TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLOGICAS

Análisis de la variabilidad intraespecífica en *Trypanosoma cruzi*: susceptibilidad a la combinación de benznidazol y clomipramina durante la infección aguda experimental

por

Bióloga Mariana Strauss

Director: Dr. Héctor Walter Rivarola

Centro de Estudios e Investigación de la Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis. Cátedra de Física Biomédica, Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (INICSA)-CONICET-UNC

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina

2016

COMISIÓN ASESORA

……Nombre y Apellido……., ……Lugar de Trabajo…….

……Nombre y Apellido……., ……Lugar de Trabajo……

……Nombre y Apellido……., ……Lugar de Trabajo……

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma: …….. Aclaración: …….

Firma: …….. Aclaración: …….

Firma: …….. Aclaración: …….

Al Doctor Walter Rivarola, director y guía de este trabajo, cuyo constante asesoramiento, apoyo, dedicación y amistad fueron de imponderable valor en la realización de la presente tesis.

A la Doctora Patricia Paglini, quien me acompañó durante esta tesis, brindándome no solo los conocimientos académicos, sino también el ejemplo de constancia, perseverancia y dedicación al trabajo.

A las Doctoras Silvina Lo Presti, Carolina Bazán y Alejandra Báez por su colaboración en la realización de la tesis, amistad y apoyo; y por su agradable y divertida compañía.

A las Doctoras Noemí Miler, Vilma Campana y Mónica Moya por su apoyo, amistad y alegría a lo largo de este proceso.

A todo el personal de las Cátedras de Física Biomédica y de Fisiología Humana de la Facultad de Ciencias Médicas por la compañía y apoyo diarios.

A José Bustamante, por su incondicional apoyo, por su amor, paciencia y por compartir esta etapa tan importante de mi vida, estando siempre a mi lado y haciéndome muy feliz.

A mis compañeras, compañeros, amigas y amigos por todos los momentos compartidos y la alegría de estar trabajando juntos.

A todos aquellos que de alguna manera hayan colaborado para hacer posible este trabajo.

A mi familia por su constante aliento y compañía a lo largo de la vida…

… a todos ustedes MUCHAS GRACIAS!!

Publicaciones derivadas de la tesis:

Strauss M, da Silva Rodrigues JH, Lo Presti MS, Bazán PC, Baez AL, García MC, Miler NC, Cremonezzi DC, Jimenez Kairuz AF, Paglini-Oliva PA, Nakamura CV, Rivarola HW. **2016**. Benznidazole and clomipramine in Chagas Disease: an *in vitro* and *in vivo* drug combination analysis. Experimental and Molecular Pathology. Aceptado para su publicación.

Bazán PC, Lo Presti MS, Strauss M, Báez AL, Miler N, Paglini PA, Rivarola HW. **2016**. Quantitative PCR and unconventional serological methods to evaluate clomipramine treatment effectiveness in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Experimental and Molecular Pathology 101:274-280.

da Silva Rodrigues JH, Stein J, Strauss M, Rivarola HW, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Duszenko M. **2016**. Clomipramine kills *Trypanosoma brucei* by apoptosis. International Journal of Medical Microbiology 306:196-205.

Lozano E, Strauss M, Spina R, Cifuente D, Tonn C, Rivarola HW, Sosa MA. **2016**. The *in vivo* trypanocidal effect of the diterpene 5-epi-icetexone obtained from Salvia gilliesii. Parasitology International 65(1):23-6.

Lo Presti MS, Bazán PC, Strauss M, Baez AL, Rivarola HW, Paglini-Oliva PA. **2015**. Trypanothione reductase inhibitors: Overview of the actionof thioridazine in different stages of Chagas disease. Acta Tropica 145: 79-87.

Lo Presti MS, Esteves B, Moya D, Bazán PC, Strauss M, Baez AL, Pizzi R, Quispe Ricalde A, Valladares B, Rivarola HW, Paglini-Oliva PA. **2014**. Circulating *Trypanosoma cruzi* populations differ from those found in the tissues of the same host during acute experimental infection. Acta Tropica 133: 98-109.

Strauss M, Lo Presti MS, Bazán PC, Baez AL, Fauro R, Esteves B, Sanchez Negrete O, Cremonezzi D, Paglini-Oliva PA, Rivarola HW. **2013**. Clomipramine and benznidazole association for the treatment of acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Parasitology International 62: 293-299.

Fauro R, Lo Presti S, Bazan C, Baez A, Strauss M, Triquell F, Cremonezzi D, Sanchez Negrete O, Camino Willhuber G, Paglini-Oliva P, Rivarola HW. **2013**. Use of clomipramine as chemotherapy of the chronic phase of Chagas disease. Parasitology 140: 917-9.

Contenido Página

Abreviaturas 1

Resumen 3

Abstract 4

1. Introducción 5

1.1 Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi* 5
- Clasificacióntaxonómica 5
- Estadios morfológicos 6
- Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi* 7
- Origen del *Trypanosoma cruzi* y clasificación actual 8
- Distribución de las UDTs 11

1.2 Detección y tipificación de *T. cruzi* mediante métodos de amplificación génica 13
- Reacción en cadena de la polimerasa 13
- PCR para la detección de *T. cruzi* 14

1.3 Transmisión 15
- Transmisión vectorial 15
- Transmisión transfusional 16
- Transmisión connatal 16
- Transmisión oral 16
- Trasplante de órganos 17
- Otras vías de infección 17

1.4 La enfermedad de Chagas 17
- Etapas de la infección 18
- Modelo Murino de enfermedad de Chagas 19

1.5 Tratamiento Quimioterapéutico 20
- Benznidazol 21
- Blancos Terapéuticos 22
  - Biosíntesis de esteroles de membrana 22

Enzimas glicolíticas 22
Acidocalcisomas 23
Transsialidasa 23
Cisteín Proteasas 23
Tripanotiona reductasa 25
1.6 Fármacos tricíclicos 26
Clomipramina: Inhibidor de la Tripanotiona reductasa 26
1.7 Combinación de fármacos para el tratamiento antiparasitario 29

2. Objetivos 30

3. Materiales y Métodos 31

3.1 Análisis de drogas *in vitro* 31
3.2 Análisis tripanocida *in vivo* 34
3.3 Estudio de conducta 37
3.4 Detección de *T. cruzi* y tipificación molecular del linaje 40
Determinación de la presencia del *T. cruzi* en sangre, músculo esquelético y cardíaco de animales infectados y tratados, por qPCR 44
Detección de los linajes TcII y TcVI en las muestras de sangre, músculo esquelético y cardíaco de animales infectados y tratados 45
3.5 Análisis estadístico 49

4. Resultados 50

4.1 Análisis de drogas *in vitro* 50
Citotoxicidad 50
Análisis de la actividad de las drogas 51
Análisis de combinación de drogas 51
4.2 Análisis tripanocida *in vivo* 52
Ratones infectados con la cepa Y de *T. cruzi*
Parasitemia (recuento en cámara de Neubauer y qPCR) 53
Sobrevida 54
Ratones infectados con aislamientos naturales de *T. cruzi*

Parasitemia (recuento en cámara de Neubauer y qPCR) 56
Sobrevida 60
Histopatología 61
Hígado, riñón e intestino 61
Músculo esquelético y cardíaco 64
Recuento de nidos de amastigotes 66
4.3 Estudio de conducta 70
4.4 Determinación de la eficacia del tratamiento mediante Análisis de Componentes Principales 71
4.5 Detección de *T. cruzi* y tipificación molecular del linaje presente en cada órgano mediante PCR 74
4.6 Tipificación molecular del linaje de los grupos tratados, mediante qPCR 76

5. Discusión 80

5.1 Eficacia *in vitro* de la combinación de drogas tripanocidas 81
5.2 Combinación de fármacos para el tratamiento antiparasitario de la enfermedad de Chagas *in vivo* 83
5.3 Evaluación del efecto ansiolítico de clomipramina mediante la prueba de laberinto elevado en cruz (Plus Maze) 91
5.4 Tipificación molecular de los linajes presentes en los aislamientos naturales de *T. cruzi* utilizados en el presente trabajo 93

6. Conclusiones 101

7. Bibliografía 103

Abreviaturas

aa – amastigotes

ACP – Análisis de Componentes Principales

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ADNk – ADN del kinetoplasto de *T. cruzi*

ADNr – ADN ribosomal

ANOVA – Análisis de la Varianza

BA – Brazos Abiertos

BC – Brazos Cerrados

Bz – Benznidazol

CC_{50} – concentración citotóxica media

CI – Índice de Combinación (Combination Index)

Clo – Clomipramina

CP – Componente Principal

Ct – Ciclo Umbral (Cycle threshold)

d.p.i – días post infección

DFMO – D,L-a- difluoromethylornithine

DMSO – dimethyl sulfóxido

EC_{50} – concentración efectiva media

FDA – Administración de Medicamentos y Alimentos (Food and Drug Administration)

GR – Glutatión Reductasa

GSSG – Glutatión oxidasa

IC_{50} – concentración inhibitoria media

IFN-γ – Interferón gamma

iNOS – óxido nítrico sintetasa inducible

INT – Infectado No Tratado

LC – Locus Cerúleo

MANOVA – Análisis Multivariado de la Varianza

MC – Músculo Cardíaco

ME – Músculo Esquelético

MTQ-PCR – Ensayo Multiplex Real-Time PCR

MTT – bromuro de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolio

NI-NT – No Infectado y No Tratado

OMS – Organización Mundial de la Salud

PBS – Buffer fosfato salino (Phosphate-Buffered Saline)

PC – Plataforma Central

PCR – Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

qPCR – Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (cuantitative Polymerase Chain Reaction)

RAPD – Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (Random Amplification of Polymorphic DNA)

SL-IR – región intergénica del miniexón (Spliced-Leader)

$T(S)_2$ – Tripanotiona forma disulfuro (oxidada)

$T(SH)_2$ – Tripanotiona forma dihidro sulfuro (reducida)

Tm – temperatura de melting, de disociación o de separación de las hebras

TR – Tripanotiona Reductasa

UDTs – Unidades Discretas de Tipificación

La especie *Trypanosoma cruzi*, causante de la enfermedad de Chagas, está compuesta por diversas subpoblaciones que exhiben un alto grado de polimorfismo cuando son analizadas por métodos bioquímicos y moleculares, presentando distintas características biológicas y comportamiento frente a la acción de fármacos. Estas subpoblaciones, han sido agrupadas en seis unidades discretas de tipificación (UDT) o linajes denominados TcI - VI. La variabilidad genética del parásito en un mismo huésped podría presentar un tropismo diferencial a los distintos órganos del mismo. En el presente trabajo se determinaron los linajes presentes en tres aislamientos de *T. cruzi* (dos obtenidos de individuos con infección con *T. cruzi* congénito, Casibla y Lucky; y uno a partir de un *Triatoma infestans* de Santiago del Estero, SGO-Z12). Como así también se evaluó, el efecto de la combinación de fármacos (benznidazol [Bz] y clomipramina [Clo]) *in vitro* e *in vivo* sobre los linajes de *T. cruzi* pertenecientes a los 3 aislamientos. Se realizaron diferentes métodos de tipificación previamente descriptos, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR en tiempo real y enzimas de restricción. Para determinar el efecto combinado de las drogas *in vitro* se incubaron tripomastigotes de *T. cruzi* pertenecientes a los 3 aislamientos, administrando las drogas en forma individual y asociadas. Para el estudio *in vivo* se infectaron 108 ratones separados en tres grupos con cada aislamiento y se los dividió en distintos esquemas de tratamiento que incluyeron la combinación de Bz+Clo. La eficacia de la fármacoterapia se evaluó a través de la sobrevida de los ratones hasta los 35 días post infección, cuantificación de parásitos en sangre y tipificación de los linajes presentes en sangre, músculo cardíaco y esquelético. Se determinó que los tres aislamientos naturales de *T. cruzi* están compuestos por una mezcla de linajes TcII y TcVI. La distribución de los linajes en los tejidos infectados no fue homogénea, encontrándose variaciones entre los animales analizados. La combinación de Bz+Clo *in vitro*, presentó un efecto sinérgico sobre los tres aislamientos de *T. cruzi*. El tratamiento *in vivo* con Bz+Clo disminuyó la carga parasitaria en relación al grupo infectado no tratado ($p<0,05$), presentando menos efectos adversos (alteraciones histológicas en hígado y riñón) que aquellos tratados con Bz. Con respecto al efecto del tratamiento sobre la distribución de los linajes de *T. cruzi*, se observó diferente sensibilidad de los mismos, ya que algunos no fueron detectados. En base a los resultados obtenidos, se reafirma la complejidad en el abordaje del tratamiento de la enfermedad de Chagas. Nuestros resultados demuestran que para valorar la efectividad de la terapéutica se debería tener en cuenta la variabilidad que posee el *T. cruzi* y sus diferentes susceptibilidades frente al tratamiento. Por otro lado, la combinación de fármacos con diferentes mecanismos de acción y acción sinérgica, podría provocar menos efectos adversos en el huésped al disminuir las dosis y a su vez aumentar su efectividad.

Chagas disease is an infection caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *T. cruzi* strains are formed by complex multiclonal populations that differ in their genetic and biological characteristics (virulence, growth rate, pathogenicity, tissue tropism, and sensitivity to antitrypanocidal drugs, among others) and in their behavior in the vertebrate host. Based on different molecular markers, *T. cruzi* is currently grouped into six genetic lineages or Discrete Typing Units (DTUs): TcI to TcVI. Natural infections are usually constituted by multiple clones with differential tropism to host tissues, which can vary throughout the infection. In the present study we determined the genetic lineages present in three *T. cruzi* natural isolates (two obtained from congenitally infected patients, Casibla y Lucky, and one from a *Triatoma infestans* from Santiago del Estero, Argentina, SGO-Z12) and their distribution in blood, cardiac and skeletal muscles from infected mice. Furthermore, we evaluated the effect of a drug combination (benznidazol [Bz] and clomipramine [Clo]) *in vitro* and *in vivo* upon parasitic load and tissue distribution. Molecular characterization of DTUs was performed using polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR and restriction enzymes. To determine the *in vitro* combined effect of drugs, trypomastigotes of *T. cruzi* from the three isolates were incubated with the drugs individually or associated. For the *in vivo* study, 108 mice were divided into three groups infected with each isolate and assigned to the different treatment schedules, which included the combination of Bz+Clo. The effectiveness of chemotherapy was evaluated through survival by day 35 post infection, parasitic load and determination of the DTUs present in blood and cardiac and skeletal muscles. We determined that the natural isolates used in the present work consisted of a mixture of lineages: TcII and TcVI. The distribution of isolates in infected tissues was not homogeneous, with variations between the animals under study. The combination of Bz+Clo *in vitro*, showed a synergistic effect upon the three isolates of *T. cruzi*. *In vivo* treatment with Bz+Clo decreased the parasitic load in relation to the infected untreated group ($p<0.05$); these animals showed fewer adverse effects (histological alterations in liver and kidney) than those treated with Bz. Regarding the effect of the treatment upon the distribution of the different *T. cruzi* lineages, different sensitivity was observed, as some lineages were not detected after the treatments while others remained. Based on the results, complexity is reaffirmed in the approach to Chagas disease treatment. To assess therapy effectiveness, *T. cruzi* variability and the different susceptibilities to treatment should be taken into account. Given this, the combination of drugs with different mechanisms of action may increase their effectiveness and, in turn, cause less adverse effects in the host, since they are used at lower doses.

Introducción

1. Introducción

La enfermedad de Chagas, también llamada tripanosomiasis americana, es una enfermedad potencialmente mortal causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi*. Se encuentra en zonas endémicas de 21 países de América Latina, donde se transmite a los seres humanos principalmente por las heces de insectos triatomíneos. Se calcula que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas, la mayoría de ellas en América Latina, donde la enfermedad de Chagas. La enfermedad lleva el nombre de Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas, médico brasileño que la descubrió en 1909 (OMS, 2016).

1.1 Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*

Clasificación taxonómica (Gallego Berenguer, 1998)

Phylum Sarcomastigophora
Subphylum Mastigophora
Clase Zoomastigophorea
Orden Kinetoplastida
Suborden Trypanosomatina
Familia Tripanosomatidae
Género *Trypanosoma*
Subgénero *Schyzotrypanum*
Especie *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909).

Los Kinetoplastida son organismos con 1 o 2 flagelos que se originan de una abertura conocida como bolsa flagelar. Normalmente contienen una estructura prominente y paraflagelar conocida como kinetoplasto, que corresponde a una condensación de ADN localizado en el interior de una única mitocondria que esta ramificada por todo el cuerpo del parásito. Este orden incluye a los patógenos: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania*.

Dentro de la familia Trypanosomatidae, el género *Trypanosoma* se caracteriza por utilizar dos huéspedes, uno vertebrado y otro invertebrado, para completar su ciclo de vida;

es uno de los géneros más importantes de la familia por incluir una serie de especies que ocasionan enfermedades en humanos, como *T. cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas y *T. brucei gambiensi* y *T. brucei rhodesiense*, causantes de la enfermedad del sueño (Gallego Berenguer, 1998).

El género *Trypanosoma* presenta particularidades tales como: organelas características (glicosomas, acidocalcisomas y reservosomas), genomas: nuclear y mitocondrial formado por maxicírculos y minicírculos. Sus genes salvo excepciones, no presentan intrones, no realizan cis-splicing, sino trans-splicing, no presentan promotores típicos, la transcripción es policistrónica y no tienen señales de poliadenilación universales; además son todos parásitos y presentan diferentes estadios de desarrollo durante su ciclo de vida (Kramer, 2012).

Estadios morfológicos

El *T. cruzi* es un parásito unicelular que alterna su vida entre dos hospedadores multicelulares, uno invertebrado y otro vertebrado. En función de la forma general de las células (piriforme, alargada o esférica), la posición relativa entre el núcleo y el kinetoplasto (anterior, lateral o posterior), la manera de salida del flagelo (central o lateral). Se definen 3 estadios para los tripanosomátidos (Figura 1) (Guzmán-Marín y col., 1999; Teixeira y col., 2011):

- **Epimastigote**: el kinetoplasto se encuentra localizado en la parte media del organismo justo por delante del núcleo. El flagelo emerge de la parte media del parásito arrastrando la membrana citoplasmática en un corto trayecto, dando la imagen de una membrana ondulante corta que se libera por el extremo anterior. Este estadio se desarrolla en el vector y en cultivos axénicos y constituye una de las formas proliferativas del *T. cruzi***.**
- **Tripomastigote:** forma elongada con el kinetoplasto situado por detrás del núcleo; el flagelo nace en su proximidad y emerge por un costado del cuerpo, se libera por el extremo anterior creando la imagen de una membrana ondulante de importante extensión. Este estadio está presente en la circulación del mamífero (tripomastigote circulante), en la ampolla rectal del vector (tripomastigote metacíclico) y en cultivo de células. La forma tripomastigota carece de capacidad replicativa.
- **Amastigote:** forma esférica u ovalada que carece de flagelo libre y por lo tanto de movimiento; estadio de localización intracelular y replicativo por división binaria simple en el mamífero y en cultivo de células de mamífero.

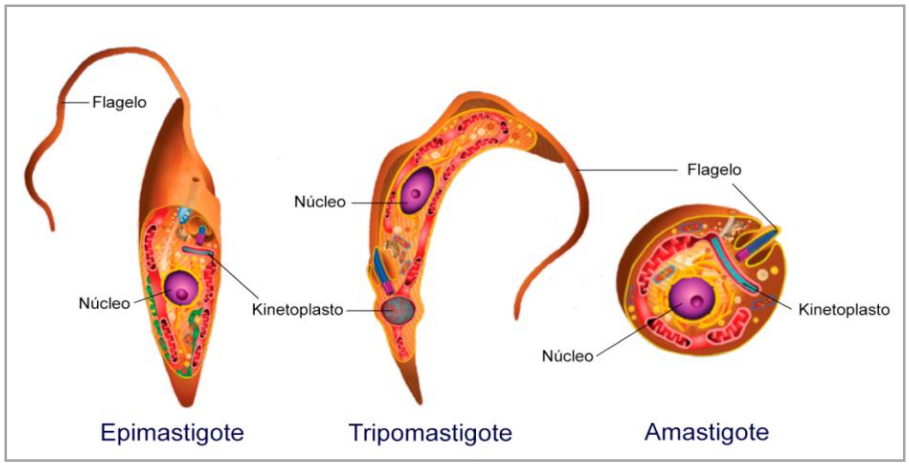


Figura 1: Principales tipos morfológicos de *T. cruzi* (Teixeira y col., 2011).

Ciclo de vida del *T. cruzi*

La infección es transmitida por triatominos a más de 100 diferentes especies de mamíferos salvajes y domésticos. El parásito, bajo la forma de tripomastigote metacíclico infectante, es depositado por el vector sobre la piel o mucosas del ser humano u otros mamíferos junto con la materia fecal.

El tripomastigote infectante atraviesa la piel por pequeñas lesiones cutáneas penetrando en las células subyacentes. Dentro de ellas pierde el flagelo y adopta la forma de amastigote. Éstos se duplican y dan lugar a tripomastigotes que se liberan a los espacios intercelulares alcanzando el torrente sanguíneo, para luego penetrar en otras células donde comienzan de nuevo el ciclo (Figura 2).

Los vectores triatominos son hemípteros de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, de aproximadamente 6 cm de largo, que se alimentan de sangre durante la noche. Se infectan al picar a un animal infectado, ingiriendo así al parásito (en su estadio de tripomastigote). En la luz del intestino medio del insecto, el parásito adopta la forma de epimastigote. En la porción anterior del intestino posterior se adhiere al epitelio y se multiplica para luego caer a la luz intestinal adoptando la forma de epimastigotes libres; y allí evolucionan a tripomastigotes metacíclicos infectantes que se localizan en la ampolla rectal (Atías y Negheme, 1991).

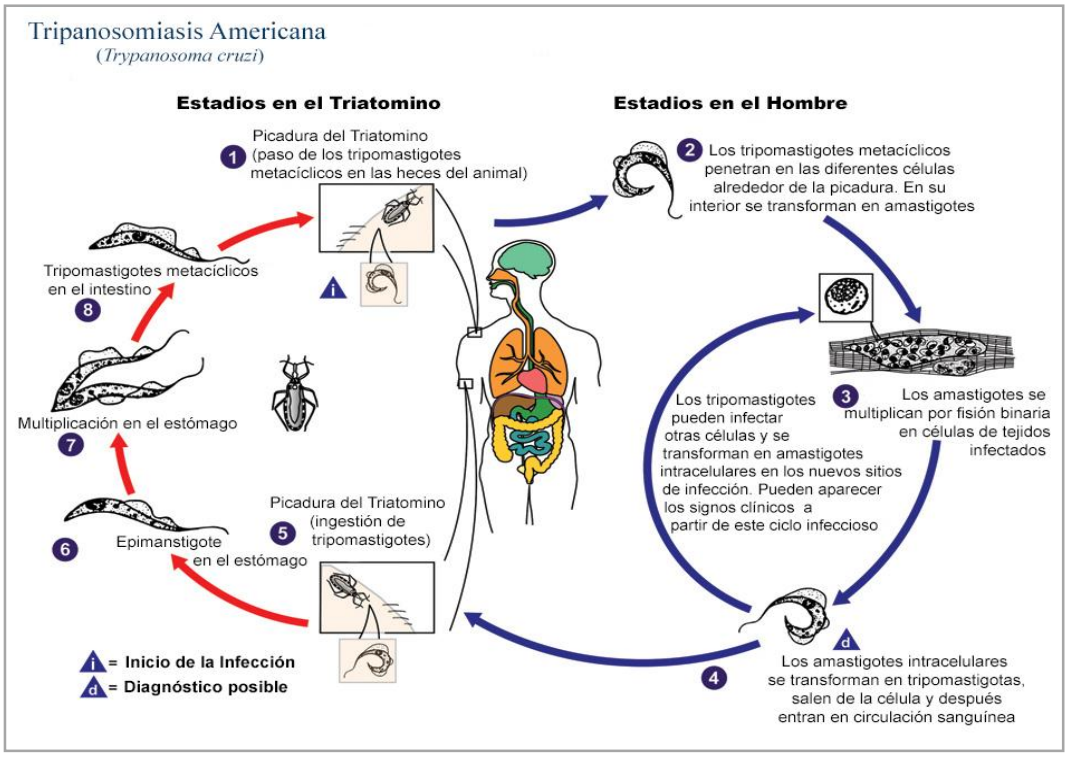


Figura 2: Ciclo de vida de *T. cruzi* (tomado y modificado de: Centers for Disease Control and Prevention [http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html]).

Origen del *T. cruzi* y clasificación actual

Evidencias moleculares recientes indican que *T. cruzi* ha evolucionado de un tripanosoma encontrado en murciélagos; este supuesto es conocido como la hipótesis de *Dispersión por Murciélagos* (¨Bat Seeding¨ hypothesis; Hamilton y col., 2012). Esta idea es apoyada por el hecho de que el pariente más cercano genéticamente a *T. cruzi* es *T. marinkellei*, encontrado en murciélagos de Sudamérica (Cavazzana y col., 2010; Hamilton y col., 2004; Hamilton y col., 2007). Ambos divergieron hace aproximadamente 6,5 - 8,5 millones de años atrás (Machado y Ayala, 2001; Lewis y col., 2011) y podrían ser considerados como subespecies (*T. c. cruzi* y *T. c. marinkellei*) (Baker y col., 1978).

Los tripanosomas *T. erneyi* y *T. livingstonei* recientemente descriptos, que se encontraron en murciélagos en Mozambique (Lima y col., 2012; 2013), y *T. dionisii*, encontrado en murciélagos del viejo y nuevo mundo, también son parientes cercanos de *T. cruzi*. Por otra parte, *T. cruzi* se ha detectado en murciélagos de América del Sur con un genotipo específico, TcBat. Recientemente se ha reportado un caso de un niño infectado con TcBat en Colombia y se ha detectado ADN de TcBat en momias en Chile (Marcili y col., 2009; Guhl y col., 2014; Ramírez y col., 2014). Basándose en estos hechos, es posible suponer que el ancestro común de los miembros del clado *T. cruzi* es un tripanosoma de murciélago.

Probablemente los murciélagos infectados con tripanosomas han colonizado América del Sur hace 7 - 10 millones de años a través de América del Norte (Stadelmann y col., 2007). Luego de la colonización, varios linajes de tripanosomas de murciélago infectaron a mamíferos terrestres, proceso probablemente facilitado por invertebrados vectores que se alimentaban de ambos (murciélagos y mamíferos terrestres) que convivían en los mismos ecotopos arbóreos. Uno de éstos intercambios dio lugar a *T. cruzi* en el Plioceno (Steverding, 2014).

La diversificación del *T. cruzi* en los actuales linajes o unidades discretas de tipificación (UDTs) TcI - TcVI y TcBat comenzó recientemente hace 1-3 millones de años atrás (Flores-López y Machado, 2011).

Existe una postura de consenso respecto a que *T. cruzi* conforma un patrón paradigmático de evolución clonal con baja tasa de recombinación génica (Tibayrenc y Ayala, 2002). El modelo propuesto no implica la ausencia absoluta de recombinación genética, sino una frecuencia muy baja, que no altera significativamente la propagación uniparental del parásito. Esto presupone que los clones son estables en el tiempo y espacio, permitiendo estudiarlos como marcadores epidemiológicos.

En el año 2009, una reunión de expertos realizada en Buzios, Brasil, acordó un consenso para la clasificación de la cepas de *T. cruzi* en seis unidades discretas de tipificación, teniendo en cuenta los estudios filogenéticos más recientes (Zingales y col., 2009, 2012). Estas unidades se definen como un conjunto de cepas que se encuentran genéticamente más relacionadas entre sí que con cualquier otra cepa, y que son identificadas por medio de marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos comunes (Tibayrenc, 1998). Recientemente, un grupo de aislamientos del parásito encontrados en murciélagos, exhibió una combinación de genotipos distinta a las existentes en las 6 UDTs. Estos análisis indicarían que el grupo TcBat nombrado anteriormente, conformaría un grupo evolutivo distinto y que sería más cercano genéticamente a TcI que al resto de las UDTs (Pinto y col., 2012; Franco y col., 2015).

Se ha planteado la hipótesis de que la historia evolutiva de *T. cruzi* estaría relacionada con la de sus hospedadores vertebrados (Briones y col., 1999). La fauna de mamíferos de América del Sur en el período Cretáceo estaba formada principalmente por marsupiales y placentarios ancestrales del orden Xenarthra (armadillos, osos hormigueros y perezosos). Algunos miembros de estos dos grandes grupos de mamíferos habrían sido los reservorios naturales del parásito en ese entonces. Los distintos ecotopos en los cuales se encontraban estos dos grupos de hospedadores habrían posibilitado la evolución por propagación clonal

de dos grupos de parásitos, que dieron origen a las UDTs ancestrales TcI y TcII. Se ha sugerido que TcI evolucionó en asociación a los mamíferos marsupiales del género Didelphis (comadrejas); y TcII, en relación a los mamíferos terrestres, como los armadillos (Yeo y col., 2005; Marcili y col., 2009).

La evidencia de recombinación de *T. cruzi* en el modelo experimental (Gaunt y col., 2003) daría soporte a la existencia de los supuestos híbridos y a la herencia uniparental del genoma mitocondrial. Se han propuesto dos modelos principales que, considerando diferentes marcadores moleculares, sugieren orígenes y evolución alternativos de las UDTs. Estos modelos (Figura 3) se conocen como modelo de "Dos eventos de hibridación" (Westenberger y col., 2005, 2006) y modelo de "Tres ancestros" (de Freitas y col., 2006).

El modelo de los "Dos eventos de hibridación" propone la existencia de un antiguo evento de recombinación genética entre TcI y TcII que habría dado origen a los actuales TcIII y TcIV, luego de un extenso período de propagación clonal y pérdida de heterocigosis. Este modelo propone, además, que otro evento de recombinación genética posterior entre TcII y TcIII habría originado a las UDTs TcV y TcVI. En este escenario, solamente TcI y TcII serían considerados como grupos homogéneos y las UDTs restantes, TcIII, TcIV, TcV y TcVI, corresponderían a grupos híbridos. El modelo alternativo de los "Tres ancestros" sugiere un origen evolutivo independiente de TcIII y TcIV, cuyas secuencias mitocondriales son similares entre sí pero diferentes a las de TcI y TcII. También considera dos eventos de hibridación, aunque más recientes, entre TcII y TcIII, que originó a los dos únicos grupos híbridos TcV y TcVI. Los híbridos heterocigotas TcV y TcVI habrían heredado el genoma mitocondrial de su parental TcIII.

La principal discrepancia entre ambos modelos reside en el origen de TcV y TcVI: por medio de un único evento de hibridación con incorporación de secuencias nucleares de TcI a través de TcIII (Westenberger y col., 2005, 2006) o, por medio de dos eventos de hibridación, excluyendo a TcI (de Freitas y col., 2006).

Un reciente estudio postuló a TcBat como un linaje monofilético y como una UDT independiente, no apoyando la hipótesis de TcBat como el antepasado de todas las UDTs, si no como grupo hermano de TcI. Aparentemente los murciélagos estarían implicados en la diversificación de todas las UDT, debido a evidencias de la presencia de TcII, TcIII y TcIV en murciélagos (Lima y col., 2015).

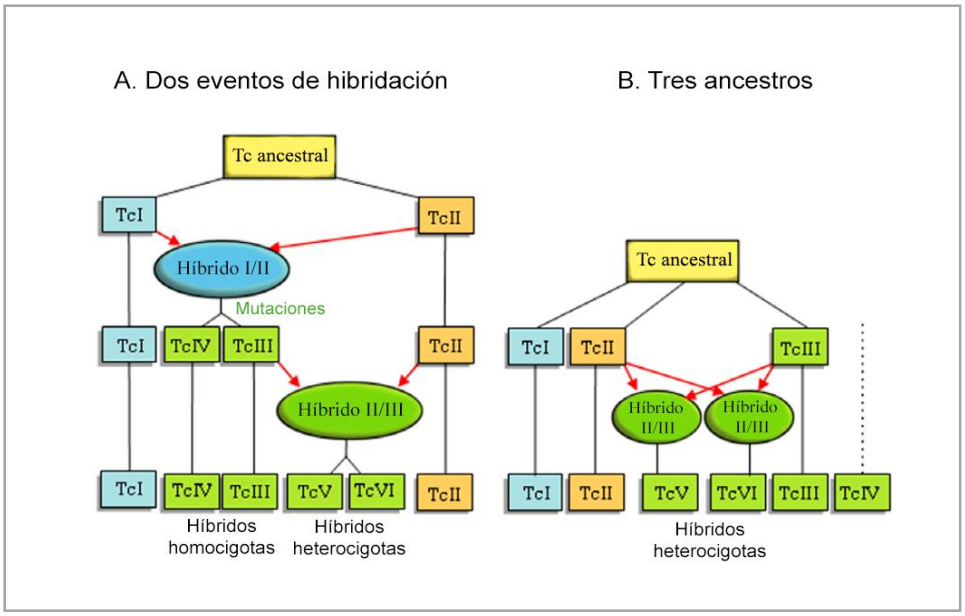


Figura 3. Modelos evolutivos y el origen de las UDTs de *T. cruzi*. Comparación de los modelos "Dos eventos de hibridación" (A) y "Tres ancestros" (B) en el rol del intercambio genético durante la evolución clonal de *T. cruzi*. Los rectángulos indican las distintas UDTs. La fusión de dos células y el intercambio genético se indica mediante óvalos, con contribución parental indicada por las flechas rojas (Zingales y col., 2012).

El avance en las investigaciones posiblemente conduzca a replantear los modelos evolutivos y el origen de las UDTs.

Distribución de las UDTs

TcI constituye la UDT más abundante y con más amplia distribución en el continente americano y es el genotipo principal en los ciclos silvestres de transmisión. Se encuentra fuertemente asociado al ecotopo arbóreo, siendo sus principales reservorios los marsupiales del género *Didelphis* (Yeo y col., 2005); es transmitido por numerosas especies de triatominos silvestres y domésticos. Es el principal agente etiológico de la enfermedad de Chagas en los países del norte de Sudamérica, América Central y México, aunque también ha sido hallado en muestras clínicas de pacientes cardiópatas de Argentina (Burgos y col., 2010).

TcII, TcV y TcVI presentan una amplia restricción al ciclo domestico de transmisión. Geográficamente se localizan al sur de la cuenca del Amazonas y constituyen la principal causa de enfermedad de Chagas en los países de esa región. TcII predomina en la región Este y central de Brasil, y se encuentra implicado en casos de megasindromes digestivos y cardiopatía (Lages-Silva y col., 2006). Su principal vector es *Panstrongylus megistus* (Sturm y Campbell, 2010). TcV es la causa principal de enfermedad de Chagas en la zona del Gran Chaco, que abarca regiones del norte de Argentina, Paraguay, Bolivia, Chile

y sur de Brasil, siendo su principal vector *Triatoma infestans* (del Puerto y col., 2010). De la misma forma, TcVI también se encuentra asociado al ciclo doméstico y peridoméstico en el cono sur de América Latina. Se lo ha encontrado asociado a la infección de perros y gatos en el noroeste de Argentina (Cardinal y col., 2008; Enriquez y col., 2012).

TcIII presenta una amplia distribución geográfica a lo largo de América del Sur, desde el oeste de Venezuela hasta el Gran Chaco argentino. Por lo general, no se encuentra asociado al ciclo doméstico de transmisión y a la infección en humanos. Se encuentra fuertemente asociado al ecotopo terrestre y al hospedador *Dasypus novemcinctus*, aunque otros mamíferos terrestres, como armadillos y roedores, actúan también como reservorios (Yeo y col., 2005; Marcili y col., 2009). Asimismo, se lo ha encontrado asociado a la infección en perros en el Gran Chaco argentino (Cardinal y col., 2008, Enriquez y col., 2012).

TcIV es endémico de América del Norte, Amazonia y norte de Sudamérica. Se ha detectado en mapaches y primates en EE.UU y en un triatomino *Rhodnius brethesi* de la región Amazónica, indicando un posible ecotopo arbóreo (Yeo y col., 2005; Roellig y col., 2008; Marcili y col., 2009). Es relativamente más frecuente que TcIII en la infección en humanos, constituyendo la segunda causa de enfermedad de Chagas en Venezuela, después de TcI (Carrasco y col., 2012). Asimismo, ha sido aislado en brotes de transmisión oral en la Amazonia brasilera y en Colombia (Monteiro y col., 2012; Ramírez y col., 2013). Se han encontrado evidencias de que TcIV podría estar dividido en dos linajes distintos, uno de América del Sur y otro de América del Norte (Lewis y col., 2009; Marcili y col., 2009).

TcBat se ha encontrado asociado a la infección en murciélagos de los géneros *Myotis* y *Noctilio*, en Brasil, Panamá y Colombia (Marcili y col., 2009; Pinto y col., 2012) y recientemente ha sido reportado un caso de un niño infectado en Colombia (Ramírez y col., 2014).

En varias zonas geográficas de América del Sur, la ocurrencia de infecciones naturales mixtas por diferentes linajes o UDTs de *T. cruzi* han sido ampliamente reportadas en seres humanos (del Puerto y col., 2010; Burgos y col., 2010; Garcia y col., 2014). Estudios *in vitro* e *in vivo* en modelos de infección con *T. cruzi* mostraron una alta variabilidad biológica entre los diferentes genotipos del parásito (Dos Reis y col., 2012; Ragone y col., 2012, 2015). Sin embargo, aún no se han encontrado asociaciones entre los linajes de *T. cruzi* y las manifestaciones clínicas de la enfermedad (del Puerto y col., 2010).

1.2 Detección y tipificación de *T. cruzi* mediante métodos de amplificación génica

Gran cantidad de métodos han sido utilizados para caracterizar la estructura poblacional de *T. cruzi* con el objetivo de dilucidar la relación entre los subgrupos de parásitos y los aspectos eco-epidemiológicos y clínicos de la infección (Macedo y Pena, 1998; Miles y col., 2009). Uno de los métodos más utilizados actualmente para este propósito, es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Reacción en cadena de la polimerasa

Esta técnica se basa en el principio de amplificación exponencial de la secuencia de ADN específica a la que se dirige la reacción, lo cual le confiere una elevada sensibilidad y especificidad analítica (Bartlett y Stirling, 2003). Se detallan diferentes variantes de la PCR:

- **PCR convencional**. Se utiliza un par de oligonucleótidos para amplificar una parte pequeña del genoma blanco. La detección del producto de reacción se realiza normalmente en geles de agarosa (Bartlett y Stirling, 2003). Es factible mejorar la sensibilidad y especificidad analíticas mediante la aplicación de la PCR anidada, o utilizando el método de Southern blot seguido de la hibridación de sondas específicas.
- **PCR multiplex**. Se utilizan múltiples pares de oligonucleótidos dirigidos a diferentes blancos moleculares en un único ensayo. Se pueden detectar y diferenciar de forma simultánea varios agentes infecciosos o secuencias genómicas en un único tubo de reacción (Markoulatos y col., 2002).
- **PCR anidada**. Se realizan dos ciclos de amplificación, con pares de oligonucleótidos diferentes. Los productos de la primera tanda de amplificación se utilizan como molde inicial para la segunda tanda, utilizando uno (semi-anidada o HN, del inglés “hemi-nested”) o dos oligonucleótidos diferentes a los utilizados en el primer ciclo. En general, los ensayos de PCR anidada proporcionan una sensibilidad y especificidad analíticas superiores en comparación a las pruebas de PCR convencional (Noyes y col., 1999).
- **qPCR o PCR en tiempo real** (también llamada PCR cuantitativa). Utiliza agentes intercalantes fluorescentes o sondas, que permiten el seguimiento continuo de la reacción durante el proceso de amplificación. Para ello, se utiliza un termociclador con sensores de fluorescencia, lo que permite medir la tasa de generación de uno o más productos específicos

(Mackay, 2004). Dicha medición se realiza luego de cada ciclo de amplificación, y es por ello que se le denomina PCR en tiempo real. Bajo condiciones ideales, estos productos se acumulan de manera exponencial (sus cantidades se duplican en cada ciclo de temperaturas). El número de ciclos de PCR en el que la acumulación de producto supera un umbral fijo se denomina "ciclo umbral" (Ct) (Higuchi y col., 1993). En las técnicas de qPCR se pueden emplear fluorocromos no específicos o sondas moleculares dependientes de la secuencia. En las técnicas basadas en fluorocromos inespecíficos, como el SYBR Green, un agente intercalante permite detectar la generación de ADN de doble cadena (Zipper y col., 2004). Estas técnicas poseen la ventaja de requerir sólo un par de oligonucleótidos para efectuar la amplificación. Sin embargo, sólo es posible amplificar y cuantificar un único producto en cada reacción. Las técnicas basadas en sondas específicas utilizan al menos un oligonucleótido marcado, lo cual incrementa la especificidad del ensayo. Una de las tecnologías más ampliamente utilizadas es la de las sondas TaqMan®, donde la amplificación de productos de PCR se mide mediante un sistema en el cual la sonda que hibrida específicamente con el producto de PCR, se encuentra marcada con dos fluorocromos. La emisión de fluorescencia se encuentra cuantitativamente asociada a la cantidad de amplicón producido (Heid y col., 1996). Una gran ventaja sobre los colorantes inespecíficos es que distintas sondas, marcadas con fluoróforos que emiten a diferentes longitudes de onda, se pueden combinar para detectar varios productos en una misma reacción.

PCR para la detección de *T. cruzi*

Mediante la técnica de PCR se amplifican secuencias específicas del ADN del parásito presente en la muestra. *T. cruzi* presenta un genoma de 100-200 $x10^6$ pares de bases (pb), variable según los diferentes aislamientos y UDTs, y compartimentalizado entre el núcleo y el kinetoplasto. Por sus cualidades de abundancia, longitud y estabilidad de secuencia, diversas regiones nucleares y del kinetoplasto han sido utilizadas como blanco de amplificación en diferentes PCRs. La secuencia específica de *T. cruzi* con mayor número de repeticiones en el genoma nuclear es la secuencia de ADN satélite, una secuencia conservada, organizada en serie, con unas 104 a 105 copias por genoma; no obstante, su contenido varía de 5 a 10 veces entre las UDTs TcI/TcIV y las UDTs TcII/III/V/VI (Duffy y col., 2009). Por otro lado, el ADN del kinetoplasto (ADNk) está compuesto por redes de maxicírculos y minicírculos concatenados, que representan entre un 10 y 20 % del ADN total del parásito. *T. cruzi* presenta un número variable de minicírculos por célula, entre 5.000

y 10.000, según el aislamiento. Ambas secuencias repetitivas son utilizadas como blancos de amplificación para la detección por PCR de la infección por *T. cruzi* (Ávila y col., 1991; Britto y col., 1995; Vago y col., 1996).

A través de los años, se han utilizado numerosos enfoques para caracterizar la diversidad bioquímica y genética de *T. cruzi*. Entre los primeros marcadores moleculares polimórficos estudiados se encontraron los genes de ADN ribosomal (ADNr) y la región intergénica del miniexón o "spliced-leader" (SL-IR), que permitieron dividir a *T. cruzi* en 2 grupos principales (Souto y col., 1996; Nunes y col., 1997; Fernandes y col., 1998), que se definieron como *T. cruzi* I y II mediante un consenso internacional (Anónimo, 1999). Posteriormente, la creación de un algoritmo de PCR basado en las secuencias del SL-IR y de los genes de ADNr 24Sα y 18S permitió la clasificación de *T. cruzi* en los seis linajes (Brisse y col., 2001). Actualmente existen diferentes esquemas de PCR desarrollados para la tipificación de *T. cruzi* (Lewis y col., 2009; D'Avila y col., 2009; Ramírez y col., 2010; Hamilton y col., 2011; Cosentino y Agüero, 2012; Cura y col., 2015).

1.3 Transmisión

Existen diferentes vías de transmisión de la infección por *T. cruzi*. Sus incidencias y prevalencias varían según las regiones geográficas, la endemicidad de la infección y los diferentes controles que se aplican sobre cada una de ellas. Las acciones del hombre sobre el ambiente, su condición de vida y vivienda, y fenómenos de migración hacia los centros urbanos, han originado una gran heterogeneidad en la epidemiologia de la infección (OMS, 2007).

Transmisión vectorial

La principal vía de transmisión es la vectorial. Esta se produce cuando parásitos presentes en las heces del insecto penetran por la herida que causa la picadura, por lesiones en la piel o por las mucosas de ojos, boca o nariz. Los insectos capaces de infectarse y por lo tanto capaces de transmitir la enfermedad pertenecen a la subfamilia Triatominae, compuesta por más 130 especies, casi todas confinadas en las Américas. La mayoría de las especies americanas pertenecientes a esta subfamilia han sido reportadas infectadas con *T. cruzi*. Su hábitat natural incluye palmeras, huecos en los árboles, grietas en las piedras, pequeñas cuevas y otros refugios de animales donde puede encontrar alimento.

T. infestans, el principal vector domiciliario, ha sido eliminado en Uruguay, Chile, Brasil, y en varias regiones de Argentina y Paraguay (Dias, 2006). Sin embargo, han aparecido otras especies (de la subfamilia Triatominae) de vectores peridomésticos y domésticos, e incluso poblaciones con resistencia a insecticidas (Cecere y col., 2006).

Transmisión transfusional

La seguridad en las transfusiones de sangre es adecuada en la mayor parte de los países de América Latina, a excepción de Bolivia y México, con una cobertura del 99 % en el tamizado de sangre (Schmunis y Cruz, 2005). Sin embargo, la infección transfusional se ha convertido en una seria complicación en los países no endémicos, debido a la migración de individuos infectados provenientes de regiones endémicas (Gascon y col., 2010; Benjamin y col., 2012). En todos los casos, la población de riesgo está constituida, principalmente, por los individuos poli-transfundidos (pacientes hemofílicos y sometidos a diálisis).

Transmisión connatal

Epidemiológicamente, la transmisión connatal o vertical se define cuando un neonato ha nacido de madre infectada y i) se detectan parásitos al momento del nacimiento o ii) se detectan parásitos o anticuerpos específicos de origen no materno luego del nacimiento, y iii) la transmisión previa por vía vectorial o transfusional pueden ser descartadas (Carlier y col., 2011). Con una incidencia variable según la región geográfica, entre el 0,1 y 18 % (Carlier y Truyens, 2010), ha sido considerada como la tercer vía de transmisión en orden de importancia, luego de la transmisión vectorial y transfusional. Pero, debido a la disminución de la vectorial y transfusional, la transmisión connatal adquiere mayor importancia en la persistencia de la infección.

Transmisión oral

La transmisión oral de *T. cruzi* es producida por el consumo de alimentos contaminados con triatominos o sus heces, o por la ingestión de carne cruda de hospedadores mamíferos infectados (Dias y col., 2002). Se considera que esta vía es causante de la enfermedad de Chagas cuando se demuestra más de un caso agudo de enfermedad febril vinculada a un alimento sospechoso, en ausencia de otra causa aparente. En la literatura se han informado numerosos brotes de Chagas agudo que han sido atribuidos a la transmisión oral, muchos de ellos en la región Amazónica, debido al consumo de bebidas o alimentos

contaminados con heces de triatominos infectados (Dias y col., 2008; Hernandez y col., 2009; Alarcón de Noya y col., 2010, Bastos y col., 2010; Ramírez y col., 2013).

Trasplante de órganos

La transmisión por trasplante de órganos provenientes de personas infectadas con *T. cruzi* también ha sido reportada (Barcán y col., 2005). Estos casos, al igual que los trasplantes a personas ya infectadas por *T. cruzi*, presentan una problemática particular debido a la inmunosupresión post-trasplante del receptor y deben ser monitorizados. En los casos en que se detectan parásitos en sangre, chagomas en la piel o nidos de amastigotes en muestras de biopsias, es recomendable que el paciente sea medicado con fármacos antiparasitarios (Diez y col., 2007).

Otras vías de transmisión

Además de las mencionadas anteriormente, se han descrito otras vías de menor importancia epidemiológica como la transmisión accidental, en hospitales y laboratorios (OMS, 2002).

1.4 La enfermedad de Chagas

En la mayoría de los casos, la infección puede iniciarse imperceptiblemente para el paciente, aunque en algunos casos es posible detectar el sitio de entrada del parásito con lesiones en la piel provocadas por la picadura del triatomino. Los parásitos depositados en la herida de la piel o en las mucosas estimulan una reacción inflamatoria local con una respuesta linforeticular. Los tripomastigotes dentro de los macrófagos son llevados al hígado, bazo, ganglios linfáticos y músculos esquelético y cardíaco, donde forman pseudoquistes de amastigotes. Con la ruptura de estos pseudoquistes en el miocardio y en los plexos mientéricos, comienza la miocarditis aguda mediada por células T CD4+ y T CD8+ e interleuquinas. Esta reacción inflamatoria lleva a la destrucción muscular y nerviosa, que se mantiene por la presencia del *T. cruzi* (Coura, 2007).

El curso de la infección estaría determinado por la cantidad de parásitos con que se infectó el paciente, el linaje o UDT de *T. cruzi* infectante, las posibles reinfecciones, el histotropismo de la cepa, y la respuesta inmune temprana y tardía del paciente (Teixeira y col, 2006). La infección en el ser humano ha sido dividida en dos etapas sucesivas: aguda y

crónica. La etapa crónica a su vez, puede presentarse en diferentes formas: sin patología y con patología demostrada (cardíaca y/o digestiva) de acuerdo a los órganos comprometidos en cada caso (Teixeira y col, 2006; Coura, 2007).

Etapas de la infección

Etapa aguda: Los signos clínicos pueden incluir signo de Romaña (edema periorbital biparpedal), conjuntivitis, fiebre, linfoadenopatía, hepatoesplenomegalia, nauseas, vómitos, diarrea, anorexia y sarpullidos (Tanowitz y col, 1992; Madoery, 1993).

Las lesiones histopatológicas de esta etapa se caracterizan por la presencia de reacciones inflamatorias localizadas, con predominio de células mononucleares en el lugar de ruptura de los nidos de amastigote, ocasionalmente con la formación de granulomas localizados principalmente en el tejido cardíaco y muscular. En algunos casos, puede haber una miocarditis aguda difusa, con edema intersticial, hipertrofia de las fibras miocárdicas y dilatación de las cavidades cardíacas. La destrucción de las neuronas cardíacas y de los plexos mientéricos, con reducción en el número de neuronas, comienza en esta etapa y continúa en la etapa crónica de la enfermedad (Andrade, 2005).

En el músculo esquelético y cardíaco los amastigotes forman nidos (un pseudoquiste sin pared limitante) y como respuesta a su presencia se encuentran asociados infiltrados inflamatorios. Estos infiltrados también invaden los ganglios parasimpáticos cardíacos, donde las células gliales o las células de Schwann pueden estar altamente parasitadas. La unión de células mononucleares inflamatorias a las neuronas lleva a la lisis y a la pérdida de estas células en la etapa aguda (Teixeira y col, 2006). Un pequeño porcentaje de individuos muere en la etapa aguda por complicaciones asociadas a miocarditis aguda o meningoencefalitis (Tanowitz y col, 1992; Madoery, 1993; Coura, 2003). Por lo general, en esta fase de la enfermedad no se observan bradiarritmias (disfunción sinusal, ni bloqueo aurículo-ventricular); si bien son más frecuentes en la fase crónica avanzada, puede presentarse disfunción sinusal o bloqueo aurículo-ventricular como síntoma principal o inicial (Bestetti y col, 2004).

La fase aguda tiene una duración de 3 a 4 meses, donde la mayoría de los pacientes pueden continuar sin presentar síntomas por el resto de sus vidas (Coura, 2003). Sin embargo, aproximadamente un 27-30 % de los pacientes infectados desarrollan síntomas cardíacos que pueden llevar a la muerte súbita, daños digestivos (6 %) y compromiso del sistema nervioso periférico (3 %) (Manoel-Caetano y Silva, 2007).

Etapa crónica sin patología demostrada: se caracteriza por una baja parasitemia y por la presencia de anticuerpos IgG anti-antígenos de *T. cruzi*. Aproximadamente, un 70 % de los pacientes permanece asintomático durante toda su vida, con exámenes radiográficos y electrocardiográficos normales. El resto de los pacientes puede, en un lapso de 10 a 30 años, evolucionar a la forma crónica con manifestaciones clínicas.

Etapa crónica con patología demostrada: las principales manifestaciones son la cardiopatía y los megasíndromes digestivos, que pueden ocurrir separadamente o coexistir en un mismo paciente. Las bajas parasitemias persisten, acompañadas de títulos elevados de anticuerpos. Este periodo se caracteriza por su evolución lenta y por el predominio de daño tisular. Las manifestaciones digestivas involucran a un tercio de los pacientes y consisten en la dilatación de vísceras (principalmente colon y esófago) debido a disfunciones neuronales ocasionadas por el parásito. Por otro lado, en dos tercios de los enfermos, la progresiva miocarditis lleva al desarrollo de la cardiopatía chagásica crónica. Los síntomas más frecuentes son palpitaciones y disnea de esfuerzo (Prata, 2001).

Modelo Murino de enfermedad de Chagas

El uso experimental del modelo ratón propicia la oportunidad de estudiar y entender las alteraciones provocadas por el parásito de forma sistemática. La primer infección experimental con *T. cruzi* fue realizada por Oswaldo Cruz, de acuerdo con la descripción del propio Chagas en 1909. Cruz y Chagas inocularon experimentalmente con *T. cruzi* varias especies animales, como perros, cobayos y monos, tratando de estudiar la evolución de la infección en diferentes vertebrados (Chagas, 1909).

El modelo experimental con ratones para la enfermedad de Chagas fue descripto por Laguens y colaboradores (1980), quiénes demostraron que reproduce las fases de la enfermedad humana desde el punto de vista patológico, inmunológico y electrocardiográfico. Además, su pequeño porte, facilidad de obtención y mantenimiento hace que sea el animal preferido para un gran número de experimentos. El modelo murino de la cardiopatía chagásica crónica reproduce el cuadro de miocarditis crónica con lesiones fibróticas e inflamatorias, cardiomegalia, dilatación y trombosis de las cavidades cardíacas. También, posibilita el estudio de nuevos blancos terapéuticos para la enfermedad de Chagas (Romanha y col., 2010). Se conoce que distintas cepas de ratones difieren en la susceptibilidad o resistencia a la infección con *T. cruzi* existiendo, al parecer, un complejo control génico de los niveles de parasitemia y de la supervivencia de los animales infectados. Esta variedad de factores, dependientes tanto del parásito como del hospedador, están

involucrados en determinar finalmente la resistencia o susceptibilidad a tratamientos antiparasitarios (Wrightsman y col., 1982; Vergara y col., 2002).

1.5 Tratamiento Quimioterapéutico

A fines de 1969 dos drogas nitroheterocíclicas estuvieron disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas: un nitrofurano, **nifurtimox** [3-metil-4 (nitrofurfurilideneamino) tetrahidro - 4H - 1,4 – tiozina - 1,1 - dióxido] y un nitroimidazol, **benznidazol** [N- benzil- 2- nitro- 1-imidazol acetamida]. Actualmente estas drogas son las autorizadas por la OMS para el tratamiento de esta enfermedad (OMS, 2016).

Nifurtimox y benznidazol actúan alterando el ADN, y por consiguiente la síntesis proteica del parásito, y aumentan la degradación de macromoléculas (Goijman y Stoppani, 1985; Gonzales y Cazzulo, 1989). El ciclo redox de ambas drogas genera especies reactivas del oxígeno, lo que contribuye a su efecto tripanocida pero también a sus acciones tóxicas en el paciente (Segura y col, 1994). Estas drogas tienen efectos adversos indeseables y su efectividad varía según la cepa. En el caso de benznidazol los efectos adversos aumentan con la edad del huésped y los más notorios son: dermatitis con erupciones cutáneas, edema generalizado, fiebre, linfoadenopatía y dolor muscular. Además se ha observado daño bioquímico y/o histológico en hígado, testículos, glándulas adrenales, ovarios y placenta de ratas (Bernacchi y col., 1986; de Castro y col., 1992; Castro y col., 2006).

Algunos trabajos reportan que el 27 % de las cepas de *T. cruzi* aisladas de diferentes orígenes biológicos y geográficos, poseen resistencia natural al benznidazol y al nifurtimox, con porcentajes de curación menores a 50 % en ratones, a pesar de nunca haber estado en contacto con estos medicamentos (Filardi y Brener, 1987; Villarreal y col., 2005; Wilkinson y col., 2008; Mejía-Jaramillo y col., 2011). Además, se reportó que es posible inducir resistencia, tanto *in vitro* como *in vivo*, por presiones continuas con estos medicamentos, lo cual genera poblaciones resistentes a concentraciones de benznidazol de hasta 220 μM; asimismo, se han identificado algunos genes involucrados en el surgimiento del fenotipo de resistencia a este medicamento (Andrade y col., 2008, Campos y col., 2009; Nogueira y col., 2009).

Benznidazol

El derivado sintético N- benzil- 2- nitro- 1-imidazol acetamida es conocido como benznidazol (Figura 4).

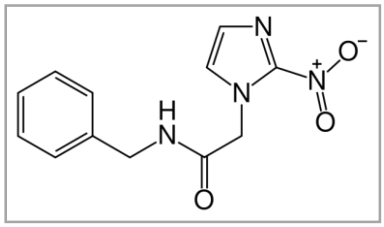


Figura 4: Estructura química de benznidazol

Tras ingresar en la célula mediante difusión pasiva, es químicamente reducido por proteínas del metabolismo anaerobio (proteínas de transporte de electrones de bajo potencial redox). El benznidazol reducido produce pérdida de la estructura helicoidal del ADN, rotura de la cadena y muerte celular, generando compuestos que son tóxicos para la célula (Samuelson, 1999; Buschini y col., 2009). Este compuesto antiparasitario es un agente productor de radicales libres, metabolitos que estarían involucrados en los efectos adversos (Roldán, 1988).

Benznidazol tiene acción tripanocida en la etapa aguda de la enfermedad y en pacientes menores de 14 años (Morello, 1988). Sin embargo, se ha demostrado que tiene poco o ningún efecto en la fase crónica de la enfermedad, con tasas de curación que van desde 0 % a 19,1 % (Braga y col., 2000; Cançado, 2002). Esta variación de la eficacia del tratamiento podría deberse a la presencia de cepas de *T. cruzi* resistentes (Caldas y col., 2008). No obstante, la probabilidad de cura parasitológica aumenta con la prontitud con que se haga el diagnóstico y el tratamiento. En ensayos clínicos realizados en la fase aguda de la infección con benznidazol, se observó un 40 % a 76 % de cura parasitológica (Bahia-Oliveira y col., 2000; Cançado, 2002). En Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia y El Salvador se realizó un estudio multicéntrico que incluyó 2.854 pacientes con miocardiopatía chagásica establecida, que recibieron benznidazol o placebo durante un máximo de 80 días. Con este estudio se demostró que la terapia tripanocida con benznidazol en pacientes con miocardiopatía chagásica redujo significativamente la detección de parásitos en suero, pero no redujo de manera significativa los episodios clínicos cardiacos a los 5 años de seguimiento (Morillo y col., 2015).

Blancos Terapéuticos

En los últimos años, los avances en el área de la genómica y la proteómica han permitido la identificación y caracterización de nuevas rutas metabólicas presentes en el parásito. En particular, se ha puesto énfasis en aquellas enzimas que muestran diferencias importantes con respecto a las enzimas presentes en mamíferos, o mejor aún que están ausentes en estos últimos, a fin de utilizarlas como blanco terapéutico para el diseño racional de nuevos fármacos.

- **Biosíntesis de esteroles de membrana**

Se ha observado que *T. cruzi* es extremadamente susceptible a los inhibidores de la biosíntesis de ergosterol debido al requerimiento, en todos los estadios de su ciclo vital, de esteroles específicos imprescindibles para la proliferación y viabilidad celular (Urbina, 2010). Entre los inhibidores de esta ruta que han mostrado ser efectivos en modelos murinos de enfermedad de Chagas, tanto en la etapa aguda como crónica, están los derivados de triazol, D0870 y posaconazol. Estos fármacos se utilizan actualmente en el mercado como antifúngicos (Urbina y Docampo, 2003). En el año 2012, se comenzó con la implementación de un estudio randomizado multicéntrico, de fase II, que exploró la eficacia del posaconazol comparado contra benznidazol, en pacientes en la llamada fase crónica asintomática de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, resultados preliminares de este estudio han reportado la baja eficacia del posaconazol comparado con benznidazol.

- **Enzimas glicolíticas**

Una característica importante del metabolismo de *T. cruzi* es que la forma amastigota utiliza glucosa como la principal fuente de ATP. Es por esto que las enzimas involucradas en la glicólisis son consideradas blancos interesantes para el desarrollo de inhibidores selectivos que afecten su función metabólica. Entre estas enzimas, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y la triosafosfato isomerasa han resultado blancos terapéuticos atractivos para el desarrollo de fármacos ya que se ha visto que además de ser enzimas claves para la supervivencia del parásito presentan diferencias estructurales importantes con las correspondientes enzimas humanas (Souza y col., 1998; Figueroa-Cortés y col., 2008).

- **Acidocalcisomas**

Los acidocalcisomas son organelos acídicos ricos en calcio y fosfatos que se han conservado durante la evolución desde procariotas hasta eucariotas. Estos organelos están involucrados en el almacenamiento de cationes y polifosfatos, en el metabolismo de pirofosfato y polifosfatos, homeostasis de calcio, mantenimiento del pH intracelular y osmoregulación (Docampo y col., 2005). En los parásitos, los acidocalcisomas poseen enzimas que están ausentes o difieren de las análogas presentes en mamíferos, por lo que han sido consideradas posibles blancos terapéuticos para el desarrollo de fármacos (Docampo y Moreno, 2008).

- **Trans-sialidasa**

La trans-sialidasa de *T. cruzi* es una glicoproteína expresada en la superficie de la forma tripomastigota sanguínea del parásito y liberada al medio, constituyendo uno de los pocos ejemplos de glicosiltransferasas de superficie en eucariotas. Los tripanosomas no son capaces de sintetizar ácido siálico y usan esta enzima para transferirlo desde sialoglicoconjugados presentes en la sangre y otros tejidos del hospedero hacia residuos de galactosa terminales presentes en mucinas que cubren la superficie del parásito. Las mucinas sialidadas están involucradas en aspectos clave de la interacción parásito-célula hospedera, tales como adhesión e invasión celular, así como en la evasión del sistema inmune (Buscaglia y col., 2006). Actualmente se están realizando estudios preclínicos de vacunas, con la formulación basada en la proteína trans-sialidasa glicosilada inactiva más adyuvantes eficaces y seguros. Estos estudios han demostrado que durante la infección aguda experimental, se ha encontrado una disminución de la parasitemia y mayor sobrevida en los animales vacunados (Bontempi y col., 2015).

- **Cisteín Proteasas**

Para los parásitos del orden Kinetoplastida, las cisteín proteasas son importantes factores de virulencia; mediante métodos químicos y moleculares se ha comprobado que resultan esenciales para la supervivencia de estos organismos (Mottram y col., 1998; Cazzulo, 1999). Las proteasas parasitarias participan en distintos procesos relacionados con la patogénesis de la enfermedad, incluyendo invasión, migración, nutrición y evasión del sistema inmune (Lecaille y col., 2002 McKerrow y col., 2006). Dentro de estas enzimas, cruzipaína (CP), la principal cisteín proteasa presente en *T. cruzi*, ha sido una de las más estudiadas como posible blanco molecular (Ponce y col., 2013).

- **Tripanotiona reductasa**

Los parásitos protozoos presentan amplias diferencias en sus defensas antioxidantes cuando se comparan con sus hospederos mamíferos. El sistema de defensa redox en mamíferos se basa en la glutatión oxidasa (GSSG) y glutatión reductasa (GR), pero es reemplazado en los tripanosomátidos por un sistema basado en la acción combinada de la tripanotiona reductasa (TR), tripanotiona, triparredoxina y triparredoxina peroxidasa, que facilitan el flujo de equivalentes de reducción desde la dihidrotripanotiona hasta el hidroperóxido que es vital para mantener una concentración baja de H_2O_2 (Turrens, 2004).

Durante su ciclo de vida, *T. cruzi* invade las células de sus hospederos donde el parásito está expuesto a especies reactivas del oxígeno (O_2^{-}•, HO•), producidas por sus propios procesos de respiración celular y por los mecanismos de defensa del huésped. Si las especies reactivas del oxígeno no son reducidas, pueden resultar perjudiciales para el parásito, llevando incluso a su muerte (Müller y col., 2003; Turrens, 2004).

La tripanotiona [N1,N8-bis-(glutationil)espermidina; $T(SH)_2$] fue inicialmente aislada en 1985 por Fairlamb. Es una molécula formada por la conjugación de dos moléculas de glutatión con una molécula de espermidina. Es un tiol de bajo peso molecular y actúa como cofactor redox en numerosos procesos biológicos. La forma oxidada de la tripanotiona, $T(S)_2$ [forma disulfuro] es reducida por la TR a $T(SH)_2$ [forma dihidro sulfuro] (figura 5). La TR posee un rol importante en el mantenimiento de una alta relación intracelular de $T(SH)_2/TS_2$ (Krauth-Siegel y col., 1987; 2003).

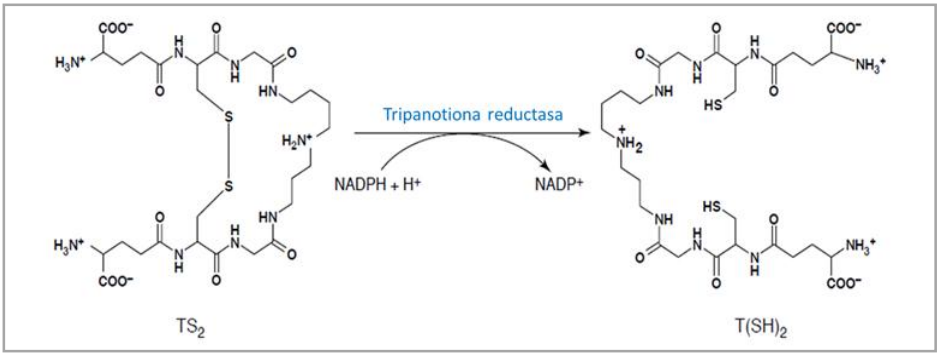


Figura 5: La tripanotiona [$T(SH_2)$] es sintetizada por la conjugación de dos moléculas de glutatión y una de espermidina. Una vez oxidada, la tripanotiona disulfuro es reducida por la acción de la enzima tripanotiona reductasa, a expensas de NADPH (Müller y col., 2003).

El sistema tripanotiona tiene importantes funciones: protege a los parásitos de daños oxidativos, es esencial para el mantenimiento de la homoestasis intracelular de los tioles, contribuye a la estructura de proteínas dependientes de grupos disulfuro, compleja metales

pesados, ejerciendo una acción antitóxica, contribuye al mantenimiento del nivel fisiológico de las poliaminas, entrega los equivalentes reducidos para la síntesis de ADN, entre otras funciones (Figura 6).

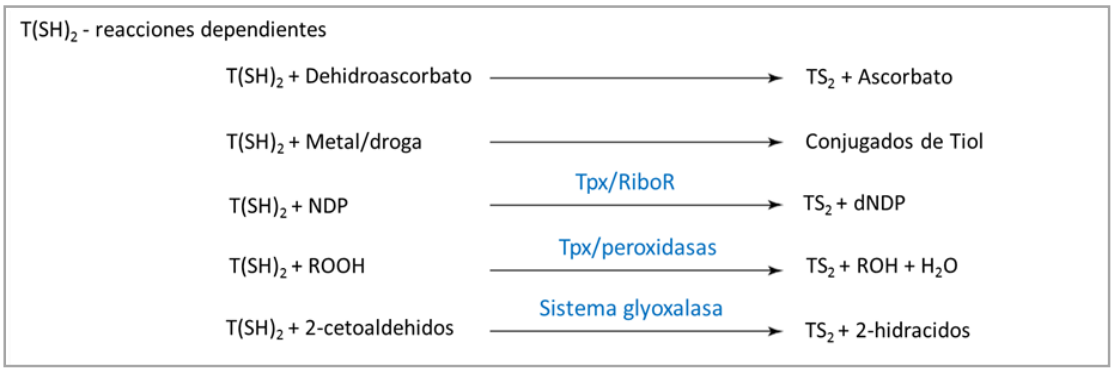


Figura 6: La dupla $T(SH)_2$ / tripanotiona reductasa proporciona los equivalentes para la reducción de la dehidroascorbato y la desintoxicación de drogas metálicas, así como 2-cetoaldehidos tales como metilglioxal. Mediada por la proteína di tiol tryparedoxin (Tpx), $T(SH)_2$ es un donante eficiente de equivalentes reductores para la síntesis de difosfatos desoxirribonucleótidos (dNDP) catalizados por la ribonucleótido reductasa (RiboR), y la destoxificación de hidroperóxidos (ROOH) a alcohol (ROH) por diferentes tipos de peroxidasas. En azul se indican las enzimas (Müller y col., 2003).

La conocida sensibilidad de los tripanosomátidos hacia las especies reactivas del oxígeno y la ausencia de esta vía en el huésped mamífero, convierten a la TR en una prometedora enzima para el desarrollo de fármacos específicos contra el parásito (Ravaschino y col., 2006; O'Sullivan y col., 2015).

Desde su identificación y validación como blanco terapéutico, un gran número de inhibidores de TR han sido descritos. El grupo de inhibidores más ampliamente estudiado han sido las poliaminas, compuestos análogos al sustrato natural, que inhiben a la TR reversiblemente. Dentro de este grupo, el inhibidor más potente encontrado hasta el momento es el derivado N1,N1,N4,N8,N12-penta(3-fenilpropil) espermina (Krauth-Siegel y col., 2005). Si bien los compuestos de esta serie presentan una excelente actividad tripanocida *in vitro*, no se ha observado una clara correlación entre la inhibición enzimática y la actividad antiparasitaria.

Actualmente varias drogas anti-tripanosomátidos modifican los niveles de $T(SH)_2$, aunque no sea ésta la acción terapéutica principal de estas drogas (Maya y col., 2007; Baiocco y col., 2009). Por ejemplo para el tratamiento de la tripanosomiasis africana: D,L-a- difluoromethylornithine (DFMO) inhibe la síntesis de putrescina, un componente de $T(SH)_2$, el óxido de melarsen con dimercaprol y como así también los derivados del antimonio impactan en varios sitios dentro de los parásitos incluyendo la inhibición de la TR

y la formación de $T(SH)_2$ (Díaz y col., 2014). Varios factores indican que la enzima TR es un blanco terapéutico indiscutible (Flohé, 2012; Colotti y col., 2013). Investigaciones en *Leishmania* y *Trypanosoma* han demostrado la importancia de la TR. Parásitos que han sido modificados genéticamente para producir una disminución en los niveles de la TR, resultaron ser muy sensibles al estrés oxidativo siendo incapaces de infectar células (Tovar y col., 1998; Krieger y col., 2000).

1.6 Fármacos tricíclicos

Los antidepresivos tricíclicos son utilizados en tratamientos psiquiátricos y reciben el nombre por su estructura química, que contiene una cadena de tres anillos (Figura 7) (Karameh Karameh y Khani, 2015). Están indicados para el tratamiento de la depresión, fobias, síndromes obsesivos, entre otras patologías. En pacientes con depresión se encontró que éstos fármacos tienen efectos pleiotrópicos, como la inhibición de la reaceptación de serotonina y noradrenalina, así como el antagonismo de algunos receptores acoplados a la proteína G (Gillman, 2007). Se ha descripto que algunos de ellos, como clomipramina, tienen acción ansiolítica y sedante y se utilizan para dolores crónicos (Rebolledo Marchesini y col., 2004). En modelos experimentales de depresión se demostró que estos fármacos tienen efectos inmunoreguladores negativos, suprimiendo de forma significativa la secreción de Interleuquina-2 e IFNγ por linfocitos T y de Interleuquina-1 por macrófagos (Maes, 2001; Diamond y col., 2006). Los antidepresivos tricíclicos se unen extensamente tanto a proteínas plasmáticas, como a proteínas de los tejidos y se distribuyen en el líquido cefalorraquídeo, el cerebro, atraviesan la placenta y se distribuyen a la leche materna.

En 1984 Hammond y colaboradores, llevaron a cabo un “screening” de 500 drogas diferentes para determinar su posible efecto tripanocida. Informaron que 71 de estos compuestos fueron activos contra el parásito. Algunos de estos eran fármacos tricíclicos como fenotiazinas y antidepresivos relacionados (Hammond y col., 1984).

Los fármacos tricíclicos, fenotiazinas y antidepresivos relacionados, además de ser usados en tratamientos psiquiátricos se utilizan como antihistamínicos, sedativos y analgésicos (Bryson y Wilde, 1996). También se ha encontrado que presentan actividad antitumoral actuando como reguladores de la autofagia (Bongiorno-Borbone y col., 2015).

En nuestro laboratorio se ha estudiado la actividad biológica de algunos fármacos tricíclicos, demostrando que clomipramina, trifluorperazina, prometazina y tioridazina

ejercen efecto tripanocida sobre tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Tulahuen (Barioglio y col., 1987; Lacuara y col., 1991; Fernández y col., 1997; Paglini-Oliva y col., 1998; Lo Presti y col., 2015).

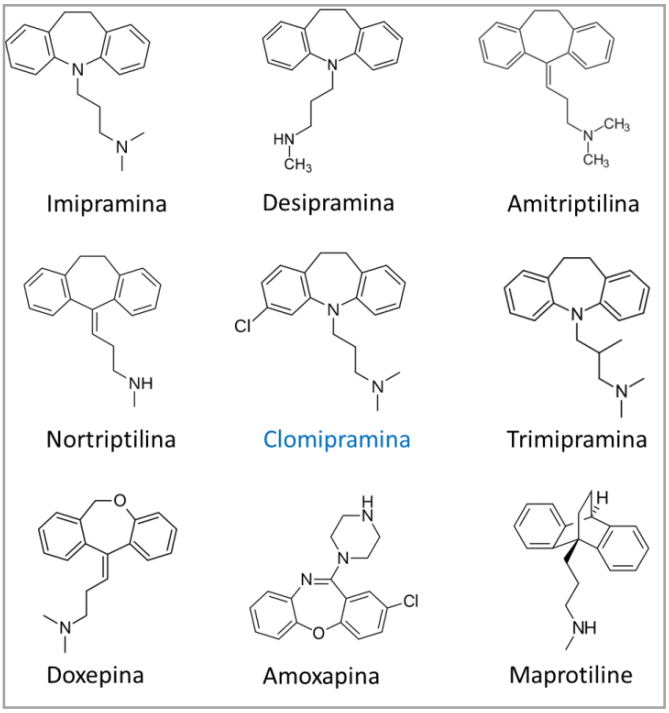


Figura 7: Antidepresivos tricíclicos. Clomipramina en azul, objeto de estudio.

Clomipramina: Inhibidor de la Tripanotiona reductasa

La clomipramina, es un fármaco del grupo de los antidepresivos tricíclicos. Es el inhibidor más potente de la TR de *T. cruzi* con un valor de constante de disociación (Ki) de 6,5 µM (Benson y col., 1992; O'Sullivan y col., 2015). Clomipramina posee un grupo etileno en la posición 10 y un cloro en la posición 2, como puede observarse en la figura 8 (Barioglio y col., 1987).

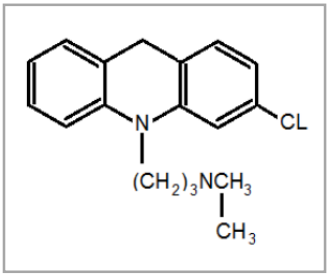


Figura 8: Estructura química de clomipramina

En estudios realizados en nuestro laboratorio en ratones infectados y tratados con clomipramina, se encontró que esta droga produjo la muerte de tripomastigotes y disminuyó

los síntomas de la miocardiopatía (Rivarola y col., 2005; Bazán y col., 2008; Gobbi y col., 2010; Fauro y col., 2013). La actividad del sistema activado tricíclico/peroxidasa a través de tres peroxidasas diferentes fue estudiado por Gutierrez-Correa y colaboradores (2001). Sus resultados apoyan la hipótesis según la cual los radicales catiónicos producidos por peroxidación de los fármacos tricíclicos inhiben a la TR. La figura 9 muestra la interacción de la clomipramina con la TR:

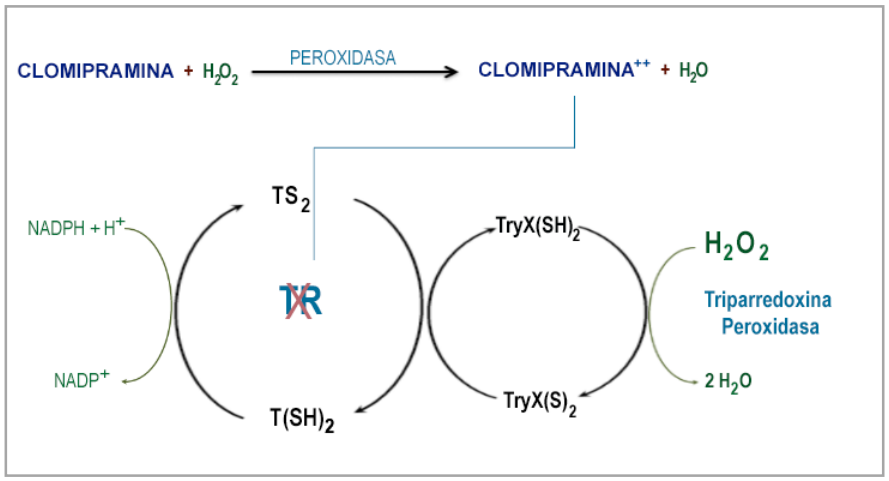


Figura 9: Interacción de clomipramina con TR. Modificado de Rivarola (2002).

Aparentemente clomipramina impacta en varios procesos en *T. cruzi* y se ha demostrado que tiene actividad anti-calmodulina, además de inhibir la TR (Barioglio y col., 1987).

Clomipramina se metaboliza principalmente por vía hepática mediante la acción de los citocromos P450, 2C19, 3A4 y 1A2. Otros fármacos que utilizan las mismas rutas de metabolización pueden provocar incrementos o reducciones de sus niveles plasmáticos. Además, posee tendencia a interaccionar con otros fármacos cuando se administran conjuntamente. Esta acción puede ser de tipo sinérgico (cuando el efecto aumenta) o antagonista (cuando el efecto disminuye).

1.7 Combinación de fármacos para el tratamiento antiparasitario

La combinación de fármacos es una práctica común en otras infecciones; algunas de ellas prolongadas, tales como el tratamiento antirretroviral (ARV) para VIH, la combinación de artesumato con amiodaquina o mefloquina para paludismo, nifurtimox con eflornitina para la *Trypanosomiasis africana* y stibogluconato de sodio con paromomicina para Leishmaniasis, son algunos ejemplos. La búsqueda de combinaciones para potenciar el efecto tripanocida puede llevarse a cabo combinando una de las dos drogas aprobadas (benznidazol o nifurtimox) con otro compuesto registrado para otra indicación pero con acción tripanocida o con compuestos nuevos en instancia de desarrollo.

Diferentes combinaciones para potenciar o generar sinergismo han sido propuestas utilizando drogas con mecanismos de acción diferenciados, tales como ketoconazol y benznidazol o ketoconazol y nifurtimox (Faúndez y col., 2008; de Almeida y col., 2009). Estas potenciales asociaciones permitirían que dos drogas obtengan al menos el mismo efecto tripanocida, con la eventual ventaja de poder disminuir las dosis actualmente recomendadas (Sosa-Estani y col., 2004). Un ejemplo de esta situación es la asociación del benznidazol con análogos heterocíclicos evaluados en estudios experimentales, donde se observó que el tratamiento oral de ratones infectados con *T. cruzi* con DB289 y benznidazol combinado tuvo mejor efecto en la sobrevida y en la reducción de la parasitemia cuando se comparaba con el efecto alcanzado con los tratamientos por separado (Batista y col., 2011). Actualmente diversos estudios realizan el cribado de fármacos utilizando métodos *in silico*, es decir simulación computacional a través de bases de datos. Un estudio utilizó la biblioteca de los fármacos aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) tomando aquellos fármacos que poseen actividad tripanocida y combinaciones sinérgicas. De 1969 compuestos analizados se encontraron veinticuatro compuestos activos contra el crecimiento de *T. cruzi*, entre ellos clomipramina y ocho pares de drogas tenían activad sinérgica (Planer y col., 2014).

Teniendo en cuenta la alta variabilidad biológica entre los diferentes genotipos de *T. cruzi* y su posible susceptibilidad diferencial a los fármacos de uso habitual, la utilización simultánea de drogas con diferente mecanismo de acción potenciaría el efecto tripanocida, permitiendo disminuir las dosis y de esa manera limitar los efectos adversos de los tratamientos.

Objetivos

2. Objetivos

Objetivo general:

Evaluar la variabilidad intraespecífica de diferentes aislamientos naturales de *Trypanosoma cruzi* en relación a su susceptibilidad a la combinación de benznidazol (Bz) y clomipramina (Clo).

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la actividad *in vitro* de Bz y Clo sobre tripomastigotes correspondientes a tres aislamientos de *T. cruzi* (SGO-Z12, Lucky y Casibla).

1.1 Determinar el efecto combinado de las drogas (antagónico, aditivo o sinérgico) sobre tripomastigotes de cultivo correspondientes a la cepa Y y a los tres aislamientos.

1.2 Evaluar la citotoxicidad de la combinación de Bz y Clo sobre células de mamíferos.

2. Determinar el efecto de la combinación de Bz y Clo en ratones infectados con los tres aislamientos de *T. cruzi*, en la etapa aguda de la infección.

2.1 Establecer las concentraciones de cada principio activo a ser utilizado para el estudio combinado de las mismas, sobre ratones infectados con la cepa Y.

2.2 Evaluar alteraciones histológicas en hígado, riñón e intestino para determinar posibles efectos tóxicos de los fármacos en el modelo murino.

3. Evaluar el efecto de las concentraciones de clomipramina utilizadas en el presente estudio sobre conductas relacionadas con la ansiedad en ratones no infectados e infectados con *T. cruzi*.

4. Tipificar los aislamientos de *T. cruzi* que fueron utilizados en el presente estudio.

4.1 Tipificar los parásitos presentes en sangre, músculo cardíaco y músculo esquelético de ratones infectados, utilizando diferentes marcadores moleculares.

4.2 Determinar el efecto de la combinación de las drogas sobre la distribución de parásitos de las diferentes UDTs en los distintos tejidos de los ratones infectados.

Materiales

y

Métodos

3. Materiales y Métodos

3.1 Análisis de drogas *in vitro*

Cultivo de células de mamíferos: las células $LLCMK_2$ (células epiteliales de riñón de mono Rhesus) fueron mantenidas en medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 2mM de L-glutamina, 10 % de suero fetal bobino (SFB) y 100 U/ml Penicilina y 100 ug/ml de Estreptomicina, buferado con bicarbonato de sodio. Las células se incubaron a 37ºC en una atmósfera de 5 % de CO_2.

Aislamiento y siembra de los parásitos: Se extrajo sangre de ratones infectados con los tres aislamientos de *T. cruzi* (dos obtenidos de individuos con infección con *T. cruzi* congénito, Casibla y Lucky; y uno a partir de un *Triatoma infestans* de Santiago del Estero, SGO-Z12) a los 15-21 días (tiempo correspondiente al pico de parasitemia), mediante punción cardíaca. Para obtener los parásitos libres de células sanguíneas, se lavó con DMEM. Se centrifugó a 400 rpm por 20 min y se tomó el sobrenadante donde se encontraron los parásitos; se realizaron diluciones según fue necesario, para obtener una concentración final de 10^7 parásitos/ml.

Infección celular: Se infectaron cultivos de células $LLCMK_2$ en monocapa con un 60 % de confluencia con tripomastigotes aislados de sangre de ratón infectado, como se explicó anteriormente. Se incubó a 37 °C. A las 72 h, una vez iniciada la liberación de formas tripomastigotes al medio de cultivo, fueron recolectados y la concentración de tripomastigotes vivos se determinó en cámara de Neubauer.

Fármacos: clomipramina (Clo) Anafranil® Novartis; y benznidazol (Bz), Abarax® Elea, Argentina; fueron previamente purificados:

- *Obtención de Bz:* Se molieron comprimidos (Abarax®) y dispersaron en etanol (agitación/calor 30min). Se filtró y el Bz se recristalizó por cambio de temperatura-solvente.
- *Obtención de Clo:* Se obtuvo por neutralización de la solución acuosa de la sal con NaOH. Se purificó por partición con 1,2 dicloroetano y posterior evaporación lenta.

Los fármacos purificados se disolvieron en dimethyl sulfoxido (DMSO), manteniendo una concentración final de DMSO que no excedió el 1 % v/v. Las soluciones de trabajo fueron preparadas en medio de cultivo DMEM antes de cada ensayo.
Las purificaciones de los fármacos fueron realizadas en la Unidad de Investigación y Desarrollo en Tecnología Farmacéutica (UNITEFA), Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Estudio Citotóxico: Para evaluar la citotoxicidad de las drogas, se aplicó el ensayo de MTT (bromuro de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolio) (Denizot y Lang, 1986). Este ensayo colorimétrico se basa en la capacidad de las mitocondrias viables para convertir el MTT, una sal de tetrazolio soluble en agua, en formazán de color púrpura e insoluble. Se incubaron 2,5 x 10^5 células/ml en placas de 96 pocillos con concentraciones de Bz de 1.000, 500, 250, 125, 62,5 y 0 µg/ml y Clo: 1.000, 500, 250, 125, 62,5, 31, 25 y 0 µg/ml a 37 °C en una atmósfera de CO_2 al 5 %. Después de 96 h de incubación, las células se lavaron con PBS (Buffer de fosfato pH 7.4; 137 mM de NaCl; 2.7 mM de KCl; 10 mM de NaHPO; 2mM de KH2PO; pH ajustado con HCl), y se añadieron 50 µL de MTT (2 mg/ml) a cada pocillo. Los cristales de formazán se solubilizaron en DMSO y la absorbancia se leyó a 570 nm en un lector de microplacas (Bio Tek - Power Wave XS). La concentración que reduce el 50% del valor de la absorbancia observada en el control representa la concentración citotóxica para 50% de las células (CC_{50}). Este estudio se realizó por triplicado.

Evaluación de la activad de Bz y Clo sobre tripomastigotes: Se midió la potencia y eficacia de cada una de las drogas sobre la cepa Y y los aislamientos SGO-Z12, Lucky y Casibla de *T. cruzi*. La potencia se define como la capacidad de un compuesto para reducir la infección a una concentración que generalmente coincide con la concentración efectiva media (EC_{50}). La eficacia se define como la actividad máxima (es decir, reducción de la infección) para el compuesto en estudio, independientemente de la concentración del compuesto. La figura 10 representa de la relación entre ambos conceptos. Para evaluar la potencia y la eficacia de las drogas se utilizaron placas de 96 pocillos, se incubaron 1x10^6 tripomastigotes/ml y se utilizaron concentraciones de Bz: 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 y 6 µg/mL y de Clo: 0,243; 0,487; 0,975; 1,95; 3,9; 7,8; 15,6 y 31; 25 µg/mL. Fueron incubados por 24h a 37 °C. Se utilizó el método de Brener (1962) para distinguir la viabilidad de los tripomastigotes. Para este método se tomó una alícuota de 5µL de cada muestra del pocillo

y se colocó en un portaobjeto e inmediatamente se contaron los parásitos con microscopio óptico (50 campos).

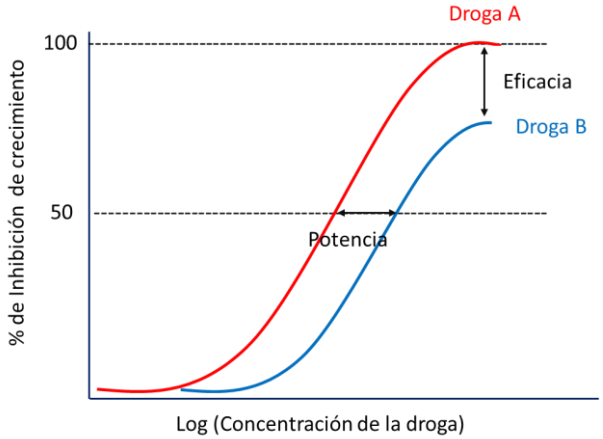


Figura 10: Potencia y eficacia de droga A y B para estudios *in vitro*.

Análisis combinado de Bz y Clo sobre tripomastigotes: Para evaluar el efecto de Clo asociado con Bz se utilizaron placas de 96 pocillos, se incubaron $1x10^6$ tripomastigotes/ml y se utilizaron y combinaron concentraciones de Bz: 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 y 6 µg/mL y de Clo: 0,243; 0,487; 0,975; 1,95; 3,9; 7,8; 15,6 y 31; 25 µg/mL. Los parásitos fueron incubados con las drogas por 24 h a 37 °C. Se utilizó el método de Brener (1962), previamente descripto, que permitió distinguir la viabilidad de los tripomastigotes.

Para determinar el mecanismo del efecto combinado de ambos fármacos se realizó el cálculo del **Índice de Combinación** (CI, Combination Index) con el algoritmo de Chou-Talalay (Chou y Talalay, 1984; Chou, 2006):

$$\mathbf{CI} = (C_{A,x} / IC_{x,A}) + (C_{B,x} / IC_{x,B})$$

Donde los denominadores ($IC_{x,A}$) y ($IC_{x,B}$) son las dosis de cada fármaco expuesto de manera única y que produce una inhibición en el crecimiento de x %; los numeradores ($C_{A,x}$) y ($C_{B,x}$), las dosis de esos mismos compuestos administrados en combinación y que producen la misma inhibición del crecimiento (x %), es decir, que son isoefectivos. Existen tres posibles resultados con este algoritmo: CI<1, donde el efecto de la combinación es sinérgico; CI=1, que implica un comportamiento aditivo; y CI>1, lo que se traduce en un efecto antagónico. De acuerdo al rango de CI, el efecto se puede definir como: muy fuerte antagonismo (CI: 10), fuerte antagonismo (CI: 3,3-10), antagonismo (CI: 1,45-3,3), moderadamente antagónico (CI: 1,20-1,45), levemente antagónico (CI: 1,10-1,20), aproximadamente aditivo (CI: 0,90-1,10), levemente sinérgico (CI: 0,85-0,90), moderadamente sinérgico (0,7-0,85), sinergismo

(CI: 0,3-0,7), fuerte sinergismo (CI: 0,1-0,3) y muy fuerte sinergismo (CI<0,1) (Chou, 2006).

También se representaron las combinaciones de los fármacos a través **Isobologramas** (Loewe, 1953, Chou y Talalay, 1984; Chou, 2006): representaciones gráficas en un eje de coordenadas de dosis que producen un efecto determinado de cada uno de los fármacos empleados individualmente y de su combinación (Figura 11). En cada uno de los ejes se representa la dosis isoefectiva de cada fármaco a estudiar y estos puntos se unen mediante una línea o isobola (también llamada línea de aditividad). Seguidamente, se representa el valor de las dosis de ambos fármacos en la combinación que presentan el mismo efecto que por separado. Si este punto se encuentra por debajo de la línea de aditividad, la combinación es sinérgica; si está por encima, existe antagonismo y si está sobre la línea el efecto es aditivo.

Los estudios se realizaron por triplicado y con cada uno de los asilamientos ya que éstos pueden presentar susceptibilidad diferencial a los fármacos.

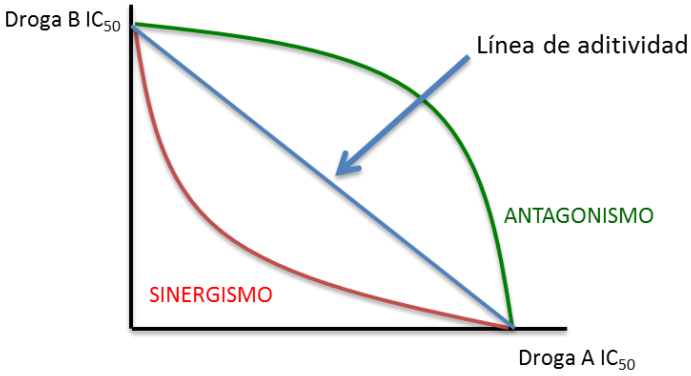


Figura 11: Gráfico de Isobolograma. Modelo teórico para la combinación de las drogas A+B.

3.2 Análisis tripanocida *in vivo*

Infección y tratamiento: ratones Albino suizos adultos (machos y hembras exocriados, peso promedio 30 ± 1g) fueron inoculados intraperitonealmente con 50 tripomastigotes de cada aislamiento. Los fármacos que se utilizaron fueron clomipramina y benznidazol.

Previamente al diseño del esquema de tratamiento, se realizó un estudio con diferentes concentraciones de fármacos para seleccionar las concentraciones mínimas que presentan efecto tripanocida y que fueron luego utilizadas para el tratamiento combinado: Bz+Clo.

Para ello se inocularon intraperitonealmente ratones Albino suizos adultos (machos y hembras) con 50 tripomastigotes de la cepa Y de *T. cruzi* y se utilizó el siguiente diseño:

NI-NT: no infectado y no tratado (n=6).
INT: infectado no tratado, grupo control (n=6).
Bz 100 mg/kg/día
Bz 50 mg/kg/día
Bz 25 mg/kg/día
Bz 12,5 mg/kg/día
Bz 6,25 mg/kg/día
Clo 10 mg/kg/día
Clo 5 mg/kg/día
Clo 2,5 mg/kg/día
Clo 1,25 mg/kg/día:
} Los fármacos se administraron diariamente por 30 días vía oral (n=6).

La efectividad del tratamiento se estudió mediante:

Sobrevida: fue monitoreada diariamente.
Parasitemia: los parásitos se contaron en cámara de Neubauer, en muestras de sangre de 5 µL obtenida de la cola de los ratones cada 7 días.
Parasitemia utilizando qPCR: De los 6 ratones infectados y tratados de cada grupo se eligieron 3 animales al azar y se analizaron las muestras de sangre extraídas en la etapa aguda de la infección (35 días post infección–d.p.i.) (Bustamante y col., 2003; Lo Presti y col., 2014). Esta técnica se describe en detalle en la sección 3.4.

A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron las concentraciones mínimas de Bz y Clo efectivas (que redujeron la infección), para ser utilizadas en el tratamiento combinado.
El efecto de las drogas sobre la infección experimental se estudió agrupando los ratones del siguiente modo:

NI-NT: ratones no infectados y no tratados, tomados como control (n=6). Se les administró agua vía oral para que todos los animales se encuentren bajo las mismas condiciones experimentales.
INT: ratones infectados con cada uno de los aislamientos y no tratados (n=6).

Ratones no infectados y tratados con:

Bz100: se trató a los ratones con Bz 100 mg/kg/día (Caldas y col, 2008) (n=6).

Bz6,25: se trató a los ratones con Bz 6,25 mg/kg/día (n=6).

Clo5: se trató a los ratones con Clo5 mg/kg/día (Rivarola y col, 2001) (n=6).

Clo1,25: se trató a los ratones con Clo 1,25 mg/kg/día (n=6).

Bz6,25+Clo1,25: se trató a los ratones con 6,25 mg/kg/día de Bz y 1,25 mg/kg/día de Clo (n=6).

Ratones infectados con cada uno de los tres aislamientos de *T. cruzi* y tratados con:

Bz100: se trató a los ratones con Bz 100 mg/kg/día (Caldas y col, 2008) (n=6).

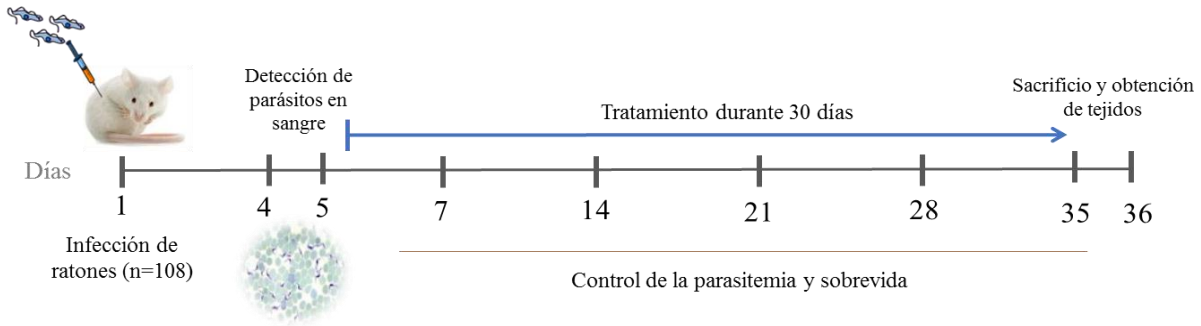
Bz6,25: se trató a los ratones con Bz 6,25 mg/kg/día (n=6).

Clo5: se trató a los ratones con Clo 5 mg/kg/día (Rivarola y col, 2001) (n=6).

Clo1,25: se trató a los ratones con Clo 1,25 mg/kg/día (n=6).

Bz6,25+Clo1,25: se trató a los ratones con 6,25 mg/kg/día de Bz y 1,25 mg/kg/día de Clo (n=6).

En todos los grupos los fármacos se administraron diariamente por 30 días vía oral. En los grupos infectados, el tratamiento comenzó entre los 4 y 5 días post infección, luego de la detección de parásitos en sangre, como se muestra en el diagrama a continuación.



La efectividad del tratamiento se estudió mediante:

Sobrevida: monitoreada diariamente.

Parasitemia: los parásitos se contaron en cámara de Neubawer, en muestras de sangre de 5 µL obtenidas de la cola de los ratones cada 7 días.

Parasitemia utilizando qPCR: De los 6 ratones infectados y tratados de cada grupo se eligieron 3 animales al azar y se analizaron las muestras de sangre, músculo cardíaco

(ventrículo izquierdo) y músculo esquelético (miembro posterior derecho), extraídas a los 35 d.p.i. Esta técnica se describe en detalle en la sección 3.4.

Estudios histológicos: Finalizado el tratamiento, se extrajeron muestras de hígado, riñón e intestino a 3 animales de cada grupo infectado con los 3 aislamientos y con la cepa Y, con el fin de evaluar las alteraciones estructurales debido a los posibles efectos tóxicos de las drogas. Los tejidos se fijaron en formol bufferado al 10 % (pH 7,0) y se incluyeron en parafina. Los cortes de 5 μm de espesor fueron coloreados con hematoxilina-eosina (n=270 muestras). Para cada sección de tejido se analizaron al microscopio aproximadamente 10 campos utilizando los aumentos totales (aumento del obejetivo x aumento del ocular): 100x, 200x, 400x, 600x, y se examinaron tres diferentes secciones del tejido por cada ratón. Las muestras se clasificaron de la siguiente manera: (-) sin alteraciones, (+): leves infiltrados inflamatorios (≥ 1 foco inflamatorio), (++) moderada infiltración inflamatoria (≥ 2 focos inflamatorios) y (+++) extensa inflamación y necrosis.

También se extrajeron muestras de músculo cardíaco (ápice) y músculo esquelético (miembro posterior derecho) (n=180 muestras) que se procesaron y tiñeron como se menciona anteriormente. Se analizaron tres secciones diferentes del tejido por cada ratón y se determinó el número de infiltrados inflamatorios utilizando fotografías correspondientes al aumento 40x. El porcentaje de área de tejido cubierta de infiltrados inflamatorios se cuantificó utilizando el programa ImageJ.

Todos los ratones fueron sacrificados mediante anestesia con ketamina ClH (Ketalar®, Parke Davis, Warner Lambert Co, EE.UU.) (10 mg / Kg) y las muestras de sangre fueron obtenidas por punción cardíaca de acuerdo con las normas establecidas por el Reglamento para el cuidado y uso de animales de experimentación en dependencia de la Facultad de Ciencias Médicas y Facultad de Odontología. Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, Universidad Nacional de Córdoba.

3.3 Estudio de conducta

La infección por *T. cruzi* produce cambios evidentes en el comportamiento en ratones. Un trabajo realizado en ratones de la cepa Suizos Webster mostró cambios clínicos y de comportamiento a partir de la segunda semana de la infección como por ejemplo: posturas encorvadas, los ojos cerrados, descamación de la piel, aumento de la piloerección,

postración, aislamiento social, disminución significativa en el peso corporal y disminución significativa de la actividad locomotora (Campos y col., 2016).

Clomipramina presenta efectos sedativos o ansiolíticos y es utilizada para dolores crónicos (Rebolledo Marchesini y col., 2004). Estudios realizados en nuestro laboratorio mostraron que esta droga (a una concentración de 5 mg/kg/día) no ocasiona cambios clínicos, como ser alteraciones cardíacas e histopatológicas en ratones Albino Suizos no infectados e infectados con *T. cruzi* con la cepa Tulahuen (Rivarola y col., 2005, Strauss y col., 2013). Sin embargo, no se ha comprobado aún su efecto sobre la conducta de ansiedad en ratones infectados con *T. cruzi*.

Laberinto elevado en cruz (plus maze): **s**e realizó la prueba del laberinto elevado en cruz que es un modelo válido para evaluar ansiedad (File y col., 1998; Rahman y col., 2015). Esta prueba fue validada primero en ratas y luego en ratones (Montgomery 1955; Lister 1987). El mismo se fundamenta en la aversión natural que presentan los animales por los espacios abiertos y a la altura, en este caso cuando son colocados en el laberinto elevado en cruz. En condiciones normales, los animales tienden a evitar los brazos abiertos (BA) y a permanecer más tiempo en los brazos cerrados (BC). El número de entradas, tiempo de permanencia, porcentaje de entradas o porcentaje de tiempo en los brazos abiertos son indicativos de índices de ansiedad.

El aparato que se utilizó consistió en una versión modificada del descripto por Montgomery (1955). El mismo constó de dos BA de 30 cm de largo por 5 cm de ancho y dos BC de 30 cm de largo por 5 cm de ancho por 15 cm de alto extendidos a partir de la plataforma central (PC) de 5 cm por 5 cm, ubicado sobre un soporte a 40 cm del suelo. El piso, la PC y las paredes de los BC fueron de madera de color negro. Para evitar que el animal se caiga, los BA estaban dotados de una baranda de acrílico transparente de 1 cm de alto (figura 12).

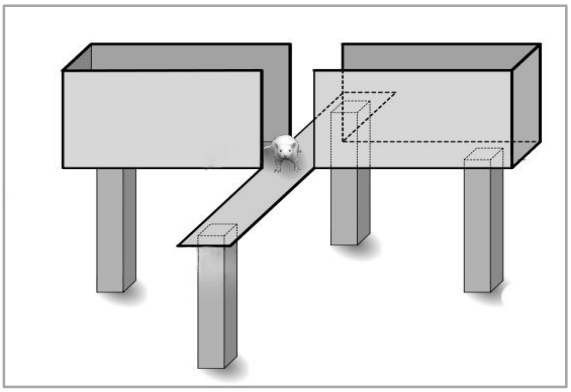


Figura 12: Diagrama del laberinto elevado en cruz.

Para el estudio de conducta se utilizó el siguiente diseño:

NI + **Vehículo**: no infectado y tratado con agua (n=10)

NI + **Clo 5 mg/kg/día**: (n=10)

NI + **Clo 1,25 mg/kg/día**: (n=10)

INT + **Vehículo:** infectado y tratado con agua (n=20)

INT + **Clo 5 mg/kg/día**: (n=15)

INT + **Clo 1,25 mg/kg/día**: (n=15)

Tratamiento e infección: en todos los grupos se utilizaron ratones Albino suizos adultos exocriados (peso promedio 30 ± 1g). Se utilizaron únicamente machos debido a que las hembras presentan variaciones en la conducta de ansiedad asociadas al ciclo reproductivo que depende del estado funcional del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Carlini y col., 2008). Los grupos infectados fueron inoculados intraperitonealmente con 50 tripomastigotes de la cepa Y de *T. cruzi*. Las diferentes concentraciones de Clo y el vehículo se administraron vía oral durante 30 días consecutivos. La prueba fue realizada 24 h después de la finalización del tratamiento durante cinco minutos, para ello el ratón se colocó en el centro del aparato con dirección hacia un brazo cerrado. Antes de cada prueba, los animales fueron habituados durante 1 h y el aparato fue lavado con una solución de etanol al 70 % y luego secado. En todos los casos el test se realizó entre las 8:00 y las 10:00 h.

Se cuantificaron los siguiente parámetros: n° de entradas en los brazos abiertos, n° de entradas en los brazos cerrados y tiempo de permanencia en los en los brazos abiertos, en brazos cerrados y en el cuadrado central. Los resultados se expresaron como: (I) porcentaje del N° de entradas a brazos abiertos, (II) porcentaje de tiempo de permanencia en brazos abiertos y (III) número total de entradas.

3.4 Detección de *T. cruzi* y tipificación molecular del linaje

Parásitos para la infección experimental: se utilizaron tripomastigotes de *T. cruzi* pertenecientes a 3 aislamientos diferentes: el aislamiento SGO-Z12 obtenido de un insecto vector de Santiago del Estero, zona endémica de nuestro país (Bustamante y col., 2003; Lo Presti y col., 2009) y caracterizado isoenzimáticamente como perteneciente al zimodema 12 de Montamat y colaboradores (1996) y dos aislamientos de *T. cruzi* obtenidos de individuos con infección congénita: Lucky (Triquell y col., 2009) y Casibla (Lo Presti y col., 2014). Estos aislamientos han sido mantenidos en el laboratorio por infecciones sucesivas cada 15 días en ratones Albino suizos.

Infección de ratones: 18 ratones Albino suizos adultos, machos y hembras exocriados, fueron inoculados intraperitonealmente con tripomastigotes de cada uno de los aislamientos de la siguiente manera:

- **Grupo 1:** ratones (n=6) infectados con 50 tripomastigotes del aislamiento SGO-Z12.
- **Grupo 2:** ratones (n=6) infectados con 50 tripomastigotes del aislamiento Lucky.
- **Grupo 3:** ratones (n=6) infectados con 50 tripomastigotes del aislamiento Casibla.

La **sobrevida** de cada uno de los grupos fue monitoreada diariamente a lo largo de la infección experimental. De los 6 ratones infectados de cada grupo se eligieron 3 animales al azar (Mejía y Triana, 2005), para ser sacrificados en la etapa aguda. Se recolectó la sangre de estos animales y se les extrajo corazón (ventrículo izquierdo) y muestras de músculo esquelético (miembro posterior derecho).

Extracción de ADN: la extracción de ADN de las muestras de sangre y tejido de animales infectados se realizó de acuerdo a lo descripto por Ávila y colaboradores (1991) y Levitan y Grosberg (1993), respectivamente. Las muestras de sangre de cada ratón se mezclaron con igual volumen de guanidina 6 M/EDTA 0,2 M. Para la extracción de tejido se tomó 30 mg de muestra. El ADN se extrajo por técnicas convencionales con fenol:cloroformo: alcoholisoamílico (Lachaud y col, 2001) y luego se precipitó con etanol. Finalmente la solución se resuspendió en agua estéril libre de nucleasas. Se conservó a -20º C hasta su uso (Wincker y col., 1994) para la amplificación del contenido de ADN del parásito por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Tipificación del linaje de *T. cruzi* infectante en cada muestra mediante PCR: la presencia de *T. cruzi* en cada muestra se determinó mediante la amplificación de un fragmento de 188 pb correspondiente al ADN nuclear del parásito utilizando dos oligonucleótidos específicos: **TCZ-1** (5'-CGAGCTCTTGCCCACACGGGTGCT-3') y **TCZ-2** (5'-CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3') (Virreira y col, 2003).

La tipificación molecular de *T. cruzi* en las muestras de sangre y de tejido de cada ratón en la etapa aguda (35 d.p.i.) se determinó mediante la amplificación por PCR de tres fragmentos diferentes que permiten, en conjunto, determinar el linaje de *T. cruzi* presente en cada tejido (Brisse y col., 2001; Steindel y col., 2008; Velazquez y col., 2008; Ramírez y col., 2010) (figura 13):

- el espaciador intergénico de los genes del miniexón, utilizando un pool de oligonucleótidos: **TC1** (5'-GTGTCCGCCACCTCCTTCGGGCC-3'), **TC2** (5'-CCTGCAGGCACACGTGTGTGTG-3') y **TC** (5'-CCCCCCTCCCAGGCCACA CTG-3'); (Souto y col., 1996, Mejía-Jaramillo y col., 2009).
- el gen de la subunidad 24Sα del ARN ribosómico, utilizando los oligonucleótidos **D71** (5'-AAGGTGCGTCGACAGTGTGG-3') y **D72** (5'-TTTTCAGAATGGCCG AACAGT-3') (Souto y col., 1996).
- el gen de la subunidad 18S del ARN ribosómico, utilizando los oligonucleótidos **V1** (5'-CAAGCGGCTGGGTGGTTATTCCA-3') y **V2** (5'-TTGAGGGAAGGC AT GACACATGT-3') (Clark y Pung, 1994).
-

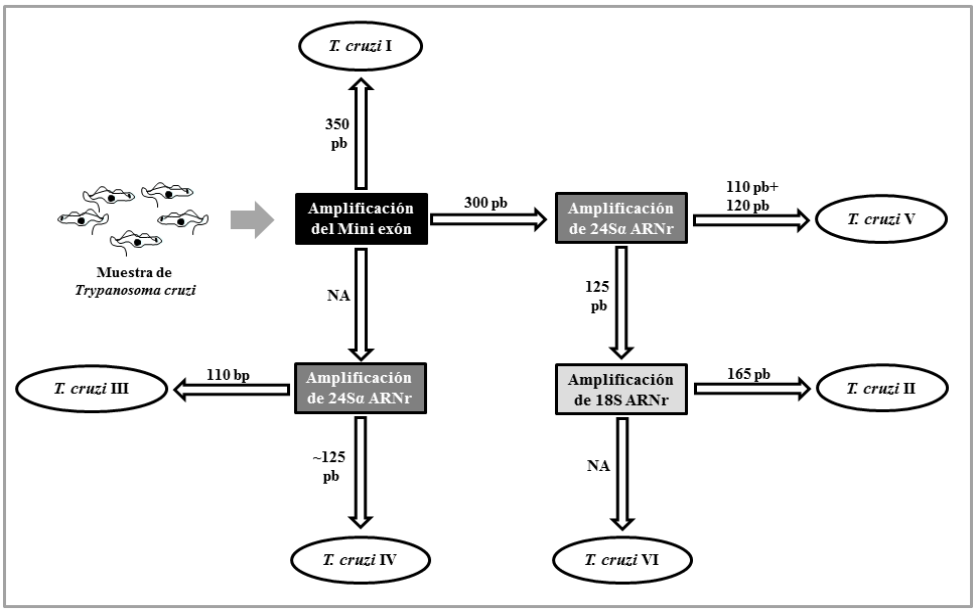


Figura 13: Algoritmo utilizado para la clasificación el linaje de *T. cruzi* utilizando tres marcadores moleculares (adaptado de Ramírez y col., 2010). NA: no amplifica; pb: pares de bases.

Con el fin de confirmar el linaje *T. cruzi* presente en cada tejido, se utilizó un segundo set de marcadores moleculares descripto por Cosentino y Agüero (2012): la amplificación seguida de la digestión del amplicón TcSC5D con una mezcla de enzimas Sph I y Hpa I, se traduce en un único patrón para todos las UDTs, excepto para las UDT TcV y TcVI, que no pueden ser diferenciadas; para poder diferenciarlas se realizó la amplificación del amplicón TcMK seguida por la digestión con la enzima Xho I. En la figura 14 se puede observar una representación esquemática de los fragmentos de restricción esperados para cada UDT. El fragmento de 832 pb del gen TcSC5D fue amplificado utilizando oligonucleótidos **TcSC5D-fwd** (5´-GGACGTGGCGTTTGA TTTAT-3´) y **TcSC5D-rev** (5´-TCCCATCTTCTTCG TTGACT-3´) y un fragmento de 537 pb del gen TcMK se amplificó utilizando **Tc-Mev-kinase26-fwd** (5´-TTTTTGCATG TCATTTTGG-3´), **Tc-Mev-kinase662-rev** (5´-AGC GGTCTTGTAATGAGCAC-3´). Las enzimas de restricción (Hpa I, Sph I y Xho I -New England Biolabs, Inc.) se utilizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante (37 ºC durante 1 h); en todos los casos la reacción finalizó con una solución de stop (50% de glicerol, 50 mM EDTA pH 8,0, y 0,05% azul de bromofenol) después del tiempo de incubación.

Epimastigotes correspondientes a las cepas Y (TcII) y Tulahuen (TcV) se utilizaron como patrones comparativos de la tipificación.

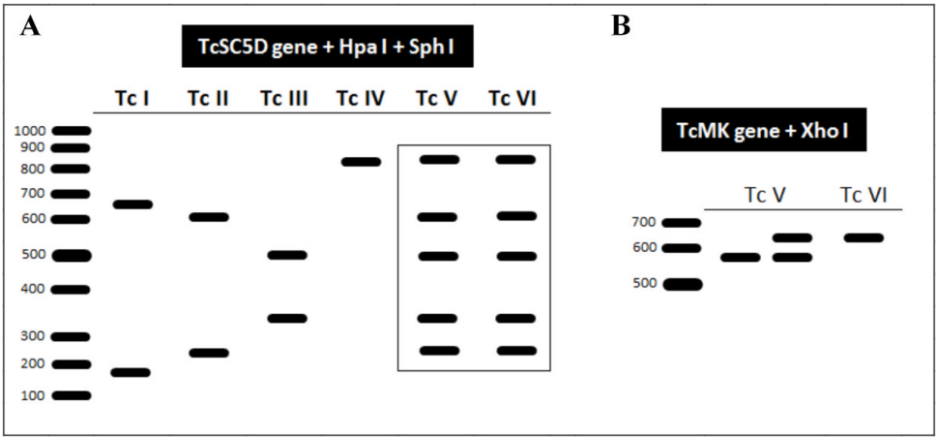


Figura 14: Esquema utilizado para la clasificación el linaje de *T. cruzi* utilizando dos marcadores moleculares (Cosentino y Agüero, 2012): A) fragmentos de restricción esperados después de la digestión del amplicón TcSC5D con una mezcla de Sph I y Hpa I; B) fragmentos de restricción esperados después de la digestión del amplicón TcMK con XhoI para diferenciar muestras Tc V y Tc VI.

La presencia de inhibidores en las muestras de ADN se descartó mediante la amplificación de un gen constitutivo del huésped (β-actina) de 289 pb, utilizando los oligonucleótidos correspondientes: **β-act-fwd** (5'-CGGAACCGCTCATTGCC-3') y **β-act-rev** (5'-AAC CAC ACTGTGCCCATCTA-3'). Los componentes de cada una de las reacciones y las condiciones de amplificación para cada PCR se describen en las tablas 1 y 2 respectivamente. En todos los casos, los productos de PCR se separaron mediante geles de agarosa al 2,5% teñido con bromuro de etidio y se observaron bajo luz UV.

Tabla 1. Componentes de cada una de las reacciones para la amplificación de los diferentes marcadores moleculares.

Marcador molecular	Tris-Cl (pH 8,4)	KCl	Cl_2Mg	dNTPs	Taq	Oligonucl.	ADN (muestra)	Volumen final
TCZ	10 mM	50 mM	1,5 mM	200 µM	0.5 U	25 ρmols	~ 2,5 ηg	25 µL
Mini-exón	10 mM	50 mM	1,75 mM	200 µM	1 U (HS)	25 ρmols	~ 5 ηg	50 µL
24Sα ARNr	10 mM	50 mM	2 mM	200 µM	1 U	20 ρmols	~ 4 ηg	50 µL
18S ARNr	10 mM	50 mM	2 mM	200 µM	1 U (HS)	20 ρmols	~ 4 ηg	50 µL
TcSC5D	10 mM	50 mM	1.6 mM	200 µM	1.5 U	10 ρmols	~ 5 ηg	25 µL
TcMK	10 mM	50 mM	1.6 mM	200 µM	2 U	10 ρmols	~ 5 ηg	25 µL
β-actina	10 mM	50 mM	1,5 mM	200 µM	0.5 U	10 ρmols	~ 2,5 ηg	25 µL

HS: Taq Polimerasa Hot start.

Tabla 2. Condiciones de reacción para la amplificación de cada uno de los marcadores moleculares

Marcador molecular	Desnaturalización inicial	Número de ciclos	Cada ciclo consistió de:			Extensión final
			Desnaturalización	Hibridación	Extensión	
TCZ	4 min; 95ºC	40	30 s; 95ºC	30 s; 60ºC	30 s 72ºC	5 min; 72ºC
Mini-exón	2 min; 94ºC	30	30 s; 94ºC	30 s; 55ºC	30 s; 72ºC	7 min; 72ºC
24Sα ARNr	1 min; 94ºC	30	30 s; 94ºC	30 s; 60ºC	30 s; 72ºC	7 min; 72ºC
18S ARNr	2 min; 94ºC	30	30 s; 94ºC	30 s; 50ºC	30 s; 72ºC	7 min; 72ºC
TcSC5D	4,5 min; 94ºC	35	30 s; 94ºC	30 s; 58ºC	30 s; 72ºC	5 min; 72ºC
TcMk	4,5 min; 94ºC	35	30 s; 94ºC	30 s; 58ºC	30 s; 72ºC	5 min; 72ºC
β-actina	4 min; 95ºC	30	30 s; 95ºC	30 s; 60ºC	30 s; 72ºC	5 min; 72ºC

En todos los casos, las amplificaciones se llevaron a cabo en un Termociclador para ADN (Ivema T-18).

Determinación de la presencia del *T. cruzi* en sangre, músculo esquelético y cardíaco de animales infectados y tratados, por qPCR: La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) se realizó utilizando muestras de ratones de cada grupo infectado y tratado (con el esquema de tratamiento que se muestra posteriormente) extraídos a los 35 d.p.i. correspondiente a la etapa aguda de la infección. La detección de *T. cruzi* en cada muestra se realizó por amplificación de un fragmento nuclear de 188 pb del ADN del parásito usando dos oligonucleótidos específicos: **TCZ-1** y **TCZ-2**, la calidad de las muestras se verificó mediante la amplificación del gen del huésped (β-actina). La qPCR se realizó utilizando el kit KAPA SYBR Fast qPCR Master Mix (2X) (Kapa Biosystems) con 10 ng de ADN genómico total (gDNA). Las muestras se amplificaron en termocilclador Q Rotor-Gene (Quiagen); se utilizaron los componentes que se muestran en la tabla 3 y las condiciones que se encuentran en la tabla 4.

Tabla 3. Componentes de la reacción para la amplificación del fragmento TCZ mediante qPCR.

Componentes	20 µL rxn	Concentración Final
Kapa Sybr Fast qPCR Master Mix (2X)	10 µL	1X
TCZ-1	0,4 µL	200 nM
TCZ-1	0,4 µL	200 nM
ADN	2 µL*	~ 10 ŋg
Agua para PCR	7,2 µL	-

* Muestras de ADN diluidas con una concentración final de 5ng/µL. rxn: volmen final de la reacción

Tabla 4. Condiciones de reacción para la amplificación del fragmento TCZ mediante qPCR.

Paso	Temperatura	Duración	Ciclos
Activación de la enzima / Desnaturalización del ADN	95 ºC	3 min	Hold
Desnaturalización	95 ºC	15 seg	40 ciclos
Hibridación	55 ºC	30 seg	
Extensión	72 ºC	30 seg	

Las reacciones se realizaron por triplicado y se incluyó un control negativo en cada amplificación.

Previamente a la amplificación de las muestras se realizó una curva de calibración con concentraciones conocidas de epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi*. Se partió de una muestra de 10^7 parásitos/mL, se extrajo el ADN como se mencionó anteriormente y se amplificó por PCR el fragmento de interés (TCZ). Luego se realizaron nueve diluciones en

serie del ADN, con agua ultrapura, (1:10) hasta obtener una concentración de 0,1 parásitos/mL y se amplificó, por triplicado, el fragmento TCZ a través qPCR.

La curva de calibración se graficó interpolando los valores de Ct (Cycle threshold o ciclo umbral, equivalente al número de ciclos necesarios para que cada curva alcance un umbral en la señal de fluorescencia) de las muestras con el logaritmo del factor de dilución del número de copias del ADN de las muestras.

Para evaluar la cantidad del ADN de interés en cada una de las muestras, se tomó en cuenta la eficiencia de la amplificación. El Ct se asigna sólo durante la fase geométrica de la amplificación donde ésta es 100 % eficiente.

La eficiencia se calculó con la siguiente fórmula:

$E = 10^{-1}/k - 1$

Donde K es la pendiente de la recta.

La eficiencia se consideró satisfactoria cuando no fue inferior a 90 % y no por encima de 110 % (Wong y Medrano, 2005). De esta manera la recta obtenida permitió calcular las concentraciones desconocidas de las muestras.

Detección de los linajes TcII y TcVI en las muestras de sangre, músculo esquelético y cardíaco de animales infectados y tratados: una vez conocidos los linajes (UDTs) que conforman los tres aislamientos en estudio y detectada la presencia de *T. cruzi* en cada una de las muestras, se optó por la utilización del fragmento A-10 adaptado por Burgos y colaboradores (2007). El polimorfismo del fragmento A-10 fue originalmente descripto por Brisse y colaboradores (Brisse y col., 2000) en un trabajo donde identifican fragmentos amplificados diferencialmente en las distintas UDT por la técnica de RAPD, que utiliza pequeños oligonucleótidos con secuencias al azar. El fragmento A-10 es una secuencia repetitiva de bajo número de copias, polimórfica, no codificante que utiliza una sola reacción de qPCR y la observación de las temperaturas de melting, para la identificación de los linajes TcII y TcVI. La temperatura de melting (Tm), de disociación o de separación de las hebras, es una medida de la estabilidad de los híbridos (complejo templado-oligonucleótido), definida como la temperatura a la cual 50 % de los híbridos se encuentran formados y 50 % permanecen disociados. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del fragmento A10 de *T. cruzi* (Brisse y col., 2000) fueron: **Pr1** (5'-CCGCTAAGCAGTTCTGTCCATA-3') y **Pr3** (5'-TGCTTTATTACCCCATGCCACAG-3') que generan fragmentos de 580 pb (identificando a TcII) y/o 525 pb (identificando a TcVI). TcII presenta un pico en la curva de temperatura de melting a 80,2 ± 0,2 ºC y TcVI a 82 ± 0,2 ºC (figura 15). Cabe destacar

que estas temperaturas pueden variar levemente de acuerdo a los reactivos y equipos utilizados, y las mismas son adecuadas para tipificar siempre que se mantenga una diferencia de 2°C entre ellas. Los productos de la qPCR fueron se observaron mediante geles de agarosa al 3 % teñidos con bromuro de etidio y se observaron bajo luz UV. En las tablas 5 y 6 se encuentran los componentes y las condiciones para la amplificación del fragmento Pr.

Tabla 5. Componentes de reacción para la amplificación del fragmento A10 mediante qPCR.

Componentes	20 µL rxn	Concentración Final
Kapa Sybr Fast qPCR Master Mix (2X)	10 µL	1X
Pr 1	0,3 µL	0,5 µM
Pr 3	0,3 µL	0,5 µM
ADN	5 µL	~ 10 ηg
Agua para PCR	4,4 µL	-

rxn: volmen final de la reacción

Tabla 6. Condiciones de reacción para la amplificación del fragmento A10 mediante qPCR.

Paso	Temperatura	Duración	Ciclos
Activación de la enzima / Desnaturalización del ADN	95 ºC	10 min	Hold
Desnaturalización	95 ºC	30 seg	40 ciclos
Hibridación / Extención	60 ºC	2 min	
Temperatura de Melting	95 ºC	15 seg	
	70 ºC	1 min	
	90 ºC	30 seg	
	60 ºC	15 seg	

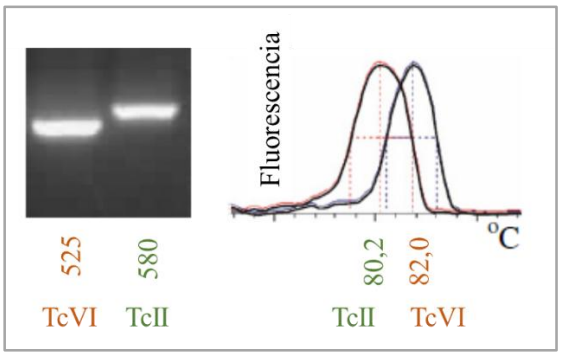


Figura 15: Se observa el patrón de bandas obtenidas a partir de la amplificación del fragmento A10 en un gel de agarosa y las temperaturas de melting (Burgos y col., 2007).

Tipificación del aislamiento Casibla utilizando el algoritmo de qPCR con sondas TaqMan: Esta determinación se realizó en conjunto con el grupo del Dr. Alejandro G. Schijman del Laboratorio del Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas, correspondiente al Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular "Dr. Héctor N. Torres" de la ciudad autónoma de Buenos Aires.

El diagrama utilizado para la identificación de las UDTs mediante qPCR utilizando sondas TaqMan (MTQ-PCR) se muestra en la figura 16. Las concentraciones de oligonucleótidos y las secuencias se detallan en la Tabla 7. Las sondas TaqMan fueron adquiridas en Technologies, Inc. (EE.UU.). Las amplificaciones de los loci nucleares de la región intergénica del miniexón (SL-IR) y de los genes de la citocromo oxidasa II, y del ADNr 18S (18S-COII MTQ-PCR) se llevaron a cabo utilizando 1X QIAGEN Multiplex PCR Kit (QIAGEN, EE.UU.). Para la amplificación del gen de la subunidad 24Sα del ARN ribosómico (24Sα-III / IV MTQ-PCR) se utilizó 1X FastStart Sonda universal Master (Roche, Alemania). Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo con 2 µL de ADN (5ng/µL) en un volumen final de 20 µL. Las condiciones de reacción para la amplificación de SL-IR y 18S-COII MTq-PCR fueron inicialmente 15 min. a 95 °C seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 30 seg. y 60 °C durante 1 min. Las condiciones de reacción para la amplificación de 24Sα-III/IV fueron inicialmente 10 min a 95 °C seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 30 seg. y 57 °C durante 1 min. (Cura y col., 2015). Para realizar las amplificaciones se utilizó el equipo Applied Biosystems (ABI 7500, EE.UU.)

La PCR SL-IR MTq diferencia las UDTs del grupo TcII/V/VI (que presentan señal de fluorescencia en el canal de HEX), con las UDTs TcIII y TcIV (que evidencian señal fluorescente en los canales de Quasar 670, CAL Fluor Red 610, o en ambos) y con la UDT TcI (que presentan señal de fluorescencia en el canal de FAM).

La tipificación de las UDTs pertenecientes al grupo TcII/V/VI se realizó mediante la detección de secuencias polimórficas de los genes de ADNr 18S y de la COII.

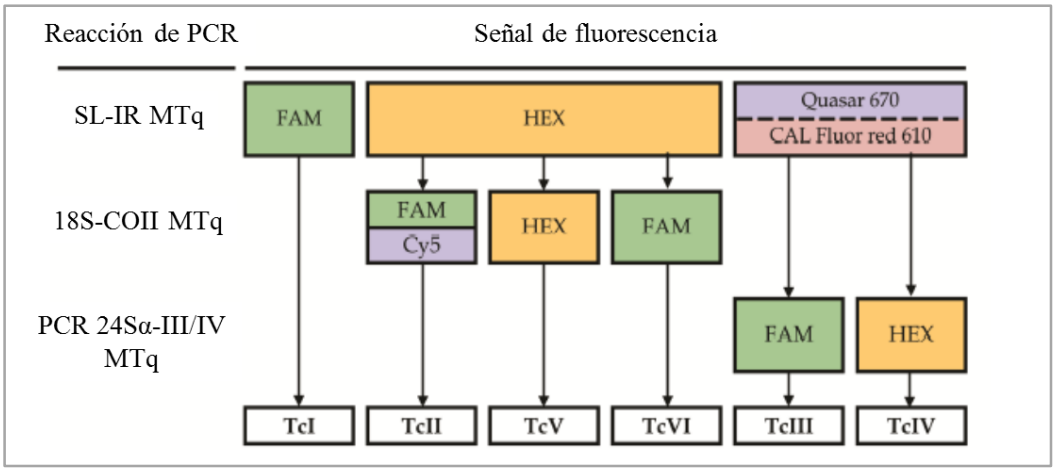


Figura 16: Algoritmo de qPCR multiplex con sondas TaqMan para la identificación de UDTs de *T. cruzi* (Cura y col., 2015)

Tabla 7. Secuencias y concentraciones de oligonucleótidos y sondas utilizadas en el ensayo de PCR multiplex real-time (Cura y col., 2015).

PCR	Oligoucleotido	Secuencia (5'- 3')	Concentración Final (µM)
SL-IR MTq	UTCC-Fw	CAGTTTCTGTACTATATTGGTACG	0,5
	TcI-Rv	CGATCAGCGCCACAGAAAGT	0,5
	TcII/V/VI-Rv	GGAAAACACAGGAAGAAGC	0,5
	TcIII-Rv	CATTTTTATGAGGGGTTGTTCG	0,5
	TcIV-Rv	CATTTTTATTAGGGGTTGTACG	0,5
	TcI (sonda)	FAM-CTC+CTTC+AT+GTT+TGT+GTCG-BHQ1	0,1
	TcII/V/VI (sonda)	HEX-TATA+CC+CATATA+TATA+TA+GC-BHQ1	0,05
	TcIII (sonda)	Quasar670-AATCGCG+TGTATGCACCGT-BHQ3	0,05
	TcIV (sonda)	CAL Fluor Red610-GCCCCCGACGCCGTCCGTG-BHQ2	0,1
18S-COII MTq	18S-Fw	ATGGGATAACAAAGGAGCAGCCTC	0,2
	18S-Rv	CTTCATTCCTGGATGCCGTGAGTT	0,2
	COII-Fw	ACACCTACCYGGTTCTCTACCT	0,2
	COII-Rv	CTYGARAGTGATTAYTTGGTGGGWG	0,2
	18S-TcII/VI (sonda)	FAM-CAGACTTCGGTCTTACCCTTCGCATCTCACA-BHQ1	0,05
	18S-TcV (sonda)	HEX-TCTT+GCC+T+C+CGCATATTTTCACA-BHQ1	0,05
	COII-TcII (sonda)	Cy5-AATGGATTACATCTACGGCTGACACCCA-BHQ3	0,1
24Sα-III/IV MTq	D71	AAGGTGCGTCGACAGTGTGG	0,4
	D76	GGTTCTCTGTTGCCCCTTTT	0,4
	TcIII (sonda)	FAM-CTTTTCC+C+C+TCTCTTTTATTA+GG-BHQ1	0,2
	TcIV (sonda)	HEX-+T+G+CTCTCTTTCCTTCTCTT+TACG-BHQ1	0,2

Análisis de los resultados: Cada PCR (de los diferentes marcadores moleculares) se realizó por triplicado, considerándose negativa luego de tres resultados negativos repetidos; un resultado positivo se consideró suficiente para considerar a la muestra como positiva para ese marcador molecular.

3.5 Análisis estadístico

La normalidad de los datos fue verificada mediante la prueba de Shapiro-Wilks y la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene.

Para el análisis de parasitemia (recuento en cámara de Neubauer) se realizó análisis multivariado (MANOVA) y test de Hotelling a posteriori; los valores correspondientes a cada día se compararon mediante análisis de la varianza (ANOVA) y test LSD de Fisher a posteriori. Los valores de qPCR, el área cubierta por infiltrados inflamatorios, la cantidad de nidos de amastigotes y los resultados del test de laberinto elevado en cruz se analizaron mediante ANOVA y test LSD de Fisher a posteriori. Para el análisis de sobrevida, se utilizó el test de sobrevida de Kaplan Meier. En todos los casos, se consideraron diferencias significativas cuando el valor de p fue menor a 0,05.

Para comprobar si el tratamiento combinado de Bz+Clo potencia el efecto encontrado en las monodrogas, se realizó un análisis multivariado de componentes principales (ACP), que permite mejorar la interpretabilidad de los datos, analizando todas las variables al mismo tiempo y conocer cuales variables son las más influyentes en el estudio. Debido a que una de las condiciones para el análisis es que el número de variables a analizar debe ser menor o igual al número de tratamientos, se seleccionaron las siguientes variables para el ACP: 1. n° de parásitos en sangre (qPCR), 2. Porcentajes de infiltrados inflamatorios en ME, 3. n° de nidos de amastigotes en ME, 4. Alteraciones en hígado, 5. Alteraciones en riñón y 6. Sobrevida. Se realizó una transformación logarítmica de la variable n° de parásitos/mL para normalizar la base de datos. Las alteraciones en hígado y riñón se consideraron como 1 (sin alteraciones), 2 (inflamación de leve intensidad) y 3 (moderada infiltración inflamatoria). Se trabajó con los datos estandarizados.

Resultados

4. Resultados

4.1 Análisis de drogas *in vitro*

Citotoxicidad

Se realizó un ensayo de citotoxicidad para evaluar los efectos de Bz y Clo en combinación y posteriormente seleccionar las concentraciones a utilizar en los análisis *in vitro* con tripomastigotes.

Luego de 96 h de incubación de las células $LLCMK_2$ con las drogas Bz y Clo, se observó que la combinación produce una respuesta por encima de la línea de aditividad (línea azul), indicando antagonismo (figura 17). La concentración citotóxica media (CC_{50}) de Clo fue de 74,78 ± 6,51 µg/ml; mientras que para Bz fue de 465 ± 18,03 µg/ml. Se puede observar gráficamente que la combinación, a determinadas concentraciones (representadas por los puntos verdes en la figura 17), produjo menor cantidad de muerte celular que las monodrogas.

Los isobologramas (figura 17 y 19) se construyeron utilizando los valores de la CC_{50} de las drogas que producen la muerte del 50 % de las células después de administrados los fármacos. Los ejes interceptan las CC_{50} para cada droga. La recta que conecta estos puntos de intersección es la línea de aditividad y representa el lugar geométrico de todos los pares de dosis (Loewe, 1953, Chou y Talalay, 1984; Chou, 2006)

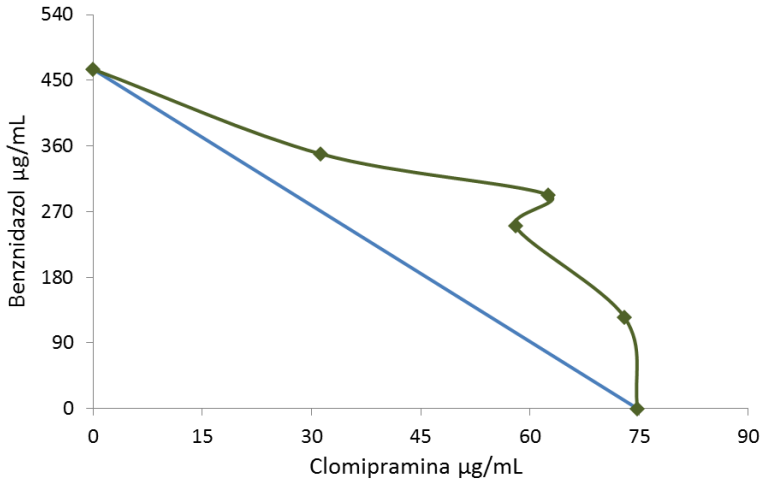


Figura 17: Isobolograma que representa el efecto combinado de Bz + Clo sobre células $LLCMK_2$ construido con las CC_{50} de cada una de las drogas.

Análisis de la actividad de las drogas

Actividad de Bz y Clo sobre tripomastigotes: en la figura 18 se observa que Bz fue más potente y eficaz que Clo sobre los 3 aislamientos de *T. cruzi*. El efecto de Bz sobre la cepa Y mostró ser menos potente y presentó una eficacia del 95 %, en comparación al efecto de Bz sobre los aislamientos. Cuando se incubaron tripomastigotes de la cepa Y tanto con Bz como con Clo los valores de la concentración efectiva media (EC_{50}) fueron los más altos en comparación con los obtenidos con los aislamientos (tabla 8). El aislamiento Casibla mostró ser el más sensible a Bz, siguiéndole SGO-Z12 y Lucky. Clomipramina presentó una actividad similar sobre los tres aislamientos.

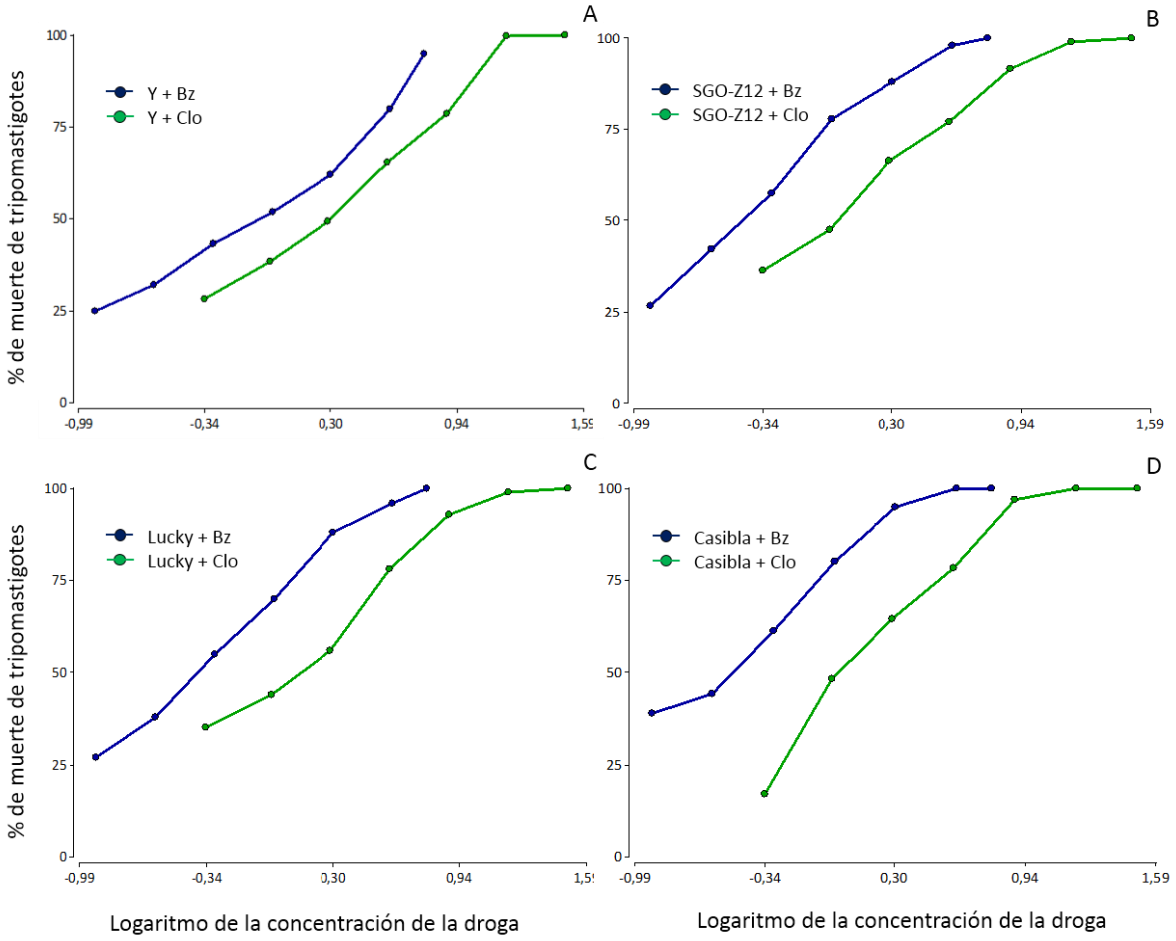


Figura 18: Actividad de Bz y Clo sobre tripomastigotes de **A**. cepa Y de *T.cruzi* y sobre los aislamientos **B**. SGO-Z12, **C**. Lucky y **D**. Casibla de *T. cruzi*. Eje X muestra el log de las concentraciones de las drogas (µg/ml) y el eje Y muestra los porcentajes de mortalidad de los tripomastigotes.

Análisis de combinación de drogas

Se evaluó el efecto combinado de las drogas sobre tripomastigotes de la cepa Y y sobre los aislamientos SGO-Z12, Lucky y Casibla. Los efectos de los pares de dosis han revelado una curva (línea roja) que se encuentra por debajo de la línea de aditividad (línea azul) en los cuatro ensayos realizados, se observó, en diferentes grados, un efecto sinérgico. Los valores de EC_{50} para cada droga se muestran en la tabla 8.

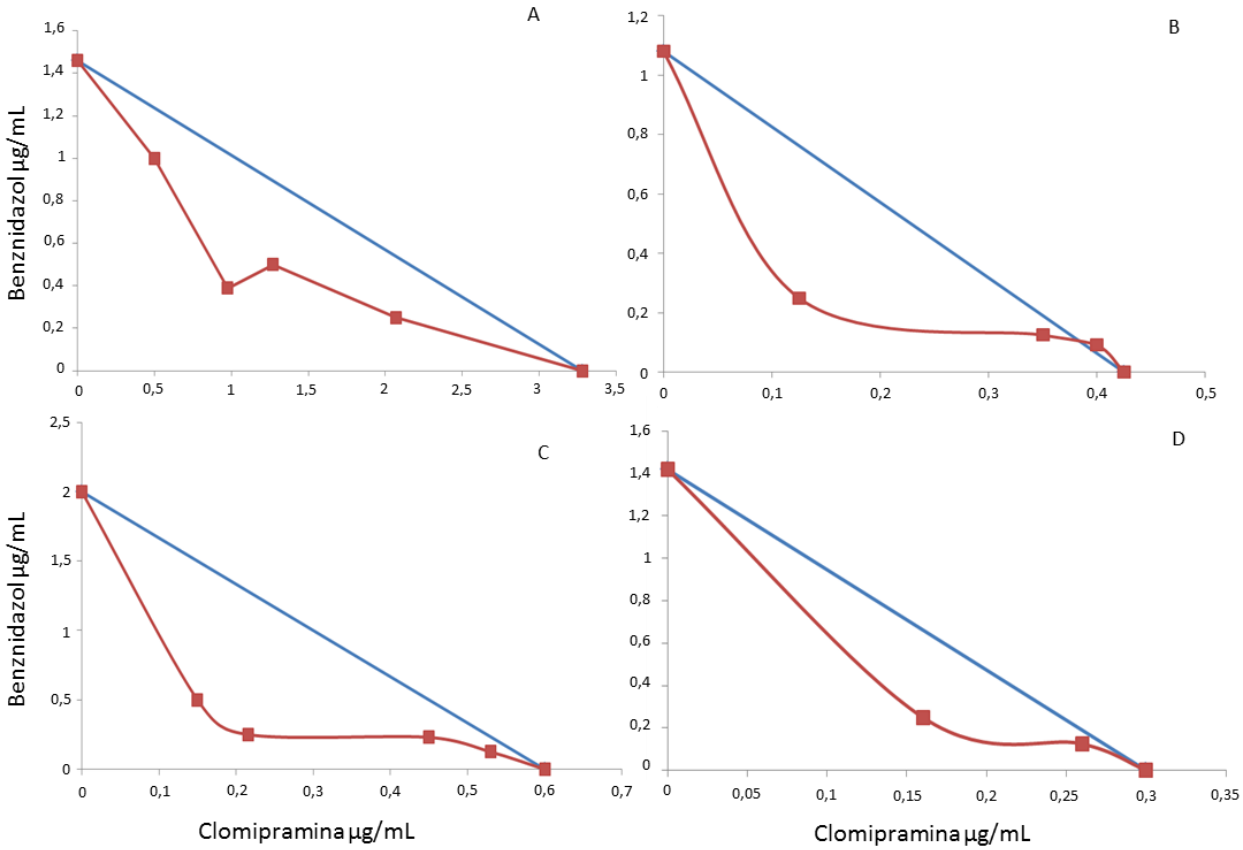


Figura 19: Isobologramas representando el efecto combinado de Bz + Clo sobre **A**. cepa Y de *T. cruzi* y sobre los aislamientos **B**. SGO-Z12, **C**. Lucky y **D**. Casibla de *T. cruzi*.

Tabla 8. Concentración efectiva media (EC_{50}) de benznidazol y clomipramina e Índice de combinación sobre células $LLCMK_2$ y cepas de *T. cruzi*.

Cepas/aislamientos	EC_{50} Clo (µg/ml)	EC_{50} Bz (µg/ml)	Índice de combinación (CI) Bz+Clo
$LLCMK_2$	74,78 ± 6,51	465 ± 18,03	1,25 (levemente antagónico)
Y	3,28 ± 0,7	1,46 ± 0,3	0,60 (sinergismo)
SGO-Z12	1,35±0,54	0,46±0,2	0,81(moderadamente sinérgico)
Lucky	2,07±0,40	0,62±0,08	0,58 (sinergismo)
Casibla	1,45 ± 0,41	0,32±0,1	0,96 (≅ aditivo)

El el Índice de Combinación (CI, Combination Index) de las drogas sobre las células $LLCMK_2$ fue de 1,25 indicando un efecto levemente antagónico, es decir, la combinación causa daño celular levemente menor que la monoterapia. La combinación de Bz+Clo presentó efecto sinérgico sobre el aislamiento Lucky y la cepa Y, levemente sinérgico sobre el aislamiento SGO-Z12 y aproximadamente aditivo sobre Casibla (tabla 8).

4.2 Análisis tripanocida *in vivo*

Ratones infectados con la cepa Y de *T. cruzi*

Parasitemia (recuento en cámara de Neubauer y qPCR)

La figura 20 representa la evolución de los niveles de parásitos circulantes en sangre de ratones infectados con la cepa Y de *T. cruzi* hasta los 35 días post infección (d.p.i.). La figura 20A muestra los niveles de parásitos de los grupos tratados con diferentes concentraciones de Bz (100, 50, 25, 12,5, 6,25 mg/kg/día). El tratamiento comenzó a los 4 d.p.i. No se encontraron diferencias significativas, en los niveles de parasitemia, entre las diferentes concentraciones de Bz utilizadas (test de Hotelling: $p>0,05$). El grupo tratado con Bz6,25 presentó mayores niveles de parásitos que el resto de los tratamientos. Todos los grupos tratados con Bz presentaron diferencias significativas con el grupo INT (test de Hotelling: $p<0,05$). Se observó un pico de parasitemia a los 21 días en el grupo INT. La figura 20B muestra los niveles de parásitos en sangre de ratones infectados y tratados con diferentes concentraciones de Clo (10, 5, 2,5, 1,25 mg/kg/día). Los grupos tratados con 10 y 2,5 mg/kg/día presentaron altos niveles de parasitema produciendo la muerte de la totalidad de los ratones a los 25 d.p.i. aproximadamente. Los grupos tratos con 5 y 1,25 mg/kg/día sobrevivieron hasta los 35 d.p.i. y no presentaron diferencias significativas con el grupo INT (test de Hotelling: $p>0,05$).

De acuerdo a los resultados obtenidos se seleccionaron, para el ensayo combinado de drogas, las concentraciones de Bz de 6,25 mg/kg/día y de Clo de 1,25 mg/kg/día (Bz6,25+Clo1,25). La figura 20C muestra los niveles de parásitos en sangre de ratones tratados con la combinación de drogas. Se muestran también las curvas de los grupos tratados con Clo1,25 y Bz6,25. El tratamiento combinado presentó una disminución significativa de la parasitemia a los días 21 y 28 post infección (p.i.) (test de Fisher: $p<0,05$) con respecto a los grupos Clo1,25 y Bz6,25.

Finalizado el tratamiento, a los 35 d.p.i. se extrajeron muestras de sangre de 3 ratones de cada grupo de tratamiento y se realizó la cuantificación de los parásitos a través de qPCR. Previamente a la cuantificación de los parásitos a través qPCR se realizó una curva de calibración (figura 21A) para interpolar los valores de Ciclo umbral (Ct) de las muestras y obtener su concentración. La curva se graficó teniendo en cuenta los valores de Ct obtenidos a partir de muestras que contienen 10^7 – 1 epimastigotes / mL (en 10 ng de ADN) contra el $\log_{10}$ de las diluciones. La recta está descrita por la siguiente ecuación: $y = -3,1327x+24,17$.

Todos los ratones infectados con la cepa Y de *T. cruzi* y tratados con diferentes concentraciones de Bz y Clo exhibieron productos de amplificación, sin embargo su carga parasitaria fue significativamente menor que en el grupo INT (test de Fisher: $p < 0,05$) (figura 21B). El grupo tratado con Bz100 presentó la menor carga parasitaria.

En contraste con los resultados de parasitemia por recuento en cámara de Neubauer, se encontraron diferencias significativas en los grupos Clo5 y Clo1,25 en comparación con el grupo INT. El tratamiento con Bz6,25+Clo1,25 produjo una reducción significativa en el número de parásitos en comparación con el grupo Bz6,25, Clo5 y Clo1,25 (test de Fisher: $p<0,05$).

Sobrevida

La figura 22 muestra la sobrevida de los grupos infectados con la cepa Y y tratados con diferentes concentraciones de Bz y Clo, hasta los 35 d.pi. El 100 % de los ratones del grupo no infectado (NI) y los grupos tratados con las concentraciones de 100, 50, 25 y 12 mg/kg/día de Bz sobrevivieron hasta los 35 d.p.i. El 83,3 % de los ratones tratados con Bz6,25 sobrevivieron hasta los 35 d.p.i.

El 50 % de los ratones del grupo INT sobrevivió hasta los 35 d.p.i. Mientras que los grupos tratados con Clo5 y Clo1,25 presentaron una sobrevida del 33,3 % y los ratones de los grupos tratados con Clo10 y Clo2,5 murieron antes de finalizar la etapa aguda de la infección. El grupo tratado con Bz6,25+Clo1,25 presentó una sobrevida del 100 %.

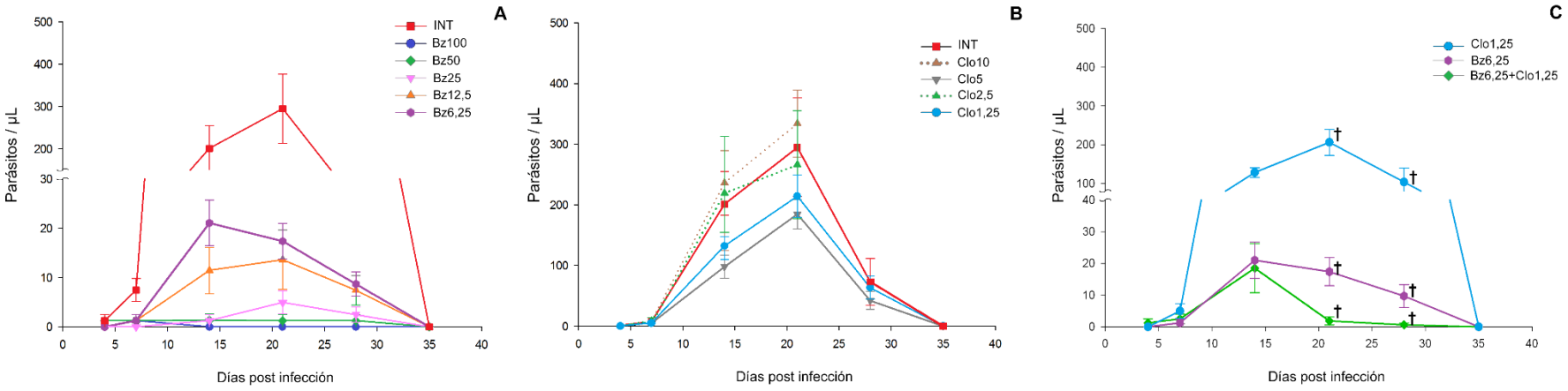


Figura 20 A-C: Evolución de los niveles de parásitos circulantes en sangre de ratones infectados con la cepa Y de *T. cruzi*. **A**. Ratones tratados con diferentes concentraciones de Bz **B**. Ratones tratados con diferentes concentraciones de Clo y **C**. Curvas de parasitemia de ratones tratados con: 6,25 mg/kg/día de Bz, 1,25 mg/kg/día de Clo y con la combinación de 6,25 mg/kg/día de Bz y 1,25 mg/kg/día de Clo. † diferencias significativas (test de Fisher: p<0,05) Barra: error estándar.

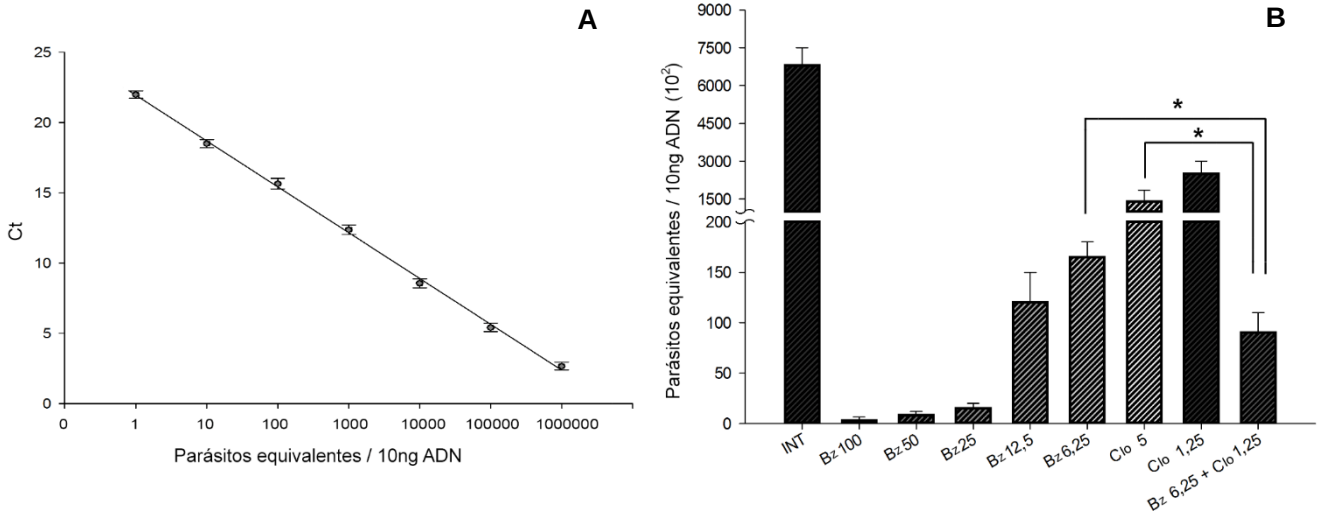


Figura 21: Cuantificación de los parásitos mediante qPCR. **A.** Curva de calibración. Límite de detección de copias de ADN de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Y). **B.** Carga parasitaria de grupos de ratones infectados la cepa Y de *T. cruzi* y tratados con diferentes concentraciones de Bz y Clo (n=3). Parásitos equivalentes en 10 ng de ADN. * diferencias significativas (test de Fisher: p<0,05) Barra: error estándar.

Los grupos tratados con Bz (todas las concentraciones) y Bz6,25+Clo1,25 presentaron diferencias significativas con el grupo INT (test de sobrevida de Kaplan Meier, p<0,05), mientras que la sobrevida de los grupos tratados con Clo5 y Clo1,25 no presentaron diferencias significativas con el grupo INT. Los grupos Clo10 y Clo2,5 presentaron diferencias significativas con el grupo INT.

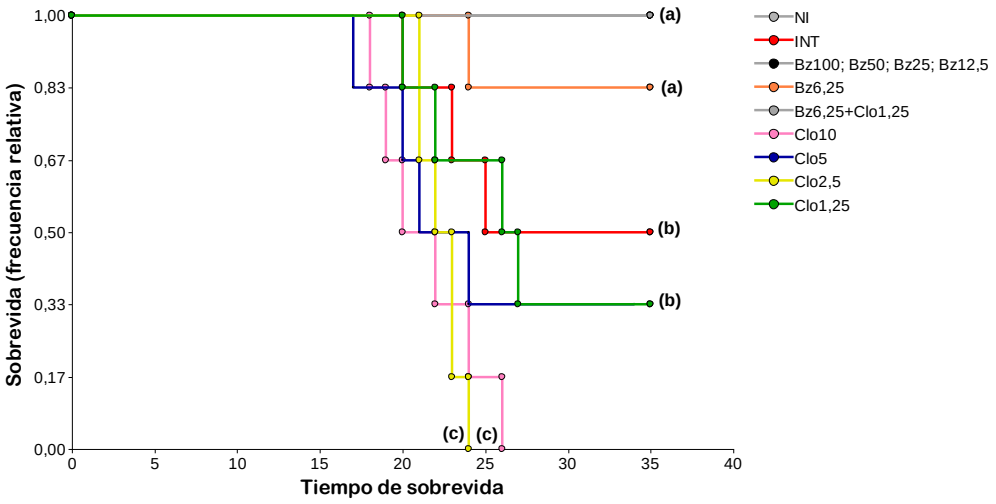


Figura 22: Sobrevida de ratones infectados con cepa Y de *T.cruzi* y tratados con diferentes dosis de Bz y Clo. Sobrevida presentada en frecuencia relativa (n=6). Letras distintas indican diferencias significativas p<0,05 (test de sobrevida de Kaplan Meier).

En base a estos resultados de parasitemia y sobrevida se determinó utilizar para los estudios posteriores en animales infectados con los aislamientos naturales de *T. cruzi*, sólo las concentraciones de Bz100; Bz6,25; Clo5; Clo1,25 y la combinación de las concentraciones más bajas de ambas drogas.

Ratones infectados con aislamientos naturales de *T. cruzi*

Parasitemia (recuento en cámara de Neubauer y qPCR)

La figura 23 representa la evolución de los niveles de parásitos circulantes en sangre de los 3 grupos infectados con los aislamientos de *T. cruzi* (SGO-Z12, Lucky y Casibla) hasta los 35 d.p.i. Como puede observarse, el parásito se encontró presente en todos los grupos estudiados a partir del día 5 p.i., presentando un pico de parasitemia entre los días 21 y 28 p.i.

La figura 23A representa la evolución de los niveles de parásitos circulantes en sangre de ratones infectados con el aislamiento SGO-Z12. El grupo INT presentó diferencias significativas con todos los grupos tratados. En el grupo de ratones tratados con Clo5, si bien se observaron diferencias significativas con el grupo INT, se detectó una mayor cantidad de parásitos en sangre durante la evolución de la infección, presentando diferencias significativas con los grupos Clo1,25, Bz100, Bz6,25 y Bz6,25+Clo5 (test de Hotelling: $p<0,05$).

La figura 23B representa la evolución de los niveles de parásitos circulantes en sangre de ratones infectados con el aislamiento Lucky. A los 14 y 21 d.p.i. solamente el grupo tratado con Bz100 presentó diferencias significativas con el grupo INT (test de Fisher: $p<0,05$). A los 28 y 35 d.p.i. se observó diferencias significativas entre el grupo INT y los grupos tratados (test de Fisher: $p<0,05$). No se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos a lo largo de la evolución de la infección (test de Hotelling: $p>0,05$).

La figura 23C representa la evolución de los niveles de parásitos circulantes en sangre de ratones infectados con el aislamiento Casibla. A los 14 y 21 d.p.i. el grupo tratado Bz100 presentó diferencias significativas con el grupo INT y con los grupos tratados (test de Fisher: $p<0,05$). El grupo tratado con Clo1,25 presentó mayor número de parásitos en sangre que el grupo INT, sin embargo a los 28 d.p.i. la carga parasitaria disminuyó significativamente y todos los grupos tratados presentaron diferencias significativas con el grupo INT (test de Fisher: $p<0,05$).

Se observó que la respuesta al tratamiento, en relación al recuento de parásitos, varió según fue la cepa o el aislamiento infectante, a excepción del tratamiento con Bz 100 mg/kg/día que presentó valores de entre 0 a 5 parásitos/µL a lo largo de la evolución de la infección. Los ratones infectados con el aislamiento SGO-Z12 y no tratados presentaron mayor carga parasitaria a lo largo de la infección en comparación con los ratones infectados con Lucky y Casibla.

A los 35 d.p.i. (finalizado el tratamiento) se determinó la carga parasitaria en sangre, músculo esquelético y músculo cardíaco de ratones infectados y tratados. La carga parasitaria en sangre de ratones infectados con el aislamiento SGO-Z12, Lucky y Casibla fue de 522.500 ± 50.000, 633.200 ± 45.000, 582.400 ± 52.100 parásitos/10ng ADN, respectivamente (figura 24). La carga parasitaria de ratones tratados con Bz6,26+Clo1,25 correspondientes a los tres grupos de infección fue de 60.000 ± 41.000, 33.500 ± 21.500 y 111.500 ± 40.000 parásitos/10 ng ADN, respectivamente.

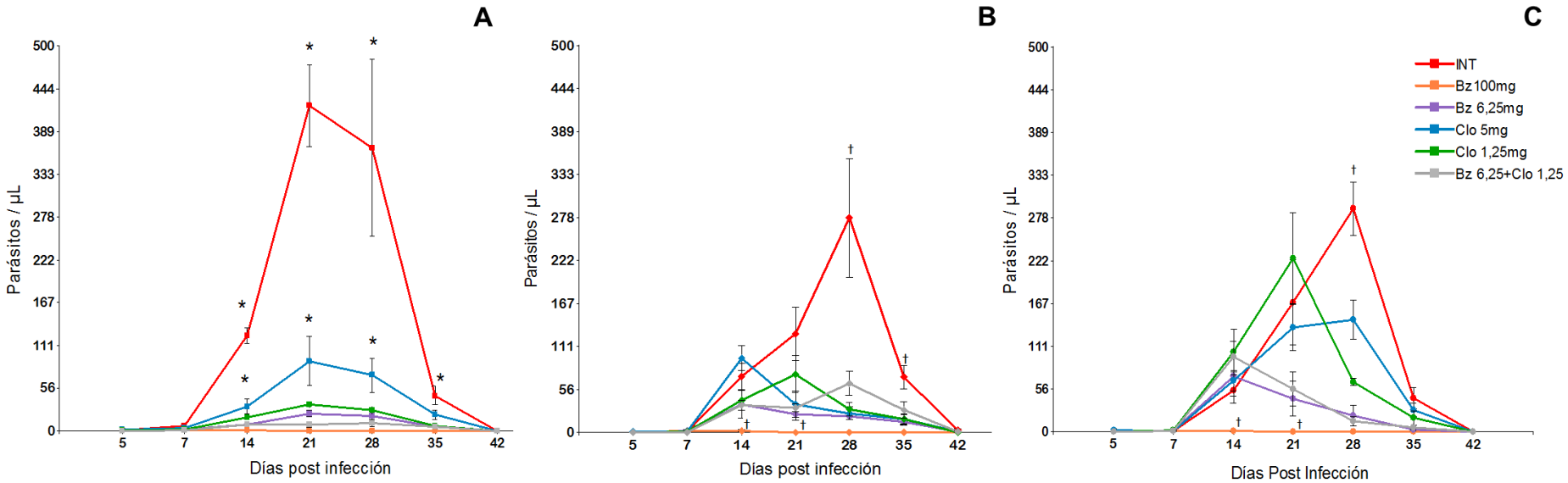


Figura 23 A-C: Evolución de los niveles de parásitos circulantes en sangre de ratones infectados con el aislamiento **A.** SGO-Z12 **B.** Lucky y **C.** Casibla de *T. cruzi* y tratados con las concentraciones que se observan en la leyenda. † diferencias significativas (test de Fisher: p<0,05) * diferencias significativas (test de Hotelling: p<0,05) Barra: error estándar.

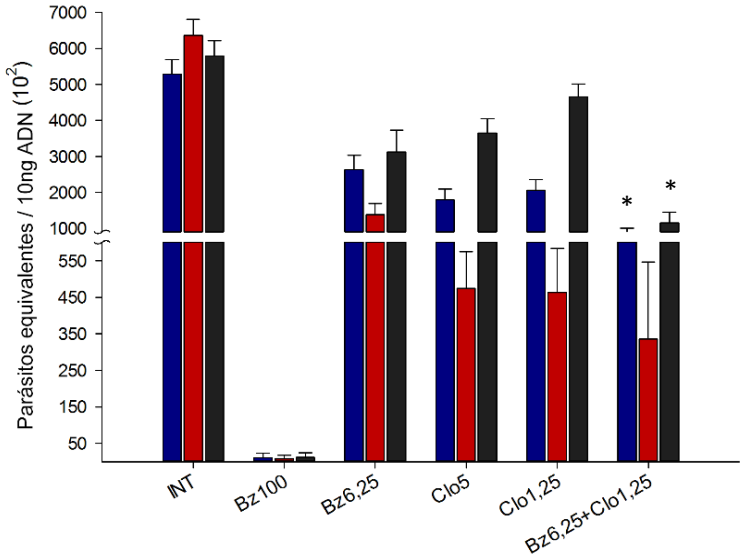


Figura 24: Carga parasitaria cuantificada a través de qPCR en sangre a los 35 d.p.i. en grupos de ratones infectados los aislamientos SGO-Z12 (■), Lucky (■) y Casibla (■) de *T. cruzi* y tratados con diferentes concentraciones de Bz y Clo. (n=3). Parásitos equivalentes a 10 ng de ADN. * diferencias significativas entre el tratamiento Bz6,25+Clo1,25 con Bz6,25 y Clo1,25 (test de Fisher: p<0,05) Barra: error estándar.

En los tres grupos de infección se observó que el tratamiento combinado disminuyó significativamente la carga parasitaria en relación a los grupos INT (test de Fisher: $p<0,05$). Los grupos infectados con SGO-Z12 y Casibla y tratados con Bz6,25+Clo1,25 mostraron menor número de parásitos en comparación con la monoterapia.

El tratamiento con Bz100 en todos los casos redujo significativamente la parasitemia en comparación con el resto de los tratamientos (test de Fisher: $p<0,05$); la cantidad de parásitos que se cuantificaron en sangre en estos grupos fue de aproximadamente de 1.000 ± 200 parásitos/10 ng ADN.

La figura 25A muestra la carga parasitaria en músculo esquelético. Los ratones infectados con los tres aislamientos y tratados con Bz6,25+Clo1,25, presentaron una disminución significativa de la cantidad de parásitos en comparación con el grupo INT. Los ratones infectados con el aislamiento Casibla y tratados con Bz6,25+Clo1,25 presentaron menor carga parasitaria que aquellos grupos tratados con las monodrogas. En los ratones infectados con el aislamiento Lucky y tratados con Bz6,25, Clo1,25 y Bz6,25+Clo1,25 se observó una disminución en la carga parasitaria en relación al grupo INT; el grupo tratado con Clo5, no presentó diferencias significativas con el grupo INT (test de Fisher $p<0,05$). La cantidad de parásitos detectados en músculo esquelético, en ratones infectados con los 3 aislamientos fue aproximadamente 10 veces menor que en sangre.

La figura 25B muestra la carga parasitaria en músculo cardíaco; en este tejido la cantidad de parásitos encontrados fue aún menor que en músculo esquelético (aproximadamente 6 veces menor que en músculo esquelético). Los ratones infectados con los aislamientos SGO-Z12 y Lucky, y tratados con Bz y Clo en sus diferentes concentraciones y en combinación, presentaron una disminución significativa de la cantidad de parásitos en comparación con el grupo INT (test de Fisher $p<0,05$). Los ratones infectados con el aislamiento Casibla y tratados no presentaron diferencias significativas con el grupo INT a excepción del grupo tratado con Bz100. Los ratones infectados con el aislamiento SGO-Z12 a los 35 d.p.i. mostraron menor carga parasitaria en músculo esquelético y cardíaco en comparación con los ratones infectados con los aislamientos Lucky y Casibla.

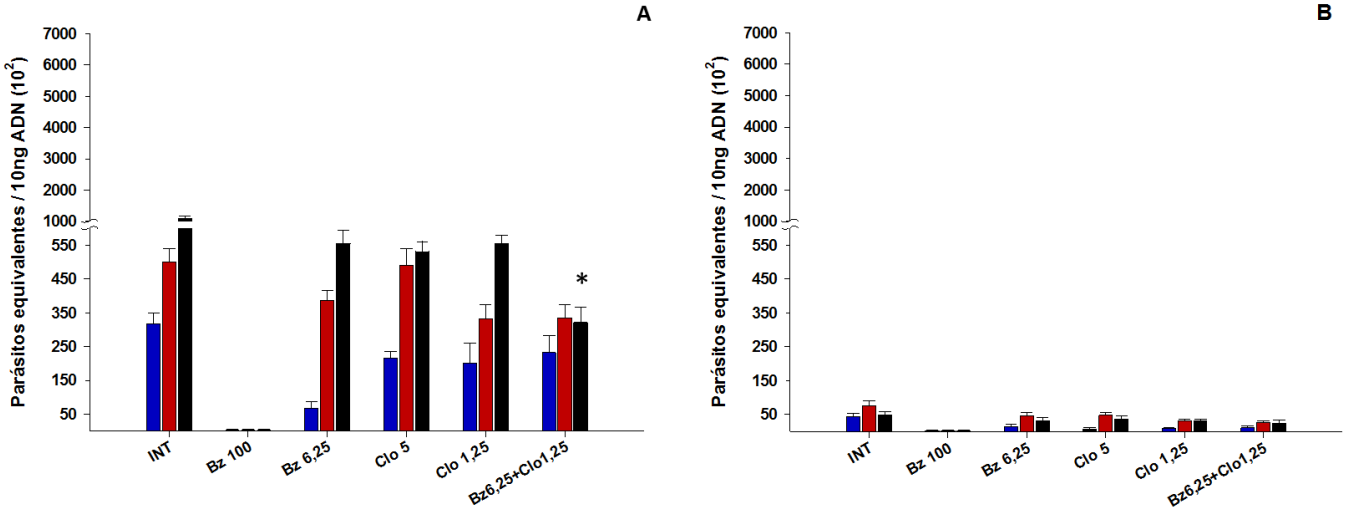


Figura 25: Carga parasitaria cuantificada a través de qPCR en ratones infectados con los aislamientos SGO-Z12 (■), Lucky (■) y Casibla (■) de *T. cruzi* y tratados con diferentes concentracioens de Bz y Clo. (n=3). **A.** Carga parasitaria cuantificada en músculo esquelético y **B.** en músculo cardíaco. * diferencias significativas entre el tratamiento Bz6,25+Clo1,25 con Bz6,25 y Clo1,25 (test de Fisher: p<0,05) Barra: error estándar.

Sobrevida

Todos los ratones infectados con el aislamiento SGO-Z12 y tratados con Bz100 y Bz6,25+Clo1,25 sobrevivieron hasta los 35 d.p.i. y presentaron diferencias significativas con el grupo INT (test de sobrevida de Kaplan Meier: p=0,026). El 83,3 % de los ratones tratados con Bz6,25 y Clo1,25 sobrevivieron hasta los 35 d.p.i., mientras que la sobrevida de los ratones tratados con Clo5 fue del 66,6 %. En estos tres últimos grupos no se observaron diferencias significativas con el grupo INT. La sobrevida del grupo INT fue del 50 % (figura 26A).

El 100 % de los ratones infectados con el aislamiento Lucky y tratados con Bz100 sobrevivieron hasta los 35 d.p.i. con diferencias significativas con el grupo INT (test de sobrevida de Kaplan Meier: p=0,019) (figura 26B). Los ratones tratados con Bz6,25+Clo1,25 presentaron una sobrevida del 83,3 % con diferencias significativas con el grupo INT (test de sobrevida de Kaplan Meier: p=0,042). La sobrevida de los ratones tratados con Bz6,25 y Clo5 fue del 66,6 % y la de los ratones tratados con Clo1,25 del 50 %. Estos grupos no presentaron diferencias significativas con el grupo INT (test de sobrevida de Kaplan Meier: p=0,322). El 33,3 % de los ratones del grupo INT sobrevivió hasta los 35 d.p.i.

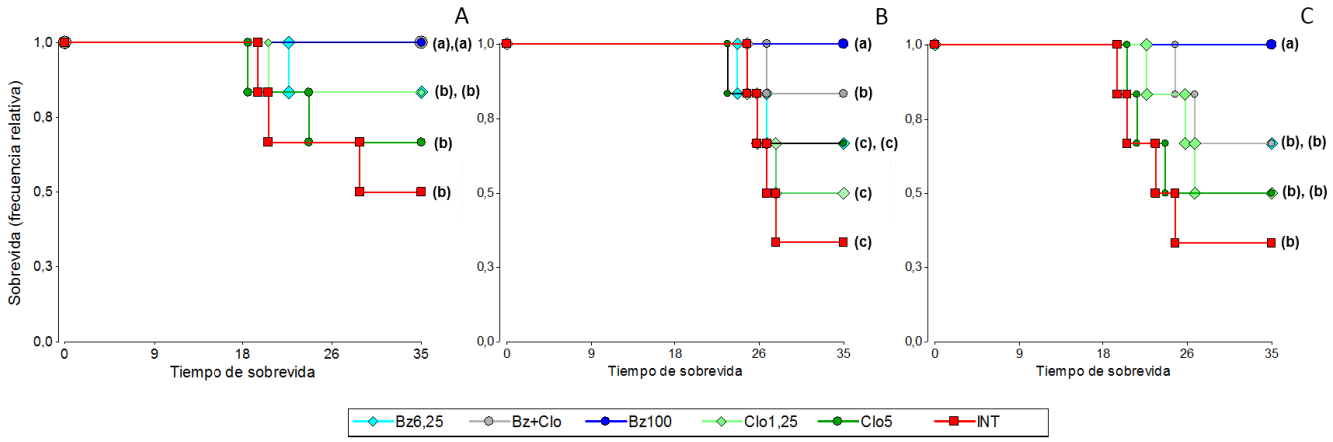


Figura 26A-C: Sobrevida de ratones infectados con los aislamientos. **A.** SGO-Z12, **B.** Lucky y **C.** Casibla de *T. cruzi* y tratados con diferentes concentraciones de Bz y Clo. Los colores utilizados para representar los tratamientos (leyenda) son los mismos en las tres figuras. Sobrevida presentada en frecuencia relativa (n=6). Letras distintas indican diferencias significativas p<0,05 (test de sobrevida de Kaplan Meier)

Todos los ratones infectados con el aislamiento Casibla y tratados con Bz100 sobrevivieron hasta los 35 d.p.i. con significativas con el grupo INT (test de sobrevida de Kaplan Meier: p=0,0192). En el grupo INT se observó una sobrevida del 33,3 % a los 35 d.p.i., mientras que los grupos tratados con Clo5 y Clo1,25 la sobrevida fue del 50 % y los tratados con Bz6,25 y Bz6,25+Clo1,25 del 66,6 %, no presentado diferencias significativas con el grupo INT (figura 26C).

La sobrevida del grupo tratado con la combinación de drogas fue en el grupo infectado con el aislamiento SGO-Z12 del 100 % y en los grupos infectados con el aislamiento Lucky y Casibla del 83,3 % y 66,6 % respectivamente. En los grupos infectados con los aislamientos SGO-Z12 y Lucky la sobrevida del grupo tratado con la combinación de drogas fue mayor que la sobrevida en los grupos tratados con las monodrogas.

4.3 Histopatología

Hígado, riñón e intestino

Al evaluar las alteraciones estructurales debido a los posibles efectos tóxicos de las drogas, se trataron ratones no infectados, con el esquema de drogas mencionado anteriormente. La histoarquitectura del hígado y riñón se encontró conservada pero se observó inflamación difusa, de leve a moderada intensidad según fueron los tratamientos. Se encontró en el grupo tratado con Bz100 más de dos focos de infiltrados inflamatorios en hígado y riñón analizados con un aumento de 200x. En los tratamientos con Clo5, Clo1,25

y Bz6,25 + Clo1,25 no se observaron daños en riñón. Dos de tres (2/3) animales pertenecientes a los grupos tratados con Bz6,25, Clo5 y Bz6,25+Clo1,25, presentaron infiltración inflamatoria leve en hígado (tabla 9). Las figuras 27 A, B y C muestran la histoarquitectura del hígado, riñón e intestino de ratones no infectados y no tratados. La figura 27D muestra un corte de hígado de un ratón no infectado tratado con Clo5 y la figura 27E de uno tratado con Bz6,25+Clo1,25.

Los ratones infectados con la cepa Y y con los distintos aislamientos, no tratados (INT), presentaron diferentes grados de daño estructural en hígado y riñón. Se observó que la infección, en todos los casos, generó daños histopatológicos debido a la respuesta inflamatoria; sin embargo el tratamiento, a excepción de Bz100, redujo en diferentes grados el daño. Los ratones infectados con la cepa Y y tratados con Bz100 y Bz6,25 mostraron inflamación de leve a moderada intensidad en hígado y de leve intensidad en riñón. La figura 27H muestra una sección de hígado un ratón infectado y no tratado donde se observa el parénquima hepático con inflamación difusa de moderada intensidad. Los ratones (2/3) tratados con Clo5 y Bz6,25+Clo1,25 presentaron focos dispersos de inflamación de leve intensidad en hígado y (1/3) en riñón. En los cortes de hígado y riñón de ratones tratados con Clo1,25 no se encontraron cambios estructurales. En los ratones infectados con el aislamiento SGO-Z12 y tratados con Bz100 y Bz6,25 (2/3) se observaron focos dispersos de inflamación leve en hígado y solamente uno de tres animales tratados con Clo5, Clo1,25 y Bz6,25+Clo1,25 presentaron focos dispersos de inflamación leve en hígado.

Los ratones infectados con el aislamiento Lucky y tratados con Bz100 (2/3) presentaron inflamación leve en hígado y un animal también presentó focos dispersos de inflamación de leve intensidad en riñón. Los animales tratados con Bz6,25, Clo5, Clo1,25 y Bz6,25+Clo1,25 (2/3) presentaron focos dispersos de inflamación leve en hígado y un ratón tratado con Bz6,25+Clo1,25 presentó inflamación leve en riñón.

Los ratones infectados con el aislamiento Casibla y no tratados (INT) mostraron inflamación de moderada a alta intensidad en hígado, al igual que los ratones tratados con Bz100 (figura 27G); los cortes de riñones de los ratones pertenecientes a éstos grupos también presentaron focos de infiltrados de leve a moderada intensidad (figura 27F e I). Los animales (3/3) tratados con Bz6,25, Clo1,25 y Bz6,25+Clo1,25 y tratados con Clo5 (2/3) presentaron focos dispersos de inflamación en hígado. No se observaron alteraciones estructurales en intestino en ninguno de los grupos analizados (tratados y no tratados).

Tabla 9. Análisis histopatológico de hígado, riñón e intestino de ratones no infectados e infectados con los diferentes aislamientos y cepa Y de *T. cruzi* y tratados con el esquema de drogas propuesto.

	Ratones No infectados y tratados																	
Órgano/ n° ratón	Bz100			Bz6,25			Clo5			Clo1,25			Bz6,25+Clo1,25			NI-NT		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Hígado	++	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Riñón	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ratones infectados con la cepa Y																	
	Bz100			Bz6,25			Clo5			Clo1,25			Bz6,25+Clo1,25			INT		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Hígado	++	++	+	++	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	++	++	++
Riñón	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
	Ratones infectados con el aislamiento SGO-Z12																	
	Bz100			Bz6,25			Clo5			Clo1,25			Bz6,25+Clo1,25			INT		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Hígado	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+
Riñón	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ratones infectados con el aislamiento Lucky																	
	Bz100			Bz6,25			Clo5			Clo1,25			Bz6,25+Clo1,25			INT		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Hígado	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Riñón	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
	Ratones infectados con el aislamiento Casibla																	
	Bz100			Bz6,25			Clo5			Clo1,25			Bz6,25+Clo1,25			INT		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Hígado	++	++	++	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	++	++	++
Riñón	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	++	+	+

(-) sin alteraciones, +: inflamación de leve intensidad (0–1 foco inflamatorio), ++: inflamación de moderada intensidad (≥ 2 focos inflamatorios). NI-NT: no infectado y no tratado. INT: infectado no tratado. (n = 3, para cada tratamiento).

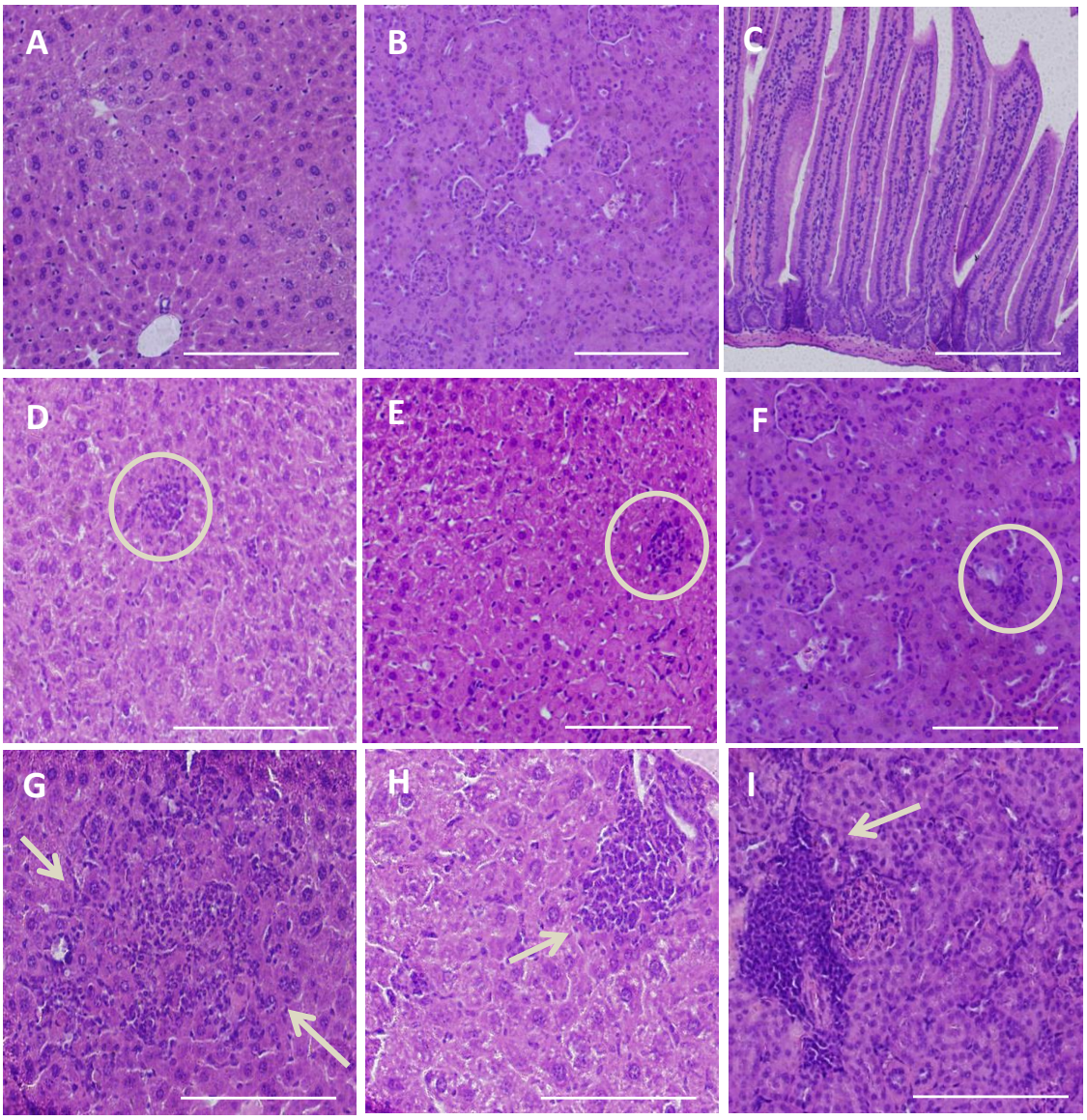


Figura 27: Cortes histológicos de hígado, riñon e intestino. Tinción Hematoxilina-eosina. 35 d.p.i. 200x. **A**, **B** y **C**) Hígado, riñón e intestino de ratón no infectado y no tratado. **D**) Hígado de ratón no infectado tratado con Clo5. **E**) Hígado de ratón no infectado tratado con Bz6,25+Clo1,25. **F**) Riñón de ratón infectado con el aislamiento Casibla y tratado con BZ 100. Los círculos muestran focos de infiltrados inflamatorios. **G**) Hígado de ratón infectado con el aislamiento Casibla tratado con Bz100. **H**) Hígado de ratón infectado con la cepa Y no tratado. **I**) Riñón de ratón infectado con el aislamiento Casibla no tratado. Las flechas muestran focos de infiltrados de moderada intensidad. las barras corresponden a 200µm

Músculo esquelético y cardíaco

Se cuantificaron las áreas cubiertas de infiltrados inflamatorios en músculo esquelético (ME) y cardíaco (MC) en todos los grupos infectados y tratados. En los grupos de ratones INT las secciones de ME cubiertas de infiltrados inflamatorios presentaron diferencias significativas en comparación a los grupos tratados (test de Fisher $p<0,05$). Los

ratones infectados con el aislamiento Casibla y tratados con Clo1,25 y Clo5 mostraron mayores porcentajes de infiltrados inflamatorios que el grupo INT (figura 28).

Los ratones tratados con Bz100 en todos los grupos presentaron los menores porcentajes de inflamación en ME. Los ratones infectados con la cepa Y y SGO-Z12 y tratados con Bz6,25+Clo1,25 no presentaron diferencias significativas con los grupos Bz100 y Bz6,25 (test de Fisher p<0,05). Los ratones infectados con la Lucky y Casibla y tratados con Bz6,25+Clo1,25 presentaron un porcentaje de área cubierta de infiltrados inflamatorios en ME similar al presentado en los grupos tratados con las monodrogas (figura 28).

En MC se encontró que los porcentajes de áreas cubiertas de infiltrados inflamatorios fueron menores que en ME y se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados con Bz100 y los grupos INT. El grupo infectado con el asilamiento Lucky y tratado con Bz6,25+Clo1,25 presentó diferencias significativas con los grupos INT y Bz100 (figura 29).

Las figuras 30, 31, 32 y 33 muestran secciones de músculo esquelético y cardíaco obtenido a 35 d.p.i. con tinción de hematoxilina-eosina de todos los grupos de ratones.

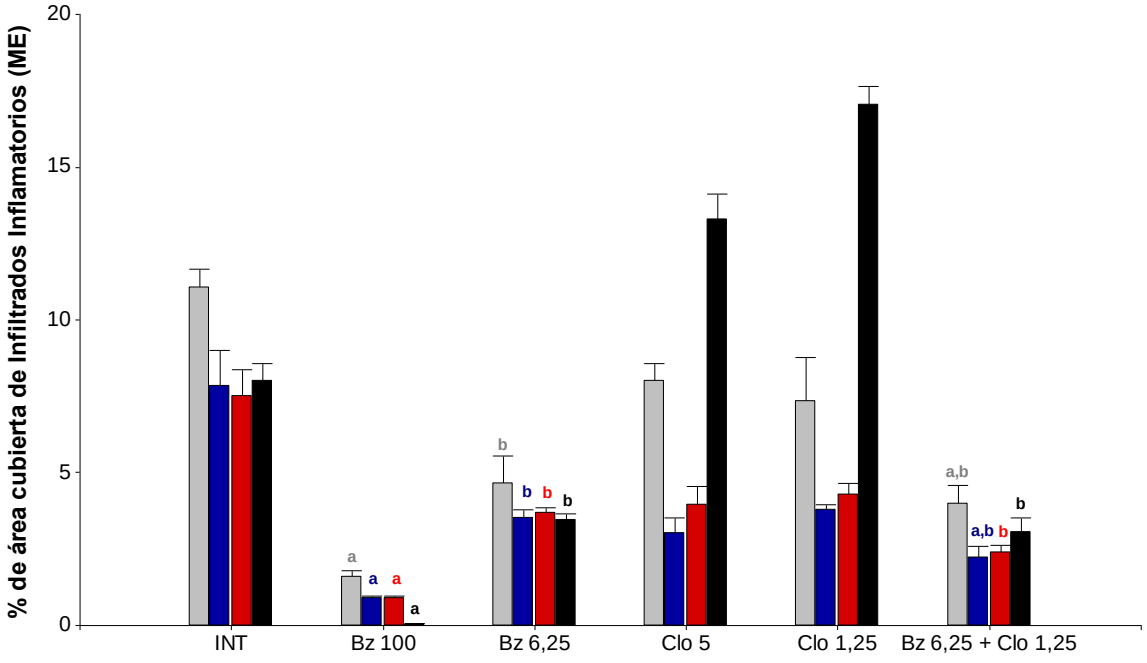


Figura 28: Porcentaje de infiltrados inflamatorios en músculo esquelético (ME) en ratones infectados con la cepa Y (■) y aislamientos SGO-Z12 (■), Lucky (■) y Casibla (■) de *T. cruzi* y tratados con diferentes concentraciones de Bz y Clo. Letras diferentes indican diferencias significativas (el color de la letra indica diferencia dentro de los grupos infectados con cada aislamiento, test de Fisher: p<0,05). Sólo se muestran las diferencias estadísticas en los grupos Bz100, Bz6,25 y Bz6,25+Clo1,25. n=3 en cada tratamiento. Barra: error estándar.

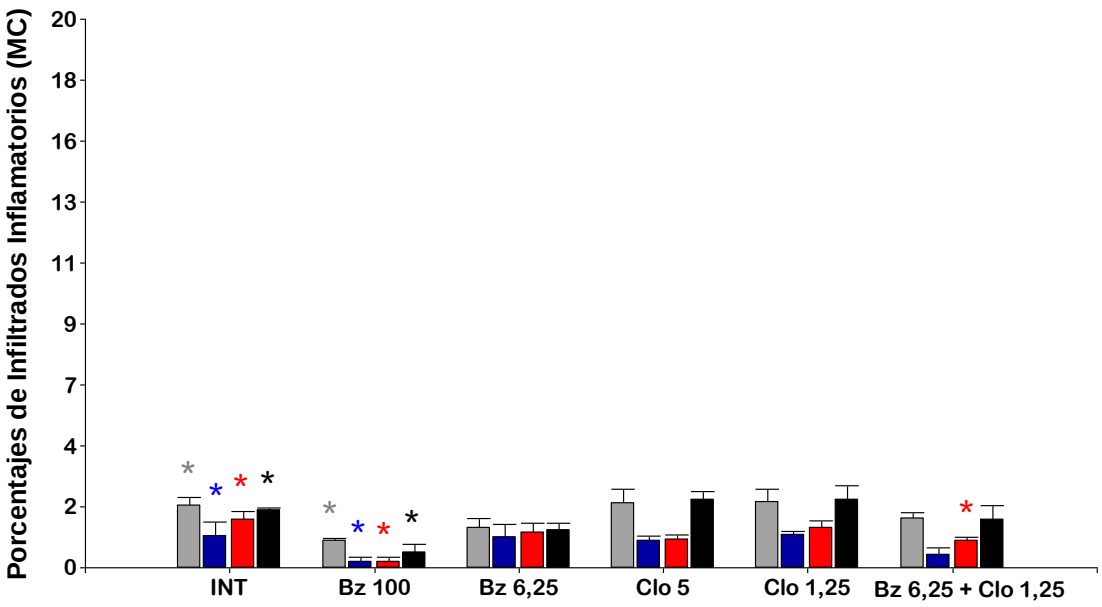


Figura 29: Porcentaje de infiltrados inflamatorios en músculo cardíaco (MC) en ratones infectados con la cepa Y (■) y aislamientos SGO-Z12 (■), Lucky (■) y Casibla (■) de *T. cruzi* y tratados con diferentes concentraciones de Bz y Clo. * diferencias significativas (el color del asterisco indica diferencia dentro de los grupos infectados con cada aislamiento, test de Fisher: p<0,05). n=3 en cada tratamiento. Barra: error estándar.

Recuento de nidos de amastigotes

Se realizó un recuento de nidos de amistigotes (tabla 10) presentes en las secciones de ME y MC de ratones infectados con los aislamientos y cepa Y de *T. cruzi*.

En los grupos tratados, se detectaron menor cantidad de nidos, en ME, en comparación con los grupo INT (test de Fisher: p<0,05) (tabla 10 y figura 34). En todos los tratamientos, se identificaron nidos de amastigotes en ME, a excepción del tratamiento con Bz100. En dos ratones infectados con el aislamiento Casibla y no tratados, se encontraron nidos en tejido cardíaco (figura 33A). En el resto de los grupos de infección no se detectaron nidos en MC.

Los grupos infectados con la cepa Y, SGO-Z12 y Lucky y tratados con Bz6,25+Clo1,25 presentaron menor cantidad de nidos en comparación con la monoterapia, en ME. El grupo infectado con el aislamiento Casibla y tratado con Bz6,25+Clo1,25 no presentó diferencias significativas con los grupos tratados con BZ6,25, Clo5 y Clo1,25 (test de Fisher: p<0,05).

Figura 30

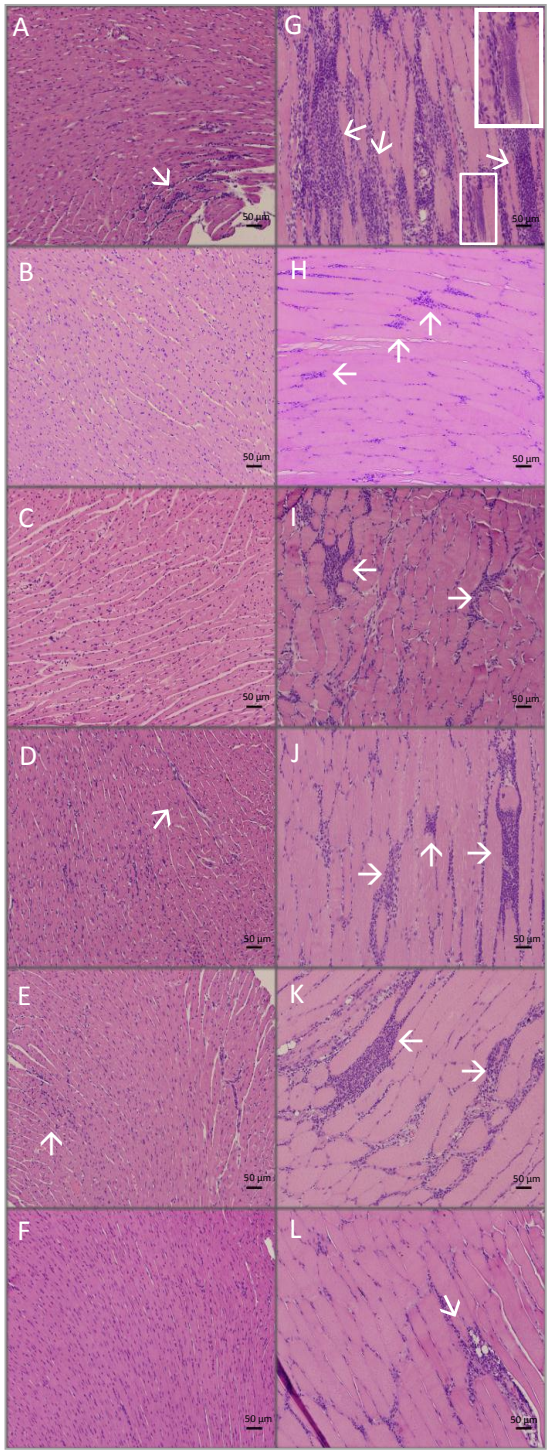
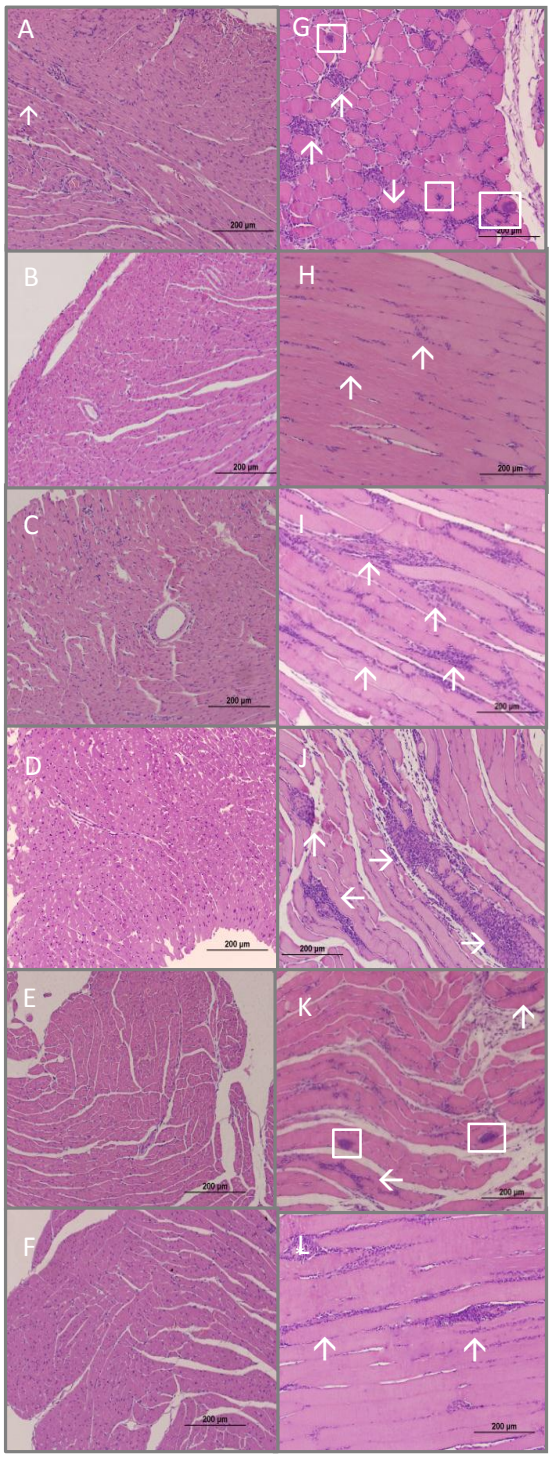


Figura 31



Figuras 30 y 31: Cortes histológicos de músculo cardíaco y esquelético de ratones infectados con la cepa Y de *T. cruzi* (figura 30), las barras corresponden a 50 µm, y con el aislamiento SGO-Z12 (figura 31), las barras corresponden a 200 µm. Aumento 200x. **A-F**) Cortes de músculo cardíaco de ratones INT, Bz100, Bz6,25, Clo5, Clo1,25 y Bz6,25+Clo1,25 respectivamente. **G-L**) Cortes de músculo esquelético de ratones INT, Bz100, Bz6,25, Clo5, Clo1,25 y Bz6,25+Clo1,25 respectivamente. Recuadro blanco: nidos de amastigotes. Flechas: señalan infiltrados inflamatorios.

Figura 32

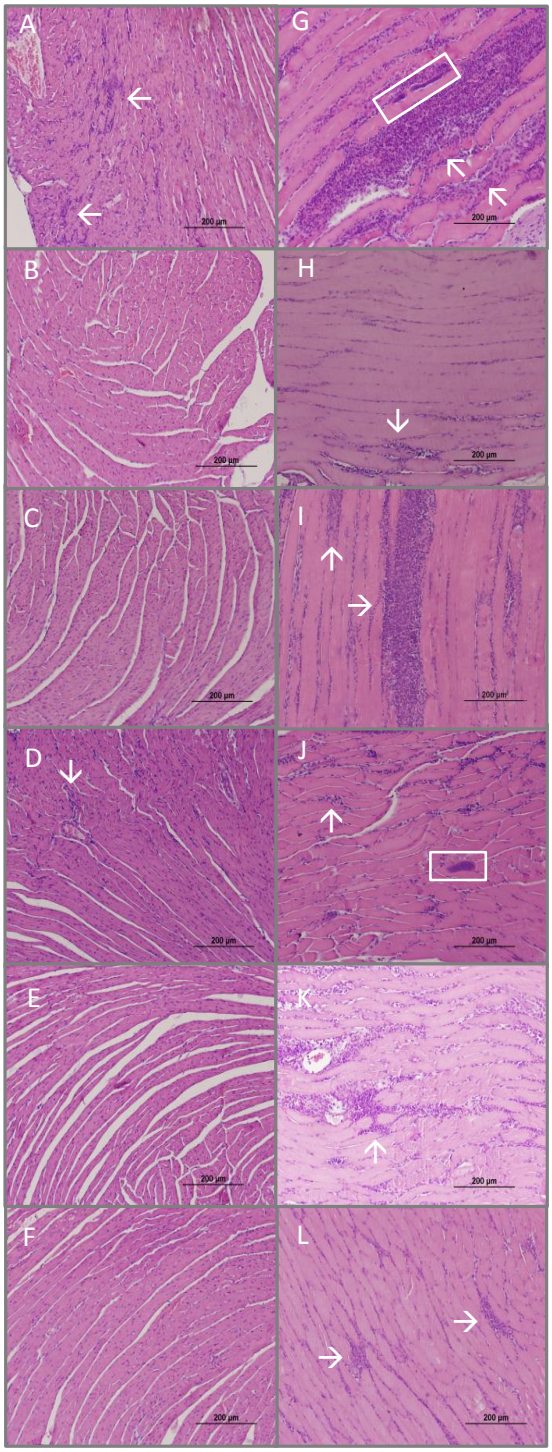
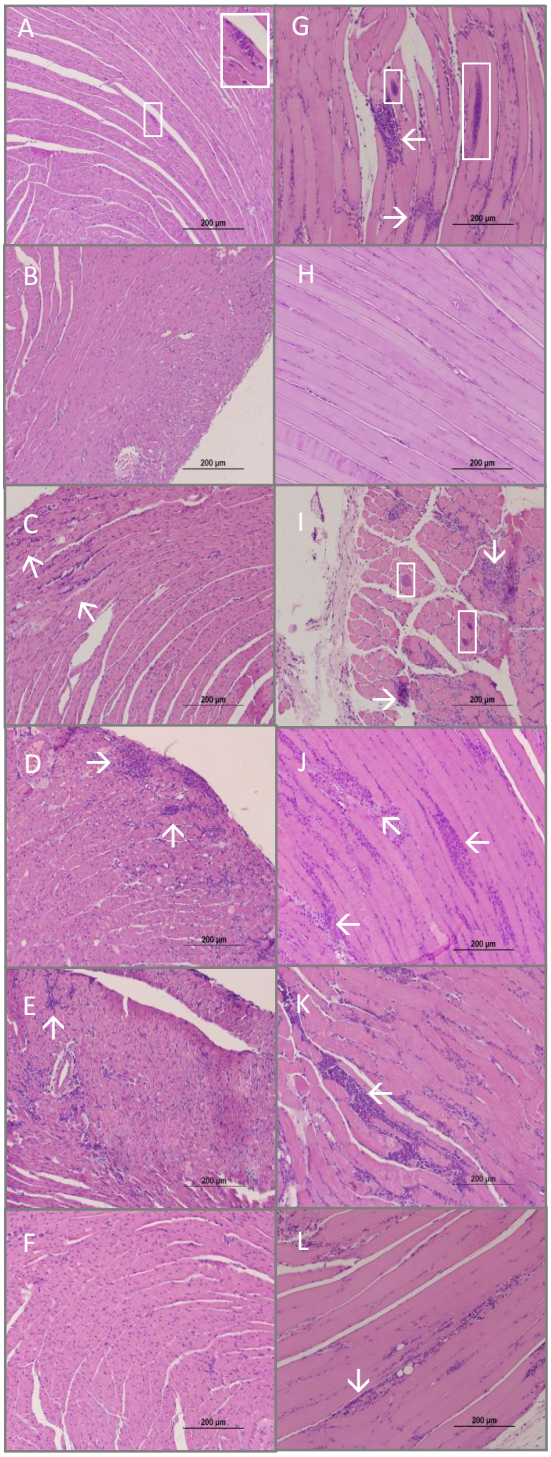


Figura 33



Figuras 32 y 33: Cortes histológicos de músculo cardíaco y esquelético de ratones infectados con el aislamiento Lucky (figura 32) y Casibla de *T. cruzi* (figura 33). Aumento 200X. **A-F**) Cortes de músculo cardíaco de ratones INT, Bz100, Bz6,25, Clo5, Clo1,25 y Bz6,25+Clo1,25 respectivamente. **G-L**) Cortes de músculo esquelético de ratones INT, Bz100, Bz6,25, Clo5, Clo1,25 y Bz6,25+Clo1,25 respectivamente. Recuadro blanco: nidos de amastigotes. Las barras corresponden a 200 µm. Flechas: señalan infiltrados inflamatorios.

Tabla 10. Número de nidos de amastigotes en MC y ME de ratones infectados con los diferentes aislamientos y cepa Y de *T. cruzi* y tratados con el esquema de drogas propuesto. n=3 en cada tratamiento.

	Cepa/Aislamientos							
	Y		SGO-Z12		Lucky		Casibla	
Grupos / Tejido	MC	ME	MC	ME	MC	ME	MC	ME
INT	0	17 (a)	0	11 (a)	0	16 (a)	2	19 (a)
BZ 100	0	0 (b)	0	0 (b)	0	0 (b)	0	0 (b)
BZ 6,25	0	12 (c)	0	8 (c, d)	0	10 (c)	0	14 (c)
CLO 5	0	11 (c)	0	7 (c, d)	0	10 (c)	0	10 (c)
CLO 1,25	0	10 (c)	0	9 (c)	0	12 (c)	0	13 (c)
BZ6,25 + CLO6,25	0	8 (d)	0	5 (d)	0	7 (d)	0	11 (c)

Los números indican el promedio de nidos encontrados en las secciones de tejido de los ratones analizados. Dentro de cada columna, letras distintas indican diferencias significativas (Fisher: $p < 0,05$).

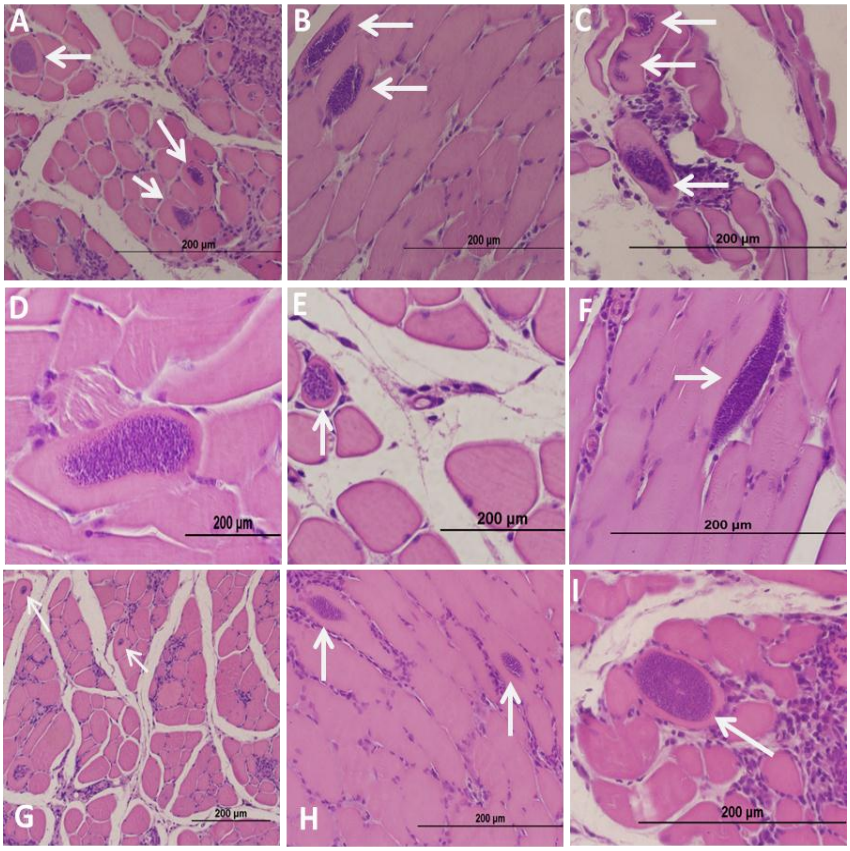


Figura 34: Cortes histológicos de músculo esquelético. Tinción Hematoxilina-Eosina. 35 d.p.i. las flechas señalan nidos de amastigotes **A**, **B** y **C**) Cortes de ratones infectados con el aislamiento Casibla, INT y tradados con Bz6,25 y Clo1,25 respectivamente. **D**, **E** y **F**) Cortes de ratones infectados con el aislamiento Lucky y tratados con Bz6,25, Clo5 e INT, respectivamente. **G**, **H** y **I**) Cortes de ratones infectados con el aislamiento SGO-Z12 y tratados con Bz6,25+ Clo1,25, Bz6,25 e INT. Las barras corresponden a 200 µm.

4.3 Estudio de conducta

Con el objetivo de determinar los efectos de Clo sobre la conducta de los ratones, se realizó la prueba del laberinto elevado en cruz, modelo válido para evaluar ansiedad en ratones. Se utilizaron ratones machos albinos Suizos adultos no infectados e infectados con la cepa Y de *T. cruzi*, tratados con vehículo, Clo1,25 y Clo5 durante 30 días.

El tratamiento de ratones no infectados con Clo5 produjo un aumento significativo en el porcentaje del número de entradas a los brazos abiertos (p= 0,0027) y en el tiempo de permanencia (p= 0,0001) con respecto al vehículo; indicando un efecto ansiolítico (figura 35 A y B). El tratamiento con Clo1,25 no presentó diferencias significativas con respecto al vehículo. En los grupos de ratones infectados con *T. cruzi*, el grupo vehículo mostró un aumento significativo en el porcentaje del número de entradas a los brazos abiertos (p= 0,0363) y en el tiempo de permanencia (p= 0,0351) con respecto al grupo vehículo no infectado. El tratamiento con Clo5, en ratones infectados, no presentó diferencias significativas con el grupo vehículo en los porcentajes del número de entradas y tiempo de permanencia en los brazos abiertos. El grupo infectado y tratado con Clo1,25 mostró una disminución significativa (p= 0,0001) en el porcentaje de entradas a los brazos abiertos en comparación con los grupos infectados, sin embargo obtuvo un porcentaje (25,93 %) similar al grupo vehículo de ratones no infectados (25,86 %).

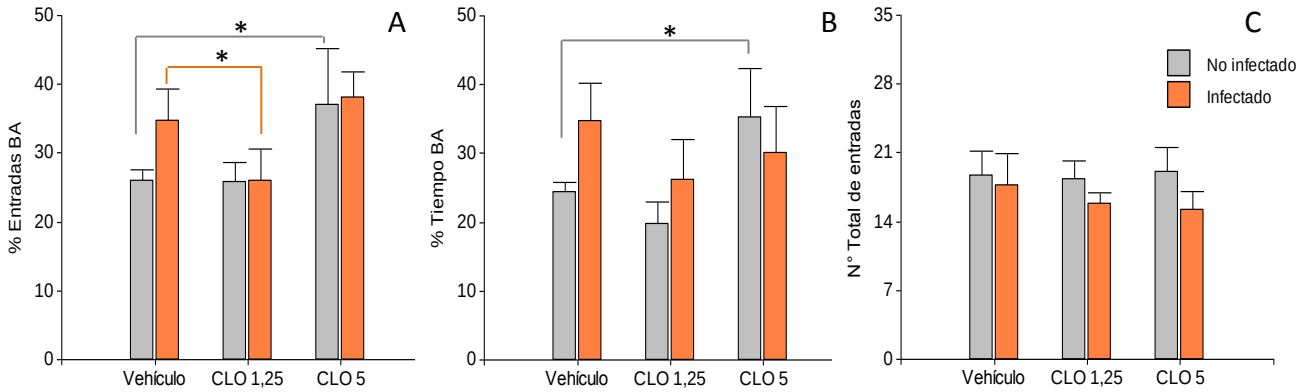


Figura 35: Test de laberinto elevado en cruz. **A**. Porcentaje de entradas a brazos abiertos (% Entradas BA). **B**. Porcentaje del tiempo de permanencia en brazos abiertos (%Tiempo BA). **C.** Número total de entradas. Los datos se representan como media+D.E. Barras grises = No infectado. Barras naranjas = infectado con la cepa Y de *T. cruzi*. n=10. (*) indica diferencias significativas (test de Fisher: p< 0,05).

En relación al número total de entradas no se observaron variaciones significativas entre los grupos infectados y no infectados, ni entre los vehículos y los tratamientos (figura

35C). Un cambio significativo en la actividad locomotora en alguno de los grupos invalidaría la interpretación de los resultados, no pudiéndose otorgar el efecto observado a las drogas, si no a la heterogeneidad locomotora de los ratones.

Al analizar los porcentajes de entrada y tiempo de permanencia en brazos abiertos se observa que el tratamiento con Clo5 presenta un efecto ansiolítico. En los grupos infectados, la infección por sí misma genera un comportamiento de tipo ansiolítico. No se observan diferencias significativas entre el grupo vehículo y Clo5 en ratones infectados probablemente debido al efecto de la infección con *T. cruzi*. El grupo de ratones infectados y tratados con Clo1,25 presentó diferencias significativas en relación al porcentaje de entradas en brazos abiertos, acercándose a los valores de los ratones no infectados (grupo vehículo); sin embargo, este grupo (Clo1,25) no presentó diferencias significativas con el grupo vehículo infectado en relación al porcentaje de tiempo de permanencia en brazos abiertos. Finalmente, se pudo observar un efecto dosis dependiente: el efecto ansiolítico aumenta con el aumento de la dosis de clomipramina.

4.4 Determinación de la eficacia del tratamiento mediante Análisis de Componentes Principales

Para comprobar si el tratamiento combinado de Bz+Clo potencia el efecto encontrado en las monodrogas, se realizó un análisis multivariado de componentes principales (ACP), que permitió mejorar la interpretabilidad de los datos, analizando todas las variables al mismo tiempo.

La figura 36 muestra 4 biplots correspondientes a cada grupo de infección. En la figura 36A se observa el biplot de las dos primeras componentes principales (CP) que explicaron el 95,6 % de la variabilidad total de los datos provistos por los tratamientos. Sin embargo, la CP1 permite, por sí sola, diferenciar los 6 tratamientos explicando un 61,8 % de la variabilidad que existe entre ellos. La correlación cofenética refleja el ordenamiento de los tratamientos en el espacio que contiene las 6 variables estudiadas (hiperespacio) en un plano: el máximo valor de correlación obtenido es 1 cuando no existe deformación (al pasar del hiperespacio al plano) en la reducción de la dimensión; en este análisis dicho coeficiente fue de 0,998.

El tratamiento con Bz100 (figura 36A) se encuentra a mayor distancia del grupo INT, medida como la proyección de cada tratamiento sobre la CP1. Los tratamientos Clo5,

Clo1,25 e INT quedaron más próximos entre sí sobre la derecha de la CP1, representado similitud en relación a los resultados obtenidos en cada una de las variables analizadas, y los tratamientos Bz100, Bz6,25 y Bz6,25+Clo1,25 quedaron más próximos sobre la izquierda.

Las alteraciones morfológicas en riñones de ratones infectados con la cepa Y fueron muy leves; esta variable no se encuentra correlacionada con ninguna de las otras variables y se concentra cercana al origen. Existe una correlación negativa entre las variables sobrevida con el porcentaje de infiltrados inflamatorias en ME, nidos de amastigotes (nidos de aa) y N° de parásitos/mL, lo que significa que a medida que aumentan los valores de parásitos, infiltrados y nidos de amastigotes, la sobrevida disminuye.

Se observó que en los grupos que presentaron alta sobrevida (Bz100, Bz6,25 y Bz6,25+Clo1,25) las drogas presentaron leve toxicidad en hígado. Mientras que los grupos con baja sobrevida (INF, Clo1,25 y Clo5) no presentaron toxicidad pero sí altos porcentajes de infiltrados inflamatorios en ME, mayor cantidad de nidos de amastigotes y mayor cantidad de parásitos/mL. El tratamiento Bz6,25+Clo1,25 se encuentra ubicado sobre la CP1 entre Bz100 y Bz6,25 indicando que la combinación de drogas potencia la respuesta al tratamiento en comparación con Bz6,25 y Clo1,25, en ratones infectados con la cepa Y de *T. cruzi*.

Los biplots B y C presentan un patrón similar al encontrado con la cepa Y en la respuesta de los diferentes tratamientos. La correlación cofenética fue de 0,991 y 0,966 respectivamente. En la figura 36B, los tratamientos Bz100 y Bz6,25+Clo1,25 quedaron próximos entre sí, sobre la izquierda de la CP1 y los tratamientos Bz6,25, Clo5, Clo1,25 e INT quedaron más próximos sobre la derecha. Los ratones infectados con el aislamiento SGO-Z12 y tratados con Bz100 y Bz6,25+Clo1,25 presentaron mayor sobrevida y daño en riñones, en comparación con los grupos tratados con Bz6,25, Clo5 y Clo1,25. Los ratones infectados con el aislamiento Lucky (figura 36C) y tratados con Bz100 y Bz6,25+Clo1,25 también presentaron mayor sobrevida que el resto de los grupos, mientras que la variable daño en riñones se encuentra asociada a los ratones INT. Se puede observar, según las variables analizadas, que el tratamiento con Bz6,25+Clo1,25 en los grupos infectados con SGO-Z12 y Lucky fue más potente que las monodrogas.

La figura 36D representa la respuesta de los diferentes tratamientos en ratones infectados con el aislamiento Casibla. La correlación cofenética fue de 0,995. Se observa en el biplot que el tratamiento con Bz100 fue el que presentó mayor sobrevida y mayores alteraciones morfológicas en hígado y riñones. Los tratamientos Clo5, Clo1,25 e INT se encuentran sobre la derecha de la CP1, y se observa que Clo5 y Clo1,25 presentan mayor

carga parasitaria, porcentaje de infiltrados inflamatorios y nidos de amastigotes que el grupo INT. A su vez, el tratamiento con Bz6,25+Clo1,25 no evidenció ser más eficaz que el tratamiento con Bz6,25, al encontrarse sus proyecciones sobre la CP1 prácticamente superpuesta.

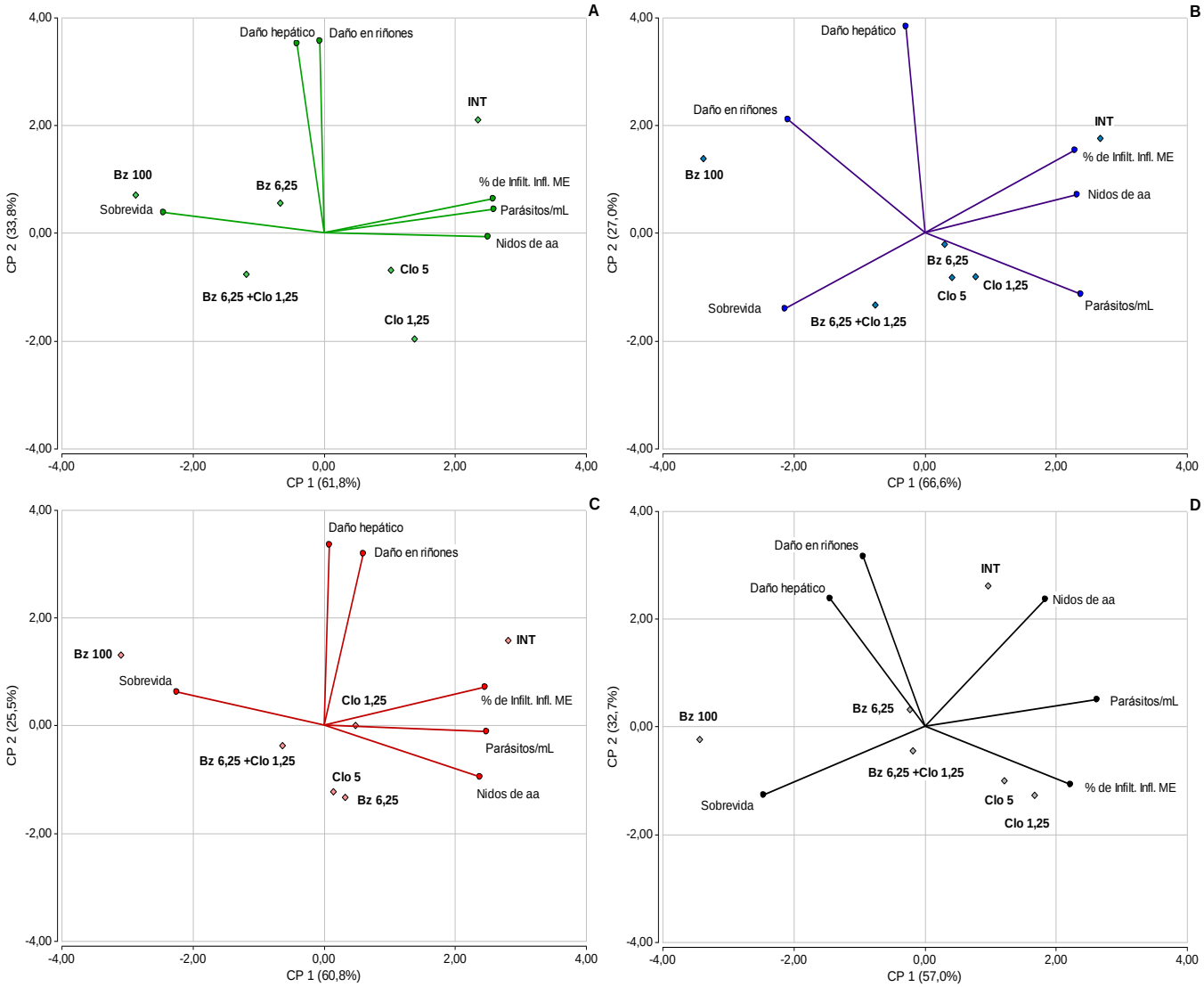


Figura 36: Biplots del análisis de componentes principales. Se muestran las interacciones entre los tratamientos y las variables analizadas. Biplot (**A**) corresponde a los tratamientos realizados sobre ratones infectados con la cepa Y de *T. cruzi*. Biplots **B**, **C** y **D** corresponden a los tratamientos realizados sobre ratones infectados con los aislamientos SGO-Z12, Lucky y Casibla respectivamente. CP: componente principal.

4.5 Detección de *T. cruzi* y tipificación molecular del linaje presente en cada órgano mediante PCR

La calidad del ADN de cada una de las muestras se verificó mediante la amplificación de un fragmento de un gen constitutivo del huésped (β-actina); las PCRs específicas para *T. cruzi* (utilizando los oligonucleótidos TCZ1 y TCZ2) se realizaron con el fin de verificar la presencia del parásito en los diferentes tejidos (sangre, corazón y músculo esquelético) de los ratones infectados.

Debido al hecho de que los estudios se realizaron utilizando tres aislamientos (no cepas), los parásitos de cada tejido se tipificaron utilizando dos métodos diferentes para la determinación de las UDTs: un conjunto de tres marcadores moleculares (miniexon, 24Sα rRNA, y 18S rRNA) como se describe en la figura 13 (Materiales y Métodos) y un conjunto de dos marcadores moleculares (amplicón TcSC5D digerido con Hpa I y Sph I, y amplicón TcMK digerido con Xho I) como se describe en la figura 14.

La tabla 11 muestra los resultados obtenidos de la tipificación molecular mediante cada uno de los métodos.

Los tres aislamientos utilizados resultaron estar formados por una mezcla de los linajes TcII y TcVI. En todos los casos, ambos linajes se encontraron juntos en sangre y en músculo cardíaco. Hubo dos muestras correspondientes a Lucky en las que no se diferenció si el linaje presente era TcV o TcVI utilizando el segundo set de marcadores moleculares, pero se espera que correspondan al linaje TcVI como el resto de las muestras estudiadas. De esta forma, estas muestras también presentarían ambos linajes (TcII y TcVI).

En las muestras correspondientes al grupo infectado con SGO-Z12 el músculo esquelético presentó solamente el linaje TcVI. Por otro lado, hubo 2 muestras de músculo esquelético (una muestra del grupo Lucky y una del grupo Casibla) que presentaron solo el linaje TcII, mientras que en el resto de los tejidos de los mismos ratones se encontraron ambos linajes.

Tabla 11: Detección y tipificación molecular de *T. cruzi* en sangre, corazón y músculo esquelético correspondientes a los 3 grupos de ratones durante la etapa aguda de la infección experimental.

Grupo	Marcador Molecular	100 bp	Ratón 1			Ratón 2			Ratón 3			Control del linaje	
			S	C	ME	S	C	ME	S	C	ME	Y	Tulahuen
SGO-Z12	TCZ		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	β-actina		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	ME		300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	24S		125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	110
	18S		165	165	NA	165	165	NA	165	165	NA	165	NC
	Linaje *de* *T. cruzi* (*)		**II**	**II**	**VI**	**II**	**II**	**VI**	**II**	**II**	**VI**	**II**	**V**
	TcSC5D + Hpa I y Sph I												
	TcMK + Xho I											-	
	Linaje *de* *T. cruzi* (**)		**VI**	**VI**	**VI**	**VI**	**VI**	**VI**	**VI**	**VI**	**VI**	**II**	**V**
Lucky	TCZ		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	β-actina		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	ME		300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	24S		125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	110
	18S		165	165	165	165	165	165	165	165	165	165	NC
	Linaje *de* *T. cruzi* (*)		**II**	**II**	**II**	**II**	**II**	**II**	**II**	**II**	**II**	**II**	**V**
	TcSC5D + Hpa I y Sph I			ND									
	TcMK + Xho I		ND					-				-	
	Linaje *de* *T. cruzi* (**)		**V o VI?**	**II o VI?**	**VI**	**VI**	**VI**	**II**	**VI**	**VI**	**VI**	**II**	**V**
Casibla	TCZ		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	β-actina		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	ME		300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	24S		125	130	125	125	125	125	125	125	125	125	110
	18S		165	165	NA	165	165	165	165	NA	165	165	NC
	Linaje *de* *T. cruzi* (*)		**II**	**II**	**VI**	**II**	**II**	**II**	**II**	**VI**	**II**	**II**	**V**
	TcSC5D + Hpa I y Sph I												
	TcMK + Xho I										-	-	
	Linaje *de* *T. cruzi* (**)		**VI**	**VI**	**VI**	**VI**	**VI**	**VI**	**VI**	**VI**	**II**	**II**	**V**

S: sangre, C: corazón, ME: músculo esquelético. Números expresados en pares de bases. NA: no amplificó. ND: no determinado. (*) Determinación del linaje de *T. cruzi* de acuerdo al algoritmo de Ramírez y col. (2010) usando tres marcadores moleculares (mini-exón, 24Sα rRNA y 18S rRNA). (**)Determinación del linaje de *T. cruzi* de acuerdo a Cosentino y Agüero (2012), usando dos marcadores moleculares (amplicón **TcSC5D** digerido con Hpa I y Sph I, amplicón **TcMK** digrido con Xho I). Las flechas indican la banda de 500 pb en el marcador de 100 pb. Las dos últimas columnas muestran la tipificación de dos cepas de *T. cruzi* ampliamente conocidas: Y (TcII) y Tulahuen (TcV).

4.6 Tipificación molecular del linaje de los grupos tratados, mediante qPCR

Se analizaron 108 muestras pertenecientes a los 3 grupos de infección. Se seleccionaron los grupos de ratones tratados con Clo5, Bz100 y Bz6,25+Clo1,25 e INT para la tipificación del linaje en sangre, corazón y músculo esquelético.

El grupo infectado con el aislamiento Casibla fue caracterizado utilizando sondas TaqMan (Cura y col., 2015). Se obtuvo concordancia con la metodología utilizada para la tipificación del linaje realizada al comienzo de este estudio con el algoritmo de Ramírez y col. (2010) y con la metodología de Cosentino y Agüero (2012), que permitieron la detección de las UDTs TcII/TcVI. Con este método se pudo descartar la posibilidad de la presencia del linaje TcIV en dicho aislamiento, esto se debe a que los dos métodos de tipificación nombrados anteriormente no permiten identificar el linaje TcIV si se encuentran presentes en la misma muestra TcII, TcV o TcVI.

Con la metodología por qPCR utilizando sondas TaqMan, dirigidas a las regiones miniexon, 18S, COII y 24Sα, la detección simultánea de TcII y TcVI se vio obstaculizada por el hecho de que la sonda 18S-TcII/VI reconoce a ambas UDTs, por lo que solamente la presencia de TcII se advierte en aquellas muestras que evidencian la señal de la sonda COII-TcII-Cy5. La sonda COII-TcII-Cy5 no logró la detección de TcII en las muestras analizadas, esto se debe a que cuando se cuenta con muestras que están compuestas por mezclas de UDTs disminuye el límite de detección para cada UDT, por lo que es necesario mayor cantidad de ADN de cada UDT para su detección. Por lo tanto se recurrió a la amplificación del fragmento genómico A10 para resolver los resultados discordantes TcII/VI obtenidos por la señal con la sonda 18S-TcII/VI.

Las curvas de melting obtenidas a partir de la amplificación del fragmento A10 que permitieron la diferenciación entre los linajes TcII y TcVI, posteriormente se visualizaron en un gel de agarosa para corroborar la presencia de las UDTs. Debido a que encontramos resultados discordantes entre las curvas de melting y las bandas obtenidas en los geles, se tomó como criterio para la tipificación, las bandas observadas en los geles y no las curvas de melting.

La figura 37 muestra las curvas de melting obtenidas a partir del fragmento genómico A10 de muestras de ratones infectados con el aislamiento Casibla: un pico de temperatura de melting a 77,69 ± 0,2 ºC indica la presencia de TcII y a 79,38 ± 0,2 ºC indica la presencia

de TcVI. Sin embargo también, como muestra la figura, se observaron curvas entre ambas temperaturas.

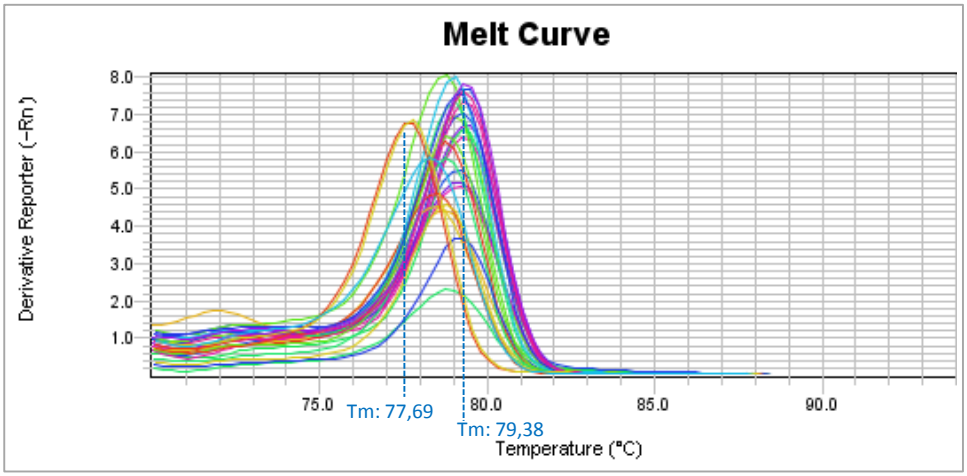


Figura 37: Curvas de melting correspondientes a la amplificación del fragmento A10 de muestras de ratones infectados con el aislamiento Casibla. El pico de temperatura de melting a 77,69 ± 0,2 ºC indica la presencia de TcII y a 79,38 ± 0,2 ºC indica la presencia de TcVI.

Las figuras 38, 39 y 40 muestran el patrón de bandas obtenidos a partir de la amplificación del fragmento A10 de un ratón por tratamiento. La tabla 12 muestra los linajes encontrados en todos los ratones analizados. Para la tipificación del linaje en los grupos infectados con los aislamientos SGO-Z12 y Lucky se realizó únicamente la amplificación del fragmento A10 para distinguir entre la presencia entre TcII y TcVI en cada una de las muestras.

En los grupos SGO-Z12, Lucky y Casibla se encontró mezcla del linaje TcII y TcVI en algunas muestras de los ratones INT. En los grupos SGO-Z12 y Casibla tratados con Clo5, algunas muestras, presentaron mezcla del linaje TcII y TcVI, mientras que en el grupo Lucky tratado con Clo5, se observó el linaje TcII o TcVI en las muestras analizadas.

Los ratones tratados con Bz100 en todos los grupos de infección presentaron en los tejidos analizados linaje TcII o TcVI. Dos de tres ratones infectados con el aislamiento Casibla y tratados con Bz100 presentaron el linaje TcII en sangre. En los grupos SGO-Z12 y Casibla tratados con Bz6,25+Clo1,25 se observó sólo el linaje TcVI en sangre, músculo esquelético y cardíaco, en los tres ratones analizados. Uno de los ratones infectados con aislamiento Lucky y tratados con Bz6,25+Clo1,25 presentó el linaje TcII en músculo cardíaco y linaje TcVI en sangre y músculo esquelético.

Se puede observar que el linaje TcVI se encontró en la mayoría de las muestras analizadas, en los tres grupos de infección.

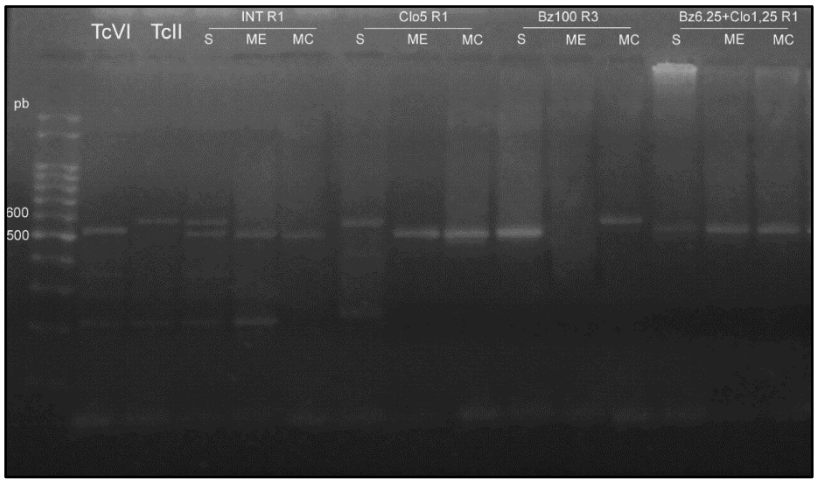


Figura 38: Productos de amplificación del fragmento A10. Los fragmentos de 580 pb indican TcII y 525 pb indican TcVI; se utilizaron como controles las cepas CL Brener (TcVI) e Y (TcII). Se muestran los tejidos (sangre: S, músculo esquelético: ME y músculo cardíaco: MC) de 4 ratones representativos infectados con el aislamiento **SGO-Z12** y tratados. Marcador 50 pb de ADN.

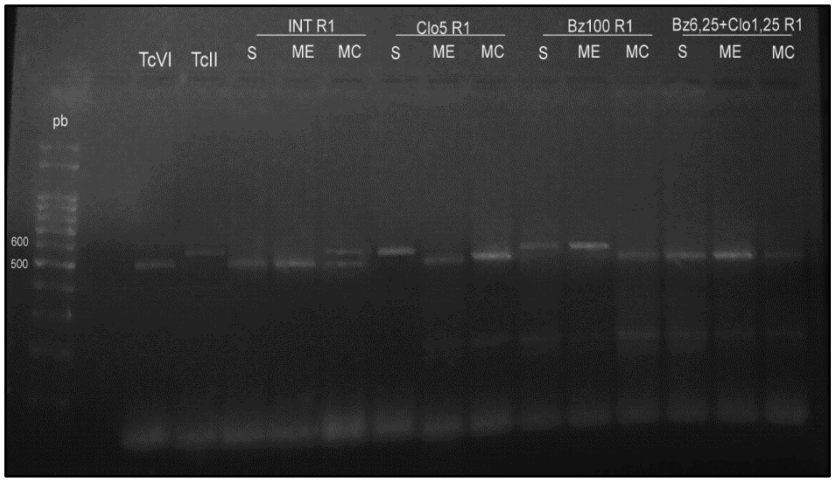


Figura 39: Productos de amplificación del fragmento A10. Los fragmentos de 580 pb indican TcII y 525 pb indican TcVI; se utilizaron como controles las cepas CL Brener (TcVI) e Y (TcII). Se muestran los tejidos (sangre: S, músculo esquelético: ME y músculo cardíaco: MC) de 4 ratones representativos infectados con el aislamiento **Lucky** y tratados. Marcador 50 pb de ADN.

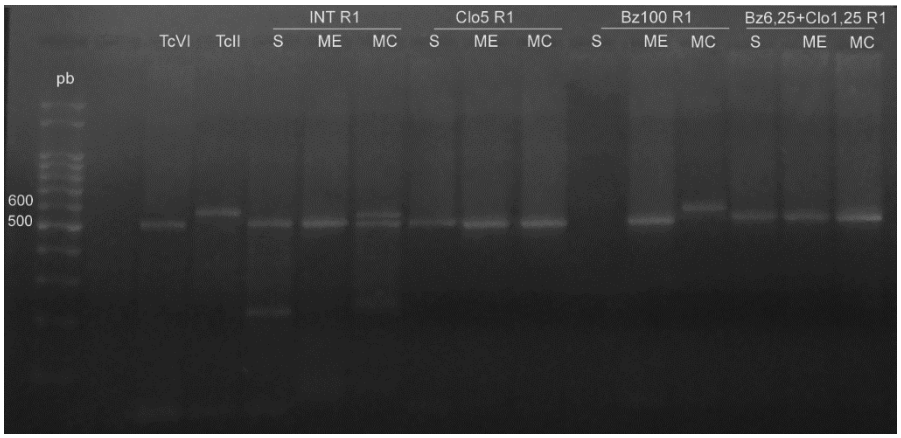


Figura 40: Productos de amplificación del fragmento A10. Los fragmentos de 580 pb indican TcII y 525 pb indican TcVI; se utilizaron como controles las cepas CL Brener (TcVI) e Y (TcII). Se muestran los tejidos (sangre: S, músculo esquelético: ME y músculo cardíaco: MC) de 4 ratones representativos infectados con el aislamiento **Casibla** y tratados. Marcador 50 pb de ADN.

Tabla 12. Detección y tipificación molecular de *T. cruzi* en sangre, corazón y músculo esquelético correspondientes a los 3 grupos de ratones durante la etapa aguda de la infección experimental y tratados con Clo5, Bz100 y Bz6,25+Clo1,25.

	SGO - Z12											
	INT			Clo5			Bz100			Bz6,25+Clo1,25		
Tejido/Ratón	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Sangre	II - VI	VI	VI	II	ND	VI	ND	ND	VI	VI	VI	VI
ME	VI	VI	VI	VI	VI	II - VI	ND	VI	ND	VI	VI	VI
MC	VI	VI	ND	VI	ND	VI	ND	ND	II	VI	VI	VI

	Lucky											
	INT			Clo5			Bz100			Bz6,25+Clo1,25		
Tejido/Ratón	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Sangre	VI	VI	VI	II	VI	VI	VI	VI	VI	VI	VI	VI
ME	VI	VI	VI	VI	II	II	II	VI	VI	VI	ND	VI
MC	II - VI	VI	VI	VI	VI	VI	II	II	VI	VI	VI	II

	Casibla											
	INT			Clo5			Bz100			Bz6,25+Clo1,25		
Tejido/Ratón	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
Sangre	VI	VI	II-VI	VI	VI	VI	ND	II	II	VI	VI	VI
ME	VI	VI	VI	VI	VI	II - VI	VI	ND	VI	VI	VI	VI
MC	II - VI	VI	VI	VI	II - VI	VI	II	VI	ND	VI	VI	VI

ND: No detectado.

Discusión

5. Discusión

El tratamiento actual para la enfermedad de Chagas tiene importantes limitaciones de seguridad y tolerabilidad y se restringe a dos fármacos, nifurtimox y benznidazol. Los esquemas actuales de tratamiento con Bz para adultos presentan dosis altas, duración prolongada (60 días) y administración con dos tomas diarias, todos factores que, junto a la aparición de efectos adversos indeseables, llevan al abandono del tratamiento. Tanto nifurtimox como benznidazol tienen actividad significativa en la fase aguda, con un 60-80% de curas parasitológicas en los pacientes tratados (Cançado, 1999; Urbina y Docampo, 2003; Von y col., 2007). Sin embargo, el tratamiento de la enfermedad de Chagas sigue siendo un campo abierto para la investigación y un problema aún no resuelto, debido a que los dos medicamentos actualmente disponibles no son totalmente eficaces y pueden producir reacciones adversas y efectos tóxicos (tales como reacciones de hipersensibilidad, depresión de la médula ósea, neuropatías y agranulocitosis) (Castro y Díaz de Toranzo, 1988; Morello, 1988; Coura y de Castro, 2002; Viotti y col., 2009). Existen dos enfoques para la optimización del tratamiento de la enfermedad de Chagas, uno de ellos propone utilizar diferentes dosis y duración de tratamiento con Bz en monoterapia, y otro, realizar combinaciones para mejorar la respuesta al tratamiento y tolerabilidad. Para el tratamiento de enfermedades infecciosas se utilizan asociaciones terapéuticas que poseen resultados exitosos debido al uso de compuestos con diferentes mecanismos de acción, al mismo tiempo que se intenta reducir la incidencia y la severidad de los efectos indeseables asociados a dichos compuestos, empleando dosis inferiores de cada uno de los fármacos. Trabajos anteriores han demostrado la importancia de la utilización de combinaciones de dos o más fármacos contra varios microorganismos tales como bacterias (Messadi y col., 2008; Sopirala, 2010), hongos (Kamysz y col., 2011), y protozoos tales como *Plasmodium* (Pereira y col., 2011), *Leishmania* (El-On y col., 2007), y *T. cruzi* (Pelizzaro-Rocha y col., 2010; Valdez y col., 2012). La terapia de combinación cobra importancia en la enfermedad de Chagas debido a que la diversidad biológica encontrada en los aislamientos naturales de *T. cruzi*, influenciada por la circulación del parásito en reservorios selváticos y domésticos, genera variaciones en la respuesta a fármacos (Macedo y Pena 1998; Murta y col., 1998; Toledo y col., 2003). Se ha demostrado que el efecto del tratamiento se modifica por eventos de infección con diferentes linajes de *T. cruzi* (Toledo y col., 2003; Martins y col., 2006; Sales-Campos y col., 2014). En varias zonas geográficas de América del Sur, la ocurrencia de infecciones naturales mixtas por diferentes genotipos de *T. cruzi* ha sido ampliamente

reportada en seres humanos (del Puerto y col., 2010; Burgos y col., 2010; Garcia y col., 2014) y en vectores (Bosseno y col., 2000). En este sentido, varios autores han demostrado la presencia de diferentes poblaciones de *T. cruzi* en la sangre y en el tejido cardíaco de individuos infectados (Burgos y col., 2010; Lo Presti y col., 2014), sugiriendo que los genotipos de *T. cruzi* que causan el daño celular son diferentes a los que se encuentran en sangre (Guhl, 2013), ratificando aún más la posibilidad de la utilización de tratamientos combinados.

5.1 Eficacia *in vitro* de la combinación de drogas tripanocidas

Como se mencionó anteriormente, una aproximación en la búsqueda de soluciones para el tratamiento de la enfermedad de Chagas es la combinación de dos o más agentes, con la finalidad de obtener algún efecto aditivo o sinérgico que potencie sustancialmente la actividad antiparasitaria de las drogas. En el presente trabajo se evaluó si el efecto producido por la combinación de Bz y Clo sobre tripomastigotes de *T. cruzi* es de naturaleza aditiva, antagónica o sinérgica. Debido a la gran heterogeneidad encontrada en las diferentes poblaciones del parásito, se utilizaron tres aislamientos naturales y la cepa Y de *T. cruzi*; los mismos se incubaron con diferentes concentraciones de Bz y Clo. Analizando las drogas por separado se observó que la actividad de Bz fue mayor que la de Clo. La eficacia de una droga, se define como la actividad máxima (en este caso, mortalidad de parásitos) para el compuesto en estudio, independientemente de la concentración del mismo. En base a este parámetro, la eficacia, tanto de Bz como de Clo, fue del 100 % sobre los tres aislamientos naturales estudiados y Clo además, presentó una eficacia del 100 % sobre la cepa Y. Cuando Bz fue incubado con la cepa Y de *T. cruzi* presentó menor eficacia en comparación con los aislamientos, sin embargo, es necesario tener en cuenta que las diferencias en la susceptibilidades a Bz observados en las cepas ampliamente utilizadas en laboratorio, tales como la cepa Y, CL Brener, y Tulahuen se deben a las variaciones en los genotipos, que poseen gran plasticidad y generan resistencia en los parásitos al estar constantemente expuestos a la droga (Moraes y col., 2014; Mejia y col., 2012).

Durante el siglo pasado, se han llevado a cabo numerosos estudios con el fin de determinar la mejor manera de medir el efecto combinado de drogas. Teniendo en cuenta la diversidad y complejidad de los sistemas biológicos, se han categorizado por lo menos 13 métodos diferentes para la determinación de sinergismo y antagonismo de combinaciones de drogas (Greco y col., 1995). Más recientemente, Chou (2006) y otros investigadores

propusieron un método matemático con base en la ley de acción de masas. Este método, ha sido ampliamente utilizado, y expresa los resultados de dos maneras diferentes: numéricamente, mediante el Índice de Combinación, y gráficamente mediante isobologramas. El isobolograma es un modelo matemático utilizado para distinguir entre combinaciones de drogas sinérgicas, aditivas o antagónicas de acuerdo a su ubicación en relación a la línea de aditividad (Tallarida, 2006). En el ensayo de citotoxicidad se observó que Bz combinado con Clo presenta un efecto levemente antagónico sobre las células $LLCMK_2$, lo que significa que la combinación produce menor daño celular que las drogas individuales, sugiriendo seguridad para la farmacoterapia. Además, cabe destacar que las concentraciones citotóxicas medias para Bz y Clo fueron marcadamente mayores que las concentraciones efectivas observadas en el análisis de combinación de drogas sobre tripomastigotes, lo que significa que con bajas concentraciones se produce la muerte de los tripomastigotes y se evita el daño de las células del huésped.

Al analizar el efecto de la combinación sobre tripomastigotes de cultivo, Bz+Clo presentó efecto sinérgico sobre el aislamiento Lucky y la cepa Y, efecto levemente sinérgico sobre el aislamiento SGO-Z12 y aproximadamente aditivo sobre el aislamiento Casibla. Se ha descripto que benznidazol inhibe diferentes proteínas y la síntesis del ARN del parásito e induce graves efectos tóxicos, generando especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno que causan daño oxidativo en el ADN del núcleo y del kinetoplasto de *T. cruzi* (Buschini y col. 2009). Por su parte, clomipramina es un potente inhibidor de la Tripanotiona reductasa de *T. cruzi* (enzima central en el metabolismo redox del parásito) (Benson, 1992; O'Sullivan y col., 2015). Este efecto sinérgico y aditivo entre Bz y Clo puede ser entendido como resultado de los mecanismos de acción complementarios de ambas drogas, que estarían potenciando su efecto letal, produciendo la muerte de los parásitos a menores concentraciones que la monoterapia: Bz generaría metabolitos que inducen daño oxidativo, mientras que Clo inhibiría la enzima (tripanotiona reductasa) encargada de repararlo. Esta combinación de efectos sería capaz de matar a los tripanosomas de manera más eficaz, ya que estos parásitos son particularmente más sensibles al estrés oxidativo que las células de mamífero (Krauth-Siegel y Comini 2008).

Los resultados sin embargo, muestran variaciones en la respuesta de los distintos aislamientos/cepa frente a la acción de los fármacos combinados, lo que manifiesta el papel de la variabilidad genética del parásito en la susceptibilidad a los diferentes tratamientos (Macedo y Pena 1998; Murta y col., 1998; Toledo y col., 2003) y resalta la importancia de la utilización de aislamientos naturales. Las diferentes poblaciones de parásitos presentes en

las infecciones mixtas (que pueden aún estar formadas por parásitos de diferentes linajes, como en este caso) pueden tener diferente susceptibilidad/resistencia a los tratamientos, lo que puede contribuir a la variación en la respuesta manifestada por los diferentes aislamientos. La mayoría de los estudios destinados a contribuir con el entendimiento de la fisiopatogenia de la enfermedad de Chagas se han llevado a cabo utilizando clones del parásito, lo que permite entender varios aspectos de la enfermedad, pero no representa la historia natural de la infección (Vago y col., 1996; Mejía y Triana, 2005). Como se recordará, tanto SGO-Z12 como Lucky y Casibla, han sido obtenidos a partir de individuos (pacientes o vectores) provenientes de área endémica, por lo que representan ejemplos de las poblaciones naturales que actualmente se encuentran en circulación y su estudio permite inferir sobre el comportamiento de estas poblaciones naturales y su respuesta a los tratamientos planteados.

Hay que tener en cuenta que los modelos *in vitro* son métodos simples para estudiar la actividad de fármacos y no siempre explican de forma completa las respuestas encontradas *in vivo*. Se conoce que la interacción entre la genética del huésped y la genética del *T. cruzi* son determinantes para el desarrollo de la infección (Freitas y col., 2009) y por consiguiente también influirán en la susceptibilidad o resistencia a fármacos.

5.2 Combinación de fármacos para el tratamiento antiparasitario de la enfermedad de Chagas *in vivo*

El ensayo *in vivo* proporcionó información importante sobre el efecto de las drogas teniendo en cuenta la complejidad biológica de la interacción parásito/huésped. En las diferentes muestras de tejido de ratones infectados y no tratados, la presencia del parásito fue demostrada a través de parasitemia (en sangre) y qPCR específica para *T. cruzi*, en sangre, músculo esquelético y músculo cardíaco. En los cuatro grupos estudiados (con los diferentes aislamientos/cepa), a los 35 d.p.i., se encontró que el parásito estaba presente en los tejidos analizados.

De acuerdo con los resultados obtenidos a partir de los tratamientos se pudo observar que el tratamiento con Clo, en todas las concentraciones utilizadas, sobre los tres aislamientos y sobre la cepa Y de *T. cruzi* presentó una efectividad parcial en la eliminación de los parásitos (figura 24). En contraposición, el tratamiento con Bz demostró ser efectivo, en relación a la disminución de la parasitemia y al aumento de la sobrevida, incluso utilizando la concentración más baja. Sin embargo, el tratamiento con la combinación de las

menores dosis de Bz y de Clo fue más efectivo, en diferentes grados según el aislamiento infectante, en comparación con los grupos tratados sólo con Bz 6,25 o Clo 1,25 mg/kg/día.

El tratamiento con diferentes concentraciones de Clo en el grupo infectado con la cepa Y no presentó diferencias significativas con el grupo infectado no tratado y se pudo observar que el tratamiento con 10 mg/kg/día (mayor concentración de Clo utilizada en el presente trabajo) produjo un aumento de la carga parasitaria en comparación con el grupo infectado no tratado. Este comportamiento podría deberse a que los tratamientos con antidepresivos (clomipramina, imipramina, citalopram) tienen efectos inmunoreguladores negativos, suprimiendo de forma significativa la secreción de Interleuquina-2 e IFNγ por linfocitos T y de Interleuquina-1 por macrófagos (Maes, 2001; Diamond y col., 2006). Cabe destacar que la dosis terapéutica máxima por día de Clo en humanos equivale a 10 mg/kg en ratones (Yang el al., 2016); esta dosis estaría produciendo este efecto inmunoregulador negativo, lo que explicaría el aumento de la carga parasitaria y la muerte de los ratones infectados con la cepa Y. Los ratones tratados con las dosis de Clo 5, 2,5 y 1,25 mg/kg/día presentaron igual o menor sobrevida que el grupo INT, lo que indicaría que aún con concentraciones más bajas de Clo, se continuaría produciendo el efecto inmunoregulador negativo. Sin embargo, para llegar a resultados más concluyentes se debería aumentar el tamaño de la muestra y probablemente medir los niveles de expresión de citoquinas luego del tratamiento para caracterizar la respuesta inmune.

Cuando el *T. cruzi* ingresa al organismo, se disparan diversos mecanismos inmunológicos destinados a modular y controlar la infección. El IFN-γ producido por las células T activadas CD4+ y CD8+ y Natural Killer tiene un papel crucial en la eliminación del parásito (Sardinha y col., 2006). El IFN-γ potencia la actividad efectora de macrófagos, mediante la inducción de la transcripción del gen codificador de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), que actúa produciendo óxido nítrico y el aumento de éste tiene un potente efecto en la eliminación del parásito (Gazzinelli y col., 1992). Se ha reportado que los ratones deficientes en iNOS son altamente susceptibles a la infección (Saeftel y col., 2001); otros investigadores sin embargo (Cummings y Tarleton, 2004), han demostrado que iNOS es importante aunque no esencial para el control de la infección con *T. cruzi*.

En base a estos resultados obtenidos con la cepa Y, se determinaron las dosis de Clo a utilizar en los estudios en animales infectados con los aislamientos naturales de *T. cruzi*: sólo las concentraciones de Bz100; Bz6,25; Clo5; Clo1,25 y la combinación de las concentraciones más bajas de ambas drogas fueron utilizadas. El grupo infectado con el aislamiento Casibla tuvo una respuesta al tratamiento similar al grupo infectado con la cepa

Y. Los animales tratados con Clo no presentaron diferencias significativas en los primeros días de la infección con el grupo INT y presentaron altos porcentajes de infiltrados inflamatorios en músculo esquelético. Por su parte, los ratones infectados con los aislamientos SGO-Z12 o Lucky y tratados con Clo presentaron parasitemias significativamente menores que los grupos INT correspondientes.

El tratamiento con la combinación de las menores dosis de Bz (6,25mg) y Clo (1,25mg) presentó una disminución más rápida de la carga parasitaria en comparación con el grupo tratado sólo con Bz (6,25mg) y una sobrevida del 100% de los ratones infectados con la cepa Y. La combinación también demostró ser efectiva en los ratones infectados con los aislamientos SGO-Z12 y Lucky. Estos resultados se pueden observar en los biplots (figura 35) obtenidos a partir del análisis de componentes principales, realizado para ilustrar el efecto de combinación de Bz6,25+Clo1,25 en el modelo murino. Este análisis es ampliamente utilizado en diferentes áreas con el fin de mejorar la interpretación de los resultados cuando múltiples variables contribuyen a un determinado resultado (de Haan y col., 2007; Wu y col., 2015; Rehman y col., 2015). Teniendo en cuenta las variables sobrevida, Nº de parásitos, porcentaje de infiltrados inflamatorios en músculo esquelético, nidos de amastigotes en músculo esquelético y daños histológicos en hígado y riñón, el análisis representó en el espacio los diferentes tratamientos según su relación con todas las variables analizadas.

El tratamiento combinado (Bz6,25+Clo1,25) administrado a ratones infectados con la cepa Y, aislamientos SGO-Z12 y Lucky, se ubicó entre Bz100 y Bz6,25 o Clo5 (figuras 35 A, B y C), indicando que la combinación de los fármacos aumentó la eficacia del tratamiento según las variables analizadas. El tratamiento combinado administrado a ratones infectados con el aislamiento Casibla, se ubicó en la misma posición que Bz6,25, indicando que ambos tratamientos presentaron el mismo efecto. También se puede observar que los tratamientos con Clo no fueron efectivos sobre ratones infectados con este aislamiento presentando, por ejemplo, los mayores porcentajes de infiltrados inflamatorios en músculo esquelético y cardíaco. Sin embargo cuando se realizó el recuento de nidos de amastigotes se encontró menor cantidad de nidos en los grupos tratados con Clo en comparación con el grupo infectado no tratado.

La respuesta al tratamiento combinado encontrada en ratones coincide con lo observado en los estudios *in vitro*. Es de destacar, que el tratamiento combinado sobre el aislamiento Casibla no presentó mayor efectividad que el tratamiento utilizando sólo Bz *in vitro* e *in vivo*. De acuerdo con Chou (2006, 2010), la extrapolación de los resultados *in vitro*

a animales es un problema que aún no está resuelto; predecir el mecanismo de acción de dos fármacos en función de su interacción no es fácil. El mecanismo de la combinación se puede dar en un punto de acción específico o en innumerables pasos. Sin embargo, varios estudios han demostrado que los compuestos con diferentes mecanismos de acción pueden cooperar para mejorar el efecto final observado (Benaim, 2006; Chen y col., 2011).

Hasta la fecha existen pocos estudios que investiguen los efectos producidos por la infección con *T. cruzi* y el tratamiento con Bz en el tejido hepático y renal, a pesar que la toxicidad atribuida al Bz culmina con frecuencia con la suspensión del tratamiento por parte de los pacientes debido a la aparición de diversos efectos adversos indeseables (Esperandim y col., 2013; Davies y col., 2014; Rendon, 2014; Novaes y col., 2015). El procesamiento enzimático de Bz conduce a la formación de intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno (Maya y col., 2007; Urbina, 2010; Esperandim y col., 2013); este proceso genera compuestos electrófilos que aumentan la toxicidad del Bz tanto contra el parásito como contra las células del huésped (Castro, 2006; Maya y col., 2007). La biotransformación del Bz por el complejo enzimático de microsomas hepáticos tiene una fuerte relación con alteraciones en el hígado (Rendon, 2014).

La infección por *T. cruzi* produce injuria morfofuncional del tejido hepático, y el tratamiento con benznidazol 100 mg/kg/día genera un desafío aún mayor para los mecanismos de defensa antioxidante hepática, que con frecuencia fallan en la neutralización de grandes cantidades de metabolitos reactivos, y su acumulación contribuye a la mala tolerabilidad del organismo asociado a la terapia anti-*T. cruzi* (Novaes y col., 2015)

En el presente trabajo se estudiaron los cambios morfológicos en hígado, riñón e intestino producidos por las drogas Bz y Clo administradas en ratones no infectados e infectados y, a su vez, el impacto de la infección por *T. cruzi*. Se pudo observar que la infección por *T. cruzi* produce alteraciones en el parénquima hepático y renal presentando inflamación difusa de leve a moderada intensidad. No se observaron alteraciones morfológicas en intestino en ninguno de los grupos analizados. Por su parte, los ratones no infectados y tratados con Bz100 y Bz6,25 presentaron alteraciones en el parénquima hepático y renal (siendo de menor intensidad en Bz6,25). Se pudo observar que Clo1,25 no presentó alteraciones morfológicas y la combinación de las drogas produjo leves alteraciones en hígado.

Los grupos INT (infectados no tratados) presentaron mayor inflamación en ambos tejidos (hígado y riñón) en comparación con los grupos tratados con Bz100, sin embargo el tratamiento con Bz100 presentó mayor cantidad de alteraciones (inflamación difusa, de

moderada intensidad en hígado y riñón) en comparación con los demás tratamientos. Estos resultados coinciden con los de Novaes y colaboradores (2015) que encontraron que la proporción de células intersticiales (células inflamatorias) en el tejido hepático y los niveles circulantes de IFN-γ, TNF-α, e IL-6 se incrementaron drásticamente por la infección; estas alteraciones se redujeron cuando se administró benznidazol 100 mg/kg/día, lo que indicaría que esta droga reduciría las citoquinas pro-inflamatorias. Más allá de su participación en el control de parásitos, estas citoquinas también estimulan directamente la síntesis de especies reactivas del oxígeno en leucocitos, lo cual altera el equilibrio redox del tejido, y favorece el daño tisular (Pérez-Fuentes y col., 2003; Bergeron y Olivier, 2006; Gupta y col., 2009; Nagajyothi y col., 2012).

Se ha reportado que clomipramina induce fosfolipidosis (lisosomas cargados de fosfolípidos) en hígado y riñón: a través de microscopia óptica se han observado los citoplasmas claros y de aspecto granular en hepatocitos y células de Kupffer de ratas tratadas con clomipramina (Hirode y col., 2008; Saito y col., 2014). En el presente trabajo, en los tejidos analizados provenientes de ratones tratados con Clo no se observó fosfolípidosis; por el contrario, se encontró una disminución de los infiltrados infamatorios en los tejidos de ratones infectados y tratados comparados con los grupos INT. Este efecto se podría deber a la baja dosis administrada y/o al efecto inmunoregulador negativo de Clo, mencionado anteriormente (Maes, 2001; Diamond y col., 2006). El tratamiento combinado mostró similares alteraciones en hígado o riñón a las encontradas con Bz6,25, y no se observó un aumento del daño morfológico debido a la administración conjunta de las drogas. Los ratones infectados con el aislamiento Casibla presentaron en todos los grupos mayores alteraciones en el parénquima hepático y renal en comparación con los aislamientos SGO-Z12 y Lucky y la cepa Y de *T. cruzi*.

Según lo observado, la severidad de las alteraciones morfológicas encontradas en el tejido hepático y renal se debe a la cepa/aislamiento infectante; el tratamiento de la infección por lo tanto, es necesario para reducir dichas alteraciones. Sin embargo se deberían evitar altas dosis de las drogas, ya que existen evidencias que demuestran que elevadas dosis de benznidazol tienen alta toxicidad, sin una contribución terapéutica significativa, es decir sin la completa eliminación de los parásitos (Cançado 2002; Castro y col., 2006; Guedes y col., 2011).

En las muestras de tejido hepático, renal e intestinal de los ratones infectados y tratados no se encontraron nidos de amastigotes. Sólo se detectaron en músculo esquelético de ratones de todos los grupos infectados y en músculo cardiaco de ratones infectados con

el aislamiento Casibla. Sin embargo, si bien no se detectaron nidos de amastigotes en músculo cardíaco de ratones infectados con SGO-Z12, Lucky y la cepa Y, se detectó la presencia del parásito en este tejido a través de qPCR específica para *T. cruzi*. Existen trabajos que han demostrado que el *T. cruzi* en la etapa aguda de la infección se encuentra presente en prácticamente todos los tejidos de huésped (Lewis y col., 2014; Lewis y col., 2016).

En el interior de la célula parasitada el tripanosoma metacíclico se transforma en amastigote. En esta fase, el parásito inicia su multiplicación por divisiones binarias sucesivas y, en aproximadamente 5 días, el citoplasma de la célula parasitada está completamente lleno de amastigotes. Esto es lo que se denomina "nido de amastigotes";–comienza entonces la transformación hacia tripomastigotes. Cuando todos los parásitos dentro de una célula alcanzan la forma tripomastigote, entran en un período de activo movimiento, lo que contribuye a hacer estallar la célula que los contiene; así los nuevos tripanosomas que pasan a la circulación parasitan células de diferentes sistemas y órganos, tales como: músculos estriados, sistema nervioso central, hígado, bazo, ganglios y musculatura lisa. En estas células se cumple nuevamente el ciclo, aportando nuevas formas tripomastigotes a la sangre. La cantidad de nidos de amastigotes brinda información acerca de la eficacia de las formas metacíclicas en el establecimiento de la infección (Cossentini y col., 2016). En el presente trabajo, se observó una menor cantidad de nidos de amastigotes (promedio=11) en tejidos de músculo esquelético de ratones infectados con el aislamiento SGO-Z12 en comparación con dichos tejidos de ratones infectados con Lucky (16), Casibla (19) o la cepa Y (17). El aislamiento SGO-Z12 demostró ser el aislamiento con menor virulencia, presentando menor infectividad y cantidad de parásitos en músculo esquelético y cardíaco, mientras que el aislamiento Casibla fue el que presentó mayor virulencia. El grupo tratado con la combinación de drogas presentó una menor cantidad de nidos de amastigotes en músculo esquelético en los ratones infectados con la cepa Y y aislamientos SGO-Z12 y Lucky en comparación con la monoterapia. En los cuatro grupos infectados, los ratones tratados con Bz100 no presentaron nidos de amastigotes, lo que se relaciona con la menor carga parasitaria encontrada en estos grupos (figura 24). Estos resultados coinciden con otros trabajos que evidencian que una dosis de 100 mg/kg/día de Bz administrada durante 20 días consecutivos no elimina completamente el *T. cruzi* en modelos experimentales murinos (Martins y col., 2008; Caldas y col., 2008; Teston y col., 2013; Gruendling y col., 2015; Cevey y col., 2016). Un estudio que utilizó dosis significativamente más bajas de Bz que las que generalmente se utilizan para el tratamiento de ratones, demostró que la administración

de Bz a 25 mg/kg/día durante la etapa aguda fue tan efectivo como Bz a 100 mg/kg/día, en términos de la disminución de parásitos en sangre y reducción de la reacción inflamatoria en músculo cardíaco de ratones infectados con la cepa RA de *T. cruzi* (TcVI) (Cevey y col., 2016). Por otro lado, la combinación de Bz con otras drogas ha demostrado tener un efecto sinérgico, aún en cepas normalmente resistentes al Bz, indicando además que los efectos de la combinación están también condicionados por la cepa o el aislamiento (Araujo y col., 2000). Estos hallazgos refuerzan la idea, por un lado, de la disminución de las dosis de Bz y, por otro, de la factibilidad de su administración en combinación con otra droga con diferentes mecanismos de acción para lograr la completa eliminación del parásito. En este sentido, para la enfermedad de Chagas, resultados positivos han sido obtenidos en diferentes etapas de la enfermedad con la asociación de benznidazol y ketoconazol (Araújo y col., 2000). En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, la combinación de Bz más Clo ha demostrado ser efectiva cuando fue administrada en la etapa aguda de la infección experimental con *T. cruzi* (cepa Tulahuen), logrando reducir la mortalidad y la parasitemia en los ratones tratados (Strauss y col., 2013). De este modo, la sinergia entre drogas puede ser una valiosa alternativa para mejorar la eficacia del tratamiento (Coura, 2007; Zingales y col., 2014).

La figura 41 resume los resultados encontrados al aplicar la combinación de Bz6,25+Clo1,25 en ratones infectados con los distintos tipos de parásitos.

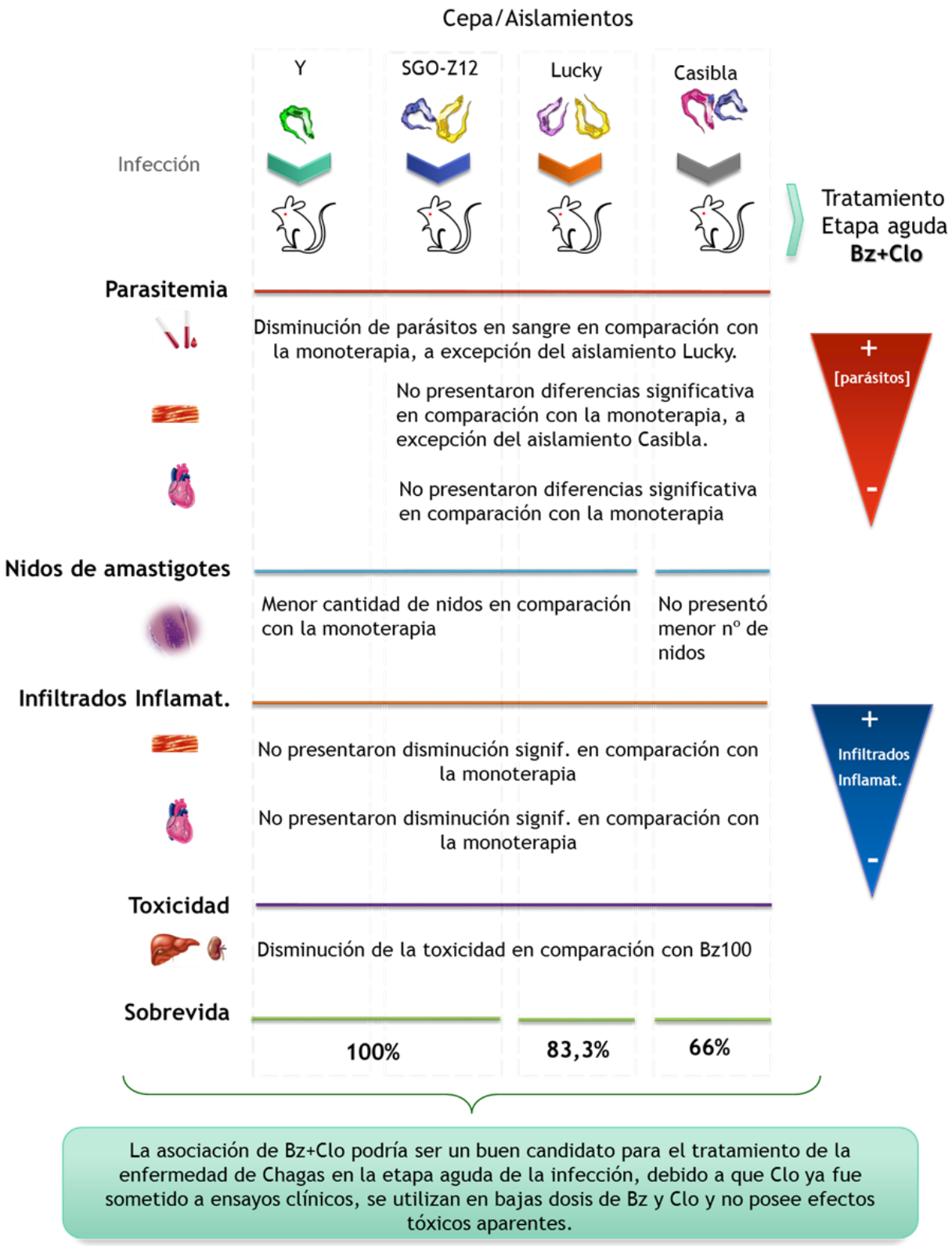


Figura 41: representación de los resultados encontrados al aplicar la combinación de Bz6,25+Clo1,25 en ratones infectados con los distintos tipos de parásitos. Se muestran los diferentes parámetros analizados y se realiza una comparación con la monoterapia en la mayoría de los casos. La base del triángulo indica "mayor cantidad" del parámetro analizado. El triángulo rojo indica que la cantidad de parásitos detectados fue decreciendo de sangre a músculo cardíaco. El triángulo azul indica mayor área cubierta de infiltrados inflamatorios en músculo esquelético que en músculo cardíaco.

5.3 Evaluación del efecto ansiolítico de clomipramina mediante la prueba de laberinto elevado en cruz (Plus Maze)

Como se mencionó anteriormente, clomipramina es un potente inhibidor de la tripanotiona reductasa de *T. cruzi*, enzima implicada en el metabolismo redox del parásito (Ravaschino y col., 2006; O'Sullivan y col., 2015). Sin embargo, el uso habitual de esta droga es en el ámbito de la psiquiatría. Clomipramina es un antidepresivo tricíclico similar en su estructura a la imipramina y a la desipramina y es el primer fármaco aprobado para el tratamiento del trastorno obsesivo-compulsivo (Capstick, 1971). Así, clomipramina es el más específico de todos los antidepresivos tricíclicos con respecto a su capacidad para inhibir la recaptación de serotonina y noradrenalina. Aunque clomipramina se utiliza clínicamente para tratar el trastorno obsesivo-compulsivo, también se utiliza para la depresión mayor y para dolores crónicos, como en la neuropatía diabética (Suehiro y col., 2013).

Por lo tanto, en su utilización como antiparasitario, la droga podría tener efectos en la conducta de los ratones debido a sus propiedades ansiolíticas. Por este motivo, se realizó la prueba del laberinto elevado en cruz que es un modelo válido para evaluar ansiedad (File y col., 1998; Rahman y col., 2015). Como se mencionó anteriormente, estudios realizados en nuestro laboratorio mostraron que Clo (a una concentración de 5 mg/kg/día) no ocasiona cambios clínicos en ratones albinos suizos infectado y no infectados (Rivarola y col., 2005, Strauss y col., 2013). Sin embargo, hasta el momento no se había comprobado su efecto sobre la conducta de ansiedad en ratones infectados con *T. cruzi*.

Los modelos de laberintos elevados, como el “plus maze”, son ejemplos de modelos ansiolíticos de tipo no condicionado, que están basados en la tendencia natural que tienen los roedores a evitar espacios abiertos y elevados (Pellow y col., 1985). Este modelo permite diferenciar entre el efecto ansiolítico o ansiogénico de fármacos. La prueba consistió en cuantificar el tiempo en que los ratones permanecieron en las zonas abiertas y zonas cerradas del laberinto; así como el número de veces que éstos entraron en cada una de ellas. Por lo tanto, se consideró disminución del estado ansioso (ansiólisis) cuanto más tiempo permaneció y realizó mayor número de entradas a zonas abiertas. Por el contrario aumento del estado ansioso (ansiogénesis) se consideró cuando el tiempo de permanencia en zonas cerradas fue mayor (Komada y col., 2008).

Estudios experimentales de modelos de depresión indican que los ratones sometidos a estrés disminuyen el porcentaje de entradas y el tiempo de permanencia en brazos abiertos en el laberinto elevado en cruz, y cuando estos ratones fueron tratados con clomipramina (10

mg/kg/día) se observó que mejoró significativamente el comportamiento de ansiedad, es decir se observó un aumento significativo del porcentaje de entradas y del tiempo de permanencia en brazos abiertos (Yang y col., 2016).

Teniendo en cuenta el mecanismo por el cual Clo produce cambios en el comportamiento de ansiedad, se evaluó el efecto de esta droga sobre ratones no infectados e infectados tratados con Clo5 y Clo1,25. En la evaluación conductual de ratones no infectados, utilizando el laberinto elevado en cruz, fue posible observar que la concentración Clo5 produce un efecto ansiolítico, al observarse más tiempo de permanencia y mayor número de entradas a zonas abiertas en comparación con el grupo vehículo. La concentración de Clo1,25 no presentó diferencias significativas con el grupo vehículo indicando que esta concentración no genera cambios en la conducta de ansiedad de ratones no infectados. La región anatómica que se encuentra en el tallo cerebral, el locus cerúleo (LC), es la principal fuente de noradrenalina en el cerebro y está implicado en procesos fisiológicos tales como la adaptación a la antinocicepción (inhibición de la sensación de dolor), el estrés, la abstinencia de opiáceos, entre otros (Pudovkina y col., 2002). El LC puede modular la nocicepción a través de su vía descendente. Se ha reportado que la vía descendente inhibitoria del dolor que parte del LC está relacionada con el desarrollo de la neuropatía (Hodge y col., 1983). La vía descendente de noradrenalina juega un rol importante en la analgesia del dolor en la neuropatía diabética, y existe una correlación entre la liberación de noradrenalina en el LC y el dolor. Estudios experimentales demostraron que el aumento extracelular de la concentración de noradrenalina fue significativamente mayor en ratas con neuropatía diabética en comparación con ratas sin alteraciones. Luego del tratamiento con clomipramina se observó que la inhibición de la recaptación de serotonina y noradrenalina fue más efectiva en estadios patológicos en comparación con ratas sin aleraciones (Suehiro y col., 2013). Estas investigaciones evidencian que clompramina juega un rol en la modulación de la recaptación de serotonina y noradrenalina en el LC, pruduciendo un efecto analgésico y probablemente ansiolítico.

Diversos estudios han reportado que el desarrollo de la enfermedad de Chagas en el modelo murino produce cambios en el comportamiento tanto en la etapa aguda como en la etapa crónica de la infección (Silva y col., 2012; Vilar-Pereira y col., 2015; Campos y col., 2016). El compromiso del sistema nervioso central en la enfermedad de Chagas es reconocido en la fase aguda de la infección, como por ejemplo, cuando se desarrolla meningoencefalitis (Prata, 2001; Rassi y col., 2010).

En base a los resultados obtenidos, encontramos que los ratones infectados con la cepa Y de *T. cruzi* a los 35 d.p.i. presentaron un comportamiento de tipo ansiolítico. Un estudio realizado en ratones Balb/c infectados con la cepa Y de *T. cruzi* demostraron que la actividad de los ratones se encontró notablemente alterada durante el curso de la infección aguda. Las características que se hallaron alteradas fueron la postura, piloerección, fatiga, debilidad, pérdida de peso y reducción en el consumo de alimentos. Estas características son coincidentes con las observadas en el presente estudio en ratones albinos suizos infectados con *T. cruzi*. Los ratones infectados y tratados con Clo5 no presentaron diferencias significativas con el grupo vehículo, probablemente debido al efecto de la infección con *T. cruzi*. Sin embargo el grupo de ratones infectados y tratados con Clo1,25 presentaron una disminución en el porcentaje de entradas en brazos abiertos y tiempo de permanencia, acercándose a los valores de los ratones no infectados. Por lo tanto esta concentración podría ser la adecuada para el tratamiento, debido a que produjo el restablecimiento de los patrones conductuales estudiados. Cabe destacar, que esta fue la dosis de Clo utilizada en la combinación con Bz.

5.4 Tipificación molecular de los linajes presentes en los aislamientos naturales de *T. cruzi* utilizados en el presente trabajo

Con el objetivo de tipificar los aislamientos naturales de *T. cruzi* utilizados, se evaluó la presencia y distribución de los mismos en distintos tejidos (sangre, músculo esquelético y músculo cardíaco) de ratones infectados con cada aislamiento, durante la fase aguda de la infección experimental.

Varios estudios han indagado sobre las propiedades biológicas y los comportamientos de las diferentes UDTs por separado (Aquilino y col., 2012; Ragone y col., 2012; Silva Valadares y col., 2012), pero pocos se han centrado en la utilización de aislamientos compuestos por una mezcla de UDTs diferentes (Llewellyn y col., 2011), tal como el presente. En los casos en los que se ha estudiado la infección debida a diferentes UDTs en un mismo individuo, las mismas han sido “generadas experimentalmente” mediante la infección de animales con dos cepas de parásitos correspondientes a UDTs diferentes (Ragone y col., 2015). En este caso, se utilizaron aislamientos naturales de *T. cruzi* (formados por más de un linaje) que actualmente se encuentran circulando en áreas endémicas de nuestro país, lo que permite analizar el comportamiento de los mismos una vez que ingresan al huésped mamífero y su respuesta a la quimioterapia propuesta.

Varios estudios han confirmado la alta incidencia de infecciones múltiples en pacientes y vectores (Bosseno y col., 2000; Solari y col., 2001; Mantilla y col., 2010) e infecciones mixtas con parásitos correspondientes a UDTs diferentes en un mismo paciente han sido reportadas (Mantilla y col., 2010; Ramírez y col., 2010). Los tres aislamientos naturales utilizados en el presente estudio consistieron de una mezcla de diferentes linajes de *T. cruzi*, como se determinó mediante los estudios de tipificación molecular; por lo tanto son ejemplos de infecciones mixtas en pacientes y vectores, ya que dos de ellos se obtuvieron de niños infectados con Chagas congénito (Lucky y Casibla) y el tercero a partir de un insecto vector proveniente de área endémica (SGO-Z12). Su utilización en un modelo experimental de infección ha demostrado que los "tipos" diferentes de parásitos podrían presentar un tropismo preferencial para ciertos órganos o tejidos y extenderse por todo el huésped, empeorando la situación para las estrategias de tratamiento.

A través de los años, se han utilizado numerosos enfoques para detectar y caracterizar la diversidad bioquímica y genética del *T. cruzi* (Brisse y col., 2001; Rozas y col., 2007; Burgos y col., 2007; Lewis y col., 2009; D'Avila y col., 2009; Ramírez y col., 2010; Hamilton y col., 2011; Yeo y col., 2011; Lauthier y col., 2012; Cosentino y Agüero, 2012; Cura y col., 2015). Sin embargo, ningún blanco molecular, por sí solo, permite la resolución completa de las diferentes UDT. Por otra parte, también hay que tener en cuenta que la dependencia en un único marcador para la tipificación de los parásitos tampoco es aconsejable debido a la potencial influencia del intercambio genético. En el presente trabajo se utilizaron diferentes metodologías para la tipificación de los linajes presentes: PCR convencional (aplicando los algoritmos de Ramírez y col., 2010 y de Cosentino y Agüero, 2012) y PCR en tiempo real (Cura y col., 2015, Burgos y col., 2007).

En una primera instancia, se plateó la tipificación de los linajes utilizando solamente el algoritmo de Ramírez y colaboradores (2010) con tres marcadores moleculares (miniexón, 24Sα y 18S). Esta metodología es teóricamente capaz de discriminar inequívocamente todos los linajes, pero la interpretación de los resultados es a menudo propensa a errores, ya que el poder de discriminación del ensayo se basa en la inspección visual de pequeñas diferencias en el tamaño de las bandas electroforéticas (Cosentino y Agüero, 2012) y la asignación a uno u otro linaje está basada en la ausencia en lugar de la presencia de productos de amplificación (ver figura 13), lo que puede ser problemático (Zingales y col, 2012) o enmascarar la presencia de infecciones mixtas, donde la presencia de un linaje puede encubrir o enmascarar la presencia de otro (particularmente, la presencia de TcII puede encubrir la presencia de TcVI, si ambos están presentes en la misma muestra). Debido a esta

limitación, se utilizó también la metodología de Cosentino y Agüero (2012) que utiliza dos marcadores moleculares adicionales (TcSC5D y TcMK). La utilización de dos metodologías diferentes, que alternativamente muestren la presencia de distintos linajes, puede permitir discriminar más detalladamente los linajes presentes en una determinada muestra (Lo Presti y col., 2014). Al comienzo del estudio se tipificaron muestras de tres ratones infectados con cada uno de los aislamientos. Una vez conocida la composición de los aislamientos, se utilizaron otros marcadores para la tipificación de los parásitos presentes en los grupos tratados y no tratados, infectados con los diferentes aislamientos. En total se tipificaron muestras de seis ratones infectados con cada uno de los aislamientos y muestras de tres ratones por cada tratamiento.

Para la tipificación del aislamiento Casibla se utilizaron sondas TaqMan (MTqPCR) (Cura y col., 2015), además de los marcadores nombrados anteriormente; esta metodología incluye un número mínimo de reacciones secuenciales (dos reacciones de qPCR), y ha demostrado elevada especificidad. Si bien, la sonda 18S-TcII/VI detectó la presencia de ambas UDTs (TcII/VI), la sonda COII-TcII-Cy5 no logró la detección de TcII en ninguna de las muestras analizadas. Por lo tanto se recurrió a la amplificación del fragmento genómico A10 (Brisse y col., 2000) para resolver los resultados discordantes TcII/VI obtenidos por la señal con la sonda 18S-TcII/VI. Con esta metodología se detectó la presencia de TcII en 7 de las 36 muestras analizadas. Esta metodología permitió además, descartar la presencia del linaje TcIV en las muestras pertenecientes a este aislamiento, ya que su presencia no se puede descartar con ninguna de las metodologías anteriores (miniexón+24Sα+18S y TcSC5D+TcMK) si otros linajes están presentes en la misma muestra.

Si bien la metodología de qPCR multiplex con sondas TaqMan fue la que presentó un número menor de reacciones para lograr la tipificación de las UDTs, fue necesario utilizar un marcador adicional para resolver los resultados discordantes. Ninguna de las metodologías de tipificación es por lo tanto totalmente eficaz a la hora de detectar infecciones mixtas en una misma muestra (es decir, que en una misma muestra se encuentren parásitos de diferentes linajes) ya que en todos los casos algunos linajes pueden quedar encubiertos. Hasta el momento no se cuenta con una única metodología para la tipificación de linajes de *T. cruzi* que pueda ser utilizada en casos de infecciones con parásitos de diferentes linajes.

Los tres aislamientos mostraron estar formados por una mezcla de parásitos correspondientes a los linajes TcII y TcVI. Estos linajes presentan una amplia restricción al

ciclo doméstico de transmisión. Su localización geográfica se encuentra al sur de la cuenca del Amazonas y constituyen la principal causa de enfermedad de Chagas en los países de esa región (Zingales y col., 2012). En el cono sur, donde *T. infestans* es el vector mayoritario, TcII, TcV y TcVI son los principales agentes causantes de la enfermedad de Chagas. Se ha reportado que TcII predomina en Brasil y TcVI en el Gran Chaco Argentino (Brèniere y col., 2002; Diosque y col., 2003; Coronado y col., 2006; Burgos y col., 2007; Carranza y col., 2009; del Puerto y col., 2010); también se ha encontrado asociado a la infección de perros y gatos en el noroeste de Argentina (Cardinal y col., 2008; Marcet y col., 2006; Enriquez y col., 2012).

La distribución de los linajes en los distintos tejidos de ratones infectados en ninguno de los casos fue homogénea: de los seis ratones infectados el aislamiento SGO-Z12, cuatro presentaron los linajes TcII y TcVI en circulación y dos sólo TcVI. En las muestras de corazón, tres de los animales presentaron TcII y TcVI y dos TcVI (cabe destacar que en una de las muestras, no se detectó la cantidad de ADN necesaria para su tipificación), mientras que en las muestras de músculo esquelético sólo se encontró TcVI. Por su parte, dos de los ratones infectados con el aislamiento Lucky presentaron una mezcla de ambos linajes en todos los tejidos y otros dos presentaron solamente el linaje TcVI. La mayoría (4/6) de los ratones infectados con el aislamiento Casibla presentaron el linaje TcVI en músculo esquelético y la mayoría (4/6) presentaron ambos linajes en sangre y corazón. Comparando los tres aislamientos, se observó que la mayoría de los ratones infectados presentaron sólo el linaje TcVI en músculo esquelético (14 de 18 muestras de este tejido). En circulación y en músculo cardíaco sin embargo, ambos linajes estaban presentes en la mayoría de los casos (11/18 y 10/17, respectivamente). Sólo dos muestras de músculo esquelético presentaron el linaje TcII (una del grupo Lucky y otra del grupo Casibla).

Estos resultados concuerdan en parte con lo encontrado por Ragone y colaboradores (2015) en un modelo de coinfección, en el que “mezclaron experimentalmente” parásitos de diferentes linajes y los utilizaron para la inoculación de ratones C57BL/6. En estos animales luego estudiaron la distribución de los diferentes linajes en sangre, corazón y músculo esquelético, encontrando que cuando los animales eran coinfectados con dos linajes diferentes, en las muestras luego sólo se detectaba uno de los linajes utilizados, como ocurrió en los casos en los que solo se detectó TcVI (aproximadamente la mitad del total de muestras analizadas). Este resultado puede deberse a varios factores: la supervivencia de un tipo determinado de parásito puede estar relacionada con diferentes mecanismos asociados con su capacidad para escapar del sistema inmune del huésped (Sales-Campos y col., 2014;

Ragone y col. 2015), o debido a un proceso selectivo dentro de las células del huésped en favor de un linaje determinado (Pena y col., 2011). Los autores reportan por ejemplo que TcIII y TcVI inducirían una mayor respuesta serológica que TcV (Ragone y col., 2012); en consecuencia, en un evento de infección mixta entre TcV + (TcIII o TcVI), TcV puede ser afectado por la respuesta inmunológica inducida por TcIII o TcVI y ser eliminado del huésped (por lo menos a niveles no detectables por las técnicas utilizadas). Algo similar podría estar ocurriendo con TcII en nuestros modelos: el sistema inmunológico del huésped podría estar eliminando los parásitos TcII a niveles no detectables por las metodologías utilizadas en el presente trabajo y solo TcVI sería detectado en estas muestras (aquí cabe destacar que TcII puede ser detectado con las metodologías propuestas en conjunto y no quedaría encubierto por otro linaje, si estuviera presente).

En todas las coinfecciones estudiadas por Ragone y colaboradores, TcVI fue el único linaje detectado sobre TcIII y TcV (coinfección con TcII no fue estudiadas en ese caso) (Ragone y col., 2015). Trabajos llevados a cabo en nuestro laboratorio estudiando infecciones mixtas entre parásitos TcV (cepa Tulahuen) y TcVI demostraron que TcVI también fue el linaje predominante en la mayoría de los tejidos analizados (resultados aún no publicados). Por otro lado, los parásitos TcII podrían estar alojados en otros tejidos del huésped que no fueron estudiados en el presente trabajo. Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que hígado y bazo son dos órganos altamente parasitados, y que los parásitos allí presentes pueden ser diferentes a los presentes en circulación (Lo Presti y col., 2014). Otros órganos como cerebro, pulmón y riñón pueden representar reservorios de parásitos con probables subpoblaciones diferentes (Carvalho y col., 1997; Ramirez y col., 2007; Rodriguez y col., 2009; Cohen y col., 2010; Menghi y col., 2011; Del Valle y col., 2014).

Por otro lado, la presencia de dos o más linajes en un mismo tejido puede modificar las lesiones que se esperan en dicho tejido, respecto a la infección con un solo linaje (Ragone y col., 2015). Cada linaje tiene diferente capacidad para infectar las células del hospedador; *T. cruzi* es capaz de infectar una amplia variedad de células huésped, pero la persistencia del parásito en las mismas depende de su capacidad para entrar en la célula y de la interacción que se desarrolle con ella (Andrade y Andrews, 2005). Se ha informado que la co-infección con diferentes cepas de *T. cruzi* puede inducir inmunidad inflamatoria protectora y mecanismos inmunes de regulación que atenúen los daños cardíacos en el modelo murino (Rodrigues y col., 2010). Así, la presencia de más de un tipo de parásito en un mismo tejido podría generar interacciones entre ellos que lleven a modificaciones diferentes (mayores o

aún menores) en los tejidos en cuestión. Las diferencias observadas en las áreas cubiertas por infiltrados inflamatorios, particularmente en músculo esquelético e hígado y riñón, en los diferentes grupos infectados (SGO-Z12, Lucky y Casibla) podrían deberse a los distintos tipos de parásitos presentes en cada aislamiento, que a pesar de pertenecer a los mismos linajes, pueden ser parásitos diferentes.

El propósito principal de la caracterización molecular de *T. cruzi* debe estar dirigido hacia su asociación con la clínica, la patogénesis de la enfermedad y la resistencia al tratamiento (Guhl, 2013). Existen estudios que han encontrado una falta de correlación entre los linajes de *T. cruzi* y la susceptibilidad al Bz *in vitro* (Villarreal y col., 2004; Moreno y col., 2010, Moraes y col. 2014). En el presente trabajo en el modelo *in vivo* se encontró que en los grupos de ratones infectados con SGO-Z12 o Casibla y tratados con Clo5, presentaron mezcla de linajes en algunas muestras, de manera coincidente con los grupos INT. Por otro lado, en todos los grupos de infección luego de los tratamientos con Bz100 y Bz6,25+Clo1,25 se encontró sólo uno de los linajes en cada una de las muestras analizadas. Los ratones tratados con Bz100 en todos los grupos de infección presentaron el linaje TcII o el linaje TcVI en cada uno de los tejidos que fueron tipificados. Aquí cabe destacar que los grupos tratados con Bz100 fueron los que presentaron una mayor cantidad de muestras cuya tipificación no fue posible debido a la baja carga parasitaria (6/9 muestras infectadas con SGO-Z12 y 3/9 muestras infectadas con Casibla). Los parásitos TcII y TcVI del aislamiento SGO-Z12 serían por lo tanto más susceptibles al tratamiento que los parásitos TcII y TcVI de Lucky y Casibla. Dentro de cada una de las UDTs, los linajes que comparten los perfiles para determinados marcadores moleculares no son necesariamente idénticos genéticamente, y con frecuencia pueden ser distinguidos con la utilización de marcadores adicionales. Así, las cepas o aislamientos dentro de cada una de las UDTs pueden ser consideradas como familias de clones estrechamente relacionadas, y no como un solo clon (Zingales y col., 2012) y por lo tanto pueden presentar alta variabilidad y diferente respuesta al tratamiento, como ha sido encontrado en el presente trabajo.

Los ratones de todos los grupos tratados con Bz6,25+Clo1,25 presentaron el linaje TcVI en todos los tejidos analizados (a excepción de una muestra de músculo cardíaco infectado con Lucky). Como se mencionó anteriormente, con los otros tratamientos (Clo5 y Bz100), TcII permaneció en algunos tejidos, e incluso fue encontrado en ausencia de TcVI. Por lo tanto, de acuerdo a estos resultados, TcII sería más susceptible al tratamiento combinado que TcVI.

Cabe destacar que aún los ratones correspondientes a los grupos tratados con la dosis habitual de Bz (100 mg/Kg/día), presentaron alguna muestra positiva para la presencia del parásito (aunque sea en muy baja cantidad), encontrándose diferencias de acuerdo al aislamiento de *T. cruzi* infectante: el aislamiento SGO-Z12 fue el más susceptible mientras que Lucky y Casibla presentaron una susceptibilidad parcial. Debido a que la ausencia total de parásitos (cura parasitológica) luego del tratamiento es difícil de lograr, la cuantificación de los mismos mediante qPCR es útil para determinar si un tratamiento ha sido efectivo en lograr disminuir la carga parasitaria: en términos de progresión de la enfermedad, una disminución significativa en la carga parasitaria (detectada por qPCR) indicaría un buen pronóstico para el hospedador. Los pocos parásitos circulantes en sangre, remanentes luego del tratamiento, representarían un menor riesgo de reinfección tisular, y serían peligrosos en caso de una inmunosupresión que reactivara la infección. En estas condiciones, sería útil establecer un límite para la cantidad de parásitos circulantes en sangre que represente un riesgo significativo para la progresión de la enfermedad, ya que en la mayoría de los casos no existe cura parasitológica (que elimine totalmente los parásitos) (Davies y col., 2014). En este sentido, en los tres grupos infectados (SGO-Z12, Lucky y Casibla) y tratados con la combinación Bz6,25+Clo1,25 se observó una disminución significativa de la carga parasitaria presente en circulación (detectada por qPCR), en relación a los grupos correspondientes no tratados. Lo mismo ocurrió con la carga parasitaria detectada en el músculo esquelético de los ratones de estos grupos.

Como se mencionó anteriormente, el papel del tratamiento en los pacientes chagásicos es muy controversial, particularmente en la etapa crónica. Con el objetivo de aclarar esta cuestión, recientemente se completó un ensayo clínico aleatorizado y controlado con placebo a gran escala para evaluar los efectos del tratamiento etiológico con Bz en pacientes chagásicos crónicos (Estudio BENEFIT - Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis) (Marín-Neto y col., 2008, 2009). Parte de sus resultados han sido publicados recientemente (Morillo y col., 2015): se incluyeron 2854 pacientes con miocardiopatía chagásica, los cuales la mitad fueron tratados con Bz a su dosis habitual (5 mg/kg) durante 80 días y la otra mitad tratados con placebo; la efectividad del tratamiento se estudió mediante electrocardiografía, ecocardiografía y detección directa del parásito por PCR cualitativa durante el transcurso de 6 años. Se observó que Bz no redujo significativamente la evolución clínica primaria, a pesar de que redujo la detección del parásito en las muestras de sangre, en relación al grupo placebo. En este estudio, las tasas de conversión de la PCR (de positivas a negativas luego del tratamiento) resultaron variables

de acuerdo a la ubicación geográfica, resaltando nuevamente el papel de la variabilidad genética del parásito y su susceptibilidad diferencial al tratamiento (Morillo y col., 2015). Los resultados del presente trabajo podrían explicar en parte los resultados obtenidos en el estudio BENEFIT: los pacientes de área endémica están probablemente expuestos a infecciones mixtas (con diferentes linajes de *T. cruzi*); la susceptibilidad diferencial de los diferentes linajes al tratamiento planteado podría significar que algunos linajes pueden permanecer en los tejidos del huésped, aún después de los tratamientos, originando las tasas variables de conversión de la PCR y los resultados contradictorios obtenidos.

El emplear simultáneamente varios fármacos tripanocidas, con diferentes mecanismos de acción, tiene la ventaja de ampliar considerablemente sus efectos terapéuticos, evitando las dosis elevadas necesarias en las monoterapias. En este trabajo se observó que la combinación de Bz+Clo modificó los valores de la mayoría de las variables estudiadas, con respecto a los ratones infectados no tratados (INT).

Estos resultados demuestran la importancia de abordar el tratamiento de la enfermedad de Chagas desde diferentes blancos del *T. cruzi*, para así potenciar el efecto tripanocida y lograr la cura o al menos retardar la progresión de la enfermedad.

Conclusiones

6. Conclusiones

- La combinación de Bz+Clo sobre tripomastigotes de cultivo presentó efecto *sinérgico* sobre la cepa Y y los aislamientos Lucky, SGO-Z12 y Casibla de *T. cruzi*. El efecto sinérgico puede ser entendido como resultado de los mecanismos de acción complementarios de ambas drogas, que estarían potenciando el efecto letal, produciendo la muerte de los parásitos a menores concentraciones que la monoterapia. A su vez, la combinación produjo menor daño celular que las drogas individuales, sugiriendo seguridad para la farmacoterapia.

- Clo es un antidepresivo tricíclico que actúa sobre el sistema nervioso central, con efectos ansiolíticos. La dosis de Clo (1,25 mg/kg/día) utilizada en el estudio de la efectividad de la combinación con Bz, no generó cambios en las conductas relacionadas con la ansiedad de los individuos tratados.

- Teniendo en cuenta los resultados del análisis de componentes principales, el tratamiento con la combinación de los fármacos en ratones infectados con la cepa Y y aislamientos SGO-Z12 y Lucky, presentó una mayor eficacia en comparación con la monoterapia; mientras que el tratamiento combinado en ratones infectados con el aislamiento Casibla, no presentó diferencias con Bz6,25.

- La infección por *T. cruzi* produjo alteraciones en el parénquima hepático y renal; todos los tratamientos redujeron la severidad de las mismas. Los tratamientos con menores dosis fueron los que presentaron menores alteraciones. El tratamiento combinado mostró similares cambios histológicos en hígado y riñón a los encontrados con Bz6,25, y no se observó un aumento del daño debido a la administración conjunta de las drogas.

- Los aislamientos utilizados en el presente estudio (SGO-Z12, Lucky y Casibla) corresponden a infecciones mixtas (TcII y TcVI), por lo que representan ejemplos de las poblaciones naturales de *T. cruzi* que actualmente se encuentran en circulación.

- La distribución de los linajes en sangre, músculo cardíaco y músculo esquelético de ratones infectados no fue homogénea; sin embargo se observó que la mayoría de los ratones presentaron el linaje TcVI.

- Aunque el tratamiento en la etapa aguda no eliminó completamente el parásito de los tejidos del hospedador, la disminución en la carga parasitaria como consecuencia del tratamiento tuvo repercusión en los parámetros estudiados (presencia del parásito en las diferentes muestras, nidos de amastigotes y sobrevida, particularmente). Los ratones de todos los grupos tratados con Bz6,25+Clo1,25 presentaron el linaje TcVI en todos los tejidos analizados (a excepción de una muestra de músculo cardíaco infectado con Lucky). TcII permaneció en algunos tejidos (e incluso fue encontrado en ausencia de TcVI) con los tratamientos Bz100 y Clo5. Por lo tanto, TcII sería aparentemente más susceptible al tratamiento combinado que TcVI.

Los presentes resultados contribuyen al conocimiento de las complejas interacciones entre *T. cruzi* y el hospedador y pueden ser útiles para determinar el pronóstico de las infecciones mixtas, característico de las zonas endémicas, y estimular la búsqueda de nuevas estrategias de tratamiento, teniendo en cuenta la alta variabilidad del parásito en un único hospedador con diferentes susceptibilidades a los tratamientos propuestos. Si bien, la asociación de Bz+Clo podría ser un buen candidato para el tratamiento de la enfermedad de Chagas en la etapa aguda de la infección, estos resultados sugieren la necesidad de seguir ensayando nuevos protocolos, con diferentes combinaciones y dosis de nuevas y más seguras drogas antiparasitarias que sean una esperanza cierta para miles de enfermos chagásicos.

Bibliografía

7. Bibliografía

- Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, Suarez JA, Abate T, Naranjo L, Paiva M, Rivas L, Castro J, Márques J, Mendoza I, Acquatella H, Torres J, Noya O. 2010. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. The Journal of Infectious Diseases 201(9): 1308-1315.
- Andrade SG. 2005. Biodemas, zimodemas e esquistodemas: sua relação com a patologia da doença de Chagas. En Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Guanabara-Koogan, Río de Janeiro 621-637.
- Andrade LO, Andrews NW. 2005. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. Nature Reviews Microbiology 3(10): 819-23.
- Andrade HM, Murta SM, Chapeaurouge A, Perales J, Nirdé P, Romanha AJ. 2008. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benznidazole. Journal of Proteome Research 7(6): 2357-67.
- Anónimo, 1999. Recommendations from a satellite meeting. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 94 Suppl 1: 429-432.
- Aquilino C, Gonzalez Rubio ML, Seco EM, Escudero L, Corvo L, Soto M, Fresno M, Malpartida F, Bonay P. 2012. Differential trypanocidal activity of novel macrolide antibiotics; correlation to genetic lineage. PLoS One 7(7): e40901.
- Araújo MS, Martins-Filho OA, Pereira ME, Brener Z. 2002. A combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 45: 819-824.
- Atías A, Neghme A. 1991. Enfermedad de Chagas. Parasitología Clínica. Cap 30. 3ª Ed. Editorial Mediterránea.
- Ávila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. 1991. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. Molecular and Biochemical Parasitology 48(2): 211-21.
- Bahia-Oliveira LM, Gomes JA, Cançado JR, Ferrari TC, Lemos EM, Luz ZM, Moreira MC, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. 2000. Immunological and clinical evaluation of Chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. The Journal of Infectious Diseases 182: 634-638.
- Baiocco P, Colotti G, Franceschini S, Ilari A. 2009. Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. Journal of Medicinal Chemistry 52(8):2603-2612.
- Baker JR, Miles MA, Godfrey DG, Barrett TV. 1978. Biochemical characterization of some species of Trypanosoma (Schizotrypanosoma) from bats (Microchiroptera). The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 27: 483-491.
- Barcán L, Luna C, Clara L, Sinagra A, Valledor A, De Rissio AM, Gadano A, García MM, de Santibañes E, Riarte A. 2005. Transmission of *T. cruzi* infection via liver transplantation to a nonreactive recipient for Chagas' disease. Liver Transplantation 11(9): 1112-1116.
- Barioglio SR, Lacuara JL, Paglini-Oliva PA. 1987. Effects of clomipramine upon motility of *Trypanososma cruzi*. Journal of Parasitology 73: 451-452.
- Bartlett JM, Stirling D. 2003. A short history of the polymerase chain reaction. Methods in Molecular Biology 226: 3-6.
- Bastos CJ, Aras R, Mota G, Reis F, Dias JP, de Jesus RS, Freire MS, de Araújo EG, Prazeres J, Grassi MF. 2010. Clinical outcomes of thirteen patients with acute Chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. PLOS Neglected Tropical Diseases 4(6): e711.
- Batista DG, Batista MM, de Oliveira GM, Britto CC, Rodrigues AC, Stephens CE, Boykin DW, Soeiro Mde N. 2011. Combined treatment of heterocyclic analogues and benznidazole upon *Trypanosoma cruzi* in vivo. PLoS One 6(7): e22155.
- Bazán PC, Lo Presti MS, Rivarola HW, Triquell MF, Fretes R, Fernández AR, Enders J, Paglini-Oliva P. 2008. Chemotherapy of chronic indeterminate Chagas disease: a novel approach to treatment. Parasitology Research 103(3): 663-9.

- Benaim G, Sanders JM, Garcia-Marcha´n Y, Colina C, Lira R, Caldera AR, Payares G, Sanoja C, Burgos JM, Leon-Rossell A, Concepcion JL, Schijman AG, Levin M, Oldfield E, Urbina JA. 2006. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. Journal of Medicinal Chemestry 49: 892-899.
- Benjamin RJ, Stramer SL, Leiby DA, Dodd RY, Fearon M, Castro E. 2012. *Trypanosoma cruzi* infection in North America and Spain: evidence in support of transfusion transmission. Transfusion 52(9): 1913-1921.
- Benson TJ, McKie JH, Garforth J, Borges A, Fairlamb AH, Douglas KT.1992. Rationally designed selective inhibitors of trypanothione reductase. Phenothiazines and related tricyclics as lead structures. Biochemical Journal 286(1): 9-11.
- Bergeron M, Olivier M. 2006. *Trypanosoma cruzi*-mediated IFN-γ-inducible nitric oxide output in macrophages is regulated by iNOS mRNA stability. Journal of Immunology 177: 6271-6280.
- Bernacchi AS, de Castro CR, de Toranzo EGD, Castro JA. 1986. Effects of nifurtimox or benznidazole administration on rat testes: ultrastructural observations and biochemical studies. Experimental and Molecular Pathology 45: 245-56.
- Bestetti RB, Cury PM. 2004. *Trypanosoma cruzi* myocardial infection reactivation presenting as complete atrioventricular block in a Chagas´ heart transplant recipient. Cardiovascular Pathology 13: 323-6.
- Bongiorno-Borbone L**,** Giacobbe A, CompagnoneM**,** Eramo A**,** De MariaR, Peschiaroli A, Melino G. 2015.Anti-tumoral effect of desmethylclomipramine in lung cancer stem cells. Oncotarget 6(19): 16926-16938.
- Bontempi IA, Vicco MH, Cabrera G, Villar SR, González FB, Roggero EA, Ameloot P, Callewaert N, Pérez AR, Marcipar IS. 2015. Efficacy of a trans-sialidase-ISCOMATRIX subunit vaccine candidate to protect against experimental Chagas disease. Vaccine 33(10): 1274-83.
- Bosseno MF, Yacsik N, Vargas F, Brenière SF. 2000. Selection of *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes (clonet 20 and 39) isolated from Bolivian triatomines following subculture in liquid medium. Memórias do Instituto Oswaldo 95(5): 601-7.
- Braga MS, Lauria-Pires L, Arganaraz ER, Nascimento RJ, Teixeira AR. 2000. Persistent infections in chronic Chagas' disease patients treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo 42:157-161.
- Brener Z. 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 4: 389-96.
- Brenière SF, Bosseno MF, Noireau F, Yacsik N, Liegeard P, Aznar C, Hontebeyrie M. 2002. Integrate study of a Bolivian population infected by *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 97(3): 289-295.
- Briones MR, Souto RP, Stolf BS, Zingales B. 1999. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. Molecular and Biochemical Parasitology 104(2): 219-232.
- Brisse S, Barnabe C, Tibayrenc M. 2000. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. International Journal for Parasitology 30: 34-44.
- Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. 2001. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. International Journal for Parasitology 31: 1218-1226.
- Britto C, Cardoso MA, Vanni CM, Hasslocher-Moreno A, Xavier SS, Oelemann W, Santoro A, Pirmez C, Morel CM, Wincker P. 1995. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. Parasitology 110(3): 241-247.
- Bryson HM, Wilde MI. 1996. Amitriptyline. A review of its pharmacological properties and therapeutic use in chronic pain states. Drug Aging 8: 459-476.
- Burgos JM, Altcheh J, Bisio M, Duffy T, Valadares HMS, Seidenstein ME, Piccinali R, Freitas JM, Levin MJ, Macchi L, Macedo AM, Freilij H, Schijman AG. 2007. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. International Journal for Parasitology 37: 1319-327.

- Burgos JM, Diez M, Vigliano C, Bisio M, Risso M, Duffy T, Cura C, Brusses B, Favaloro L, Leguizamon MS, Lucero RH, Laguens R, Levin MJ, Favaloro R, Schijman AG. 2010. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. Clinical Infectious Diseases 51(5): 485-495.
- Buscaglia CA, Campo VA, Frasch ACC, Di Noia JM. 2006. *Trypanosoma cruzi* surface mucins: Host-dependent coat diversity. Nature Reviews Microbiology 4: 229-236.
- Buschini A, Ferrarini L, Franzoni S, Galati S, Lazzaretti M, Mussi F, Northfleet de Albuquerque C, Araújo Domingues Zucchi TM, Poli P. 2009. Genotoxicity Revaluation of Three Commercial Nitroheterocyclic Drugs: Nifurtimox, Benznidazole, and Metronidazole. Journal of Parasitology Research 2009: 463575.
- Bustamante JM, Rivarola HW, Fernández AR, Enders JE, Fretes R, Palma JA, Paglini-Oliva PA. 2003. Indeterminate Chagas' disease: *Trypanosoma cruzi* strain and reinfection are factors involved in the progression of cardiopathy. Clinical Science 104: 415-420.
- Caldas IS, Talvani A, Caldas S, Carneiro CM, de Lana M, de Matta Guedes P, Bahia MT. 2008. Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. Parasitology Research 103:413-421.
- Campos FM, Liarte DB, Mortara RA, Romanha AJ, Murta SM. 2009. Characterization of a gene encoding alcohol dehydrogenase in benznidazole-susceptible and -resistant populations of *Trypanosoma cruzi*. Acta Tropica 111:56-63.
- Campos JN, Hoppe L, Duque T, de Castro S, Oliveira G1. 2016. Use of non-invasive parameters to evaluate swiss webster mice during *Trypanosoma cruzi* experimental acute infection. Journal of Parasitology 102(2): 280-5.
- Cançado JR. 1999. Criteria of Chagas Disease Cure. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 94: 331-335.
- Cançado JR. 2002. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo 44: 29-37.
- Capstick N. 1971. Chlorimipramine in obsessional states. (A pilot study). Psychosomatics 12(5):332-5.
- Cardinal MV, Lauricella MA, Ceballos LA, Lanati L, Marcet PL, Levin MJ, Kitron U, Gürtler RE, Schijman AG. 2008. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. International Journal for Parasitology 38(13): 1533-1543.
- Carlier Y, Truyens C. 2010. Maternal-fetal transmission of Trypanosma cruzi. En: J. Telleria and M. Tibayrenc. American trypanosomiasis: Chagas disease, one hundred years of research. UK, USA: Elsevier 22: 539-581.
- Carlier Y, Torrico F, Sosa-Estani S, Russomando G, Luquetti A, Freilij H, Albajar Vinas P. 2011. Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. PLOS Neglected Tropical Diseases 5(10): e1250.
- Carlini VP, Martini AC, Schiöth HB, Ruiz RD, Fiol de Cuneo M, de Barioglio SR. 2008. Decreased memory for novel object recognition in chronically food-restricted mice is reversed by acute ghrelin administration. Neuroscience 153(4):929-34.
- Carranza JC, Valadares HMS, D'Avila DA, Baptista RP, Moreno M, Galvão LMC, Chiari E, Sturm NR, Gontijo ED, Macedo AM, Zingales, B. 2009. *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. International Journal for Parasitology 39(9): 963-973.
- Carrasco HJ, Segovia M, Llewellyn MS, Morocoima A, Urdaneta-Morales S, Martínez C, Martínez CE, Garcia C, Rodríguez M, Espinosa R, de Noya BA, Díaz-Bello Z, Herrera L, Fitzpatrick S, Yeo M, Miles MA, Feliciangeli MD. 2012. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes in Venezuela. PLOS Neglected Tropical Diseases 6(6): e1707.
- Carvalho MF, de Franco MF, Soares VA. 1997. Amastigotes forms of *Trypanosoma cruzi* detected in a renal allograft. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 39(4): 223-6.
- Castro JA, Diaz de Toranzo EG. 1988. Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease). Biomedical and Environmental Sciences 1: 19-33.
- Castro JA, De Mecca MM, Bartel LC. 2006. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). Human & Experimental Toxicology 25: 471-479.

- Cavazzana M Jr, Marcili A, Lima L, da Silva FM, Junqueira ÂC, Veludo HH, Viola LB, Campaner M, Nunes VL, Paiva F, Coura JR, Camargo EP, Teixeira MMG. 2010. Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus Schizotrypanum parasitic in Brazilian bats. International Journal for Parasitology 40: 345-355.
- Cazzulo JJ. 1999. La cruzipaina, cisteina proteinasa principal del *Trypanosoma cruzi* secuencia y organizacion genomica de los genes que la codifican. Medicina 59 (Supl. II):7-10.
- Cecere MC, Vazquez-Prokopec GM, Ceballos LA, Gurevitz JM, Zárate JE, Zaidenberg M, Kitron U, Gürtler RE. 2006. Comparative trial of effectiveness of pyrethroid insecticides against peridomestic populations of *Triatoma infestans* in northwestern Argentina. Journal of Medical Entomology 43(5): 902-909.
- Cevey AC, Mirkin GA, Penas FN, Goren NB. 2016. Low-dose benznidazole treatment results in parasite clearance and attenuates heart inflammatory reaction in an experimental model of infection with a highly virulent *Trypanosoma cruzi* strain. International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance 6: 12e22.
- Chagas C. 1909. Nova trypanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e ciclo evolutivo do *Schizotripanum cruzi* n. gen. n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 1: 159-218.
- Chen L, Dou J, Su Z, Zhou H, Wang H, Zhou W, Guo Q, Zhou C. 2011. Synergistic activity of baicalein with ribavirin against influenza A (H1N1) virus infections in cell culture and in mice. Antiviral Research 91: 314-320.
- Chou TC, Talalay P. 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Advances in Enzyme Regulation 22: 27-55.
- Chou TC. 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. Pharmacological Reviews 58: 621-681.
- Chou TC. 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. Cancer Research 70(2): 440-6.
- Clark CG, Pung OJ. 1994. Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. Molecular and Biochemical Parasitology 66: 175-179.
- Cohen V, Ceballos V, Rodriguez N, Gonzales Z, Marciano B, Dackiewicz N, Berberian G. 2010. Enfermedad de Chagas como causa de masa cerebral ocupante en paciente con leucemia linfoblástica en remisión. Archivos argentinos de pediatría 108: 134-137.
- Colotti G, Baiocco P, Fiorillo A, Boffi A, Poser E, Chiaro FD, Ilari A. 2013. Structural insights into the enzymes of the trypanothione pathway: targets for antileishmaniasis drugs. Future Medicinal Chemistry 5(15): 1861-1875.
- Coronado X, Zulantay I, Albrecht H, Rozas M, Apt W, Ortiz S, Rodriguez J, Sanchez G, Solari A. 2006.Variation in *Trypanosoma cruzi* clonal composition detected in blood patients and xenodiagnoses triatomines: Implications in the molecular epidemiology of Chile. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 74(6): 1008-1012.
- Cosentino RO, Agüero F. 2012. A simple strain typing assay for *Trypanosoma cruzi*: discrimination of major evolutionary lineages from a single amplification product. PLOS Neglected Tropical Diseases 6 (7): e1777.
- Cossentini LA, Da Silva RV, Yamada-Ogatta SF, Yamauchi LM, De Almeida Araújo EJ, Pinge-Filho P. 2016. Aspirin treatment exacerbates oral infections by *Trypanosoma cruzi*. Expirmental Parasitology 164: 64-70.
- Coura JR, de Castro SL. 2002. A critical review on Chagas disease chemotherapy. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 97(1): 3-24.
- Coura JR. 2003. Tripanossomose, doença de Chagas. Ciência e cultura (São Paulo) 55: 30-33.
- Coura JR. 2007. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 102: 113-122.
- Cummings KL, Tarleton RL. 2004. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Infection and Immunity 72(7): 4081-9.
- Cura CI, Duffy T, Lucero RH, Bisio M, Péneau J, Jimenez-Coello M, Calabuig E, Gimenez MJ, Valencia Ayala E, Kjos SA, Santalla J, Mahaney SM, Cayo NM, Nagel C, Barcán L, Málaga Machaca ES, Acosta Viana KY, Brutus L, Ocampo SB, Aznar C, Cuba Cuba CA, Gürtler RE, Ramsey JM, Ribeiro I, VandeBerg JL,

Yadon ZE, Osuna A, Schijman AG. 2015. Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for the Identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Biological and Clinical Samples. PLOS Neglected Tropical Diseases 19: 9(5):e0003765.

- D'Avila DA, Macedo AM, Valadares HMS, Gontijo ED, de Castro AM, Machado CR, Chiari E, Galvão LMC. 2009. Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. Journal of Clinical Microbiology 47(6): 1718-1725.
- Davies C, Dey N, Negrette OS, Parada LA, Basombrio MA, Garg NJ. 2014. Hepatotoxicity in mice of a novel anti-parasite drug candidate hydroxymethyl nitrofurazone: a comparison with benznidazole. PLOS Neglected Tropical Diseases 8: e3231.
- de Almeida EA, Silva EL, Guariento ME, Aoki FH, Pedro R de J. 2009. Aetiological treatment with itraconazole or ketoconazole in individuals with *Trypanosoma cruzi*/HIV co-infection. Annals of tropical medicine and parasitology 103(6): 471-6.
- de Castro CR, Diaz de Toranzo EG, Castro JA. 1992. Benznidazole-induced ultrastructural alterations in rat adrenal cortex. Mechanistic studies. Toxicology 74: 223-32.
- de Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira S. MR, Chiari E, Junqueira ACV, Fernandes O, Macedo AM, Machado CR, Pena SDJ. 2006. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. PLOS Pathogens 2(3): e24.
- de Haan JR, Wehrens R, Bauerschmidt S, Piek E, van Schaik RC, Buydens LM. 2007. Interpretation of ANOVA models for microarray data using PCA. Bioinformatics 23: 184-190.
- del Puerto R, Nishizawa JE, Kikuchi M, Iihoshi N, Roca Y, Avilas C, Gianella A, Lora J, Velarde FU, Renjel LA, Miura S, Higo H, Komiya N, Maemura K, Hirayama K. 2010. Lineage analysis of circulating *Trypanosoma cruzi* parasites and their association with clinical forms of Chagas disease in Bolivia. PLOS Neglected Tropical Diseases 4: e687.
- Del Valle D, Trombetta LA, Moreno D, Galache V, Semorile K, Bava A.J. 2014. Miocarditis aguda y meningoencefalitis por *Trypanosoma cruzi* en un paciente seropositivo al VIH. Revista Cubana Medicina Tropical 66: 458-464.
- Denizot F, Lang R. 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. Journal of Immunological Methods 89(2): 271-7.
- Diamond M, Kelly JP, Connor TJ. 2006. Antidepressants suppress production of the Th1 cytokine interferon-gamma, independent of monoamine transporter blockade. European Neuropsychopharmacology 16(7):481-90.
- Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ. 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 97(5): 603-612.
- Dias JC. 2006. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 39: 370-375.
- Dias JP, Bastos C, Araújo E, Mascarenhas AV, Martins Netto E, Grassi F, Silva M, Tatto E, Mendonça J,Araújo RF, Shikanai-Yasuda MA, Aras R. 2008. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 41(3): 296-300.
- Díaz MV, Miranda MR, Campos-Estrada C, Reigada C, Maya JD, Pereira CA, López-Muñoz R. 2014. Pentamidine exerts in vitro and in vivo anti *Trypanosoma cruzi* activity and inhibits the polyamine transport in *Trypanosoma cruzi*. Acta Tropica 134:1-9.
- Diez M, Favaloro L, Bertolotti A, Burgos JM, Vigliano C, Lastra MP, Levin MJ, Arnedo A, Nagel C, Schijman AG, Favaloro RR. 2007. Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas' disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation. American Journal of Transplantation 7(6): 1633-1640.
- Diosque P, Barnabé C, Padilla AM, Marco JD, Cardozo RM, Cimino RO, Nasser JR, Tibayrenc M, Basombrío MA. 2003. Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted endemic area for Chagas' disease in Argentina. International Journal for Parasitology 33(10): 997-1003.
- Docampo R, de Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SN. 2005. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. Nature Reviews Microbiology 3: 251-261.

- Docampo R, Moreno SN. 2008. The acidocalcisome as a target for chemotherapeutic agents in protozoan parasites. Current Pharmaceutical Design 14: 882-888.
- Dos Reis D, Monteiro WM, Bossolani GD, Teston AP, Gomes ML, de Araújo SM, Barbosa Md, de Ornelas Toledo MJ. 2012. Biological behaviour in mice of *Trypanosoma cruzi* isolates from Amazonas and Parana, Brazil. Experimental Parasitology 130: 321- 329.
- Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, Favaloro RR, Freilij H, Schijman AG. 2009. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. PLOS Neglected Tropical Diseases 3(4): e419.
- El-On J, Bazarsky E, Sneir R. 2007. *Leishmania major*: in vitro and in vivo anti-leishmanial activity of paromomycin ointment (Leshcutan) combined with the immunomodulator Imiquimod. Experimental Parasitology 116(2): 156-62.
- Enriquez GF, Cardinal MV, Orozco MM, Lanati L, Schijman AG, Gürtler RE. 2012. Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi* identified in rural dogs and cats in the humid Argentinean Chaco. Parasitology 140(3): 303-308.
- Esperandim VR, da Silva Ferreira D, Sousa Rezende KC, Cunha WR, Saraiva J, Bastos JK, Andrade E, Silva ML, de Albuquerque S. 2013. In vivo infection by *Trypanosoma cruzi*: a morphometric study of tissue changes in mice. Parasitology Reserch 112: 431-436.
- Fairlamb AH, Blackbum P, Ulrich P, Chait BT, Cerami A. 1985. Trypanothione; a novel bis (glutathionly) spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. Science 227: 1486-1487.
- Faúndez M, López-Muñoz R, Torres G, Morello A, Ferreira J, Kemmerling U, Orellana M, Maya JD. 2008. Buthionine sulfoximine has anti-*Trypanosoma cruzi* activity in a murine model of acute Chagas' disease and enhances the efficacy of nifurtimox. Antimicrobial Agents Chemotherapy 52(5): 1837-9.
- Fauro R, Lo Presti S, Bazan C, Baez A, Strauss M, Triquell F, Cremonezzi D, Negrete OS, Willhuber GC, Paglini-Oliva P, Rivarola HW. 2013. Use of clomipramine as chemotherapy of the chronic phase of Chagas disease. Parasitology 140(7):917-27.
- Fernández AR, Fretes R, Rubiales S, Lacuara J L, Paglini-Oliva P. 1997. Effects of prometazine on the viability of *T. cruzi*. Medicina 57:59-62.
- Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC, Naiff RD, Barrett TV, Degrave W, Zingales B, Campbell DA, Coura JR. 1998. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 58(6): 807-811.
- Figueroa-Cortés AA, Torres-Pérez A, Salaiza N, Cabrera N, Escalona-Montaño A, Rondán A, Aguirre-García, M, Gómez-Puyou A, Pérez-Montfort R, Becker IA. 2008. Monoclonal antibody that inhibits *Trypanosoma cruzi* growth in vitro and its reaction with intracellular triosephosphate isomerase. Parasitology Research 102:635-643.
- Filardi LS, Brener Z. 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 81:755-9.
- File SE, Kenny PJ, Ouagazzal A M. 1998. Bimodal modulation by nicotine of anxiety-like behaviour in the social interaction test: Role of the dorsal hippocampus. Behavioral Neuroscience 112: 1423-1429.
- Flohé L. 2012. The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. Biotechnology Advances 30(1): 294-301.
- Flores-López CA, Machado CA. 2011. Analyses of 32 loci clarify phylogenetic relationships among *Trypanosoma cruzi* lineages and support a single hybridization prior to human contact. PLOS Neglected Tropical Diseases 5: e1272.
- Franco J, Ferreira RC, Ienne S, Zingales B. 2015. ABCG-like transporter of *Trypanosoma cruzi* involved in benznidazole resistance: gene polymorphisms disclose inter-strain intragenic recombination in hybrid isolates. Infection, Genetics and Evolution 31: 198-208.
- Freitas JM, Andrade LO, Pires SF, Lima R, Chiari E, Santos RR, Soares M, Machado CR, Franco GR, Pena SDJ, Macedo AM. 2009. The MHC gene region of murine hosts influences the differential tissue tropism of infecting *Trypanosoma cruzi* strains. PLoS ONE 4: e5113.

- Gallego Berenguer J. 1998. Manual de Parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario. Studi General (Universitat de Barcelona). Barcelona. España.
- Garcia A, Ortiz S, Iribarren C, Bahamonde MI, Solari A. 2014. Congenital co-infection with different *Trypanosoma cruzi* lineages. Parasitology International 63:138-139.
- Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. 2010. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. Acta Tropica 115(1-2): 22-27.
- Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, Mena SS, Veazey P, Miles GA, Acosta N, de Arias AR, Miles MA. 2003. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. Nature 421(6926): 936-939.
- Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. 1992. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages.European Journal of Immunology 22(10):2501-2506.
- Gillman PK. 2007. Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated. British Journal of Clinical Pharmacology 151(6): 737-48.
- Gobbi P, Baez A, Lo Presti MS, Fernández A, Enders JE, Fretes R, Gea S, Paglini-Oliva PA, Rivarola HW. 2010. Association of clomipramine and allopurinol for the treatment of the experimental infection with *Trypanosoma cruzi.* Parasitology Research 107: 1279-1283.
- Goijman SG; Stoppani. 1985. AOM: Effects of nitroheterocyclic drugs on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. Biochemical Pharmacology 34: 1331-1336.
- Gonzales NS, Cazzulo JJ. 1989. Effects of trypanocidal drugs on proteins biosynthesis in vitro and in vivo by *Trypanosoama cruzi*. Biochemical Pharmacology 38: 2873-2878.
- Greco WR, Bravo G, Parsons JC. 1995. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. Pharmacological Reviews 47: 331-385.
- Gruendling AP, Massago M, Teston AP, Monteiro WM, Kaneshima EN, Araújo SM, Gomes ML, Barbosa Md, Toledo MJ. 2015. Impact of Benznidazole on Infection Course in Mice Experimentally Infected with *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV. American Society of Tropical Medicine and Hygiene 92(6): 1178-1189.
- Guedes PM, Silva GK, Gutierrez FR, Silva JS. 2011. Current status of Chagas disease chemotherapy. Expert Review of Anti-infective Therapy 9: 609-620.
- Guhl F. 2013. Epidemiología Molecular de *Trypanosoma cruzi*. Revista Española de Salud Pública: 1-8.
- Guhl F, Auderheide A, Ramírez JD. 2014. From ancient to contemporary molecular eco-epidemiology of Chagas disease in the Americas. International Journal for Parasitology 44: 605-612.
- Gupta S, Wen JJ, Garg NJ. 2009. Oxidative stress in Chagas disease. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases 190354: 1-8.
- Gutierrez Correa J, Fairlamb AH, Stoppani AO. 2001. Inactivation of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase by phenothiazine cationic free radicals. Revista Argentina de Microbiología 33(1): 36-46.
- Guzmán-Marín E, Zavala-Castro JE, Acosta-Viana KY, Rosado-Barrera ME. 1999. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. Revista Biomédica 10: 177-184.
- Hamilton PB, Stevens JR, Gaunt MW, Gidley J, Gibson WC. 2004. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. International Journal for Parasitology 34:1393-1404.
- Hamilton PB, Gibson WC, Stevens JR. 2007. Patterns of co-evolution between trypanosomes and their hosts deduced from ribosomal RNA and protein-coding gene phylogenies. Molecular Phylogenetics and Evolution 44: 15-25.
- Hamilton PB, Lewis MD, Cruickshank C, Gaunt MW, Yeo M, Llewellyn MS, Valente SA, Maia da Silva F, Stevens JR, Miles MA, Teixeira MM. 2011. Identification and lineage genotyping of South American trypanosomes using fluorescent fragment length barcoding. Infection Genetics and Evolution 11(1): 44-51.
- Hamilton PB, Teixeira MMG, Stevens JR. 2012. The evolution of *Trypanosoma cruzi*: the 'bat seeding' hypothesis. Trends in Parasitology 28: 136-141.

- Hammond DJ, Cover B, Gutteridge WE. 1984. A novel series of chemical structures active in vitro against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 78: 91-95.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. 1996. Real time quantitative PCR. Genome Research 6(10): 986-994.
- Hernández LM, Ramírez AN, Cucunubá ZM, Zambrano P. 2009. Brote de Chagas agudo en Lebrija,Santander 2008. Revista Del Observatorio de Salud Pública de Santander 1: 28-36.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. Biotechnology (N Y) 11(9): 1026-1030.
- Hirode M, Ono A, Miyagishima T, Nagao T, Ohno Y, Urushidani T. 2008. Gene expression profiling in rat liver treated with compounds inducing phospholipidosis. Toxicology and Applied Pharmacology 229: 290-299.
- Hodge CJ Jr, Apkarian AV, Owen MP, Hanson BS. 1983. Changes in the effects of stimulation of locus coeruleus and nucleus raphe magnus following dorsal rhizotomy. Brain Research 288(1-2): 325-9.
- Kamysz E, Simonetti O, Cirioni O, Arzeni D, Ganzetti G, Campanati A, Giacometti A, Gabrielli E, Silvestri C, Kamysz W, Offidani A, Barchiesi F. 2011. In vitro activity of the lipopeptide PAL-Lys-Lys-NH2, alone and in combination with antifungal agents, against clinical isolates of Candida spp. Peptides 32(1): 99-103.
- Karameh Karameh W, Khani M. 2015. Intravenous Clomipramine for Treatment-Resistant Obsessive-Compulsive Disorder. International Journal of Neuropsychopharmacology 19(2). pii: pyv084.
- Komada M, Takao M, Miyakawa T. 2008. Elevated Plus Maze for Mice. Journal of Visualized Experiments (22): 1088.
- Kramer S. 2012. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: The case of kinetoplastids. Molecular and Biochemical Parasitology181(2): 61-72.
- Krauth-Siegel RL, Enders B, Henderson GB, Fairlamb AH, Schirmer RH. 1987. Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Purification and characterization of the crystalline enzyme. European Journal of Biochemistry 164(1): 123-8.
- Krauth-Siegel RL, Meiering SK, Schmidt H. 2003. The parasite-specific trypanothione metabolism of trypanosoma and leishmania. Biological Chemistry 384(4): 539-49.
- Krauth-Siegel RL, Bauer H, Schirmer RH. 2005. Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: Old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia. Angewandte Chemie International Edition 44: 690-715.
- Krauth-Siegel RL, Comini MA. 2008. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. Biochimica et Biophysica Acta 80(11):1236-48.
- Krieger S, Schwarz W, Ariyanayagam MR, Fairlamb AH, Krauth-Siegel RL, Clayton C. 2000. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. Molecular Microbiology 35(3): 542-52.
- Lachaud L, Chabbert E, Dubessay P, Reynes J, Lamothe J, Bastien P. 2001. Comparison of various sample preparation methods for PCR diagnosis of visceral Leishmaniasis using peripheral blood. Journal of Clinical Microbiology 39:613-617.
- Lacuara JL, Barioglio S, Paglini-Oliva P, Bernachi AS, Fernández AR, Castro JA, Cazzulo JJ. 1991. Disruption of Mitochondrial Function as the Basis of the Trypanocidal Effect of Trifluoperazine on *Trypanosoma cruzi*. Experientia 47: 612-616.
- Lages-Silva E, Ramírez LE, Pedrosa AL, Crema E, da Cunha Galvão LM, Junho Pena SD, Macedo AM, Chiari E. 2006. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. Journal of Clinical Microbiology 44(6): 2167-2171.
- Laguens RP, Cabeza Meckert P, Basombrio MA, Chambo GL, Cossio PM, Arana RM, GelpiR. 1980. Infección crónica del ratón con *Trypanosoma cruzi*. Modelo experimental de enfermedad de Chagas. Medicina (Bs. Aires) 40: 33.
- Lauthier JJ, Tomasini N, Barnabé C, Rumi MMM, D'Amato AMA, Ragone PG, Yeo M, Lewis MD, Llewellyn MS, Basombrío MA, Miles MA, Tibayrenc M, Diosque P. 2012. Candidate targets for Multilocus Sequence

Typing of *Trypanosoma cruzi*: validation using parasite stocks from the Chaco Region and a set of reference strains. Infection Genetics and Evolution 12(2): 350-358.

- Lecaille F, Kaleta J, Brömme D. 2002. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. Chemical Reviews 102:4459-4488.
- Levitan DR, Grosberg RK. 1993. The analysis of paternity and maternity in the marine hydrozoans Hydractinia symbiolongicarpus using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Molecular Ecology 2: 315-326.
- Lewis MD, Ma J, Yeo M, Carrasco HJ, Llewellyn MS, Miles MA. 2009. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 81(6): 1041-1049.
- Lewis MD, Llewellyn MS, Yeo M, Acosta N, Gaunt MW, Miles MA. 2011. Recent, independent and anthropogenic origins of *Trypanosoma cruzi* hybrids. PLOS Neglected Tropical Diseases 5:e1363.
- Lewis MD, Francisco AF, Taylor MC, Burrell-Saward H, McLatchie AP, Miles MA, Kelly JM. 2014. Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. Cellular Microbiology 16: 1285-1300.
- Lewis MD, Francisco AF, Taylor MC, Jayawardhana S, Kelly JM. 2016. Host and parasite genetics shape a link between *Trypanosoma cruzi* infection dynamics and chronic cardiomyopathy. Cellular Microbiology doi:10.1111/cmi.12584.
- Lima L, da Silva MF, Neves L, Attias M, Takata CSA, Campaner M, de Souza W, Hamilton PB, Teixeira MMG. 2012. Evolutionary insights from bat trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *erneyi sp*. nov., in African bats closely related to *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* and allied species. Protist 163:856-872.
- Lima L, Espinosa-Álvarez O, Hamilton PB, Neves L, Takata CSA, Campaner M, Attias M, de Souza W, Camargo EP, Teixeira MMG. 2013. *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. Parasit Vectors 6:221.
- Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-VarónJA, Carranza JC, Pinto CM, Serrano MG, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MMG. 2015. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). Acta Tropica 151:166-177.
- Lister RG. 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety-like behaviour in themouse. Psychopharmacology 92, 180-185.
- Lo Presti MS, Rivarola HW, Fernández AR, Enders JE, Levin G, Fretes R, Cerban FM, Garrido VV, Paglini-Oliva P. 2009. Involvement of the beta-adrenergic system in the cardiac chronic form of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Parasitology 136 (8):905-18.
- Lo Presti MS, Esteves BH, Moya D, Bazán PC, Strauss M, Báez AL, Pizzi R, Quispe Ricalde, MA, Valladares B, Rivarola HW, Paglini-Oliva PA. 2014. Circulating *Trypanosoma cruzi* populations differ from those found in the tissues of the same host during acute experimental infection. Acta Tropica 133: 98-109.
- Lo Presti MS, Bazán PC, Strauss M, Báez AL, Rivarola HW, Paglini-Oliva PA. 2015. Trypanothione reductase inhibitors: Overview of the action of thioridazine in different stages of Chagas disease. Acta Tropica 145: 79-87.
- Loewe S. 1953.The problem of synergism and antagonism of combined drugs. Arzneimittel-Forschung 3: 285-290.
- Llewellyn MS, Rivett-Carnac JB, Fitzpatrick S, Lewis MD, Yeo M, Gaunt MW, Miles MA. 2011. Extraordinary *Trypanosoma cruzi* diversity within single mammalian reservoir hosts implies a mechanism of diversifying selection. International Journal for Parasitology 41(6):609-14.
- Macedo AM, Pena SDJ. 1998. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. Parasitol Today 14: 119-124.
- Machado CA, Ayala FJ. 2001. Nucleotide sequences provide evidence of genetic exchange among distantly related lineages of *Trypanosoma cruzi*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 98:7396-7401.

- Madoery R. 1993.Actualizaciones en la Enfermedad de Chagas. Editores: R Madoery, C Madoery, MI Cámera. Clinical Microbiology Reviews 1992 5: 400-419. Full Text 8.
- Maes M. 2001. The immunoregulatory effects of antidepressants. Human Psychopharmacology 16(1):95-103.
- Mackay IM. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical Microbiology and Infection 10(3): 190-212.
- Manoel-Caetano F da S, Silva AE. 2007. Implications of genetic variability of *Trypanosoma cruzi* for the pathogenesis of Chagas disease. Cadernos de Saúde Pública 23: 2263-74.
- Mantilla JC, Zafra GA, Macedo AM, González CI. 2010. Mixed infection of *Trypanosoma cruzi* I and II in a Colombian cardiomyopathic patient. Human Pathology 41(4): 610-3.
- Marcet PL, Duffy T, Cardinal MV, Burgos JM, Lauricella MA, Levin MJ, Kitron U, Gürtler RE, Schijman AG. 2006. PCR-based screening and lineage identification of *Trypanosoma cruzi* directly from faecal samples of triatomine bugs from northwestern Argentina. Parasitology 132(1): 57-65.
- Marcili A, Lima L, Cavazzana MJR, Junqueira ACV, Veludo HH, Maia da Silva F, Campaner M, Paiva F, Nunes VLB, Teixeira MMG. 2009. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. Parasitology 136: 641-655.
- Marin-Neto JA, Rassi A Jr, Morillo CA, Avezum A, Connolly SJ, Sosa-Estani S, Rosas F, Yusuf S; BENEFIT Investigators. 2008. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). American Heart Journal 156(1): 37-43.
- Marin-Neto JA, Rassi A Jr, Avezum A Jr, Mattos AC, Rassi A, Morillo CA, Sosa-Estani S, Yusuf S; BENEFIT Investigators. 2009. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 104: 319-24.
- Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. 2002. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. Journal of Clinical Laboratory Analysis 16(1): 47-51.
- Martins HR, Figueiredo LM, Valamiel-Silva JC, Carneiro CM, Machado-Coelho GL, Vitelli-Avelar DM, Bahia MT, Martins-Filho OA, Macedo AM, Lana M. 2008. Persistence of PCR positive tissue in benznidazole-treated mice with negative blood parasitological and serological tests in dual infections with *Trypanosoma cruzi* stocks from different genotypes. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 61: 1319-1327.
- Martins HR, Toledo MJ, Veloso VM, Carneiro CM, Machado-Coelho GL, Tafuri WL, Bahia MT, Valadares HM, Macedo AM, Lana M. 2006. *Trypanosoma cruzi*: Impact of dual-clone infections on parasite biological properties in BALB/c mice. Experimental Parasitology 112: 237-246.
- Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, Ferreira A, Morello, A. 2007. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology 146: 601-620.
- McKerrow JH, Caffrey C, Kelly B, Loke P, Sajid M. 2006. Proteases in parasitic diseases. Annual Review Pathology 1: 497-536.
- Mackay IM. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical Microbiology and Infection 10(3): 190-212.
- Mejía AM, Triana O. 2005. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi* in blood and organs of infected mice determined by LSSP-PCR. Biomedica 25(1): 76-86.
- Mejía-Jaramillo AM, Peña VH, Triana-Chávez O. 2009. *Trypanosoma cruzi*: Biological characterization of lineages I and II supports the predominance of lineage I in Colombia. Experimental Parasitology 121(1): 83-91.
- Mejía-Jaramillo AM, Fernández GJ, Palacio L, Triana O. 2011. Gene expression study using real-time PCR identifies an NTR gene as a major marker of resistance to beznidazole in *Trypanosoma cruzi*. Parasit Vectors 4: 1-12.
- Mejia AM, Hall BS, Taylor MC, Gómez-Palacio A, Wilkinson SR, Triana-Chávez O, Kelly JM. 2012. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. The Journal of Infectious Diseases 206: 220-228.

- Menghi C, Gatta C, Angeleri A, Rocher A, Palaoro L. 2011. *Trypanosoma cruzi*: tripomastigotes en líquido pleural de un paciente con SIDA. Revista Chilena de Infectología 28: 597-598.
- Messadi AA, Lamia T, Kamel B, Salima O, Monia M, Saida BR. 2008. Association between antibiotic use and changes in susceptibility patterns of Pseudomonas aeruginosa in an intensive care burn unit: a 5-year study, 2000-2004. Burns 34(8): 1098-102.
- Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, Gaunt MW, Mauricio IL. 2009. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on Leishmania: looking back and to the future. Parasitology 136(12): 1509-1528.
- Monteiro WM, Magalhães LKC, de Sá ARN, Gomes ML, de Ornelas Toledo MJ, Borges L, Pires I, de Oliveira Guerra JA, Silveira H, das Graças Vale Barbosa M. 2012. *Trypanosoma cruzi* IV causing outbreaks of acute Chagas disease and infections by different haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. PLoS One, 7(7): e41284.
- Montamat EE, De Luca D'Oro GM, Gallerano RH, Sosa R, Blanco A. 1996. Characterization of *Trypanosoma cruzi* populations by zymodemes: correlation with clinical picture. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 55(6): 625-8.
- Montgomery KC. 1955. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. Journal of Comparative and Physiological Psychology 48(4): 254-60.
- Moraes CB, Giardini MA, Kim H, Franco CH, Araujo-Junior AM, Schenkman S, Chatelain E, Freitas-Junior LH. 2014. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. Scintific Reports 4: 4703.
- Morello A. 1988. The biochemestry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanism in *Trypanosoma cruzi*. Comparative Biochemistry and Physiology 90: 1-12.
- Moreno M, D'ávila DA, Silva MN, Galvão LM, Macedo AM, Chiari E, Gontijo ED, Zingales B. 2010. *Trypanosoma cruzi* benznidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 105(7): 918-24.
- Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A Jr, Rosas F, Villena E, Quiroz R, Bonilla R, Britto C, Guhl F, Velazquez E, Bonilla L, Meeks B, Rao-Melacini P, Pogue J, Mattos A, Lazdins J, Rassi A, Connolly SJ, Yusuf S; BENEFIT Investigators. 2015. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. The New England Journal of Medicine 373(14): 1295-306.
- Mottram JC, Brooks DR, Coombs GH. 1998. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and Leishmania in host–parasite interactions. Current Opinion in Microbiology 1:455-460.
- Müller S, Liebau E, Walter RD, Krauth-Siegel RL. 2003. Thiol-Based redox metabolism of protozoan parasites. Trends in Parasitology 19: 320-328.
- Murta SMF, Gazzinelli RT, Brener Z, Romanha AJ. 1998. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. Molecular and Biochemical Parasitology 93: 203-214.
- Nagajyothi F, Zhao D, Weiss LM, Tanowitz HB. 2012. Curcumin treatment provides protection against *Trypanosoma cruzi* infection. Parasitology Research 110: 2491-2499.
- Nogueira FB, Ruiz JC, Robello C, Romanha AJ, Murta SM. 2009. Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial tryparedoxin peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. Parasitology Research 104: 835-44.
- Novaes RD, Santos EC, Cupertino MC, Bastos DS, Oliveira JM, Carvalho TV, Neves MM, Oliveira LL, Talvani A. 2015. *Trypanosoma cruzi* infection and benznidazole therapy independently stimulate oxidative status and structural pathological remodeling of the liver tissue in mice. Parasitology Reserch 114(8): 2873-81.
- Noyes HA, Stevens JR, Teixeira M, Phelan J, Holz P. 1999. A nested PCR for the ssrRNA gene detects *Trypanosoma binneyi* in the platypus and *Trypanosoma sp*. in wombats and kangaroos in Australia. International Journal for Parasitology 29(2): 331-9.
- Nunes LR, de Carvalho MR, Buck GA. 1997. *Trypanosoma cruzi* strains partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader RNA and rRNA gene promoters. Molecular and Biochemical Parasitology 86(2): 211-224.

- OMS. 2002. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. Organización Mundial de la Salud.
- OMS. 2007. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. Organización Mundial de la Salud.
- OMS. 2016. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. Nota descriptiva N°340.
- O'Sullivan MC, Durham TB, Valdes HE, Dauer KL, Karney NJ, Forrestel AC, Bacchi CJ, Baker JF. 2015. Dibenzosuberyl substituted polyamines and analogs of clomipramine as effective inhibitors of trypanothione reductase; molecular docking, and assessment of trypanocidal activities. Bioorganic & Medicinal Chemistry 23: 996-1010.
- Paglini-Oliva P, Fernández AR, Fretes R, Pelsman A. 1998. Structural, ultraestructural studies and evolution of *Trypanosoma cruzi* infected mice treated with thioridazine. Experimental and Molecular Pathology 65: 78-86.
- Pelizzaro-Rocha KJ, Tiuman TS, Izumi E, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Nakamura CV. 2010. Synergistic effects of parthenolide and benznidazole on *Trypanosoma cruzi*. Phytomedicine 18: 36-39
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. 1985. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. Journal of Neuroscience Methods 14: 149-167.
- Pena DA, Eger I, Nogueira L, Heck N, Menin Á, Báfica A, Steindel M. 2001. Selection of TcII *Trypanosoma cruzi* population following macrophage infection. The Journal of Infectious Diseases 204(3): 478-86.
- Pereira MR, Henrich PP, Sidhu AB, Johnson D, Hardink J, Van Deusen J, Lin J, Gore K, O'Brien C, Wele M, Djimde A, Chandra R, Fidock DA. 2011. In vivo and in vitro antimalarial properties of azithromycin-chloroquine combinations that include the resistance reversal agent amlodipine. Antimicrobial Agents Chemotherapy (7): 3115-24.
- Pérez-Fuentes R, Guégan J-F, Barnabé C, López-Colombo A, SalgadoRosas H, Torres-Rasgado E, Briones B, Romero-Díaz M, RamosJiménez J, Sánchez-Guillén Mdel C. 2003. Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically individuals. International Journal for Parasitology 33: 293-299.
- Pinto CM, Kalko EK, Cottontail I, Wellinghausen N, Cottontail VM. 2012. TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. Infection, Genetics and Evolution 12(6): 1328-1332.
- Planer JD, Hulverson MA, Arif JA, Ranade RM, Don R, Buckner FS. 2014. Synergy testing of FDA-approved drugs identifies potent drug combinations against *Trypanosoma cruzi*. PLOS Neglected Tropical Diseases 8(7):e2977.
- Ponce NE, Sanmarco L, Gea S, Aoki MP. 2013. El *Trypanosoma cruzi*, parásito que causa la enfermedad de Chagas, modula la señalización inducida por interleuquina-6 a través de la degradación de receptor gp130 en diferentes células de huesped. Química de los Laureados Vol. Nº3.
- Prata A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. Lancet Infect Dis 1(2):92-100.
- Pudovkina OL, Cremers TI, Westerink BH. 2002. The interaction between the locus coeruleus and dorsal raphe nucleus studied with dual-probe microdialysis. European Journal of Pharmacology 445(1–2): 37-42.
- Ragone PG, Perez Brandan C, Padilla AM, Monje Rumi M, Lauthier JJ, Alberti D'Amato AM, Tomasini N, Cimino RO, Romero NM, Portelli M, Nasser JR, Basombrío MA, Diosque P. 2012. Biological behavior of different *Trypanosoma cruzi* isolates circulating in an endemic area for Chagas disease in the Gran Chaco region of Argentina. Acta Tropica 123: 196-201.
- Ragone PG, Pérez Brandán C, Monje Rumi M, Tomasini N, Lauthier JJ, Cimino RO, Uncos A, Ramos F, Alberti D'Amato AM, Basombrío MA, Diosque P. 2015. Experimental Evidence of Biological Interactions among Different Isolates of *Trypanosoma cruzi* from the Chaco Region. PLoS ONE 10(3): e0119866.
- Rahman MM, Uddin ME, Islam AM, Chowdhury MA, Rahman MA. 2015. CNS Depressant and Antinociceptive Effects of Different Fractions of Pandanus Foetidus Roxb. Leaf Extract in Mice. Malaysian Journal of Medical Sciences 22(3): 33-40.
- Ramirez CB, Jaramillo A, Becerra A, Mansalve E, Villareal W, Villabona R. 2007.Lesión cerebral como presentación de la enfermedad de Chagas. Primer caso reportado en Colombia. Acta Neurológica Colombiana 23: 15-18.

- Ramírez JD, Guhl F, Rendón LM, Rosas F, Marin-Neto JA, Morillo CA. 2010. Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic chagasic patients. PLOS Neglected Tropical Diseases 4, e899.
- Ramírez JD, Montilla M, Cucunubá ZM, Floréz AC, Zambrano P, Guhl F. 2013. Molecular epidemiology of human oral Chagas disease outbreaks in Colombia. PLOS Neglected Tropical Diseases 7(2): e2041.
- Ramírez JD, Tapia-Calle G, Muñoz-Cruz G, Poveda C, Rendón LM, Hincapié E, Guhl F. 2014. Trypanosome species in neo-tropical bats: biological, evolutionary and epidemiological implications. Infection, Genetics and Evolution 22:250-256.
- Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JÁ. 2010. Chagas disease. Lancet 375: 1388-1402.
- Ravaschino EL, Docampo R, Rodríguez JB. 2006. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Phosphinopeptides against *Trypanosoma cruzi* Targeting Trypanothione Biosíntesis. Journal of Medicinal Chemistry 49: 426-435.
- Rebolledo Marchesini P, González Rendic X, Valenzuela P, Larraguibel Salas F, Mujica BA. 2004. Pain in spine injured patients. Ciencia & trabajo 6(12): 73-78.
- Rehman N, Ehsan S, Abdullah SMU, Akhtar MJ, Mandic DP, McDonald-Maier KD. 2015. Multi-Scale Pixel-Based Image Fusion Using Multivariate Empirical Mode Decomposition. Sensors 15: 10923-10947.
- Rendon D. 2014. Alterations of mitochondria in liver but not in heart homogenates after treatment of rats with benznidazole. Human & Experimental Toxicology 33:1066-1070.
- Rivarola HW, Fernández AR, Enders JE, Fretes R, Gea S, Paglini-Oliva P. 2001. Effects of clomipramine on *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 95: 1-5.
- Rivarola HW, Paglini-Oliva P. 2002. *Trypanosoma cruzi* Trypanothione Reductase Inhibitors: Phenothiazines and Related Compounds Modify Experimental Chagas Disease Evolution. Current drug targets. Cardiovascular & haematological disorders 2: 43-52.
- Rivarola HW, Bustamante JM, Lo Presti MS, Fernández AR, Enders JE, Gea S, Fretes RE, Paglini-Oliva PA. 2005. *Trypanosoma cruzi*: Chemotherapeutic effects of clomipramine in mice infected with an isolate obtained from an endemic area. Experimental Parasitology 111: 80-86.
- Rodriguez SP, Sanz MM, Aponte LM. 2009. Enfermedad de Chagas: Chagoma cerebral con afectación el cuerpo calloso en un paciente con SIDA. Revista Colombiana de Radiología 20: 2793-2797.
- Rodrigues WF, Miguel CB, Chica JE, Napimoga MH. 2010. 15d-PGJ(2) modulates acute immune responses to *Trypanosoma cruzi* infection. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 105(2):137-43.
- Roellig DM, Brown EL, Barnabé C, Tibayrenc M, Steurer FJ, Yabsley MJ. 2008. Molecular typing of *Trypanosoma cruzi* isolates, United States. Emerging Infectious Diseases journal 14(7): 1123-1125.
- Roldán E. 1988. Fundamentos y aplicaciones de las propiedades antioxidativas del ácido tióctico. Medicina 58: 525.
- Romanha AJ, Castro SL, Soeiro Mde N, Lannes-Vieira J, Ribeiro I, Talvani A, Bourdin B, Blum B, Olivieri B, Zani C, Spadafora C, Chiari E, Chatelain E, Chaves G, Calzada JE, Bustamante JM, Freitas-Junior LH, Romero LI, Bahia MT, Lotrowska M, Soares M, Andrade SG, Armstrong T, Degrave W, Andrade Zde A. 2010. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 105(2): 233-8.
- Rozas M, De Doncker S, Adaui V, Coronado X, Barnabé C, Tibyarenc M, Solari A, Dujardin JC. 2007. Multilocus polymerase chain reaction restriction fragment– length polymorphism genotyping of *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease): taxonomic and clinical applications. The Journal of Infectious Diseases 195(9): 1381-1388.
- Saeftel M, Fleischer B, Hoerauf A. 2001. Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. Infection and Immunity 69: 2252-9.
- Saito K, Maekawa K, Ishikawa M, Senoo Y, Urata M, Murayama M, Nakatsu M, Yamada H, Saito Y. 2014. Glucosylceramide and Lysophosphatidylcholines as Potential Blood Biomarkers for Drug-Induced Hepatic Phospholipidosis. Toxicological Sciences 141(2): 377-386.

- Sales-Campos H, Kappel HB, Andrade CP, Lima TP, Mattos ME Jr., de Castilho A, Correia D, Giraldo LE, Lages-Silva E. 2014. A DTU-dependent blood parasitism and a DTU-independent tissue parasitism during mixed infection of *Trypanosoma cruz*i in immunosuppressed mice. Parasitology Research 113: 375-385.
- Samuelson J. 1999. Why metronidazole is active against both bacteria and parasites. Antimicrobial Agents Chemotherapy 43:1533-41.
- Sardinha LR, Elias RM, Mosca T. 2006. Contribution of NK, NK T, γδ T, and αβ T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. Infection and Immunity 74(4): 2031-2042.
- Schmunis GA, Cruz JR. 2005. Safety of the blood supply in Latin America. Clinical Microbiology Reviews 18(1): 12- 29.
- Segura MA, Molina de Raspi E, Basombrio MA. 1994. Reversibility of muscle and Herat lesions in chronic; *Trypanosoma cruzi* infected mice after late trypanocidal treatment. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 89: 213-216.
- Silva DR, De Castro SL, Alves MC, Batista WS, Oliveira GM. 2012. Acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection: Establishing a murine model that utilises non-invasive measurements of disease parameters. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 107: 211-216.
- Silva Valadares HM, Pimenta JR, Segatto M, Veloso VM, Gomes ML, Chiari E, Gollob KJ, Bahia MT, de Lana M, Franco GR, Machado CR, Pena SD, Macedo AM. 2012. Unequivocal identification of subpopulations in putative multiclonal *Trypanosoma cruzi* strains by FACs single cell sorting and genotyping. PLOS Neglected Tropical Diseases 7: e1722.
- Sopirala MM, Mangino JE, Gebreyes WA, Biller B, Bannerman T, Balada-Llasat JM, Pancholi P. 2010. Synergy testing by Etest, microdilution checkerboard, and time-kill methods for pan-drug-resistant Acinetobacter baumannii. Antimicrobial Agents Chemotherapy 54(11): 4678-83.
- Solari A, Ortíz S, Soto A, Arancibia C, Campillay R, Contreras M, Salinas P, Rojas A, Schenone H. 2001 Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected children with nifurtimox: a 3 year follow-up by PCR. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 48(4): 515-9.
- Sosa-Estani S, Armenti, A, Araujo, G, Viotti R, Lococo B, Ruiz Vera B, Vigliano C, de Rissio AM, Segura EL. 2004. Tratamiento de la enfermedad de Chagas con benznidazol y ácido tióctico. Medicina (B Aires) 64:1-6.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Molecular and Biochemical Parasitology 141-152.
- Souza DHF, Garratt RC, Araujo APU, Guimaraes BG, Jesus WDP, Michels PAM, Hannaert V, Oliva G. 1998. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. FEBS Letters 424:131-135.
- Stadelmann B, Lin LK, Kunz TH, Ruedi M. 2007. Molecular phylogeny of new world Myotis (Chiroptera, Vespertilionidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA genes. Molecular Phylogenetics and Evolution 43:32–48.
- Steindel M, Kramer Pacheco L, Scholl D, Soares M, Hoehr de Moraes M, Eger I, Kosmann C, Sincero TC, Stoco PH, Murta SM, de Carvalho-Pinto CJ, Grisard EC. 2008. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 60: 25-32.
- Steverding D. 2014. The history of Chagas disease. Parasites & Vectors 7:317.
- Strauss M, Lo Presti MS, Bazán PC, Baez A, Fauro R, Esteves B, Sanchez Negrete O, Cremonezzi D, Paglini-Oliva PA, Rivarola HW. 2013. Clomipramine and benznidazole association for the treatment of acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Parasitology International 62(3):293-9.
- Sturm NR, Campbell DA. 2010. Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. Acta Tropica 115(1-2): 35-43.
- Suehiro K, Funao T, Fujimoto Y, Yamada T, Mori T, Nishikawa K. 2013. Relationship between noradrenaline release in the locus coeruleus and antiallodynic efficacy of analgesics in rats with painful diabetic neuropathy. Life Sciences 92(23): 1138-1144.
- Tallarida RJ. 2011. Quantitative Methods for Assessing Drug Synergism. Genes Cancer 2(11): 1003-1008.

- Tanowitz HB, KirchhoffLV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. 1992. Chagas disease. Clinical Microbiology Reviews 5: 400-419.
- Teixeira ARL, Nascimento RJ, Sturm NR. 2006. Evolution and pathology in Chagas disease - A review. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 101: 463-491.
- Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, de Souza W. 2011. Atlas didático: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. 1ª Ed. Fundação CECIERJ.
- Teston AP, Monteiro WM, Reis D, Bossolani GD, Gomes ML, de Araújo SM, Bahia MT, Barbosa MG, Toledo MJ. 2013. In vivo susceptibility to benznidazole of *Trypanosoma cruzi* strains from the western Brazilian Amazon. Tropical Medicine & International Health 18(1): 85-95.
- Tibayrenc M. 1998. Beyond strain typing and molecular epidemiology: integrated genetic epidemiology of infectious diseases. Parasitology Today 14(8): 323-9.
- Tibayrenc M, Ayala FJ. 2002. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. Trends in Parasitology 18(9): 405-410.
- Toledo MJ, Bahia MT, Carneiro CM, Martins-Filho OA, Tibayrenc M, Barnabé C, Tafuri WL, de Lana M. 2003. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. Antimicrobial Agents Chemotherapy 47: 223-230.
- Tovar J, Cunningham ML, Smith AC, Croft SL, Fairlamb AH. 1998. Down-regulation of Leishmania donovani trypanothione reductase by heterologous expression of a trans-dominant mutant homologue: effect on parasite intracellular survival. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 95(9): 5311-6.
- Triquell MF, Díaz-Luján C, Freilij H, Paglini P, Fretes RE. 2009. Placental infection by two subpopulations of *Trypanosoma cruzi* is conditioned by differential survival of the parasite in a deleterious placental medium and not by tissue reproduction. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 103(10): 1011-8.
- Turrens JF. 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. Molecular Aspects of Medicine 25: 211-220.
- Urbina JA, Docampo, R. 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. Trends in Parasitology 19:495-501.
- Urbina JA. 2010. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. Acta Tropica 115: 55-68.
- Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, Reis DD, Corrêa-Oliveira R. 1996. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. Lancet 348(9031): 891-892.
- Valdez RH, Tonin LT, Ueda-Nakamura T, Silva SO, Dias Filho BP, Kaneshima EN, Yamada-Ogatta SF, Yamauchi LM, Sarragiotto MH, Nakamura CV. 2012. In vitro and in vivo trypanocidal synergistic activity of N- buty l-1- (4-dimethylamino) pheny l-1, 2, 3, 4-tetrahydro-β-carboline-3-carboxamide associated with benznidazole. Antimicrobial Agents of Chemotherapy 56(1): 507-12.
- Velazquez M, Diez CN, Mora C, Diosque P, Marcipar IS. 2008. *Trypanosoma cruzi*: An analysis of the minicircle hypervariable regions diversity and its influence on strain typing. Experimental Parasitology 120: 235-241
- Vergara U, Palomo I, Zúñiga C, Navarrete C. 2002. Complejo principal de Histocompatibilidad. En: Fundamentos de Inmunología Básica y Clínica. Ed. Universidad de Talca. pp. 167-178.
- Vilar-Pereira G, Ruivo LA, Lannes-Vieira J. 2015. Behavioural alterations are independent of sickness behaviour in chronic experimental Chagas disease. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 110(8): 1042-1050.
- Villarreal D, Barnabe´ C, Sereno D, Tibayrenc M. 2004. Lack of correlation between in vitro susceptibility to benznidazole and phylogenetic diversity of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. Experimental Parasitology 108: 24-31.
- Villarreal D, Nirde P, Hide M, Barnabe C, Tibayrenc M. 2005. Differential gene expression in benznidazole-resistant *Trypanosoma cruzi* parasites. Antimicrobial Agents Chemotherapy 49: 2701-9.
- Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Alvarez MG, Petti M, Bertocchif G, Armentig A. 2009. Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: fears and realities. Expert Review of Anti- infective Therapy 7: 157-163.

- Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y, Svoboda M. 2003. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 68: 574-582.
- Von A, Zaragoza E, Jones D, Rodriguez Morales AJ, Paredes CF. 2007. New insights into Chagas disease: a neglected disease in Latin America. The Journal of Infection in Developing Countries 1: 99-111.
- Westenberger SJ, Barnabé C, Campbell DA, Sturm NR. 2005. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. Genetics 171(2): 527-543.
- Westenberger SJ, Sturm NR, Campbell DA. 2006. *Trypanosoma cruzi* 5S rRNA arrays define five groups and indicate the geographic origins of an ancestor of the heterozygous hybrids. International Journal for Parasitology 36(3): 337-346.
- Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM, Cheeseman I. 2008. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 105: 5022-7.
- Wincker P, Bosseno MF, Britto C, Yaksic N, Cardoso MA, Morel CM, Brenière SF. 1994. High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. FEMS Microbiology Letters 15: 124(3):419-23.
- Wong ML, Medrano JF. 2005. Real-time PCR for mRNA quantitation. Biotechniques 39(1): 75-85.
- Wrightsman R, Krassner S, Watson J. 1982. Genetic control of response to *Trypanosoma cruzi* in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival. Infection and Immunity 36: 637-644.
- Wu Y, Xiao N, Yu L, Pan C, Li Y, Zhang X, Liu G, Dai, Z, Pan X, Li A. 2015. Combination Patterns of Major R Genes Determine the Level of Resistance to the M. oryzae in Rice (Oryza sativa L.). PLoS One 10: e0126130.
- Yang L, Shi L, Yu J, Zhang Y. 2016. Activation of protein kinase A in the amygdala modulates anxiety-like behaviors in social defeat exposed mice. Molecular Brain 9:3.
- Yeo M, Acosta N, Llewellyn M, Sánchez H, Adamson S, Miles GAJ, López E, González N, Patterson JS, Gaunt MW, de Arias AR, Miles MA. 2005. Origins of Chagas disease: *Didelphis* species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. International Journal for Parasitology 35(2): 225-233.
- Yeo M, Mauricio IL, Messenger LA, Lewis MD, Llewellyn MS, Acosta N, Bhattacharyya T, Diosque P, Carrasco HJ, Miles MA. 2011. Multilocus sequence typing (MLST) for lineage assignment and high resolution diversity studies in *Trypanosoma cruzi*. PLOS Neglected Tropical Diseases 5(6): e1049.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 104(7): 1051-1054.
- Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infection, Genetics and Evolution 12(2): 240-253.
- Zingales B, Miles MA, Moraes CB, Luquetti A, Guhl F, Schijman AG, Ribeiro I. 2014. Drugs for Neglected Disease Initiative; Chagas Clinical Research Platform Meeting. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 109(6):828-33.
- Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. Nucleic Acids Research 32(12): e103.