

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Sensibilidad de cepas de *Trypanosoma cruzi* DTU TcI al fexinidazol

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas

CRISTOPHER ANDRÉS GARCÍA MEJÍA

Quito, 2019

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del candidato Christopher Andrés García Mejía ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Jaime Costales Ph. D.

DIRECTOR DE LA DISERTACIÓN

6 de mayo de 2019

AGRADECIMIENTOS

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el financiamiento y ayuda en este proyecto (QINV0063-IINV529010100).

Al Institut de le Recherche pour le Développement (IRD) por el aporte y financiamiento de este proyecto.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y a la Escuela de Biología.

A Jaime Costales Cordero PhD por acogerme en su laboratorio, guiarme en el proyecto, y por su paciencia.

A Jenny Telleria PhD por su vital apoyo en este proyecto, así como su gran ayuda en los experimentos.

A Camila Cilveti, Jalil Maiguashca, Anaid Rivadeneira, Andrea Vela, Verónica Andrade, Isabel Tamayo, Michelle Del Salto y a todos mis compañeros del CISEAL. Por su ayuda y apoyo en este proyecto.

A mi familia que fue un pilar fundamental para poder conseguirlo, en especial a mis padres, mi hermano, mis primos y en memoria de mi abuelo Jaime, gracias por todo.

A mis amigos de la banca, que siempre estuvieron ahí para mí cuando los necesite, y que recorrieron todo el camino conmigo, gracias por llevarme hasta aquí.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ANEXOS	X
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT	2
3. LISTA DE ABREVIATURAS	3
4. INTRODUCCIÓN	4
4.1. EPIDEMIOLOGÍA.....	4
4.2. TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD.....	5
4.3. CICLO DE VIDA DE <i>T. CRUZI</i>	5
4.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	6
4.5. MEDICAMENTOS ACTUALES	7
4.6. NUEVAS ALTERNATIVAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ECH	7
4.6.1. FEXINIDAZOL	8
4.7. VARIABILIDAD GENÉTICA EN <i>T. CRUZI</i>	8
4.8. ENSAYO COLORIMÉTRICO DE VIABILIDAD CELULAR.....	9
4.9. INHIBICIÓN Y LETALIDAD	10
4.10. JUSTIFICACIÓN	10
5. OBJETIVOS.....	11
5.1. OBJETIVO GENERAL	11
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
6. METODOLOGÍA	12
6.1. CEPAS DE <i>T. CRUZI</i>	12
6.2. LÍNEAS CELULARES DE MAMÍFERO	12
6.3 CULTIVO DE EPIMASTIGOTES	12
6.4. CULTIVO DE CÉLULAS DE MAMÍFERO	13

6.5. GENERACIÓN DE CULTIVOS DE TRIPOMASTIGOTES DE <i>T. CRUZI</i>	13
6.6. PRODUCCIÓN DE TRIPOMASTIGOTES PARA LOS ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	13
6.7. CURVAS DE CRECIMIENTO DE EPIMASTIGOTES.....	14
6.8. ELABORACIÓN DE CURVA DE TITULACIÓN.....	14
6.9. ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE IC ₅₀ CON EPIMASTIGOTES.....	14
6.10. ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LC ₅₀ CON TRIPOMASTIGOTES .	15
6.11. ENSAYO COLORIMÉTRICO CON RESAZURINA	16
6.12. ANÁLISIS DE DATOS	16
7. RESULTADOS.....	18
7.1. CURVAS DE CRECIMIENTO	18
7.2. CURVAS DE TITULACIÓN	20
7.3. COMPARACIÓN ENTRE CEPAS	21
7.4. COMPARACIÓN ENTRE MEDICAMENTOS	30
8. DISCUSIÓN.....	37
9. BIBLIOGRAFÍA.....	41
10. ANEXOS.....	46

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Sensibilidad de epimastigotes de las distintas cepas en empleadas en el estudio al fexinidazol	22
Tabla 2. Sensibilidad de epimastigotes de las distintas cepas en empleadas en el estudio al benznidazol.....	22
Tabla 3. Sensibilidad de tripomastigotes de las distintas cepas en empleadas en el estudio al fexinidazol	24
Tabla 4. Sensibilidad de tripomastigotes de las distintas cepas en empleadas en el estudio al benznidazol.....	24
Tabla 5. Niveles de Significancia de comparación Kruskal- Wallis Dunn- Bonferroni entre pares de cepas de <i>T. cruzi</i> en epimastigotes y tripomastigotes para ambos medicamentos.29	
Tabla 6. Niveles de significación de comparación entre medicamentos por cepas	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curvas de crecimiento para las cepas de <i>T. cruzi</i> empleadas en el estudio.	19
Figura 2. Curva de titulación epimastigotes.	20
Figura 3. Curva de titulación tripomastigotes	21
Figura 4. Mediana de los valores de IC_{50} para epimastigotes con fexinidazol y benznidazol	23
Figura 5. Mediana de los valores de LC_{50} para tripomastigotes fexinidazol y benznidazol.	25
Figura 6. Sensibilidad al fexinidazol de epimastigotes de cepas de <i>T. cruzi</i> DTU I.....	26
Figura 7. Sensibilidad al benznidazol de epimastigotes de cepas de <i>T. cruzi</i> DTU I.....	26
Figura 8. Sensibilidad de tripomastigotes de cepas de <i>T. cruzi</i> DTU I al fexinidazol.	27
Figura 9. Sensibilidad de tripomastigotes de cepas de <i>T. cruzi</i> DTU I al benznidazol.....	28
Figura 10. Comparación de sensibilidad de epimastigotes de la cepa HUMAN al benznidazol y fexinidazol.	30
Figura 11. Comparación de sensibilidad de epimastigotes de la cepa ECUA7 al benznidazol y fexinidazol.....	31
Figura 12. Comparación de sensibilidad de epimastigotes de la cepa TRC2377 al benznidazol y fexinidazol.....	31
Figura 13. Comparación de sensibilidad de epimastigotes de la cepa BJ401 al benznidazol y fexinidazol.	32
Figura 14. Comparación de sensibilidad de epimastigotes de la cepa Sc43 al benznidazol y fexinidazol.....	32
Figura 15. Comparación de sensibilidad de tripomastigotes de la cepa HUMAN al benznidazol y fexinidazol.....	33

Figura 16. Comparación de sensibilidad de tripomastigotes de la cepa ECUA7 al benznidazol y fexinidazol.	34
Figura 17. Comparación de sensibilidad de tripomastigotes de la cepa TRC2377 al benznidazol y fexinidazol. e.	34
Figura 18. Comparación de sensibilidad de tripomastigotes de la cepa BJ401 al benznidazol y fexinidazol	35
Figura 19. Comparación de sensibilidad de tripomastigotes de la cepa Sc43 al benznidazol y fexinidazol.	35

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	47
Anexo 2. Estructura química de los nitro-derivativos usados contra la ECh..	48
Anexo 3. Esquema de una placa de curva de titulación.	1
Anexo 4. Esquema ensayo epimastigotes y tripomastigotes.	1
Anexo 5. Preparación de las diluciones de fexinidazol y benznidazol en placas de ensayo de 96 pocillos..	1
Anexo 6. Reducción de resazurina en una placa de ensayo colorimétrico.....	2
Anexo 7. Curvas de sensibilidad de epimastigotes al fexinidazol.....	3
Anexo 8. Curvas de sensibilidad de epimastigotes al benznidazol.	4
Anexo 9. Curva de sensibilidad de tripomastigotes al fexinidazol.....	5
Anexo 10. Curva de sensibilidad de tripomastigotes al benznidazol.	6
Anexo 11. Valor de significancia obtenido en prueba de Kruskal- Wallis para epimastigotes tratados con fexinidazol.....	7
Anexo 12. Valor de significancia obtenido en prueba de Kruskal- Wallis para epimastigotes tratados con benznidazol.	8
Anexo 13. Valor de significancia obtenido en prueba de Kruskal- Wallis para tripomastigotes tratados con fexinidazol.....	9
Anexo 14. Valor de significancia obtenido en prueba de Kruskal- Wallis para tripomastigotes tratados con benznidazol.	10
Anexo 15. Corrección de Dunn- Bonferroni de pruebas entre parejas de cepas de epimastigotes con fexinidazol.	11

Anexo 16. Corrección de Dunn- Bonferroni para cepas de epimastigotes con benznidazol. Indica diferencias estadísticamente significativas	12
Anexo 17. Corrección Dunn- Bonferroni de cepas de tripomastigotes con fexinidazol. Indica diferencias estadísticamente significativas.....	13
Anexo 18. Corrección de Dunn- Bonferroni de cepas de tripomastigotes con benznidazol. Indica diferencias estadísticamente significativas.....	14

1. RESUMEN

La enfermedad de Chagas (ECh) o tripanosomiasis americana, causada por el parásito unicelular *Trypanosoma cruzi*, afecta a un número estimado de 6 millones de personas en el mundo y 200 000 en el Ecuador. Esta enfermedad muestra una amplia gama de manifestaciones clínicas, y se desarrolla en dos fases. En la fase aguda, que dura aproximadamente durante dos meses después del contagio, los síntomas son leves o están ausentes, mientras que en la fase crónica existen daños irreversibles al corazón y sistema digestivo, que pueden causar incapacidad y muerte en los pacientes. Actualmente, existen solo dos medicamentos aprobados para el tratamiento de la ECh: nifurtimox (Lampit[®], Bayer) y benznidazol (Rochagan[®], Roche). Sin embargo, ambos medicamentos tienen limitaciones tales como costo elevado, efectos secundarios importantes en los pacientes, tratamientos largos, y efectividad cuestionable en la fase crónica de la enfermedad, por lo que la búsqueda de nuevos tratamientos es indispensable. El fexinidazol (Sanofi) es un compuesto que fue inicialmente estudiado debido a su actividad contra *Trichomonas* y *Entamoeba histolytica* y fue redescubierto posteriormente por su gran potencial antiparasitario; actualmente se encuentra en pruebas clínicas para tratar la enfermedad del sueño causada por *Trypanosoma brucei*. El objetivo del presente estudio fue evaluar la acción del fexinidazol frente a cepas de *T. cruzi* con distintos niveles de virulencia: dos cepas virulentas (HUMAN, ECUA7) y dos cepas poco virulentas (BJ401, TRC2377) y una cepa de referencia, y contrastando con el medicamento tradicional (benznidazol). Para ello fue empleado un ensayo colorimétrico basado en la capacidad del parásito de reducir resazurina a resofurina, produciendo un cambio de color púrpura a rosado el cual puede ser cuantificado mediante espectrofotometría. Los valores de inhibición (IC₅₀) y letalidad (LC₅₀) fueron calculados para epimastigotes y tripomastigotes de cada cepa, comparándolos con los obtenidos utilizando el benznidazol. Se encontraron diferencias entre las cepas estudiadas en cuanto a su sensibilidad al fexinidazol y benznidazol, pero en general los dos fármacos mostraron una efectividad similar. Los resultados sugieren que el fexinidazol es una alternativa adecuada al uso del benznidazol.

Palabras Clave: epimastigotes tripomastigotes resazurina benznidazol fexinidazol.

2. ABSTRACT

Chagas Disease (CD), which affects ~6 million people in the world and 200 000 in Ecuador, is caused by the unicellular parasite *Trypanosoma cruzi*. The disease progresses in two phases termed acute and chronic. In the acute phase, which lasts two months, symptoms are usually mild or absent. During the chronic phase; patients may develop severe damages to the heart or digestive system organs, which in some cases result in death. Currently, there are two compounds employed for ECh treatment: nifurtimox (Lampit[®] Bayer) and benznidazole (Rochagan[®] Roche). However, these two drugs have several limitations, including their high cost, their low efficacy in the chronic phase, and the need for long treatment periods, making the development of new alternative treatments an urgent issue. Fexinidazole, was originally discovered as an antibiotic compound, which was later rediscovered as an antiparasitic compound with potential for treatment of Human African Trypanosomiasis (HAT). Clinical trials are currently under way to evaluate the efficacy of fexinidazole for the treatment of HAT. The objective of this study is to compare the activity of fexinidazole with benznidazole over four *T. cruzi* I strains, divided into different scales of virulence: high infectivity (HUMAN, ECUA7) and low infectivity (BJ401, TRC2377) adding also a reference strain Sc43. We employed an *in-vitro*, resazurin-based colorimetric assay which changes from color purple to red measurable in spectrophotometry, obtaining absorbance data to determine the IC₅₀ and LC₅₀ values for each of the studied strains in two different phases of the life cycle of *T. cruzi* (epimastigotes, trypomastigotes). In general, the performance of both chemicals was similar in our *in-vitro* assays, suggesting that fexinidazole action could be a good substitute for the traditional drug benznidazole.

Key words: epimastigotes trypomastigotes resazurin benznidazole fexinidazole.

3. LISTA DE ABREVIATURAS

ECh	Enfermedad de Chagas
TAH	Tripanosomiasis africana humana
DTU	Unidad discreta de tipificación (Discrete Typing Units)
DMSO	Dimetil sulfóxido
WHO	Organización Mundial de la Salud
IC₅₀	Concentración inhibitoria 50%
LC₅₀	Concentración letal 50 %
FBS	Suero fetal bovino
LIT	Medio de infusión de hígado triptosa.
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco

4. INTRODUCCIÓN

4.1. EPIDEMIOLOGÍA

La ECh, causada por el protozooario parásito *Trypanosoma cruzi*, es endémica en Latinoamérica, donde constituye un serio problema de salud pública. Actualmente, se estima que entre 6 y 8 millones de personas se encuentran infectadas por *T. cruzi*, mientras que otros 70 millones (20% de la población latinoamericana) están en riesgo de contraer la enfermedad (WHO, 2015). Se estima que la ECh genera costos de más de 7,19 mil millones de dólares anuales a los sistemas de salud en el mundo (Lee, Bacon, Bottazi y Hotez, 2013).

Desde el punto de vista social, la ECh es prevalente en zonas rurales; sin embargo, durante los últimos años, se ha propagado debido a la migración humana hacia los países industrializados como: Estados Unidos, Canadá, países de Europa como España y Portugal, países del Asia como el Japón y, recientemente, Australia (WHO, 2015).

En nuestro país, alrededor de 200 000 personas se encuentran infectadas, y se estima que anualmente hay un incremento de dos mil casos, con una incidencia de 14 por cada 100, 000 habitantes (WHO, 2015). Se han presentado casos en casi todas las provincias del Ecuador exceptuando Chimborazo, Tungurahua, Cotopaxi y el Carchi (Abad y Aguilar, 2003; Quinde, Ríos, Solórzano y Dumonteil, 2015). Adicionalmente un estudio llevado a cabo en la provincia de Esmeraldas en zonas habitadas por las tribus indígenas Awá, se determinó un 3,2% de seropositividad en un muestreo de 144 individuos (Guevara et al., 2014).

Desafortunadamente, no se cuenta con información completa sobre la prevalencia de esta enfermedad en el Ecuador y el acceso a diagnósticos en el país es limitado. Dado que en las dos últimas décadas los reportes de casos por parte del Ministerio de Salud Pública del Ecuador han sido esporádicos y restringidos a ciertas zonas geográficas, se ha llegado incluso a proponer erróneamente que la enfermedad ha sido controlada en el país (Cartelle, Holban, Escalante y Cevallos, 2015). Estas afirmaciones, que pueden resultar contraproducentes para el control de la ECh, han sido rebatidas claramente en la literatura científica (Dumonteil, et al., 2016).

4.2. TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD

La ECh es transmitida el protozooario parásito *T. cruzi*, un hemoflagelado de la familia Tripanosomatidae, capaz de infectar mamíferos, incluido el ser humano (WHO, 2015). La principal ruta de contagio es el contacto con las heces de insectos hematófagos de la subfamilia Triatominae (WHO, 2015), conocidos vulgarmente en el Ecuador como chinches o chinchorros (Grijalva et al., 2017).

A nivel latinoamericano, los principales vectores de esta enfermedad son: *Triatoma dimidiata*, *Triatoma brasiliensis*, *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus megistus* (WHO, 2015). En el Ecuador, son 13 los principales vectores y, desde el punto de vista epidemiológico, se destacan las especies: *Triatoma dimidiata*, la cual está distribuida más en áreas urbanas como Guayaquil, Manabí y Portoviejo; y *Rhodnius ecuadoriensis*, que se encuentra distribuido principalmente en zonas rurales desde la parte céntrica de la región Costa hasta el norte de Perú. (Grijalva et al., 2017).

La ecología de los triatominos varía, ya que pueden encontrarse dentro de los hogares e interactuar con los humanos y animales domésticos (área domiciliar), zonas aledañas a los domicilios (áreas peridomiciliares), y zonas de bosque primario o alterado, donde el parásito interactúa con sus reservorios salvajes que incluyen armadillos, raposas, etc. (áreas selváticas). En cada una de estas zonas de establecen ciclos de transmisión, que involucran a los triatominos y a los mamíferos presentes. De mayor importancia para la transmisión de *T. cruzi* a humanos son los ciclos domiciliar y peri domiciliar, en los que el control vectorial es crucial (Grijalva et al., 2017).

Adicionalmente, existen otras rutas de transmisión de la infección, tales como las transfusiones de unidades de sangre infectadas (Schmunis, 1999) que son las responsables de la expansión de la enfermedad a países industriales; la trasmisión congénita, de madre a hijo por vía transparentaría; la transmisión oral y, finalmente, accidentes de laboratorio (Freilij y Altcheh, 1983).

4.3. CICLO DE VIDA DE *T. CRUZI*

T. cruzi es un parásito intracelular obligado, y su ciclo de vida tiene distintas fases. El epimastigote es una fase replicativa que se multiplica en el tracto intestinal de los insectos vectores, y que en el intestino posterior madura en tripomastigotes metacíclicos. Estos últimos son capaces de infectar mamíferos (incluido el ser humano) mediante el contacto de las heces con las mucosas o con la herida causada por el vector al alimentarse. Mientras ingiere sangre, o inmediatamente después, el vector defeca, liberando los parásitos en sus heces. Al rascarse la picadura, la persona picada involuntariamente introduce los parásitos a la herida o se los lleva a las mucosas de la boca o los ojos mientras duerme. Una vez que ha ganado acceso al organismo, *T. cruzi* invade algunas células pasando a su forma intracelular, el amastigote, y multiplicándose por espacio de 4 o 5 días. Posteriormente, los parásitos volverán a transformarse en tripomastigotes y saldrán de la célula hospedera hacia el torrente sanguíneo (Anexo 1), desde donde pueden nuevamente ser ingeridos por un vector. Adicionalmente, desde el torrente sanguíneo, el parásito también puede infectar otros órganos, tales como el corazón, esófago y colon (WHO, 2015).

4.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La ECh se desarrolla en dos fases. La fase inicial o aguda dura alrededor de dos meses después de la infección. La parasitemia es patente durante esta fase, sin embargo, los síntomas suelen ser leves o no existentes. En el sitio de entrada del parásito puede presentarse una llaga conocida como “chagoma”, o si el parásito entró por la mucosa de un ojo, se produce un edema unipalpebral, lo que se conoce como el “signo de Romaña”. Otros síntomas, que suelen ser leves, y que no permiten la identificación de la enfermedad, incluyen fiebres, náuseas y ligera arritmia cardiaca (Rassi, Rassi, y Marín, 2010). Debido al establecimiento de la respuesta inmune en contra del parásito, alrededor de dos meses después de la infección, la parasitemia desaparece casi totalmente y se inicia la fase crónica (Pereira y Navarro, 2013; Prata, 2001).

La fase crónica puede manifestarse de formas, la forma crónica indeterminada y la forma crónica definida. La forma indeterminada (asintomática) de la enfermedad se presenta en alrededor del 60 % de los pacientes. Estos pacientes deben ser sometidos a control médico permanente ya que su pronóstico no es claro (Pereira et al., 2013). La forma crónica definida puede presentarse como una patología cardiaca o una patología digestiva, o una patología cardio-digestiva (Prata, 2001). Cuando se desarrolla una patología cardiaca, las

complicaciones clínicas son una tromboembolia, insuficiencia cardíaca y/o una aneurisma. Cuando se presenta una patología digestiva puede afectar el esófago o el colon. Adicionalmente, en raras ocasiones, la ECh crónica puede afectar al sistema nervioso central periférico vegetativo provocando alteraciones funcionales y/o anomalías psiquiátricas (Rassi, et al., 2010).

4.5. MEDICAMENTOS ACTUALES

Los únicos medicamentos actualmente aprobados para el tratamiento de la ECh son dos compuestos nitro-heterocíclicos: benznidazol (Rochagan) y nifurtimox (Lampit) (Anexo 2). Su mecanismo de acción es bastante similar, ambas moléculas entran en contacto con las nitroreductasas presentes en *T. cruzi*, descomponiéndose en radicales libres y metabolitos electrofílicos (nitroderivativos) (Rajao, et al., 2014). *T. cruzi* no tiene catalasa o glutatión peroxidasa y su superóxido dismutasa tiene una actividad muy baja; la defensa contra los radicales libres del parásito se basa en glutatión reducido y glutatión conjugado con espermidina, llamado “tripanotión”. Los nitroderivativos secuestran los tioles de estas moléculas de defensa dejando propenso al parásito al ataque de radicales libres, causando estrés oxidativo y la muerte (Coura y Castro, 2002; Hall y Wilkinson, 2012).

El nifurtimox y benznidazol han sido históricamente los únicos medicamentos disponibles para tratar la ECh, sin embargo, ambos presentan varias limitaciones tales como requerir un tratamiento prolongado (60 días). Adicionalmente, causan efectos secundarios importantes, que incluyen dolor articular, dolor muscular, fiebre, pérdida de peso, así como efectos dermatológicos, hematológicos, y neurológicos (Rassi et al., 2010). Finalmente, los costos del tratamiento son elevados y su efectividad en la fase crónica de la enfermedad es cuestionable (Coura y Castro, 2002; Rassi et al., 2010). Por este motivo, desarrollar nuevos compuestos con mejor eficacia para el tratamiento de la ECh es sumamente deseable y necesario (Bermúdez, et al., 2016).

4.6. NUEVAS ALTERNATIVAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ECh

T. cruzi, al igual que los hongos, depende de la síntesis del ergosterol para su viabilidad y proliferación, por lo cual varias investigaciones se han enfocado en la inhibición

de este ruta metabólica mediante el uso de ketoconazole, fluconazole, e itraconazole. Desafortunadamente, todos estos medicamentos fallaron en las pruebas de eficacia contra *T. cruzi* en animales de laboratorio (Urbina, 2001). Finalmente, se identificaron dos compuestos prometedores, el pozaconazole, y el ravuconazole, que inhiben la C-14 esterol demetilasa e impiden el paso de lanesterol a ergosterol, alterando la composición de la membrana plasmática de *T. cruzi*. Sin embargo, la producción de estos compuestos es costosa y laboriosa (Urbina 2001; Urbina, 2009).

4.6.1. FEXINIDAZOL

El 5-nitroimidazole fexinidazol (Sanofi) fue originalmente descubierto como una molécula con gran actividad en contra de *Trichomonas* y *Entamoeba histolytica*, cuyo desarrollo se estancó en las fases preclínicas (Reather y Seidenath, 1983). Recientemente, gracias al programa de desarrollo de nuevos medicamentos para el tratamiento de las enfermedades desatendidas “Drugs for Neglected Diseases Initiative” (DNDi) se han realizado estudios sobre la actividad de nitroimidazoles conocidos y nuevos compuestos, en donde se determinó que el fexinidazol es efectivo para la Tripanosomiasis africana humana (TAH) causada por *Trypanosoma brucei*. La situación actual del fexinidazol se encuentra siendo estudiado en fases clínicas (Torrelee et al. 2014). Adicionalmente, ya se ha probado en varias cepas de *T. cruzi*, mostrando una mayor actividad inhibitoria que el benznidazol y nifurtimox (Bahía et al., 2012).

4.7. VARIABILIDAD GENÉTICA EN *T. CRUZI*

La amplia variabilidad genética de *T. cruzi* fue reconocida a finales de los años 70, época en que se agruparon variantes del parásito en distintos “zimodemos” (ZI, ZII Y ZIII), basados en las isoenzimas del parásito mediante técnicas de electroforesis multilocus de enzimas (MLEE, por sus siglas en inglés) (Barnabé, Brisse y Tibayrenc, 2000). Con el desarrollo de nuevas metodologías moleculares, a finales de la década de los 90, las variantes genéticas de *T. cruzi* fueron agrupadas en los linajes TcI y TcII, y se identificaron también híbridos entre ambos linajes (Zingales et al., 2009). Finalmente, en el año 2009, se llegó a un consenso de expertos en el que se decidió denominar a las distintas variantes genéticas de *T. cruzi* como “unidades discretas de tipificación” (DTUs, por sus siglas en inglés).

Existen siete DTUs reconocidos, TcI a TcVI (Zingales et al., 2009) además de la inclusión de TcBat (Zingales et al., 2012).

El DTU de mayor distribución es TcI (Ocaña et al., 2010). Este DTU predomina en el Ecuador, en donde se ha reportado en Loja (Ocaña et al., 2010) y la provincia de Manabí (Costales et al., 2015). Si bien este DTU predomina en el Ecuador, también existe un reporte de aislados de *T. cruzi* provenientes de pacientes crónicos en la zona costera del Ecuador que pertenecen al “zimodemo III”, actualmente agrupado en TcIV y TcV, (Zingales et al., 2009).

4.8. ENSAYO COLORIMÉTRICO DE VIABILIDAD CELULAR

Existen diversos tipos de ensayos basados en colorimetría, microscopía y fluorescencia que pueden emplearse para evaluar la actividad de medicamentos anti parasíticos *in vitro*. Entre ellos, la colorimetría es la más práctica ya que requiere poca manipulación, es menos costosa y más efectiva (Riss et al., 2013).

Uno de los ensayos colorimétricos más empelados es el de la resazurina (RN), el cual constituye una alternativa simple y de bajo costo. El método tiene un principio de acción, basado en la reducción de la molécula de RN, mediante interacción con enzimas oxidativas propias de la respiración de células vivas. La oxidación de la RN produce resorufina, lo que puede evidenciarse por una variación colorimétrica de púrpura a rojo. Existe una relación directa entre el índice reducción de resazurina y la proliferación de células en el cultivo (Rolon, Vega y Escario, 2016). El ensayo de RN también ha sido ampliamente empleado para estudiar el efecto de diversos químicos sobre *T. cruzi*, por ejemplo cariofileno, eugenol y el mismo benznidazol (Leite, et al., 2013; Rolon, et al., 2016).

4.9. INHIBICIÓN Y LETALIDAD

Para la cuantificación de la acción de un compuesto contra un patógeno, se emplean distintos parámetros. La concentración inhibitoria 50 (IC₅₀), corresponde a la mitad (50%) de la concentración inhibitoria máxima, es decir la concentración del compuesto que inhibe la proliferación del patógeno en un 50% (Sebaugh, 2010). Por otra parte, la concentración letal 50 (LC₅₀), corresponde a la concentración del compuesto que elimina al 50% del patógeno en el ensayo (Sebaugh, 2010). En el presente estudio, se aplican estas dos medidas en distintas fases del ciclo de vida de *T. cruzi*: la IC₅₀ se aplicó a epimastigotes, fase replicativa del parásito, mientras que el cálculo de la LC₅₀ se aplicó a los tripomastigotes, los cuales no se multiplican.

4.10. JUSTIFICACIÓN

Este proyecto analizó la acción del fexinidazol en distintas cepas con mayor (Ecu7, HUMAN) o menor (TRC2377, BJ401) grado de virulencia (Zurita, 2011), dentro del DTU predominante en el Ecuador (TcI). Existen varios estudios *in vitro* de medicamentos contra *T. cruzi* que han empleado ensayos colorimétricos, pero no muchos de ellos han comparado la susceptibilidad de distintas cepas de un mismo DTU. Adicionalmente, como se mencionó anteriormente, *T. cruzi* presenta distintas formas en su ciclo de vida (WHO, 2007), unas adaptadas a la reproducción en insectos vectores (epimastigotes), otras capaces de infectar mamíferos, incluido el hombre (tripomastigotes). Si bien los epimastigotes no infectan seres humanos, en este estudio la acción del fexinidazol fue evaluada *in vitro* en tripomastigotes y epimastigotes. A pesar de que los epimastigotes no tienen relevancia en términos clínicos, constituyen una de las formas replicativas de *T. cruzi* y su mantenimiento en laboratorio es más simple ya que crecen en medio axénico, por lo que frecuentemente se emplean en pruebas iniciales de sensibilidad a medicamentos (Bahía et al., 2012).

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

5.1.1. Evaluar la acción del fexinidazol sobre *T. cruzi in vitro*, y compararlo con la acción de benznidazol; en cepas virulentas y no virulentas del DTU TcI.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

5.2.1. Cultivar y mantener epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi in vitro*, para emplearlos en el proyecto.

5.2.2. Evaluar la sensibilidad al benznidazol y fexinidazol de epimastigotes y tripomastigotes de dos cepas virulentas y dos no virulentas de *T. cruzi* DTU TCI.

5.2.3. Comparar la acción del fexinidazol y benznidazol entre cepas virulentas y no virulentas en tripomastigotes de *T. cruzi*.

6. METODOLOGÍA

6.1. CEPAS DE *T. CRUZI*

Se emplearon cuatro cepas de *T. cruzi* correspondientes al DTU TcI y, adicionalmente, la cepa Sc43, correspondiente al DTU V. Las cepas TcI fueron: HUMAN, una cepa aislada de un paciente con cardiopatía chagásica crónica (Costales et al., 2015); ECUA7, aislada de un paciente asintomático de la ciudad de Piñas, provincia de El Oro (Garzón et al., 2002). Adicionalmente, se utilizaron las cepas TRC2377 y BJ401, ambas aisladas de vectores *Rhodnius ecuadoriensis* (Ocaña et al., 2010). En estudios *in vitro* previos, HUMAN y ECUA7 han presentado mayor infectividad contra células de mamífero que TRC2377 y BJ401 (Cilveti, 2018). Por otro lado, Sc43 es una cepa estándar proveniente de *Triatoma infestans*, aislada en Santa Cruz, Bolivia, para la cual existen valores publicados de IC₅₀ (Aquilino, et al., 2012). Esta cepa se empleó para verificar que los valores de IC₅₀ medidos en el estudio se encontraran dentro de los rangos previstos.

6.2. LÍNEAS CELULARES DE MAMÍFERO

Las células utilizadas para el cultivo de parásitos pertenecían a la línea LL-Mkc2 cuyo origen es del epitelio de riñón de mono *Macaca mulatta*, esta línea celular ha sido previamente empleada en estudios de interacción de células de mamífero con *T. cruzi*.

6.3 CULTIVO DE EPIMASTIGOTES

Las distintas cepas de *T. cruzi* empleadas en el estudio fueron cultivadas en medio nutritivo (LIT) descrito por Fernández, Castellani y Kimura (1996), con 1% de penicilina estreptomicina y suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés) inactivado al calor. Los cultivos fueron mantenidos a temperatura ambiente (25 °C) en frascos de 75 cm² de tapa con filtro (Corning) y fueron revisados en un microscopio invertido (Nikon Eclipse T-5100), tres veces por semana.

6.4. CULTIVO DE CÉLULAS DE MAMÍFERO

Las células LL-Mck2 fueron cultivadas en medio de cultivo “Dublecco Modified Eagle’s Medium” (DMEM) , suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina/estreptomicina y 1% piruvato de sodio. Las células fueron mantenidas en un incubador (Memmert, Schwabach modelo 108) a 37°C, 5% CO₂ y 98% de humedad, y subcultivadas 1:4 semanalmente.

6.5. GENERACIÓN DE CULTIVOS DE TRIPOMASTIGOTES DE *T. cruzi*

Las distintas cepas empleadas en el estudio se encontraban disponibles como epimastigotes. Para generar tripomastigotes, se mantuvieron cultivos axénicos de epimastigotes (como se describe en la sección 6.3.) y se los permitió crecer hasta que alcanzaran la fase estacionaria (una semana, aproximadamente). En estas condiciones, se generan espontáneamente tripomastigotes metacíclicos. Se contaron 1×10^7 parásitos, que fueron centrifugados a 800 x g por 10 minutos. El decantado fue lavado con PBS estéril, centrifugado nuevamente bajo las mismas condiciones, resuspendido en 10 ml de medio DMEM suplementado con FBS y colocado sobre una capa de células LL-Mck2 en un frasco de 75 cm² por 12 horas para que los tripomastigotes metacíclicos invadan las células de mamífero. Finalmente, se eliminaron los epimastigotes restantes con medio DMEM conteniendo 5% de suero de caballo sin inactivar.

6.6. PRODUCCIÓN DE TRIPOMASTIGOTES PARA LOS ENSAYOS *IN VITRO*

Las cepas del estudio (HUMAN, ECUA7, TRC2377, BJ401, Sc43) fueron reproducidas en capas de células LL-Mck2 en frascos de 75 cm². Se emplearon 3×10^6 tripomastigotes por frasco, en 10 ml de medio DMEM, suplementado con 2% de FBS. Las infecciones se realizaron a 37 °C, 98% humedad relativa y 5% CO₂. La menor concentración de FBS en este paso favorece la invasión celular por parte de *T. cruzi*. Los tripomastigotes fueron colectados entre los días 5 y 9 post-infección.

6.7. CURVAS DE CRECIMIENTO DE EPIMASTIGOTES

Con el objetivo de reducir la variabilidad en los ensayos debido a distintas tasas de reproducción de epimastigotes para distintas cepas, se realizaron curvas de crecimiento, intentando que los cultivos de las distintas cepas estén en la misma fase. Para ello, se inocularon 1×10^7 parásitos en 10 ml de medio LIT en un frasco de 25 cm². Posteriormente, se realizaron conteos diarios en una cámara Neubauer. El día en el cual el número de parásitos se estabiliza después de la fase exponencial se consideró como el inicio de la fase estacionaria

6.8. ELABORACIÓN DE CURVA DE TITULACIÓN

Se realizó una curva de titulación en el ensayo colorimétrico para determinar el número adecuado de parásitos que se requiere para los ensayos, empleando una solución de resazurina (Sigma) 3 mM en PBS (Rolón et al., 2016). Para ello, en los primeros dos pocillos de una placa de 96 pocillos se colocaron 2×10^6 parásitos en 200 μ L de medio de cultivo, y se realizaron diluciones seriadas disminuyendo sucesivamente a la mitad el número de parásitos hasta alcanzar 1.56×10^4 . Se añadió la solución de resazurina 3 mM y se la permitió actuar por espacio de 6 horas. Los parásitos reducen la resazurina en resorufina, que puede medirse espectrofotométricamente para determinar el número óptimo de parásitos a emplear en los ensayos (Anexo 3).

6.9. ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE IC₅₀ CON EPIMASTIGOTES

El objetivo de este ensayo es calcular la concentración inhibitoria (IC₅₀) en epimastigotes, contrastando parásitos con medicamento. Para ello, se preparó una solución madre de concentración 40 mM disolviendo 0,110 mg de fexinidazol (Chinain Budapest) en 10 ml de DMSO. Para el benznidazol, la solución madre de 40 mM se preparó con 0,104 mg en 10 ml de DMSO.

Para probar la acción de ambos medicamentos, se realizaron diluciones seriadas entre 1 mM, y 7,8 μ M en un volumen final de 20 μ l de DMSO, tanto para fexinidazol como benznidazol. Posteriormente, se añadieron 180 μ l de una dilución 5×10^6 epimastigotes/ml en medio LIT en una placa de cultivo estéril de 96 pocillos (Costar) (Anexo 4). Cada ensayo

se realizó en triplicado, y con un volumen de 200 µl por pocillo, a una temperatura de 28 °C. Se incluyeron como controles tres pocillos de medio LIT, tres de dilución de epimastigotes sin medicamento, y tres de epimastigotes lisados con Tritón 9% (Anexo 5).

6.10. ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LC₅₀ CON TRIPOMASTIGOTES

El objetivo de este ensayo es calcular la concentración letal (LC₅₀) en tripomastigotes. Se emplearon soluciones madre preparadas como se detalla en la sección 6.9. Y los tripomastigotes fueron obtenidos a través de cultivo celular, como se detalló en la sección 6.6.

Para probar la acción del medicamento, se realizaron diluciones seriadas entre 1mM, y 7,8 µM de fexinidazol y benznidazol, en un volumen de 20 µl. Posteriormente, en los pocillos de una placa de cultivo estéril de 96 pocillos (Costar), se añadieron 180 µl de una dilución que contenía 5×10^6 tripomastigotes/ml en medio DMEM. Se incluyeron como controles tres pocillos de medio DMEM, tres de dilución de tripomastigotes sin medicamento, y tres de tripomastigotes lisados con Tritón 9%

6.11. ENSAYO COLORIMÉTRICO CON RESAZURINA

Se preparó una solución de sal sódica de resazurina (Sigma) 3 mM en PBS estéril, pH 7,4, la cual fue posteriormente esterilizada por filtración y almacenada a 4 °C. Se añadieron 20 µl de dicha solución por cada pocillo de los ensayos detallados en las secciones 6.9 y 6.10, y las placas se incubaron a 37°C por 4 horas en el caso de epimastigotes y 17 horas en el caso de tripomastigotes. La actividad metabólica de los parásitos que sobreviven al medicamento causa que la molécula de resazurina (púrpura) se transforme en resofurina (rosado intenso) (Anexo 6). Este cambio en color se cuantificó midiendo la absorbancia a 490 nm y 630 nm (Riss et al., 2013) en un lector de placas de ELISA ELX-800 (BioTek).

6.12. ANÁLISIS DE DATOS

Se calculó el porcentaje de reducción de resazurina de acuerdo a Goegan et al. (1995):

$$Aw = \frac{ALw - (AHw * Ro) \text{ pocillos con muestra.}}{ALw - (AHw * Ro) \text{ pocillos control.}}$$

Donde Aw= Reducción de resazurina; ALw= valor de absorbancia en la longitud de onda menor; AHw= valor de absorbancia en la longitud de onda mayor Ro= Valor de absorbancia de medio, dividido para el valor de medio con resazurina. Las dos primeras concentraciones de los medicamentos fueron eliminadas del análisis, ya que se determinó que la concentración final de DMSO que contenían (mayor de 5%) es tóxica para los parásitos.

Posteriormente, se aplicaron las funciones IC₅₀ y LC₅₀ del software Prism 7.0 (GraphPad Co), con normalización curvas (Gupta, Gautam, Wennerberg y Aittokallio, 2018). Como primer paso, se transformaron las concentraciones a valores logarítmicos, y se realizó la curva normalizada teniendo en cuenta al control positivo (resazurina completamente reducida) como 100% de valor reducción de resazurina, ajustando el resto de datos de concentración a este valor.

6.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se aplicó un test de Shapiro- Wilk a los valores de IC_{50} Y LC_{50} , y se observó que estos datos no se ajustan a una distribución normal, razón por la cual se procedió a compararlos mediante el test no-paramétrico de Kruskal- Wallis con la corrección Dunn-Bonferroni, la cual multiplica el valor de la significancia por el número de relaciones existentes, utilizando el software SPSS versión 24. (IBM Co.). Las variaciones entre medicamentos por cada cepa se evaluaron mediante el test no-paramétrico U de Mann-Whitney.

7. RESULTADOS

7.1. CURVAS DE CRECIMIENTO

Las curvas de crecimiento se realizaron para observar el comportamiento de los epimastigotes en cultivo axénico. Iniciando con 1×10^7 parásitos, se buscó determinar el tiempo necesario para que los parásitos de cada cepa pasen de la fase de latencia a la fase de crecimiento exponencial y determinar cuántos días tardan en llegar a la fase estacionaria. Dado que los epimastigotes tienen la capacidad de replicarse, determinar estos parámetros es esencial para reducir la variabilidad en los ensayos. Las cepas BJ401, HUMAN y TRC 2377 alcanzaron la fase estacionaria en el séptimo día post-inoculación, ECUA7, por otra parte, tardó ocho días en alcanzar dicha fase. Esto permitió preparar los cultivos con la antelación necesaria antes de la ejecución de los ensayos colorimétricos (Figura 1).

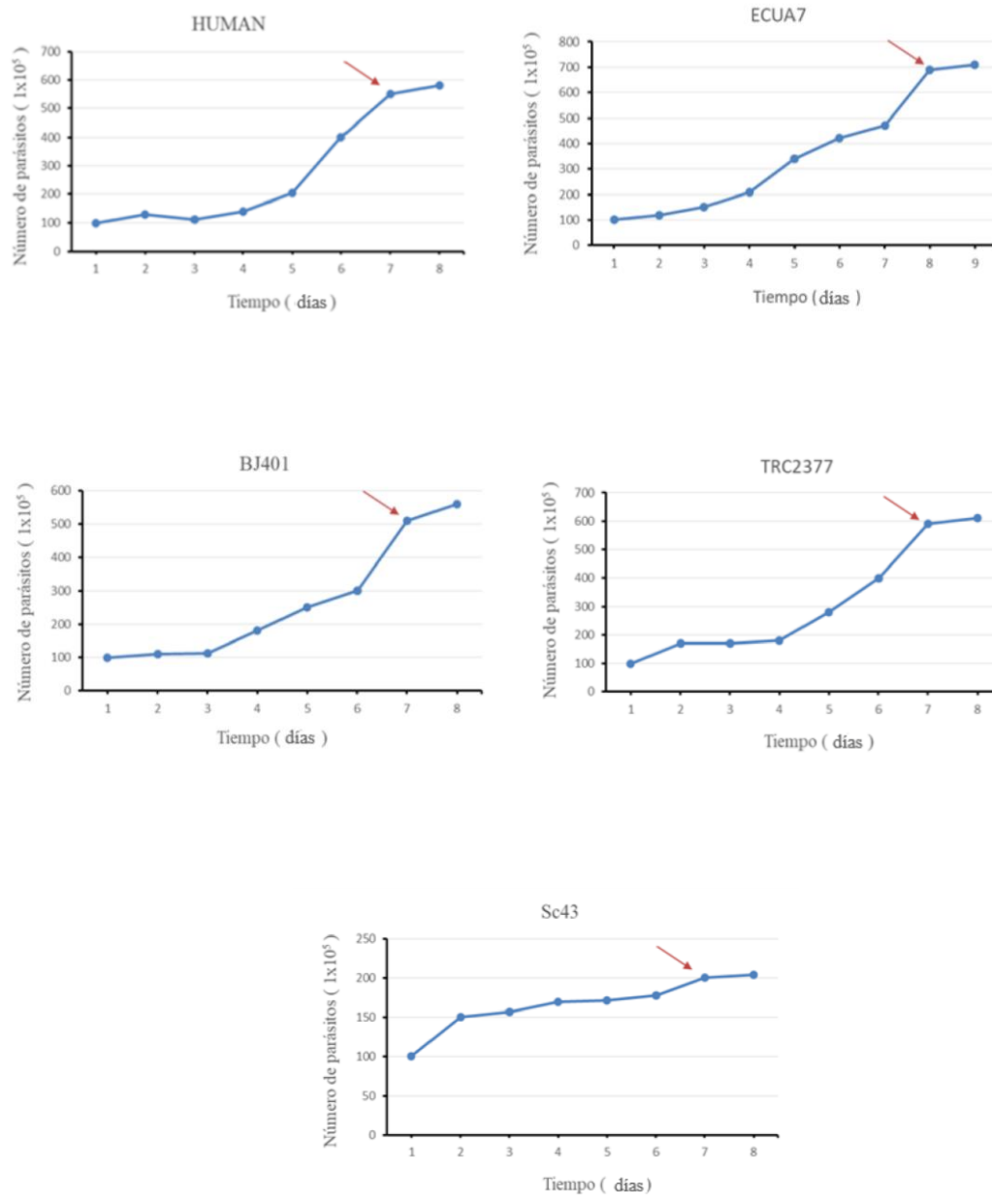


Figura 1. Curvas de crecimiento para las cepas de *T. cruzi* empleadas en el estudio. Las flechas indican el día en el que el cultivo llegó a la fase estacionaria, determinada por conteo microscópico. El día en el cual el número de parásitos se estabiliza después de la fase exponencial se consideró como el inicio de la fase estacionaria.

7.2. CURVAS DE TITULACIÓN

En las curvas de titulación, se determinó que con 1×10^6 epimastigotes/pocillo la absorbancia a 490 nm (correspondiente a la resorufina) se estabiliza alrededor de 2.0 (Figura 2). Por ello, este número de epimastigotes fue empleado en los ensayos colorimétricos posteriores para determinación de IC_{50} .

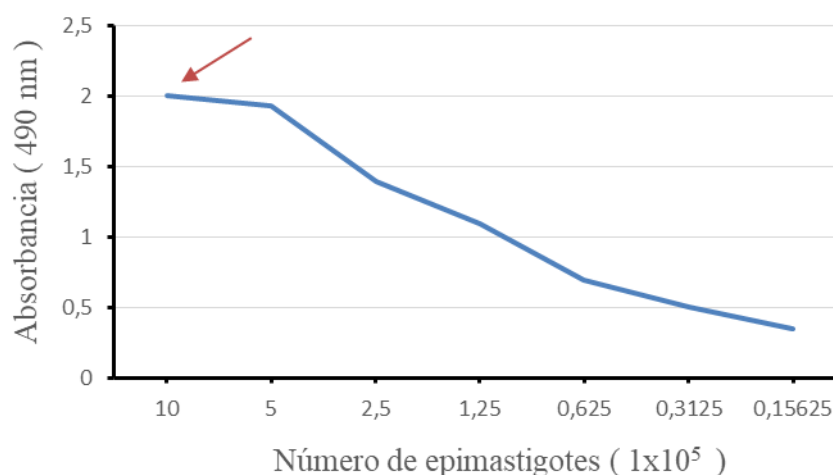


Figura 2. Curva de titulación epimastigotes. Diluciones seriales de entre 1×10^6 y 1.56×10^4 epimastigotes de la cepa HUMAN fueron preparadas en un volumen de 200 μ l en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 20 μ l de resazurina 3 mM/pocillo y se incubó a 25°C por 4 horas. Posteriormente, la absorbancia fue determinada espectrofotométricamente a 490 nm. La flecha indica el número de parásitos que se eligió para realizar el experimento. La curva muestra los valores promedio entre los dos replicados técnicos incluidos en la misma placa.

En el caso de los tripomastigotes, 1×10^6 parásitos/pocillo producen una reducción de resazurina correspondiente a una absorbancia de alrededor de 0.5 a 490 nm (Figura 3). Si bien un número mayor de tripomastigotes puede aumentar la señal, debido al costo de aumentar el número de parásitos, así como la posible interferencia que los mismos causarían en las lecturas, se eligió 1×10^6 parásitos/pocillo para los ensayos de LC_{50} .

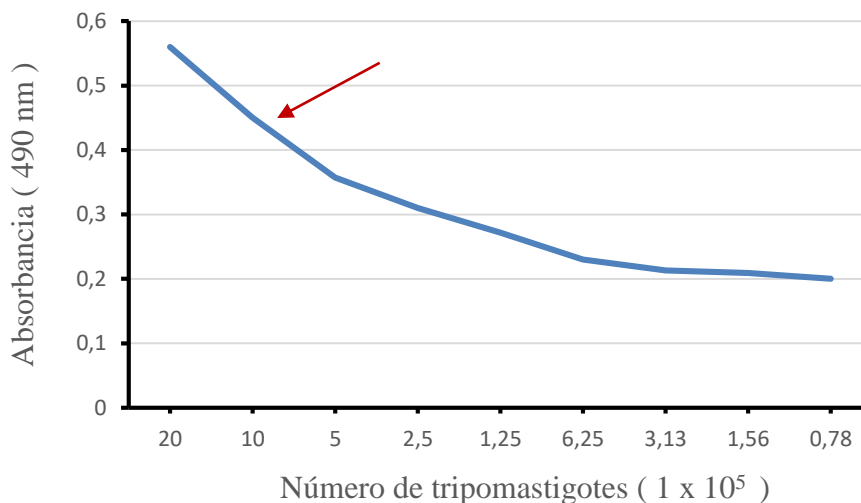


Figura 3. Curva de titulación tripomastigotes. Diluciones seriales de entre 2×10^6 y $7,8 \times 10^3$ tripomastigotes de la cepa HUMAN en medio DMEM 2% FBS fueron preparadas en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 20 μ l de resazurina 3 mM por pocillo, y la absorbancia determinada espectrofotométricamente a 490 nm 4 horas después. La flecha indica el número de parásitos que fue seleccionado para los ensayos posteriores. La curva muestra los valores promedio entre los dos replicados técnicos incluidos en la misma placa.

7.3. COMPARACIÓN ENTRE CEPAS

Para epimastigotes, se realizaron entre uno y dos ensayos por cepa (por triplicado) con fexinidazol (Tabla 1) y entre uno y tres ensayos (por triplicado) para benznidazol (Tabla 2). Las medianas para los valores de (IC_{50}) determinados en los distintos ensayos independientes se presentan en la Figura 4. Las curvas de regresión cuadrática realizadas para obtener los valores presentados se encuentran en los Anexos 7 y 8.

Tabla 1. Sensibilidad de epimastigotes de las distintas cepas al fexinidazol. Se indican los valores de IC₅₀ obtenidos en distintos ensayos con epimastigotes.

Ensayos	IC50 (μM)					
	1			2		
Cepas	1	2	3	1	2	3
HUMAN	15,88	15,36	19,44			
ECUA7	4,839	3,804	3,391			
TRC2377	3,45	2,967	9,407	3,285	3,655	3,894
BJ401	13,31	6,427	10,78	8,658	5,683	5,069
Sc43	34,78	30,46	30,3			

Tabla 2. Sensibilidad de epimastigotes de las distintas cepas al benznidazol. Se indican los valores de IC₅₀ obtenidos en distintos ensayos con epimastigotes.

Ensayos	IC50 (μM)								
	1			2			3		
Cepas	1	2	3	1	2	3	1	2	3
HUMAN	25,56	27,27	26,86	22,63	30,62	17,52			
ECUA7	5,446	6,963	8,039	13,46	19,85	10,54	10,38	10,99	18,44
TRC2377	3,07	3,296	3,48	3,09	3,287	2,91			
BJ401	3,45	2,967	9,407						
Sc43	19,06	28,75	20,7						

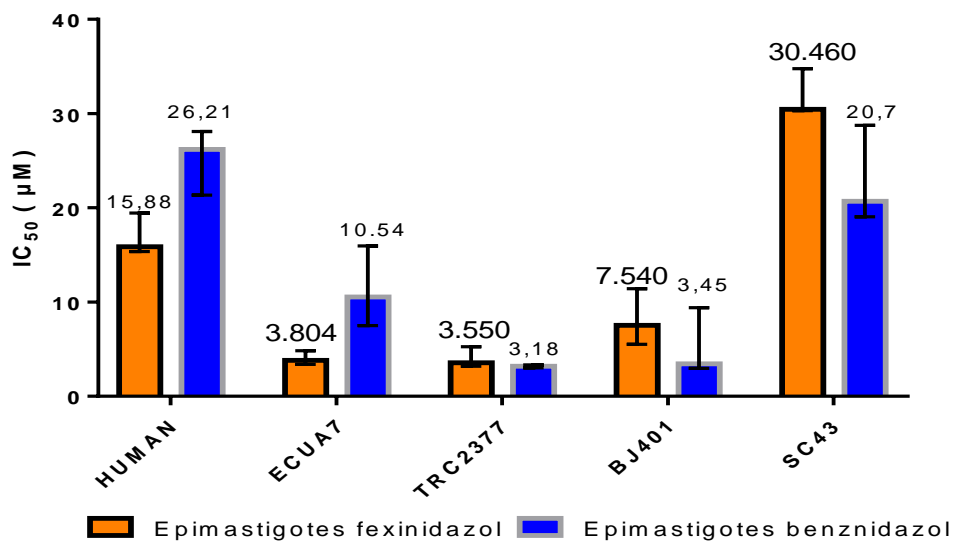


Figura 4. Mediana de los valores de IC_{50} para epimastigotes con fexinidazol y benznidazol. Se muestran la mediana de los valores IC_{50} obtenidos para epimastigotes de las diferentes cepas de *T. cruzi*. El eje Y representa los valores de IC_{50} (μM). Las barras de desviación corresponden a la dispersión intercuartílica.

Para tripomastigotes se realizaron entre uno tres ensayos (por triplicado) cada cepa para fexinidazol (Tabla 3) y benznidazol (Tabla 4). Las medianas para los valores de las pruebas de letalidad (LC_{50}) se presentan en la Figura 5. Las curvas de regresión cuadrática realizadas para obtener los valores presentados se encuentran en los Anexos 9 y 10.

Tabla 3. Sensibilidad de tripomastigotes de las distintas cepas al fexinidazol. Se indican los valores de LC₅₀ obtenidos en distintos ensayos con tripomastigotes.

Ensayos	LC50 (μ M)								
	1			2			3		
Cepas	1	2	3	1	2	3	1	2	3
HUMAN	7,243	16,93	15,97	6,866	8,085	8,388			
ECUA7	4,511	4,54	4,536	3,483	4,478	3,872			
TRC2377	3,708	3,993	3,897	3,184	3,215	3,73	3,014	3,153	3,332
BJ401	2,938	3,961	3,039						
Sc43	3,953	4,552	4,2						

Tabla 4. Sensibilidad de tripomastigotes de las distintas cepas al benznidazol. Se indican los valores de LC₅₀ obtenidas en distintos ensayos con tripomastigotes.

Ensayos	LC50 (μ M)								
	1			2			3		
Cepas	1	2	3	1	2	3	1	2	3
HUMAN	6,626	8,146	7,311	6,773	5,886	5,55	6,716	4,312	5,582
ECUA7	4,838	6,041	5,732	11,64	10,54	15,93			
TRC2377	3,358	4,017	4,37	4,361	3,974	5,163	2,534	2,427	2,543
BJ401	4,261	2,85	2,887	6,226	4,753	4,37	3,813	2,953	4,888
Sc43	3,316	3,92	6,214						

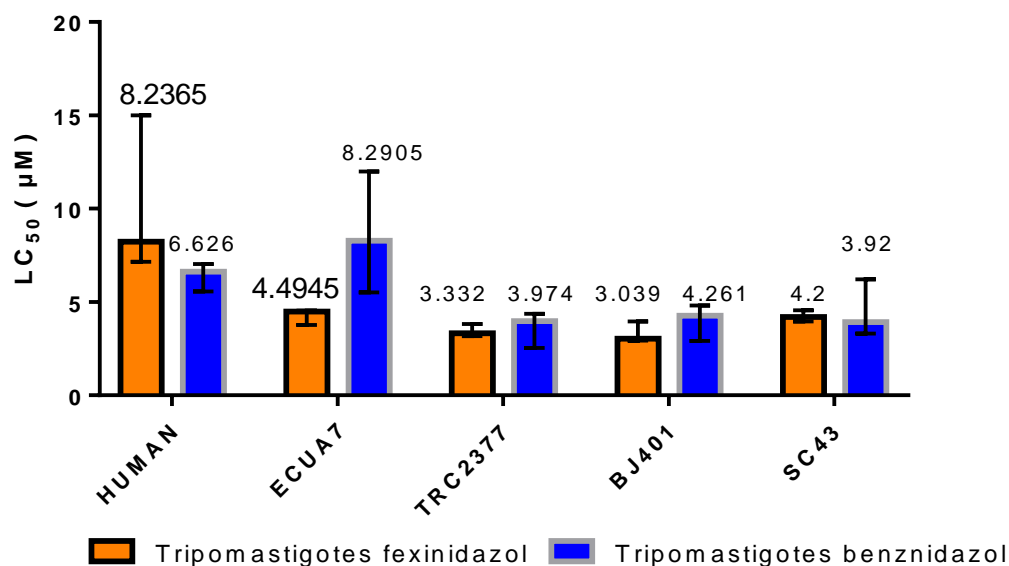


Figura 5. Mediana de los valores de LC₅₀ para tripomastigotes fexinidazol y benznidazol. Se muestran la mediana de los valores LC₅₀ obtenidos en tripomastigotes para las diferentes cepas de *T. cruzi*. El eje Y representa los valores de LC₅₀ (µM). Las barras de desviación corresponden a la dispersión intercuartílica.

En las comparaciones entre epimastigotes de distintas cepas, se obtuvieron diferencias significativas de los valores de IC₅₀ (valor de $\rho < 0,05$ en el test de Kruskal-Wallis) tanto con fexinidazol ($\rho = 0,007$) (Anexo 11) como con benznidazol ($\rho = 0,000$) (Anexo 12). Al comparar los valores de LC₅₀ de cada cepa de tripomastigotes se obtuvieron diferencias significativas para fexinidazol ($\rho = 0,001$) (Anexo 13) y para benznidazol ($\rho = 0,001$) (Anexo 14).

Para realizar comparaciones entre cada una de las cepas se aplicó la prueba de Kruskal- Wallis con la corrección de Dunn- Bonferroni. Para epimastigotes tratados con fexinidazol se encontraron diferencias significativas entre las cepas HUMAN y TRC2377 ($\rho = 0,012$) y entre HUMAN y ECUA7 ($\rho = 0,05$) (Anexo 15 y Figura 6). Para epimastigotes tratados con benznidazol existe variación significativa entre las cepas HUMAN y TRC2377 ($\rho = 0,000$) y entre HUMAN y BJ401 ($\rho = 0,028$) (Anexo 16 y Figura 7).

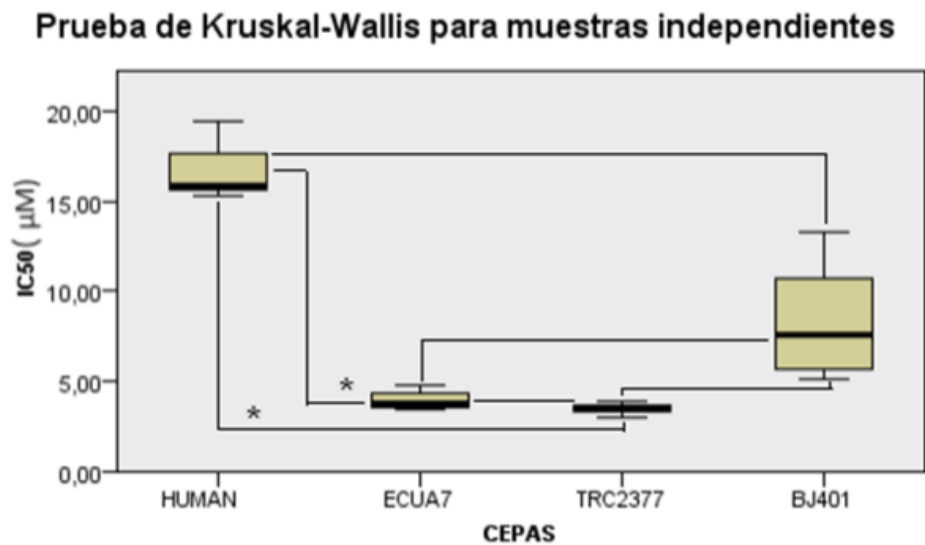


Figura 6. Sensibilidad al fexinidazol de epimastigotes de cepas de *T. cruzi* DTU

I. Se muestra la comparación entre los valores de IC₅₀ mediante el test de Kruskal- Wallis para muestras independientes con la corrección de Dunn- Bonferroni para las cepas usadas en el estudio. Los asteriscos indican diferencias significativas.

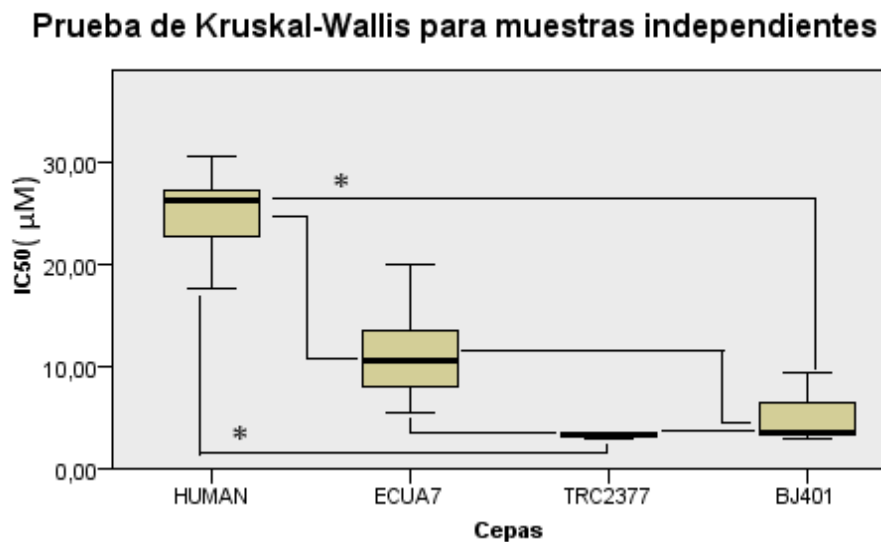


Figura 7. Sensibilidad al benznidazol de epimastigotes de cepas de *T. cruzi* DTU

I. Se muestra la comparación entre los valores de IC₅₀ mediante el test de Kruskal- Wallis para muestras independientes con la corrección de Dunn- Bonferroni para las cepas usadas en el estudio. Los asteriscos indican diferencias significativas.

El mismo test fue aplicado para realizar comparaciones entre parejas de cepas de tripomastigotes. Para los parásitos tratados con fexinidazol se identificó variación entre las cepas HUMAN y TRC2377 ($\rho= 0,001$) y HUMAN y BJ401 ($\rho= 0,022$) (Anexo 17 y Figura 8). Un resultado similar se obtuvo para tripomastigotes tratados con benznidazol. Existen diferencias significativas entre HUMAN y TRC2377 ($\rho= 0,009$); HUMAN y BJ401 ($\rho= 0,001$) (Anexo 18 y Figura 9). Los resultados fueron resumidos en la tabla 5.

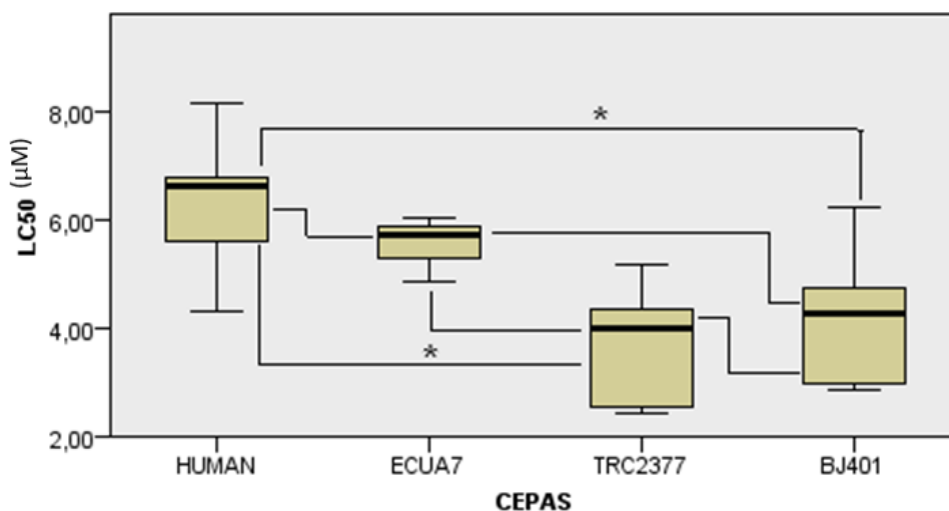


Figura 8. Sensibilidad de tripomastigotes de cepas de *T. cruzi* DTU I al fexinidazol. Se muestra la comparación entre los valores de LC₅₀ mediante el test de Kruskal- Wallis para muestras independientes con la corrección de Dunn- Bonferroni para las cepas usadas en el experimento. Los asteriscos indican diferencias significativas.

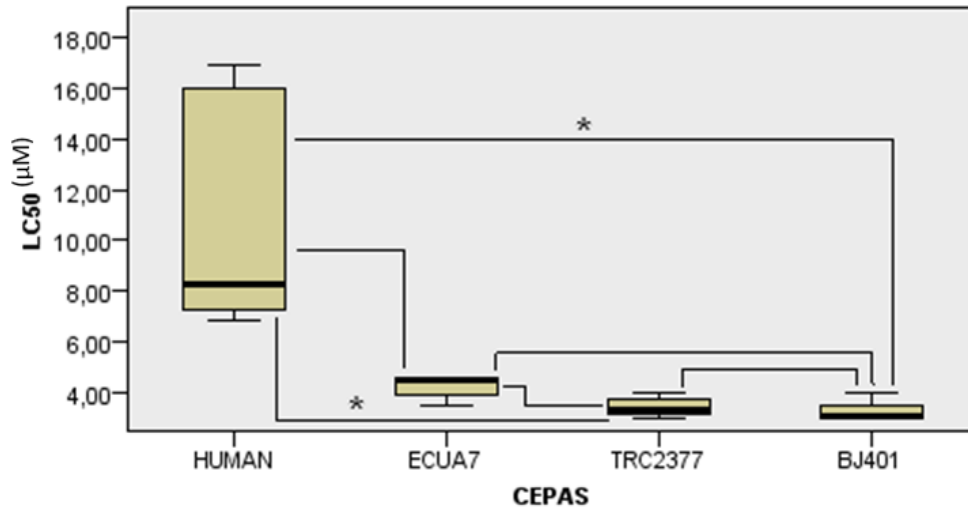


Figura 9. Sensibilidad de tripomastigotes de cepas de *T. cruzi* DTU I al benznidazol. Se muestra la comparación entre los valores de LC_{50} mediante el test de Kruskal- Wallis para muestras independientes con la corrección de Dunn- Bonferroni para las cepas usadas en el estudio. Los asteriscos indican diferencias significativas.

Tabla 5. Comparación de la sensibilidad al fexinidazol y benznidazol de epimastigotes y tripomastigotes de las cepas de *T. cruzi* empleadas en el estudio. Se muestran los niveles de significancia de comparación Kruskal- Wallis para muestras independientes con la corrección de Dunn- Bonferroni entre pares de cepas. ^{NS} Diferencias no significativas, * Diferencias significativas.

Comparación de Cepas	Epimastigotes		Tripomastigotes	
	Fexinidazol	Benznidazol	Fexinidazol	Benznidazol
HUMAN-ECUA7	0,05 *	0,305 ^{NS}	0,435 ^{NS}	1,000 ^{NS}
HUMAN-TRC2377	0,012 *	0,000 *	0,009 *	0,001 *
HUMAN-BJ401	1,000 ^{NS}	0,028 *	0,001 *	0,022 *
ECUA7-TRC2377	0,210 ^{NS}	0,071 ^{NS}	0,535 ^{NS}	0,219 ^{NS}
ECUA7- BJ401	0,614 ^{NS}	0,864 ^{NS}	0,487 ^{NS}	0,737 ^{NS}
TRC2377- BJ401	1,000 ^{NS}	1,000 ^{NS}	1,000 ^{NS}	1,000 ^{NS}

7.4. COMPARACIÓN ENTRE LA ACTIVIDAD DE FEXINIDAZOL Y BENZNIDAZOL

Los valores de IC_{50} y LC_{50} obtenidos se utilizaron también para comparar la acción de ambos medicamentos entre cada cepa, usando la prueba de U de Mann-Whitney. Se identificaron diferencias entre la sensibilidad al fexinidazol y benznidazol para los epimastigotes de las cepas: la cepa HUMAN fue más susceptible al benznidazol ($\rho=0,048$, Figura 10), la cepa ECUA7 fue más susceptible al fexinidazol ($\rho=0,009$, Figura 11). Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas en la acción de los nitroderivativos para las cepa TRC 2377 ($\rho=0,329$, Figura 12) ni para la cepa BJ401 ($\rho=0,262$, Figura 13). Finalmente, la cepa Sc43 fue más sensible al fexinidazol ($\rho=0,002$, Figura 14).

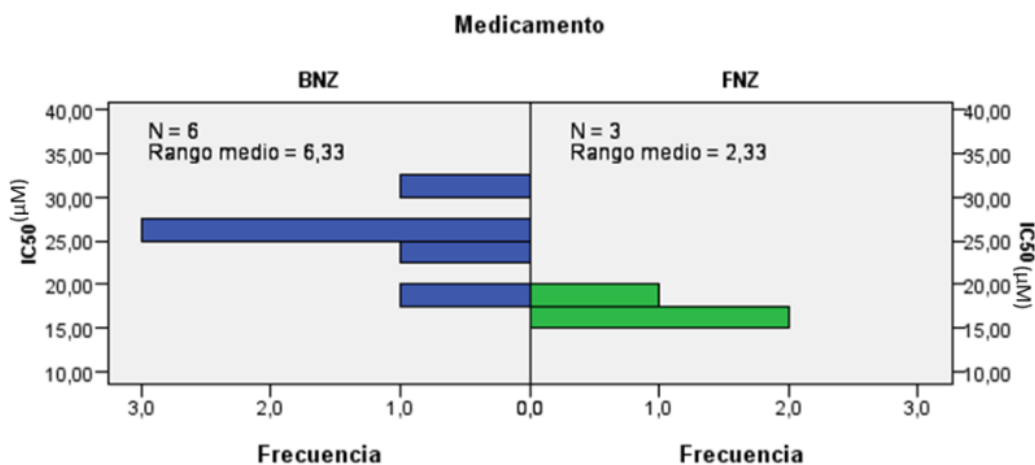


Figura 10. Comparación de sensibilidad de epimastigotes de la cepa HUMAN al benznidazol y fexinidazol. Se muestra la comparación U de Mann-Whitney entre los valores de IC_{50} para benznidazol y fexinidazol correspondientes epimastigotes de la cepa HUMAN. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas, con una mayor sensibilidad de los parásitos al fexinidazol. BNZ = benznidazol y FNZ = fexinidazol.

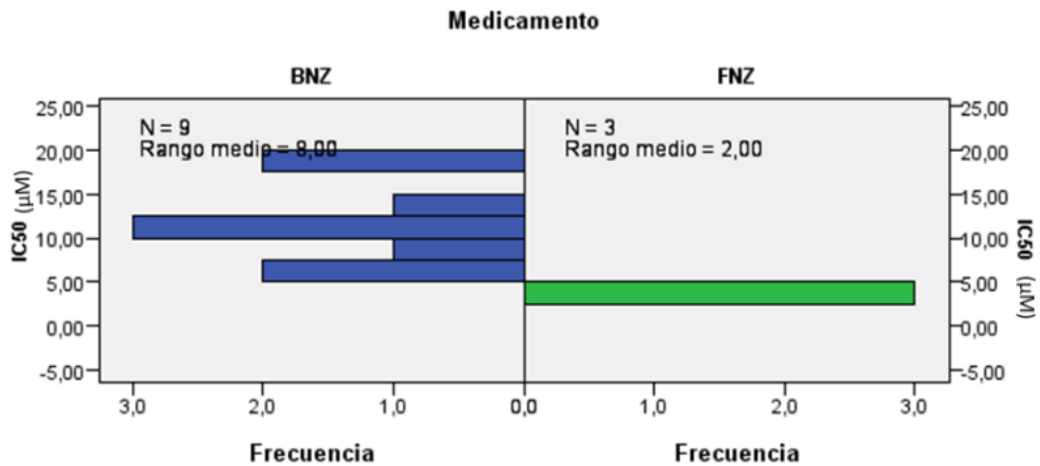


Figura 11. Comparación de sensibilidad de epimastigotes de la cepa ECUA7 al benznidazol y fexinidazol. Se muestra la comparación U de Mann-Whitney entre los valores de IC₅₀ para benznidazol y fexinidazol correspondientes epimastigotes de la cepa ECUA7. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas, con una mayor sensibilidad de los parásitos al fexinidazol. BNZ =benznidazol y FNZ = fexinidazol.

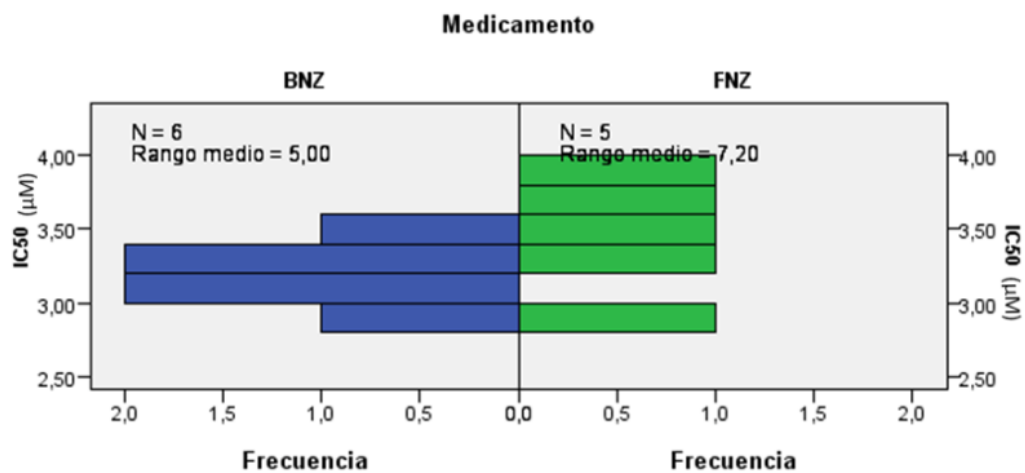


Figura 12. Comparación de sensibilidad de epimastigotes de la cepa TRC2377 al benznidazol y fexinidazol. Se muestra la comparación U de Mann-Whitney entre los valores de IC₅₀ para benznidazol y fexinidazol correspondientes epimastigotes de la cepa TRC2377. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas. BNZ = benznidazol y FNZ = fexinidazol.

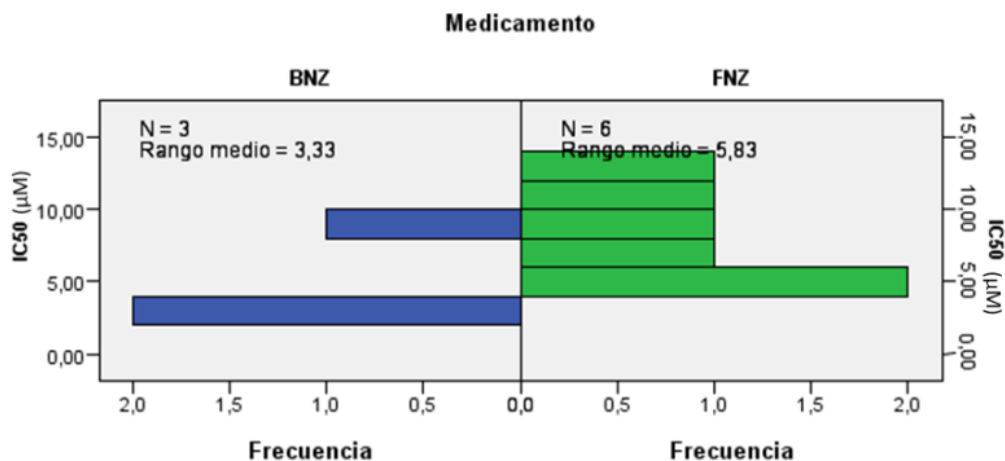


Figura 13. Comparación de sensibilidad de epimastigotes de la cepa BJ401 al benznidazol y fexinidazol. Se muestra la comparación U de Mann-Whitney entre los valores de IC₅₀ para benznidazol y fexinidazol correspondientes a epimastigotes de la cepa BJ401. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas. BNZ = benznidazol y FNZ = fexinidazol.

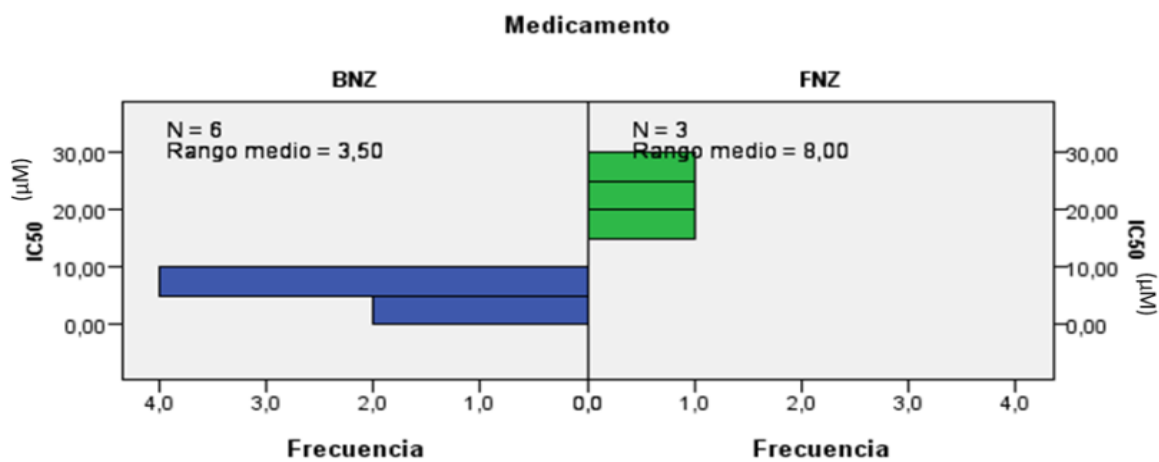


Figura 14. Comparación de sensibilidad de epimastigotes de la cepa Sc43 al benznidazol y fexinidazol. Se muestra la comparación U de Mann-Whitney entre los valores de IC₅₀ para benznidazol y fexinidazol, correspondientes a epimastigotes de la cepa Sc43. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas, siendo los parásitos más sensibles al benznidazol. BNZ = benznidazol y FNZ = fexinidazol.

En el caso de los tripomastigotes las cepas: HUMAN y ECUA7 tuvieron variación entre la acción de los medicamentos: ($p= 0,008$) y ($p= 0,024$), respectivamente, siendo más susceptibles al fexinidazol HUMAN y al benznidazol ECUA7 (Figuras 15 y 16). Por el contrario, no se mostraron diferencias significativas entre los medicamentos para las cepas TRC 2377 ($p= 0,489$, Figura 17), BJ401 ($p= 0,262$, Figura 18) ni Sc43 (Sig.=0,700, Figura 19). Los resultados fueron resumidos en la Tabla 6.

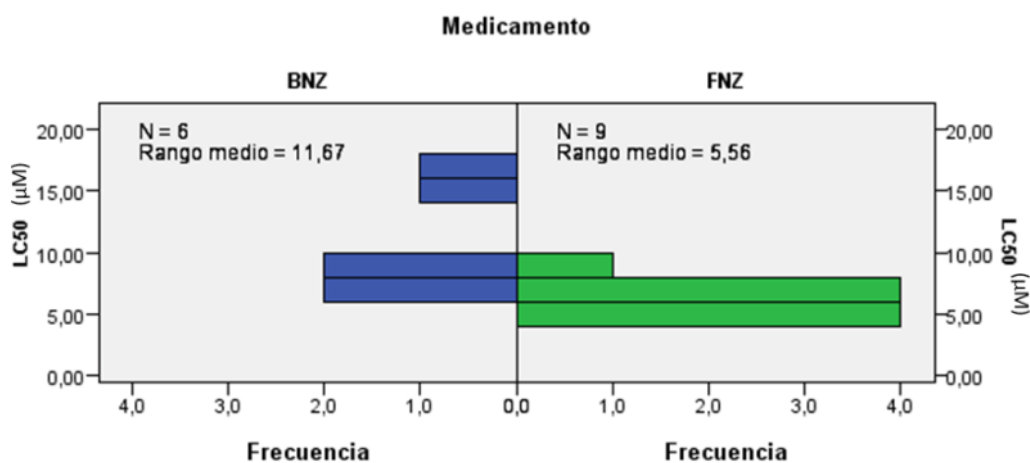


Figura 15. Comparación de sensibilidad de tripomastigotes de la cepa HUMAN al benznidazol y fexinidazol. Se muestra la comparación U de Mann-Whitney entre los valores de LC_{50} para benznidazol y fexinidazol correspondientes tripomastigotes de la cepa HUMAN. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas, siendo los parásitos más sensibles al fexinidazol. BNZ=benznidazol y FNZ= fexinidazol.

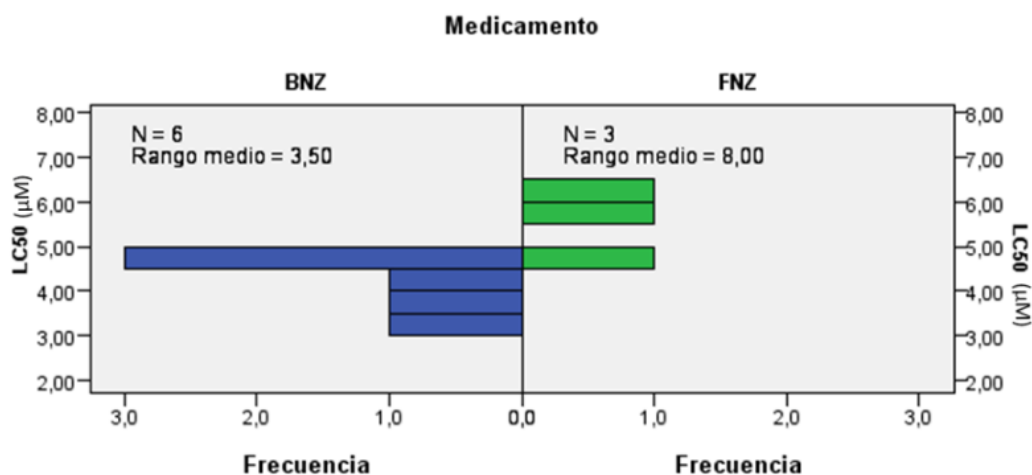


Figura 16. Comparación de sensibilidad de tripomastigotes de la cepa ECUA7 al benznidazol y fexinidazol. Se muestra la comparación U de Mann-Whitney entre los valores de LC₅₀ para benznidazol y fexinidazol correspondientes a tripomastigotes de la cepa ECUA7. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas, siendo los parásitos más sensibles al benznidazol. BNZ=benznidazol y FNZ=fexinidazol. BNZ=benznidazol y FNZ=fexinidazol.

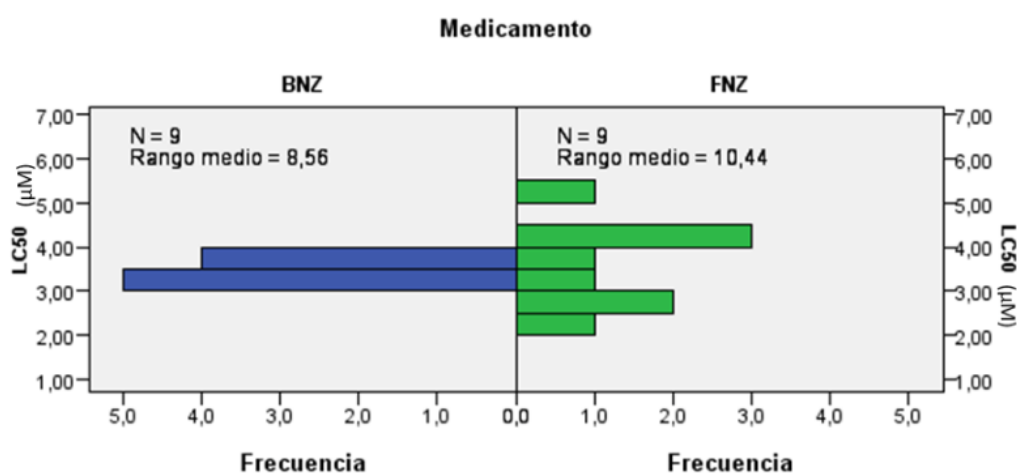


Figura 17. Comparación de sensibilidad de tripomastigotes de la cepa TRC2377 al benznidazol y fexinidazol. Se muestra la comparación U de Mann-Whitney entre los valores de LC₅₀ para benznidazol y fexinidazol correspondientes a tripomastigotes de la cepa TRC2377. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas. BNZ=benznidazol y FNZ=fexinidazol. BNZ=benznidazol y FNZ=fexinidazol.

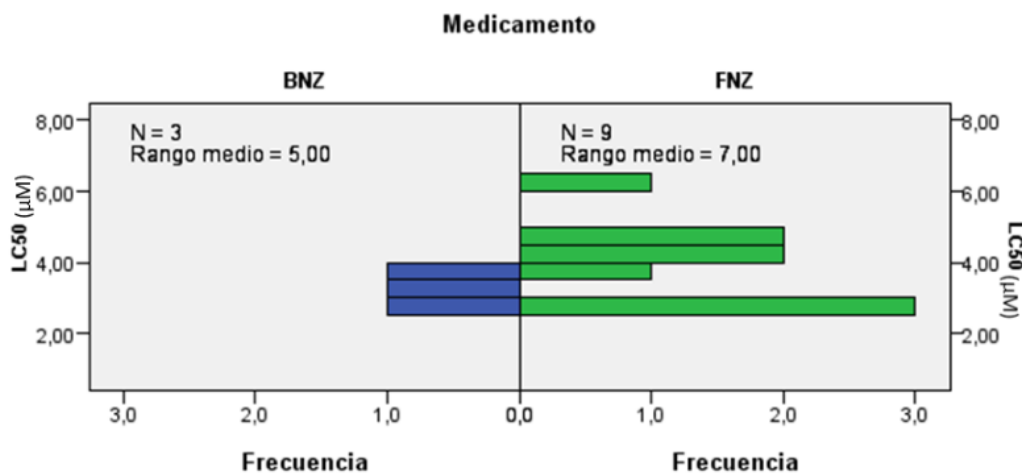


Figura 18. Comparación de sensibilidad de tripomastigotes de la cepa BJ401 al benznidazol y fexinidazol. Se muestra la comparación U de Mann-Whitney entre los valores de LC₅₀ para benznidazol y fexinidazol correspondientes a tripomastigotes de la cepa BJ401. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas. * BNZ=benznidazol y FNZ= fexinidazol.

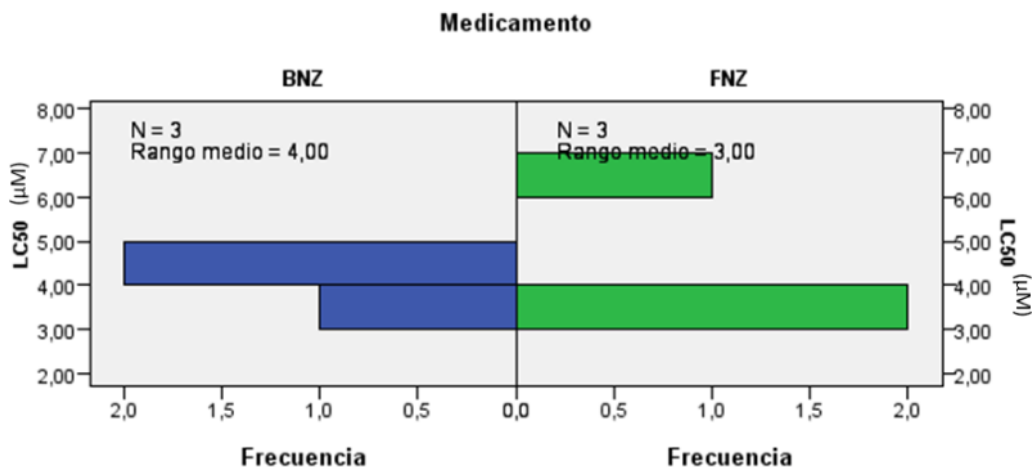


Figura 19. Comparación de sensibilidad de tripomastigotes de la cepa Sc43 al benznidazol y fexinidazol. Se muestra la comparación U de Mann-Whitney entre los valores de LC₅₀ para benznidazol y fexinidazol correspondientes a tripomastigotes de la cepa Sc43. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas. BNZ=benznidazol y FNZ= fexinidazol.

Tabla 6. Comparación de la actividad del fexinidazol y benznidazol en las cepas estudiadas. Se muestran los niveles de significación en la prueba de U de Mann- Withney. ^{NS} Diferencias no significativas, * Diferencias significativas. Cuando existieron diferencias significativas, el medicamento al cual la cepa fue más sensible se indica entre paréntesis.

	Epimastigotes	Tripomastigotes
Cepa	Fexinidazol- Benznidazol	Fexinidazol- Benznidazol
HUMAN	0,048 * (Fexinidazol)	0,008 * (Fexinidazol)
ECUA7	0,009 * (Fexinidazol)	0,024 * (Benznidazol)
TRC2377	0,329 ^{NS}	0,489 ^{NS}
BJ401	0,262 ^{NS}	0,262 ^{NS}
Sc43	0,002 * (Benznidazol)	0,700 ^{NS}

8. DISCUSIÓN

Para determinar sensibilidad de *T. cruzi* frente a fexinidazol y benznidazol en los ensayos colorimétricos *in vitro*, primero fue importante determinar la velocidad a la que los cultivos de epimastigotes llegan a la fase estacionaria, con la finalidad de minimizar la variabilidad de los ensayos. Fue posible determinar que los cultivos de todas las cepas empleadas alcanzaron la fase estacionaria 7 días después de iniciar el cultivo, a excepción de la cepa ECUA7, que alcanzó la fase estacionaria 24 horas después que el resto. Los epimastigotes no pueden infectar mamíferos, y únicamente se replican en el tracto digestivo de los vectores. Sin embargo, son muchas veces empleados para medir la toxicidad de químicos sobre *T. cruzi*, dada la facilidad de multiplicarlos en cultivo axénico, lo cual no es posible con tripomastigotes. Las mediciones de IC₅₀ en epimastigotes presentaron variaciones más amplias que las de LC₅₀ en tripomastigotes. Dado que los epimastigotes son formas replicativas, existe siempre la posibilidad de que su multiplicación durante el ensayo incremente la variabilidad. Los tripomastigotes, al no multiplicarse, facilitan la reproducibilidad del ensayo, y además son una fase del ciclo de vida relevante para la infección en seres humanos.

Por otra parte, una debilidad de la metodología inicialmente planteada para las diluciones de medicamentos fue identificada durante el transcurso del trabajo. El esquema de dilución de los medicamentos empleado en el estudio conllevaba a que hubiera una concentración de DMSO de 10% y 5% en el primer y segundo pocillos de la placa, respectivamente. Estudios previos (Galvao et al., 2014), indican que concentraciones de DMSO mayores al 3% influyen sobre la viabilidad celular. Asimismo, experimentos realizados en nuestro laboratorio (Andrea Vela, Bruno Oury, resultados no publicados), han mostrado que concentraciones de DMSO mayores al 3% afectan directamente a *T. cruzi* en los ensayos *in vitro*. Para evitar este efecto del diluyente, se eliminaron las dos diluciones más altas de los cálculos posteriores, ya que no sería posible distinguir la toxicidad causada por los medicamentos de la causada por el DMSO a estas concentraciones, afectando los resultados.

Adicionalmente, si bien este estudio se enfocaba principalmente en cepas pertenecientes al DTU I, la cual constituye el linaje genético más importante de *T. cruzi* en nuestro país, también incluimos en el panel a la cepa Sc43, DTU V. Se había reportado

anteriormente un valor de IC₅₀ de 21,4 µM para benznidazol la cepa Sc43 (Aquilino et al., 2012). Por ese motivo, incluimos esta cepa en nuestro estudio. El valor promedio de IC₅₀ reportado para la cepa Sc43 en nuestros ensayos fue de 18,67 µM, muy similar al previamente reportado, lo que proporcionó más confianza en los resultados obtenidos en este estudio.

T. cruzi es una especie altamente variable en cuanto a su genética. Además de que se reconocen seis linajes principales (DTUs TcI-TcVI), existe también variabilidad dentro de los linajes. Es así que el linaje TcI está ampliamente distribuido desde el norte de Argentina y Chile hasta el Sur de los Estados Unidos, y presenta una gran variabilidad genética intra-linaje (Llewellyn et al., 2009). En este estudio, encontramos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la susceptibilidad tanto a fexinidazol como a benznidazol entre las cepas de TcI estudiadas, tanto en IC₅₀ en epimastigotes como en LC₅₀ en tripomastigotes. Dado que estas cepas del parásito no han sido previamente expuestas a ninguno de los dos medicamentos, estos resultados sugieren que existen distintos niveles de resistencia natural a los medicamentos que dependen de características biológicas genéticamente determinadas.

En cuanto a los resultados de los ensayos con tripomastigotes, que son una fase del ciclo de vida relevante para la infección humana, se encontró que la cepa HUMAN es la más resistente tanto al benznidazol como al fexinidazol, seguida de la cepa Ecu 7. Estas dos cepas fueron aisladas de hospederos humanos: HUMAN se obtuvo de un paciente salvadoreño, cuyo daño cardíaco fue tan marcado, que requirió un trasplante de corazón (Costales, et al., 2015), mientras que la segunda fue aislada de un paciente ecuatoriano asintomático (Garzón, et al., 2002). Estas dos cepas son también más agresivas *in vitro* en cuanto a la infección de células de mamífero en comparación a las cepas BJ401 y TRC2377 (Cilveti, 2018). Si bien se podría especular que la mayor resistencia a los fármacos está asociada también a cepas de mayor agresividad sobre células de mamífero *in vitro*, sería todavía necesario estudiar una cantidad más amplia de cepas para ver si esta tendencia se mantiene.

Si bien el patrón de sensibilidad a los medicamentos estudiados no es exactamente igual cuando se comparan las respuestas de epimastigotes y tripomastigotes, la cepa HUMAN sigue siendo la más resistente en ambas fases del ciclo de vida del parásito. Los tripomastigotes de la cepa SC43 mostraron mayor sensibilidad a ambos medicamentos que

los epimastigotes, mientras que las cepas ECUA7, TRC2377 y BJ401 fueron las más sensibles al benznidazol y fexinidazol.

Estudios previos han clasificado la resistencia de distintas cepas del parásito en tres categorías: sensibles ($IC_{50} < 6 \mu M$), parcialmente resistentes ($IC_{50} < 21 \mu M$) y resistentes ($IC_{50} > 21 \mu M$) (Mejía, et al 2012). Basándonos en esta clasificación, podemos aplicar estos valores a las medianas de los valores de LC_{50} obtenidos para cada una de las cepas, podemos decir que los tripomastigotes cepas HUMAN y ECUA7 son parcialmente resistentes tanto al fexinidazol como al benznidazol, mientras que el resto de cepas estudiadas son susceptibles. Los resultados son más variables en cuanto al IC_{50} de los epimastigotes, donde el mismo patrón general se mantiene, pero los parásitos son más resistentes, especialmente los epimastigotes de HUMAN que son resistentes al benznidazol y los de SC43, que son parcialmente resistentes al benznidazol y resistentes al fexinidazol. Esto provee de más apoyo a la idea de que los valores de IC_{50} en epimastigotes no necesariamente son buenos predictores del LC_{50} en tripomastigotes.

Los resultados muestran que la actividad del fexinidazol y el benznidazol son muy similares en los tripomastigotes de las cepas estudiadas. Sin embargo, una de las limitaciones del tratamiento con benznidazol es que se necesitan altas dosis y bastante frecuentes 5 a 7 mg/kg/ día, mientras que la farmacocinética del fexinidazol se ha estudiado en animales de laboratorio, mostrando que es bien asimilado y distribuido hacia los órganos afectados con *T. cruzi*, permitiendo que el medicamento pueda permanecer más tiempo dentro del organismo, reduciendo la frecuencia de administración. Por otra parte, se ha determinado que el fexinidazol es más tolerable que el benznidazol en ensayos de infección *in vivo* tanto contra *T. cruzi* como contra *T. brucei* (Torrelee, 2013). Además el fexinidazol posee una baja genotoxicidad, y no existen cambios cardíacos o de índole neuronal durante el tiempo de duración del tratamiento (Torrelee, 2013). Adicionalmente, se ha observado que el fexinidazol reduce notablemente la miocarditis durante la infección experimental con *T. cruzi* en animales de laboratorio (Bahía et al., 2012).

Teniendo en cuenta todas estas ventajas y potencial del fexinidazol para tratamiento del ECh, este estudio pretende determinar si este medicamento es efectivo sobre varias cepas de TcI, el linaje más extendido en América Latina y el predominante en Ecuador. Los resultados sugieren que si bien hay cepas con una mayor resistencia natural al fexinidazol,

este fármaco tiene una efectividad similar a la del benznidazol. Teniendo en cuenta que es un químico menos tóxico, podría representar una alternativa preferible al benznidazol, si es que los ensayos clínicos que están siendo llevados a cabo actualmente en Cochabamba, Bolivia (Clinical trials, 2015), muestran resultados prometedores en sujetos humanos. Los resultados de este estudio brindan soporte adicional al potencial del fexinidazol, el cual, al tener similar eficacia que el benznidazol, puede ser una buena alternativa en casos de fallo terapéutico.

Basándonos en la experiencia adquirida en este estudio, para futuros estudios con fexinidazol recomendaríamos emplear preferiblemente ensayos con tripomastigotes y no epimastigotes. Si bien estos últimos pueden mantenerse en cultivo axénico, no siempre brindan resultados comparables con tripomastigotes, que son más relevantes para la infección en humanos. También sería conveniente realizar estudios en amastigotes, que se multiplican intracelularmente en las células de mamífero y que brindarían información sobre qué tan bien actúa el medicamento intracelularmente. Finalmente, sería de interés estudiar si es que el fexinidazol potencia el funcionamiento del benznidazol al usarse en combinación.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Aquilino, C., Gonzalez, R., Seco, E., Escudero, J., Corvo, M., Soto, M., Fresno, M., Malpartida, F. y Bonay, P. (2012). Differential Trypanocidal Activity of Novel Macrolide Antibiotics; Correlation to Genetic Lineage, *PloS One*, 7, 1-10, e40901.
- Abad, F. y Aguilar, M. (2003). Control de la enfermedad de Chagas en el Ecuador, *OPS/OMS-Ministerio de Salud Pública del Ecuador*, 70pp.
- Bahía, M., Nascimento, A., Mazzeti, A., Marques, L., Goncalvez, K., Mota, L., Dinis, L., Calvas, I. y Talvani, A. (2012). Antitrypanosomal Activity of Fexinidazole Metabolites, Potential New Drugs for Chagas Disease. Laboratorio de Docencia de Chagas, Universidad Ouro Pretta. Cruzeiro, Brazil. *American Society for Microbiology*, 58, 4362-4370, e1870.
- Barnabé, C., Brisse, S. y Tibayrenc, M. (2000). Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology*, 120 (5), 513-526,
- Bermúdez, J., Davies, C., Simonazzi, A., Real, J. y Palma, S. (2016). Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Tropica*, 156, 1–16.
- Cartelle, G., Holban, A., Escalante, S. y Cevallos, M. (2015). Epidemiology of Tropical Neglected Diseases in Ecuador in the Last 20 Years. *PLoS One*, 10.
- Cilveti, C. (2018). Distinct proteomic profiles are associated with *Trypanosoma cruzi* I strains displaying high/low infectivity towards mammalian cells *in vitro* (Disertación de Maestría). Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Clinical Trials (2015). Study to Evaluate Fexinidazole Dosing Regimens for the Treatment of Adult Patients with Chagas Disease. Recuperado de <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02498782>.

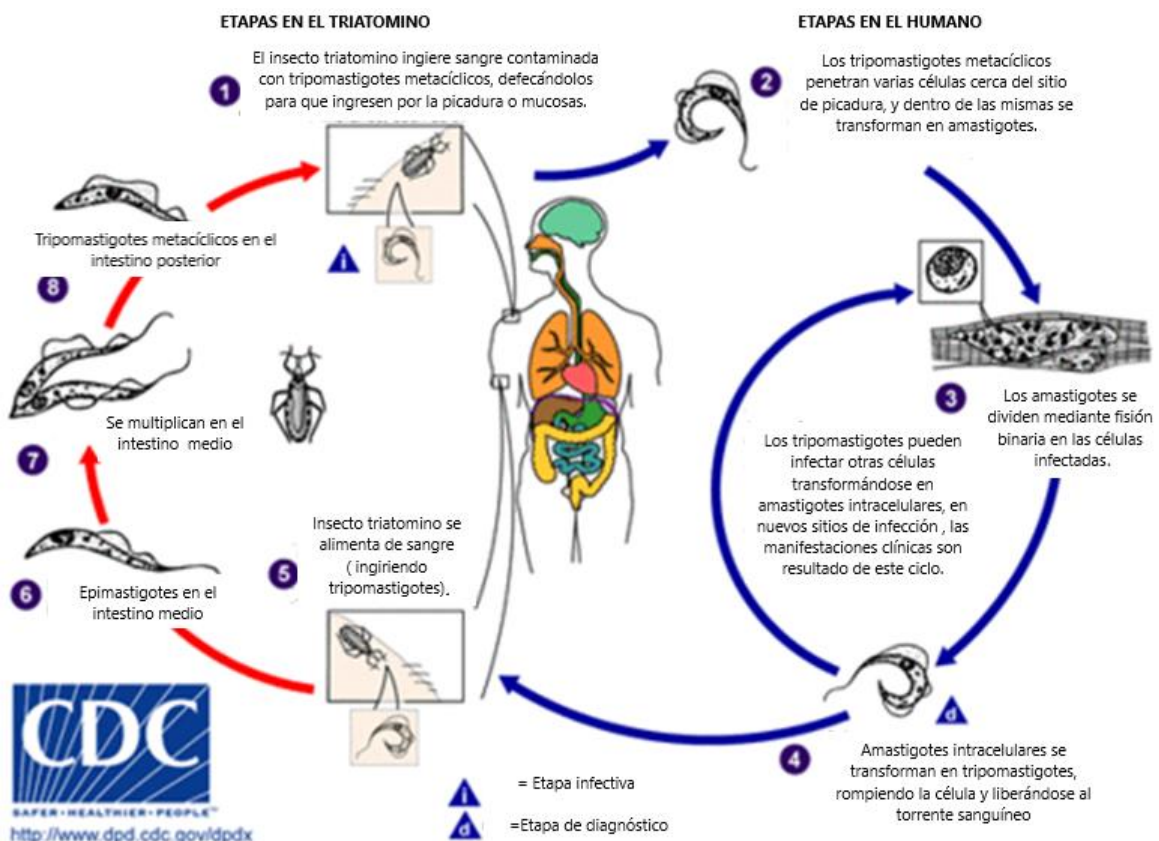
- Costales, J., Kotton, C., Zurita, A., Garcia, J., Llewellyn, M., Messenger, L. y Burleigh, B. (2015). Chagas disease reactivation in a heart transplant patient infected by domestic *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I (TcIDOM). *Parasites and Vectors*, 8(1). 435. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1039-3>.
- Coura, J. y Castro, S. (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97, 3-24.
- Dumonteil, E., Herrera, C., Martini, L., Grijalva, M., Guevara, G. y Costales, J. (2016). Chagas Disease Has Not Been Controlled in Ecuador. *PLoS One*, 11(6). doi:10.1371/journal.pone.0158145.
- Fernandes, J., Castellani, O. y Kimura, E. (1996). Physiological events in the course of the growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*, 61: 213- 125.
- Freilij, H. y Altcheh, J. (1983). Congenital Chagas disease: diagnostic and clinical aspects. *Clinical Infection Disease*, 21, 551–555.
- Galvao, J., Davis, B., Tilley, M., Normando, E., Duchon, M. y Cordeiro, M. (2014). Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 28(3):17-30.
- Garzón, E., Barnabé, C., Córdova, X., Bowen, C., Paredes, W., Gómez, E. y Guevara, A. (2002). *Trypanosoma cruzi* isoenzyme variability in Ecuador: first observation of zymodeme III genotypes in chronic chagasic patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(4), 378–382.
- Goegan, P., Johnson, G. y Vincent, R. (1995). Effects of Serum Protein and Colloid on the alamarBlue Assay in Cell Cultures. *Toxicology In Vitro*, 9(3), 257-266.
- Grijalva, M., Villacís, A., Moncayo, A., Ocaña, S., Yumiseva, C. y Baus E. (2017). Distribution of triatomine species in domestic and peridomestic environments in central coastal Ecuador. *PLoS Neglected Tropical Disease*, 11(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005970>.

- Guevara, A., Moreira, J., Criollo, H., Vivero, S., Racines, M., Cevallos, V., Prandi, V., Caicedo, C., Robinzon, F. y Anselmi M. (2014). First description of *Trypanosoma cruzi* human infection in Esmeralda's province, Ecuador. *Parasites and Vectors*, 7, 358.
- Gupta, A., Gautam, P., Wennerberg, K. y Aittokallio, T. (2018). A normalized drug response metric improves accuracy and consistency of drug sensitivity quantification in cell-based screening. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/262568>
- Hall, S. y Wilkinson, S. (2012). Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(1), 115-123.
- Lee, B., Bacon, K., Bottazzi, M. y Hotez, P. (2013). Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *The Lancet infectious diseases*, 13(4), 342-348.
- Leite, N., Sobral-Souza, C., Albuquerque, R., Brito, D., Lavor, A., Alencar, L. y Coutinho, H. (2013). Actividad antiparasitaria *in vitro* citotóxica de cariofileno y eugenol contra *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania brasiliensis*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(4), 522-528.
- Llewellyn, M., Miles, M., Carrasco, H., Lewis, M., Yeo, M., Vargas, J. y Gaunt, M. (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), e1000410. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000410>.
- Mejía, A., Fernández, G., Montilla, M., Nicholls, R., y Triana, O. (2012). Sensibilidad al benznidazol de cepas de *Trypanosoma cruzi* sugiere la circulación de cepas naturalmente resistentes en Colombia. *Biomédica*, 32(2), 196-205.
- Ocaña-Mayorga, S., Llewellyn, M., Costales, J., Miles, M., y Grijalva, M. J. (2010). Sex, Subdivision, and Domestic Dispersal of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Southern Ecuador. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 4(12), e915. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000915>.

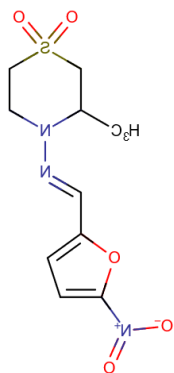
- Pereira, P. y Navarro, E. (2013). Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 19(1), 34. <https://doi.org/10.1186/1678-9199-19-34>.
- Quinde, L., Rios, P., Solorzano, L. y Dumonteil, E. (2016). Ten years (2004-2014) of Chagas disease surveillance and vector control in Ecuador: successes and challenges. *Tropical Medicine & International Health*, 21(1), 84-92.
- Prata A., (2001). Clinical and epidemiological Aspects of Chagas Disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 1, 92-99.
- Rajao, M., Furtado, C., Alves, C., Passos-Silva, D., de Moura, M., Schamber-Reis, B., Machado, C. (2014). Unveiling benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 55(4), 309-321. <https://doi.org/10.1002/em.21839>.
- Rassi, A., Rassi, A. Jr., y Marin J. (2010). Chagas disease. *Lancet*. 375: 1388-1402.
- Reather, W. y Seidenath, H. (1983). The activity of Fexinidazole (HOE 239) against experimental infections with *Trypanosoma cruzi*, trichomonads and *Entamoeba histolytica*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 77:13-26.
- Riss, T., Moravec, R. y Niles, A. (2013). Cell Viability Assays. *Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences*, 1-10.
- Rolon, M., Vega, C. y Escario, J. (2005). Development of Resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigote. *Journal of Parasitology*, 99: 103-111
- Schmunis, G. (1999). Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94: 93-101.
- Sebaugh, J. (2010). Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical Statistics*, 10: 128- 134.
- .Torreele, E., Trunz, B. B., Tweats, D., Kaiser, M., Brun, R., Mazué, G. Pécoul, B. (2010). Fexinidazole – A New Oral Nitroimidazole Drug Candidate Entering Clinical

- Development for the Treatment of Sleeping Sickness. *PloS Neglected Tropical Diseases*, 4(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000923>
- Leite, N., Souza, C., Albuquerque, R., Brito, D., Lavor, A., Alencar, L. y Coutinho, H. (2013). Atividade antiparasitaria *in vitro* e citotóxica de cariofileno e eugenol contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania brasiliensis*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18, 522-528.
- Urbina, J. (2002). Chemotherapy of Chagas Disease. *Current Pharmaceutical Design* 8, 287-295.
- Urbina, J. (2009). New advantages in the management of a long neglected disease. *Clinical Infectious Diseases*, 49, 1685-1687.
- WHO (World Health Organization). (2007). Technical Report Series, Control of Chagas' disease, ed. TDR/GTC/09. Recuperado de: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42443/WHO_TRS_905.pdf?sequence=1
- Zingales, B., Miles, M., Campbell, D., Tibayrenc, M., Macedo, A., Teixeira, M., Schijman, A., Llewellyn, M., Lages-Silva, E., Machado, C., Andrade, S. y Sturm, N. (2009). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection Genetics Evolution*, 12(2), 240-53.
- Zingales, B., Andrade, S., Briones, M., Campbell, D., Chiari, E., Fernandes, O. y Schijman, A. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 1051-1054.
- Zurita A. (2011). Estudio preliminar de la prevalencia de cardiopatía chagásica en la provincia de Manabí, Ecuador y caracterización molecular y biológica de aislados TcI de *Trypanosoma cruzi* (Disertación de pregrado). Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.

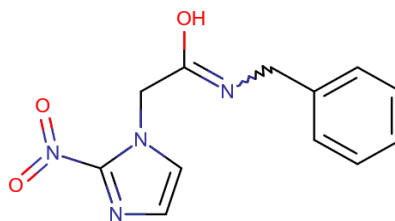
10. ANEXOS



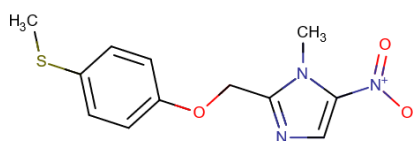
Anexo 1. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Los epimastigotes se multiplican en el intestino medio de los triatominos y pasan al intestino posterior, donde se convierten en tripomastigotes metacíclicos. Estos últimos, son capaces de infectar mamíferos (incluido el ser humano). Una vez dentro del hospedero mamífero, los tripomastigotes metacíclicos son capaces de invadir las células, en el interior de las cuales se transforman en amastigotes, que se dividen por fisión binaria. Posteriormente, se transforman nuevamente en tripomastigotes, que destruyen la célula, y salen a la circulación sanguínea, desde donde pueden ser ingeridos por otro triatomino. Modificado de CDC página. <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>.



Nifurtimox

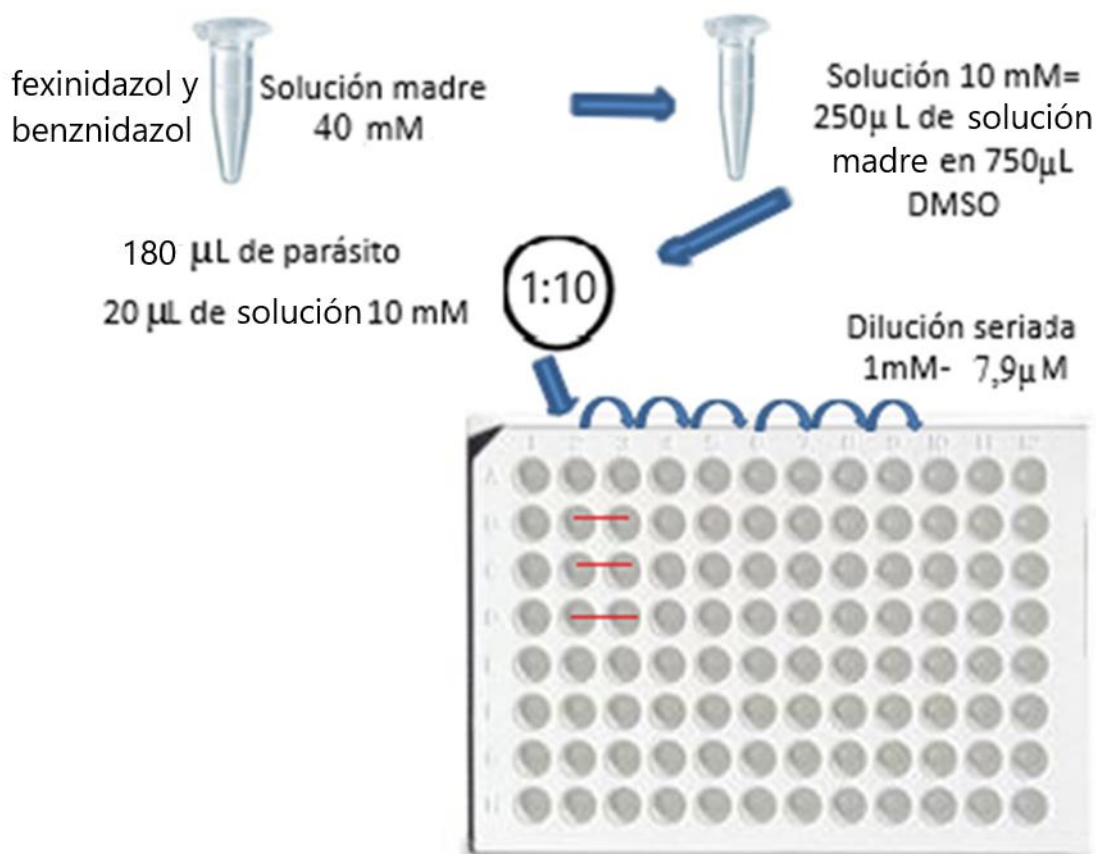


Benznidazol



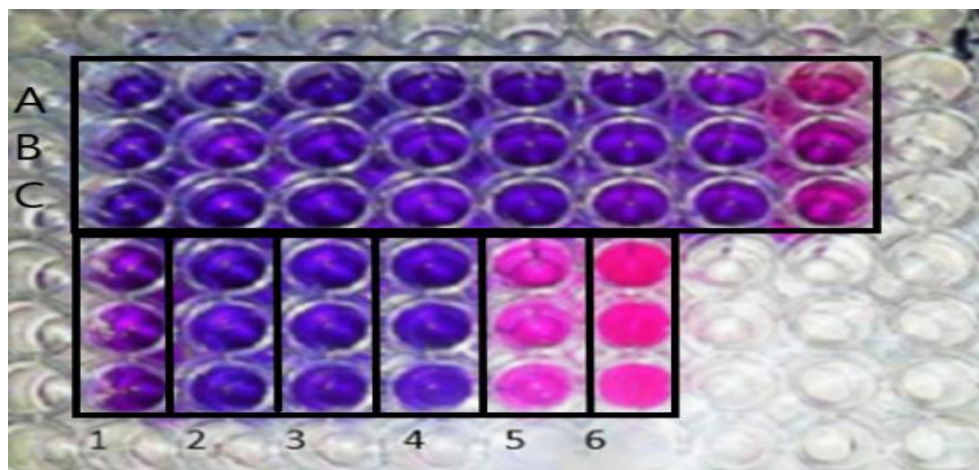
Fexinidazol

Anexo 2. Estructura química de los nitro-derivativos usados contra la ECh. Gráficos tomados de DrugBank. <https://www.drugbank.ca>.

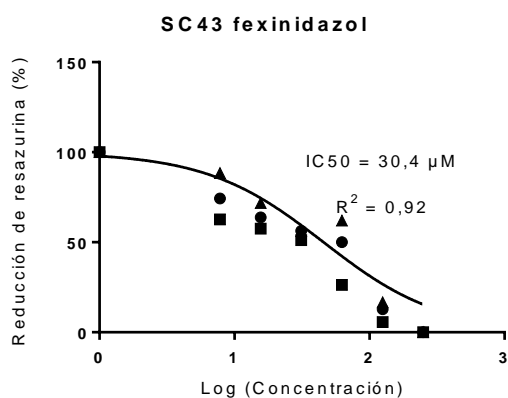
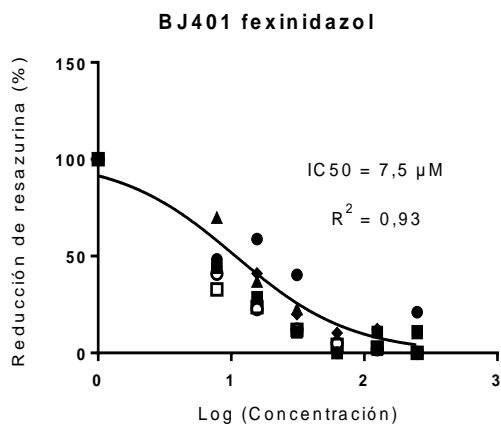
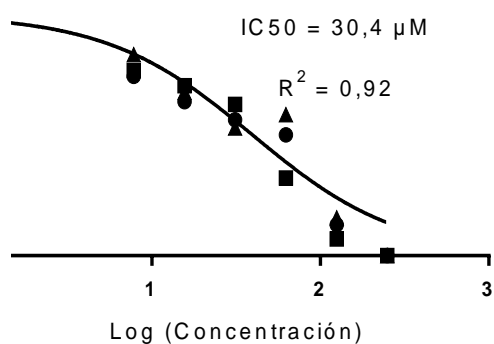
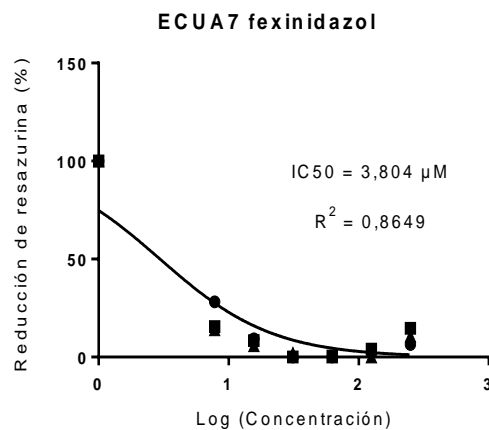
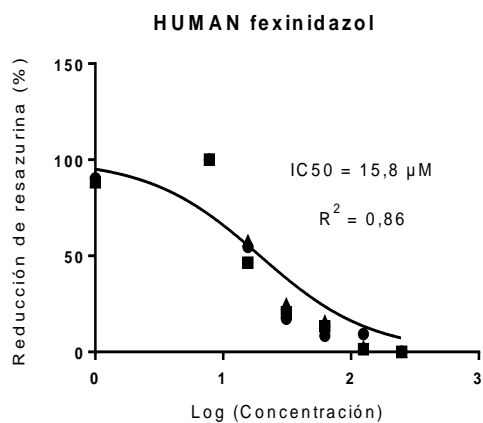


Anexo 5. Preparación de las diluciones de fexinidazol y benznidazol en placas de ensayo de 96 pocillos. La misma metodología de dilución de compuestos fue empleada en los ensayos de epimastigotes y tripomastigotes con medio (DMEM 2%FBS o LIT 10%FBS). Partiendo de una solución madre (40 mM), se realiza una dilución de menor concentración (10 mM). La concentración en el primer pocillo de la placa es de 1:10 (20 μl en 180 μl de medio de cultivo), equivalente a una concentración de 1 mM. Posteriormente, se realizaron diluciones seriales (factor 2) hasta obtener una concentración 7,9 μM. Las dos concentraciones más altas de medicamento se excluyeron del análisis de datos, debido a la presencia de toxicidad del DMSO.

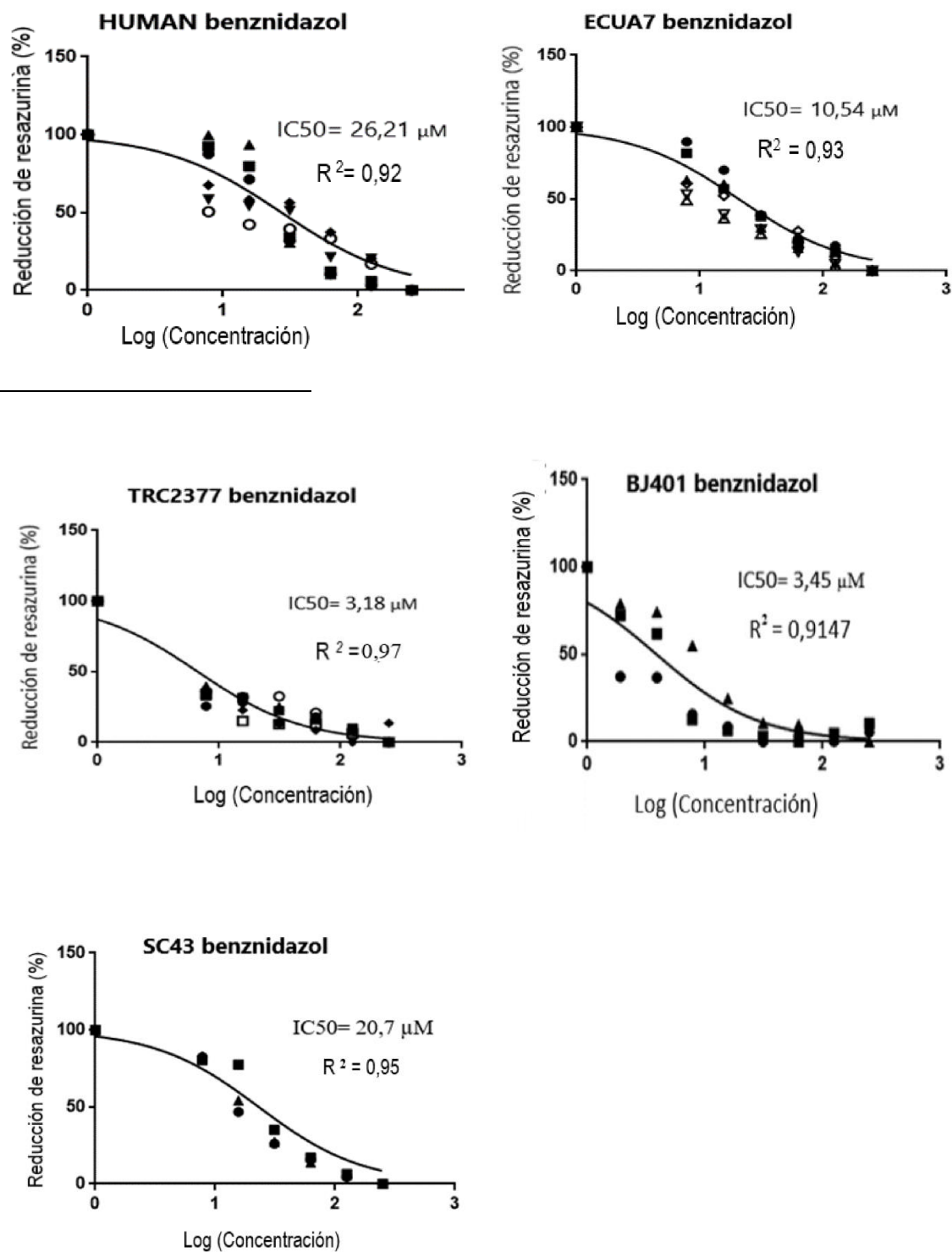
Conc. (μM) 1000 500 250 125 62,5 31,25 15,62 7,9



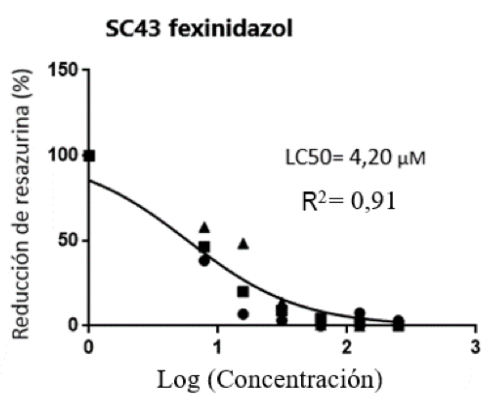
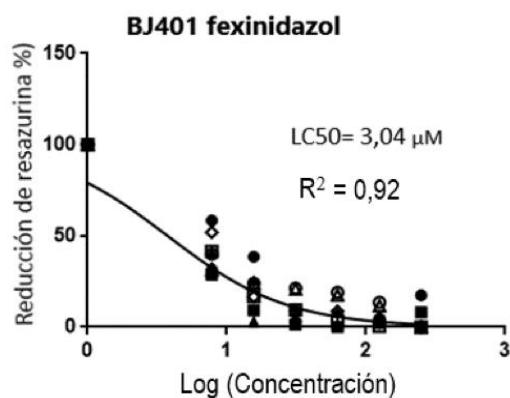
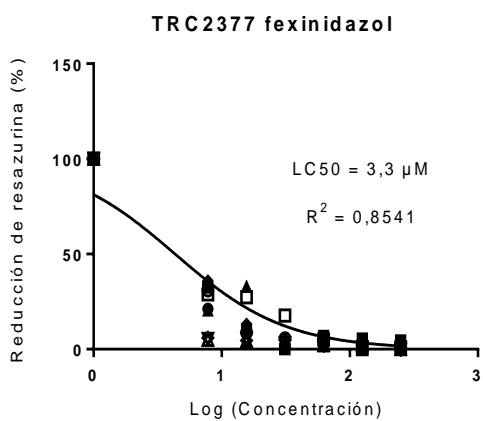
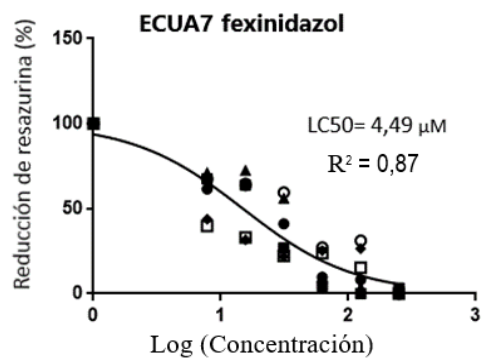
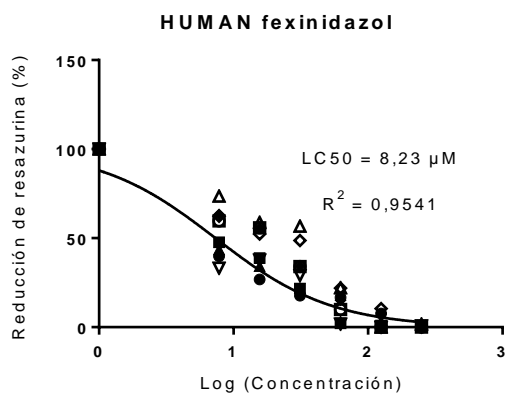
Anexo 6. Reducción de resazurina en una placa de ensayo colorimétrico. Se muestra una placa representativa del ensayo colorimétrico (placa de tripomastigotes de la cepa HUMAN tratada con beznidazol). Los ensayos se realizaron por triplicado con diluciones seriales (A, B, C) entre 1 mM y 7.9 μM . El cambio de resazurina (púrpura) a resorufina (rojo) puede evidenciarse de izquierda a derecha, a medida que el medicamento está presente en menor concentración. Se incluyeron además los siguientes controles, en triplicado: 1. 1×10^6 parásitos (tripomastigotes) suspendidos en 200 μl de medio DMEM 2% FBS. 2. 1×10^6 parásitos (tripomastigotes) suspendidos en 200 μl de medio DMEM 2% FBS y lisados con 0,9% de detergente Tritón. 3 y 4. 200 μl medio DMEM 2% FBS + 20 μl de resazurina 3 mM. 5. 200 μl Medio DMEM 2% FBS sin resazurina 6. Resazurina 3 mM completamente reducido (solución de resazurina autoclavada), 200 μl .



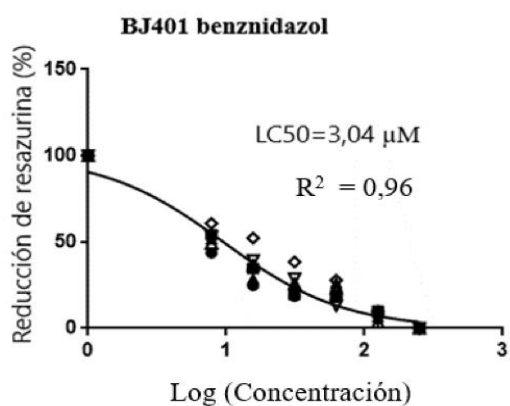
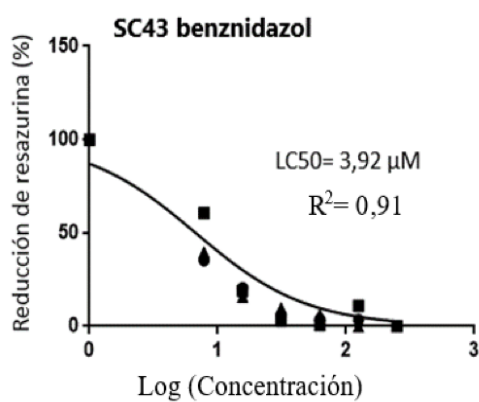
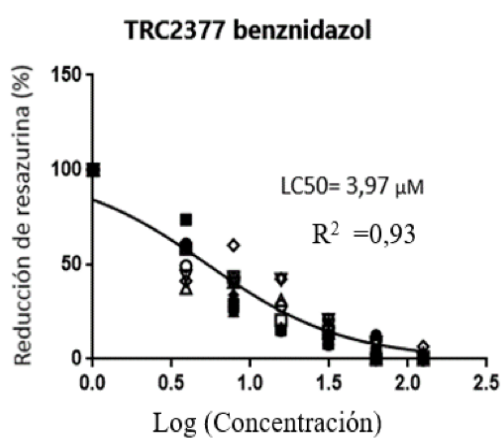
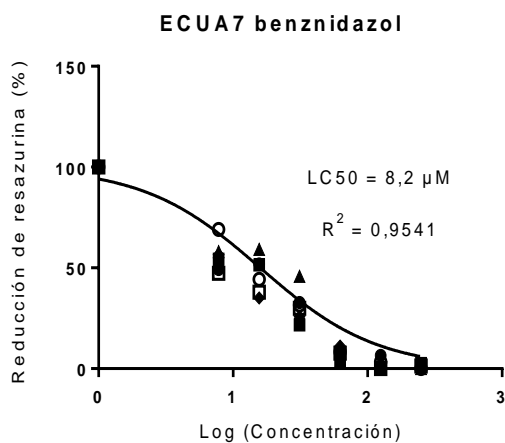
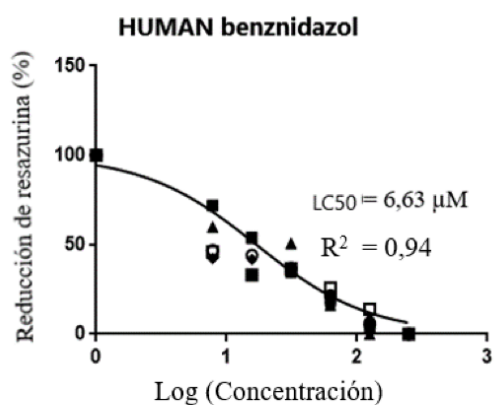
Anexo 7. Curvas de sensibilidad de epimastigotes al fexinidazol. Reducción de resazurina vs concentración del medicamento, con normalización de datos hacia el control positivo. La curva corresponde a la línea de regresión cuadrática de los datos.



Anexo 8. Curvas de sensibilidad de epimastigotes al benznidazol. Reducción de resazurina vs concentración del medicamento, con normalización de datos hacia el control positivo. La curva corresponde a la línea de regresión cuadrática de los datos



Anexo 9. Curva de sensibilidad de tripomastigotes al fexinidazol. Datos de reducción de resazurina vs concentración del medicamento, con normalización de datos hacia el control positivo. La curva corresponde a la línea de regresión cuadrática de los datos.²



Anexo 10. Curva de sensibilidad de tripomastigotes al benznidazol. Datos de reducción de resazurina vs concentración del medicamento, con normalización de datos hacia el control positivo. La curva corresponde a la línea de regresión cuadrática de los datos.

N total	18
Estadístico de contraste	12,269
Grados de libertad	3
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,007

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

Anexo 11. Valor de significancia obtenido en prueba de Kruskal- Wallis para epimastigotes tratados con fexinidazol.

N total	24
Estadístico de contraste	18,856
Grados de libertad	3
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,000

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

Anexo 12. Valor de significancia obtenido en prueba de Kruskal- Wallis para epimastigotes tratados con benznidazol.

N total	24
Estadístico de contraste	17,060
Grados de libertad	3
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,001

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

Anexo 13. Valor de significancia obtenido en prueba de Kruskal- Wallis para tripomastigotes tratados con fexinidazol.

N total	30
Estadístico de contraste	16,368
Grados de libertad	3
Sig. asintótica (prueba bilateral)	,001

1. Los estadísticos de prueba se ajustan para empates.

Anexo 14. Valor de significancia obtenido en prueba de Kruskal- Wallis para tripomastigotes tratados con benznidazol.

Anexo 15. Corrección de Dunn- Bonferroni de pruebas entre parejas de cepas de epimastigotes con fexinidazol. * Indica diferencias estadísticamente significativas, en este caso entre las cepas HUMAN y TRC2377. También existen diferencias significativas entre HUMAN y ECUA7, ya que el valor de significancia es 0,05 pero existe gran variación entre estas dos cepas en los gráficos.

Muestra 1- Muestra 2	Estadístico de contraste	Error estándar	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. Ajust.
TRC2377- BJ401	0,333	3,775	0,088	0,930	1,000
TRC2377- ECUA7	6,500	3,082	2,109	0,035	0,210
TRC2377- HUMAN	11,667	3,775	3,091	0,002	0,012*
BJ401- ECUA7	-6,167	3,775	-1,634	0,102	0,614
ECUA7- HUMAN	11,333	4,359	2,600	0,009	0,050
BJ401- HUMAN	5,167	3,775	1,369	0,171	1,000

Anexo 16. Corrección de Dunn- Bonferroni para cepas de epimastigotes con benznidazol. * Indica diferencias estadísticamente significativas, en este caso las cepas HUMAN y TRC2377 tienen diferencias significativas, al igual que HUMAN y BJ401.

Muestra 1- Muestra 2	Estadístico de contraste	Error estándar	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. Ajust.
TRC2377- BJ401	2,500	5,000	0,500	0,617	1,000
TRC2377- ECUA7	9,389	3,272	2,519	0,012	0,071
TRC2377- HUMAN	16,667	4,082	4,082	0,000	0,000*
BJ401- ECUA7	6,889	4,714	1,461	0,144	0,864
BJ401- HUMAN	14,167	5,000	2,833	0,05	0,028*
ECUA7- HUMAN	7,278	3,727	1,953	0,051	0,305

Anexo 17. Corrección Dunn- Bonferroni de cepas de tripomastigotes con fexinidazol. *

Indica diferencias estadísticamente significativas, este caso las cepas HUMAN y TRC2377 tienen diferencias significativas, al igual que HUMAN y BJ401.

Muestra 1- Muestra 2	Estadístico de contraste	Error estándar	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. Ajust.
TRC2377- BJ401	-2,000	4,714	0,000	0,671	1,000
TRC2377- ECUA7	8,500	5,000	1,700	0,089	0,535
TRC2377- HUMAN	15,833	5,000	3,167	0,002	0,009*
BJ401- ECUA7	6,500	3,727	1,744	0,081	0,487
BJ401- HUMAN	13,833	3,727	3,712	0,000	0,001*
ECUA7- HUMAN	7,333	4,082	1,796	0,072	0,435

Anexo 18. Corrección de Dunn- Bonferroni de cepas de tripomastigotes con benznidazol. * Indica diferencias estadísticamente significativas, este caso las cepas HUMAN y TRC2377 tienen diferencias significativas, al igual que HUMAN y BJ401.

Muestra 1- Muestra 2	Estadístico de contraste	Error estándar	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. Ajust.
TRC2377- BJ401	3,222	4,150	0,777	0,437	1,000
TRC2377- ECUA7	12,278	5,000	2,092	0,036	0,219
TRC2377- HUMAN	15,278	4,150	3,682	0,000	0,001*
BJ401- ECUA7	9,056	5,000	1,543	0,123	0,737
BJ401- HUMAN	12,050	4,150	2,905	0,004	0,022*
ECUA7- HUMAN	3,000	5,000	0,511	0,609	1,000