

Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.
Carrera de Ciencias Biológicas.

“Evaluación de la actividad de nanopartículas de plata (AgNPs) como nuevos agentes anti-*Trypanosoma cruzi*”



Tesinista: Marcos Daniel Juárez

Firma:.....

Directora: Paola Carolina Bazán

Firma:.....

Co-director: Pablo Roberto Dalmaso

Firma:.....

Lugar de Trabajo:

Centro de Investigación de la Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis
Cátedra de Física Biomédica, Facultad de Ciencias Médicas, UNC.



Año 2021

“Evaluación de la actividad de nanopartículas de plata (AgNPs) como nuevos agentes anti-*Trypanosoma cruzi*”

Tribunal Examinador

Dra. Claudia Rodríguez

Firma:.....

Dra. Ma. Alejandra Bertolotti

Firma:.....

Dr. Eduardo M. Clop

Firma:.....

Calificación:

Fecha:

ÍNDICE

RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN	5
OBJETIVOS	20
HIPÓTESIS Y PREDICCIONES	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
RESULTADOS.....	24
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	34
BIBLIOGRAFÍA.....	35
ANEXO I	42

RESUMEN

Nanopartículas de plata (AgNPs) fueron obtenidas mediante síntesis natural a partir de un extracto de achicoria (*Cichorium intybus*) para probar su efecto parasiticida sobre epimastigotes y tripomastigotes de la cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (TcII). La producción de AgNPs se realizó mediante reacciones de oxidación-reducción a partir de nitrato de plata (AgNO_3). Se caracterizaron el tamaño medio y concentración de las nanopartículas obtenidas. Se ensayó la citotoxicidad sobre la línea celular Vero proveniente de mono verde africano (*Cercophitecus aethiops*) mediante la técnica de captación del rojo neutro. La actividad en epimastigotes se evaluó mediante la exposición durante 96 h a diluciones seriadas de AgNPs a partir del nivel de máxima concentración no citotóxica (MCNC) reportada en el test de citotoxicidad. La actividad oxidativa fue cuantificada con la sonda H_2DCFDA usando espectrofluorimetría. Se realizó microscopía de fluorescencia sobre los epimastigotes tratados con la IC_{50} de AgNPs y grupos control a las 96 h. La actividad en tripomastigotes se realizó con un ensayo en sangre de ratón obtenida a los 15 días post infección. Las AgNPs producidas presentaron una absorbancia máxima a una longitud de $\approx 440\text{nm}$. El tamaño promedio fue de 67 nm y la concentración de 23 μM . El ensayo de captación del rojo neutro en la línea celular Vero arrojó un valor de MCNC para AgNO_3 de 0,0007 mM (700 μM) y de 3 μM para las AgNPs sintetizadas. Las AgNPs sobre epimastigotes arrojaron un valor de $\text{IC}_{50}=1,153 \mu\text{M}$ para AgNPs a las 96 horas de tratamiento, siendo la MCNC (3 μM) letal para el 100% de los parásitos. Las células presentaron daño evidente. El control con AgNO_3 presentó una tasa de inhibición absoluta. Se observó actividad oxidativa en células expuestas a la IC_{50} . En la forma tripomastigote se logró una inhibición máxima del $\approx 60\%$ a la MCNC. La concentración efectiva 50 (EC_{50}) fue de 2,58 μM .

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*; Nanopartículas de Plata; Especies reactivas del Oxígeno; Diclorofluoresceína.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas desatendidas son responsables de la muerte de más de medio millón de personas cada año a nivel mundial (Nii-Trebi, 2017). Estas enfermedades reciben poca atención y se ven frecuentemente postergadas en las prioridades de la salud pública.

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es una afección parasitaria, sistémica, crónica, transmitida por vectores y causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*, con una fuerte vinculación con aspectos socio-económico-culturales deficitarios, siendo considerada una enfermedad desatendida (OPS, 2021a). Es una patología endémica en 21 países de las Américas, aunque también se encuentra en países no endémicos de América y el mundo debido a los movimientos migratorios (OPS/OMS, 2021).

La enfermedad se transmite a través de insectos hemípteros de la subfamilia *Triatominae* (chinchas o vinchucas), capaces de colonizar viviendas rurales, suburbanas o urbanas insalubres. Se puede transmitir también por transfusiones sanguíneas (Angheben et al., 2015), trasplante de órganos (Pierrotti et al., 2018), por vía congénita (Kemmerling et al., 2019) y por el consumo de alimentos y bebidas contaminadas (Filigheddu et al., 2017), entre otras (OPS, 2021b).

La transmisión vectorial de la enfermedad se produce cuando los triatóminos, cuya alimentación es hematófaga, infectan a las personas expuestas a su picadura, al depositar heces que contienen parásitos en heridas de la piel o sobre mucosas (Monteon, 2019).

Si bien intentar un cálculo aproximado de la magnitud que tiene esta enfermedad puede arrojar resultados muy imprecisos (Guhl & Lazdins-Helds, 2007), las estimaciones más recientes de la Organización Mundial de la Salud prevén que hay al menos 5.742.167 infectados sólo en los países de Latinoamérica, siendo Argentina, Brasil y México los más afectados (1.505.235; 1.156.821 y 876.458 personas respectivamente) (OMS, 2015).

La enfermedad recibe su nombre en reconocimiento al médico e infectólogo brasileño, Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879-1934), quien en 1909 la describió por primera vez en el pueblo de Lassance, estado de Minas Gerais, Brasil (Chagas, 1909). El trabajo de Chagas fue especial en la historia de la medicina, por ser el único investigador que pudo describir por completo una enfermedad infecciosa, es decir, el patógeno, su vector y hospedador, las manifestaciones clínicas y la epidemiología (de Haro Arteaga, 2003). Carlos Chagas fue candidato en dos ocasiones al premio Nóbel (1913 y 1920), sin embargo, no fue galardonado, pues para esa época no se comprendía el carácter universal del descubrimiento de la tripanosomiasis

americana, y tampoco el impacto epidemiológico de la nueva enfermedad (Bestetti et al., 2009).

En Argentina, el médico y bacteriólogo Salvador Mazza (1886-1946) fue el impulsor de las investigaciones referentes a la enfermedad de Chagas al realizar campañas en el noroeste del país al mando de la Misión de Estudios de Patología Regional Argentina (MEPRA), un proyecto de extensión de la Universidad Nacional de Buenos Aires dedicado a la investigación de un gran número de afecciones como la leishmaniasis, la leucemia aguda linfocítica, la malaria, la hidatidosis, la criptococosis, entre otras. Llegó a detectar hasta 1244 casos de tripanosomiasis en seres humanos, y describió una larga lista de mamíferos que podían ser reservorio de la enfermedad, entre los que se encontraban el perro y el gato (Mazza, 1949; Leónard, 1992).

Taxonomía

A continuación, se detallará la ubicación taxonómica de los organismos involucrados en la enfermedad de Chagas (parásito e insecto vector):

Clasificación taxonómica del parásito (Tabla 1)

Tabla 1: Clasificación taxonómica del parásito.

Categoría	Taxón
Dominio/Imperio	Eukaryota (=Eukaria)
Supergrupo	Excavata (<i>incertae sedis</i>)
Subgrupo	Discoba (=Eozoa)
Superphylum	Discicristata
Phylum	Euglenozoa
Subphylum	Glycomonada
Clase	Kinetoplastea
Subclase	Metakinetoplastina
Orden	Trypanosomatida
Familia	Trypanosomatidae
Subfamilia	Trypanosomatinae
Género	<i>Trypanosoma</i>
Subgénero	<i>Schizotrypanum</i>
Especie	<i>Trypanosoma cruzi</i>

Trypanosoma cruzi Chagas, 1909

En la sangre del hospedador mamífero es descripto como un pequeño parásito (entre 16,3 a 21,8 μm , incluyendo flagelo), con una típica forma de “C” y un gran kinetoplasto de aproximadamente 1,2 μm de diámetro en la región posterior. Tiene un flagelo y una membrana ondulante con dos o tres convoluciones. Pueden distinguirse tanto formas delgadas como anchas de tripomastigotes. La forma intracelular denominada amastigote, se encuentra agrupada en pseudoquistes en diversos tejidos del mamífero hospedador. A diferencia de otras especies del subgénero *Schizotrypanum*, *T. cruzi* posee un amplio rango de hospedadores. Se encuentra como reservorio en más de 150 especies de mamíferos incluyendo a los murciélagos, sin embargo, algunos animales como aves y reptiles no son susceptibles a la infección por *T. cruzi*, aunque el vector se alimente de ellos (Stevens & Brisse, 2009). Su genoma se distribuye en pares de cromosomas homólogos que puede variar en número y tamaño en las distintas cepas (Zingales, 2018).

Clasificación taxonómica del vector (Tabla 2)

Tabla 2: Clasificación taxonómica de los insectos triatomíneos.

Categoría	Taxón	Categoría	Taxón
Dominio/Imperio	Eukaryota	Subclase	Pterygota
Supergrupo	Opisthokonta	Sin rango	Neoptera
Reino	Metazoa	Sin rango	Paraneoptera
Sin rango	Bilateria	Orden	Hemíptera
Sin rango	Protostomia	Suborden	Heteroptera
Superphylum	Ecdysozoa	Infraorden	Cimicomorpha
Phylum	Arthropoda	Superfamilia	Reduvidae
Subphylum	Hexapoda	Familia	Reduviidae
Clase	Insecta	Subfamilia	Triatominae

Subfamilia Triatominae Jeannel, 1919

Es una subfamilia de insectos reduvidos conocidos en el cono sur del continente americano como vinchucas; chipos o barbeiros. Son insectos hematófagos, es decir que se alimentan de la sangre de vertebrados. 140 especies son reconocidas formalmente dentro de Triatominae, probablemente todas con capacidad de transmitir el parásito *T. cruzi*, siendo los de mayor importancia aquéllos que se han adaptado a vivir en contacto cercano con el ser humano. La subfa-

milia Triatominae está constituida por cinco tribus (Schofield & Galvão, 2009). Actualmente un gran número de estudios apoyan la monofilia de este grupo (Monteiro et al., 2018). La mayoría de las especies de triatominos (aproximadamente 135 de las 140 descritas) se encuentran exclusivamente en el Nuevo Mundo, entre las latitudes 42°N (noreste de los Estados Unidos) y 46°S (Patagonia argentina) (Gorla & Noireau, 2017; Vieira et al., 2018). La distribución geográfica está caracterizada por poseer ciclos selváticos y ciclos de tipo doméstico o peridoméstico (Groom et al., 2017). En Argentina existen registros de 17 especies de triatominos, los cuales están agrupados en los géneros *Panstrongylus*, *Psammolestes* y *Triatoma*; sin embargo las especies de mayor impacto e importancia epidemiológica son aquellas pertenecientes al género *Triatoma* (Fig. 1) (Ceccarelli et al., 2020).

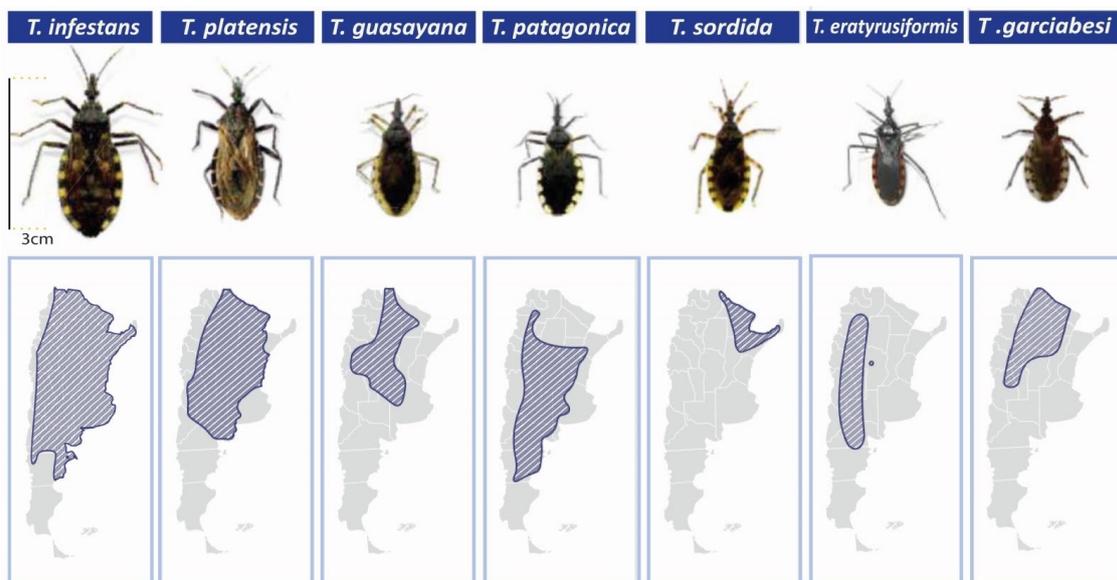


Figura 1. Principales especies de triatominos con distribución en la República Argentina (Ceccarelli et al., 2020).

Formas celulares de *T. cruzi*

Los estadios básicos de *T. cruzi* se pueden diferenciar por su forma, posición del kinetoplasto respecto del núcleo y la región por donde emerge el flagelo (Zavala Castro, 2014; de Lana & de Menezes Machado, 2017). De esta manera se presentan los siguientes estadios celulares (Figura 2):

Epimastigote: Es la forma replicativa, no infectiva para el ser humano o mamífero, y se encuentra en el tracto intestinal del vector invertebrado. Es de aspecto fusiforme, con 20 a 25 μm de longitud. El cinetoplasto se localiza en la región anterior, cerca del núcleo, y el flagelo, que se ubica en posición anterior al núcleo, forma una pequeña membrana ondulante. Este

estadio morfológico se multiplica por fisión binaria longitudinal en el intestino de los triatominos para dar lugar a tripomastigotos metacíclicos.

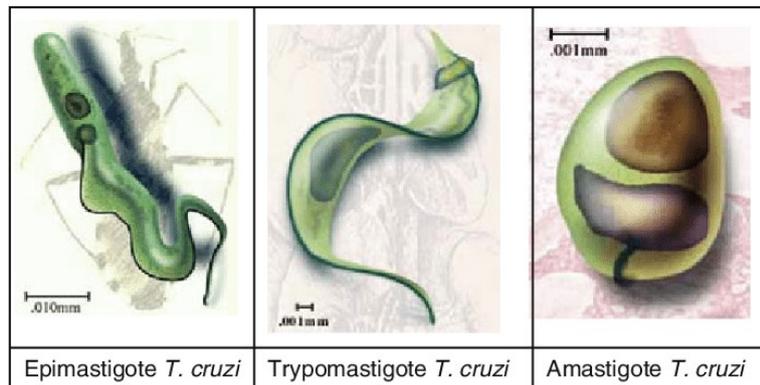


Figura 2. Formas celulares presentes en *T. cruzi* (Muñoz-Saravia et al., 2012).

Amastigote: Es la forma replicativa intracelular que se reproduce en el huésped mamífero. Proviene de la diferenciación de los tripomastigotes, tanto metacíclicos como sanguíneos, y tiene la capacidad de infectar a otras células. Se multiplica por fisión binaria longitudinal y puede ser reproducida en cultivos de diferentes tipos de células de mamíferos. Posee una forma redondeada llamada leishmanoide, mide de 2 a 2.5 μm , su flagelo está secuestrado dentro de una bolsa visible, según lo revela el microscopio electrónico, y presenta un gran núcleo y cinetoplasto.

Tripomastigote metacíclico: Es una forma no replicativa pero infectiva para el humano u otros mamíferos; es producto de la diferenciación de los epimastigotes en la porción distal del intestino del vector por un proceso denominado metaciclogénesis. Los tripomastigotes metacíclicos se depositan con las heces del insecto. Tienen forma alargada y miden entre 20 y 25 μm de longitud. Se distinguen por presentar un núcleo vesiculoso y hacia la parte posterior de éste se halla el cinetoplasto, de forma casi siempre esférica. El flagelo, con su membrana ondulante, se observa a lo largo del cuerpo del parásito y surge libremente en el extremo posterior.

Tripomastigote sanguíneo: Al igual que el tripomastigote metacíclico, es una forma no replicativa pero infectiva para el insecto vector y el mamífero; es resultado de la diferenciación del amastigote dentro del hospedador vertebrado; puede infectar a nuevas células o pasar al vector invertebrado y cerrar así el ciclo de vida del parásito.

Ciclo biológico

Su ciclo biológico inicia cuando el insecto vector se alimenta de la sangre de un mamífero infectado, la cual contiene tripomastigotes circulantes, que ingresan al aparato digestivo del insecto (Figura 3). En el intestino del triatomino los parásitos sufren un proceso de dife-

renciación a epimastigotes duplicativos, para luego pasar a tripomastigotes metacíclicos. La transformación de un estadio replicativo no-infectivo (epimastigote) a uno no-replicativo infectivo (tripomastigote) es promovida por las condiciones del microambiente intestinal del vector (Kollien & Schaub, 2000).

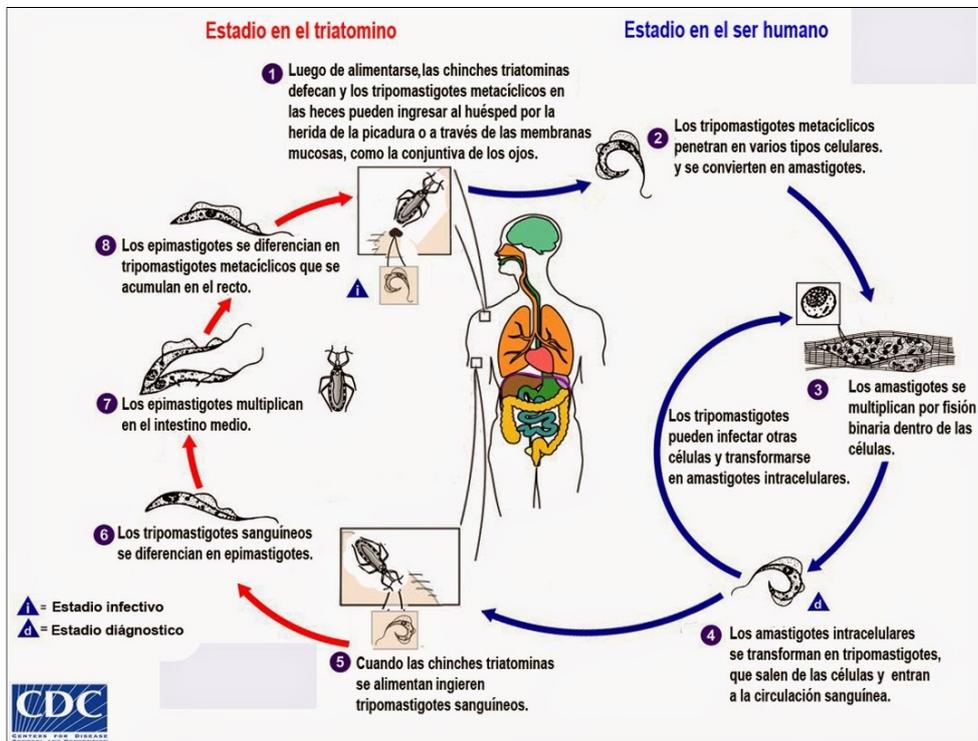


Figura 3. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*. Se observa la alternancia entre el vector triatomino y el hospedador definitivo. Fuente: Centers for Disease Control and Prevention (CDC)

En una etapa posterior el triatomino infectado se alimenta nuevamente, y al llenarse con sangre proveniente del mamífero defeca sobre la piel o mucosas del huésped depositando tripomastigotes metacíclicos. Cuando el triatomino arrastra con sus patas la materia fecal, se introducen los tripomastigotes metacíclicos por la laceración inducida por la probóscide del insecto al alimentarse. Otra alternativa es que el mismo huésped se infecte a sí mismo al llevar las deyecciones a una solución de continuidad en la piel, hacia alguna mucosa o a la conjuntiva ocular (Zavala Castro, 2014).

En la mayoría de los animales la adquisición del parásito se produce por la vía oral, es decir al ingerir las formas infecciosas cuando el animal rasca con su boca el lugar del cuerpo donde se depositaron las heces de los insectos, al comer alimentos contaminados con el parásito o alimentarse de insectos u otros mamíferos infectados (Jansen et al., 2017). Se ha demostrado que la vía oral es más efectiva para la transmisión de la enfermedad que la infección a través de la vía dérmica (Eickhoff et al., 2013).

Cuando la infección se produce por vía dérmica, el parásito se introduce en el tejido celular circundante a la picadura, lugar en el cual se diferencia en amastigote, multiplicándose por fisión binaria (Monteon, 2019). Al producirse la multiplicación en el músculo adyacente y en las células de la dermis, se origina un nódulo inflamatorio, el chagoma, el cual puede persistir durante varias semanas. Después de numerosas duplicaciones, los amastigotes se diferencian en tripomastigotes, que son liberados por lisis celular, alcanzando el torrente circulatorio, lo cual les permite invadir nuevos tejidos (Mehlhorn, 2016) En el hombre la localización más frecuente del parásito está en las células reticuloendoteliales del bazo, hígado, ganglios linfáticos y miocardio (Pereira & Pérez, 2003). El ciclo se completa cuando un insecto vector no parasitado se alimenta del mamífero infectado y adquiere el parásito. La transmisión del parásito también puede realizarse sin la participación del insecto vector como ocurre en los casos de transmisión transfusional, congénita, trasplante de órganos y por alimentos contaminados.

Diversidad intraespecífica: linajes en *T. cruzi*

T. cruzi presenta una gran diversidad genética y se clasifica por consenso en seis linajes o agrupaciones denominadas Unidades Discretas de Tipificación (DTU por sus siglas en inglés de *Discrete Typing Units*)(Figura 4), enumeradas desde TcI hasta TcVI (Zingales et al., 2009). Posteriormente se describió una séptima DTU, proveniente de aislados de murciélagos (Tcbat). La evidencia existente respalda la importancia de esta diversidad en términos de epidemiología y su asociación con las presentaciones clínicas y sus implicancias (Guhl, 2017a):

TcI: Es la más frecuente y ampliamente distribuida. Puede ser transmitida tanto en ciclos selváticos como domésticos. TcI está ampliamente distribuída en todo el continente americano, compatible con una evolución a largo plazo (Zingales, 2018). Se ha asociado con enfermedades cardíacas en Colombia, Argentina, Venezuela y Brasil. Este linaje está fuertemente asociado con el ecotopo arbóreo. Sus principales vectores son *Rhodnius* y *Triatoma*. Se ha demostrado gran diversidad en TcI (Llewellyn et al., 2009), confirmando la existencia de cuatro subgrupos genéticos o haplotipos (Ia, Ib, Id e Ie) (Guhl, 2017b).

TcII: Está asociado con mayor frecuencia con ciclos domésticos. TcII es tan antiguo como TcI, pero tiene una distribución geográfica más limitada. Predomina en las regiones del sur y centro de América del Sur. Es el principal causante de la enfermedad en la región este y central de Brasil. Puede causar enfermedades cardíacas y digestivas, dando lugar a megasíndromes. Se encuentra asociado al ciclo doméstico y peridoméstico, siendo rara vez aislado del ciclo silvestre. Su vector principal es *Pastrongylus* (Zingales, 2018).

TcIII: Está asociado con mayor frecuencia con ciclos selváticos, implicado como causa de brotes agudos en la cuenca del Amazonas. Se encuentra relacionado al nicho terrestre en la región del Chaco y se reportaron pocos casos de infección en Colombia. Al igual que TcIV es poco común encontrarlo en el ciclo doméstico. El principal reservorio es la mulita (*Dasyus novemcinctus*) y los vectores son de los géneros *Panstrongylus* y *Triatoma* (Zingales, 2018).

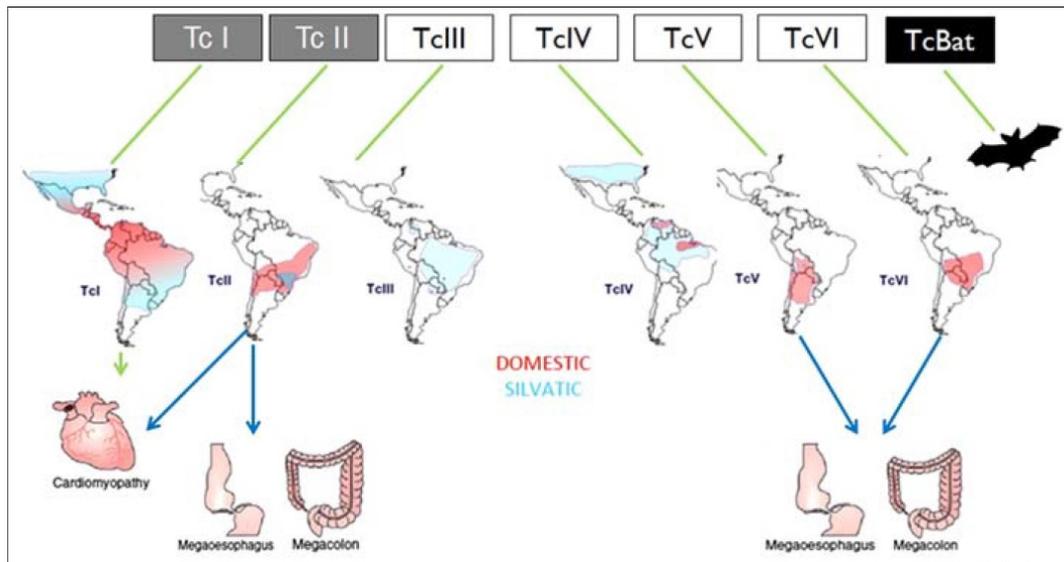


Figura 4. Distribución geográfica de las DTUs de *T. cruzi* en el continente americano.

TcIV: Se encuentra principalmente asociado con ciclos selváticos, implicado como causa de brotes agudos en la cuenca del Amazonas. Parece tener un ecotopo arbóreo y es el segundo DTU más frecuente en Venezuela. Es endémico en América del Norte junto a TcI, donde se encuentra asociado al ecotopo terrestre infectando fundamentalmente a mapaches. En América del Sur, los primates salvajes y coatíes son los principales huéspedes (Zingales, 2018).

TcV: Está asociado con mayor frecuencia con ciclos domésticos. Puede causar enfermedades cardíacas y digestivas, dando lugar a megasíndromes. Es la DTU más frecuente en Argentina, seguido de TcVI y TcI (Quebrada Palacio et al., 2018). Además es el principal causante de la enfermedad en la zona conocida como el Gran Chaco, que comprende partes de Argentina, Paraguay, Bolivia, Chile y el sur de Brasil. Su principal vector es *Triatoma infestans* (Del Puerto et al., 2010).

TcVI: Está asociado con mayor frecuencia con ciclos domésticos. Pueden causar enfermedades cardíacas y digestivas, incluso megasíndromes. Al igual que TcV, se encuentra

asociado al ciclo doméstico y peridoméstico en el cono sur de América Latina. En Argentina se lo vio asociado a la infección de perros y gatos (Cardinal et al., 2008; Enriquez et al., 2013). Varios estudios indican que TcV y TcVI muestran una diversidad intra-linaje mínima y son productos de distintos eventos de hibridación (Zingales, 2018).

Tcbat: Su nombre se originó por aislados de murciélagos del centro y sudeste de Brasil, diferenciados de las seis DTU por varios marcadores genéticos (Marcili et al., 2009). Los análisis filogenéticos apoyan a Tcbat como una DTU independiente. Esta DTU no se desarrolla en triatomíneos de laboratorio, por lo que se ha inferido como vectores potenciales a insectos de la familia Cimicidae (Zingales, 2018).

Aspectos clínicos

La enfermedad de Chagas se divide en fase aguda y fase crónica. Se considera fase aguda desde la infección hasta que la parasitemia detectada microscópicamente es negativa. Las manifestaciones inician entre 7 a 10 días desde el origen de la infección, y consisten normalmente en síntomas que se asemejan a un cuadro gripal (Tzizik & Borchardt, 2018). La fase aguda pasa desapercibida en la gran mayoría de los casos. Ocasionalmente se pueden observar lesiones cutáneas que indican el lugar de la picadura (chagoma de inoculación). En otras ocasiones se manifiesta un edema bpalpebral unilateral con conjuntivitis, conocido como signo de Romana (Hemmige et al., 2012). La muerte en la fase aguda es extremadamente rara y ocurre en pacientes inmunodeprimidos o en etapas tempranas de la vida. Esta fase puede durar hasta 2 meses (Echeverría & Morillo, 2019). La fase crónica inicia cuando la parasitemia detectada microscópicamente es negativa y las pruebas serológicas son positivas, lo que ocurre aproximadamente 1-2 meses después de la infección. En esta fase la mayor parte de los pacientes son asintomáticos. Sin embargo, un porcentaje variable de pacientes desarrollan complicaciones décadas después de la infección, predominantemente con afectación cardíaca (20-30%), digestiva (5-20%) o mixta (5-10%) (Molina et al., 2016; Echavarría et al., 2021).

Tratamiento

El tratamiento está basado en 2 medicamentos desarrollados hace más de 40 años: benznidazol (un nitroimidazol) y nifurtimox (un nitrofurano). En la fase aguda de la enfermedad ambos presentan una aceptable tasa de curación, entre el 65 y el 80% de los pacientes, llegando a tasas por encima del 95% en los casos de transmisión congénita, sin embargo, en los casos de infección crónica se consiguen tasas de curación entre el 15 y el 40% (Molina et al., 2016). Por otra parte, ambos compuestos presentan un gran número de efectos adversos, como dermatitis, hipersensibilidad, pérdida de peso, cólico intestinal, entre otros. Parestesias y

síntomas de polineuritis sistémica, obligan a suspender el tratamiento (Viotti et al., 2009). Esta toxicidad podría deberse a la dosis acumulativa y a los protocolos de tratamiento de larga duración (30-120 días) (Jackson et al., 2010; Murcia et al., 2012; Castro, 2014). Dada la baja efectividad de los tratamientos existentes se han testeado numerosos compuestos, sin embargo, sólo el alopurinol y algunos azoles se han estudiado en ensayos clínicos, estudios observacionales o casos clínicos (Sales Junior et al., 2017).

Ante este panorama y dada la eficaz actividad antimicrobiana que ha sido reportada para las nanopartículas metálicas (NPs), en la actualidad se viene promoviendo la aplicación del desarrollo nanotecnológico en la síntesis de NPs con características funcionales y biocompatibles que les confieran la capacidad para ser utilizadas en el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas en el futuro inmediato (Huh & Kwon, 2011; Zhu et al., 2014).

La actividad antimicrobiana de las NPs ha sido atribuida principalmente a su habilidad para producir especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés de *Reactive Oxygen Species*), vía la reacción de Fenton (Choi & Hu, 2008; Abdal Dayem et al., 2017). Dado que es conocido que *T. cruzi* es sensible a ROS (Paes et al., 2011), concentraciones elevadas de ROS intracelular podrían resultar en la generación de estrés oxidativo, y a partir de ello, conducir a diversas disfunciones estructurales y metabólicas, lo cual podría derivar en la muerte del parásito por apoptosis (Davies, 2000). La toxicidad intrínseca de las NPs depende de una serie de factores como lo son el tamaño, la forma, el área superficial, la carga superficial, la solubilidad y el estado de aglomeración (Ávalos et al., 2013; Coutiño et al., 2017). En relación a la toxicidad en mamíferos, estudios efectuados en ratones y ratas han demostrado que las AgNPs en circulación sanguínea se acumulan en macrófagos y se distribuyen sistémicamente llegando a diversos órganos. Si bien el órgano diana de estos nanomateriales es el hígado, también se han observado depósitos de AgNPs en riñones, cerebro, pulmones y testículos (Ávalos et al., 2013).

Síntesis biológica de NPs

La síntesis biológica ha surgido como una nueva opción para obtener materiales a escala nanométrica, debido principalmente a la creciente necesidad por utilizar métodos de síntesis más amigables con el medio ambiente. La biosíntesis involucra el empleo de microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) o extractos de plantas para lograr la reducción de iones metálicos. En comparación con el uso de microorganismos, el empleo de extractos de plantas como agentes reductores puede ser una vía más rápida para la preparación de nanopartículas (Aguilar Mendez, 2009). Los extractos acuosos vegetales permiten la biosíntesis de NPs debido a la presencia de fitocompuestos con propiedades reductoras y estabilizantes, tales como

alcaloides, polifenoles y flavonoides. Se observó una estabilidad de las AgNPs preparadas a partir de métodos biológicos de hasta más de 12 meses, verificándose el pico de absorción a la misma longitud de onda usando espectroscopía de luz ultravioleta-visible (UV-vis). En comparación con los métodos químicos tradicionales, los métodos biológicos permiten una mayor facilidad en el control de la forma, el tamaño y la distribución de las nanopartículas, además las nanopartículas producidas por esta vía son menos tóxicas para las células de mamífero. Sin embargo, a pesar de ser una técnica totalmente ecológica, la síntesis biológica todavía presenta algunas desventajas, tales como los largos tiempo de reacción y bajas escalas de producción (Mittal et al., 2013; Nazeruddin et al., 2014).

Caracterización de NPs

Las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas son importantes por su comportamiento, distribución, seguridad y eficacia. Por lo tanto, la caracterización de AgNPs es importante para evaluar los aspectos funcionales de las partículas sintetizadas. Puede realizarse utilizando una variedad de técnicas analíticas, que incluyen espectroscopía UV-Vis, dispersión dinámica de luz (DLS), microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía de fuerza atómica (AFM), entre otras (Zhang et al., 2016).

Espectroscopia de absorción de luz ultravioleta-visible

La espectroscopía UV-Vis es una técnica rápida, sencilla y aplicable a diferentes tipos de NPs. Se basa en la absorción de radiación tanto ultravioleta como visible por el analito. Las AgNPs poseen propiedades ópticas que las hacen interactuar fuertemente con longitudes de onda específicas de la luz. La espectroscopia UV-Vis es una técnica sensible a la presencia de coloides de Ag debido a que estas NPs presentan un pico de absorción intenso por la excitación de plasmones superficiales. La aparición de un pico de absorción alrededor de los 400-450 nm es un indicativo de la presencia de AgNPs. Por otra parte, el tamaño promedio de las nanopartículas estudiadas depende de la frecuencia puntual dentro de dicho rango. Por ejemplo, la presencia de un pico a 400 nm corresponde a AgNPs de menos de 5 nm de diámetro, mientras que, si el pico de absorción se desplaza a 420 nm, el tamaño predominante de las AgNPs es de alrededor de 20 nm (Sánchez Moreno, 2017).

Especies reactivas del oxígeno en sistemas biológicos

El oxígeno molecular (O_2) es esencial para la existencia de los seres vivos en la Tierra. En los organismos fotosintéticos es producido por la oxidación del agua por el complejo de ruptura del agua del fotosistema II durante la fase luminosa de la fotosíntesis (Figura 5). Por otro lado, en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (o cadena respiratoria), el oxí-

geno es el último aceptor de los electrones, al reducirse completamente en el complejo IV (citocromo oxidasa) por la adición de protones y electrones, formando agua. Acoplado a este proceso de respiración o consumo de oxígeno, las células sintetizan la mayor parte del ATP que se requiere para los diversos procesos celulares.

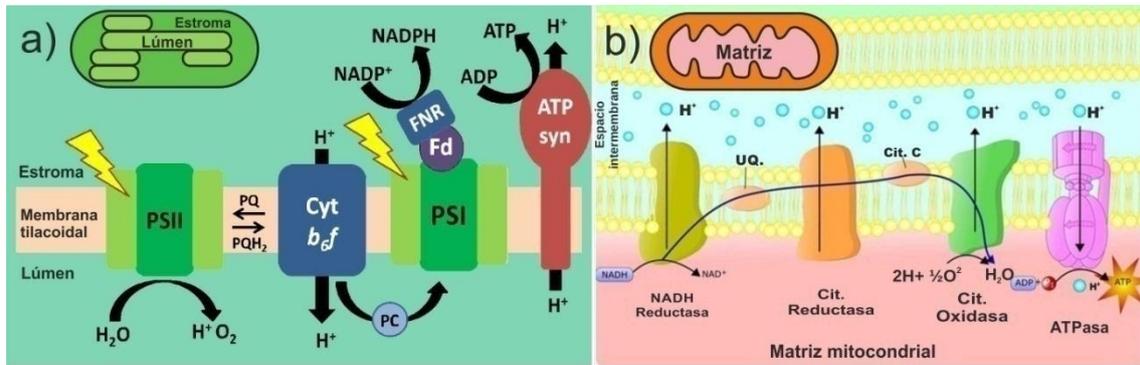


Figura 5. Rol del oxígeno en los sistemas biológicos: (a) Participación en la fotosíntesis y (b) Participación en la cadena de transporte de electrones mitocondrial.

Sin embargo, el oxígeno no sólo se requiere en la respiración; hay muchas enzimas que también lo utilizan. Además, el oxígeno juega un papel esencial en la química de los radicales libres. Un radical libre se define como cualquier especie química, atómica o molecular, capaz de existir independientemente, con uno o más electrones desapareados (Cárdenas-Rodríguez & Pedraza-Chaverri, 2006). Las ROS pueden presentarse tanto como radicales o no radicales (Tabla 3), siendo las especies radicales más reactivas que las formas no radicales. Sin embargo, algunas especies no radicales pueden actuar como precursoras de especies radicales.

Tabla 3: Especies reactivas del oxígeno.

Radicales	No radicales
Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Oxígeno singlete (1O_2)
Hidroxilo (OH^{\cdot})	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Peroxilo (RO_2^{\cdot})	Ozono (O_3)
Alcoxilo (RO^{\cdot})	Anión peroxinitrito ($ONOO^-$)
Hidroperoxilo (OH_2^{\cdot})	Anión hipocloroso ($HOCl$)
	Ácido hipobromoso ($HOBr$)

Por ejemplo, H_2O_2 es formado por la enzima superóxido dismutasa (SOD). A pesar de no ser una especie de tipo radical, posee una alta lipofilicidad, lo que le permite atravesar las membranas y reaccionar con $O_2^{\cdot-}$ en presencia de metales de transición, formando el radical OH^{\cdot} , considerado una de las especies oxidantes más dañinas.

El modo de acción que confiere actividad biocida a las AgNPs aún no se ha dilucidado por completo. Los posibles mecanismos incluyen: 1) absorción de especies solubles de Ag seguido de interrupción de la producción de ATP y la replicación del ADN; 2) daño directo a las membranas celulares por contacto con AgNPs y 3) generación de ROS mediada por AgNPs y Ag^+ , que pueden incluir los radicales $\text{O}_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , H_2O_2 y $^1\text{O}_2$, lo cual puede conducir a un colapso de la membrana y la función mitocondrial o causar daño en el ADN y desencadenar la oxidación de proteínas y procesos de peroxidación lipídica (Figura 6) (He et al., 2011).

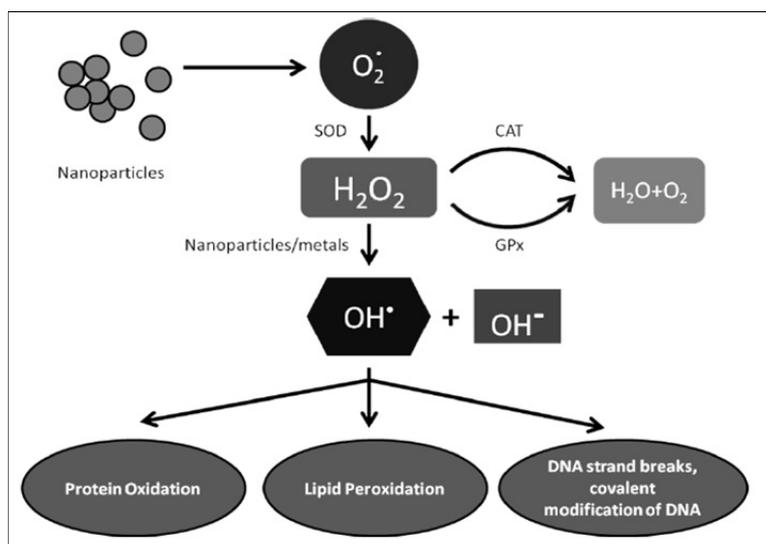


Figura 6. Mecanismos propuestos para explicar el efecto biocida de nanopartículas metálicas (Huang et al., 2010).

Detección de especies reactivas del oxígeno

Las especies reactivas presentan algunas características que las hacen difíciles de detectar, por ejemplo, su corta vida útil y la variedad de antioxidantes existentes *in vivo*, capaces de capturar estas especies reactivas. Entre los métodos para detectar ROS se encuentran los basados en quimioluminiscencia, la espectroscopía de resonancia de espín electrónico, la espectroscopía de fluorescencia o fluorimetría y los métodos espectrofotométricos (Armstrong & Whiteman, 2007). Entre estos métodos el uso de sondas fluorescentes es de gran conveniencia para la detección y cuantificación de ROS debido a su alta sensibilidad, simplicidad y resolución en técnicas de imágenes microscópicas (Gomes et al., 2005).

Sonda H_2DCFDA

La forma diacetato de la 2,7-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA) puede aplicarse en estudios celulares debido a su gran capacidad de difundir a través de la membrana celular (Figura 7). Una vez internalizadas las esterasas intracelulares escinden el H_2DCFDA en las regiones de los dos enlaces éster, produciendo un producto relativamente polar e impermeable a la membrana celular, H_2DCF . Esta molécula no fluorescente se acumula intracelularmente y la oxidación posterior produce el producto altamente fluorescente DCF. El estado redox de la muestra se puede controlar detectando el aumento de fluorescencia. La acumulación de DCF en las células puede medirse mediante un aumento de la fluorescencia a 530 nm cuando la muestra se excita a 485 nm (Eruslanov & Kusmartsev, 2010).

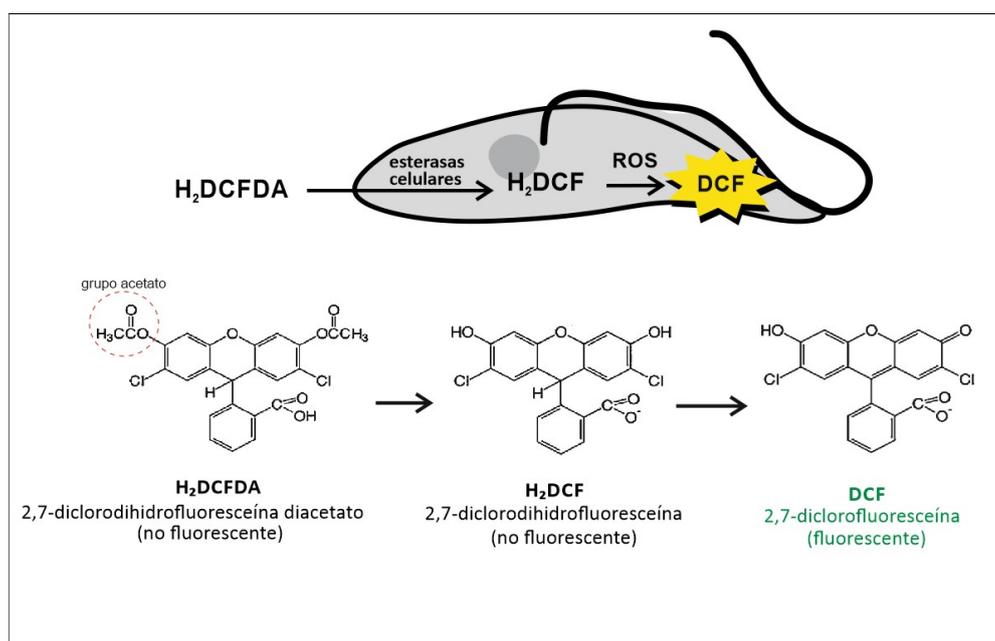


Figura 7. Mecanismo responsable de la fluorescencia intracelular mediada por H_2DCFDA

Este compuesto fue inicialmente considerado como un indicador específico para H_2O_2 , sin embargo, se demostró que H_2DCF es oxidado por diversas ROS, como los radicales HO^\bullet y ROO^\bullet , como así también por especies reactivas del nitrógeno (RNS) como NO^\bullet y $ONOO^-$. La presencia de peroxidasas celulares es importante para la oxidación de H_2DCF a DCF por H_2O_2 . Adicionalmente DCF puede sufrir fotorreducción ya sea en presencia de luz visible o UV-A, lo que conduce a un aumento artificial de la oxidación de H_2DCF y, en consecuencia, a una amplificación de la fluorescencia de DCF.

Debido a la existencia de varias sustancias que interfieren con la formación de DCF, esta sonda tiene un mejor uso como marcador del estrés oxidativo celular que como indicador de la formación de H_2O_2 u otras ROS (Gomes et al., 2005).

Concentración efectiva e inhibitoria media

Se define como concentración efectiva media, abreviada como EC_{50} , a la concentración molar de una sustancia que produce el 50% del efecto máximo posible. Es decir, es la concentración de un fármaco que provoca una respuesta a medio camino entre la línea de base y la respuesta máxima aplicable a curvas de dosis-respuesta con pendiente ascendente. Por otro lado, se conoce como concentración inhibitoria media, expresada como IC_{50} , a la concentración molar de una sustancia que reduce la variable respuesta en un 50% en curvas de dosis-respuesta de pendiente descendente (GraphPad, 2020).

Pruebas de toxicidad: Test de captación del rojo neutro

Los estudios de citotoxicidad *in vitro* son útiles y necesarios para la realización de ensayos clínicos de una sustancia dada. La implementación de estos métodos, en contraposición con los estudios *in vivo*, evita el uso innecesario de animales de experimentación, son técnicas de rápida realización y de menor costo. Dentro de los ensayos de citotoxicidad más conocidos y ya validados se encuentran el ensayo de captación del rojo neutro, el ensayo de enlazamiento al azul de kenacid y el ensayo con sales de tetrazolio (MTT).

El test de captación del rojo neutro es un ensayo capaz de medir la toxicidad de un compuesto a corto o largo plazo, determinado por la liberación del colorante rojo neutro (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina clorhidrato) debido a la pérdida de la viabilidad celular (Arrebola et al., 2003). El método se basa en la capacidad de las células viables para incorporar y unir el colorante supravital rojo neutro (Borenfreund & Puerner, 1985) (Figura 8). Este tinte débilmente catiónico penetra en las membranas celulares por difusión pasiva y se concentra en los lisosomas, donde se une mediante enlaces hidrofóbicos a grupos aniónicos y/o fosfatos de la matriz lisosómica. Luego, el tinte se extrae de las células viables usando una solución de etanol acidificada, y la absorbancia del tinte solubilizado se cuantifica usando un espectrofotómetro (Repetto et al., 2008). El grado de inhibición del crecimiento relacionado con la concentración del compuesto que se evalúa constituye un índice de toxicidad (Arrebola et al., 2003).

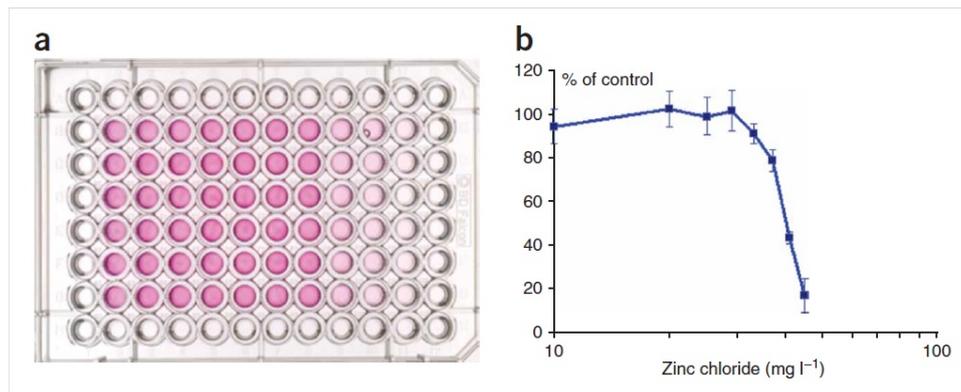


Figura 8. Ensayo de rojo neutro: a) Típica imagen de una placa de 96 pocillos al final del ensayo. Los pocillos de coloración más intensa corresponden a las concentraciones menores de la sustancia testeada. b) Gráfico de concentración de compuesto testeado *versus* absorbancia (Repetto et al., 2008).

OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar el efecto de nanopartículas de plata (AgNPs) biosintetizadas a partir de extractos acuosos vegetales, sobre el crecimiento y viabilidad de las formas celulares de *T. cruzi* (epimastigote y tripomastigote) pertenecientes a la cepa Y (TcII), para evaluar si las AgNPs obtenidas mediante esta vía afectan significativamente la viabilidad celular parasitaria.

Objetivos Específicos

- Evaluar los efectos citotóxicos de las NPs sobre células de mamíferos.
- Evaluar el efecto de inhibición de las NPs sintetizadas con extractos acuosos vegetales, sobre las formas celulares epimastigote y tripomastigote.
- Calcular la concentración inhibitoria del 50% del crecimiento parasitario (IC₅₀) y la concentración efectiva media (EC₅₀) de las NPs utilizadas.
- Determinar la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en *T. cruzi* producidas por efecto de la exposición a AgNPs.

HIPÓTESIS Y PREDICCIONES

Hipótesis H₁: AgNPs producidas mediante síntesis biológica a partir de *C. intybus* tienen un efecto tripanocida sobre epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* (cepa Y).

Predicción: Habrá una menor cantidad de parásitos en aquellos cultivos expuestos a AgNPs biosintetizadas en comparación con parásitos no expuestos.

Hipótesis H₂: El efecto tripanocida producido por exposición a AgNPs es traducido como un aumento en la cantidad de ROS intracelular en *T. cruzi*.

Predicción: La cantidad de ROS correspondiente a células expuestas a AgNPs será mayor que en aquellas células no expuestas a las mismas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Formas evolutivas del parásito y procedencia

Se utilizaron epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*, pertenecientes a la cepa Y, obtenida por primera vez en el año 1953, de un paciente oriundo de la región de São Paulo; Brasil. Esta cepa corresponde al linaje Tc II (Zingales et al., 2009; Amato Neto, 2010).

Obtención de tripomastigotes

Los tripomastigotes fueron obtenidos de manera directa de la sangre de ratón infectado con la cepa Y, entre los 15 y 21 días posteriores a la infección, tiempo en que se produce la mayor densidad de parásitos en circulación.

Obtención de epimastigotes

El cultivo de epimastigotes se realizó a partir de tripomastigotes obtenidos de ratones infectados a los 15-21 días mediante punción cardíaca, extrayéndose un volumen de 1mL de sangre infectada, que posteriormente se sometió a centrifugación.

Los tripomastigotes extraídos fueron cultivados en medio Diamond (NaCl 0,1 M, K₂HPO₄ 0,05 M, pH 7,2, triptosa 0,625%, triptona 0,625%, extracto de levadura 0,625%, hemina 12,5 µg/mL) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFB) a 29°C.

Obtención de la muestra de sangre

El procedimiento de extracción de sangre intracardíaca de ratones se realizó con isoflurano USP (Baxter). Con el animal en plano anestésico se lo colocó en posición decúbito dorsal para realizar la punción, mediante la cual se extrajo una muestra de aproximadamente 1mL de sangre. La eutanasia del animal se realizó exponiéndolo nuevamente a isoflurano al 5%.

Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata (AgNPs)

Las AgNPs fueron biosintetizadas a partir de la reducción química del precursor metálico AgNO_3 , empleando agentes reductores y estabilizantes provenientes de un extracto acuoso de *Cichorium intybus* (achicoria). Procedimiento: Se hirvió durante 5 min un total de 5 g de materia vegetal fresca en 100 mL de agua destilada. Luego se llevó a cabo el filtrado para separar los remanentes sólidos. Se incorporaron 2,5 mL de extracto filtrado en una solución de AgNO_3 1mM a 75°C. La síntesis se realizó en agitación durante 10 minutos a temperatura constante.

La solución coloidal obtenida se caracterizó mediante espectroscopía UV-Vis para corroborar la formación de AgNPs, como así también para determinar la concentración y el tamaño promedio de las mismas.

Test de citotoxicidad

Se realizó mediante el método de captación del rojo neutro (Borenfreund & Puerner, 1985; Borenfreund & Shopsis, 1985) sobre la línea celular Vero C176 evaluando las siguientes muestras:

- 1) Solución de AgNO_3 1mM.
- 2) Extracto acuoso de *C. intybus* (5 g/100 mL H_2O) obtenido por decocción.
- 3) Suspensión coloidal de AgNPs biosintetizadas (100 pM) empleando el extracto de *C. intybus*.

A partir de cada una de las muestras se realizaron diluciones 1/10 en Medio Esencial Mínimo (10% SFB y 0,3 g/L glutamina), colocándose por triplicado en monocapas confluentes de células Vero C176 crecidas en placas de 96 pocillos. A partir de allí se hicieron:

-23 diluciones (factor 2/3) para la muestra 1.

-15 diluciones seriadas (factor 2/3) para las muestras 2 y 3.

Se incubó durante 72 h a 37°C y 5% de CO_2 . Posteriormente se realizó la observación de la monocapa celular a las 24 h y 48 h. A las 72 h se midió la viabilidad celular correspondiente a testigos, controles y muestras mediante la técnica de captación del rojo neutro. La lectura se hizo mediante espectrofotometría.

Efecto sobre cultivo de epimastigotes

La actividad antiproliferativa contra las formas epimastigotes se realizó incubando una placa de 96 pocillos con 3×10^6 parásitos/mL con las AgNPs a ser estudiadas, generando 15 diluciones seriadas con factor de dilución 5/6 a partir del valor de máxima concentración no citotóxica (MCNC) obtenido en el test de citotoxicidad. Cada pocillo se llenó con 150 μL de la

suspensión conteniendo los parásitos, medio Diamond, 10% de SFB y las NPs a ser testeadas. Se realizaron los grupos controles correspondientes:

- a) Medio Diamond con epimastigotes
- b) Medio Diamond con epimastigotes y extracto de achicoria
- c) Medio Diamond con epimastigotes en presencia de AgNO_3 0,1 mM.

Las placas se incubaron a 29°C por 96 h en una estufa de cultivo.

Se realizó recuento celular mediante microscopía óptica con un n=25 campos para cada concentración evaluada. El experimento se realizó por triplicado.

Efecto sobre tripomastigotes sanguíneos

Para evaluar el efecto tripanocida sobre la forma celular tripomastigote se realizó el ensayo de inhibición de motilidad llevado a cabo por Paglini-Oliva et al. (1998). Las mediciones fueron realizadas sobre sangre de ratón infectado (1mL) con la cepa Y (15 días post infección) mediante punción cardíaca. Se realizó un recuento por microscopía óptica a 400X de formas móviles del parásito en 10 campos a t=0 min (control) y luego del agregado de las AgNPs, disueltas en medio Diamond, a diferentes concentraciones por triplicado y a diferentes tiempos de incubación (t=10, 20, 30, 40 y 120 min). Posteriormente a t=120 min, se determinó, a partir del porcentaje de inhibición, la concentración efectiva media (EC_{50}). Para verificar si los parásitos inmóviles estaban muertos, se tiñó con eosina al 0,1%. Sólo los parásitos muertos fueron coloreados. Se realizaron los controles correspondientes.

Detección de especies reactivas del oxígeno

La generación de ROS en la forma celular epimastigote de *T. cruzi* de la cepa Y tratada con AgNPs se cuantificó por técnicas espectrofluorométricas mediante la utilización de la sonda fluorescente H_2DCFDA . Para la medición de ROS se realizó el siguiente esquema de tratamiento:

1. Epimastigotes en medio Diamond incubados con H_2DCFDA 10 μM .
2. Epimastigotes en medio Diamond incubados con el extracto acuoso de achicoria y H_2DCFDA 10 μM .
3. Epimastigotes en medio Diamond en presencia de AgNO_3 0,1 mM y H_2DCFDA 10 μM .
4. Epimastigotes en presencia de IC_{20} , IC_{50} e IC_{90} de AgNPs H_2DCFDA 10 μM .

En todos los casos se utilizó una concentración de 3×10^6 epimastigotes/mL, que fueron incubados a 29 °C durante 30 min en oscuridad. Pasado este lapso se procedió a la medición de la fluorescencia. La medición se realizó utilizando un lector de placas con una longitud de excitación de 480 nm y longitud de emisión de 520 nm.

Microscopía de fluorescencia

Se utilizó microscopía de fluorescencia para monitorear la generación de ROS intracelular. El microscopio utilizado fue el modelo NIKON TE-2000U, con las siguientes longitudes de onda de trabajo: longitud de excitación, 490 nm; longitud de emisión, 519 nm. Transcurrido el tiempo de incubación con H₂DCFDA, se tomó una alícuota de 50 µL y se colocó sobre un portaobjetos. Inmediatamente se observó la fluorescencia emitida a partir de cada uno de los tratamientos.

Análisis de los resultados

Test de citotoxicidad: Los resultados fueron presentados como porcentaje de viabilidad celular. Se determinó la máxima concentración no citotóxica (MCNC) de AgNPs y AgNO₃.

Ensayo sobre epimastigotes: Se calcularon la IC₂₀, IC₅₀ e IC₉₀ mediante análisis de regresión. Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés de *ANalysis Of VAriance*) y test de comparaciones múltiples (test de Fisher) para comparar los datos de recuento celular, verificando previamente la distribución normal de los datos y la homogeneidad de las varianzas. Se consideraron diferencias significativas con un valor de $p < 0,05$. Los datos de fluorescencia se presentaron como porcentaje mediante gráfico de barras.

Ensayo sobre tripomastigotes: Se determinó el porcentaje de supervivencia parasitaria, tomando como valor máximo el correspondiente al grupo control. Se calculó la EC₅₀ mediante análisis de regresión. Se realizaron ANOVA y test de comparaciones múltiples (test de Fisher) para comparar los datos de recuento celular, verificando previamente la distribución normal de los datos y la homogeneidad de las varianzas.

Se utilizaron los programas estadísticos InfoStat versión 2020 (Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) (Di Rienzo et al., 2020) y GraphPad Prism versión 8.0.0 (GraphPad Software, San Diego, California USA) (GraphPad, 2020).

RESULTADOS

Síntesis de AgNPs

La síntesis a partir del extracto de *C. intybus* se produjo de manera exitosa, dando lugar a un espectrograma de UV-Vis característico (Figura 9), presentando una absorbancia máxima en un valor de longitud aproximado de 440 nanómetros ($\lambda_{\max} \approx 440$ nm), lo cual es indicativo de la presencia de AgNPs en solución. El coeficiente de extinción molar o absorptividad molar (ϵ) fue de $880 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \times 10^8$; la absorbancia de 0,2 y el paso óptico utilizado 0,1 cm. Estos parámetros permitieron calcular la concentración mediante la utilización de la ley de Beer-Lambert. El tamaño promedio luego de la caracterización fue de 67 nm y la concentración de 23 pM.

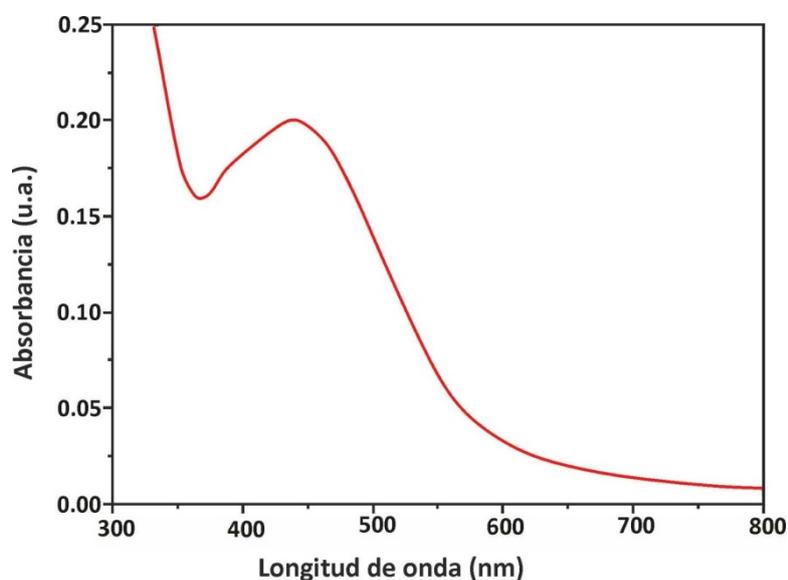


Figura 9. Espectro de absorción UV-Vis de AgNPs obtenido a partir de AgNO_3 y extracto de *C. intybus*. Se produjo una absorbancia máxima (0,20 u.a.) en un valor de longitud aproximado de 440 nanómetros ($\lambda_{\max} \approx 440$ nm).

Ensayo de citotoxicidad

El ensayo de captación del rojo neutro realizado sobre la línea celular VERO C176 arrojó un valor de MCNC para AgNO_3 de 0,0007 mM (700 pM) y de 3 pM para las AgNPs sintetizadas (Figuras 10 y 11). Concentraciones mayores a 700 pM y 3 pM de AgNO_3 y AgNPs respectivamente, comenzaban a interferir con el sistema celular provocando alteraciones morfológicas visibles al microscopio óptico. Por otro lado el extracto de *C. intybus* en ningún caso reportó una viabilidad inferior al 90% en el rango de diluciones estudiadas, razón por la cual se lo considera como no citotóxico.

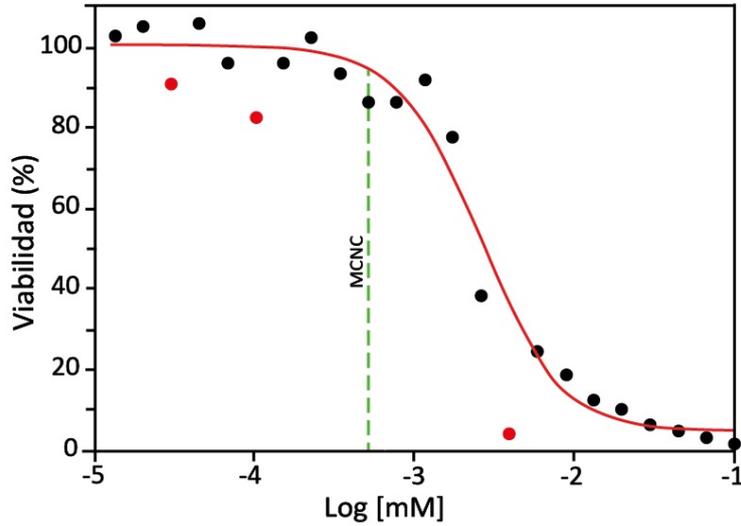


Figura 10. Citotoxicidad de AgNO_3 sobre la línea celular VERO. La máxima concentración no citotóxica (MCNC) fue de 0,0007 mM (700 pM). El coeficiente de determinación obtenido fue de 0,977 ($R^2=0,977$).

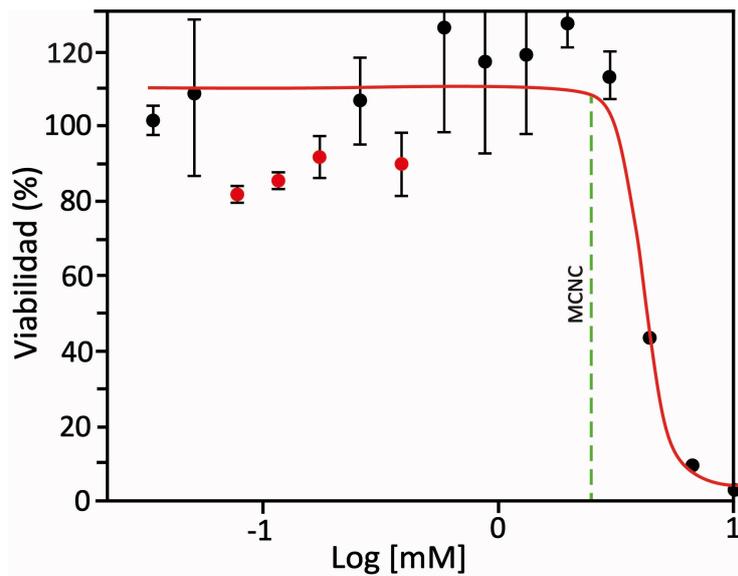


Figura 11. Toxicidad de AgNPs sobre la línea celular VERO. La máxima concentración no citotóxica (MCNC) fue de 3 pM. El coeficiente de determinación obtenido fue de 0,98 ($R^2=0,98$).

Efecto en cultivo de epimastigotes

El ensayo sobre el cultivo de epimastigotes arrojó un valor de $\text{IC}_{50}=1,153$ pM para AgNPs a las 96 h de tratamiento (Figura 12), siendo la MCNC (3 pM) letal para el 100% de los parásitos. Las células presentaron daño evidente al microscopio óptico, perdiendo totalmente la movilidad y mostrando alteración de la forma y tamaño. El tratamiento con AgNO_3

presentó una viabilidad igual a cero. Los valores correspondientes a las concentraciones inhibitorias 20 y 90 fueron las siguientes: $IC_{20}=0,854$ pM e $IC_{90}=1,852$ pM.

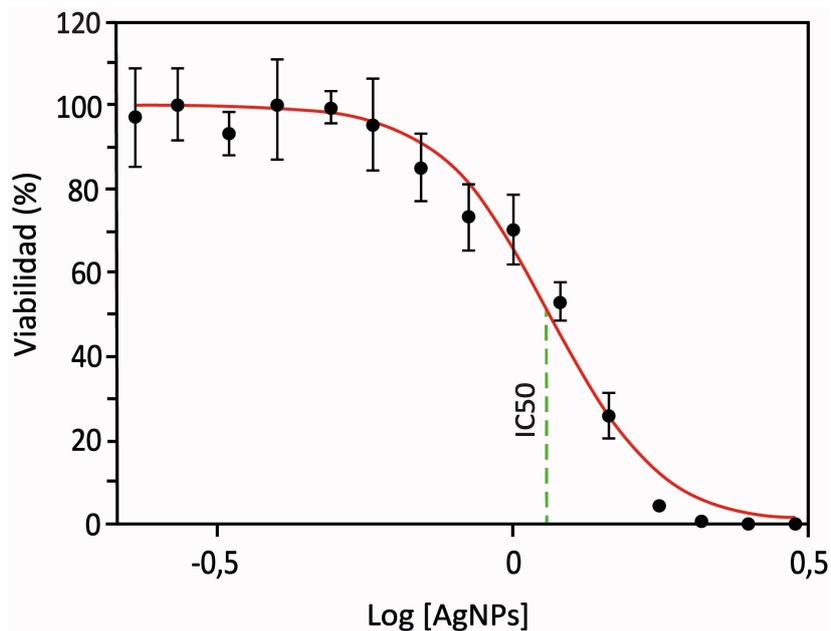


Figura 12. Toxicidad de AgNPs sobre cultivo celular de epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi* a las 96 h de tratamiento, la IC_{50} obtenida fue de 1,153 pM ($R^2=0,9657$).

Recuento celular en epimastigotes

El recuento celular en la forma epimastigote arrojó los siguientes valores, expresados como la media del número de células por campo más el desvío estándar (Figura 13):

Epimastigotes en presencia de extracto de *C. intybus*: $9,99 \pm 2,52$; epimastigotes en medio Diamond: $10,29 \pm 2,75$; epimastigotes en presencia de $AgNO_3$ 0,1 mM: $0,00 \pm 0,00$; epimastigotes en presencia de AgNPs 0,85 pM (IC_{20}): $9,20 \pm 2,69$; epimastigotes en presencia de AgNPs 1,15 pM (IC_{50}): $4,99 \pm 2,57$ y epimastigotes en presencia de AgNPs 1,85 pM (IC_{90}): $1,26 \pm 1,63$.

Para el análisis estadístico se excluyeron los datos correspondientes a epimastigotes en $AgNO_3$ 0,1 mM y epimastigotes en AgNPs 1,85 pM (IC_{90}), dado que no cumplían con los criterios de homogeneidad de varianzas (evaluado mediante el Test de Levene) y normalidad de los datos (Test de Kolmogorov) (ver Anexo I). Los tratamientos restantes arrojaron diferencias significativas con un valor de $p < 0,05$.

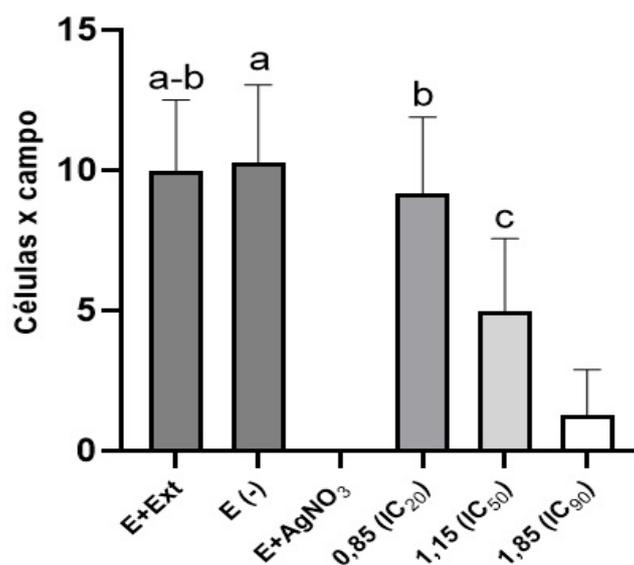


Figura 13. Recuento celular en epimastigotes de la cepa Y a las 96 h. Los valores de IC₂₀, IC₅₀ e IC₉₀ corresponden a concentraciones de AgNPs expresadas en picomolar (pM). E+Ext: epimastigotes y extracto de *C. intybus*; E (-): epimastigotes sin tratamiento; E+AgNO₃, epimastigotes en presencia de nitrato de plata 0,1 mM. Las diferentes letras (a, a-b, b, y c) indican diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

Detección de especies reactivas del oxígeno en la forma epimastigote

La determinación de ROS mediante H₂DCFDA arrojó los siguientes valores, expresados como la media del porcentaje de fluorescencia más el desvío estándar (Figura 14):

Epimastigotes en presencia de extracto de *C. intybus*: $15,18 \pm 1,2$; epimastigotes en medio Diamond: $22,01 \pm 4,73$; Epimastigotes en presencia de AgNO₃ 0,1 mM: $87,30 \pm 2,73$; epimastigotes en presencia de AgNPs 0,85 pM (IC₂₀): $82,82 \pm 24,28$; epimastigotes en presencia de AgNPs 1,15 pM (IC₅₀): $50,74 \pm 6,84$ y epimastigotes en presencia de AgNPs 1,85 pM (IC₉₀): $70,28 \pm 16,49$.

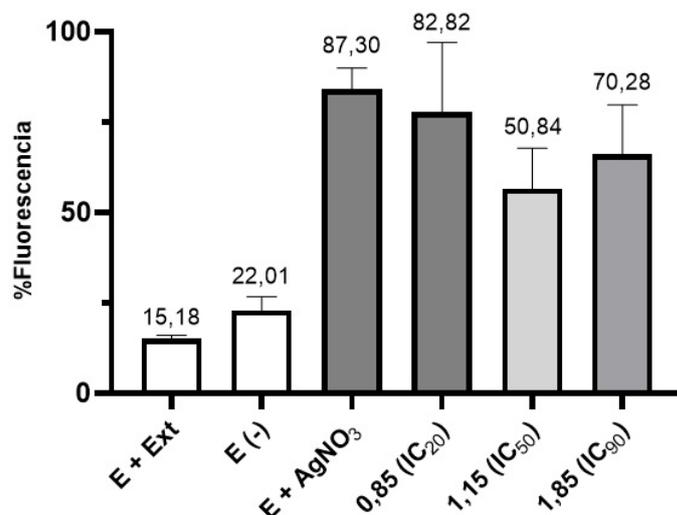


Figura 14. Porcentaje de fluorescencia de H₂DCFDA medida en epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi* a las 96 h. Los valores de IC₂₀, IC₅₀ e IC₉₀ corresponden a concentraciones de AgNPs expresadas en picomolar (pM). E+Ext: epimastigotes y extracto de *C. intybus*; E (-): epimastigotes sin tratamiento; E+AgNO₃, epimastigotes en presencia de nitrato de plata 0,1mM.

Efecto en la forma celular tripomastigote

El ensayo sobre la forma tripomastigotes (cepa Y) no produjo una inhibición total en rangos menores a la MCNC (Tabla 4), sin embargo a tiempos de incubación mayores se presentó gradualmente menor supervivencia, llegando a obtenerse un porcentaje de supervivencia de 39,04% a los 120 min de exposición. Mediante análisis de regresión se calculó una concentración efectiva media (EC₅₀) de 2,58 pM (Figura 15).

Tabla 4. Efecto de AgNPs sobre tripomastigotes de la cepa Y de *T. cruzi* en sangre de ratón a diferentes tiempos de incubación. Número de experimentos: 10 para cada grupo. Los resultados están expresados como porcentaje de supervivencia (media más desvío estándar).

tiempo incubación (min)	0pM	2,08pM	2,5pM	3pM
10	100	100 ± 7,51	100 ± 9,20	100 ± 38,14
20	100	100 ± 16,77	89,32 ± 2,49	63,48 ± 24,56
30	100	75,00 ± 19,20	84,55 ± 7,74	75,84 ± 2,94
40	100	80,89 ± 10,97	85,67 ± 13,10	77,53 ± 1,09
120	100	72,47 ± 16,40	58,71 ± 12,21	39,04 ± 3,28

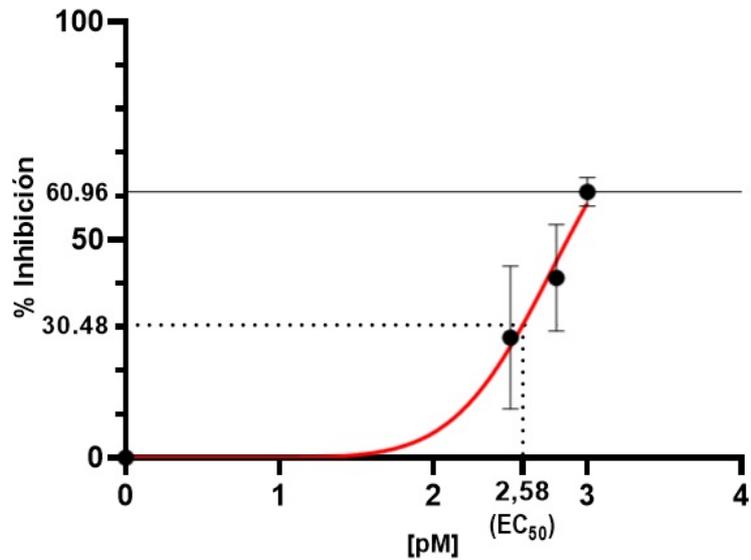


Figura 15. Curva de inhibición de motilidad en la forma tripomastigote. La concentración efectiva media (EC₅₀) obtenida para AgNPs fue 2,58 pM en tripomastigotes de *T. cruzi* a los 120 min de exposición ($R^2= 0,98$).

Recuento celular en tripomastigotes

El recuento celular en la forma tripomastigote arrojó los siguientes valores, expresados como la media del número de células por campo más el desvío estándar (Figura 16):

Tripomastigotes en ausencia de tratamiento: $11,87 \pm 5,22$; tripomastigotes en presencia de AgNPs 2,08 pM: $8,60 \pm 5,06$; tripomastigotes en presencia de AgNPs 2,5 pM: $6,97 \pm 4,13$; tripomastigotes en presencia de AgNPs 3 pM (MCNC): $4,63 \pm 3,24$. Los tratamientos arrojaron diferencias significativas con un valor de $P < 0,05$.

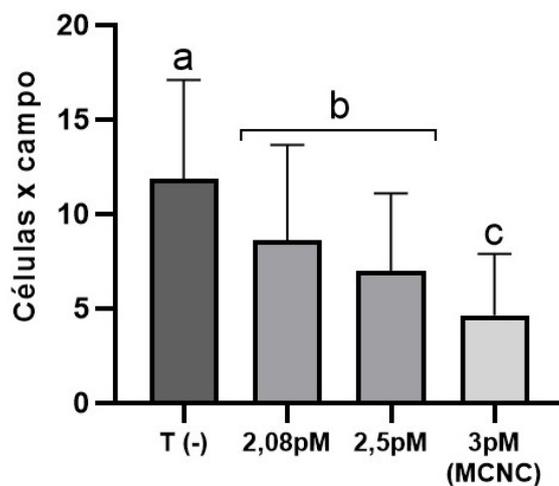


Figura 16. Recuento celular en tripomastigotes sanguíneos de la cepa Y a los 120 minutos de exposición a AgNPs. Los valores corresponden a concentraciones expresadas en picomolar

(pM). Las diferentes letras (a, b, y c) indican diferencia significativa ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

Microscopía de fluorescencia

Las imágenes de fluorescencia sobre la forma epimastigote mostraron un nivel de intensidad alto y daño celular evidente en los tratamientos correspondientes a la IC_{50} y a los parásitos tratados con $AgNO_3$ 0,1 mM, mientras que los tratamientos de parásitos en extracto de *C. intybus* y parásitos cultivados en medio Diamond mostraron bajos niveles de fluorescencia (Figura 17).

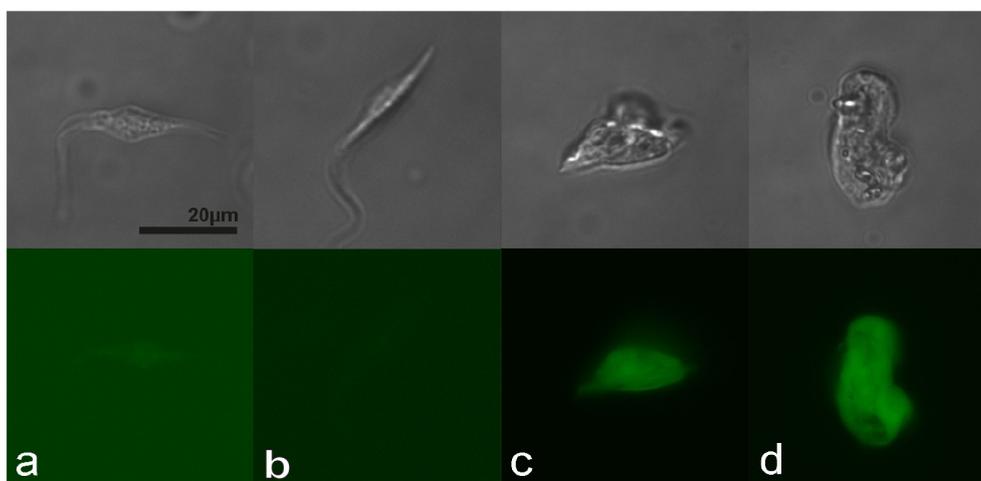


Figura 17. Microscopía de fluorescencia de epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi* a las 96 h. Referencias: a) Grupo control epimastigotes sin tratamiento; b) Grupo control epimastigotes en presencia de extracto de *C. intybus*; c) Grupo control epimastigotes en presencia de $AgNO_3$ 0,1 mM y d) Tratamiento con AgNPs 1,153pM (IC_{50}).

DISCUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos se logró confirmar la hipótesis de trabajo H_1 acerca de la existencia de un efecto tripanocida mediado por acción de AgNPs, ya que en la forma epimastigote el ANOVA y el posterior test de comparaciones múltiples LSD Fisher para los datos de conteo parasitario arrojaron diferencias significativas entre los tratamientos de epimastigotes en medio Diamond y epimastigotes expuestos a la concentración inhibitoria media de AgNPs. Lo mismo sucedió con la MCNC de AgNPs en la forma tripomastigote en comparación con aquellos parásitos no tratados, de tal manera que se cumplió con la predicción propuesta. Si bien en la forma epimastigote no fue posible la comparación de todos los tratamientos en conjunto dadas las características de heterocedasticidad y ausencia de distribución nor-

mal de los datos para algunos de los grupos en estudio, es interesante destacar el hecho que la MCNC de AgNPs para las células de mamífero logró reducir la viabilidad al 100% en la forma parasitaria epimastigote.

Por otra parte, si bien la hipótesis H₂ sobre la existencia de una producción intracelular de ROS como resultado de la exposición a AgNPs no se logró confirmar con rigor estadístico dada la naturaleza del diseño y la metodología utilizada, tanto las gráficas de barras como las imágenes mediante microscopía de fluorescencia mostraron un aumento en la intensidad para los tratamientos con AgNO₃ 0,1 mM y AgNPs en la concentración inhibitoria 50 para la forma epimastigote. Una metodología alternativa al procedimiento realizado en el presente trabajo sería la utilización de citometría de flujo ya que mediante la misma se puede realizar un conteo célula por célula de la población en estudio arrojando información muy precisa acerca del estrés oxidativo (Eruslanov & Kusmartsev, 2010).

La efectividad de AgNPs difirió entre las formas tripomastigote y epimastigote en *T. cruzi*, esto podría ser debido a una resistencia diferencial de la forma tripomastigote al tratamiento o a una variación de la actividad de AgNPs en el medio de cultivo con respecto al tejido sanguíneo. Con relación a la variabilidad de la resistencia entre las formas celulares, por ejemplo, se conoce que la forma tripomastigote es más resistente a la acción mediada por la vía del complemento, que actúa contra los tripomastigotes metacíclicos durante la infección en el hospedador definitivo (Lidani et al., 2017). Además, se ha documentado un aumento de las enzimas con función antioxidante en la forma tripomastigote luego de la diferenciación celular a partir del epimastigote no infectivo como un mecanismo para hacer frente al daño oxidativo al cual es expuesto, lo que le otorgaría una resistencia adicional (Paes et al., 2011).

La caracterización mediante espectroscopía UV-Vis de las AgNPs fue útil para poder determinar las cualidades principales del producto utilizado. Esta caracterización puede ser más informativa si se incorporan análisis como la microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM), mediante las cuales se pueden observar detalles como la forma de las partículas y el nivel de aglomeración de la muestra (Mourdikoudis et al., 2018).

Con respecto al ensayo de citotoxicidad, el resultado para AgNO₃ arrojó un valor de MCNC mucho mayor que el correspondiente al realizado con AgNPs, esto es de utilidad ya que al observar el daño celular causado por AgNPs, puede descartarse que este efecto sea principalmente debido a la presencia de iones Ag⁺ en solución, provenientes de alguna fracción de nitrato de plata residual disuelta, cuando se trabaja a una concentración tan pequeña como 3 pM en comparación a los 700 pM que empiezan a ser citotóxicos en la línea celular VERO. En otras palabras los resultados muestran que las AgNPs son 233 veces más citotóxicas que AgNO₃. Es importante tener en cuenta que la respuesta por parte de las células de mamífero frente a pequeñas variaciones de AgNPs es alta, ya que si bien a 3 pM no se presen-

ta toxicidad, en un valor de 4,4 pM la viabilidad se vió reducida al 40%. En el cuerpo humano, por ejemplo la biocompatibilidad de estas partículas en el tejido sanguíneo es dependiente de la concentración. De esta manera concentraciones del orden de los $\mu\text{g/mL}$ pueden afectar a los procesos de coagulación y de proliferación de linfocitos y causar hemólisis (Huang et al., 2016).

El ensayo mediante la sonda fluorescente H_2DCFDA , no tuvo una tendencia clara de aumento en la intensidad al aumentar la concentración de AgNPs, sin embargo, todos los tratamientos con nanopartículas mostraban intensidad mayor con respecto a los tratamientos con extracto y medio Diamond únicamente. En ausencia de AgNPs se presentó un nivel de fluorescencia bajo o basal, que podría estar relacionado con una generación de radicales debido a las condiciones propias del cultivo celular, que constituyen de por sí un agente estresor (Armstrong & Whiteman, 2007).

Con relación a los valores obtenidos de concentración inhibitoria y concentración efectiva, en el caso de la EC_{50} para la forma tripomastigote es importante entender que la estimación se hizo en el rango de concentraciones que el estudio de citotoxicidad permitió utilizar. Dentro de este rango no fue posible delimitar una meseta para la curva obtenida en este caso, razón por la cual no se logró conocer el efecto máximo que tendrían las AgNPs en esta forma celular y, dado que la EC_{50} se define como la concentración molar que produce la mitad del efecto máximo, se debió tomar como punto de mayor efecto al valor en el umbral de la MCNC. En contraposición a esto, sí fue posible definir con claridad una curva de dosis-respuesta para el caso de la forma epimastigote, por esto el valor de IC_{50} obtenido en epimastigotes posee un buen nivel de confiabilidad.

Esta investigación debe considerarse como una primera aproximación acerca del efecto de AgNPs sobre *T. cruzi*, ya que también es requerido evaluar el tratamiento sobre la forma celular amastigote, que se presenta de manera intracelular y es la principal responsable del daño producido por la enfermedad de Chagas en el hospedador definitivo (Batista et al., 2018; Ceole et al., 2018). En un estudio previo sobre el efecto de AgNPs en la especie *Trypanosoma brucei* (Adeyemi et al., 2018) la IC_{50} obtenida fue más alta que la obtenida en el presente trabajo, lo cual hace prometedor el resultado de este estudio, dado que las concentraciones que se usaron fueron más bajas, y mostraron efectividad.

Sería de interés la realización de ensayos complementarios a partir de otras especies vegetales que produzcan NPs de menor tamaño puesto que se sabe que son más efectivas a menor tamaño, debido a un aumento del área superficial de contacto con la membrana parasitaria (Mittal et al., 2013). En relación a la conveniencia de usar nanopartículas obtenidas mediante síntesis a partir de extractos vegetales frente a aquellas obtenidas por síntesis química, un estudio en bacterias mostró efectividad similar en ambos casos (Selvapriya & Deepa, 2017), o

incluso mayor efectividad en nanopartículas de síntesis vegetal (Ramírez Aguirre et al., 2020), lo cual se cree que es debido a la estabilidad de las nanopartículas por la presencia de fitocompuestos. En este trabajo no se evaluó el efecto de nanopartículas de otros metales de transición, por ejemplo, nanopartículas de oro (AuNPs), si bien ensayos realizados con nanopartículas de oro recubiertas con ácido tánico (AuNPs-TA), un agente reductor y estabilizador, mostraron una efectividad limitada sobre *Leishmania amazonensis*, parásito filogenéticamente emparentado con *T. cruzi* (Lopes et al., 2018).

Se ha reportado que tanto cepas como genotipos (o DTUs) de *T. cruzi* pueden presentar variabilidad de respuestas al tratamiento, mostrando cierto grado de resistencia o susceptibilidad (Filardi & Brener, 1984; Quebrada Palacio et al., 2018; Revollo et al., 2019). En este estudio se utilizó la cepa Y (perteneciente al linaje TcII), la misma es considerada como moderadamente resistente frente al tratamiento con benznidazol (Batista et al., 2010). En un futuro se deberían realizar análisis con respecto a la efectividad del tratamiento con AgNPs sobre parásitos pertenecientes a diferentes cepas y DTUs, sobre todo aquellas con mayor prevalencia en Argentina tales como los genotipos V y VI (Cura et al., 2012).

Los resultados expuestos en este trabajo permiten proponer al campo de la síntesis natural de nanopartículas y la nanotecnología en general como un área potencial para la búsqueda de tratamientos frente a la enfermedad de Chagas y otras enfermedades parasitarias emparentadas, ya que es un área poco explotada dado que la investigación reciente con NPs en el ámbito de la salud ha estado focalizada en estos productos principalmente por su actividad como agentes antibacterianos, antifúngicos y anticancerígenos.

CONCLUSIONES

- Las AgNPs fueron citotóxicas en la línea celular Vero C176 a partir de la concentración 3 pM (máxima concentración no citotóxica).
- El extracto acuoso de *Cichorium intybus* no mostró citotoxicidad, por lo cual se lo consideró inocuo.
- Las AgNPs provenientes de la síntesis a partir de extractos de *C. intybus* fueron efectivas significativamente contra las formas parasitarias epimastigote y tripomastigote de la cepa Y de *T. cruzi* (TcII). La concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) fue de 1,153 pM en

epimastigotes y la concentración efectiva 50 (EC₅₀) de 2,58 pM en la forma tripomastigote.

- Se observó la presencia de daño oxidativo causado por especies reactivas del oxígeno (ROS) en epimastigotes de la cepa Y expuestos a la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de AgNPs.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdal Dayem, A., Hossain, M. K., Lee, S. Bin, Kim, K., Saha, S. K., Yang, G. M., Choi, H. Y., & Cho, S. G. (2017). The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms18010120>
- Adeyemi, O. S., Molefe, N. I., Awakan, O. J., Nwonuma, C. O., Alejlowo, O. O., Olaolu, T., Maimako, R. F., Suganuma, K., Han, Y., & Kato, K. (2018). Metal nanoparticles restrict the growth of protozoan parasites. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 46(sup3), S86–S94. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1489267>
- Aguilar Mendez, M. A. (2009). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata: Efecto sobre Colletotrichum gloeosporioides. *Instituto Politécnico Nacional, Centro de Investigación En Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada*, 1–89. https://repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/10801/1/PTA_D_20090630_001.PDF
- Amato Neto, V. (2010). Origin of the “y strain” of *Trypanosoma cruzi*. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 52(3), 171. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652010000300012>
- Angheben, A., Boix, L., Buonfrate, D., Gobbi, F., Bisoffi, Z., Pupella, S., Gandini, G., & Aprili, G. (2015). Chagas disease and transfusion medicine: A perspective from non-endemic countries. *Blood Transfusion*, 13(4), 540–550. <https://doi.org/10.2450/2015.0040-15>
- Armstrong, J. S., & Whiteman, M. (2007). Measurement of Reactive Oxygen Species in Cells and Mitochondria. *Methods in Cell Biology*, 80(06), 355–377. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(06\)80018-X](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(06)80018-X)
- Arrebola, D. F. A., Fernández, L. A. R., & Sánchez, D. L. C. (2003). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Revista de Toxicología En Línea*, 13. http://www.sertox.com.ar/img/item_full/19003.pdf
- Ávalos, A., Haza, A., Mateo, D., & Morales, P. (2013). Nanopartículas de plata: Aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 7(2), 1–23. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5209/rev_RCCV.2013.v7.n2.43408
- Batista, C. M., Kessler, R. L., Eger, I., & Soares, M. J. (2018). Treatment of *Trypanosoma cruzi* with 2-bromopalmitate alters morphology, endocytosis, differentiation and infectivity. *BMC Cell Biology*, 1–16.
- Batista, D. D. G. J., Batista, M. M., De Oliveira, G. M., Do Amaral, P. B., Lannes-Vieira, J., Britto, C. C., Junqueira, A., Lima, M. M., Romanha, A. J., Sales, P. A., Stephens, C. E., Boykin, D. W., & Soeiro, M. D. N. C. (2010). Arylimidamide DB766, a potential chemotherapeutic candidate for Chagas' disease treatment.

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(7), 2940–2952. <https://doi.org/10.1128/AAC.01617-09>
- Bestetti, R. B., Martins, C. A., & Cardinalli-Neto, A. (2009). Justice where justice is due: A posthumous Nobel Prize to Carlos Chagas (1879-1934), the discoverer of American Trypanosomiasis (Chagas' disease). *International Journal of Cardiology*, 134(1), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2008.12.197>
- Borenfreund, E., & Puerner, J. A. (1985). Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicology Letters*, 24(2–3), 119–124. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(85\)90046-3](https://doi.org/10.1016/0378-4274(85)90046-3)
- Borenfreund, E., & Shopsis, C. (1985). Toxicity monitored with a correlated set of cell-culture assays. *Xenobiotica*, 15(8–9), 705–711. <https://doi.org/10.3109/00498258509047431>
- Cárdenas-Rodríguez, N., & Pedraza-Chaverri, J. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes : aspectos básicos. *Educación Química*, 17(2), 164–173.
- Cardinal, M. V., Lauricella, M. A., Ceballos, L. A., Lanati, L., Marcet, P. L., Levin, M. J., Kitron, U., Gürtler, R. E., & Schijman, A. G. (2008). Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *International Journal for Parasitology*, 38(13), 1533–1543. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.04.010>
- Castro, J. A. (2014). Efectos Tóxicos De Los Fármacos Utilizados Para El Tratamiento De La Enfermedad De Chagas. *Ciencia e Investigación*, 81–85.
- Ceccarelli, S., Balsalobre, A., Cano, M., Canale, D., Lobbia, P., Stariolo, R., Rabinovich, J., & Marti, G. (2020). Analysis of Chagas disease vectors occurrence data: the Argentinean triatomine species database. *Biodiversity Data Journal*, 8. <https://doi.org/10.3897/bdj.8.e58076>
- Ceole, L. F., Gandhi, H., Villamizar, L. H., Soares, M. J., & Timothy, P. (2018). *Synthesis of novel quinine analogs and evaluation of their effects on Trypanosoma cruzi*. 10, 391–408.
- Chagas, C. (1909). Nouvelle espèce de trypanosomiase humaine [New type of human trypanosomiasis]. *Bulletin de La Société de Pathologie Exotique*, 2(6), 304–307.
- Choi, O., & Hu, Z. (2008). Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environmental Science and Technology*, 42(12), 4583–4588. <https://doi.org/10.1021/es703238h>
- Coutiño, E. del R., Ávila, L., & Helguera, O. A. (2017). Nanoparticulas de plata: Mecanismos de entrada, toxicidad y estres oxidativo. *Revista de Educación Bioquímica*, 36(2), 39–54.
- Cura, C. I., Lucero, R. H., Bisio, M., Oshiro, E., Formichelli, L. B., Burgos, J. M., Lejona, S., Brusés, B. L., Hernández, D. O., Severini, G. V., Velazquez, E., Duffy, T., Anchart, E., Lattes, R., Altchek, J., Freilij, H., Diez, M., Nagel, C., Vigliano, C., ... Schijman, A. G. (2012). *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in Chagas disease patients from endemic and non-endemic regions of Argentina. *Parasitology*, 139(4), 516–521. <https://doi.org/10.1017/S0031182011002186>
- Davies, K. J. A. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50(4–5), 279–289. <https://doi.org/10.1080/15216540051081010>
- de Haro Arteaga, I. (2003). Algunos hechos históricos relacionados con la enfermedad de Chagas. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 50(2), 109–112. <https://doi.org/10.20453/rmh.v3i4.384>
- de Lana, M., & de Menezes Machado, E. M. (2017). Biology of *Trypanosoma cruzi* and biological diversity. In *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition* (Second Edition, pp. 345–369). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00016-2>

- Del Puerto, R., Nishizawa, J. E., Kikuchi, M., Iihoshi, N., Roca, Y., Avilas, C., Gianella, A., Lora, J., Velarde, F. U. G., Renjel, L. A., 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(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000687>
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2021). InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Echavarría, N. G., Echeverría, L. E., Stewart, M., Gallego, C., & Saldarriaga, C. (2021). Chagas Disease: Chronic Chagas Cardiomyopathy. *Current Problems in Cardiology*, 46(3), 100507. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2019.100507>
- Echeverria, L. E., & Morillo, C. A. (2019). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, 33(1), 119–134. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.015>
- Eickhoff, C. S., Dunn, B. A., Sullivan, N. L., & Hoft, D. F. (2013). Comparison of the infectivity of trypanosoma cruzi insect-derived metacyclic trypomastigotes after mucosal and cutaneous contaminative challenges. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(4), 508–511. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762013000400018>
- Enriquez, G. F., Cardinal, M. V., Orozco, M. M., Lanati, L., Schijman, A. G., & Gürtler, R. E. (2013). Discrete typing units of Trypanosoma cruzi identified in rural dogs and cats in the humid Argentinean Chaco. *Parasitology*, 140(3), 303. <https://doi.org/10.1017/S003118201200159X>
- Eruslanov, E., & Kusmartsev, S. (2010). Identification of ROS Using Oxidized DCFDA and Flow-Cytometry. *Methods in Molecular Biology*, 594, 57–72. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_4
- Filardi, L. S., & Brener, Z. (1984). A rapid method for testing in vivo the susceptibility of different strains of Trypanosoma cruzi to active chemotherapeutic agents. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 79(2), 221–225. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761984000200008>
- Filigheddu, M. T., Górgolas, M., & Ramos, J. M. (2017). Enfermedad de Chagas de transmisión oral. *Medicina Clinica*, 148(3), 125–131. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2016.10.038>
- Gomes, A., Fernandes, E., & Lima, J. L. F. C. (2005). Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 65(2–3), 45–80. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.10.003>
- Gorla, D., & Noireau, F. (2017). Geographic distribution of Triatominae vectors in America. *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition*, 197–221. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00009-5>
- GraphPad. (2020). *How to Perform a Dose-Response Analysis*. 1–12. <https://f.hubspotusercontent00.net/hubfs/4627953/GP - Ebooks/How to Perform a Dose-Response Analysis/GraphPad-Dose-Response-Ebook.pdf?hsCtaTracking=8b8fd8cb-d8a3-410d-8dd4-ac47e2476148%7C050a990e-1921-4dd7-9b0e-5a1bb71391d5>
- Groom, Z. C., Protopapas, A. D., & Zochios, V. (2017). Tropical diseases of the myocardium: A review. *International Journal of General Medicine*, 10, 101–111. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S130828>
- Guhl, F. (2017a). Geographical Distribution of Chagas disease. In J. Telleria & M. Tibayrenc (Eds.), *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition* (2nd ed., pp. 89–112).

Elsevier Inc.

- Guhl, F. (2017b). Chagas disease in pre-Colombian civilizations. In J. Telleria & M. Tibayrenc (Eds.), *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition* (pp. 23–46). Elsevier Inc.
- Guhl, Felipe, & Lazdins-Helds, J. K. (2007). Reporte sobre la enfermedad de Chagas. In *Grupo de trabajo científico.: Geneva: World Health organization.* <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Reporte+sobre+la+enfermedad+de+Chagas#0>
- He, D., Jones, A. M., Garg, S., Pham, A. N., & Waite, T. D. (2011). Silver nanoparticle-reactive oxygen species interactions: Application of a charging-discharging model. *Journal of Physical Chemistry C*, *115*(13), 5461–5468. <https://doi.org/10.1021/jp111275a>
- Hemmige, V., Tanowitz, H., & Sethi, A. (2012). *Trypanosoma cruzi* infection: A review with emphasis on cutaneous manifestations. *International Journal of Dermatology*, *51*(5), 501–508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2011.05380.x>
- Huang, H., Lai, W., Cui, M., Liang, L., Lin, Y., Fang, Q., Liu, Y., & Xie, L. (2016). An Evaluation of Blood Compatibility of Silver Nanoparticles. *Scientific Reports*, *6*(April), 1–15. <https://doi.org/10.1038/srep25518>
- Huang, Y. W., Wu, C. H., & Aronstam, R. S. (2010). Toxicity of transition metal oxide nanoparticles: Recent insights from in vitro studies. *Materials*, *3*(10), 4842–4859. <https://doi.org/10.3390/ma3104842>
- Huh, A. J., & Kwon, Y. J. (2011). “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*, *156*(2), 128–145. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.002>
- Jackson, Y., Alirol, E., Getaz, L., Wolff, H., Combescure, C., & Chappuis, F. (2010). Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic Chagas disease. *Clinical Infectious Diseases*, *51*(10). <https://doi.org/10.1086/656917>
- Jansen, A. M., Roque, A. L. R., & Xavier, S. C. C. (2017). *Trypanosoma cruzi* enzootic cycle: General aspects, domestic and synanthropic hosts and reservoirs. In *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition* (pp. 265–282). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00012-5>
- Kemmerling, U., Osuna, A., Schijman, A. G., & Truyens, C. (2019). Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: A review about the interactions between the parasite, the placenta, the maternal and the fetal/neonatal immune responses. *Frontiers in Microbiology*, *10*(AUG), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01854>
- Kollien, A. H., & Schaub, G. A. (2000). The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitology Today*, *16*(9), 381–387. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01724-5](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01724-5)
- Leónard, J. (1992). Investigaciones en el interior de la Argentina: La búsqueda de la salud emprendida por Salvador Mazza. *Boletín de La Oficina Sanitaria Panamericana*, *113*(4), 301–313.
- Lidani, K. C. F., Bavia, L., Ambrosio, A. R., & de Messias-Reason, I. J. (2017). The complement system: A prey of *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Microbiology*, *8*(APR), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00607>
- Llewellyn, M. S., Miles, M. A., Carrasco, H. J., Lewis, M. D., Yeo, M., Vargas, J., Torrico, F., Diosque, P., Valente, V., Valente, S. A., & Gaunt, M. W. (2009). Genome-scale multilocus microsatellite typing of

- Trypanosoma cruzi discrete typing unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *PLoS Pathogens*, 5(5). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000410>
- Lopes, L. C. S., Brito, L. M., Bezerra, T. T., Gomes, K. N., Carvalho, F. A. D. A., Chaves, M. H., & Cantanhêde, W. (2018). Silver and gold nanoparticles from tannic acid: Synthesis, characterization and evaluation of antileishmanial and cytotoxic activities. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 90(3), 2679–2689. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170598>
- Marcili, A., Lima, L., Cavazzana, M., Junqueira, A. C. V., Veludo, H. H., Maia Da Silva, F., Campaner, M., Paiva, F., Nunes, V. L. B., & Teixeira, M. M. G. (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(6), 641–655. <https://doi.org/10.1017/S0031182009005861>
- Mazza, S. (1949). La enfermedad de Chagas en la República Argentina. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 47(1–2), 273–288. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0074-02761949000100011>
- Mehlhorn, H. (2016). Encyclopedia of Parasitology. In H. Mehlhorn (Ed.), *Encyclopedia of Parasitology* (Fourth Ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-43978-4>
- Mittal, A. K., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*, 31(2), 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>
- Molina, I., Salvador, F., & Sánchez-Montalvá, A. (2016). Formación médica continuada: Salud Internacional y Atención al Viajero Actualización en enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 34(2), 132–138. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2015.12.008>
- Monteiro, F. A., Weirauch, C., Felix, M., Lazoski, C., & Abad-Franch, F. (2018). Evolution, Systematics, and Biogeography of the Triatominae, Vectors of Chagas Disease. In D. Rollinson & J. R. Stothard (Eds.), *Advances in Parasitology* (Vol. 99, pp. 265–344). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2017.12.002>
- Monteon, V. (2019). *Trypanosoma cruzi*: the early contact between insect-derived metacyclic trypomastigotes and the mammalian cells. *Annals of Parasitology*, 65(3), 193–204. <https://doi.org/10.17420/ap6503.201>
- Mourdikoudis, S., Pallares, R. M., & Thanh, N. T. K. (2018). Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*, 10(27), 12871–12934. <https://doi.org/10.1039/c8nr02278j>
- Muñoz-Saravia, S. G., Haberland, A., Wallukat, G., & Schimke, I. (2012). Chronic Chagas' heart disease: A disease on its way to becoming a worldwide health problem: Epidemiology, etiopathology, treatment, pathogenesis and laboratory medicine. *Heart Failure Reviews*, 17(1), 45–64. <https://doi.org/10.1007/s10741-010-9211-5>
- Murcia, L., Carrilero, B., Viñas, P. A., & Segovia, M. (2012). Nifurtimox chemotherapy: Collateral effects in treated *Trypanosoma cruzi* infected patients. *Revista Espanola de Quimioterapia*, 25(1), 74–75.
- Nazeruddin, G. M., Prasad, N. R., Waghmare, S. R., Garadkar, K. M., & Mulla, I. S. (2014). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticle using *Azadirachta indica* leaf extract and its anti-microbial activity. *Journal of Alloys and Compounds*, 583, 272–277. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2013.07.111>
- Nii-Trebi, N. I. (2017). Emerging and Neglected Infectious Diseases: Insights, Advances, and Challenges. *BioMed Research International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5245021>

- OMS. (2015). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Weekly Epidemiological Record*, 90(6), 33–43.
- OPS/OMS. (2021). *Información general: Enfermedad de Chagas. Nota Descriptiva*. https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856:2011-informacion-general-enfermedad-chagas&Itemid=40370&lang=es
- OPS. (2021a). *Enfermedad de Chagas*. <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>
- OPS. (2021b). *Enfermedad de Chagas en las Américas - Hoja informativa para los trabajadores de salud*. https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13568:chagas-in-americas-health-workers-2017&Itemid=40721&lang=es
- Paes, M. C., Cosentino-Gomes, D., Souza, C. F. De, Nogueira, N. P. D. A., & Meyer-Fernandes, J. R. (2011). The role of heme and reactive oxygen species in proliferation and survival of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Parasitology Research*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/174614>
- Paglioni-Oliva, P., Fernández, A. R., Fretes, R., & Peslman, A. (1998). Structural, ultrastructural studies and evolution of *Trypanosoma cruzi*-infected mice treated with thioridazine. *Experimental and Molecular Pathology*, 65(2), 78–86. <https://doi.org/10.1006/exmp.1998.2227>
- Pereira, Á., & Pérez, M. (2003). Tripanosomosis. Enfermedad de Chagas y enfermedad del sueño. *Offarm (Barcelona. Internet)*, 22(2), 104–111.
- Pierrotti, L. C., Carvalho, N. B., Amorin, J. P., Pascual, J., Kotton, C. N., & López-Vélez, R. (2018). Chagas disease recommendations for solid-organ transplant recipients and donors. *Transplantation*, 102(2S), S1–S7. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002019>
- Quebrada Palacio, L. P., González, M. N., Hernandez-Vasquez, Y., Perrone, A. E., Parodi-Talice, A., Bua, J., & Postan, M. (2018). Phenotypic diversity and drug susceptibility of *Trypanosoma cruzi* TcV clinical isolates. *PLoS ONE*, 13(9), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203462>
- Ramírez Aguirre, D. P., Flores Loyola, E., De la Fuente Salcido, N. M., Rodríguez Sifuentes, L., Ramírez Moreno, A., & Marszalek, J. E. (2020). Comparative antibacterial potential of silver nanoparticles prepared via chemical and biological synthesis. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(12), 8662–8670. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2020.09.057>
- Repetto, G., del Peso, A., & Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3(7), 1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>
- Revollo, S., Oury, B., Vela, A., Tibayrenc, M., & Sereno, D. (2019). In vitro benznidazole and nifurtimox susceptibility profile of *Trypanosoma cruzi* strains belonging to discrete typing units tci, tcii, and tev. *Pathogens*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/pathogens8040197>
- Sales Junior, P. A., Molina, I., Murta, S. M. F., Sánchez-Montalvá, A., Salvador, F., Corrêa-Oliveira, R., & Carneiro, C. M. (2017). Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 97(5), 1289–1303. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0761>
- Sánchez Moreno, M. (2017). Nanopartículas de plata: preparación, caracterización y propiedades con aplicación en inocuidad de los alimentos. Trabajo de fin de máster. In *Facultad de ciencias. Departamento de Química Inorgánica y Química Técnica. Universidad Nacional De Educación A Distancia*.
- Schofield, C. J., & Galvão, C. (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta*

Tropica, 110(2–3), 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.01.010>

- Selvapriya, V., & Deepa, C. (2017). A Novel, Comparative Study of Chemical and Green Synthesis of Silver Nanoparticles. *Journal of Environmental Nanotechnology*, 6(1), 23–26. <https://doi.org/10.13074/jent.2017.03.171226>
- Stevens, J. R., & Brisse, S. (2009). Systematics of trypanosomes of medical and veterinary importance. In I. Maudlin, P. H. Holmes, & M. A. Miles (Eds.), *The trypanosomiasis* (Issue October, pp. 1–23). <https://doi.org/10.1079/9780851994758.0001>
- Tzizik, D. M., & Borchardt, R. A. (2018). Chagas disease. *Journal of the American Academy of Physician Assistants*, 31(12), 30–33. <https://doi.org/10.1097/01.JAA.0000547749.92933.6a>
- Vieira, C. B., Praça, Y. R., Bentes, K. L. da S., Santiago, P. B., Silva, S. M. M., Silva, G. D. S., Motta, F. N., Bastos, I. M. D., de Santana, J. M., & de Araújo, C. N. (2018). Triatomines: Trypanosomatids, Bacteria, and Viruses Potential Vectors? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 405. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00405>
- Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Alvarez, M. G., Petti, M., Bertocchi, G., & Armenti, A. (2009). Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: Fears and realities. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7(2), 157–163. <https://doi.org/10.1586/14787210.7.2.157>
- Zavala Castro, J. E. (2014). Capítulo 10: Enfermedad de Chagas y otras tripanosomiasis. In Mc Graw Hill Education (Ed.), *Parasitología Médica. Marco Antonio Becerril* (4th ed., pp. 95–109).
- Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9). <https://doi.org/10.3390/ijms17091534>
- Zhu, X., Radovic-Moreno, A. F., Wu, J., Langer, R., & Shi, J. (2014). Nanomedicine in the Management of Microbial Infection – Overview and Perspectives. *Nano Today*, 9(4), 478–498. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.06.003>.Nanomedicine
- Zingales, B., Andrade, S., Briones, M., Campbell, D., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A., Machado, C., Miles, M., Romanha, A., NR, S., Tibayrenc, M., & Schijman, A. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), 1051–1054. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000700021>
- Zingales, Bianca. (2018). *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*, 184, 38–52. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>

ANEXO I

Procedimiento estadístico para el experimento de conteo en la forma epimastigote:

Al realizar el ANOVA para evaluar los distintos tratamientos correspondientes al conteo en microscopio óptico en la forma epimastigote, el mismo arrojó diferencias significativas con un p-valor <0,05:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Conteo	450	0,78	0,77	37,83

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	7798,92	5	1559,78	307,23	<0,0001
Tratamiento	7798,92	5	1559,78	307,23	<0,0001
Error	2254,19	444	5,08		
Total	10053,11	449			

H₀: todas las \bar{x} de los niveles del factor son iguales. H₁: al menos una \bar{x} es diferente.

Sin embargo, al revisar los parámetros de normalidad mediante el Test de Kolmogorov y homocedasticidad utilizando Test de Levene, se observa que no se cumple los criterios para la validación del ANOVA.

Prueba de bondad de ajuste (Kolmogorov)

Variable	Ajuste	media	varianza	n	Estadístico D	p-valor
RDUO Conteo	Normal(0,5,02)	0,00	5,02	450	0,14	<0,0001

H₀: Los residuos tienen distribución normal; H₁: Los residuos no tienen distribución normal.

Análisis de la varianza (Test Levene)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Conteo	450	0,26	0,25	80,49

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	273,80	5	54,76	31,48	<0,0001
Tratamiento	273,80	5	54,76	31,48	<0,0001
Error	772,25	444	1,74		
Total	1046,05	449			

H₀: las varianzas poblacionales son iguales H₁: Las varianzas poblacionales no son iguales.

Por esta razón se procedió a extraer del análisis los datos correspondientes a epimastigotes tratados con la IC₉₀ y epimastigotes tratados con AgNO₃ 0,1 mM, por contener preponderantemente valores nulos (0) y afectar la varianza general. Luego de esta modificación obtenemos que existen diferencias significativas entre los tratamientos y que se cumplen los criterios de homocedasticidad y normalidad para validar el resultado:

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
----------	---	----------------	-------------------	----

Conteo 300 0,40 0,39 30,60

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1365,40	3	455,13	65,48	<0,0001
Tratamiento	1365,40	3	455,13	65,48	<0,0001
Error	2057,52	296	6,95		
Total	3422,92	299			

H₀: todas las \bar{x} de los niveles del factor son iguales. H₁: al menos una \bar{x} es diferente.

Análisis de la varianza (Test de Levene)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RABS Conteo	300	2,3E-03	0,00	74,04

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1,65	3	0,55	0,22	0,8790
Tratamiento	1,65	3	0,55	0,22	0,8790
Error	721,65	296	2,44		
Total	723,30	299			

H₀: las varianzas poblacionales son iguales H₁: Las varianzas poblacionales no son iguales.

Prueba de bondad de ajuste (Kolmogorov)

Variable	Ajuste	media	varianza	n	Estadístico	Dp-valor
RDUO Conteo	Normal(0,6,88)	0,00	6,88	300	0,07	0,1442

H₀: Los residuos tienen distribución normal; H₁: Los residuos no tienen distribución normal.

Por último se procedió a realizar el test de comparaciones múltiples LSD Fisher, el cual arrojó los siguientes resultados:

Test LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,84730

Error: 6,9511 gl: 296

Tratamiento	Medias n	E.E.	
IC50	4,99 75	0,30	A
IC20	9,20 75	0,30	B
E+Ext	9,99 75	0,30	B C
E+D	10,29 75	0,30	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)