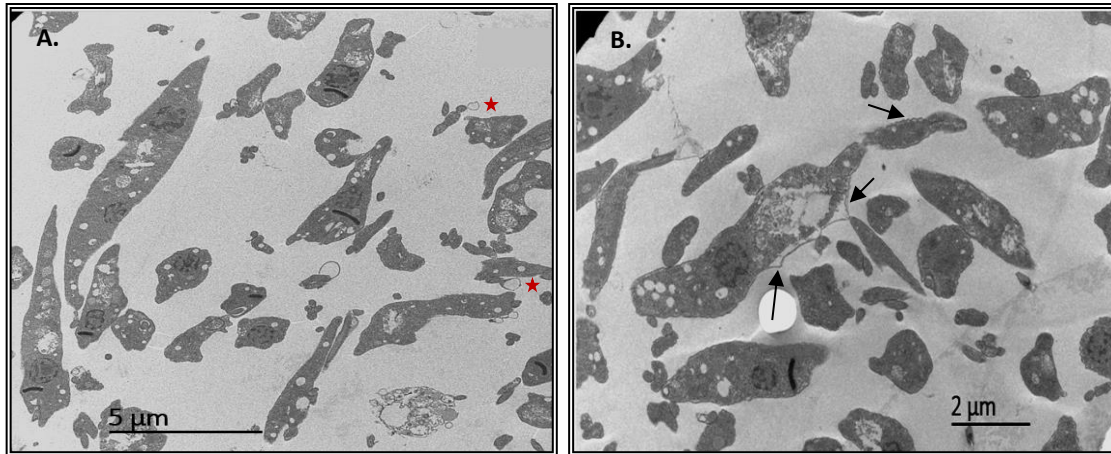


Figura 37-A, B. Microscopia electrónica de trasmisión de epimastigotes de *T. cruzi* con AGN. Magnificación: 7000X (A) y 12000X (B). Las flechas indican desprendimiento de la membrana y las estrellas rojas ampollas de membrana.

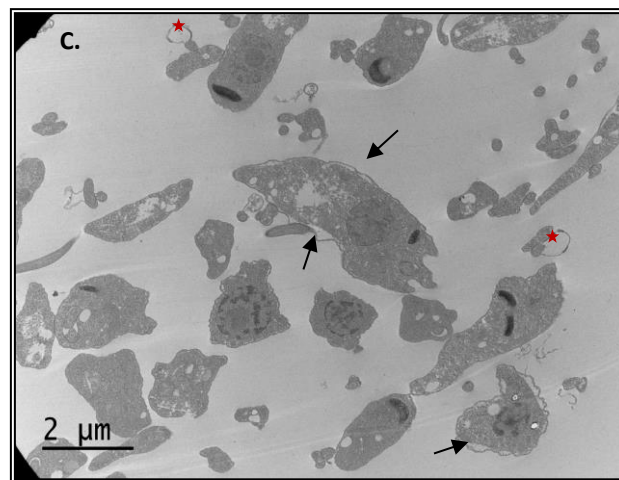


Figura 37-C. Microscopia electrónica de trasmisión de epimastigotes de *T. cruzi* con AGN. Magnificación: 12000X. Las flechas indican desprendimiento de la membrana y las estrellas rojas ampollas de membrana.

4.4.5. ESTUDIOS DE PATRONES PROTEICOS POR ELECTROFORESIS

Los electroferogramas son utilizados generalmente como análisis cuantitativos de cantidad y tipos de proteínas, en nuestro caso quisimos determinar si alguno de los compuestos modifica el perfil proteico normal de los parásitos. En base a lo cual, realizamos una corrida electroforética y comparamos proteínas del control vs tratamientos (concentración 1 y 10 µg/ml) a las 24 y 48h.

Por electroforesis se observó que la expresión de proteínas a las 24h, no fue alterada luego de los tratamientos con respecto al control (datos no mostrados). Sin embargo, cuando analizamos el patrón proteico a las 48h, se observó una diferencia en el tratamiento con XML a la concentración de 10 µg/ml (figura 38), cuya banda representa una proteína de peso molecular aproximada a los 90kDa que no aparece en

el control, pero se puede ver levemente marcada en los tratamientos con SVG. Consideramos que esta proteína pueda estar relacionada a una proteína de choque térmico.

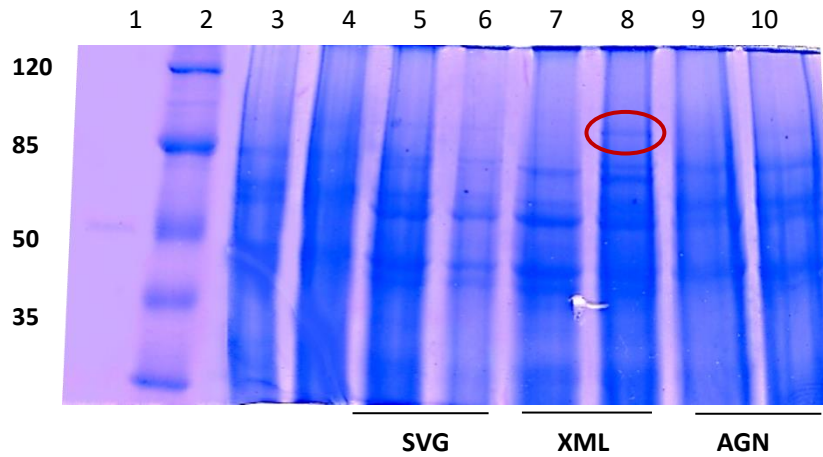


Figura 38. Patrón proteico de las 48h de epimastigotes de *T. cruzi*. Referencias: carril 1: Albumina, carril 2: marcador de peso molecular, carril 3: Control, carril 4 tratamiento con 5µg/ml de BZN, carril 5, 7 y 9 son parásitos tratados con 1µg/ml. Mientras que el 6, 8 y 10 son parásitos tratados con 10µg/ml de cada uno de los compuestos.

5. CONCLUSIÓN

5. CONCLUSIÓN

La necesidad actual de buscar un tratamiento alternativo al que actualmente se usa para la enfermedad de Chagas, dado que presenta efectos secundarios, resistencia en ciertas cepas y efectividad principalmente en la fase aguda de la enfermedad (Haberland y col. 2013; González y col. 2014), ha llevado consigo la apertura de varias líneas de investigación al respecto. Frente a ello, el uso de extractos naturales está mostrando ser realmente prometedor, dado que son una importante fuente de compuestos bioactivos y muchos de ellos muestran tener actividad tripanocida (Sepúlveda-Boza y Cassels 1996; Salem y Werbovetsz 2006; Barros de Alencar y col. 2017).

Más aún, en este trabajo nosotros observamos el efecto antiproliferativo de tres nuevos flavonoides de origen natural, Salvigenina (SVG), Apigenina (AGN) y Xantomicrool (XML) evaluados sobre epimastigotes de *T. cruzi*, incluso a bajas concentraciones. Lo que también fue observado con otros tipos de flavonoides como eupatorina, cirsimaritina y 5-desmetilsinensetina, tanto en epimastigotes como tripomastigotes (Beer y col. 2016). Al igual que ciertos grupos de lactonas sesquiterpénicas (Breggio y col. 2000; Jiménez-Ortiz y col. 2005), diterpenos (Sanchez y col. 2006; Lozano y col. 2012), benzoquinonas y derivados (Spina y col. 2018), entre otros (Barros de Alencar y col. 2017).

Esta inhibición en el crecimiento de epimastigotes se vio acompañada de un incremento en la mortalidad de los parásitos, en general relacionada a un aumento de la concentración del compuesto. A partir de ello obtuvimos los IC₅₀ de cada compuesto que se encuentran entre 5-10 µg/ml, que comparado al IC₅₀ que tiene el BNZ (5 µg/ml) (Spina y col. 2018) sería aparentemente similar. Sin embargo, con nuestros compuestos se destaca un efecto mayor en los índices de mortalidad lo que indica un mejor resultado, ya que con SVG y AGN a las 48 h de exposición muere el 100% de los parásitos, indicando un efecto citotóxico en comparación al efecto citostático del BZN.

Si bien los flavonoides han presentado una variedad de funciones y actividades en los modelos animales o bacterias (Middleton y col. 2000), su relación con los parásitos aún es poco estudiada. Y en los estudios encontrados en la literatura no suelen realizar análisis de posibles blancos moleculares en los que actúen dichos compuestos para

poder establecer relación con el efecto citostático mostrado en *T. cruzi* (Beer y col. 2016). Por lo cual, en nuestro estudio para indagar sobre posibles blancos moleculares comenzamos con un ensayo que permite determinar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), teniendo en cuenta el particular mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo de *T. cruzi* que los hace más susceptibles frente a estos compuestos (Jiménez 2014) y enmarca la importancia de la regulación de este proceso para supervivencia de los parásitos.

Es así que, de los tres flavonoides analizados, solo con SVG a las tres concentraciones usadas se vio un incremento en los niveles de ROS a diferencia de XML y AGN que son levemente significativos con respecto a los controles en las concentraciones mayores. Esto no necesariamente puede estar relacionado a la función prooxidante o antioxidante que poseen las flavonas, y aunque muchas veces se tiene en cuenta la estructura química, en nuestro caso la presencia de grupos oxidrilos que promoverían o inhibirían determinada función es casi nula (Cao y col. 1996; Heim y col. 2002; Kumar y Pandey 2013). No obstante, el incremento de los niveles de ROS podría deberse a la intervención en un mecanismo de defensa que regula la producción de estos, dada la relación de varios flavonoides con enzimas reguladoras de diversos procesos, cuya acción se ve afectada (Middleton y col. 2000). Incluso, un estudio en particular con tres flavonas (quercetina, miricetina y kempferol) identificó un decrecimiento dependiente de la concentración sobre la cantidad del glutatión nuclear y la actividad glutatión S-transferasa, que eleva la concentración de ROS impidiendo su eliminación (Sahu y Gray 1996).

En la mitocondria se generan normalmente especies reactivas de oxígeno principalmente a través de la cadena transportadora de electrones, en la membrana mitocondrial interna (Macedo-Márquez 2012). Sin embargo, existen enzimas encargadas de mantener niveles normales de ROS, como superóxido dismutasa y catalasa. Como se mencionó anteriormente, cuando alguno de estos procesos no funciona correctamente o cuando hay una disfunción mitocondrial se acumulan niveles de ROS generando estrés oxidativo en la célula (Gamero de Luna y Gamero-Estévez 2012; Macedo-Márquez 2012).

Teniendo en cuenta la acción de nuestros compuestos, observamos que SVG al producir un aumento en los niveles de ROS en los epimastigotes, genera una

disfunción mitocondrial significativa con las tres concentraciones probadas. Esto ha sido evaluado en muchos trabajos de compuestos naturales, donde se han observado daños a nivel mitocondrial, generalmente relacionado a los radicales libres (Zarkovic 2003; Evans y Cooke 2004), más aun destacan modificaciones a nivel estructural de la organela (Bombaça y col. 2018; Londero y col. 2018; Spina y col. 2018). Con AGN no se puede establecer una relación entre estos procesos, ya que no presenta disminución de la actividad mitocondrial con respecto a los controles. Y con XML el aumento de dicha actividad con respecto al control podría reflejar una situación de estrés, en la cual la exacerbación va acompañada de una posterior muerte celular (ATCC: The Global Bioresource Center 2011). Esto ocurre debido a que la mitocondria se encarga entre otras funciones, a aportar energía necesaria para realizar todos los procesos metabólicos de la célula incluyendo situaciones de estrés; sin embargo, al no tener disponible la cantidad necesaria de oxígeno (por el aumento de ROS) como aceptor final de electrones, no recupera la energía perdida inicialmente (Gamero de Luna y Gamero-Estévez 2012).

A pesar de que no se puede hablar de una acción en general de los compuestos, es evidente que todos causan disminución en la proliferación de los epimastigotes. El XML fue el que produjo excepciones en el caso de la actividad mitocondrial, en el patrón proteico dado que presenta una banda que no fue visualizada con ninguno de los otros tratamientos ni en el control, lo que puede deberse a la expresión de una proteína de choque térmico (HSP90), la cual se asocia a situaciones de estrés celular e inhibición del crecimiento sobre epimastigotes de *T. cruzi* (Graefe y col. 2002). Y, por último, en el tiempo de acción para que el XML ejerciera efecto, basándonos en el ensayo de reversión, fue mayor en comparación a la AGN y SVG. Esto último puede deberse a un menor grado de lipofilidad del XML dado su anillo fenol que aumenta la polaridad del mismo, mientras que los grupos metilos (presentes mayoritariamente en los otros dos flavonoides) incrementan la lipofilidad y favorece la entrada de los compuestos a través de la membrana celular del parásito (Palace-Berl y col. 2013), destacando la permeabilidad selectiva de la misma.

Un punto que comparten los tratamientos con SVG, AGN y XML es la modificación morfológica con respecto a nuestros controles, ocasionando cambios en la cantidad y tamaño del flagelo, como también la intensa formación de vacuolas. Esto último, se vio

compartido con las diferencias en la ultraestructura demostrada por microscopía electrónica de transmisión, que puede ser explicado por las condiciones de estrés generadas por los flavonoides, características de procesos apoptóticos (McCarthy y Evan 1998; Diez 2000).

Tanto la desorganización o pérdida de la densidad citoplasmática como el incremento de la vacuolización, han sido observados en trabajos previos de compuestos naturales (Santoro *y col.* 2007; Bombaça *y col.* 2018; Spina *y col.* 2018; Rodríguez-Hernández *y col.* 2019), y en general, se asocian también con situaciones de estrés. Otro cambio que se observó en los parásitos tratados con los compuestos en relación a los controles o al tratamiento con la droga patrón (BZN) fue la aparición de “ampollas” de membrana que aparentan ser desprendimientos de material membranoso, lo cual ha sido relacionado con la liberación de membrana dañada (Santoro *y col.* 2007) o a procesos apoptóticos, dado que tales estructuras fueron reportadas en células de mamíferos como cuerpos apoptóticos, sin embargo, se necesita más investigación al respecto en estos organismos celulares (Menna-Barreto *y col.* 2009).

Además, se sugiere que una desorganización de los microtúbulos afectaría al citoesqueleto y esto produciría las deformaciones encontradas con los tratamientos (Podbielkowska *y col.* 1995). Por otro lado, el desprendimiento de la membrana o separación con respecto al material citoplasmático puede atribuirse a la modificación en la biosíntesis de fosfolípidos y esteroides de la membrana plasmática (Rodríguez-Hernández *y col.* 2019).

En conclusión, tanto SVG, AGN y XML presentan actividad tripanocida, la cual ocasiona cambios a nivel morfológicos y ultraestructurales. Aunque los mecanismos de acción suelen ser distintos, esta variación depende de su estructura química principalmente. No obstante, son necesarios más estudios que analicen la influencia de nuestros flavonoides frente a algún proceso involucrado en la regulación de los niveles de ROS, como un análisis de la actividad del tripanotión para determinar si los compuestos inhiben o no su función. También, en relación a la modificación del citoesqueleto, sería interesante realizar un estudio que cuantifique la concentración de tubulina en los parásitos, ya que es la principal enzima encargada de la producción de microtúbulos que regulan la estructura celular; al igual que alguna de las vías que regulen este proceso.

En cuanto a la acción de los compuestos sobre la mitocondria, consideramos necesario un estudio que determine el efecto sobre el potencial de membrana con algún marcador químico como JC-1 o DIOC6, lo que aportaría mayor información a la disfunción mitocondrial generada con SVG y a la relación con los altos niveles de ROS observados en los tres tratamientos evaluados (SVG, XML y AGN). Asimismo, proponemos continuar trabajando con estudios que contribuyan a determinar si las estructuras observadas con MO y MET son flagelos duplicados o alargamiento del citoplasma, mediante inmunofluorescencia. Finalmente, con el fin de evaluar la toxicidad y determinar si se preserva la acción antiproliferativa de los flavonoides sobre otros estadios de *T. cruzi*, es fundamental adicionar un estudio con células de mamíferos, y con modelos animales para poder extrapolar los datos.

6. REFERENCIAS

6. REFERENCIAS

- Abalos, J. W., & Wygodzinsky, P. (1951). La vinchuca: Folklore y antecedentes históricos. *Cienc Investig*, 7, 472-5.
- Álvarez-Hernández, D. A., Franyuti-Kelly, 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.
- Amieva, C. (2014). La Problemática del Chagas en la actualidad de Latinoamérica: viejos y nuevos problemas, grandes desafíos. Aposta. *Revista de Ciencias Sociales*, (62).
- Amieva, C., Soledad, S., Reche, V., Balsalobre, A., Boveda, E., Medone, P., & Sanmartino, M. (2013). Chagas, museo, universidad: reflexiones sobre el andar de un proyecto de extensión. In IV ENCUESTRO DE MUSEOS DEL MERCOSUR I ENCUESTRO DE MUSEOS LATINOAMERICANO Y DEL CARIBE.
- Amino, R., Martins, R. M., Procopio, J., Hirata, I. Y., Juliano, M. A., & Schenkman, S. (2002). Trialysin, a novel pore-forming protein from saliva of hematophagous insects activated by limited proteolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 277(8), 6207-6213.
- Andrade, L. O., & Andrews, N. W. (2005). The *Trypanosoma cruzi*–host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 819.
- Apt B, Werner, Heitmann G, Ingrid, Jercic L, M. Isabel, Jofré M, Leonor, Muñoz C. del V, Patricia, Noemí H, Isabel, San Martín V, Ana M, Sapunar P, Jorge, Torres H, Marisa, & Zulantay A, Inés. (2008). Guías clínicas de la enfermedad de Chagas: Parte II. Enfermedad de Chagas en el adulto, la infancia y adolescencia. *Revista chilena de infectología*, 25(3), 194-199.
- Apt B, Werner, Heitmann G, Ingrid, Jercic L, M. Isabel, Jofré M, Leonor, Muñoz C. del V, Patricia, Noemí H, Isabel, San Martín, Ana M, Sapunar P, Jorge, Torres H, Mariza, & Zulantay A, Inés. (2008). Guías Clínicas de la Enfermedad de Chagas. Comité de Parasitología, Departamento de Enfermedades Emergentes y Reemergentes, MINSAL. *Rev. Chil. Infect.* 25: 189-389.
- Araújo, A., Jansen, A. M., Reinhard, K., & Ferreira, L. F. (2009). Paleoparasitology of Chagas disease: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 9-16.
- Ariyanayagam, M. R., & Fairlamb, A. H. (2001). Ovoidiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Molecular and biochemical parasitology*, 115(2), 189-198.
- Arner, E., Kindlund, E., Nilsson, D., Farzana, F., Ferella, M., Tammi, M. T., & Andersson, B. (2007). Database of *Trypanosoma cruzi* repeated genes: 20 000 additional gene variants. *BMC genomics*, 8(1), 391.
- Arora, A., Nair, M. G. & Strasburg, G. M. (1998). Structure–activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(9), 1355-1363.

- Asociación Colombiana de Infectología (2007). Guía de atención de la enfermedad de Chagas. *Guías de promoción de la salud y prevención de enfermedades en la salud pública, vol. 23. p.1-48.*
- ATCC: The Global Bioresource Center (2011). MTT Cell Proliferation Assay. U.S., Canadá y Puerto Rico. Recuperado de <https://www.atcc.org/~media/DA5285A1F52C414E864C966FD78C9A79.ashx>
- Aufderheide, A. C., Salo, W., Madden, M., Streitz, J., Buikstra, J., Guhl, F., & Allison, M. (2004). A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 101(7), 2034-2039.*
- Awad, H. M., Boersma, M. G., Boeren, S., van Bladeren, P. J., Vervoort, J. & Rietjens, I. M. (2001). Structure- activity study on the quinone/quinone methide chemistry of flavonoids. *Chemical Research in Toxicology, 14(4), 398-408.*
- Barbosa, M. M., & Nunes, M. C. P. (2012). Estratificación del riesgo en la enfermedad de Chagas. *Revista Española de Cardiología, 65, 17-21.*
- Barrera, P., Sülsen, V. P., Lozano, E., Rivera, M., Beer, M. F., Tonn, C., & Sosa, M. A. (2013). Natural sesquiterpene lactones induce oxidative stress in *Leishmania mexicana*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.*
- Barros de Alencar, M. V. O., de Castro e Sousa, J. M., Rolim, H. M. L., de Medeiros, M. D. G. F., Cerqueira, G. S., de Castro Almeida, F. R., & Islam, M. T. (2017). Diterpenes as lead molecules against neglected tropical diseases. *Phytotherapy Research, 31(2), 175-201.*
- Beer, M. F., Frank, F. M., Germán Elso, O., Ernesto Bivona, A., Cerny, N., Giberti, G., & Cazorla, S. I. (2016). Trypanocidal and leishmanicidal activities of flavonoids isolated from *Stevia satureiifolia* var. *satueiifolia*. *Pharmaceutical biology, 54(10), 2188-2195.*
- Bern, C. (2015). Chagas' disease. *New England Journal of Medicine, 373(5), 456-466.*
- Bhat, K. P., & Pezzuto, J. M. (2002). Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences, 957(1), 210-229.*
- Bogitsh, B. J., Carter, C. E., & Oeltmann, T. N. (2018). Human parasitology. *Academic Press.*
- Bombaça, A., Von Dossow, D., Barbosa, J., Paz, C., Burgos, V., & Menna-Barreto, R. (2018). Trypanocidal Activity of Natural Sesquiterpenoids Involves Mitochondrial Dysfunction, ROS Production and Autophagic Phenotype in *Trypanosoma cruzi*. *Molecules, 23(11), 2800.*
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., & Saran, M. (1990). [36] Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. In *Methods in enzymology* (Vol. 186, pp. 343-355). *Academic Press.*
- Brengio, S. D., Belmonte, S. A., Guerreiro, E., Giordano, O. S., Pietrobon, E. O., & Sosa, M. A. (2000). The sesquiterpene lactone dehydroleucodine (DhL) affects the growth of cultured epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Parasitology, 86(2), 407-412.*
- Briceño-León, R. (2009). La enfermedad de Chagas en las Américas: una perspectiva de ecosalud. *Cadernos de saúde pública, 25, S71-S82.*

- Burda, S., & Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(6), 2774-2779.
- Cabello, C., & Cabello, F. (2008). Zoonosis con reservorios silvestres: Amenazas a la salud pública ya la economía. *Revista médica de Chile*, 136(3), 385-393.
- Cabrera, J., Saavedra, E., del Rosario, H., Perdomo, J., Loro, J. F., Cifuentes, D. A., & Estévez, F. (2016). Gardenin B-induced cell death in human leukemia cells involves multiple caspases but is independent of the generation of reactive oxygen species. *Chemico-biological interactions*, 256, 220-227.
- Campbell, D. A., Thomas, S., & Sturm, N. R. (2003). Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal?. *Microbes and infection*, 5(13), 1231-1240.
- Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1996). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(5), 749-760.
- Carabarin Lima, A., González Vázquez, M. C., Baylon Pacheco, L., & Rosales Encina, J. L. (2011). Enfermedad de Chagas: una enfermedad olvidada.
- Carvalho, T. U. D., & Souza, W. D. (1986). Infectivity of amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 28(4), 205-212.
- Castagnino, H. (1986). Mazza y la lucha contra el mal de Chagas. *Revista Todo es Historia*, 225, 8-31.
- Chagas, C. (1909). Nova trypanomiazaia humana. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1, 159.
- Chan, T., Galati, G., & O'Brien, P. J. (1999). Oxygen activation during peroxidase catalysed metabolism of flavones or flavanones. *Chemico-Biological Interactions*, 122(1), 15-25.
- Cotelle, N. (2001). Role of flavonoids in oxidative stress. *Current topics in medicinal chemistry*, 1(6), 569-590.
- Coura, J. R. (2007). Chagas disease: what is known and what is needed-A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102, 113-122.
- Crane, M. S. J., & Dvorak, J. A. (1979). *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells. DNA synthesis and growth of intracellular amastigotes and their relationship to host cell DNA synthesis and growth. *The Journal of protozoology*, 26(4), 599-604.
- Darwin, C. R. (1845). Journal of researches into the natural history and geology of the countries visited during the voyage of H.M.S. Beagle round the world, under the Command of Capt. John Murray, Londres Fitz Roy, R.N. 2d edition.
- De Souza, W. (1989). Components of the cell surface of trypanosomatids. *Prog Protistol*, 3, 87-184.
- Delaporte, F. (1999). La maladie de Chagas: histoire d'un fléau continental. *Payot & Rivages*.
- Dias, J. C. P. (2006). Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bioecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos.
- Díez, J. (2000). Aspectos Moleculares del Proceso de la Apoptosis. *Rev Esp Cardiol*, 53, 267-74.

- Docampo, R., & Moreno, S. N. J. (1999). Acidocalcisome: a novel Ca²⁺ storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. *Parasitology Today*, 15(11), 443-448.
- Docampo, R., Ulrich, P., & Moreno, S. N. (2010). Evolution of acidocalcisomes and their role in polyphosphate storage and osmoregulation in eukaryotic microbes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1541), 775-784.
- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95.
- Drugs for Neglected Disease Initiative (DNDi). (2015b). About Leishmaniasis; [cited 2016 Feb 16]. Available from: [http:// www.dndi.org/diseases-projects/leishmaniasis/](http://www.dndi.org/diseases-projects/leishmaniasis/).
- Duschak, G. V. (2011). A decade of targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. *Recent patents on anti-infective drug discovery*, 6(3), 216-259.
- Dvorak, J. A. (1984). The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: biological and medical implications. *Journal of cellular biochemistry*, 24(4), 357-371.
- Dvorak, J. A., Hall, T. E., Crane, M. S. J., Engel, J. C., McDaniel, J. P., & Uriegas, R. (1982). *Trypanosoma cruzi*: Flow Cytometric Analysis. I. Analysis of Total DNA/Organism by Means of Mithramycin-Induced Fluorescence 1, 2. *The Journal of protozoology*, 29(3), 430-437.
- Elias, M. C. Q., Marques-Porto, R., Freymüller, E., & Schenkman, S. (2001). Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. *Molecular and biochemical parasitology*, 112(1), 79-90.
- Evans, M. D., & Cooke, M. S. (2004). Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *Bioessays*, 26(5), 533-542.
- Ferrer, E., Lares, M., Viettri, M., & Medina, M. (2013). Comparación entre técnicas inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(5), 277-282.
- Finkel, T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Current opinion in cell biology*, 15(2), 247-254.
- Furukawa, A., Oikawa, S., Murata, M., Hiraku, Y., & Kawanishi, S. (2003). (-)-Epigallocatechin gallate causes oxidative damage to isolated and cellular DNA. *Biochemical pharmacology*, 66(9), 1769-1778.
- Galati, G., & O'Brien, P. J. (2004). Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(3), 287-303.
- Galati, G., Chan, T., Wu, B., & O'Brien, P. J. (1999). Glutathione-dependent generation of reactive oxygen species by the peroxidase-catalyzed redox cycling of flavonoids. *Chemical research in toxicology*, 12(6), 521-525.
- Gamero de Luna, E. J. & Gamero-Estévez, E. (2012). Enfermedades mitocondriales. *Med fam Andal*, 13(3), 244-57.

- Gascón, J. (2005). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas importada. *Medicina Clínica*, 125(6), 230-235.
- Gascón, J., Bern, C., & Pinazo, M. J. (2010). Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta tropica*, 115(1-2), 22-27.
- Gastañaga Holguera, T., García Santos, F. J., Herraiz, M. A., & Vidart Aragón, J. A. (2008). Enfermedad de Chagas y gestación. *Progresos de Obstetricia y Ginecología*, 51(6), 365-369.
- Gomes, C., Almeida, A. B., Rosa, A. C., Araujo, P. F., & Teixeira, A. R. (2019). American trypanosomiasis and Chagas disease: Sexual transmission. *International Journal of Infectious Diseases*.
- González, A. F., Cuartero, I. G., Díez, A. G., & Fernández, P. F. (2014). Infecciones por protozoos hemoflagelados: leishmaniasis, enfermedad de Chagas y tripanosomiasis africana. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 11(54), 3194-3207.
- González-Tomé, M. I., Rivera, M., Camano, I., Norman, F., Flores-Chávez, M., Rodríguez-Gómez, L., & García-Burguillo, A. (2013). Recomendaciones para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de la embarazada y del niño con enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(8), 535-542.
- Gorla, D., & Noireau, F. (2017). Geographic distribution of Triatominae vectors in America. In *American Trypanosomiasis Chagas Disease* (pp. 197-221). Elsevier.
- Graefe, S. E., Wiesgigl, M., Gaworski, I., Macdonald, A., & Clos, J. (2002). Inhibition of HSP90 in *Trypanosoma cruzi* induces a stress response but no stage differentiation. *Eukaryotic Cell*, 1(6), 936-943.
- Guhl, F. (2009). Enfermedad de Chagas: realidad y perspectivas. *Revista Biomedica*, 20(3), 228-234.
- Guhl, F. (2017) Geographical distribution of Chagas disease. *American Trypanosomiasis, Chagas Disease. One Hundred Years of Research* (ed. by J. Telleria & M. Tibayrenc). Elsevier, pp. 89–112.
- Guhl, F., Jaramillo, C., Vallejo, G. A., Cardenas, A., Arroyo, F., & Aufderheide, A. (2000). Chagas disease and human migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(4), 553-555.
- Gupta, S., Wen, J. J., & Garg, N. J. (2009). Oxidative stress in Chagas disease. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2009.
- Haberland, A., Saravia, S. G. M., Wallukat, G., Ziebig, R., & Schimke, I. (2013). Chronic Chagas disease: from basics to laboratory medicine. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 51(2), 271-294.
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & therapeutics*, 96(2-3), 67-202.
- Hayashi, T., Sawa, K., Kawasaki, M., Arisawa, M., Shimizu, M., & Morita, N. (1988). Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *Journal of natural products*, 51(2), 345-348.

- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(10), 572-584.
- Hodnick, W. F., Kung, F. S., Roettger, W. J., Bohmont, C. W. & Pardini, R. S. (1986). Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids: A structure-activity study. *Biochemical pharmacology*, 35(14), 2345-2357.
- Instituto Nacional de Salud (2010). Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública. Protocolo para la vigilancia en Salud Pública de Chagas. Colombia, vol. 1; p. 1-49.
- Jiménez, V. (2014). Dealing with environmental challenges: mechanisms of adaptation in *Trypanosoma cruzi*. *Research in microbiology*, 165(3), 155-165.
- Jimenez-Ortiz, V., Brengio, S. D., Giordano, O., Tonn, C., Sánchez, M., Burgos, M. H., & Sosa, M. A. (2005). The trypanocidal effect of sesquiterpene lactones helenalin and mexicanin on cultured epimastigotes. *Journal of Parasitology*, 91(1), 170-174.
- Kettle, D. S. (1990). Insects and Acarines of Medical and Veterinary Importance. In: *Medical and Veterinary Entomology*. CAB International. Oxfordshire, Inglaterra. pp 99-448.
- Kowalska, A., Kowalski, P., & Torres, M. Á. T. (2011). Chagas disease—American trypanosomiasis. *Polish Annals of Medicine*, 18(1), 156-167.
- Krauth-Siegel, R. L., & Coombs, G. H. (1999). Enzymes of parasite thiol metabolism as drug targets. *Parasitology Today*, 15(10), 404-409.
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*.
- Ley, V., Robbins, E. S., Nussenzweig, V., & Andrews, N. W. (1990). The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *Journal of Experimental Medicine*, 171(2), 401-413.
- Lozano, E., Barrera, P., Salinas, R., Vega, I., Nieto, M., Tonn, C. & Sosa, M. A. (2012). Sesquiterpene lactones and the diterpene 5-epi-icetexone affect the intracellular and extracellular stages of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology international*, 61(4), 628-633.
- Lukeš, J., Hashimi, H., & Zíková, A. (2005). Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Current genetics*, 48(5), 277-299.
- Macedo-Márquez, A. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 15(2), 97-103.
- Macedo-Silva, S. T. D., Oliveira Silva, T. L. A. D., Urbina, J. A., Souza, W. D. & Rodrigues, J. C. F. (2011). Antiproliferative, ultrastructural, and physiological effects of amiodarone on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Molecular biology international*, 2011.

- Manne, J. M., Snively, C. S., Ramsey, J. M., Salgado, M. O., Bärnighausen, T. & Reich, M. R. (2013). Barriers to treatment access for Chagas disease in Mexico. *PLoS neglected tropical diseases*, 7(10), e2488.
- Manta, B., Comini, M., Medeiros, A., Hugo, M., Trujillo, M., & Radi, R. (2013). Trypanothione: a unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(5), 3199-3216.
- Massarini, A. & Schnek, A. (2015). Ciencia entre todos: tecnociencia en contexto social: una propuesta de enseñanza, CABA, Argentina. *Paidós*, 1ªed. pp 167-192.
- McCarthy, N. J., & Evan, G. I. (1997). 15 Methods for Detecting and Quantifying Apoptosis. In *Current topics in developmental biology* (Vol. 36, pp. 259-278). Academic Press.
- Médicos sin fronteras (s.f). Chagas. Información sobre la enfermedad. Descarga, diciembre, 2018 de <https://www.msf.org.ar/conocenos/enfermedades>
- Medone, P., Susevich, M. L., Amieva, C., Gaddi, A., Marti, G., Mordegli, C., & Sanmartino, M. (2013). Los Jóvenes y el Chagas: nuevas miradas posibles. Experiencias educativas en el Museo de La Plata. En *Entomologia Cultural*. (Brasil): Universidade Estadual de Feira de Santana.
- Menna-Barreto, R. F. S., Corrêa, J. R., Cascabulho, C. M., Fernandes, M. C., Pinto, A. V., Soares, M. J., & De Castro, S. L. (2009). Naphthoimidazoles promote different death phenotypes in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, 136(5), 499-510.
- Metodiewa, D., Kochman, A. & Karolczak, S. (1997). Evidence for antiradical and antioxidant properties of four biologically active N, N, diethylaminoethyl ethers of flavanone oximes: a comparison with natural polyphenolic flavonoid (rutin) action. *Biochem Mol Biol Int* 41, 1067–1075.
- Middleton, E., Kandaswami, C., & Theoharides, T. C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological reviews*, 52(4), 673-751.
- Ministerio de Salud (2011). Guía Clínica Guía de Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de la Enfermedad de Chagas. Santiago, vol. 1; p. 1-38.
- Ministerio de Sanidad y Política Social (2009). Enfermedad de Chagas en personas procedentes de Latinoamérica residentes en España. Sanidad, vol. 1; p. 1-84.
- Miranda, K., Benchimol, M., Docampo, R., & de Souza, W. (2000). The fine structure of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology research*, 86(5), 373-384.
- Mitelman, J. E., Descalzo, A., Giménez, L., Pesce, R., Romero Villanueva, H., & Auger, S. (2011). Consenso de Enfermedad de Chagas-Mazza. *Rev Argent Cardiol*, 79, 544-64.
- Monteiro, R. V., Dietz, J. M., & Jansen, A. M. (2010). The impact of concomitant infections by *Trypanosoma cruzi* and intestinal helminths on the health of wild golden and golden-headed lion tamarins. *Research in veterinary science*, 89(1), 27-35.

- Mora, A., Paya, M., Rios, J. L. & Alcaraz, M. J. (1990). Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. *Biochemical pharmacology*, 40(4), 793-797.
- Náquira, C., & Cabrera, R. (2009). Breve reseña histórica de la enfermedad de Chagas, a cien años de su descubrimiento y situación actual en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 26(4), 494-504.
- Nordberg, J., & Arnér, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology and medicine*, 31(11), 1287-1312.
- Ogbadoyi, E. O., Robinson, D. R., & Gull, K. (2003). A high-order transmembrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome positioning and segregation by flagellar basal bodies in trypanosomes. *Molecular biology of the cell*, 14(5), 1769-1779.
- Oliveira D. & Costa Chaves, G. en Médicos sin fronteras. (2012). Movilización popular y enfermedad de Chagas. Rio de Janeiro: MSF. *Disponible en http://issuu.com/mariana.abisaab/docs/mobilizac_a_o_popular_e_chagas_esp_final*
- Opperdoes, F. R., & Borst, P. (1977). Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS letters*, 80(2), 360-364.
- Organización Mundial de la Salud (2007). Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Grupo de trabajo científico. TDR/GTC/09. Ginebra, Suiza.
- Organización Mundial de la Salud (2013). Estadísticas Sanitarias Mundiales. Informe Anual. Ginebra, Suiza.
- Organización Mundial de la Salud (2013). Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases. Ginebra, Suiza.
- Organización Mundial de la Salud (2018). La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Descargado diciembre 2018, de [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)).
- Organización Panamericana de la Salud (2013). Estadísticas en América.
- Palace-Berl, F., Jorge, S. D., Pasqualoto, K. F. M., Ferreira, A. K., Maria, D. A., Zorzi, R. R., ... & Tavares, L. C. (2013). 5-Nitro-2-furfuriliden derivatives as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents: design, synthesis, bioactivity evaluation, cytotoxicity and exploratory data analysis. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 21(17), 5395-5406.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 5.
- Pena, S. D., Machado, C. R., & Macedo, A. M. (2009). *Trypanosoma cruzi*: ancestral genomes and population structure. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 108-114.
- Piacenza, L., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Kelly, J. M., Wilkinson, S. R., & Radi, R. (2008). Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against

macrophage-and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochemical Journal*, 410(2), 359-368.

- Podbielkowska, M., Piwocka, M., Waszkowska, E., Waleza, M., & Zobel, A. M. (1995). Effect of coumarin and its derivatives on mitosis and ultrastructure of meristematic cells. *International journal of pharmacognosy*, 33(1), 7-15.
- Ponte, E. D. (1958). Manual de entomología médica y veterinaria argentinas (No. Aa1 DEPOSITO FV).
- Raasi, A., & Luquetti, A. O. (2003). Specific treatment for *Trypanosoma cruzi* infection (Chagas disease). In *American trypanosomiasis* (pp. 117-125). Springer, Boston, MA.
- Rassi, A., de Rezende, J. M., Luquetti, A. O., & Rassi Jr, A. (2010). Clinical phases and forms of Chagas disease. In *American Trypanosomiasis* (pp. 709-741). Elsevier.
- Rassi, A., Dias, J. C. P., & Marin-Neto, J. A. (2009). Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. *Heart*, 95(7), 524-534.
- Ribeiro, M., Nitz, N., Santana, C., Moraes, A., Hagström, L., Andrade, R., & Hecht, M. (2016). Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model. *Experimental parasitology*, 162, 1-6.
- Riou, G., & Delain, E. (1969). Electron microscopy of the circular kinetoplasmic DNA from *Trypanosoma cruzi*: occurrence of catenated forms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 62(1), 210-217.
- Rodríguez-Hernández, K. D., Martínez, I., Agredano-Moreno, L. T., Jiménez-García, L. F., Reyes-Chilpa, R., & Espinoza, B. (2019). Coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense* produce ultrastructural alterations and affect in vitro infectivity of *Trypanosoma cruzi*. *Phytomedicine*, 152827.
- Ryckman, R. E., & Archbold, E. F. (1981). The Triatominae and Triatominae-borne trypanosomes of Asia, Africa, Australia and the East Indies. *Bull Soc Vector Ecol*, 6, 143-166.
- Sahu, S. C., & Gray, G. C. (1996). Pro-oxidant activity of flavonoids: effects on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer letters*, 104(2), 193-196.
- Salazar-Schettino, P. M., Bucio-Torres, M. I., Cabrera-Bravo, M., de Alba-Alvarado, M. C., Castillo-Saldaña, D. R., Zenteno-Galindo, E. A., ... & Perera-Salazar, M. G. (2016). Enfermedad de Chagas en México. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 59(3), 6-16.
- Salem, M. M., & Werbovetz, K. A. (2006). Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. *Current medicinal chemistry*, 13(21), 2571-2598.
- Sanchez, A. M., Jimenez-Ortiz, V., Sartor, T., Tonn, C. E., García, E. E., Nieto, M., ... & Sosa, M. A. (2006). A novel icetexane diterpene, 5-epi-icetexone from *Salvia gilliessi* is active against *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropica*, 98(2), 118-124.

- Sanmartino, M. (2009). 100 años de Chagas (1909-2009): revisión, balance y perspectiva. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 68(3-4).
- Sanmartino, M., Amieva, C., Balsalobre, A., Carrillo, A., Marti, G., Medone, P., & Menegaz, A. (2015). Hablamos de Chagas: aportes para repensar la problemática con una mirada integral. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: CONICET—Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.
- Sanmartino, M., Menegaz, A., Mordeglia, C., Mengascini, A. S., Amieva, C., Ceccarelli, S., & Bravo Almonacid, G. (2012). La problemática del Chagas en 4D: representaciones de docentes de nivel inicial y primario de La Plata. In *III Jornadas de Enseñanza e Investigación Educativa en el campo de las Ciencias Exactas y Naturales 26, 27 y 28 de septiembre de 2012 La Plata, Argentina*. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Humanidades y Ciencias de la Educación. Departamento de Ciencias Exactas y Naturales.
- Santana, R. A. G., Guerra, M. G. V., Sousa, D. R., Couceiro, K., Ortiz, J. V., Oliveira, M., & Silva, G. A. (2019). Oral Transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. *Emerging infectious diseases*, 25(1), 132.
- Santoro, G. F., Cardoso, M. G., Guimarães, L. G. L., Freire, J. M., & Soares, M. J. (2007). Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). *Parasitology*, 134(11), 1649-1656.
- Schmidt, T., A Khalid, S., J Romanha, A., MA Alves, T., W Biavatti, M., Brun, R., & HG Lago, J. (2012). The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases-part II. *Current medicinal chemistry*, 19(14), 2176-2228.
- Scott, D. A., Docampo, R., Dvorak, J. A., Shi, S., & Leapman, R. D. (1997). In situ compositional analysis of acidocalcisomes in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(44), 28020-28029.
- Silveira, C. A. (2006). Factores de riesgo implicados en la transmisión oral de la enfermedad de Chagas. *Consulta técnica en epidemiología, prevención y manejo de la transmisión de la enfermedad de Chagas como enfermedad transmitida por alimentos*. Rio de Janeiro: OPS/OMS, 4, 16-19.
- Simpson, L. (1972). The kinetoplast of the hennellid flagellates. In *International Review of Cytology*(Vol. 32, pp. 139-207). Academic Press.
- Solari, A. J. (1995). Mitosis and genome partition in trypanosomes. *Biocell: official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica. et. al*, 19(2), 65-84.
- Souza, W. D. (2002). Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current pharmaceutical design*, 8(4), 269-285.
- Souza, W. D. (2009). Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 89-100.

- Souza, W. D., & Cavalcanti, D. P. (2007). DNA-containing organelles in pathogenic protozoa: a review. *Trends in Cell and Molecular Biology, Volume 2*, 89-104.
- Spina, R. M., Lozano, E., Barrera, P. A., Agüero, M. B., Tapia, A., Feresin, G. E., & Sosa, M. Á. (2018). Antiproliferative effect and ultrastructural alterations induced by 5-O-methylembelin on *Trypanosoma cruzi*. *Phytomedicine, 46*, 111-118.
- Steinert, G., Firket, H., & Steinert, M. (1958). Synthèse d'acide désoxyribonucléique dans le corps parabasal de *Trypanosoma mega*. *Experimental Cell Research, 15*(3), 632-635.
- Sülsen, V. P., Cazorla, S. I., Frank, F. M., Redko, F. C., Anesini, C. A., Coussio, J. D., & Muschietti, L. V. (2007). Trypanocidal and leishmanicidal activities of flavonoids from Argentine medicinal plants. *The American journal of tropical medicine and hygiene, 77*(4), 654-659.
- Sundar, S., & Chakravarty, J. (2013). Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. *Expert opinion on pharmacotherapy, 14*(1), 53-63.
- Tang, D. G., & Porter, A. T. (1996). Apoptosis: a current molecular analysis. *Pathology & Oncology Research, 2*(3), 117-131.
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology, 552*(2), 335-344.
- Turrens, J.F. (2004). Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Mol Aspects Med., 25*, 211-220.
- Ventura-Garcia, L., Roura, M., Pell, C., Posada, E., Gascón, J., Aldasoro, E., & Pool, R. (2013). Socio-cultural aspects of Chagas disease: a systematic review of qualitative research. *PLoS neglected tropical diseases, 7*(9), e2410.
- Vercesi, A. E., Moreno, S. N., & Docampo, R. (1994). Ca²⁺/H⁺ exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. *Biochemical Journal, 304*(1), 227-233.
- Vickerman, K. W. H. R., Preston, T. M., Lumsden, W. H. R., & Evans, D. A. (1976). Biology of the Kinetoplastida. In *Comparative Cell Biology of the Kinetoplastid Flagellates* (pp. 35-130). Academic Press London.
- Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Bertocchi, G., Petti, M., Alvarez, M. G., ... & Armenti, A. (2006). Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Annals of internal medicine, 144*(10), 724-734.
- Vogt, V., Cifuentes, D., Tonn, C., Sabini, L., & Rosas, S. (2013). Antifungal activity in vitro and in vivo of extracts and lignans isolated from *Larrea divaricata* Cav. against phytopathogenic fungus. *Industrial crops and products, 42*, 583-586.
- Walker, E. H., Pacold, M. E., Perisic, O., Stephens, L., Hawkins, P. T., Wymann, M. P., & Williams, R. L. (2000). Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Molecular cell, 6*(4), 909-919.
- Webster, P., & Russell, D. G. (1993). The flagellar pocket of trypanosomatids. *Parasitology Today, 9*(6), 201-206.

- Wilkinson, S. R., & Kelly, J. M. (2003). The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. *Biological chemistry*, 384(4), 517-525.
- 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.
- Zabala, J. P. (2007). *Production et utilisation des connaissances scientifiques autour de la maladie de Chagas: reducción y uso de conocimientos científicos vinculados a la enfermedad de Chagas* (Doctoral dissertation).
- Zabala, J. P. (2009). Historia de la enfermedad de Chagas en Argentina: evolución conceptual, institucional y política. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 16.
- Zabala, J. P. (2010). La enfermedad de Chagas en la Argentina: Investigación científica, problemas sociales y políticas sanitarias. In *La enfermedad de Chagas en la Argentina: investigación científica, problemas sociales y políticas sanitarias*.
- Zarkovic, N. (2003). 4-Hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Molecular aspects of medicine*, 24(4-5), 281-291.
- Zeledon, R, Alvarenga, N. J, & Schosinsky, K. (1997). Chagas Disease. *Pan American Health Organization. Publ. No. 347*.
- Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R. D. S., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O. & Miles, M. A. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), 1051-1054.