



Facultad de Medicina
Escuela de Medicina

“Actividad tripanocida *in vitro* de los extractos de flor de Palo Negro (*Leptocarpha rivularis*) sobre las formas amastigote y tripomastigote de *Trypanosoma cruzi*”

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

Gloria Pino Quintanilla

Director de Tesis: Dr. Joan Villena García

Codirector de Tesis: Dr. Mario Párraga San Román

Abril / 2023



Facultad de Medicina
Escuela de Medicina

“Actividad tripanocida *in vitro* de los extractos de flor de Palo Negro (*Leptocarpha rivularis*) sobre las formas amastigote y tripomastigote de *Trypanosoma cruzi*”

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas, mención en Biología Celular y Molecular

Gloria Pino Quintanilla

Director de Tesis: Dr. Joan Villena García

Codirector de Tesis: Dr. Mario Párraga San Román

Abril / 2023



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

"Actividad tripanocida *in vitro* de los extractos de flor de Palo Negro (*Leptocarpha rivularis*) sobre las formas amastigote y tripomastigote de *Trypanosoma cruzi*"

Gloria Pino Quintanilla

Este trabajo se realizó bajo la supervisión del Dr. Joan Villena García en el laboratorio de Biología Celular de la Universidad de Valparaíso y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión:

Dr. Carlos Jara
Presidente Comisión

Dr. Juan Diego Maya
Profesor Informante

Dra. Ximena Collao
Profesor Informante

Dr. Juan Villena García
Director de Tesis

**Viña del Mar, Chile
2023**

AGRADECIMIENTOS

Considerando el orden de cómo se fue gestando esta investigación, agradezco a cada uno/a su participación:

- Al PhD Carlos Jara, por la inquietud de la idea planteada, sin esa pregunta clave en una reunión informal, esta investigación no habría nacido.
- PhD Juan Diego Maya, por facilitarme las cepas de *T. cruzi*, gracias a su colaboración hoy contamos con la línea celular.
- PhD Iván Montenegro, gracias por facilitar los extractos naturales de flor de Palo Negro.
- Al proyecto LICHEN UVA 20993: "Desarrollo de un Prototipo Modelo de Kit para Cuantificación de la Carga Parasitaria para Enfermedad de Chagas" por financiar la investigación.
- Al PhD Joan Villena, por recibirme en su laboratorio y darme el espacio de trabajo.
- PhD Mario Párraga, porque además de ser Codirector, toleró mis estados de frustración y orientó mis procesos.
- A mis compañeras y amigas de Laboratorio, Camila y Karina bien saben que su apoyo, enseñanzas y escuchas, fue de vital importancia para hacer esto posible. Aprendí mucho de ustedes.
- Mi familia y amigos, por estar y enviar su energía en cada momento.
- A Patricia y Litzi, por compartir y dejar en mí el amor por los parásitos.

ABREVIATURAS

AcEt	: Acetato de Etilo
DNA	: Ácido desoxirribonucleico
BNZ	: Benznidazol
BrEt	: Bromuro de Etidio
CS	: Control Solvente
DCM	: Diclorometano
DMSO	: Dimetilsulfóxido
ECh	: Enfermedad de Chagas
EtOH	: Etanol
Hex	: Hexano
IgG	: Inmunoglobulina G
mL	: Mililitro
mM	: Milimolar
MTT	: Ensayo de Reducción de la Sal de Tetrazolio
NFX	: Nifurtimox
nm	: Nanómetros
OMS	: Organización Mundial de la Salud
PCR	: Reacción en Cadena de la Polimerasa
qPCR	: Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa
RAM	: Reacciones adversas al medicamento
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute 1640, Gibco®
SLs	: Lactonas sesquiterpénicas
SRB	: Sulforodamina B
<i>T.cruzi</i>	: <i>Trypanosoma cruzi</i>
TCA	: Ácido tricloroacético
UDTs	: Unidades discretas de tipificación
µg	: Microgramos
µL	: Microlitros
µM	: Micromolar

ÍNDICE

RESUMEN	8
1 INTRODUCCIÓN	9
1.1 Agente Parasitario	9
1.2 Mecanismo de Transmisión	10
1.3 Patogenia y Clínica.....	11
1.4 Tratamiento	12
1.5 Extractos Naturales.....	13
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	15
2.1 HIPOTESIS	15
2.2 OBJETIVO GENERAL.....	15
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3 METODOLOGÍA	16
3.1 Extractos de Flores de Palo Negro (<i>Leptocarpha rivularis</i>)	16
3.2 Cultivo de Células Vero ®	16
3.3 Cultivo de <i>T. cruzi</i> y recolección	16
3.4 Viabilidad Celular de Células Vero ®.....	17
3.5 Viabilidad Celular de Tripomastigotes por Ensayo MTT.....	18
3.6 Tinción con Bromuro de Etidio (BrEt) para la detección nuclear de células infectadas	19
3.7 Cuantificación de DNA parasitario.....	20
3.8 Análisis de Resultados	21
4 RESULTADOS.....	22
4.1 Viabilidad Celular de Células Vero ®.....	22
4.2 Viabilidad Celular de Tripomastigotes por Ensayo MTT.....	25
4.3 Tinción con Bromuro de Etidio (BrEt) para la detección nuclear de células infectadas.	29
4.4 Cuantificación de DNA parasitario.....	32
5 DISCUSIÓN	33
6 CONCLUSIONES	37
7 PROYECCIONES	38
BIBLIOGRAFÍA	39

RESUMEN

Trypanosoma cruzi, es un protozoo flagelado que causa la Enfermedad de Chagas, patología endémica en América, incluyendo Chile. *T. cruzi*, presenta tres formas morfológicas fundamentales, de las cuales dos están presentes en mamíferos. En el desarrollo de esta enfermedad, se reconocen las fases aguda y crónica, y como tratamiento convencional se usa principalmente Nifurtimox. Sólo en fase aguda se identifica el criterio de cura terapéutica por lo que la búsqueda de nuevos compuestos, especialmente de origen natural para tratar dicha patología, es un nicho necesario de explorar. Así, plantas endémicas de Chile como *Leptocarpha rivularis* que produce lactonas sesquiterpénicas (SLs) y muestran actividad citotóxica y antiprotozoaria, se han considerado como posible alternativa de tratamiento. El objetivo fue estudiar el efecto tripanocida de cuatro extractos de flor de Palo Negro: Hexano, Diclorometano, Acetato de Etilo y Etanol, sobre las formas amastigote y tripomastigote de *T. cruzi*. Mediante este estudio experimental se muestra que los extractos de Hexano, Diclorometano y Acetato de Etilo presentan actividad tripanocida, particularmente el extracto Diclorometano. Esto resulta prometedor para continuar el estudio de futuros fármacos tripanocidas naturales.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, amastigote, tripomastigote, extractos naturales, Palo Negro, tripanocida.

1| INTRODUCCIÓN

1.1 Agente Parasitario

Trypanosoma cruzi, es un protozoo flagelado descrito en 1909 en Minas Gerais (Brasil) por el médico e investigador Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1), como el agente etiológico de la enfermedad que lleva su nombre. Pertenece al Orden Kinetoplastida y la familia Trypanosomatidae, siendo un organismo cuya especie es de gran variabilidad dado que una cepa o aislado de este parásito corresponde a una población constituida por varios clones, pudiendo ser identificables por marcadores genéticos, moleculares y/o inmunológicos (2). En la actualidad, las poblaciones naturales del parásito se clasifican en seis unidades discretas de tipificación o UDTs, están son: Tc I, Tc II, Tc III, Tc IV, Tc V y Tc VI, las cuales aparentemente se distribuyen diferencialmente entre las diversas especies de triatomíneos, hospedadores mamíferos y hábitats en distintas áreas geográficas dentro de las Américas (3). En su ciclo de vida presenta tres formas morfológicas fundamentales: Amastigote, forma multiplicativa del parásito en el interior de las células del hospedero mamífero; Epimastigote, forma de multiplicación del parásito en el intestino del triatoma y Tripomastigote, presente en la sangre de mamíferos e intestino anterior y posterior de vinchucas. Este último, también corresponde a la forma infectante para los hospederos mamíferos (Ver Imagen N°1: Ciclo Biológico *T. cruzi*. Adaptado de CDC, 2019 (4).

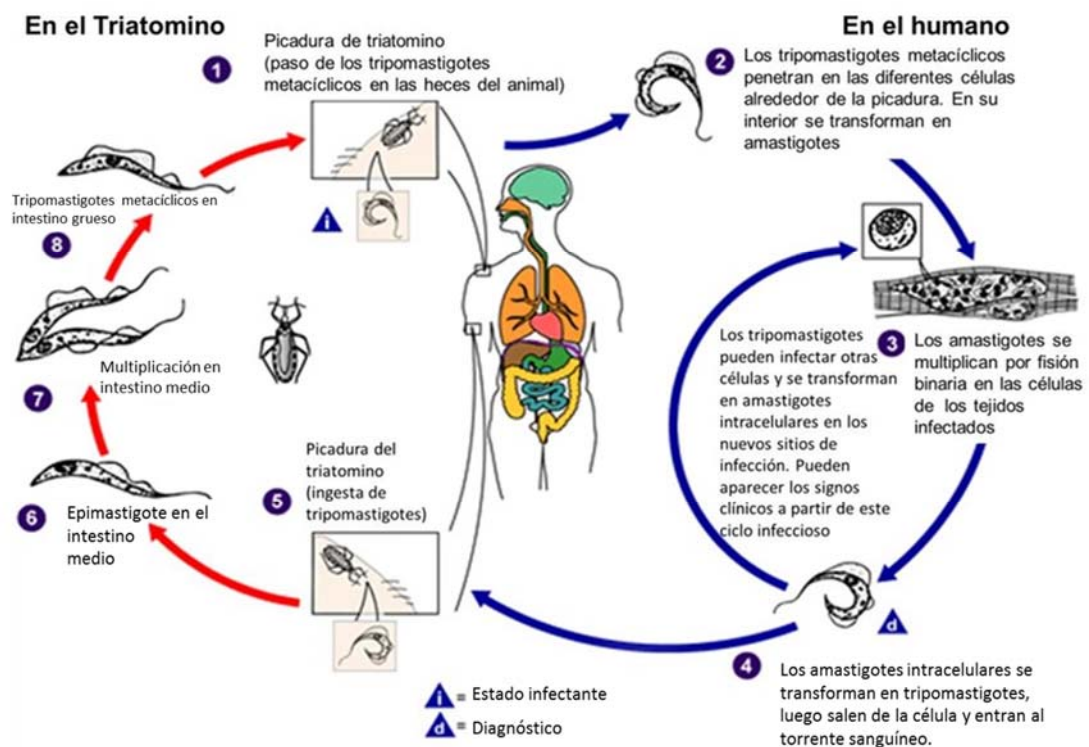


Imagen N°1: Ciclo Biológico de *T. cruzi*, adaptado de CDC, 2019 (4).

1.2 Mecanismo de Transmisión

La transmisión del parásito se realiza principalmente por medio de los vectores biológicos (Ver Imagen N°1), los que corresponden a insectos hematófagos del Orden Hemiptera, Familia Reduviidae y Subfamilia Triatominae, popularmente conocidos como vinchucas. En Chile, es transmitido por los vectores *Triatoma infestans*, *Mepraia spinolai*, *Mepraia gajardoi* y *Mepraia parapatrica* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae), siendo *Triatoma infestans* el vector domiciliario y el principal responsable de la prevalencia histórica de esta enfermedad en este país (5). Hay que considerar que este mecanismo se encuentra interrumpido en Uruguay desde 1997 y en Chile desde 1999, a consecuencia de eficientes campañas de erradicación del vector (6). Dada esta situación, la vía transplacentaria, se considera como el mecanismo de transmisión más importante en Chile. El trasplante de órganos y tejidos, el mecanismo transfusional, alimentario y

accidentes cortopunzantes, pueden dar inicio al ciclo descrito (Imagen N°1), una vez que hayan ingresado tripomastigotes al organismo mamífero, dada su condición de forma infectante.

1.3 Patogenia y Clínica

La presencia del parásito, sus parasitemias (dado el ciclo de vida intra y extracelular que tiene) y las invasiones tisulares, producen daño continuo y sistemático en diferentes órganos y tejidos, patología que se denomina Enfermedad de Chagas (ECh), también llamada Tripanosomiasis americana. Forma parte de las enfermedades desatendidas, tropicales y transmitidas por vectores según la Organización Mundial de la Salud (OMS), y es endémica en 21 países del continente americano (7) . Se estima que existen entre 6 y 8 millones de personas infectadas, en tanto que alrededor de 65 millones se encuentran en riesgo de adquirir la infección (7,8). En Chile, aproximadamente existen 145.000 individuos infectados, siendo zona endémica vectorial el territorio que se encuentra entre las regiones de Arica y Parinacota, del Libertador General Bernardo O'Higgins y la Metropolitana (9,10).

En el desarrollo de la ECh, se reconocen dos fases o periodos, de acuerdo con la duración y presentación clínica. Estos se definen como fase aguda y fase crónica, esta última se subdivide en indeterminada o asintomática y sintomática. Durante la fase aguda, el período de incubación es de 4 a 10 días. Generalmente es asintomático, siendo más frecuente en personas jóvenes. Se caracteriza por evidenciar una alta parasitemia, con síntomas y signos transitorios definidos (2). Dada la respuesta inmune del hospedador, esta parasitemia patente de fase aguda evoluciona a una parasitemia subpatente, por lo que solo alrededor del 1 a 2% de los casos de enfermedad de Chagas se detectan en esta etapa, considerándose que este período agudo se extiende por dos a cuatro meses (11). Avanzada esta etapa, el hospedador puede permanecer sin sintomatología, es decir, en una fase crónica indeterminada o asintomática. Entre el 50% y 70% de los pacientes que se encuentran en esta etapa, pueden permanecer en esta condición de asintomáticos durante toda su vida, caracterizándose por presentar baja parasitemia y serología positiva (títulos de IgG), el 30 - 50% restante desarrolla una etapa crónica con sus respectivas complicaciones. En esta última fase, se presentan signos y síntomas asociados a los órganos blancos de la ECh, estos son principalmente corazón, esófago y

colon. Por lo que los pacientes que se encuentran en esta fase evidencian compromiso de dichos órganos desarrollando miocardiopatías (arritmias, bloqueos), megaesófago (reflujo) y megacolon (constipación). (12).

1.4 Tratamiento

Los fármacos antiparasitarios utilizados son el Nifurtimox (NFX) y Benznidazol (BNZ), siendo el primero de éstos el más utilizado, con mayor disponibilidad y distribución en nuestro país, de acuerdo con la Norma General Técnica Control y Prevención de la Enfermedad de Chagas del Ministerio de Salud (2014). El tratamiento farmacológico antiparasitario tiene como objetivos: prevenir la transmisión vertical considerando que es el mecanismo de transmisión de mayor relevancia en nuestro país luego de que la transmisión vectorial fuera interrumpida en 1999; evitar la progresión de la enfermedad mediante la disminución de la carga parasitaria de *T. cruzi*,; evitar las complicaciones del sistema cardiovascular y digestivo; finalmente, mejorar la calidad de vida futura de los pacientes (12). Sin embargo, se sabe que el NFX, conduce a la regresión de la parasitemia y síntomas clínicos durante la fase aguda y se ha descrito que la eficacia del fármaco disminuye a medida que transcurre mayor tiempo desde el inicio de la infección. Es así como durante la etapa crónica determinada e indeterminada, los resultados de los estudios son controversiales y no convincentes, lo que se explicaría por las características intracelulares del parásito (13). Además, hay que considerar que el tratamiento antiparasitario está contraindicado durante el embarazo, dado el desconocimiento de los riesgos en el desarrollo fetal. A su vez, en los adultos mayores no hay antecedentes respecto a efectos adversos (14,15), lo que resulta un aspecto fundamental de la adecuada administración de la farmacoterapia. Entre las reacciones adversas al medicamento (RAM), se consideran leves y moderadas aquellas que presentan ausencia de compromiso vital, como prurito, rash cutáneo, gastritis, entre otras, y se requiere la suspensión transitoria del tratamiento. Por el contrario, aquellas que pueden comprometer la vida de la persona como rash severo (vesículas, exantema, enantema) de piel, un aumento de pruebas hepáticas, y/o alteraciones del sistema nervioso central, entre otras, implican la suspensión definitiva del medicamento (12).

1.5 Extractos Naturales

La eficacia de los fármacos tripanocidas utilizados actualmente para tratar la ECh, está lejos de ser óptima para el tratamiento en los pacientes que se encuentran en etapa crónica, a su vez al desconocer los riesgos que puede tener sobre el feto está contraindicado en mujeres embarazadas (16). Por lo tanto, encontrar fármacos nuevos, eficaces y seguros sigue siendo un desafío actual.

Es así, que buscando nuevos compuestos naturales que actúen sobre *T. cruzi*, algunos estudios han mostrado que extractos de microalgas poseen actividad tripanocida (16), al igual que algunas plantas endémicas chilenas en donde se ha presenciado que *Podanthus mitique*, produce lactonas sesquiterpénicas (SLs), que muestran actividad citotóxica y antiprotozoaria (17–19). Esta familia de compuestos bioactivos, como son las SLs están comprendidas por un gran grupo de metabolitos secundarios que poseen diversas actividades biológicas, y se han caracterizado más de 5000 variantes estructurales (20). La gran diversidad de estructuras que presentan las SLs está probablemente relacionada con la diversidad biológica de estas especies y su éxito ecológico, ya que se encuentran presentes en más de 100 familias de plantas con flores. Su actividad farmacológica incluye un amplio abanico de actividades tales como antimicrobiana, antiviral, antiinflamatoria, antitumoral, antiprotozoaria, entre otras. (21).

En nuestro país, existe una planta endémica denominada "Palo Negro" (*Leptocarpha rivularis*), la cual corresponde a un arbusto perenne nativo del sur de Chile, que crece en suelos húmedos y soleados hasta dos metros de alturas, con hojas dentadas de hasta 10 cm y flores hermafroditas de hasta 2 cm de diámetro, compuestas por capítulos axilares y terminales amarillos. (22).

Leptocarpha rivularis, conocido como "Palo Negro" ha sido ampliamente utilizado en la medicina ancestral mapuche desde la época prehispánica para padecimientos gastrointestinales y estomacales, al punto que partes de este arbusto se comercializan en mercados públicos y farmacias locales (22). La familia Asteraceae a la cual pertenece este tipo de arbusto, presenta como metabolitos secundarios, compuestos acetilénicos, sesquiterpenos y lactonas sesquiterpénicas, además *L. rivularis*, se caracteriza por contener aceites esenciales, flavonoides y triterpenos. (22,23). Sin embargo, pese al gran interés que genera dada la variedad de metabolitos secundarios que produce, las

propiedades de sus flores aún no son descritas exhaustivamente. Estudios fitoquímicos previos han demostrado la presencia de sesquiterpenos, principalmente un contenido elevado de *Leptocarpina* un tipo de SLs (22), lo que hace que sea atractivo en la búsqueda de terapias naturales con potencial actividad tripanocida que pudiese presentar gracias a la presencia de esta familia de compuestos bioactivos.

En resumen, la ECh, es una enfermedad de gran impacto en la salud pública a nivel mundial y nacional dada las características que presenta: el agente causal, desarrolla un ciclo de vida intra y extracelular; y el tratamiento con drogas sintéticas comerciales es limitante. Se propone el uso de extractos naturales obtenidos de plantas endémicas chilenas cuyos compuestos han mostrado previamente algún tipo de actividad tripanocida.

2| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPOTESIS

Los extractos naturales de flor de Palo Negro (*Leptocarpha rivularis*) presentan actividad tripanocida sobre las formas parasitarias amastigote y tripomastigote de *T. cruzi*.

2.2 OBJETIVO GENERAL

1. Evaluar la actividad tripanocida *in vitro* de los extractos de flor de Palo Negro (*Leptocarpha rivularis*) sobre las formas amastigote y tripomastigote de *Trypanosoma cruzi*.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto tripanocida de los extractos de flor de Palo Negro (*Leptocarpha rivularis*) sobre la forma tripomastigote de *Trypanosoma cruzi* mediante ensayo de viabilidad celular.
2. Determinar el efecto tripanocida de los extractos de flor de Palo Negro (*Leptocarpha rivularis*) sobre la forma amastigote de *Trypanosoma cruzi* mediante tinción nuclear de células infectadas y amplificación de ácidos nucleicos.

3| METODOLOGÍA

3.1 Extractos de Flores de Palo Negro (*Leptocarpha rivularis*)

Los extractos naturales fueron realizados por el Dr. Iván Montenegro para el Laboratorio de Bioensayos (Biología Celular del Cáncer) y se contó con ellos para aplicarlos en la ejecución del trabajo de investigación. Estos extractos se realizaron a partir de las flores del Palo Negro (*Leptocarpha rivularis*) colectadas durante la época de floración en el mes de noviembre en la ciudad de Temuco, región de la Araucanía. Se utilizaron solventes en forma creciente de polaridad: Hexano (Hex), Diclorometano (DCM), Acetato de Etilo (AcEt) y Etanol (EtOH), para luego ser filtrados y evaporados en rotavapor. Los extractos de flores de *Leptocarpha rivularis*, se mantienen a -20 °C (22).

3.2 Cultivo de Células Vero ®

Las células de fibroblasto de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) ATCC® CCL-81TM) Células Vero ® fueron cultivadas en placas de cultivo celular con medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute 1640, Gibco® (RPMI), suplementado con bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 2mg/mL, estreptomicina al 100 µg/mL penicilina al 100 UI/mL y enriquecido con suero fetal bovino al 10% para crecimiento o al 5% para mantenimiento en estufa a 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO₂, reemplazando el medio cada 24 o 48 horas (24).

3.3 Cultivo de *T. cruzi* y recolección

Para este estudio, se utilizaron las formas parasitarias amastigote y tripomastigote de *T. cruzi*, ya que son las que se desarrollan en hospedadores mamíferos como se describe en el apartado 1.1.

Los tripomastigotes cepa Dm 28c de *T. cruzi* (25), se obtuvieron a partir de cultivos de células Vero® infectadas con el parásito. Para esto las células Vero® fueron cultivadas como se describe anteriormente. Luego de 24 horas, fueron infectadas en proporción 3:1 con tripomastigotes provenientes de un cultivo anterior. Transcurridos entre 3 – 4 días, se recolectó el medio de cultivo con tripomastigotes y se centrifugó a 500g por 5 minutos. El sobrenadante fue recolectado y centrifugado a 3500g durante 10 minutos a 4 °C, obteniendo en el sedimento las formas infectivas de *T. cruzi*. Los tripomastigotes fueron resuspendidos en medio RPMI y el número de células se determinó en una cámara

de Neubauer (16)

Para la obtención de células Vero ® infectadas con amastigotes de *T. cruzi*, estas fueron cultivadas como se indica anteriormente (Apartado 3.2) y transcurridas 24 horas se infectaron con los tripomastigotes colectados en la proporción 3:1.

3.4 Viabilidad Celular de Células Vero ®

La viabilidad celular de las células Vero® no infectadas y tratadas con los cuatro extractos de la flor de Palo Negro se determinó mediante un ensayo colorimétrico con Sulforodamina B (SRB). Para determinar la concentración que no afecta a la viabilidad celular, las células Vero® sin infectar fueron sembradas por triplicado en placas de 96 pocillos a una densidad de 5×10^3 células por pocillo e incubadas durante 24 horas. Una vez transcurrido ese tiempo fueron tratadas por separado con los cuatro extractos de flor de Palo Negro (Hex, DCM, AcEt y EtOH) en diferentes concentraciones (2,5 – 6,25 – 12,5 – 18,75 – 25 – 50 – 100 y 250 $\mu\text{g/mL}$). Se usó DMSO 0,1% como control solvente, NFX (10 μM) como control positivo y se incluyó un control negativo, que corresponde a células infectadas sin exposición a los extractos. Las células fueron expuestas a los tratamientos por 24 y 48 horas a 37°C con atmósfera húmeda al 5% de CO_2 . Luego de cada tratamiento, las células fueron fijadas con Ácido Tricloroacético (TCA) al 10% (concentración final) por una hora a 4 °C. Posteriormente las células fueron lavadas 3 veces por inmersión en agua destilada. Luego fueron teñidos con 50 $\mu\text{L/pocillo}$ de sulforodamina B (SRB), al 0,1% p/v en ácido acético al 1%, dejándolas a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente, las células fueron lavadas 3 veces con 150 $\mu\text{L/pocillo}$ de ácido acético al 1% y se dejaron secar a temperatura ambiente.

El colorante fue solubilizado con 100 $\mu\text{L/pocillo}$ de Tris Base 10 mM, para luego medir la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm en el lector de microplacas. Los porcentajes de viabilidad celular se compararon con el control, para determinar si existía diferencia estadísticamente significativa en el efecto sobre la viabilidad celular tras cada tratamiento.

Objetivo Específico N°1: Determinar el efecto tripanocida de los extractos de las flores de Palo Negro (*Leptocarpa rivularis*) sobre la forma tripomastigote de *Trypanosoma cruzi* mediante ensayo de viabilidad celular.

3.5 Viabilidad Celular de Tripomastigotes por Ensayo MTT

El efecto de los extractos de flor de Palo Negro (*Leptocarpa rivularis*) sobre el tripomastigote se evaluó mediante el Ensayo de Reducción de la Sal de Tetrazolio (MTT) con el kit CyQUANTTM MTT Cell Proliferation Assay (ThermoFisher, USA). Para esto, se recolectaron los tripomastigotes de acuerdo con el protocolo mencionado en el Apartado 3.3, y se cultivaron por triplicado en una placa de 96 pocillos en una densidad de 1×10^6 células por pocillo. Transcurridas 24 horas, fueron tratadas por separado con los cuatro extractos de las flores de Palo Negro (Hex, DCM, AcEt y EtOH) en diferentes concentraciones (12,5 – 18,75 – 25 y 50 ug/mL). Se usó DMSO 0,1% como control solvente, NFX (10 ug/mL) como control positivo y se incluyó un control negativo, que corresponde a células infectadas sin exposición a los extractos. Los tripomastigotes fueron expuestos a los tratamientos por 24 y 48 horas a 37°C con atmósfera al 5% de CO₂.

Se realizó el ensayo de MTT según indicaciones del fabricante para células no adherentes. Para ello, se resuspendieron los tripomastigotes en 100 µL de medio fresco sin rojo fenol, se trataron con 10 µL de MTT (12 mM), incluyendo el control negativo que son los tripomastigotes sin tratamiento y se incubaron a 37 °C por 2 horas. Luego se eliminó el medio, y se agregaron 50 µL de DMSO, repipeteando suavemente. Finalmente, se incubó a 37 °C por 10 minutos y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm en el lector de microplacas.

Los porcentajes de viabilidad celular se compararon con el control solvente, para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa en el efecto sobre la viabilidad celular tras cada tratamiento. Para el cálculo de IC₅₀, se utilizó el programa Sigma Plot 12.0.

Objetivo Específico N°2: Determinar el efecto tripanocida de los extractos de las flores de Palo Negro (*Leptocarpha rivularis*) sobre la forma amastigote de *Trypanosoma cruzi* mediante tinción nuclear de células infectadas y amplificación de ácidos nucleicos.

3.6 Tinción con Bromuro de Etidio (BrEt) para la detección nuclear de células infectadas

Para la obtención de células vero ® infectadas con amastigotes de *T. cruzi*, estas fueron cultivadas como se describe anteriormente en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos redondos a una densidad de 1×10^3 células por pocillo. Transcurridas 24 horas se infectan con los tripomastigotes colectados en la proporción 3:1, por cuadruplicado. Al tercer día de haber realizado este procedimiento, fueron tratadas por separado con dos extractos de las flores de Palo Negro (Hex y DCM) en diferentes concentraciones (12,5 – 18,75 y 25 ug/mL). Se usó DMSO 0,1% como control solvente, NFX (10 µM) como control positivo y se incluyó un control negativo, que corresponde a células infectadas sin exposición a los extractos. Las células fueron expuestas a los tratamientos por 24 y 48 horas a 37°C con atmósfera al 5% de CO₂.

Luego de transcurrido el tiempo de exposición a los tratamientos con los extractos de las flores de Palo Negro, el cubreobjetos se extrajo de la placa de 24 pocillos y se depositaron en una nueva placa de 24 pocillos, donde se fijaron las células con 200 µL de metanol frío por 10 min a -20 °C. Luego cada pocillo se lavó dos veces con 300 µL con PBS al 1%, y se dejó secar a temperatura ambiente por 1 hora. Finalmente, cada cubreobjetos se tiñó con 5 µL de BrEt 2 ng/uL, se selló la muestra y se observó en el microscopio de fluorescencia (MIRAKO MOSEVE, Japan). Finalmente se realizó el registro fotográfico digital de cada tratamiento (20 fotos por muestra) para posteriormente contar de forma manual el número total de células, las células infectadas y la cantidad de amastigotes por muestra, que permitió definir el grado de infección usando la fórmula:

$$(\text{N}^\circ \text{ de células infectadas} / \text{N}^\circ \text{ de células totales}) \times 100.$$

Los porcentajes de infección se compararon con el control solvente, para determinar si

existe diferencia estadísticamente significativa en el efecto sobre la infección de amastigotes tras cada tratamiento.

3.7 Cuantificación de DNA parasitario

Para evaluar el efecto de los extractos de la flor de Palo Negro (*Leptocarpha rivularis*) sobre la célula infectada con amastigote, se realizó la cuantificación del DNA parasitario. Para ello, se cultivaron Células Vero® en placas de 6 pocillos una densidad de 2×10^3 células por pocillo, transcurridas 24 horas se infectaron con los tripomastigotes colectados en la proporción 3:1, por duplicado. Al tercer día, fueron tratadas por separado con dos extractos de las flores de Palo Negro (Hex y DCM) en dos concentraciones diferentes (12,5 y 18,75 $\mu\text{g/mL}$). Se usó DMSO 0,1% como control solvente, NFX (10 μM) como control positivo y se incluyó un control negativo, que corresponde a células infectadas sin exposición a los extractos. Las células fueron expuestas a los tratamientos por 24 y 48 horas a 37°C con atmósfera al 5% de CO_2 .

Transcurrida la exposición a los tratamientos con los extractos de las flores de Palo Negro se realizó extracción de DNA genómico con el Kit E.Z.N.A Tissue DNA (Omega Biotek), según protocolo del fabricante. El DNA purificado fue cuantificado por fluorimetría con el kit QuantiFluor® dsDNA System (Promega, USA)

Para evaluar cambios en la carga parasitaria, el DNA fue analizado por PCR en tiempo real utilizando SYBR® Green. La reacción de qPCR se realizó con el kit FastStart Universal Probe Master Mix (Roche Diagnostics GmbH Corp., Mannheim, Alemania) con 9,4 μL de DNA en un volumen final de 20 μL . Las reacciones fueron amplificadas en el sistema de detección CFX96 Touch Real-Time PCR (Bio-Rad, USA) en las siguientes condiciones: un primer paso de 5 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos y un paso final de 1 minuto a 60 °C.

Para esto se usaron cebadores descritos en reportes previos (26) avalados por estudios internacionales (27,28). Para *T.cruzi* se utilizaron las secuencias Cruzi 1: 5' - AGTCGGCTGATCGTTTTCGA-3' y Cruzi 2: 5' -AATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3'. Como normalizador se utilizó GAPDH, usando las siguientes secuencias de cebadores; F: 5' - CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT - 3' y R: 5' - AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA

GAC – 3´.

Para el cálculo de la carga de DNA de *T. cruzi* se utilizó el método del Livak K & Schmittgen ($\Delta\Delta Ct$) (29), considerando la normalización con GAPDH. Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

Donde,

R=Expresión relativa

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ Tratamiento} - \Delta Ct \text{ Control}$

$\Delta Ct = Ct \text{ Gen estudio} - Ct \text{ Gen de referencia}$

3.8 Análisis de Resultados

Para comparar los datos obtenidos en cada experimento se realizó un análisis estadístico con el software Stata/SE 17.0. Dado que los datos no presentaron distribución normal se utilizó el test de Kruskal-Wallis, prueba de contraste no paramétrica, con un valor $p < 0,05$ como criterio de significancia estadístico, seguido de la prueba post hoc de Dunn.

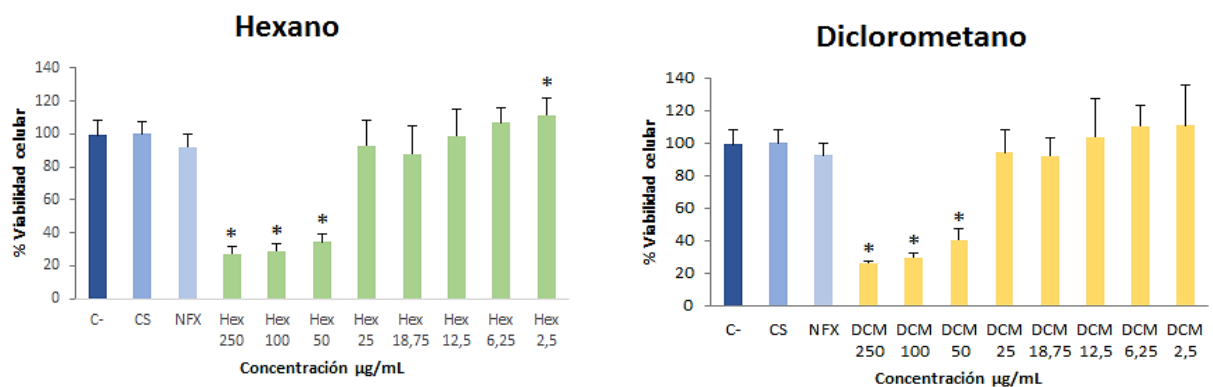
4| RESULTADOS

4.1 Viabilidad Celular de Células Vero ®

Para evidenciar que no hubiera efecto de los extractos de flor de Palo Negro sobre las células Vero®, se analizó la respuesta de éstas a los tratamientos en diferentes concentraciones mediante un ensayo colorimétrico con Sulforodamina B (SRB) que evalúa viabilidad celular.

Como se observa en las Figuras N°1A y N°1B, no existe diferencia estadísticamente significativa entre el tratamiento con solvente (CS: DMSO 0,1%) y el medio de cultivo (C-) en la línea celular trabajada ($p > 0,05$) ni a las 24 ni a las 48 horas. Al no observarse diferencias significativas entre ambos controles, el solvente (CS) se consideró como el control para realizar el resto de las comparaciones.

Figura N°1A



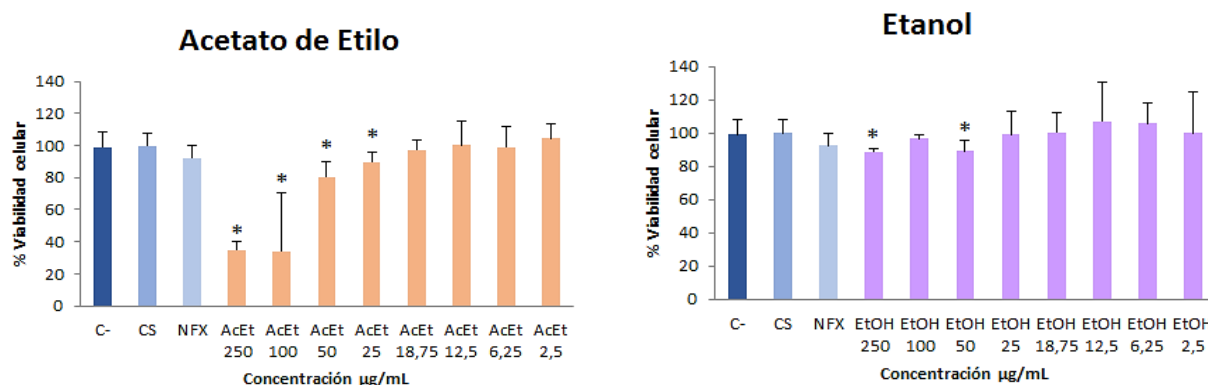


Figura N°1A: Efecto de los extractos de flor de Palo Negro sobre Células Vero ® expuestas a diferentes concentraciones tras 24 horas. Los valores son expresados como porcentajes de células vivas, las barras de error corresponden a su respectiva desviación estándar (Análisis extractos/control solvente, *: $p < 0,05$ Test Kruskal-Wallis: post hoc Test de Dunn).

Se observa una disminución significativa ($p < 0,05$) en la viabilidad de las células Vero tratadas con extracto de Hexano en las concentraciones 250, 100 y 50 µg/mL durante 24 horas, al compararlo con el CS. Por su parte, se observa un aumento estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de la viabilidad celular respecto del CS al disminuir la concentración a 2,5 µg/mL. En el caso del extracto de Diclorometano, se aprecia una disminución de la viabilidad celular a medida que aumenta la concentración del extracto, siendo estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en las concentraciones altas (250, 100 y 50 µg/mL) respecto al CS. Situación similar se observa en el extracto de Acetato de Etilo, en donde se observa disminuida la viabilidad celular de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$), tras tratamiento en las concentraciones 250, 100, 50 y 25 µg/mL, respecto al CS. En el caso del extracto de Etanol, si bien hay diferencias estadísticas ($p < 0,05$) en las concentraciones 250 y 50 µg/mL respecto al CS, la viabilidad celular se registra mayor al 80% en todas las concentraciones utilizadas.

Figura N°1B

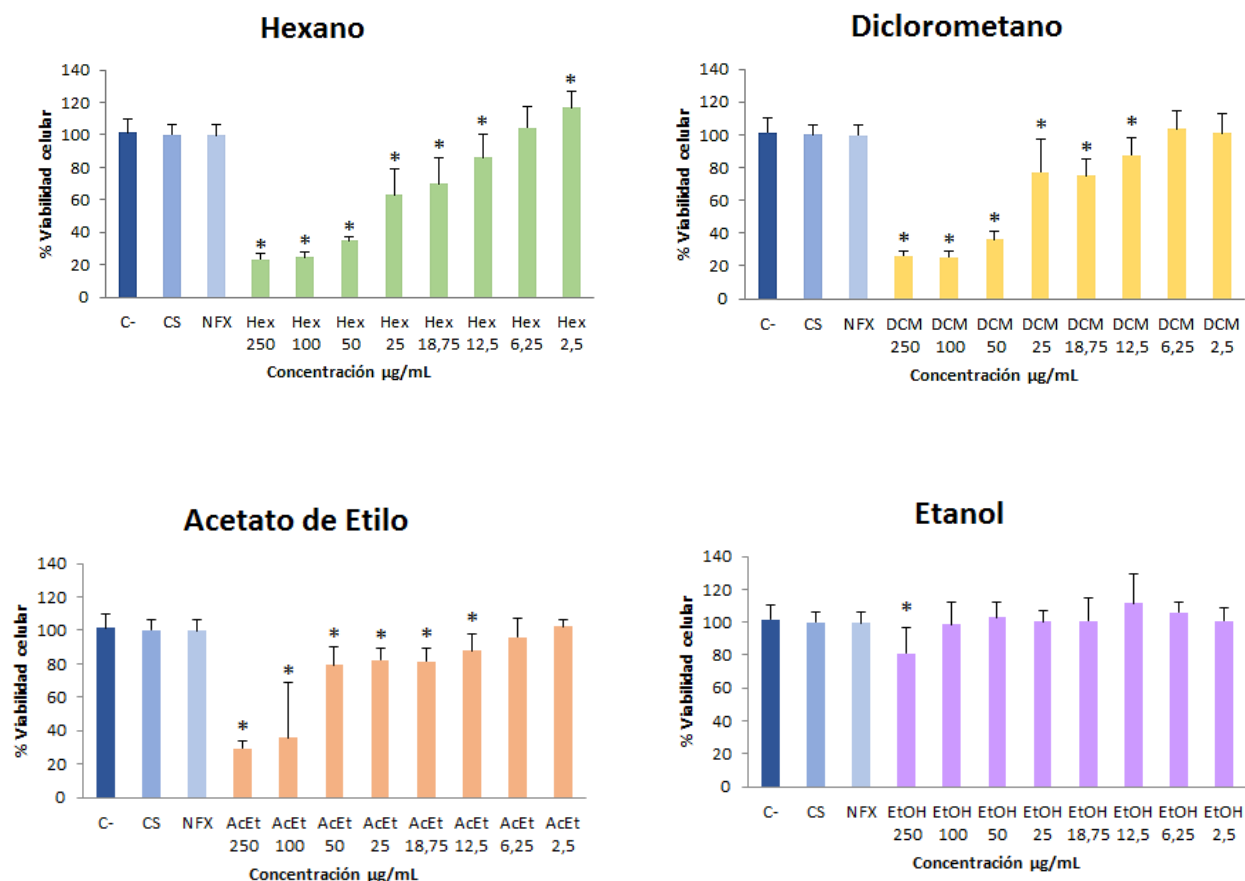


Figura N°1B: Efecto de los extractos de flor de Palo Negro sobre Células Vero ® expuestas a diferentes concentraciones tras 48 horas. Los valores son expresados como porcentajes de células vivas, las barras de error corresponden a su respectiva desviación estándar (Análisis extractos/control solvente, *: $p < 0,05$ Test Kruskal-Wallis: post hoc Test de Dunn).

La viabilidad celular con el extracto Hexano aumenta a medida que disminuye la concentración del extracto. El efecto es menor al registrado en el CS en las concentraciones 250, 100, 50, 25, 18,75 y 12,5 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$), tras 48 horas de tratamiento. La viabilidad celular es significativamente mayor ($p < 0,05$) respecto del CS, al disminuir la concentración del extracto a 2,5 $\mu\text{g/mL}$. En el tratamiento con

Diclorometano, se observa una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en la viabilidad celular en las concentraciones 250, 100, 50, 25, 18,75 y 12,5 $\mu\text{g/mL}$ respecto al CS luego de 48 horas de tratamiento. En las concentraciones bajas (6,25 y 2,5 $\mu\text{g/mL}$) no hay diferencias. Con el extracto Acetato de Etilo, se aprecia una reducción de la viabilidad celular a medida que aumenta la concentración del extracto, siendo estadísticamente significativo ($p < 0,05$) para las concentraciones 250, 100, 50, 25, 18,75 y 12,5 $\mu\text{g/mL}$. En el caso del extracto de Etanol, si bien hay diferencias significativas ($p < 0,05$) de la concentración 250 $\mu\text{g/mL}$ respecto al CS, la viabilidad celular es mayor al 80% en todas las concentraciones utilizadas.

Objetivo Específico N°1: Determinar el efecto tripanocida de los extractos de la flor de Palo Negro (*Leptocarpha rivularis*) sobre la forma tripomastigote de *Trypanosoma cruzi* mediante ensayo de viabilidad celular.

4.2 Viabilidad Celular de Tripomastigotes por Ensayo MTT

Como se describe en el apartado 3.5, el efecto de los extractos de flor de Palo Negro (*Leptocarpha rivularis*) sobre el tripomastigote se evaluó mediante el Ensayo de Reducción de la Sal de Tetrazolio (MTT), tras 24 y 48 horas postratamiento.

Para este objetivo se consideraron los cuatro extractos de las flores de Palo Negro (Hex, DCM, AcEt y EtOH) en las concentraciones intermedias dado que no fueron citotóxicas para las Células Vero (12,5 - 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$). En el caso de los extractos de Hex y DCM, se sumó la concentración 18,75 $\mu\text{g/mL}$ por mostrar mejor actividad.

Los porcentajes de viabilidad celular se compararon con el control solvente, para determinar si existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el efecto sobre la viabilidad del tripomastigote tras cada tratamiento.

En los extractos de Hex y DCM el IC_{50} es 19,4 y 41,94 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, a las 48 horas postratamiento. Para los tripomastigotes tratados por 24 horas con los cuatro extractos, y para los tratados con los extractos AcEt y EtOH a las 48 horas el IC_{50} indica un valor superior a 50 $\mu\text{g/mL}$ dado que las concentraciones usadas son más bajas que las necesarias para reducir al 50% la viabilidad de los tripomastigotes.

Figura N°2A

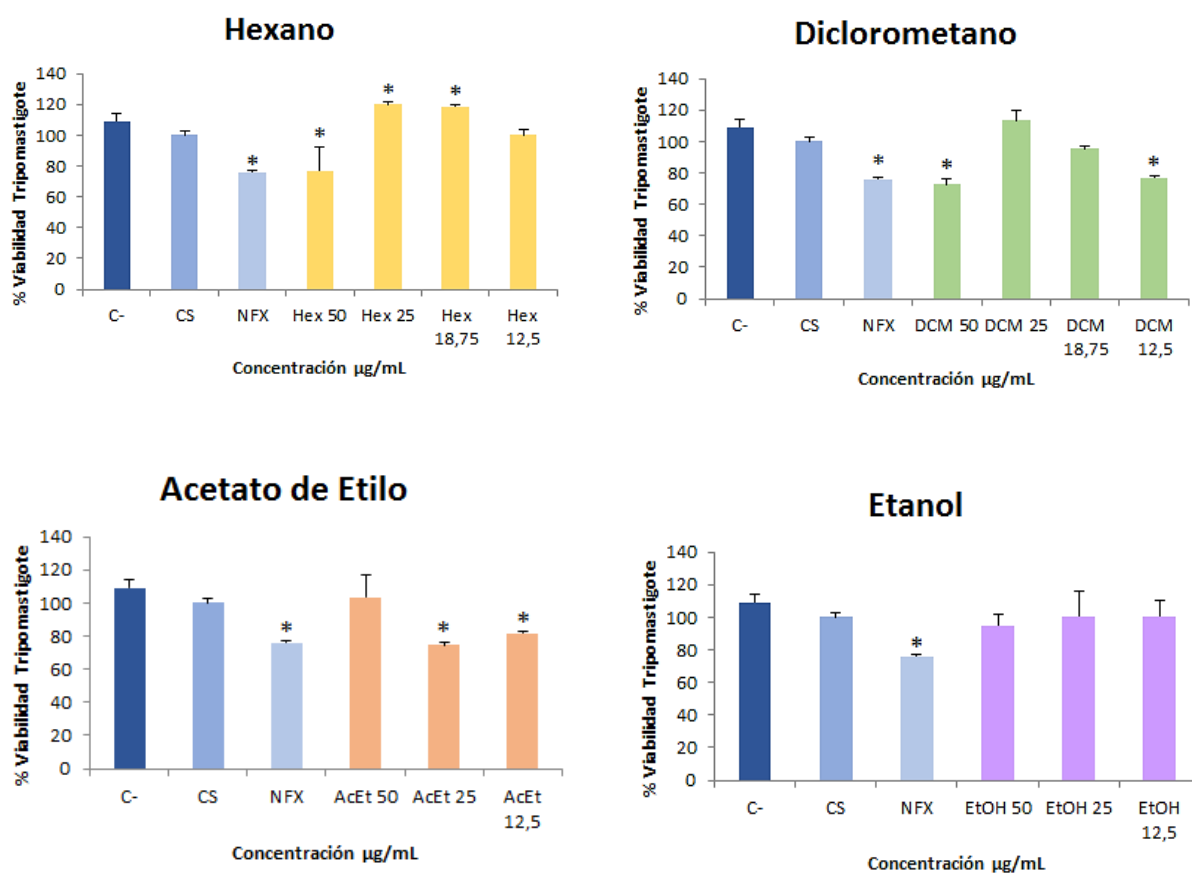


Figura N°2A: Efecto de los extractos de flor de Palo Negro sobre la viabilidad de Tripomastigotes tras 24 horas postratamiento. Los valores son expresados como porcentajes de células vivas, las barras de error corresponden a su respectiva desviación estándar (Análisis extractos/control solvente, *: $p < 0,05$ Test Kruskal-Wallis: post hoc Test de Dunn).

Se observa una disminución significativa ($p < 0,05$) con la concentración 50 $\mu\text{g/mL}$ respecto al CS y un valor similar al observado para el control positivo NFX (10 μM). Por el contrario, aumenta significativamente ($p < 0,05$) la viabilidad de los tripomastigotes respecto al CS, al usar las concentraciones 25 y 18,75 $\mu\text{g/mL}$, para los tratamientos de 24h con el extracto de Hexano. Con el extracto de Diclorometano, la viabilidad de los tripomastigotes disminuye significativamente ($p < 0,05$) en los tratamientos con las

concentraciones de 50 y 12,5 $\mu\text{g/mL}$ respecto al CS. En el caso del extracto de Acetato de Etilo, se aprecia que disminuye significativamente ($p < 0,05$) la viabilidad de los tripomastigotes, al aplicar las concentraciones de 25 y 12,5 $\mu\text{g/mL}$ respecto al CS pero presenta valores similares a los obtenidos con NFX (control positivo). Sin embargo, al usar el extracto de Etanol se aprecia que sólo hay diferencias significativas respecto al control solvente en el caso del NFX 10 μM ($p < 0,05$).

Figura N°2B

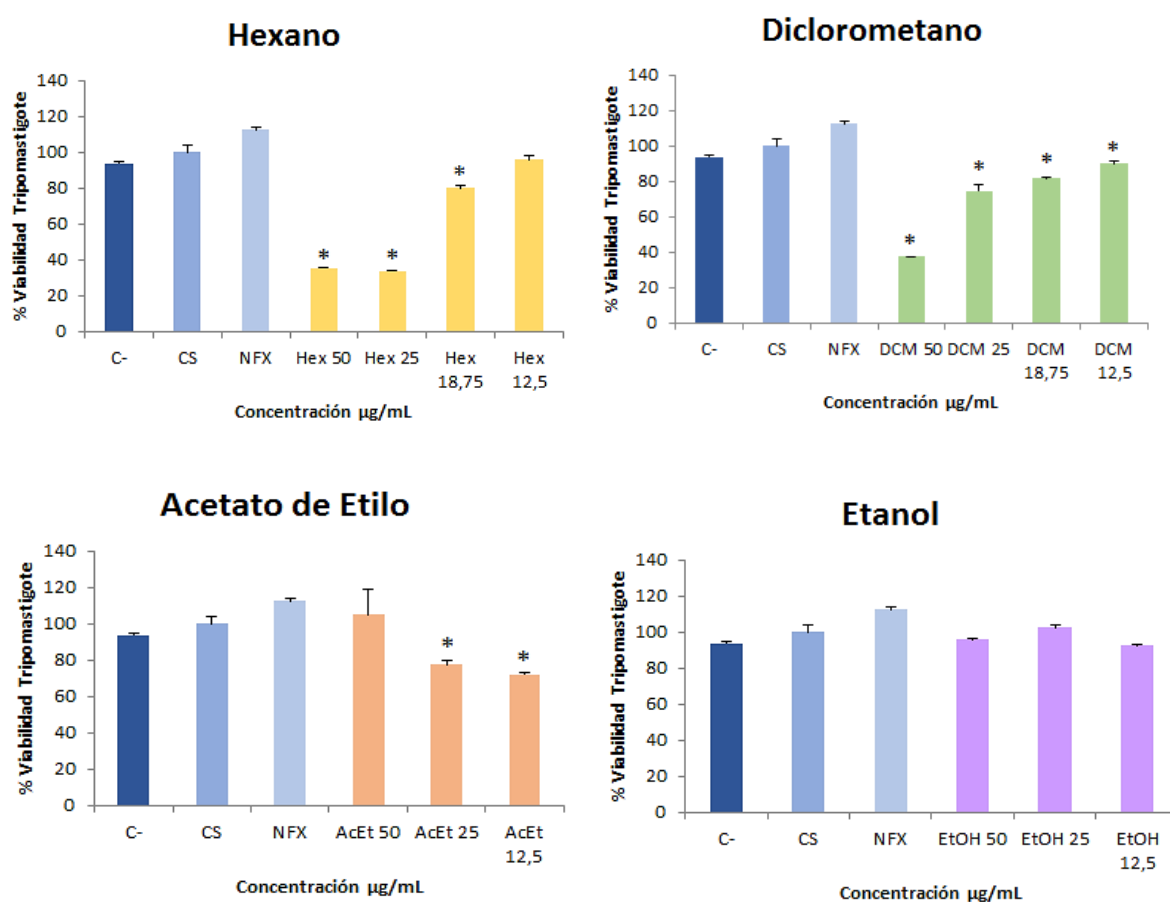


Figura N°2B: Efecto de los extractos de flor de Palo Negro sobre la viabilidad de Tripomastigotes tras 48 horas postratamiento. Los valores son expresados como porcentajes de células vivas, las barras de error corresponden a su respectiva desviación estándar (Análisis extractos/control solvente, *: $p < 0,05$ Test Kruskal-Wallis:

post hoc Test de Dunn).

Se observa que disminuye la viabilidad de los tripomastigotes, presentando diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) respecto al CS al usar tres concentraciones (50, 25 y 18,75 $\mu\text{g/mL}$) del extracto de Hexano, luego de 48 horas postratamiento.

A su vez, disminuyen la viabilidad del parásito de forma estadísticamente significativa ($p < 0,05$) respecto al CS ante todas las concentraciones utilizadas (50, 25, 18,75 y 12,5 $\mu\text{g/mL}$) del extracto de Diclorometano. Por el contrario, en el extracto de Acetato de Etilo, se muestra una disminución de la viabilidad estadísticamente significativa ($p < 0,05$) respecto al CS al usar sólo dos concentraciones (25 y 12,5 $\mu\text{g/mL}$). En el caso del extracto de Etanol, no se observan diferencias.

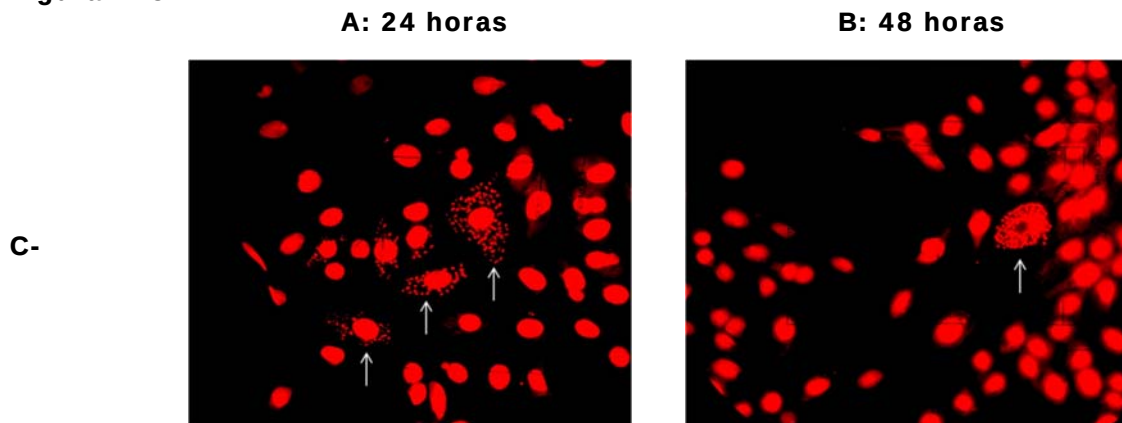
Objetivo Específico N°2: Determinar el efecto tripanocida de los extractos de la flor de Palo Negro (*Leptocarpa rivularis*) sobre la forma amastigote de *Trypanosoma cruzi* mediante tinción nuclear de células infectadas y amplificación de ácidos nucleicos.

4.3 Tinción con Bromuro de Etidio (BrEt) para la detección nuclear de células infectadas.

Para evaluar el efecto de los extractos sobre las células Vero infectadas con amastigotes se realizó la detección nuclear de células con la tinción de Bromuro de Etidio. Para este objetivo solo se consideraron dos extractos de las flores de Palo Negro (Hex y DCM) en diferentes concentraciones (12,5 – 18,75 y 25 ug/mL), dado que si bien hay concentraciones que son citotóxicas para las Células Vero, muestran perfil de acción tripanocida más favorable.

No se muestran imágenes representativas como resultado de la aplicación de los extractos de Hex y DCM en las concentraciones de 18,75 y 25 ug/mL, ya que no se observaron células, al igual que Hex en la concentración 12,5 ug/mL.

Figura N°3



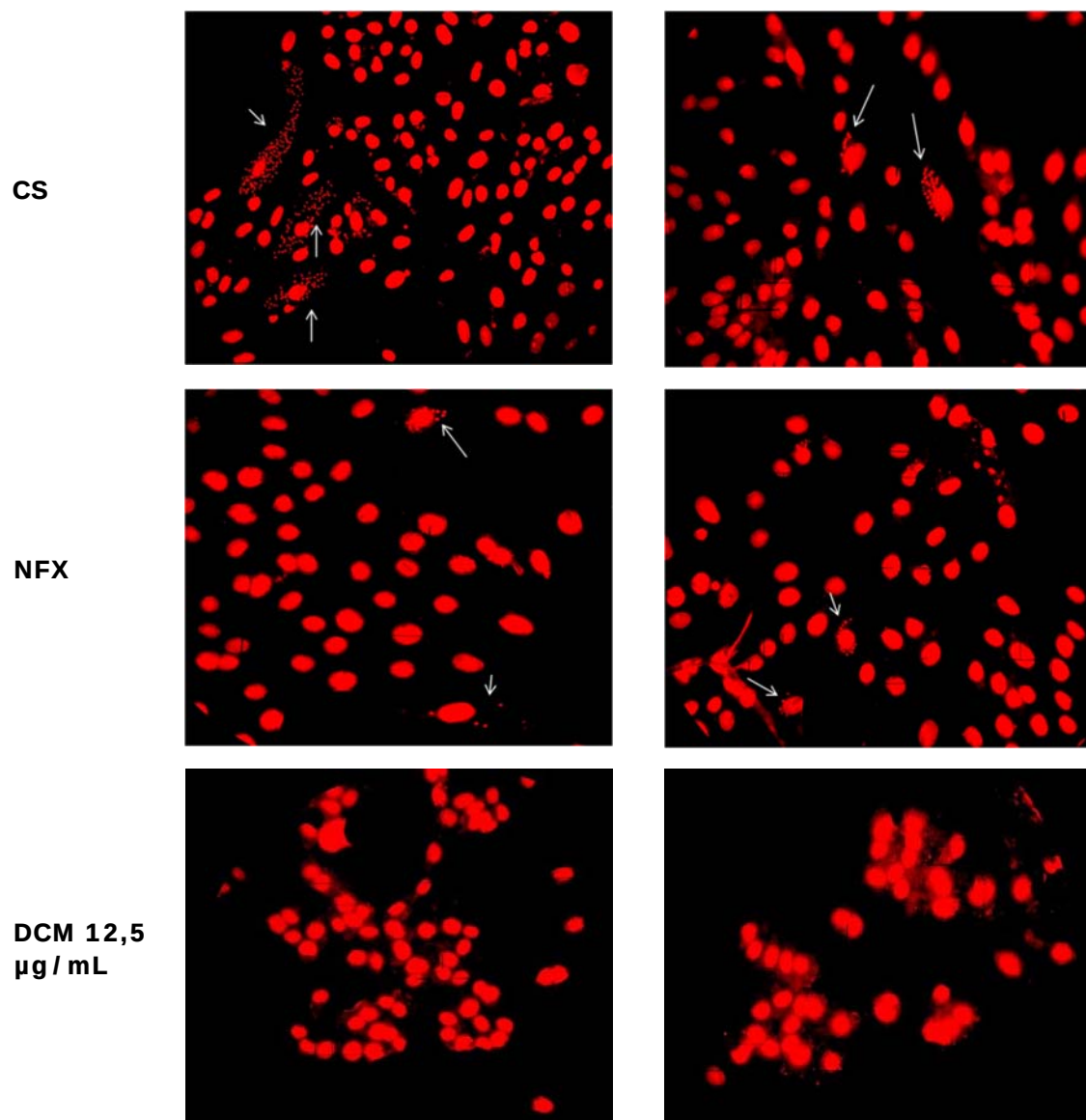


Figura N°3 A y B: Imágenes representativas de Células Vero infectadas no tratadas (C-) y tratadas con el extracto DCM en la concentración de 12,5 µg / mL además del CS y NFX durante 24 y 48 horas, respectivamente. Los amastigotes intracelulares fueron reconocidos por su ubicación en torno al núcleo de la Célula Vero® (flechas blancas). En la concentración de 12,5 ug/mL del extracto DCM se observan células y disminuye la infección respecto del control solvente.

Tabla N°1 A:

Tratamiento ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	$\bar{X}$ N° Células Totales	$\bar{X}$ N° Células Infectadas	$\bar{X}$ N° Amastigotes	$\bar{X}$ % Infección
C-	71,0	2,3	58,4	3,9
CS	78,6	2,2	87,6	3,8
NFX*	66,0	1,2	10,5	2,5
DCM 12,5*	45,4	0,2	1,7	0,5

Tabla N°1 B:

Tratamiento ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	$\bar{X}$ N° Células Totales	$\bar{X}$ N° Células Infectadas	$\bar{X}$ N° Amastigotes	$\bar{X}$ % Infección
C-	66,9	1,9	28,1	3,5
CS	98,1	1,9	26,6	2,4
NFX*	109,5	0,5	2,7	0,7
DCM 12,5*	32,8	0,1	0,1	0,1

Tabla N°1 A y B: Efecto de los extractos sobre la infección de células vero con amastigotes a las 24 y 48 horas, respectivamente. (Análisis tratamientos/control solvente, *: $p < 0,05$ Test Kruskal-Wallis: post hoc Test de Dunn). Los valores registrados corresponden al promedio de las células totales, células infectadas y número de amastigotes presentes en las muestras analizadas por tratamiento (20 muestras por cada tratamiento en cuádruplicado)

Respecto al número de amastigotes, hay una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) respecto al CS en NFX $10 \mu\text{M}$ y DCM $12,5 \text{ ug/mL}$ para ambos tiempos de exposición. Para el grado de infección, se puede observar una disminución en el porcentaje, siendo estadísticamente significativa ($p < 0,05$) respecto al CS para NFX $10\mu\text{M}$ y DCM $12,5 \text{ ug/mL}$ a las 24 y 48 horas postratamiento.

4.4 Cuantificación de DNA parasitario

Para evaluar el efecto de los extractos de la flor de Palo Negro (*Leptocarpha rivularis*) sobre la célula infectada con amastigote, se realizó la cuantificación del DNA parasitario, como se describe en el apartado 3.7.

Figura N°4

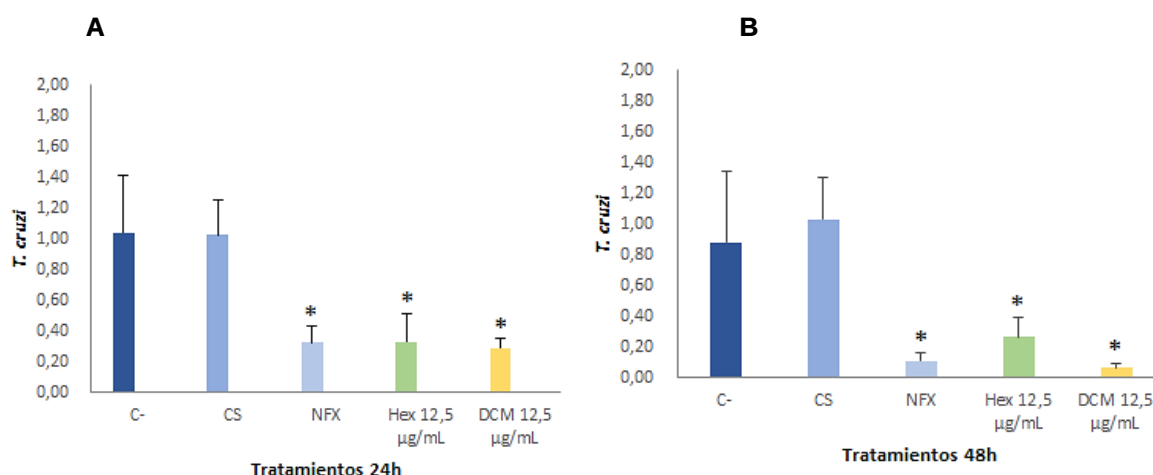


Figura N°4: Efecto de los extractos Hex y DCM sobre la carga de DNA del parásito en Células Vero ® a las 24 (A) y 48 (B) horas. Los datos son una comparación de DNA del parásito en 1 ng de DNA total aislado de células infectadas. La cuantificación en tiempo real por qPCR se realizó mediante el Método $\Delta\Delta Ct$. Los datos representan las medias y las barras de error corresponden a su respectiva desviación estándar (Análisis extractos/control solvente, *: $p < 0,05$ Test Kruskal-Wallis: post hoc Test de Dunn).

Se observa una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) del DNA del parásito, para los grupos tratados con NFX, Hex 12,5 µg/mL y DCM 12,5 µg/mL comparados con el CS, en las células tratadas por 24 horas (A). Sin embargo, en estos tres tratamientos la cantidad del DNA parasitario es similar. Por el contrario, al observar la Figura N°3B se aprecia que los tratamientos usados disminuyen la cantidad del DNA parasitario respecto al CS, siendo estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Sin embargo, los grupos tratados con NFX 10 µM y DCM 12,5 µg/mL se comportan de forma similar, diferenciándose del grupo tratado con Hex 12,5 µg/mL, 48 horas postratamiento.

5| DISCUSIÓN

Según la Organización Panamericana de Salud “*El Chagas es casi 100% curable si se trata en sus etapas iniciales con los medicamentos: Benznidazol y Nifurtimox*” (30). Sin embargo, estos dos fármacos actualmente utilizados, presentan baja eficacia en la fase crónica de la enfermedad, a su vez se reconoce que pueden causar RAM y están contraindicados durante el embarazo. A su vez la OMS, declara como prioridad de investigación para la ECh desarrollar un tratamiento capaz de eliminar el parásito de las personas infectadas (16,31,32). En Chile, la Norma General Técnica Control y Prevención de la Enfermedad de Chagas del Ministerio de Salud plantea en unos de sus objetivos, evitar la progresión de la enfermedad, mediante la disminución de la carga parasitaria de *T. cruzi* y mejorar la calidad de vida futura de los pacientes (12).

En este sentido, resulta importante el estudio de nuevos agentes tripanocidas. Así, los compuestos antichagásicos que aparecen en las investigaciones más reportadas son de origen vegetal (16,33,34). Estudios han mostrado que el extracto etanólico de *C. reinhardtii*, una microalga, es potencialmente tripanocida (16), al igual que *Podanthus mitique* una planta endémica chilena que produce lactonas sesquiterpénicas (SLs), que muestran actividad citotóxica y antiprotozoaria (17–19).

En esta investigación se analiza el efecto tripanocida de cuatro extractos de la flor de Palo Negro, una planta endémica de nuestro país que se caracteriza por la presencia de sesquiterpenos, principalmente un contenido elevado de *Leptocarpina* un tipo de SLs (22) y de la cual no hay antecedentes sobre su acción antiprotozoaria.

Cabe señalar, que la actividad tripanocida de los fármacos que se prueban afecta mayoritariamente a la forma extracelular del parásito. Lo que los hace efectivos principalmente en la fase aguda de la patología, no así en la fase crónica. Esto hace necesario que el estudio planteado haya sido evaluado en ambas formas desarrolladas en mamíferos: Amastigote (intracelular) y Tripomastigote (extracelular) (16,31).

Antes de revisar el efecto tripanocida, se aplicaron los extractos en las células hospedadoras sin infectar, para este caso Células Vero® que corresponden a células de fibroblasto de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*, ATCC® CCL-81TM) (35) en un rango de ocho concentraciones diferentes para así decidir que

concentraciones presentan menor citotoxicidad para éstas y analizar el efecto contra el amastigote, comparado con el solvente DMSO 0,1% y NFX 10 μ M (16). Posteriormente se evaluó el efecto de dichas concentraciones sobre el tripomastigote pensando que concentraciones más elevadas podrían ser citotóxicas.

Para el ensayo de viabilidad de la forma de tripomastigote, como se indica anteriormente se consideraron concentraciones intermedias que mostraron ser favorables para las Células Vero utilizando los cuatro extractos de la flor de Palo Negro. Si bien en estudios publicados previamente se especifica que el tiempo de exposición de los tripomastigotes a los extractos es de 96 horas, la investigación presentada muestra el efecto tripanocida ya a las 24 y 48 horas postratamiento. En donde, los extractos de Hex y DCM muestran mayor efecto tripanocida, siendo IC_{50} 19,4 y 41,94 μ g/mL respectivamente, a las 48 horas postratamiento, valores aceptados para productos naturales (16). Para los tripomastigotes tratados por 24 horas con los cuatro extractos, y para los tratados con los extractos AcEt y EtOH a las 48 horas el IC_{50} indica un valor superior a 50 μ g/mL dado que las concentraciones usadas son más bajas que las necesarias para reducir al 50% la viabilidad de los tripomastigotes. Respecto a la actividad anti *T. cruzi*, Obbo et al. (36) reporta que es más intensa al usar los extractos de diclorometano de *K. anthotheca* (IC_{50} 13,81 μ g/mL), *B. adoensis* (IC_{50} 2,1 μ g/mL) y *Momordica foetida* (IC_{50} 17,90 μ g/mL) y extracto de hexano de *K. anthotheca* (IC_{50} 18,57 μ g/mL), tras 24 horas postratamiento. Mientras que, Veas et al. (16) indica que las microalgas *C. reinhardtii*, *S. obliquus* y *T. suecica* presentan actividad tripanocida, eliminando casi el 90% de los tripomastigotes (<200 μ g/mL) siendo más efectivas que NFX (10 μ M), tras 96 horas postratamiento.

A su vez, estudios *in vitro* muestran el efecto tripanocida de SLs incluyendo ambrosina (IC_{50} = 67,1 μ M), incomptina B (IC_{50} = 123,7 μ M), y glaucolido (IC_{50} = 215,1 μ M), (37) además de dehidroleucodina (10,2 μ M) y helenelina (3,8 μ M) que tiene efecto sobre la forma tripomastigote (16,38). También, SLs aisladas de extractos de hojas y flores *Vernonanthura nebularum* y *Elephantopus mollis*, también han mostrado mejor acción que NFX (39). Las lactonas sesquiterpénicas eupatoriopirina, estafietina, eupahaconenina B y minimolida se han aislado de *S. maimarensis*, *S. alpina*, *S. gilliesi* y *M. minima* respectivamente, todas especies de astearáceas argentinas. Siendo la eupatoriopirina la más activa frente a amastigotes y tripomastigotes (40). Esto hace

necesario, que la investigación planteada continúe hacia la evaluación del efecto tripanocida de la SLs *Leptocarpina* presente en los extractos de flor de Palo Negro (22), de forma aislada.

De los cuatro extractos de flor de Palo negro (Hex, DCM, AcEt y EtOH) usados en la investigación, sólo los extractos Hex y DCM se usaron para evaluar la viabilidad de amastigotes de *T. cruzi*, ya que presentaron mejor perfil de acción tripanocida pese a que hay concentraciones que afectan la viabilidad de Células Vero. Las concentraciones usadas 25 y 18,75 µg/mL para ambos extractos resultaron ser citotóxicas para las células infectadas con *T. cruzi*, al igual que el extracto Hex en la concentración 12,5 µg/mL a las 24 y 48 horas postratamiento, ante lo observado al usar la Tinción con BrEt. El extracto DCM (12,5 µg/mL) redujo el número de parásitos intracelulares de un promedio de 87,6 a 1,7 amastigotes por célula tras 24 horas postratamiento, mientras que tras 48 horas disminuyó de 26,6 a 0,1 amastigotes por célula. El extracto etanólico de *C. reinhardtii* y el extracto metanólico de *S. obliquus*, presentado por Veas et al. reduce el número de parásitos intracelulares de un promedio de 4,38 a 3,0 y 2,80 amastigotes por célula, respectivamente (16). Lo que muestra que los resultados obtenidos al usar los extractos de flor de Palo Negro parecen ser más efectivos.

El porcentaje de infección también disminuyó tras 24 horas postratamiento con DCM (12,5 µg/mL) de 3,8% a 0,5%, mientras que luego de 48 horas se redujo de 2,4% a 0,1%, siendo más efectivo que NFX (2,5% y 0,7%, tras 24 y 48 horas postratamiento respectivamente). El estudio realizado por Veas et al. con extractos de microalgas señala que los extractos etanólicos de *C. reinhardtii* y *T. suecica* disminuyen el porcentaje de células infectadas de 9,11% a 3,54% y 4,54%, respectivamente. Al igual que los extractos metanólicos de *T. suecica* y *S. obliquus* que reducen el porcentaje de infección a 4,30% y 4,69% respectivamente (16), es así que en base a estos datos los resultados obtenidos parecen ser más efectivos.

Al cuantificar el DNA parasitario en células infectadas y tratadas con HEX y DCM (12,5 µg/mL) estos demuestran actividad citotóxica contra amastigote, disminuyendo la cantidad de DNA de *T. cruzi* a 32% y 26% tras 24 y 48 horas postratamiento respectivamente, con extracto Hex. A su vez, en las células tratadas con DCM, la carga de DNA de amastigotes disminuye a 29% y 6% tras 24 y 48 postratamiento

respectivamente. Siendo comparable con la acción de NFX que disminuye a 32% y 10%, luego de 24 y 48 horas postratamiento.

La diferencia entre lo observado con las técnicas usadas (Tinción con BrEt y qPCR) dan la oportunidad de continuar con la investigación, indagando en el mecanismo de muerte celular que se desencadena en la forma intracelular de *T. cruzi*, frente al tratamiento con los extractos de flor de Palo Negro, considerando que Montenegro et al. plantea que estos extractos funcionan mediante la activación de caspasa inducida por *Leptocarpina* activando la vía apoptótica en líneas celulares tumorales (22).

Finalmente, el estudio realizado es una herramienta promisorio en el tratamiento de la Enfermedad de Chagas, dado que los bajos efectos de los fármacos anti *T. cruzi* convencionales se deben, en alguna medida, a la baja eficacia contra las formas intracelulares del parásito (16).

6| CONCLUSIONES

- Los extractos de Hexano y Diclorometano de flor de Palo Negro muestran mejor perfil tripanocida sobre la forma Tripomastigote de *T. cruzi*.
- El extracto de Diclorometano en la concentración 12,5 µg/mL presenta acción tripanocida sobre la forma amastigote de *T. cruzi*, sin ser citotóxico para la célula hospedadora disminuyendo el porcentaje de infección.
- El extracto de Diclorometano en la concentración 12,5 µg/mL, disminuye la cantidad de DNA parasitario en Células Vero®.

7 | PROYECCIONES

- Evaluar el efecto tripanocida del Extracto AcEt sobre la forma amastigote.
- Evaluar el efecto tripanocida de los cuatro extractos de la flor de Palo Negro, en concentraciones $\leq 6,25 \mu\text{g/mL}$
- Analizar el/los tipo/s de mecanismos de muerte celular que se activa en el parásito, tanto en su forma amastigote como tripomastigote, al exponerlo a los extractos usados.
- Estudiar el efecto tripanocida de fármacos y/o tratamientos naturales combinados sobre el parásito en su forma intra y extracelular.

BIBLIOGRAFÍA

1. [PDF] Guía de Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de la Enfermedad de Chagas - Free Download PDF [Internet]. [citado 11 de abril de 2022]. Disponible en: <https://silo.tips/download/guia-de-diagnostico-tratamiento-y-prevencion-de-la-enfermedad-de-chagas>
2. Duffy T. Desarrollo y aplicación de estrategias de PCR para la genotificación y cuantificación de *Trypanosoma cruzi*. [Buenos Aires, Argentina]: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.; 2010.
3. Ceballos LA. CICLO SILVESTRE DE TRANSMISIÓN DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN EL NOROESTE DE ARGENTINA.
4. Prevention CC for DC and. CDC - Chagas Disease - Epidemiology & Risk Factors [Internet]. 2019 [citado 30 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>
5. Canals M, González C, Canals L, Canals A, Cáceres D, Alvarado S, et al. ¿Qué dicen los números de la evolución temporal de la enfermedad de Chagas? Revista chilena de infectología. abril de 2017;34(2):120-7.
6. Lorca H M, García C A, Bahamonde M MI, Fritz M A, Tassara O R. Certificación serológica de la interrupción de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en Chile. Revista médica de Chile. marzo de 2001;129(3):264-9.
7. Enfermedad de Chagas e Inmunosupresión Decálogo para la Prevención, el Diagnóstico y el Tratamiento. [Internet]. [citado 11 de abril de 2022]. Disponible en: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/54561/OPSCDEVT210008_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y
8. Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. Mem Inst Oswaldo Cruz. 30 de octubre de 2007;102 Suppl 1:113-22.
9. Schenone H, Villarroel F, Rojas A, Alfaro E. Biological and ecological factors in the epidemiology of Chagas' disease in Chile. Boletín chileno de parasitología [Internet]. 1980 [citado 11 de abril de 2022]; Disponible en: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Biological+and+ecological+factors+in+the+epidemiology+of+Chagas%27+disease+in+Chile&author=Schenone%2C+H.&publication_year=1980
10. Apt W, Zulantay I, Solari A, Ortiz S, Oddo D, Corral G, et al. Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* in the Province of Choapa, IV Region, Chile: Preliminary Report (2005-2008). Biological Research. 2010;43(3):269-74.
11. Pinto PL, Amato Neto V, do Nascimento SA, de Souza HB, Miyamoto A, Moreira AA, et al. [Viability of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane juice]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1990;32(5):325-7.

12. Norma General Técnica Control y Prevención Nacional de la Enfermedad de Chagas [Internet]. [citado 28 de marzo de 2023]. Disponible en: https://www.ispch.cl/sites/default/files/normativa_biomedico/Norma%20T%C3%A9cnica%20Chagas.pdf
13. Fuentes B R, Maturana A M, de la Cruz M R. Eficacia de nifurtimox para el tratamiento de pacientes con enfermedad de Chagas crónica. *Revista chilena de infectología*. febrero de 2012;29(1):82-6.
14. Scarim CB, Jornada DH, Chelucci RC, de Almeida L, Dos Santos JL, Chung MC. Current advances in drug discovery for Chagas disease. *Eur J Med Chem*. 15 de julio de 2018;155:824-38.
15. Carlier Y, Altcheh J, Angheben A, Freilij H, Luquetti AO, Schijman AG, et al. Congenital Chagas disease: Updated recommendations for prevention, diagnosis, treatment, and follow-up of newborns and siblings, girls, women of childbearing age, and pregnant women. *PLoS Negl Trop Dis*. octubre de 2019;13(10):e0007694.
16. Veas R, Rojas-Pirela M, Castillo C, Olea-Azar C, Moncada M, Ulloa P, et al. Microalgae extracts: Potential anti-Trypanosoma cruzi agents? *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 1 de julio de 2020;127:110178.
17. Hoeneisen M, Sicva M, Bohlmann F. Sesquiterpene lactones of Podanthus mitiqui. *Phytochemistry*. 1 de enero de 1980;19(12):2765-6.
18. Bautista E, Calzada F, Yepez-Mulia L, Chavez-Soto M, Ortega A. Incomptines C and D, two heliangolides from Decachaeta incompta and their antiprotozoal activity. *Planta Med*. octubre de 2012;78(15):1698-701.
19. Bombaça ACS, Dossow DV, Barbosa JMC, Paz C, Burgos V, Menna-Barreto RFS. Trypanocidal Activity of Natural Sesquiterpenoids Involves Mitochondrial Dysfunction, ROS Production and Autophagic Phenotype in Trypanosomacruzi. *Molecules*. 28 de octubre de 2018;23(11):E2800.
20. Kreuger MRO, Grootjans S, Biavatti MW, Vandenabeele P, D'Herde K. Sesquiterpene lactones as drugs with multiple targets in cancer treatment: focus on parthenolide. *Anticancer Drugs*. octubre de 2012;23(9):883-96.
21. Modzelewska A, Sur S, Kumar SK, Khan SR. Sesquiterpenes: natural products that decrease cancer growth. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. septiembre de 2005;5(5):477-99.
22. Montenegro I, Moreira J, Ramírez I, Dorta F, Sánchez E, Alfaro JF, et al. Chemical Composition, Antioxidant and Anticancer Activities of Leptocarpha rivularis DC Flower Extracts. *Molecules*. 25 de diciembre de 2020;26(1):E67.
23. Martínez R, Kesternich V, Carrasco H, Álvarez-Contreras C, Montenegro C, Ugarte R, et al. Synthesis and conformational analysis of leptocarpin derivatives. Influence of modification of the oxirane ring on leptocarpin's cytotoxic activity. *Journal of the*

Chilean Chemical Society. diciembre de 2006;51(4):1010-4.

24. Liempi A, Castillo C, Cerda M, Droguett D, Duaso J, Barahona K, et al. Trypanosoma cruzi infectivity assessment in "in vitro" culture systems by automated cell counting. Acta Tropica. marzo de 2015;143:47-50.
25. Contreras VT, Araújo-Jorge TC de, Bonaldo MC, Thomaz N, Barbosa HS, Meirelles M de NSL de, et al. Biological aspects of the DM28C clone of Trypanosoma cruzi after metacylogenesis in chemically defined media. Mem Inst Oswaldo Cruz. marzo de 1988;83:123-33.
26. Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, et al. Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of Trypanosoma cruzi satellite DNA in blood samples. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(1):e2000.
27. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, et al. Development of a real-time PCR assay for Trypanosoma cruzi detection in blood samples. Acta Trop. septiembre de 2007;103(3):195-200.
28. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of Trypanosoma cruzi DNA in blood samples from Chagas disease patients. PLoS Negl Trop Dis. 11 de enero de 2011;5(1):e931.
29. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. Methods. diciembre de 2001;25(4):402-8.
30. Enfermedad de Chagas - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. [citado 3 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>
31. Kratz JM. Drug discovery for chagas disease: A viewpoint. Acta Trop. octubre de 2019;198:105107.
32. World Health Organization y TDR Disease Reference Group on chagas Disease - 2012 - Research priorities for Chagas disease, human Afri.pdf [Internet]. [citado 3 de abril de 2023]. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/77472/WHO_TRS_975_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
33. Muñoz OM, Maya JD, Ferreira J, Christen P, San Martin J, López-Muñoz R, et al. Medicinal plants of Chile: evaluation of their anti-Trypanosoma cruzi activity. Z Naturforsch C J Biosci. 2013;68(5-6):198-202.
34. Elso OG, Puente V, Barrera P, Sosa-Escudero MA, Sülsen VP, Lombardo ME. Mode of action of the sesquiterpene lactones eupatoriopicrin and estafietin on Trypanosoma cruzi. Phytomedicine. febrero de 2022;96:153900.

35. Rojo G, Castillo C, Duaso J, Liempi A, Droguett D, Galanti N, et al. Toxic and therapeutic effects of Nifurtimox and Benznidazol on *Trypanosoma cruzi* ex vivo infection of human placental chorionic villi explants. *Acta Tropica*. 1 de abril de 2014;132:112-8.
36. Obbo CJD, Kariuki ST, Gathirwa JW, Olaho-Mukani W, Cheplogoi PK, Mwangi EM. In vitro antiplasmodial, antitrypanosomal and antileishmanial activities of selected medicinal plants from Ugandan flora: Refocusing into multi-component potentials. *J Ethnopharmacol*. 30 de enero de 2019;229:127-36.
37. Sepúlveda-Robles O, Espinoza-Gutiérrez B, Gomez-Verjan JC, Guzmán-Gutiérrez SL, De Ita M, Silva-Miranda M, et al. Trypanocidal and toxicological assessment in vitro and in silico of three sesquiterpene lactones from Asteraceae plant species. *Food and Chemical Toxicology*. 1 de marzo de 2019;125:55-61.
38. Jimenez V, Kemmerling U, Paredes R, Maya JD, Sosa MA, Galanti N. Natural sesquiterpene lactones induce programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: a new therapeutic target? *Phytomedicine*. 25 de septiembre de 2014;21(11):1411-8.
39. Maciel Diogo G, Andrade JS, Sales Junior PA, Maria Fonseca Murta S, Dos Santos VMR, Taylor JG. Trypanocidal Activity of Flavanone Derivatives. *Molecules*. 17 de enero de 2020;25(2):397.
40. Elso OG, Bivona AE, Sanchez Alberti A, Cerny N, Fabian L, Morales C, et al. Trypanocidal Activity of Four Sesquiterpene Lactones Isolated from Asteraceae Species. *Molecules*. 25 de abril de 2020;25(9):2014.