



Aplicación del método bioquímico-colorimétrico para identificar agentes trypanocidas

Application of the biochemical-colorimetric method to identify trypanocidal agents

PALMA TOVAR, CAMILA ISABEL¹
 SALAMANCA CAPUSIRI, EFRAÍN²
 TICONA HUALLPARA, JUAN CARLOS³
 UDAETA VELÁSQUEZ, ENRIQUE⁴
 MITA DÍAZ, VERONICA⁵
 VELA RAMIREZ, CATHERINE ELENA⁶
 ALACAMA CONDORI, WARÁ⁶

SERRATO, ALCIDES⁷
 TITOA VIRARI, DEMETRIO⁸
 YBAGUARI CARTAGENA, LUCIO⁹
 YBAGUARI QUENEVO, MARÍA⁹
 AMATURI QUENEVO, DOLORES⁹
 NAVI QUETEGUARY, VICTORIA⁹
 GIMÉNEZ TURBA, ALBERTO*¹⁰

FECHA DE RECEPCIÓN: 7 AGOSTO DE 2019

FECHA DE ACEPTACIÓN: 13 DE SEPTIEMBRE DE 2019

Resumen

La tripanosomiasis americana es una enfermedad infecciosa desatendida, causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi*, que no cuenta con tratamiento en la fase crónica de esta enfermedad mortal, uno de los desafíos es encontrar terapias efectivas para esta compleja enfermedad, dado que no presenta síntomas asociables a la parasitosis por lo que es desconocida entre los médicos tradicionales. Nuestra Facultad está evaluando la medicina tradicional tacana como fuente de agentes antiparasitarios potenciales.

El objetivo de este trabajo fue identi-

Abstract

American trypanosomiasis is listed among the unattended infectious disease, is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, and has no treatment in the chronic phase of this deadly disease. One of the challenges is finding effective therapies for this complex disease, given that it does not present any associated symptoms to the parasitism and is unknown among traditional doctors. Our Faculty is evaluating tacana traditional medicine as a source of potential antiparasitic agents.

The objective of this work was to identify

1 Licenciada en Bioquímica, Maestrante de la Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas. e-mail: camila.i.palma.t@gmail.com

2 Master of Science. Personal de Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas. e-mail: efrain_salamanca@hotmail.com

3. Philosophy doctor. personal del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas. e-mail: biojuancarlos@yahoo.com

4. Licenciado Docente de la Facultas de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas e-mail: udaepuma@gmail.com

5. Estudiante de Internado Rotatorio de la Carrera de Química Farmacéutica. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas.

6. Estudiantes de Primer Año de la Carrera de Bioquímica. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas.

7. Comunario de Buena Vista, Provincia Abel Iturralde. Médico tradicional

8. Comunario de San Miguel, Provincia Abel Iturralde. Médico tradicional

9. Comunarios de San Silvestre, Provincia Abel Iturralde. Médicos tradicionales

10. Philosophy doctor. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas. e-mail: agimenez@megalink.com

* Correo de contacto: jagimenez@megalink.com

car productos naturales trypanocidas utilizando el método colorimétrico XTT-PMS. Para ello, se realizaron curvas de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* y determinamos el tiempo óptimo de realización de los ensayos. Se seleccionó la población inicial de trabajo (3×10^6 parásitos/mL), las condiciones de incubación (medio LIT, 27°C, 72 horas) y revelado (XTT-PMS, 4 horas). Con el protocolo optimizado, se realizaron evaluaciones de actividad de drogas control, controles naturales y 20 extractos crudos de plantas medicinales de la amazonía. La actividad se basó en cálculos de concentración inhibitoria media y se consideraron activos las sustancias con $CI_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$. De los 20 extractos evaluados, el 40% fueron activos. Las plantas más interesantes fueron Sipu sipu ($CI_{50} = 8.9 \pm 1.7 \mu\text{g/mL}$), Ejiye bid'u ($CI_{50} = 9.1 \pm 1.5 \mu\text{g/mL}$) e Id'ene eidhue ($CI_{50} = 10.8 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$) con valores de CI_{50} cercanos a los controles, confirmando la utilidad y potencial del protocolo desarrollado.

PALABRAS CLAVE

Trypanosoma cruzi, Cultura Tacana, Método Colorimétrico XTT-PMS, Concentración Inhibitoria Media (CI_{50}).

trypanocidal natural products using the XTT-PMS colorimetric method. For this, growth curves of *T. cruzi* epimastigotes were made to determine the optimal time to carry out the tests. The initial work population (3×10^6 parasites / mL), the incubation conditions (medium LIT, 27°C, 72 hours) and revealed process (XTT-PMS, 4 hours) were selected. With the optimized protocol, activity evaluations of control drugs, natural controls and 20 crude extracts of medicinal plants of the Amazon were carried out. The activity was based on calculations of mean inhibitory concentration and substances with $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ were considered active. Of the 20 extracts evaluated, 40% were active. The most interesting plants were Sipu sipu ($IC_{50} = 8.9 \pm 1.7 \mu\text{g/mL}$), Ejiye bid'u ($IC_{50} = 9.1 \pm 1.5 \mu\text{g/mL}$) and Id'ene eidhue ($IC_{50} = 10.8 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$) with values of IC_{50} close to the controls, confirming the usefulness and potential of the developed protocol.

KEY WORDS

Trypanosoma cruzi, Tacana Culture, XTT-PMS Colorimetric Method, Medium Inhibitory Concentration (IC_{50}).

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, también llamada tripanosomiasis americana, es una enfermedad infecciosa desatendida, potencialmente mortal causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi*. Se encuentra en zonas endémicas de 21 países de América Latina, donde se transmite a los seres humanos principalmente por las heces de insectos triatomíneos conocidos como vinchucas, chinches o con otros nombres, según la zona geográfica (OMS, 2015). En las últimas décadas se ha observado con mayor frecuencia en otros continentes debido a la movilidad de la población entre América Latina y el resto del mundo (WHO, 2018). Se calcula que en el mundo hay entre 7 y 8 millones de personas infectadas por *Trypanosoma cruzi*, de las que el 30% presentan alteraciones cardiacas y un 10% padecen alteraciones digestivas, neurológicas o combinadas (OPS/OMS, 2010). En nuestro país, se estima que existen unos 607 186 casos de Chagas (Coalición Chagas, 2017).

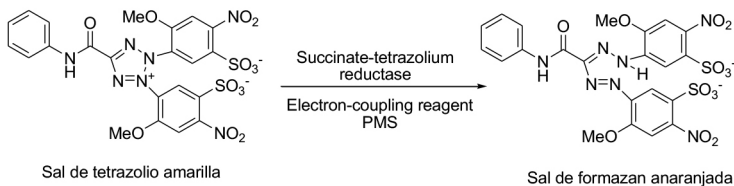
La fase aguda de la enfermedad de Chagas dura las primeras semanas o meses de la infección y generalmente es asintomática o con algunas manifestaciones que no son específicas de la enfermedad de Chagas. Durante la fase

crónica la infección puede mantenerse silenciosa por décadas e incluso por toda la vida. Algunas personas infectadas desarrollan complicaciones cardíacas y otras desarrollan complicaciones intestinales (Apt-B. *et al.*, 2008; CDC, 2017). A causa del gran número de animales silvestres que sirven de reservorio a este parásito en las Américas, la enfermedad no puede erradicarse. Los objetivos de control consisten en eliminar la transmisión y lograr que la población infectada tenga acceso temprano a la asistencia sanitaria (WHO, 2018).

El benznidazol (Benz) y el nifurtimox (Nif) son agentes antiparasitarios empleados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. El 2017, la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA) aprobó al Benz para tratar la enfermedad de Chagas (FDA, 2017). El Nif está en la lista de "Medicamentos Esenciales" de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para adultos y niños (IntraMed, 2016). Sus efectos adversos (WHO, 1995) denotan la necesidad de encontrar agentes antiparasitarios menos tóxicos. La medicina tradicional es considerada un interesante punto de partida en la búsqueda de nuevos fármacos, ya que se han encontrado moléculas bioactivas en varias especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional. La cultura tacana, ubicada al norte del Departamento de La Paz, cuenta con más de un centenar de especies vegetales que utilizan para el tratamiento de diferentes dolencias, por lo que desde 1993 el IIFB se ha interesado en valorar especies de su medicina tradicional realizando estudios de química biodirigida, con el propósito de encontrar agentes antiparasitarios eficaces.

La evaluación de actividad biológica se realiza por medio de ensayos de proliferación celular. Los *Microculture Tetrazolium Assays* (MTAs) son bioensayos rápidos, sensibles y no radioactivos que permiten medir la viabilidad celular en base a la actividad metabólica de las células vivas (Kulkarni *et al.*, 2003). El MTT produce sales de formazán insolubles, lo cual alarga el procedimiento al necesitar solventes orgánicos para disolver estas sales. Para resolver esta dificultad se utiliza el XTT, una sal levemente amarilla que cuando se reduce por las oxidoreductasas mitocondriales se vuelve formazán, una sal soluble de color naranja brillante (Esquema 1). Esta variación colorimétrica se mide en un lector de absorbancia, con una longitud de onda de 450nm y una longitud de onda de referencia de 630nm. Los resultados mejoran cuando se tiene un aceptor intermedio de electrones, como el PMS (ATCC, 2011; Salamanca-Capusiri *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2003).

Esquema 1. Reducción mitocondrial del XTT



En este trabajo se identificaron extractos de plantas con actividad trypanocida utilizando el método colorimétrico XTT-PMS estandarizado.

MATERIALES Y MÉTODO

Materiales y equipos

Cabina de Seguridad Biológica (SECURIPLUS PSM Classe II, Francia); Estufa (Standard Incubator, WTB Binder, Alemania); Frascos de Cultivo Tisular de 50mL (25cm² Fisher Scientific, USA); Lector de Microplacas (BioTek Synergy HT, USA. Software Gen 5. 2.09); Microscopio de Fluorescencia (EVOS FL, Life Technologies, USA); Microscopio Óptico (Leitz, Alemania); Microscopio Óptico Invertido (Axiovert 25, Zeiss, Alemania), Placas de 96 Pozos, Fondo Plano (Thermo Scientific, USA).

Reactivos

KCl y NaCl (Biopack, Argentina); NaHCO₃ (Cicarelli, Argentina); Infusión de hígado (DIFCO, USA); Gentamicina (VWR, USA); Caldo Triptosa; Dimetil-sulfóxido (DMSO); Extracto de Levadura, Fenasin Metosulfato (PMS); NaH₂P₄O₇, Na₂HPO₄, Glutaraldehído; Hemina; Sal Sódica de 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT); Suero Bovino Fetal (SBF) y Trietanolamina (Sigma-Aldrich, USA).

Controles naturales, drogas control y extractos

Alcaloides totales de la corteza de *Galipea longiflora* Krause (CAT, 50-6.3µg/mL) y 2-fenilquinolina (2FQ, 50-6.3µg/mL, Giménez *et al.*, 2005). Doxorubicina Clorhidrato Doxocris[®] (1.5-0.2µg/mL, LKM Bolivia S.A, donada por Ricardo Amaru-Unidad de Biología Celular-Facultad Medicina-UMSA). Miltefosina (3-0.4µg/mL, Impavido[®], Paladin, Canadá). Benznidazol (25-3.1µg/mL, Lafepe, Brasil). Nifurtimox (3-0.4µg/mL, Lampit[®] Bayer, Alemania). Extractos crudos (100-3.1µg/mL).

Material biológico: epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

Cultivados a 27°C en medio *Liver Infussion Tryptose* (LIT, 3mL, 5.0g/L de NaCl, 7.5g/L de Na₂HPO₄, 5.0g/L de Caldo Triptosa, 3.0g/L de Extracto de Levadura, 3.0g/L de Infusión de Hígado, 0.4g/L de KCl, 20.0mg/L de Hemina en 1mL/L de Trietanolamina y 1.0mL/L de agua destilada, 50.0mg/L de Gentamicina, pH 7.2, 5%v/v de SBF desactivado por calor). El cambio de medio se realizó cada 72hrs.

Material vegetal y obtención de extractos crudos

Las plantas fueron colectadas en base al acuerdo de colaboración sobre saberes ancestrales con el Consejo Indígena de los Pueblos Tacana (CIPTA) y el Consejo Indígena de Mujeres Tacana (CIMTA), por el personal del Área de Química Farmacéutica (AQF-IIFB) alrededor de las comunidades Buena Vista (S 14°21'969" y O 67°33'764", elevación 205 m.s.n.m), San Silvestre (S 14°04'412" y O 67°51'837", elevación 222 m.s.n.m) y San Miguel (S 14°30.524"

y O 67°29.547', elevación 276 m.s.n.m), provincia Abel Iturralde del departamento de La Paz-Bolivia. Las muestras Vaucher fueron depositadas y se encuentran en proceso de identificación en el Herbario Nacional de Bolivia (LPB). Los extractos crudos fueron preparados por maceración etanólica por 72hr, a temperatura ambiente, filtrados y llevados a sequedad en rota- evaporador y secados al vacío hasta peso constante o por fluido súper crítico con CO₂ a 2000psi y 370C, por 10hrs, en el AQF-IIFB.

Preparación del XTT-PMS y revelado

El XTT (1mg/mL) y PMS (0.05mg/mL) (Henriques *et al.*, 2011) disuelto en PBS (2.86g/L de Na₂HPO₄, 0.31g/L de NaH₂PO₄, pH 7.4) y depositado (50μL / pozo). Luego de la incubación como descrito y se realizaron las lecturas de absorbancia a 450 (630nm de referencia).

Curva de crecimiento

Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (1x10⁶ parásitos/mL) en medio LIT y 5%v/v de SBF. Incubados como descrito, por 5 días. El recuento de población se realizó en cámara de Neubauer y en paralelo mediante la lectura de densidad óptica a 450nm (630nm como referencia de absorbancia del medio). El procedimiento se realizó por triplicado y tres repeticiones.

Elección de población óptima de trabajo y tiempo de revelado

Epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con poblaciones de 1.2x10⁷, 6x10⁶, 3x10⁶, 1.5x10⁶ y 7.5x10⁵ (ajustadas con medio LIT y 5%v/v de SBF). Fueron incubadas por 72hrs a 27°C. Finalmente, se adiciono el agente revelador (XTT-PMS) y se realizó la lectura de densidad óptica como descrito, cada hora durante 7 horas. El procedimiento se realizó por triplicado en tres repeticiones.

Evaluación de actividad trypanocida

En placas de cultivo de 96 pozos se dispensaron 100μL de epimastigotes (3x10⁶ parásitos/mL). Posteriormente, a diferentes pozos se agregaron 100μL de las concentraciones preparadas de drogas control, controles naturales y extractos crudos, incluyendo pozos "Blanco" (200μL de LIT) y "Control de Crecimiento" (200 μL de epimastigotes). Cada muestra se evaluó por triplicado, obteniendo un valor promedio y desviación estándar. Muestras con CI₅₀ > 50μg/mL fueron consideradas inactivas.

Obtención de la CI₅₀

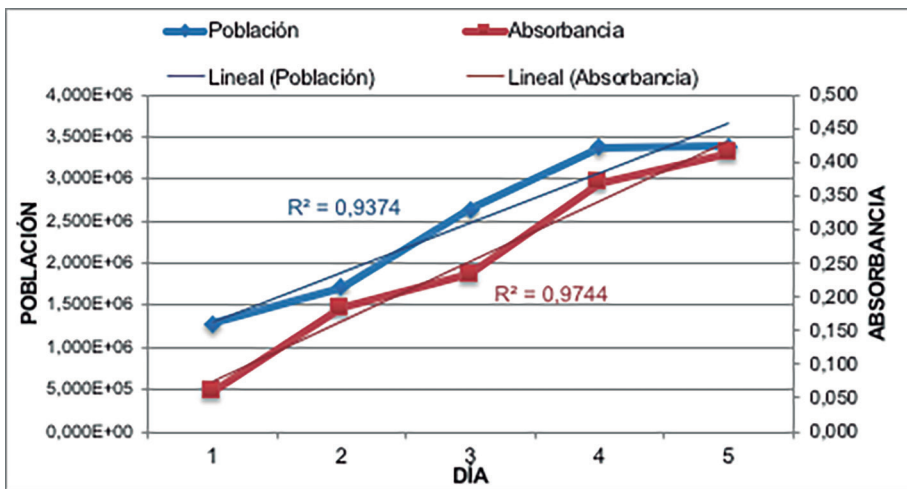
Los valores de densidad óptica (absorbancia) fueron transformados en porcentaje de inhibición (Software Gen 5. 2.09), donde el 100% de inhibición representa la absorbancia del "Blanco". La conversión del porcentaje de inhibición a su correspondiente valor de la CI₅₀ se realizó en el programa Microsoft Excel, por función de tendencia lineal, donde "y" es porcentaje de inhibición y "x" es la concentración en μg/mL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Curva de crecimiento

El coeficiente de correlación lineal R^2 de ambas mediciones (conteo en cámara de Neubauer y lectura de absorbancias), permitió reconocer el comportamiento lineal del crecimiento de los parásitos, por un lapso de 5 días, reflejando que durante este tiempo los parásitos se encuentran en fase logarítmica de crecimiento. A las 72 horas de incubación se consiguió duplicar la población inicial, por lo que fue definido como el tiempo de incubación ideal para medir la CI_{50} (Gráfico 1). El R^2 de las absorbancias (método colorimétrico) fue mayor que el de la población contada en cámara de Neubauer (método óptico), lo cual refleja que el método colorimétrico es más sensible a pequeñas variaciones que el ojo humano.

Gráfico 1. Población y Absorbancia de cultivos de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

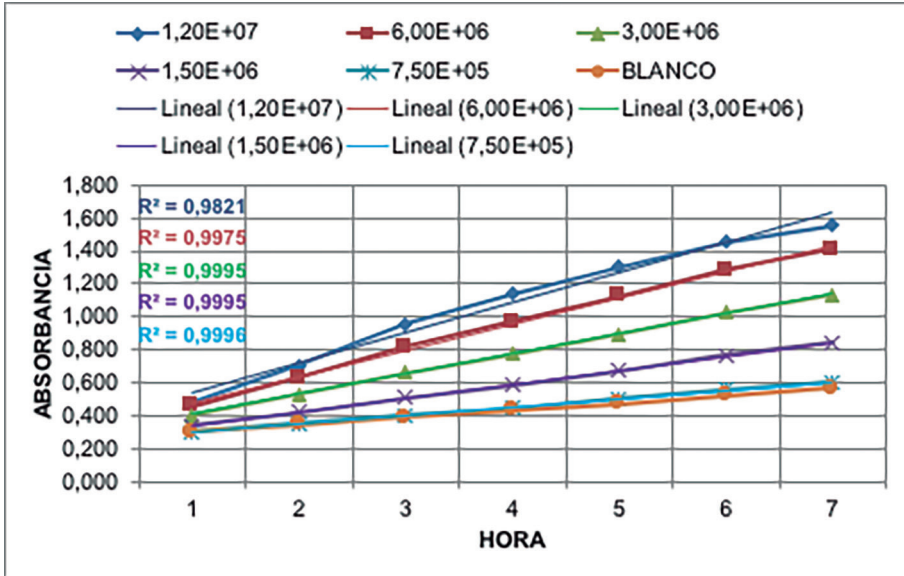


Elección de población óptima de trabajo y tiempo de revelado

Las poblaciones de 3×10^6 , $1,5 \times 10^6$ y $7,5 \times 10^5$ mostraron comportamiento lineal. Sin embargo, la población de 3×10^6 , desde las 4 horas de incubación con XTT-PMS, dio lugar a valores de absorbancia correspondientes casi al doble de las del blanco (Gráfico 2 y Tabla 1), a diferencia de las poblaciones iniciales de $1,5 \times 10^6$ y $7,5 \times 10^5$ cuyas absorbancias no difirieron lo suficiente con relación al blanco. La necesidad de tener esta diferencia de absorbancias radica en que durante el desarrollo de las pruebas de evaluación de actividad trypanocida necesitamos detectar valores de absorbancia superiores al blanco y correspondientes a la mitad del control positivo de crecimiento, para poder calcular los valores de CI_{50} .



Gráfico 2. Absorbancias según población y tiempo de revelado con XTT-PMS



Los resultados de la puesta a punto del método colorimétrico XTT-PMS para *Trypanosoma cruzi* reflejaron que lo ideal es trabajar dentro de los primeros 5 días de crecimiento logarítmico del parásito, exponiendo a las muestras por evaluar, una población inicial de 3×10^6 parásitos/mL, seguido de una incubación de 72 horas a 270C y posterior revelado con XTT-PMS, con 4 horas de incubación adicional.

Tabla 1. Absorbancias según población y tiempo de revelado con XTT-PMS

Población	1.2×10^7	6×10^6	3×10^6	1.5×10^6	7.5×10^5	BLANCO	3×10^6 Blanco
Horas							
1	0.478	0.458	0.405	0.343	0.302	0.306	1.322
2	0.704	0.630	0.527	0.424	0.350	0.348	1.517
3	0.955	0.819	0.661	0.513	0.404	0.393	1.682
4	1.143	0.967	0.772	0.588	0.450	0.436	1.772
5	1.305	1.125	0.896	0.676	0.503	0.474	1.891
6	1.452	1.282	1.026	0.767	0.558	0.523	1.962
7	1.558	1.411	1.133	0.842	0.608	0.566	2.000

Evaluación de actividad trypanocida

El protocolo adaptado y aplicado nos permite evaluar sustancias puras tanto de origen sintético (las drogas control) como naturales (CAT y 2FQ). El trabajo de Luna et al 2009, determina la IC50 de las drogas control, en M, frente a epimastigotes de diversas cepas de *T. cruzi*, aisladas en Colombia, el intervalo de valores presentado en la Tabla 2 están ya transformado a g/mL,

para poder comparar los resultados. Moreira *et al.* 2013, solo reporta datos para el Benznidazole. Los controles naturales CAT y 2FQ, fueron similares a los obtenidos por Arevalo (2018) y es primera vez que se reportan datos para Doxorubicina frente a *T. cruzi*.

Tabla 2. Actividad trypanocida de drogas control y referencia bibliográfica

Controles		Arevalo.	Moreira et al.	Luna et al.
Controles	autores	(2018)	(2013)	(2009)
CAT	16.6±2.9	19.3±3.1	-	-
2FQ	21.2±1.1	25.6±5.7	-	-
Benznidazole	7.0±2.6	10.5±2.5	9.0	2.9-11.1
Nifurtimox	1.2±0.3	1.8±0.2	-	0.4-1.5
Miltefosina	1.2±0.7	-	-	0.4-1.6
Doxorubicina	0.9±0.2	-	-	-

El presente protocolo ha sido aplicado en la valoración de diversos extractos crudos de plantas medicinales utilizadas por la etnia Tacana, para su clasificación como activos o inactivos frente *Trypanosoma cruzi* (Tabla 3), demostrando su utilidad en los laboratorios dedicados a la tarea de encontrar especies con actividad antiparasitaria.

De los 20 extractos crudos obtenidos de las plantas medicinales tacana, el 40% (8 extractos) presentaron valores de $CI_{50} < 50 \text{mg/mL}$ y el 60% (12 extractos) fueron catalogados como inactivos. De las ocho plantas activas, las más interesantes fueron Sipu sipu ($CI_{50} = 8.9 \pm 1.7 \mu\text{g/mL}$), Ejije bid'u ($CI_{50} = 9.1 \pm 1.5 \mu\text{g/mL}$) e Id'ene eidhue ($CI_{50} = 10.8 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$), que presentaron valores de CI_{50} inferiores a los controles naturales CAT ($CI_{50} = 16.6 \pm 2.9 \mu\text{g/mL}$) y 2FQ ($CI_{50} = 21.2 \pm 1.19 \mu\text{g/mL}$) y en particular Sipu sipu y Ejije bid'u con actividad del orden del Benz ($CI_{50} = 7.0 \pm 2.6 \mu\text{g/mL}$). Las otras 5 plantas activas (Uembe, Cawuara, Bacua etse, Siyaya macho y Berwena) presentaron valores de CI_{50} semejantes o mayores a los controles, permitiendo inclusive una subdivisión de los activos, frente a los controles (Tabla 3).

CONCLUSIONES

El método colorimétrico XTT-PMS aplicado, arrojó resultados sobre las drogas control utilizadas, Benznidazole, Miltefosina y Nifurtimox, y a los controles naturales de *Galipea longiflora*, congruentes con otros autores y por lo tanto es aplicable para la evaluación, identificación y selección de productos naturales y extractos crudos de plantas con actividad trypanocida, in vitro, sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Tabla 3. Actividad trypanocida de 20 plantas medicinales utilizadas por la etnia tacana

	Especies Botánicas	Nombre Tacana	CI ₅₀ (µg/mL)
	Género especie	Activos (CI ₅₀ ≤ 50 µg/mL)	
1	<i>Piper umbellatum</i>	Sipu sipu	8.9±1.7
2	<i>Capsicum spp</i>	Ejije bid'u	9.1±1.5
3	<i>Hyptis brevipes</i>	Id'ene eidhue	10.8±1.1
4	<i>Philodendron undulatum</i>	Uembe	21.6±2.1
5	<i>Tessaria integrifolia</i>	Cawuara	23.1±0.5
6	<i>Scoparia dulcis</i>	Bacua etse	24.1±0.6
7	<i>Chamaedorea angustisecta</i>	Siyaya macho	54.0±10.2
8	<i>Stachytarpheta cayennensis</i>	Berwena	56.2±10.3
Inactivos (CI ₅₀ > 50 µg/mL)			
9	<i>Aphelandra cf. aurantica</i>	Tse buke ina	>50
10	<i>Duguetia spixiana</i>	Budhe ina	>50
11	<i>Macfaidyena unguis-cati</i>	Bechu junu	>50
12	<i>Palicourea lasiantha</i>	Ejije nawarao	>50
13	<i>Picramnia spruceana</i>	Idiria	>50
14	<i>Palicourea punicea</i>	Uchi ina	>50
15	<i>Sida rhombifolia</i>	Judhu ina	>50
16	<i>Jatropha curcas</i>	Waca janidhe	>50
17	<i>Justicia albadenia</i>	Bamare batse piadha	>50
18	<i>Dieffenbachia williamsii</i>	Chura ina	>50
19	<i>Chondrodendron tomentosum</i>	Dharara junu	>50
20	<i>Phyllanthus niruri</i>	Tumba piedra	>50

AGRADECIMIENTOS

A los proyectos UMSA-ASDI: Bioprospección Tacana y Biomoléculas (anti-parasitarios), por el apoyo financiero (75000553). Al CIPTA y CIMTA por facilitar los trabajos de campo en las comunidades Tacana. Uno de los co-autores (PTCI) recibió beca del Programa Fortalecimiento UMSA-ASDI, Maestría en Ciencias Biológica y Biomédicas de la UMSA.

REFERENCIAS

Arévalo López, Diandra "Evaluación in vitro de biomoléculas naturales y sintéticas sobre cultivos de kinetoplastidos- *Leishmania* y *Trypanosoma*", Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas de Mención PARASITOLOGÍA. UMSA (Defensa 08-2018). Tutores A. Giménez, E. Salamanca

ATCC. (2011). XTT Cell Proliferation Assay Kit Instruction Manual. EE.UU. Recuperado de <https://www.atcc.org/~media/56374CEEC36C47159D2040410828B969.ashx>

Apt B., W., Heitmann G., I., Jercic L., M. I., Jofré M., L., Muñoz C. del V., P., H., I. N., Zulantay A., I. (2008). Parte II. Enferme-

- dad de Chagas en el Adulto, la Infancia y Adolescencia. *Revista Chilena de Infectología*, 25(3), 194–199.
- CDC. (2017). Parasites - American Trypanosomiasis (Also Known As Chagas Disease): General Information. Recuperado de https://www.cdc.gov/parasites/chagas/gen_info/detailed.html
- Coalición Chagas. (2017). Chagas en el Mundo. Recuperado de https://coalicionchagas.carto.com/viz/0858263a-4298-11e5-82ab-0e8dde98a187/public_map
- FDA. (2017). Highlights Of Prescribing Information. Recuperado de https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/209570lbl.pdf
- Giménez, A., Avila, J. A., Ruiz, G., Paz, M., Udaeta, E., Ticona, J. C., Bascope, M. *et al.* (2005). Estudios Químicos, Biológicos y Farmacológicos de *Galipea longiflora*, Krause. *Revista Boliviana de Química*, 22(1), 94–107.
- Henriques, C., Moreira, T. L. B., Maia-Brigagao, C., Henriques-Pons, A., Carvlho, T. M. U., de Souza, W. (2011). Tetrazolium Salt Based Methods for High-Throughput Evaluation of Anti-Parasite Chemotherapy. *Analytical Methods*, 3, 2148–2155.
- IntraMed. (2016). Noticias Médicas: Anuncian Estudio de Fase III con Nifurtimox en Chagas Pediátrico. Recuperado de <https://www.intramed.net/contenido-ver.asp?contenidoID=90044>
- Kulkarni, S. R., & Upadhye, S. B. (2003). Microculture Tetrazolium Assay: An Update. *Indian Drugs*, 40(1), 1–8.
- Luna, K. P., Hernández, I. P., Rueda, C. M., Zorro, M. M., Croft, S. L., & Escobar, P. (2009). In vitro susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole. *Biomedica*, 29(3), 448–455. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v29n3/v29n3a13.pdf>
- Moreira, R. R., Martins, G. Z., Magalhaes, N. O., Almeida, A. E., Pietro, R. C., Silva, F. A., & Cicarelli, R. M. (2013). In vitro trypanocidal activity of solamargine and extracts from *Solanum palinacanthum* and *Solanum lycocarpum* of brazilian cerrado. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 85(3), 903–907.
- OMS. (2015). Enfermedad de Chagas. Recuperado de https://www.who.int/topics/chagas_disease/es/
- OPS/OMS. (2010). Algunos Datos y Cifras: Mundo y las Américas. Recuperado de www.paho.org/par
- Salamanca-Capusiri, E., Ruiz-Pinell, G., Ticona-Huallpara, J. C., & Giménez-Turba, A. (2008). Método Colorimétrico-XTT: Como Evaluación de Alto Rendimiento de Sustancias con Actividad Leishmanicida. *BIOFARBO*, 16, 21–27.
- Williams, C., Espinosa, O. A., Montenegro, H., Cubilla, Y. L., Capson, T. L., Ortega-Barría, E., & Romero, L. (2003). Hydro-soluble Formazan XTT: Its Application to Natural Products Drug Discovery for Leishmania. *Journal of Microbiological Methods*, 55(3), 813–816.
- WHO (1995). WHO Model Prescribing Information: Drugs Used in Parasitic Diseases (2a ed.). Hong Kong. Recuperado de <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/jh2924s/2.11.2.html>
- WHO (2018). Chagas Disease (American Trypanosomiasis): Key Facts. Recuperado de [http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))