

Cinvestav-Monterrey

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**Unidad Monterrey**

**Foto-inactivación del parásito *Trypanosoma cruzi* mediante el uso  
de luz visible.**

**Tesis que presenta:**

I.B. Tomás Jafed Buenfil Chi

**para obtener el Grado de**

Maestro en Ciencias

**en la Especialidad de**

Ingeniería y Física Biomédicas

**Directora de Tesis:**

Dra. Hilda Josefina Mercado Uribe

## Agradecimientos

En primera instancia, al Consejo Nacional de Ciencia Y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante el período de estudios de maestría.

A mi tutora de tesis, la Dra. Hilda J. Mercado Uribe por brindarme la confianza, apoyo y asesoría para realizar este proyecto en tiempo y forma.

A mis sinodales:

El Dr. Jesús Carlos Ruiz Suárez por sus comentarios, correcciones y por permitirme trabajar en su laboratorio al inicio de la etapa experimental y práctica de este proyecto.

El Dr. José Rafael Guzmán Sepúlveda por sus comentarios, correcciones, así como el apoyo recibido al instalar el arreglo optoelectrónico automatizado con fibra óptica utilizado en la etapa experimental del presente proyecto.

A Alejandra Nicolás Cruz, por ser una gran amiga y compañera en este viaje desde su inicio en propedéuticos, todos los momentos compartidos, así como por enseñarme el proceso de cultivo de *T. cruzi*, orientarme y aclarar mis dudas al respecto.

A Alberto Daniel Ortega Zambrano, por su buen compañerismo, ser un gran colega, asesorarme desde mi llegada al laboratorio y enseñarme sobre la técnica de inactivación fotodinámica.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV) Unidad Monterrey y a todos los profesores que contribuyeron en mi formación académica.

Agradezco a mi familia y amigos, por la animosidad, apoyo y siempre alentarme a seguir adelante en todo lo que me proponga. Principalmente a mis padres Claudia Chi Soberanis y Tomás Buenfil Gómez, quienes siempre han estado apoyándome y motivándome a alcanzar mis sueños, a ellos les debo el alcanzar este logro en mi carrera. A mi hermana Rosgre Buenfil, por el apoyo y los ánimos en todo este proceso. A mis tíos Nelly, Remigio, Rebeca, Francisca y Rosalía por su apoyo desde el inicio de esta etapa hasta su culminación y estar pendiente de mi en todo momento.

# Índice

Índice de figuras.....	iv
Índice de tablas.....	vii
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Enfermedad de Chagas.....	1
1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	2
1.2.1. Clasificación taxonómica y Unidades Discretas de Tipificación.....	2
1.2.2. Estructura celular.....	5
1.2.3. Morfología.....	6
1.2.4. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	9
1.3. Aspectos clínicos de la enfermedad.....	11
1.4. Tratamientos.....	12
1.5. Bioseguridad en el laboratorio.....	14
1.6. Inactivación Fotodinámica.....	14
1.6.1. Fotosensibilizadores.....	16
1.6.2. Curcumina.....	17
1.6.3. Fuente emisora de luz.....	20
1.7. Planteamiento del problema.....	21
1.8. Hipótesis.....	22
1.9. Objetivos.....	22
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
2.1. Preparación del medio de cultivo.....	23
2.2. Preparación de buffer de fosfatos (PBS).....	24
2.3. Preparación de curcumina.....	24
2.4. Cultivo <i>in-vitro</i> de parásitos.....	25
2.4.1. Introducción de las muestras en la cámara de Neubauer.....	26
2.5. Irradiación de muestras de <i>T. cruzi</i> .....	27
2.5.1. Preparación de alícuotas y grupos de estudio.....	27
2.5.2. Placa de cultivo celular.....	29
2.5.3. Fuente emisora de luz (arreglo optoelectrónico).....	30

<b>3. RESULTADOS</b> .....	31
<b>3.1. Cinética de crecimiento de <i>T. cruzi</i></b> .....	31
<b>3.2. Cinética de crecimiento de <i>T. cruzi</i> con curcumina</b> .....	32
<b>3.3.- Inactivación de <i>T. cruzi</i></b> .....	33
<b>3.3.1.- CL-Brener</b> .....	33
<b>3.3.2. Ninoa</b> .....	41
<b>4. DISCUSIÓN</b> .....	48
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	50
<b>6. PERSPECTIVAS</b> .....	51
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	52

## Índice de figuras

Figura 1.1. Distribución global de casos asociados a la enfermedad de Chagas.....	1
Figura 1.2. Esquemas sobre los modelos propuestos A) de doble hibridación y B) tres ancestros que originaron los linajes híbridos de <i>T. cruzi</i> .....	3
Figura 1.3. Representación esquemática de los organelos de amastigote de <i>T. cruzi</i> .....	7
Figura 1.4. Representación esquemática de los organelos de epimastigote de <i>T. cruzi</i> .....	8
Figura 1.5. Representación esquemática de los organelos de Tripomastigote de <i>T. cruzi</i> .....	9
Figura 1.6. Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> .....	10
Figura 1.7. Generación de Especies Reactivas de Oxígeno.....	15
Figura 1.8. Estructura de la curcumina.....	19
Figura 1.9. Tautómeros de la curcumina.....	19
Figura 1.10. Formas cerrada y abierta del enol .....	19
Figura 1.11. Espectro de absorción de la curcumina.....	20
Figura 2.1. Retícula de conteo de la cámara de Neubauer.....	25
Figura 2.2.- Distribución de las muestras en la placa de cultivo celular .....	29
Figura 2.3. Arreglo optoelectrónico automatizado.....	30
Figura 2.4. Irradiación de cultivos usando una fibra óptica.....	30
Figura 2.5. Arreglo optoelectrónico con fibra óptica.....	30
Figura 3.1. Cinética de crecimiento de cepas CL-Brener y Ninoa de <i>T. cruzi</i> , n=3.....	31
Figura 3.2. Cinética de crecimiento de las cepas de <i>T. cruzi</i> adicionando curcumina n=3.....	33
Figura 3.3. Grupos de control y resultados de la inactivación de CL-Brener (16mW) el mismo día de la irradiación, n=3.....	34
Figura 3.4. Resultados obtenidos en la inactivación de cepa CL-Brener de <i>T. cruzi</i> . Día 1 Post irradiación (16mw), n=3.....	35
Figura 3.5. Resultados obtenidos en la inactivación de cepa CL-Brener de <i>T. cruzi</i> . Día 2 Post irradiación (16mw), n=3.....	35
Figura 3.6. Resultados obtenidos en la inactivación de cepa CL-Brener de <i>T. cruzi</i> . Día 3 Post irradiación (16mw), n=3.....	36

Figura 3.7. Muestras con fotosensibilizador a través del tiempo. Cepa CL-Brener (16 mW), n=3.....	37
Figura 3.8. Grupos de control y resultados de la inactivación de CL-Brener (32 mW) el mismo día de la irradiación, n=3.....	37
Figura 3.9. Resultados obtenidos en la inactivación de cepa CL-Brener de <i>T. cruzi</i> . Día 1 Post irradiación (32 mw), n=3.....	38
Figura 3.10. Resultados obtenidos en la inactivación de cepa CL-Brener de <i>T. cruzi</i> . Día 2 Post irradiación (32 mw), n=3.....	39
Figura 3.11. Resultados obtenidos en la inactivación de cepa CL-Brener de <i>T. cruzi</i> . Día 3 Post irradiación (32 mw), n=3.....	39
Figura 3.12. Seguimiento de las muestras de la cepa CL-Brener control (PS) e irradiada (PS*) con luz azul y curcumina (n=3).....	40
Figura 3.13. Grupos control y resultados de la inactivación de Cepa Ninoa de <i>T. cruzi</i> (16 mW) el mismo día de la irradiación, n=3.....	41
Figura 3.14. Resultados obtenidos en la inactivación de cepa Ninoa de <i>T. cruzi</i> . Día 1 Post irradiación (16 mw), n=3.....	42
Figura 3.15. Resultados obtenidos en la inactivación de cepa Ninoa de <i>T. cruzi</i> . Día 2 Post irradiación (16 mW), n=3.....	43
Figura 3.16. Resultados obtenidos en la inactivación de cepa Ninoa de <i>T. cruzi</i> . Día 3 Post irradiación (16 mW), n=3.....	43
Figura 3.17. Seguimiento de las muestras de la cepa Ninoa control (PS) e irradiada (PS*) con luz azul y curcumina (n=3).....	44
Figura 3.18. Grupos control y resultados de la inactivación de Cepa Ninoa de <i>T. cruzi</i> (32 mW) el mismo día de la irradiación, n=3.....	45
Figura 3.19. Resultados obtenidos en la inactivación de cepa Ninoa de <i>T. cruzi</i> . Día 1 Post irradiación (32 mW), n=3.....	46
Figura 3.20. Resultados obtenidos en la inactivación de cepa Ninoa de <i>T. cruzi</i> . Día 2 Post irradiación (32 mW), n=3.....	46

Figura 3.21. Resultados obtenidos en la inactivación de cepa Ninoa de *T. cruzi*. Día 3 Post irradiación (32 mW), n=3.....47

Figura 3.22. Seguimiento de las muestras de la cepa Ninoa control (PS) e irradiada (PS\*) con luz azul y curcumina (n=3).....47

## Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>T. cruzi</i> .....	2
Tabla 2. Aspectos clínicos y epidemiológicos asociados a cada DTU.....	4
Tabla 3. Tratamientos recomendados por los CDC contra el mal de Chagas.....	13
Tabla 4. Composición de la cúrcuma.....	17
Tabla 5. a) Reactivos utilizados para preparar medio LIT .....	23
Tabla 5. b) Reactivos utilizados para complementar al medio LIT .....	23
Tabla 6. Reactivos utilizados para preparar PBS.....	24

## Resumen

En el presente trabajo investigamos el efecto de la inactivación fotodinámica en cepas del parásito hemoflagelado *T. cruzi*, en estadio epimastigote, principal agente causal del mal de Chagas. Las cepas que fueron sometidas a estudio son la CL-Brener y Ninoa. Se identificó la curva de crecimiento del parásito para verificar viabilidad y buen estado de las cepas, adicionalmente se obtuvo una curva de crecimiento de ambas cepas de *T. cruzi*, en la cual el medio de cultivo fue adicionado con curcumina. Los resultados obtenidos no identifican efectos citotóxicos derivados de la degradación de la misma. Los parásitos fueron sometidos a períodos de irradiación de 1 hora con potencias de 16 y 32 mW. Se obtuvieron resultados satisfactorios para ambas cepas, con un porcentaje de inactivación superior al 85% y 90% para Ninoa y CL-Brener, respectivamente. Nuestro trabajo contribuye en identificar el efecto de la curcumina utilizada como fotosensibilizador y la susceptibilidad de *T. cruzi* a los efectos provocados por la exposición a la luz visible.

## **Abstract**

In the present work we investigate the photodynamic inactivation method and the degree of inactivation produced on strains of the hemoflagellate parasite *T. cruzi*, in the epimastigote stage, the main causal agent of Chagas disease. We study CL-Brener and Ninoa strains. The grow curve of the parasite was identified to verify viability and good condition of the strains, additionally a growth curve of both strains of *T. cruzi* was obtained, in which the culture medium was added with curcumin. The results obtained do not identify cytotoxic effects derived from curcumin degradation. The parasites were irradiated during one hour at 16 and 32 mW. We obtained an inactivation percentage higher than 85% and 90% for Ninoa and CL-Brener respectively. Our work contributes to identifying the effect of curcumin as a photosensitizer and the susceptibility of *T. cruzi* to the effects caused by exposure to visible light.

# INTRODUCCIÓN

## 1.1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas, también denominada tripanosomiasis americana, es una zoonosis descrita por primera vez en el estado de Minas Gerais, Brasil en 1909 por el doctor Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas. El agente etiológico de la enfermedad es el hemoparásito protozooario flagelado, *Trypanosoma cruzi*. [1,2,23]

En la actualidad representa un reto epidemiológico, ya que se considera como una condición endémica y problema de salud pública en gran cantidad de países latinoamericanos que van desde México hasta el sur de Chile y Argentina. Aunque la preocupación se da a escala global debido a factores como la urbanización y continua migración de individuos provenientes de países endémicos hacia lugares no endémicos de la enfermedad, en los cuales se ha detectado la presencia de pacientes infectados, como son: Estados Unidos y Canadá en Norteamérica, así como casos encontrados en Australia, Europa y Japón. En la figura 1.1. se muestra la distribución global de casos. [2,3,5]

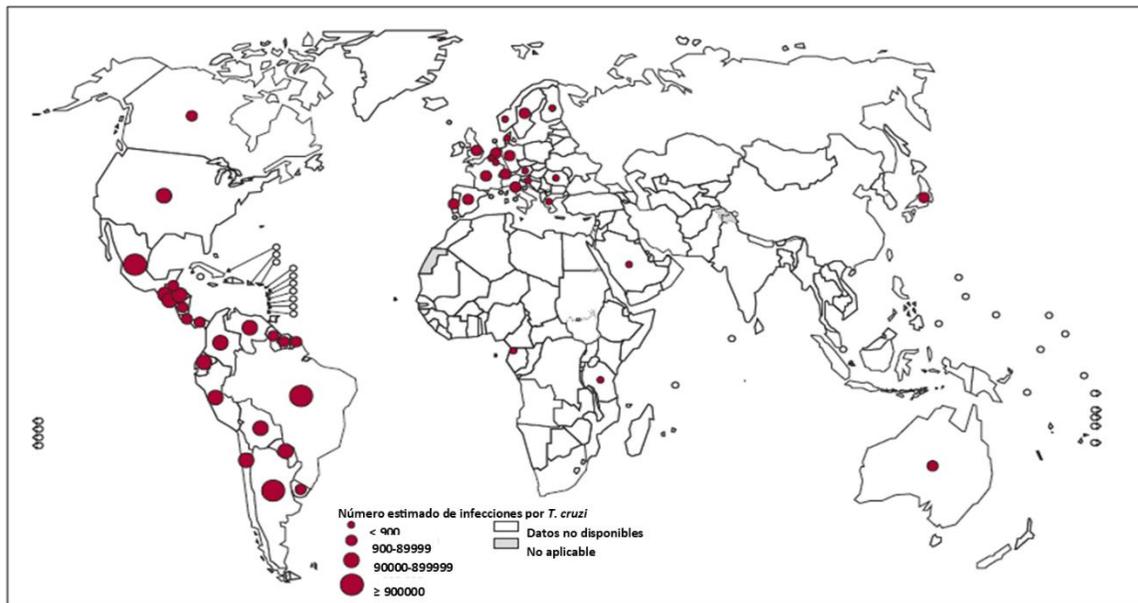


Figura 1.1. Distribución global de casos asociados a la enfermedad de Chagas [9].

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estiman entre 6 a 7 millones de personas infectadas con *T. cruzi*. La principal vía de transmisión se da de manera vectorial (más del 80% de las infecciones registradas), debido al contacto del ser humano con heces u orina de chinches de triatominos hematófagos infectados de la familia Reduviidae, pertenecientes a los géneros *Triatoma* (*T. Infestans*, *T. dimidiata*), *Rhodnius* (*R. prolixus*) y *Pastrongylus* (*P. megistus*). [3,4,6]

Otras vías de transmisión son: la vía transfusional, se produce a través de transfusiones sanguíneas de donantes infectados por *T. cruzi*, se considera como el segundo mecanismo en orden de ocurrencia (aproximadamente 20% de las infecciones); congénita transplacentaria (2-6%), otros mecanismos menos frecuentes son: accidentes de laboratorio, vía oral (al ingerir alimentos contaminados) y trasplantes de órganos. [3,4,6,23]

## 1.2. *Trypanosoma cruzi*

### 1.2.1. Clasificación taxonómica y Unidades Discretas de Tipificación

El parásito protozoario flagelado *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas. En la siguiente tabla se especifica la ubicación taxonómica del mismo. [15]

Taxonomía	
Dominio	Eukaryota
Reino	Protista
Filo	Protozoa
Subfilo	Sarcomastigophora
Clase	Kinetoplastea
Orden	Kinetoplastida
Familia	Trypanosomatidae
Género	<i>Trypanosoma</i>
Especie	<i>T. cruzi</i>

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *T. cruzi* [15].

En un consenso efectuado en 2009, se evidenció, acorde a análisis filogenéticos realizados a diversas cepas de *T. cruzi*, que independientemente de ser catalogada como una especie cuya evolución es clonal, existe una alta variabilidad genética y eventos de recombinación genética e hibridación entre las mismas, lo que conduce a la aparición de poblaciones multiclonales. La aparición de estas poblaciones puede deberse a que la infección de los mamíferos en zonas endémicas es a través de la exposición a diferentes especies de triatomíneos. Por lo que la clasificación actual se da bajo las llamadas “Unidades Discretas de Tipificación” (DTUs). Según Tibayrenc (2003), éstas describen conjuntos de poblaciones que son genéticamente más similares entre sí que a cualquier otra población, y son identificables mediante marcadores moleculares comunes, denominados etiquetas. [22,24,25]

Las DTUs se denominan como TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI. En la figura 1.2. se muestran los dos modelos propuestos que pretenden explicar el modelo evolutivo de la clasificación actual.

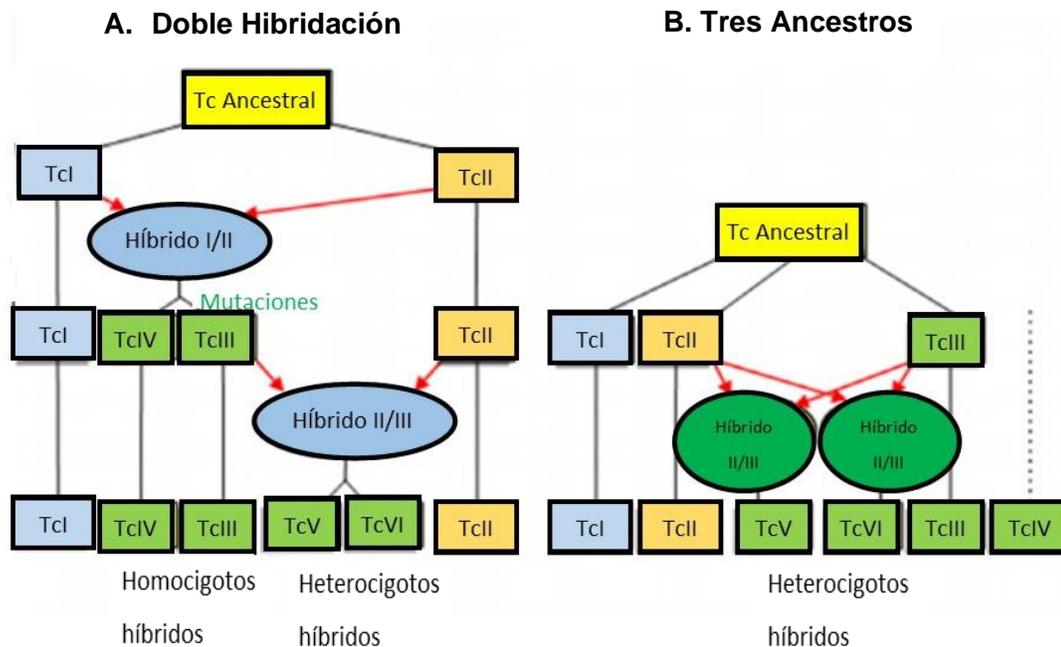


Figura 1. 2. Esquemas sobre los modelos propuestos A) de doble hibridación y B) tres ancestros que originaron los linajes híbridos de *T. cruzi* [26]

En la tabla 2, se hace un compendio con las características generales asociadas a cada DTU.

<b>DTU</b>	<b>Ciclo de transmisión</b>	<b>Distribución geográfica de la enfermedad</b>	<b>Aspectos Clínicos</b>
TcI	Predominante en ciclo silvestre, se han documentado casos domésticos y peri-domésticos.	Norteamérica, Centroamérica y Norte de Sudamérica	Cardiomiopatías. No asociado a infecciones congénitas
TcII	Predominante en ciclo doméstico y raro en selvático	Cono sur y de manera esporádica en Norteamérica	Cardiomiopatías Megasíndromes (megacolon y megaesófago) No asociado a infecciones congénitas
TcIII	Predominante en ciclo selvático	Sudamérica	Raramente causa infecciones en humanos o animales domésticos
TcIV	Predominante en ciclo selvático y raro en doméstico	Norteamérica	Infección de animales silvestres
		Sudamérica	Asociado a transmisión oral y casos agudos severos en humanos en Brasil
TcV	Predominante en ciclo doméstico y raro en selvático	Cono sur, Gran Chaco y Sur de Brasil	Casos agudos severos, megasíndromes digestivos y cardiopatías. Asociado a infecciones congénitas en Bolivia
TcVI	Predominante en ciclo doméstico y raro en selvático	Cono sur y Gran Chaco	Casos agudos severos, megasíndromes digestivos y cardiopatías

Tabla 2. Aspectos clínicos y epidemiológicos asociados a cada DTU [adaptado de 26,27,28].

### 1.2.2. Estructura celular

Una de las características principales de *T. cruzi* es la presencia de una membrana plasmática compuesta de proteínas, lípidos, carbohidratos que en conjunto forman la glicocálix, material filamentoso ubicado en la parte externa de la membrana plasmática, está presente en todas las fases que comprenden el ciclo de vida del parásito. Su espesor varía dependiendo del estadio del parásito, contando con 5 nm en amastigotes y epimastigotes, hasta 15 nm de espesor en tripomastigotes sanguíneos. En base a estudios realizados a través de la técnica de electroforesis a poblaciones mixtas, provenientes de cultivos axénicos de epimastigotes y tripomastigotes, se determinó el valor de la carga para ambos estadios, resultando una carga con valor de  $-0.52 \mu\text{m sec}^{-1}\text{V}^{-1}\text{cm}$  en epimastigotes y de  $-1.14 \mu\text{m sec}^{-1}\text{V}^{-1}\text{cm}$  en tripomastigotes metacíclicos. <sup>[16]</sup>

Otra característica importante que contienen los protozoarios tripanosomátidos es la presencia de una pared de microtúbulos subpeliculares localizada debajo de la membrana plasmática, que se encuentran conectados unos a otros con ésta a través de filamentos cortos. Esta asociación determina la rigidez de la célula y dificultades encontradas en la rotura de la célula por medios mecánicos. Las secciones transversales de los microtúbulos muestran que son estructuras huecas, cuya pared tiene un espesor de 5 nm y la porción central muestra un diámetro de aproximadamente 20 nm. <sup>[16]</sup>

Los miembros de la familia Trypanosomatidae se movilizan a través de un flagelo que nace del cuerpo basal o kinetosoma, que se sitúa alrededor de la envoltura mitocondrial del cinetoplasto, y que emerge de una invaginación llamada bolsillo flagelar. El flagelo presenta 9 pares de microtúbulos axonemales y 1 par central que se oculta en la porción distal, adicionalmente el cuerpo basal presenta una estructura cilíndrica conformada por 9 tripletes de microtúbulos. En conjunto, estas dos estructuras constituyen el órgano de locomoción

del parásito. La longitud de éste varía de acuerdo a la etapa de desarrollo. En amastigotes es de 1  $\mu\text{m}$  de longitud, y cerca de 20  $\mu\text{m}$  al final del ciclo intracelular. El flagelo puede establecer contacto con todo tipo de superficies con las cuales interactúa el parásito. [16,17,18]

Al igual que todas las células eucariotas, *T. cruzi* posee una sola mitocondria, que se expande por toda la célula. Ésta posee Ácido Desoxirribonucleico (ADN), en el cual se determinó una organización cuya conformación se da a manera de minicírculos y se concentra en una región de la mitocondria localizada debajo del cuerpo basal dando origen al cinetoplasto (estructura intramitocondrial). [17,18]

Se ha observado la presencia de un organelo denominado glicosoma, que se encuentra envuelto por una membrana y es de matriz densa, cuya función principal es la de localizar en su interior a todas las enzimas de la vía glicolítica del parásito. [17,18]

Las estructuras descritas en este apartado se pueden visualizar en las figuras 1.3, 1.4 y 1.5.

### **1.2.3. Morfología**

El complejo ciclo de vida de *T. cruzi* comprende 3 formas completamente diferenciadas y definidas. [10,11,19]

- 1) Amastigotes: El estadio multiplicativo al interior celular del mamífero, tiene una forma ovalada que mide aproximadamente 3-6  $\mu\text{m}$  de diámetro. Un flagelo corto nace a partir del bolsillo flagelar y su cinetoplasto se puede encontrar en la región anterior del núcleo celular, que posee una forma de bastón. Este estadio se puede obtener en el laboratorio al infectar células provenientes de algún modelo animal o cultivadas *in-vitro*. Se puede muestra su estructura y composición en la figura 1.3.

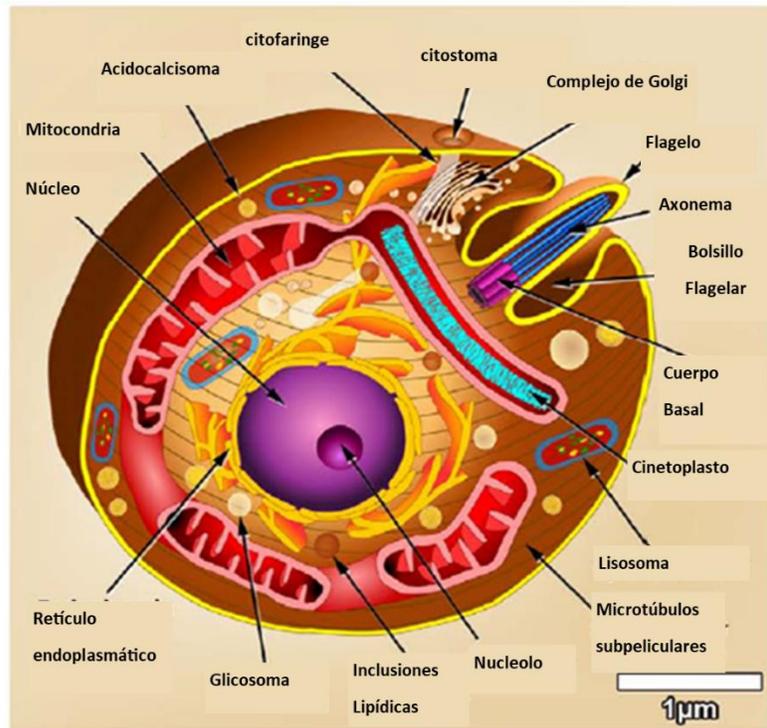


Figura 1.3. Representación esquemática de los organelos de amastigote de *T. cruzi* [11]

- 2) Epimastigotes: Son organismos de forma fusiforme y replicativa que miden aproximadamente 20-40  $\mu\text{m}$  de longitud y el cinetoplasto se suele encontrar en forma de bastón en la región anterior al núcleo. El flagelo nace del bolsillo flagelar, hasta la región anterior del parásito y se mantiene unido al cuerpo del parásito a través de una membrana ondulante. En esta fase se detectan reservomas, que son organelos formados a partir de la fusión de vesículas originadas en la vía endocítica y aparato de Golgi. Su función principal es la de acumular y almacenar proteínas, así como el almacenamiento de lípidos. Suelen ser observados en la fase logarítmica de crecimiento de *T. cruzi* en cultivos acelulares y en el intestino del huésped invertebrado (vector). Se muestra su estructura y composición en la figura 1.4.

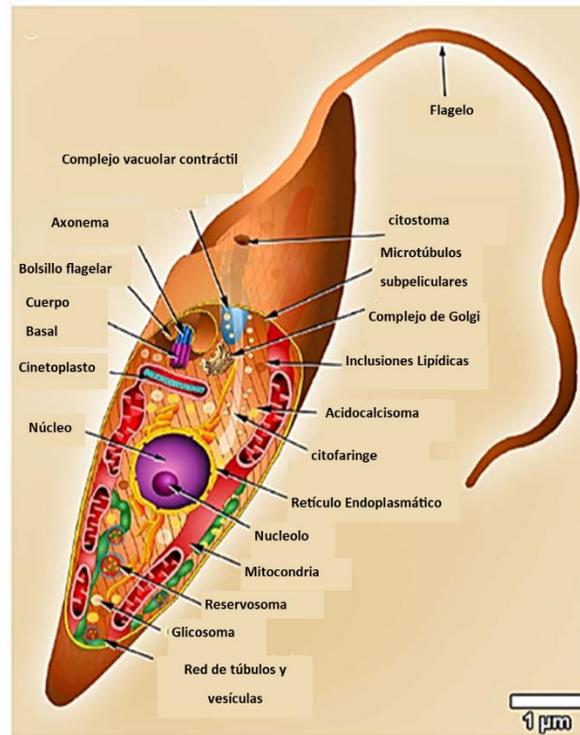


Figura 1.4. Representación esquemática de los organelos de epimastigote de *T. cruzi* [11]

3) Tripomastigotes: Es la forma infectiva del parásito, poseen una longitud cercana a 25  $\mu\text{m}$  y con un diámetro de 2  $\mu\text{m}$ . El cinetoplasto está localizado en la parte posterior del núcleo y es redondo, en este estadio el flagelo nace del bolsillo flagelar en la zona posterior del parásito, que se fija en el cuerpo de éste mediante una membrana ondulante, no se detecta el nucléolo. Se pueden encontrar en el espacio intercelular y en la sangre del mamífero (*T. sanguíneos*), en el intestino posterior, heces y orina del vector (*T. metacíclicos*). Así como en la fase estacionaria de crecimiento en cultivos axénicos y en la fase líquida de cultivos celulares. Se muestra su estructura y composición en la figura 1.5.

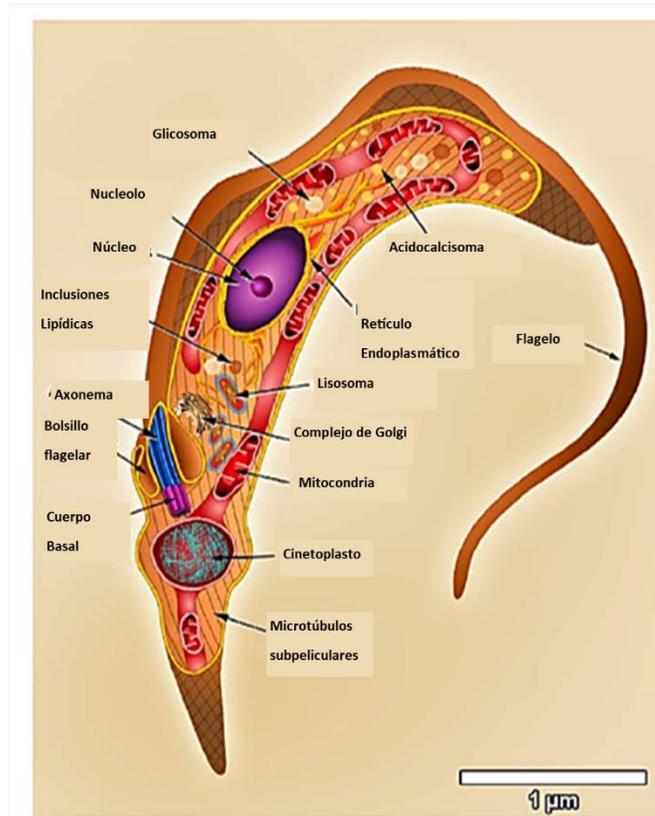


Figura 1.5. Representación esquemática de los organelos de tripomastigote de *T. cruzi* [11]

#### 1.2.4. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo biológico de *T. cruzi* involucra a dos huéspedes intermediarios: el invertebrado, que actúa como vector (insecto triatomino) y el vertebrado (mamíferos), principalmente el ser humano. Como se ha descrito en la sección 1.2.3, el parásito presenta 3 estadios diferenciados, amastigotes, epimastigotes y tripomastigotes. En la figura 1.6. se muestra de manera general el ciclo biológico de *T. cruzi*.<sup>[10,12,13,14]</sup> El ciclo inicia cuando el insecto triatomino (vector) se alimenta y succiona tripomastigotes sanguíneos que se encuentran en el torrente sanguíneo del huésped vertebrado infectado (humano). En el estómago del

vector, se descomponen la mayoría de los tripomastigotes, los que lograron sobrevivir se diferencian a su estadio de epimastigotes replicativos, mediante un proceso denominado metacicloogénesis. Los epimastigotes viajan al intestino medio donde se dividen por fisión binaria, para posteriormente adherirse a las membranas perimicrovillares secretadas por las células del intestino posterior. A continuación, migran al recto y se adhieren al epitelio a través de un flagelo, antes de diferenciarse a su forma de tripomastigote metacíclico, estadio altamente infeccioso y no replicativo. Éstos son alojados en la ampolla rectal del vector, hasta ser eliminados a través de las heces u orina del insecto triatomino al ingerir sangre del vertebrado. Al interior celular del mamífero se transforman en amastigotes. Estos se dividen repetidamente mediante fisión binaria y dan espacio a tripomastigotes sanguíneos que se liberan en el espacio intercelular, para penetrar al interior de otras células e iniciar un nuevo ciclo de infección. [10,12,14]

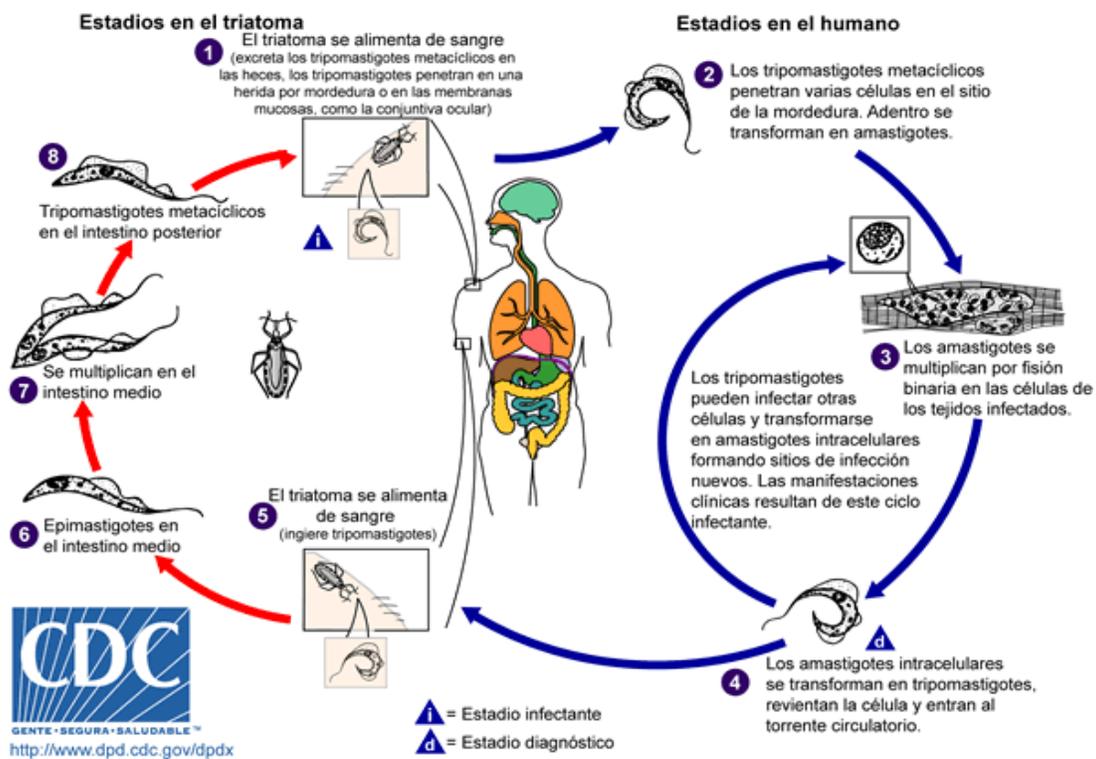


Figura 1.6. Ciclo biológico de *T. cruzi* [13]

### 1.3. Aspectos clínicos de la enfermedad

La enfermedad de Chagas se caracteriza por dos fases o períodos.

**Fase aguda:** Período que inicia al adquirirse la infección, tiene una duración aproximada de hasta 2 meses, en la cual se encuentra una alta parasitemia en sangre, que favorece el diagnóstico de la enfermedad a través de la identificación y detección de tripomastigotes en sangre periférica mediante las técnicas como microscopía de luz, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hemocultivos y xenodiagnósticos. Regularmente esta fase es asintomática. [2,3]

Las manifestaciones sintomáticas de la enfermedad aparecen alrededor de 10 días después de la infección e incluyen síndrome febril, adenopatías, hepatoesplenomegalia, exantema, anemia, mialgias, artralgias y convulsiones, y en casos severos se producen meningoencefalitis y miocarditis. [2,3,5,8]

Al haberse contraído la infección mediante el mecanismo de transmisión vectorial, puede aparecer en el sitio de la picadura una reacción local conocida como Chagoma de inoculación, así como la presencia del edema bpalpebral unilateral o signo de Romaña. Según la OMS, aproximadamente del 1-2% de los pacientes infectados son diagnosticados en esta fase de la enfermedad. [2,3,5,7,8]

**Fase crónica:** Período en el cual la parasitemia disminuye. El diagnóstico se basa en la detección de anticuerpos IgG anti-*T.cruzi*, y se confirma a través de técnicas inmunológicas como el enzoinmunoanálisis (ELISA), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y la hemoaglutinación indirecta (HAI). [3,5,7,8]

- a) Forma indeterminada. Fase asintomática o latente que da comienzo a partir de 8 semanas después de contraer la infección, su duración comprende entre 10 a 30 años. Entre un 60 a 70% de los pacientes pueden permanecer en esta fase el resto de su vida, y solamente entre un 30 a 40% logran desarrollar síntomas años después del contagio.
  
- b) Forma determinada. Así se denomina a la forma sintomática, en la cual entre un 20 al 30% de los pacientes presentan cardiopatía chagásica, que produce alteraciones eléctricas en diversas zonas del músculo cardíaco (arritmias, insuficiencia cardíaca, aneurismas ventriculares). La tasa de mortalidad anual asociada ha estos padecimientos es del 3.9%. Entre un 5 al 35% de los afectados puede desarrollar afecciones digestivas (síndromes de megacolon y megaesófago) o mixtas (cerca del 10% de los pacientes).

#### **1.4. Tratamientos**

En la actualidad, solo existen dos fármacos antiparasitarios, Benznidazol [BNZ] y Nifurtimox [NFX] que son los únicos que han sido prescritos y aprobados para tratar el mal de Chagas. En México son controlados por la Secretaría de Salud. El BNZ fue introducido en 1971, como un derivado activo de nitroimidazol, actúa sobre la cadena respiratoria y tiene efecto en contra de las formas amastigote y tripomastigote del parásito. Los principales efectos adversos encontrados son de carácter dermatológico, que van desde presencia de fotosensibilización hasta dermatitis exfoliativa. También se presentan anorexia, náuseas, vómitos, insomnio y disgeusia. Esta aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) casi exclusivamente para uso en pacientes pediátricos (2-12 años). El NFX, se introdujo en 1965, es un compuesto nitofurano, que actúa mediante la producción

de radicales libres y metabolitos electrofilicos, los cuales desencadenan el cese en el desarrollo intracelular del parásito. Es un fármaco de rápida absorción en la vía gastrointestinal y metabolizada en el hígado. Los efectos adversos que pueden presentarse son: afecciones en el tracto gastrointestinal, anorexia, náuseas, vómitos, así como síntomas que afectan al sistema nervioso central (irritabilidad, insomnio, desorientación). Su uso se encuentra bajo protocolo de investigación. Ambos fármacos, son conocidos por reducir la severidad de los síntomas y acortar el curso de la enfermedad y parasitemia detectable. La cura parasitológica solo se observa en un porcentaje que va de los 60-85% de pacientes tratados en la fase aguda de la enfermedad y >90% en casos congénitos, en la etapa crónica la probabilidad de éxito es menor al 60%.

Acorde a lo señalado por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) , en la tabla 3, se presentan las pautas terapéuticas recomendadas por grupos de edad, de cada fármaco. <sup>[1,6,20,21]</sup>

<b>Medicamento</b>	<b>Grupo de edades</b>	<b>Dosis y duración</b>
<b>Benznidazol</b>	2–12 años	5 a 8 mg/kg por día, vía oral, en 2 dosis divididas durante 60 días.
<b>Nifurtimox</b>	≤ 10 años	15 a 20 mg/kg por día, vía oral, en 3 o 4 dosis divididas durante 90 días.
	11–16 años	12.5 a 15 mg/kg por día, vía oral, en 3 o 4 dosis divididas durante 90 días.
	17 años o más	8 a 10 mg/kg por día, vía oral, en 3 o 4 dosis divididas durante 90 días.

Tabla 3.- Tratamientos recomendados por los CDC contra el mal de Chagas. [21]

## 1.5. Bioseguridad en el laboratorio

Las medidas de bioseguridad implementadas en el laboratorio son vitales para proteger, cuidar y prever por la salud del personal que trabaja con material y muestras infectadas con *Trypanosoma cruzi*. Por tal motivo, para la realización experimental de este trabajo se tomaron las medidas y recomendaciones realizadas en:

- Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas) <sup>[29]</sup>

## 1.6. Inactivación Fotodinámica

El método de inactivación fotodinámica requiere de tres componentes: Un agente fotosensibilizador (FS), luz y oxígeno. Su mecanismo de acción se basa en la absorción de fotones de luz (de la misma longitud de onda en la que absorbe el FS). El FS sufre una transición de un estado de baja energía o estado singlete base  $S_0$  (estado en cual dispone de dos electrones con espines opuestos encontrados en un orbital molecular de baja energía) , a un primer estado singlete excitado ( $S_1$ ) de corta duración (ns). La energía suministrada puede llevar al FS a un estado de mayor energía ( $S_2$ ,  $S_3$ , etc.); enseguida éste puede recaer y regresar al estado base ya sea mediante emisión de luz por fluorescencia o conversión interna (CI). Además, el FS en estado  $S_1$ , puede decaer a un proceso llamado cruce entre sistemas (CS), donde el espín del electrón excitado se invierte para sufrir una transición a un estado de energía superior denominado estado triplete excitado, de vida más larga (ms). En el estado triplete puede perder energía a través de la emisión de luz o fosforescencia, así como reaccionar con el oxígeno ambiental (estado fundamental) mediante dos mecanismos o vías fotoquímicas:

- Tipo I: El FS reacciona con moléculas vecinas, lo que implica una transferencia de electrones o de un átomo de hidrógeno, entre el sustrato y el FS, lo que genera radicales libres intermediarios, que al reaccionar con el oxígeno produce especies reactivas de oxígeno (ERO) como: superóxidos ( $O_2^-$ ), radicales hidroxilos (OH) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).
- Tipo II: Implica la transferencia de energía desde el FS al oxígeno molecular  $^3O_2$ ; lo que devuelve al FS a su estado basal y se genera oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), la molécula más perjudicial en el proceso de fotoinactivación.

Sin embargo, en general, las ERO's eventualmente pueden dañar casi todos los tipos de biomoléculas (proteínas, lípidos, ácido nucleico) otros componentes celulares e incluso muerte celular. [31,32,34-37,39]

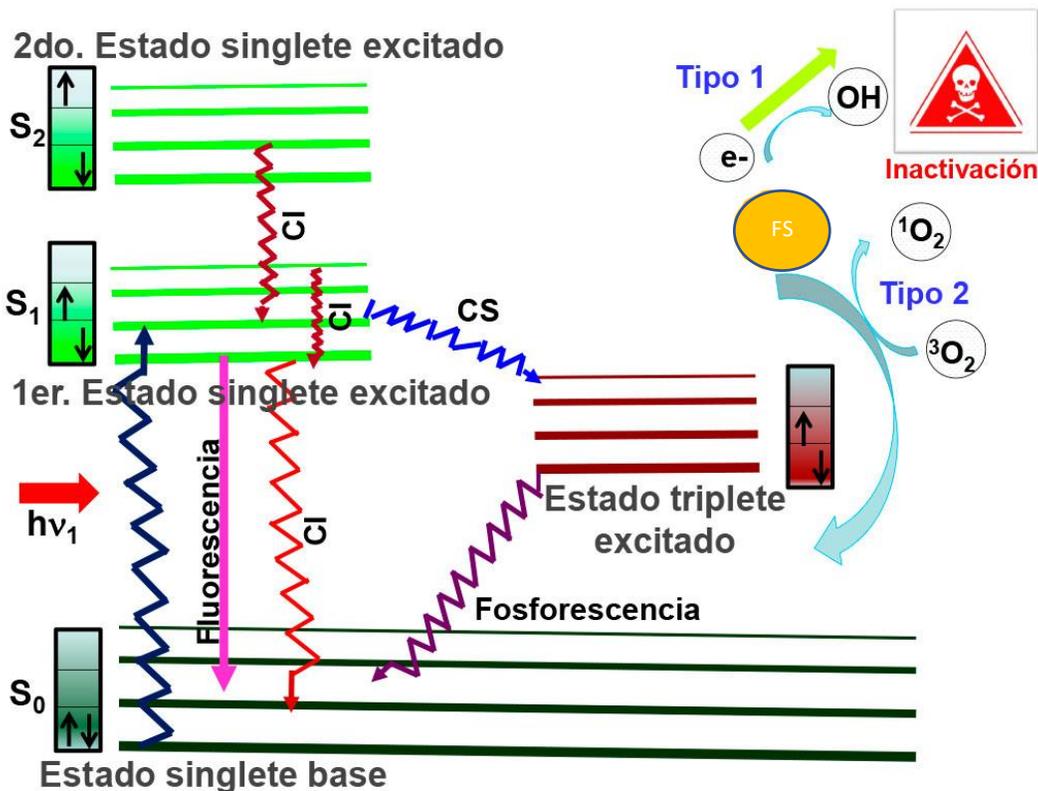


Figura 1.7. Generación de Especies Reactivas de Oxígeno.[37]

### 1.6.1. Fotosensibilizadores

Los fotosensibilizadores (FS) son compuestos químicos, obtenidos mediante derivados sintéticos (derivados de hematoporfirinas, colorantes sintéticos como derivados de xantenos, fenotiazinas, triarilmetanos, antraciclinas, antrapirazoles, entre otros), o de la naturaleza (curcumina, hipericina, antraquinonas de *Heterophyllaea pustulata*), que en su estado base no presentan citotoxicidad, aunque en presencia de luz a una determinada longitud de onda y oxígeno molecular, provocan una serie de reacciones intracelulares originando especies reactivas de oxígeno (ERO's), que conllevan tanto a la muerte celular, como a la eliminación de microorganismos patógenos de infecciones localizadas. [30,31,35]

En diferentes estudios se han descrito las características que deben tener los FS para ser utilizados en terapia fotodinámica antimicrobiana (TFDA). Las más importantes son: [30,34,35,36]

- Presentar alto grado de pureza y tener una composición química conocida.
- Poseer elevada estabilidad química y fotoquímica.
- Ser fácilmente sintetizado.
- Tener una alta producción de ERO's.
- Presentar baja toxicidad en la oscuridad, siendo altamente citotóxico en presencia de luz a una longitud de onda definida.
- Ser de fácil disponibilidad y bajo costo.
- Tener capacidad de absorber luz a longitudes de onda comprendidas en el espectro visible.
- Tener una adecuada lipofiliidad, ser lo suficiente hidrofílicos.

### 1.6.2. Curcumina

Dentro de los fotosensibilizadores naturales, la curcumina muestra características muy interesantes que a continuación se detallan.

La curcumina, pertenece a la familia de los curcuminoides, que son pigmentos polifenólicos obtenidos de los tallos subterráneos de la planta tropical *Curcuma longa* L., especie nativa de climas tropicales del sur y sudeste de Asia, cultivada primordialmente en China e India.

A esta planta se le atribuyen múltiples propiedades y aplicaciones de uso doméstico, y de tratamiento de enfermedades como son síndromes digestivos, fiebres, problemas hepáticos, entre otros. [38,39]

Según lo reportado por González- Albadalejo, 2015, la composición de la cúrcuma se describe en la siguiente tabla.

<b>Composición</b>	<b>Porcentaje (%)</b>
Curcuminoides	2.5
Fibra	3.5
Aceites	4.6
Minerales	3.2
Proteínas	5.8
Grasas	4.7
Agua	12.0
Hidratos de carbono	63.7

Tabla 4.- Composición de la cúrcuma. [38]

Los polifenoles encontrados en la cúrcuma son: la curcumina (60-70%), la desmetoxicurcumina (20-27%), la bisdesmetoxicurcumina (10-15%), y la ciclocurcumina. A la primera, se le adjudican sus propiedades medicinales. <sup>[38,39]</sup>

La curcumina es un diaril-heptanoide, que presenta un esqueleto formado por dos anillos fenólicos conectados entre sí, mediante un puente dicetónico  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado de 7 carbonos. (ver figura 1.8).

La curcumina posee propiedades que le ayudan a interactuar con su entorno.

- Es una molécula anfipática, es parcialmente soluble en agua y disolventes orgánicos.
- La estructura de la molécula presenta dos tautómeros (figura 1.9.) cuya forma predominante en todo tipo de disoluciones y disolventes es la enol, exceptuando los disolventes apolares. La estructura de la forma enol varía de acuerdo con la polaridad del medio como se muestra en la figura 1.10.
- El puente dicetónico conforma la parte polar de la molécula, se comporta como dadora o aceptora de enlaces de hidrógeno. Esto gracias a la conformación estructural del punto anterior. Al saturarse esta actividad (dadora o aceptora de enlaces de hidrógeno) , se activa la capacidad de funcionar como dador y/o aceptor de grupos OH.
- Los grupos OMe, solo funcionan como aceptores de enlaces de hidrógeno.
- La curcumina es estable a temperaturas (< 80-100 °C), y pH ácidos, pero inestable a pH neutros y básicos. La vida media de la curcumina es de 10 minutos en medios básicos y 200 min en medios cuyo pH va en el rango de 3.5-6.0. Aunque la albúmina de suero bovino es capaz de mantener la curcumina funcional por varias horas.
- Es poco soluble en agua.

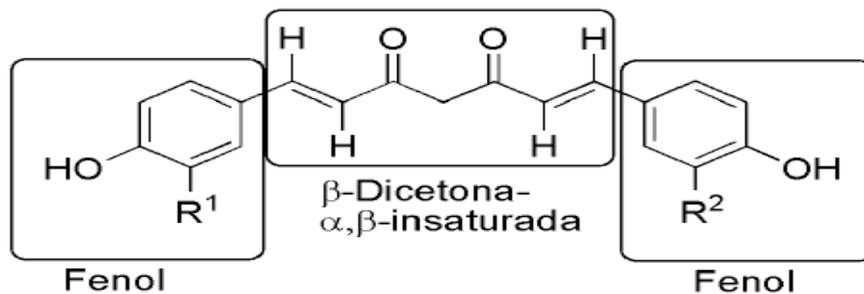


Figura 1.8. Estructura de la curcumina [38]

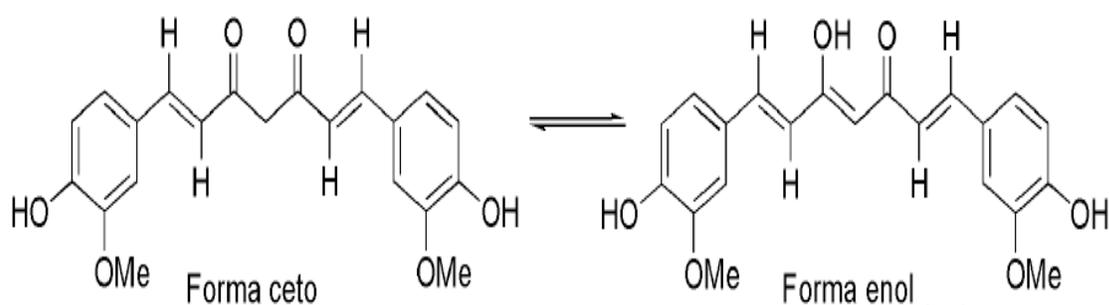


Figura 1.9. Tautómeros de la curcumina [38]

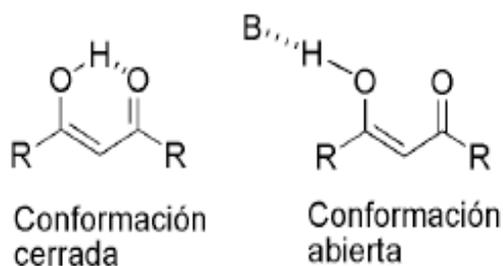


Figura 1.10. Formas cerrada y abierta del enol [38]

. La curcumina posee grupos cromóforos, lo que la hace una molécula fotosensible. Su principal mecanismo de degradación se da a través de un proceso fotoquímico que usa luz visible para la generación de ERO's. Es un FS natural que no presenta toxicidad a dosis altas y muestra buenas propiedades fluorescentes. Sin embargo, tiene algunas desventajas, como la rápida eliminación, que impide que este compuesto pueda alcanzar su máximo potencial. [30,38,39]

El espectro de absorción de la curcumina tiene su pico máximo en 425 nm, como se puede observar en la figura 1.11.

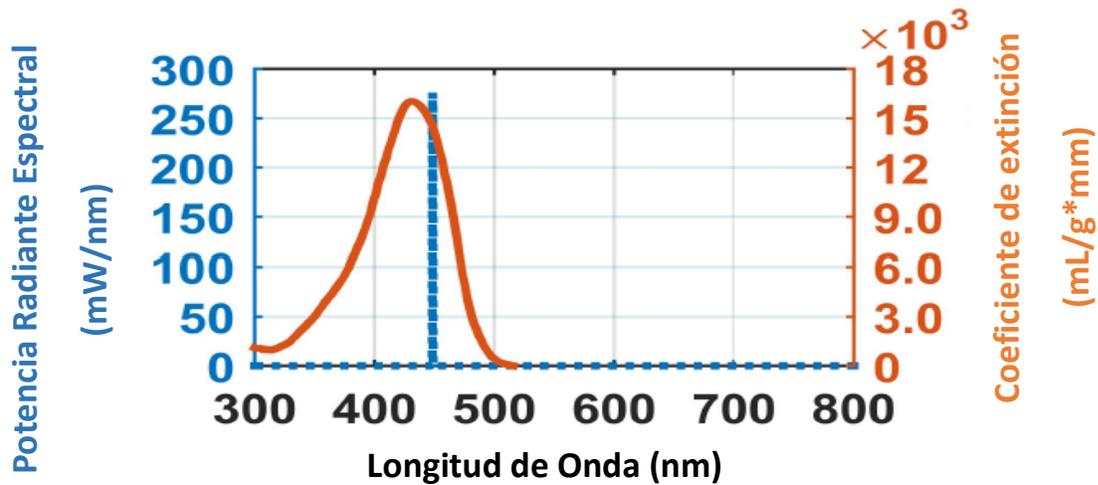


Figura 1.11. Espectro de absorción de la curcumina. (Medido en nuestro grupo de investigación)

### 1.6.3. Fuente emisora de luz

Las fuentes de luz utilizadas en la inactivación fotodinámica deben producir niveles adecuados de ERO's para observar un efecto citotóxico. En consecuencia, el espectro de la luz a utilizar debe coincidir con la longitud de onda de mayor absorción del FS. Se suelen utilizar LED's y láseres, siendo estos últimos los más requeridos debido a que generan luz monocromática de alta energía. La mayoría de los FS se activa con luces entre 630-700 nm. [30-31]

## 1.7. Planteamiento del problema

La enfermedad de Chagas es considerada como un problema de carácter público y endémico en México, ya que contamos con 1.1 millones de personas infectadas en el país, de acuerdo con cifras de la Organización Panamericana de la Salud (OPS). Este problema se agrava debido a la alta movilidad de la población a nivel mundial, provocando una mayor diseminación y descontrol de la enfermedad. En la actualidad se utilizan dos fármacos para tratar esta enfermedad, el Benznidazol [BNZ] y Nifurtimox [NFX], cuyo principal mecanismo de acción es la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO's). El uso de estas sustancias lamentablemente es de larga duración y conlleva efectos secundarios importantes. Con base en lo anterior, y dado que el método de inactivación fotodinámica se basa en la producción de ERO's, nos planteamos el reto de investigar si el uso de la curcumina (que es fotosensibilizador natural e inocuo) en conjunto con la luz visible, logran inactivar epimastigotes de *T. cruzi*.

Utilizamos epimastigotes en este trabajo, debido a que es el estadio del parásito que se puede cultivar y preservar en el laboratorio sin tanto riesgo de infección en el manejo de éstos.

## 1.8. Hipótesis

La inactivación fotodinámica es un método eficiente para inactivar cepas CL-Brener y Ninoa de *T. cruzi*.

## 1.9. Objetivos

Objetivo General:

- Investigar la inactivación de cepas CL-Brener y Ninoa del parásito *T. cruzi* mediante el uso del método de inactivación fotodinámica.

Objetivos Específicos:

- Realizar cultivos *in-vitro* de *T. cruzi*.
- Obtener la cinética de crecimiento de las cepas de estudio.
- Establecer un protocolo de irradiación de los cultivos de *T. cruzi*, usando un sistema optoelectrónico y luz visible.
- Determinar el grado de inactivación y daño celular que produce el método de inactivación fotodinámica en las cepas CL-Brener y Ninoa de *T. cruzi*.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo LIT (Liver Infusion-Tryptose) fue preparado con los siguientes reactivos, para un volumen total de 100 mL:

Reactivo	Concentración
Cloruro de sodio (NaCl)	450 mg
Cloruro de potasio (KCl)	40 mg
Fosfato dibásico de sodio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	420 mg
D(+) Glucosa	200 mg
Infusión de Hígado	500 mg
Triptosa	500 mg

Tabla 5. a) Reactivos utilizados para preparar medio LIT

Los reactivos se vierten en un frasco de vidrio, a los cuales se agregan 89 mL de agua Milli-Q (18.2 MΩ cm), y se esteriliza el contenido en autoclave. A continuación, se complementa el medio con:

Reactivo	Concentración
Hemina [5mg/mL]	0.5 mL
Suero Fetal Bovino (SFB)	10.0 mL
Antibiótico	1.0 mL

Tabla 5.b) Reactivos utilizados para complementar al medio LIT

## 2.2. Preparación de buffer de fosfatos (PBS)

Para un volumen de 1000 mL a una concentración de 1x, se utilizan los siguientes reactivos:

Reactivo	Concentración
Cloruro de sodio (NaCl)	6.5g
Fosfato dibásico de potasio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2.8g
Fosfato monobásico de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.5g

Tabla 6. Reactivos utilizados para preparar PBS.

Los reactivos se vierten en un frasco de vidrio, a los cuales se agregan 1000 mL de agua Milli-Q (18.2 MΩ cm), y se ajusta el pH a 7.4 utilizando ácido clorhídrico (HCl) y/o hidróxido de sodio al 1 Normal (NaOH 1N). Por último, se esteriliza la solución en la autoclave.

## 2.3. Preparación de curcumina

En la balanza microanalítica, se mide una cantidad de 36 mg de curcumina (C7727 Sigma-Aldrich), la cual se vierte a un tubo de ensayo al que se agregan 10 mL de alcohol etílico al 70%, se agita la solución hasta encontrar la menor cantidad de grumos posibles. Enseguida se vierte el contenido del tubo de ensayo a un matraz de aforado, se agregan 90 mL de alcohol al 70% para obtener un volumen total de 100 mL, se agita la solución hasta que sea homogénea. Por último, se vierte el contenido del matraz aforado a un frasco de vidrio cubierto de aluminio en su totalidad, se conserva a una temperatura de -20°C para evitar su degradación. La concentración molar de la curcumina es de  $977 \times 10^{-6}$  M.

## 2.4. Cultivo *in-vitro* de parásitos

Para el desarrollo del presente proyecto se utilizan dos cepas de *T. cruzi* siendo éstas CL-Brener (cepa control) y Ninoa (objeto de estudio).

Para realizar el cultivo de parásitos, el primer paso consiste en realizar un conteo de éstos en la cámara de Neubauer. El hematocitómetro o cámara de Neubauer es una gruesa placa de cristal de unos 30 x 70 mm y 4 mm de grosor, la cual posee 2 cámaras para el conteo de microorganismos y/o células. En una cámara simple la porción central está dividida 3 partes, como se ve en la figura 2.1.

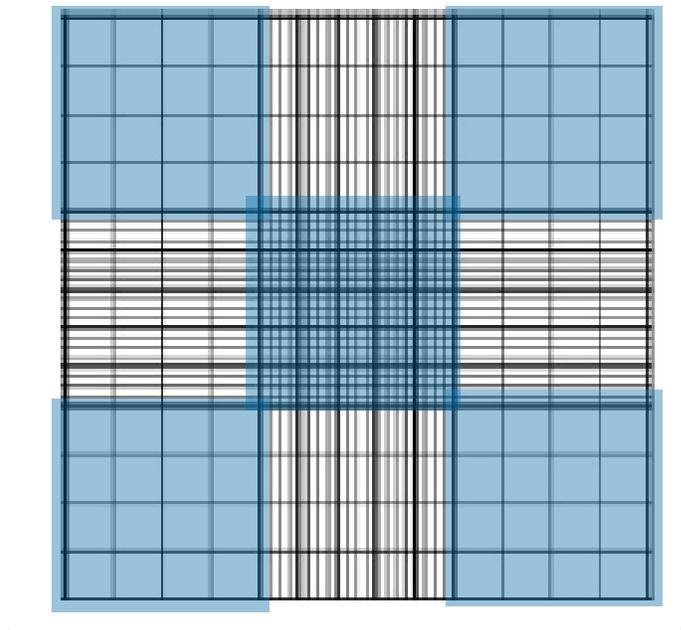


Figura 2.1. Retícula de conteo de la cámara de Neubauer.

Dicha porción central se denomina retícula, la cual mide 3mm x 3mm de lado. Subdividida en 9 cuadrados de 1mm por lado cada uno. Los cuadrados en las esquinas se utilizan para el recuento de leucocitos, el cuadrado central está destinado al recuento de glóbulos rojos,

plaquetas y en nuestro caso de parásitos. Para el recuento se debe colocar sobre la parte central de la cámara un cubreobjetos (22 x 22 mm) el cual delimita un espacio de 0,1mm entre la cámara y sí mismo.

#### **2.4.1. Introducción de las muestras en la cámara de Neubauer**

Se coloca un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer. A continuación, se vierten 10 µL de la muestra de estudio por un extremo de la cámara, entre el cubreobjetos y la misma. Se repite lo mismo con la muestra control.

Se coloca la cámara de Neubauer en el microscopio y se identifica la zona de recuento (cuadro central), solo se contabilizan los parásitos encontrados en 5 cuadrantes de la zona de conteo (las 4 esquinas y el central). Algunas consideraciones a tener en cuenta son: deben contabilizarse los parásitos que topen con el límite superior o izquierdo del cuadrante a contar. El número total de parásitos por mL en el cultivo está determinado por la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Parásitos}}{\text{mL}} = \text{Parásitos contados} * \frac{1}{\text{Factor de volumen}(\text{mm}^3)} * \frac{1000\text{mm}^3}{1 \text{ mL}}$$

Al conocer la cantidad de parásitos por mL en los cultivos de origen, a través de una regla de 3 se determina la cantidad necesaria de cultivo en µL, para obtener una concentración inicial de  $1 \times 10^6$  Parásitos/mL. Se toma la cantidad necesaria de cultivo y se vierte a un tubo de ensayo, como último paso se agrega la cantidad restante de medio LIT para un volumen total de 5 mL. Los cultivos se incuban a una temperatura constante de 28°C. Este procedimiento se realiza una vez a la semana para mantener las cepas sanas y evitar la aparición de tripomastigotes por envejecimiento del cultivo.

## **2.5. Irradiación de muestras de *T. cruzi***

Antes de iniciar con la irradiación de muestras de *T. cruzi*, es de vital importancia preparar todos los materiales y alícuotas necesarias para la realización de los experimentos. En primera instancia, se realiza un conteo con la cámara de Neubauer para determinar la cantidad de parásitos por mL de cultivo, estimar la cantidad de parásitos en las alícuotas y finalmente, saber con cuántos contaremos en los grupos de estudio.

### **2.5.1. Preparación de alícuotas y grupos de estudio.**

Los grupos de estudio se clasifican en ensayos y controles.

1.- Los ensayos, son aquellas muestras de estudio que contienen un fotosensibilizador y son sometidas a irradiación durante un tiempo determinado, con la finalidad de comparar si existe un alto nivel de inactivación de las cepas de *T. cruzi*, respecto a los controles que son sometidos a diferentes escenarios. Se realizan por triplicado en cada experimento y son sometidas a un tiempo de irradiación de 1 hora a diferentes potencias (16 y 32 mW); en otras palabras: Parásitos (Medio LIT) + Agente Fotosensibilizador (Curcumina) + Radiación (Luz Azul).

Para preparar la solución de Curcumina en el buffer de PBS, se toma un 1 ml de la solución de curcumina preparada en el punto 2.3., la cual se vierte a un tubo de ensayo, al cual se agregan 9 mL de PBS para diluir la curcumina y obtener una concentración molar de  $97.7 \times 10^{-6}$  M, 10 veces menor a la solución del punto 2.3.

Las alícuotas están en una proporción de 1:10, y contienen 100  $\mu$ L de solución de curcumina en PBS y 900  $\mu$ L de parásitos en medio de cultivo. Se agita en el vortex durante

30 segundos para homogeneizar. La concentración final de la curcumina es de  $9.77 \times 10^{-6}$  M. Se deja reposar 30 minutos para ser absorbida por los parásitos, antes de irradiar.

2.- Controles, ayudan a determinar y asegurar el buen desempeño de cada experimento.

Estos son:

Control 1: Parásitos (Medio LIT) + Agente Fotosensibilizador (Curcumina) en ausencia de luz. Tiene la finalidad de identificar algún efecto citotóxico derivado de la degradación de la curcumina.

Control 2: Parásitos (Medio LIT) + Medio PBS en ausencia de luz. Sirve para identificar si existe variación alguna o efectos adversos derivados de la diferencia de pH (ya que para obtener la concentración final requerida de curcumina esta se diluye en PBS), que no estén asociados a la curcumina. La alícuota se prepara en una proporción 1:10, contiene 100  $\mu$ L de medio PBS y 900  $\mu$ L de parásitos en medio de cultivo y se agita durante 30 segundos en el vortex para homogeneizar.

Control 3: Parásitos (Medio LIT) en ausencia de luz (control puro), que sirve para identificar si hubo algún error humano, por contaminación al realizar el experimento.

Control 4: Parásitos (Medio LIT) + Radiación (Luz Azul). Su finalidad es la de determinar si solo la exposición a luz azul causa un efecto adverso en las cepas de *T. cruzi*. Se somete a períodos de irradiación de 1 hora a diferentes potencias (16 y 32 mW).

### 2.5.2. Placa de cultivo celular.

Un elemento de vital importancia para la irradiación es el uso de la placa de cultivo celular de 96 pozos, cuya distribución de muestras para los experimentos se visualiza en la figura 2.2. En rojo se señalan los ensayos, en azul los controles no irradiados y en morado el control irradiado. El volumen para cada muestra es de 200  $\mu\text{L}$ . El resto de los pocillos se llena con 200  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q ( $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ) estéril, para evitar evaporación. Al terminar de llenar los pocillos, se cierra la placa y se sella con una lámina de parafilm. Se procede a pesar el contenido antes de irradiar.

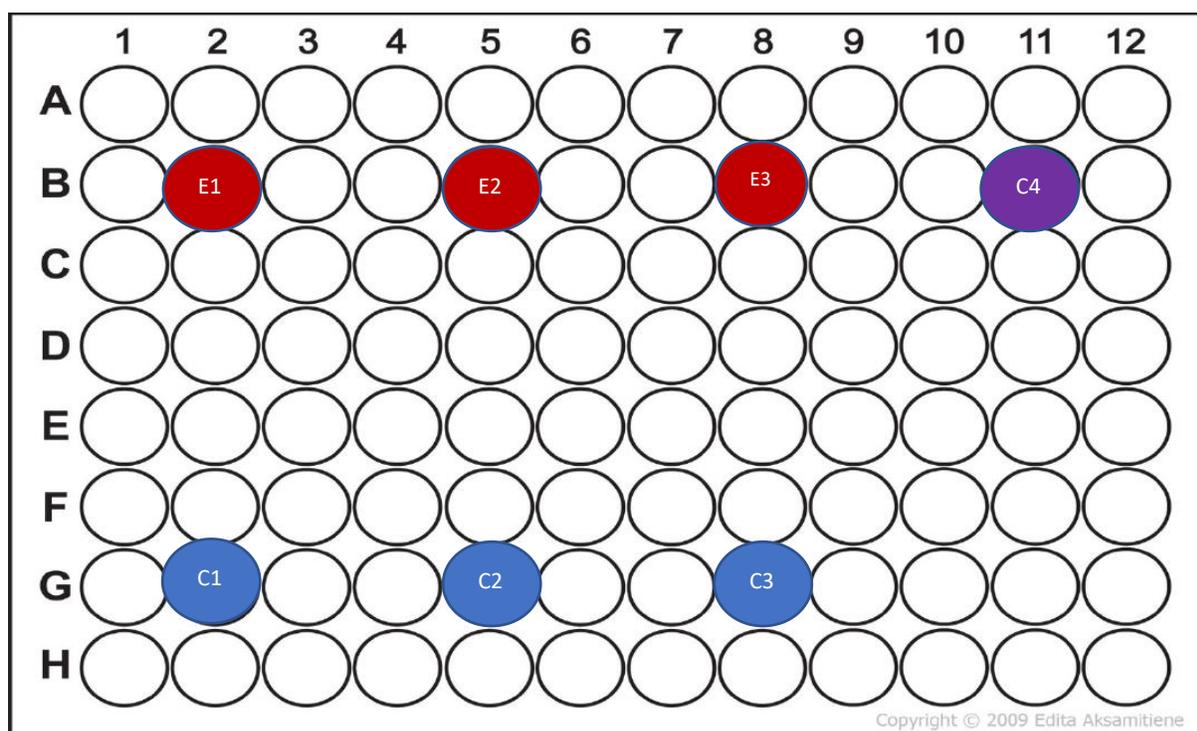


Figura 2.2.- Distribución de las muestras en la placa de cultivo celular. E1-E3: Ensayos por triplicado. C1-C4: hacen referencia a los controles 1,2,3 y 4 respectivamente.

### 2.5.3. Fuente emisora de luz (arreglo optoelectrónico)

En el desarrollo del presente proyecto se trabajó con dos arreglos optoelectrónicos diferentes. En la figura 2.3. se puede observar el arreglo tradicional y en las figuras 2.4. y 2.5. el arreglo con fibra óptica. El segundo fue implementado por cuestiones de seguridad, para poder realizar las irradiaciones dentro de la campana de flujo laminar y evitar lo más que se pudiera, el manejo de las muestras en el exterior.

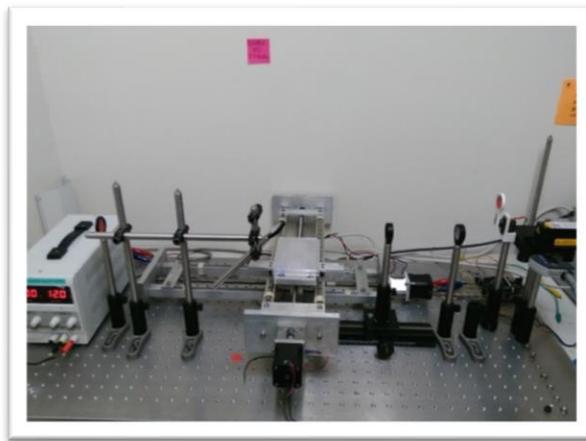


Figura 2.3. Arreglo optoelectrónico automatizado.

Los detalles técnicos, funcionales y conformacionales del arreglo optoelectrónico automatizado se detallan en Ortega Zambrano, 2019. El segundo arreglo optoelectrónico está compuesto por un micro-posicionador óptico de 3 ejes, un adaptador de fibra y una fuente emisora de luz, el cual se observa en las figuras 2.4 y 2.5.

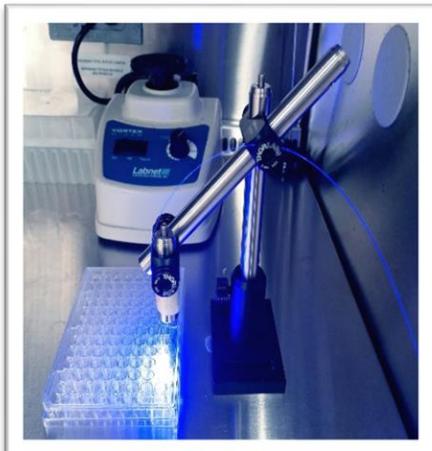


Figura 2.4. Irradiación de cultivos usando una fibra óptica.

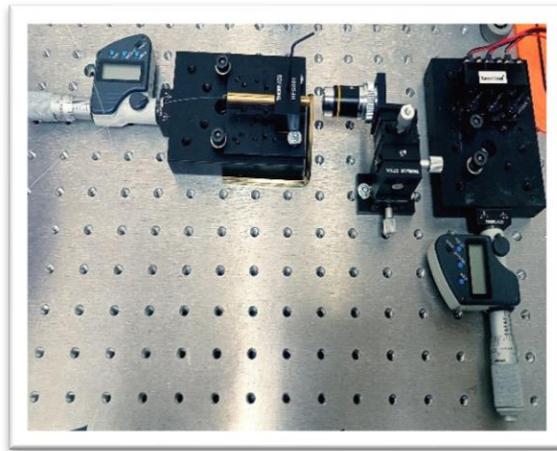


Figura 2.5. Arreglo optoelectrónico con fibra óptica.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Cinética de crecimiento de *T. cruzi*

En la figura 3.1. se muestra la gráfica resultante con los promedios obtenidos al realizar el seguimiento a las cinéticas de crecimiento (por triplicado) de epimastigotes de las cepas CL-Brener y Ninoa durante 8 días. Se puede observar que alcanzaron el punto máximo de su crecimiento en el día 5 post resiembra (PR). También se observa que Ninoa, es una cepa con mayor actividad respecto al comportamiento que presenta CL-Brener, con un promedio de  $1.355 \times 10^7$  parásitos/mL y  $1.083 \times 10^7$  parásitos/mL, respectivamente.

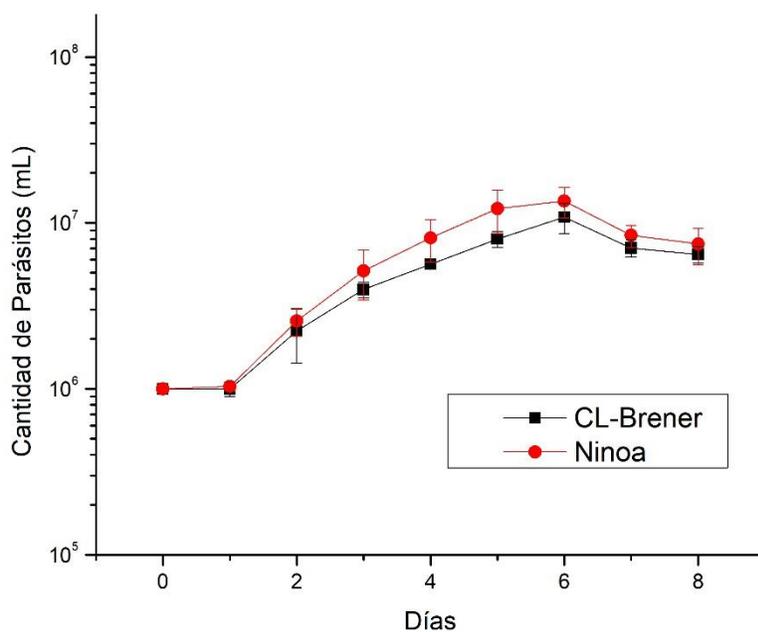


Figura 3.1. Cinética de crecimiento de cepas CL-Brener y Ninoa de *T. cruzi*, n=3.

### 3.2. Cinética de crecimiento de *T. cruzi* con Curcumina

Adicionalmente a la cinética de crecimiento reportada en el punto anterior, se decidió hacer para cada cepa de *T. cruzi* (CL-Brener y Ninoa) un ajuste al medio de cultivo adicionando curcumina a razón de 1:10 respecto al volumen total (5mL), con la finalidad de replicar el porcentaje de las alícuotas en los grupos de estudio, así como para identificar algún efecto de citotoxicidad derivado de los productos de degradación de la curcumina que pudieran interferir en el ciclo natural de crecimiento de *T. cruzi*. El cultivo para esta cinética de crecimiento se ha realizado por triplicado para cada cepa, asegurando contar con una concentración inicial de  $1 \times 10^6$  parásitos. Los resultados obtenidos se observan en la figura 3.2. en la cual, como se puede ver a simple vista, el crecimiento máximo para ambas cepas se da al día 6, y a partir del día 7 empieza el descenso en el crecimiento de las cepas. Al igual que en la cinética de crecimiento del punto anterior, observamos una actividad mayor en la cepa Ninoa, contando con un promedio de  $1.011 \times 10^7$  parásitos/mL respecto a los  $8.483 \times 10^6$  parásitos/mL obtenidos para CL-Brener. Los resultados muestran una muy ligera disminución en el crecimiento de CL-Brener respecto al caso sin FS, por lo que los productos de la degradación de la curcumina prácticamente no tienen un efecto significativo en las cepas de estudio.

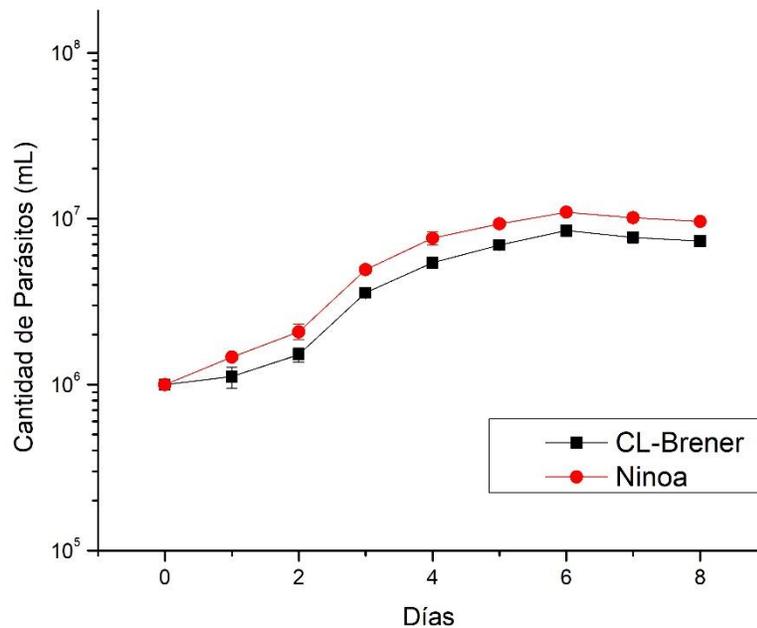


Figura 3.2. Cinética de crecimiento de las cepas de *T. cruzi* adicionando curcumina, n=3.

### 3.3.- Inactivación de *T. cruzi*

#### 3.3.1.- CL-Brener

Inicialmente se realizaron 3 experimentos con la cepa CL-Brener para determinar el porcentaje de inactivación obtenido al irradiar las muestras con un diodo láser (12 V) que emite luz a una longitud de onda de 450 nm (Azul), con una potencia de 16mW/cm<sup>2</sup>, fluencia de energía de 89 J/cm<sup>2</sup> y un tiempo de irradiación de 60 minutos para cada ensayo y control 4. A partir de ahora los grupos de estudio identificados en el apartado 2.5.1. de esta tesis se identificarán de la siguiente manera: LIT (Control 3), PS (Control 1), PBS (Control 2), LIT\* (Control 4) y PS\* (se reporta el promedio obtenido de los 3 ensayos sometidos a irradiación de cada experimento).

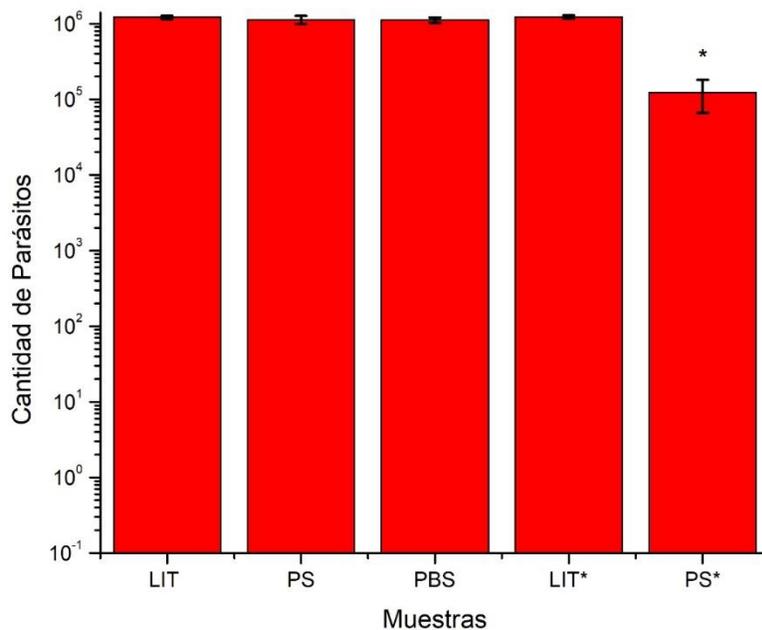


Figura 3.3. Grupos de control y resultados de la inactivación de CL-Brener (16mW) el mismo día de la irradiación, n=3.

Una vez terminado el proceso de irradiación, se pesa el contenido que se encuentra en las placas de cultivo celular, y se procede a recuperar las muestras de los grupos de estudio señalados en el apartado 2.5.2. A continuación, se realiza el conteo en cámara de Neubauer para cada uno de los grupos de estudio para registrar los cambios en las muestras. En la figura 3.3. observamos el promedio de los 3 experimentos realizados por separado, bajo condiciones similares. Se observa que, inmediatamente después de la exposición, los controles no irradiados LIT, PS, PBS y el control sometido a radiación (LIT\*) no muestran cambio significativo en la cantidad de parásitos; en tanto que los ensayos (PS\*) muestran una disminución de 1 logaritmo en el número de parásitos respecto a la cantidad original. Lo que representa un porcentaje de inactivación de 90 % inmediato a la irradiación. Se

realizó un seguimiento de 3 días posteriores al día de exposición, y los resultados obtenidos se muestran en las figuras 3.4, 3.5 y 3.6.

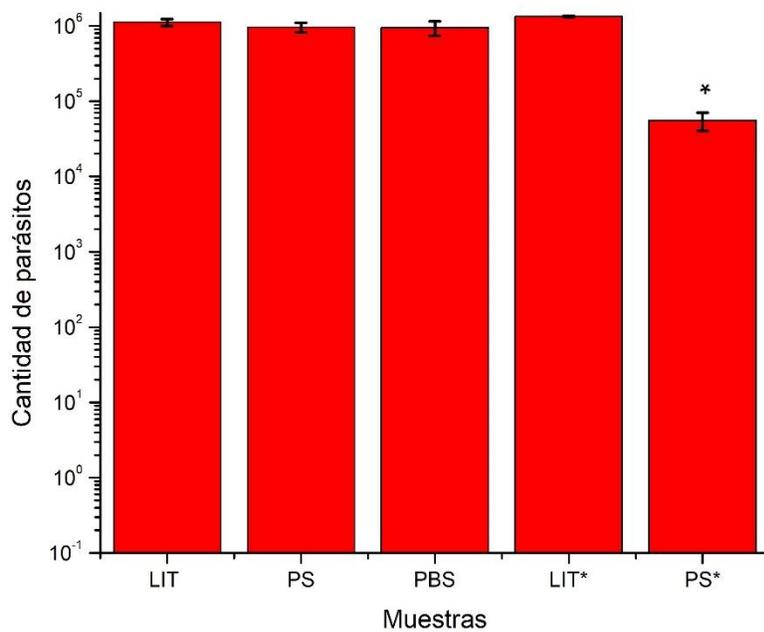


Figura 3.4. Resultados obtenidos en la inactivación de cepa CL-Brener de *T. cruzi*. Día 1 Post irradiación

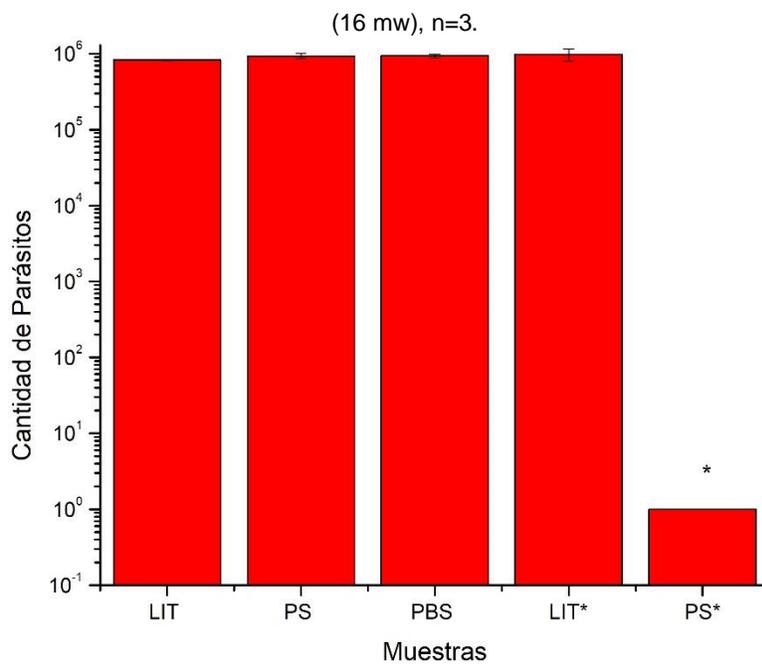


Figura 3.5. Resultados obtenidos en la inactivación de cepa CL-Brener de *T. cruzi*. Día 2 Post irradiación

(16 mw), n=3.

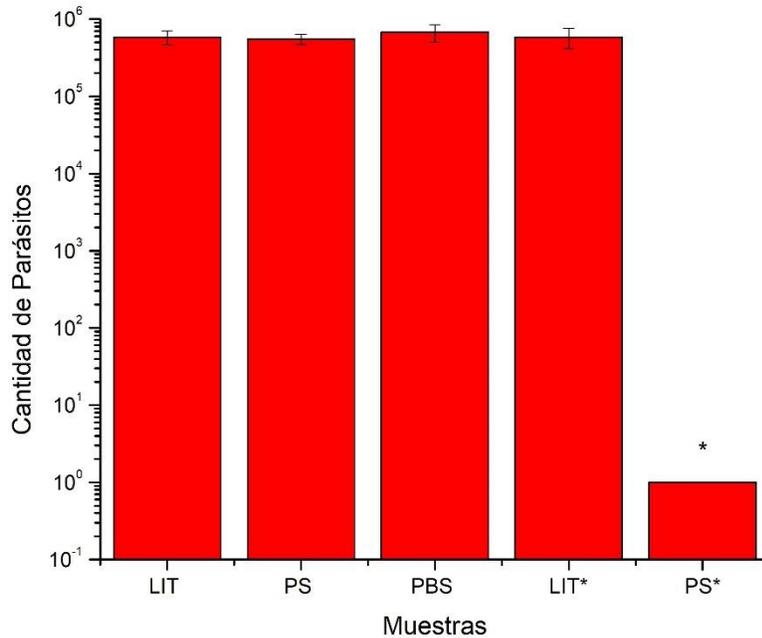


Figura 3.6. Resultados obtenidos en la inactivación de cepa CL-Brener de *T. cruzi*. Día 3 Post irradiación (16 mw), n=3.

Los resultados obtenidos al dar seguimiento a las muestras los días posteriores a la irradiación fueron los siguientes: No se encontraron cambios significativos en la cantidad de parásitos en los controles no irradiados LIT, PS, PBS ni en el control irradiado (LIT\*); en tanto que el efecto en el grupo de ensayo un día después de la irradiación nos indica un efecto de inactivación del 97%, y a partir del día 2 ya no se encontraron parásitos vivos en las muestras, lo que parece indicar un efecto de inactivación retardada del 100%. En la figura 3.7. se hace una comparación entre la cantidad de parásitos encontrados en las muestras en el control 1 (PS) y ensayos (PS\*) a partir del día de la exposición hasta el 3er día de seguimiento.

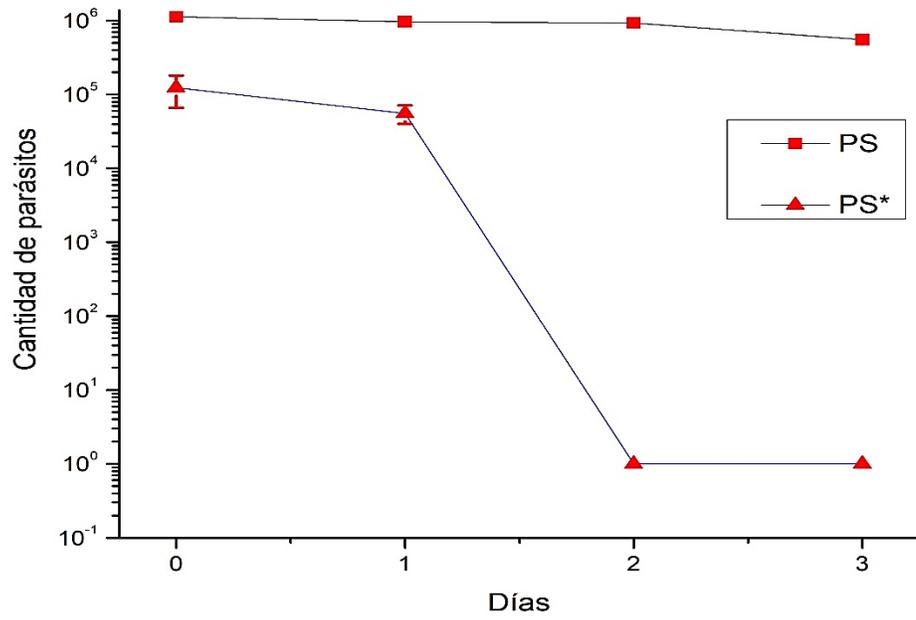


Figura 3.7. Muestras con fotosensibilizador a través del tiempo. Cepa CL-Brener (16 mW), n=3.

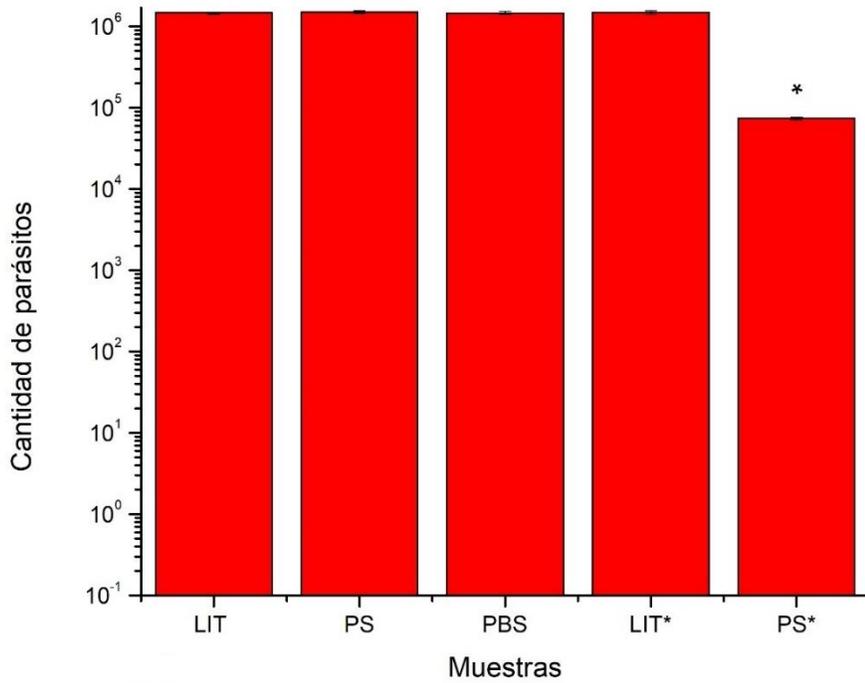


Figura 3.8. Grupos de control y resultados de la inactivación de CL-Brener (32 mW) el mismo día de la irradiación, n=3.

Posteriormente, se decidió realizar una serie de experimentos por triplicado con las mismas condiciones que los anteriores, exceptuando la potencia, la cual se duplicó a 32mW. En esta serie de experimentos, como se observa en la figura 3.8, no se presentan cambios significativos en los controles no irradiados LIT, PS y PBS, ni en el irradiado (LIT\*). El porcentaje promedio de inactivación de *T. cruzi* en los ensayos inmediato a la exposición es de 95%.

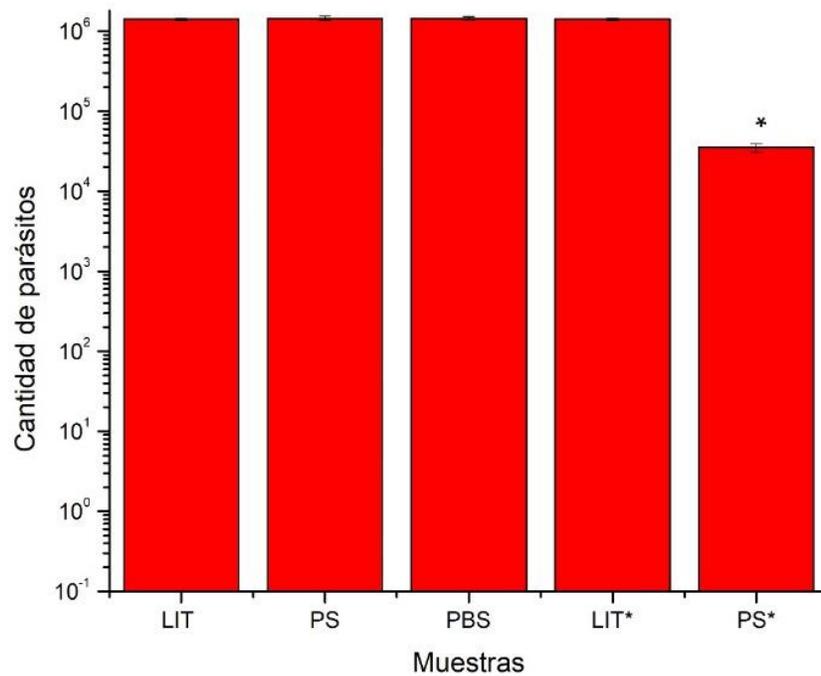


Figura 3.9. Resultados obtenidos en la inactivación de cepa CL-Brener de *T. cruzi*. Día 1 Post irradiación (32 mw), n=3.

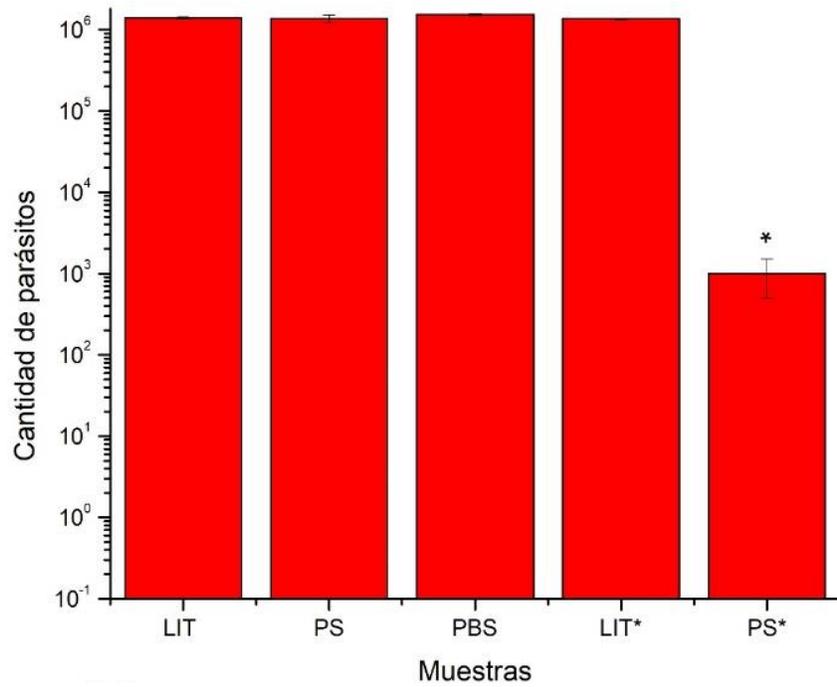


Figura 3.10. Resultados obtenidos en la inactivación de cepa CL-Brener de *T. cruzi*. Día 2 Post irradiación (32 mw), n=3.

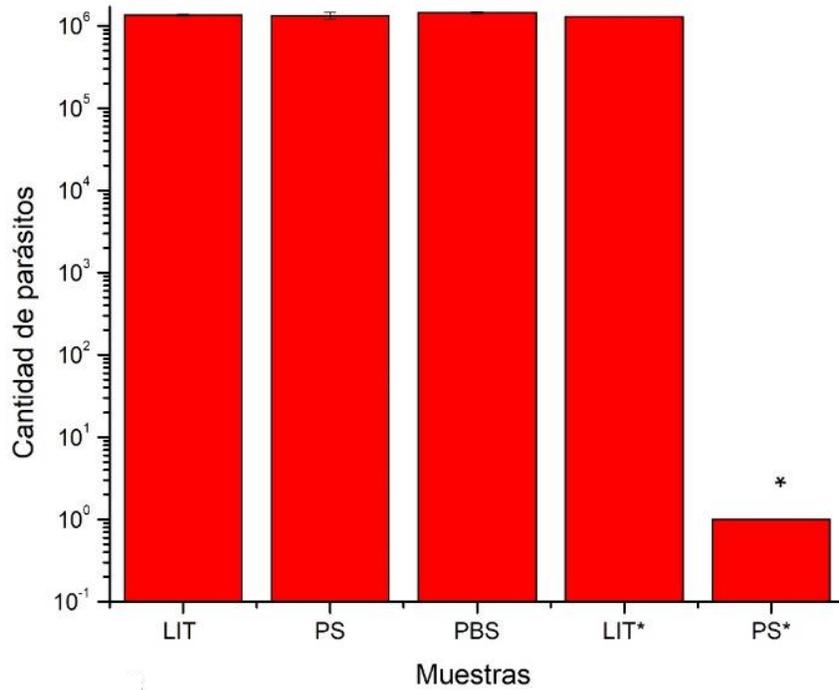


Figura 3.11. Resultados obtenidos en la inactivación de cepa CL-Brener de *T. cruzi*. Día 3 Post irradiación (32 mw), n=3.

En las figuras 3.9,3.10 y 3.11 se muestra el seguimiento realizado a los grupos de estudio en días posteriores a la irradiación. No se observan cambios en la cantidad de parásitos en los grupos de control LIT, PS, PBS y LIT\*. Por el contrario, se encontraron cambios significativos en el grupo PS\*. Al día 1 de seguimiento se encontró un porcentaje de inactivación de los parásitos correspondiente al 97.64%, al día 2 un 99.93% y al día 3 de un 100%. Estos resultados se muestran más claramente en la figura 3.12.

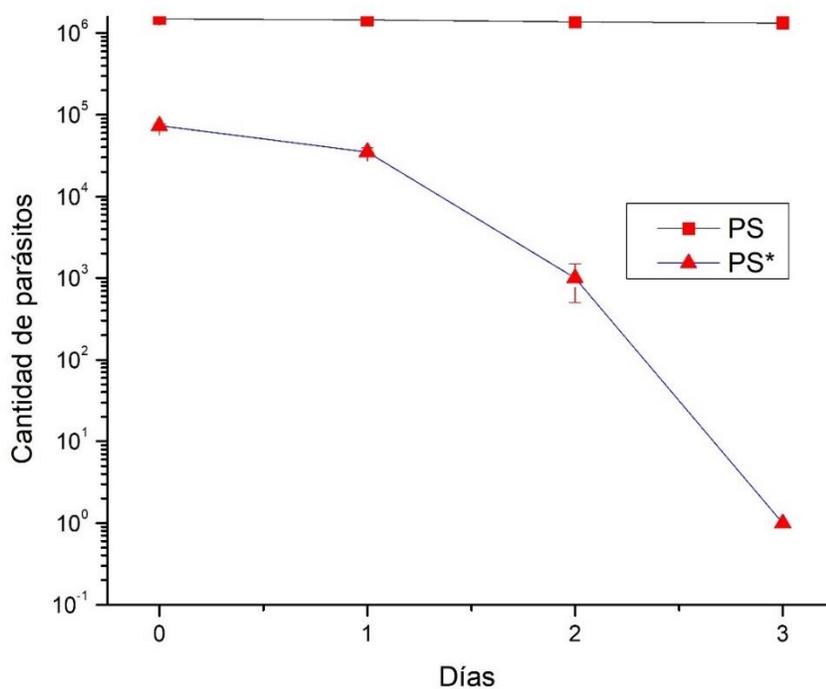


Figura 3.12. Seguimiento de las muestras de la cepa CL-Brener control (PS) e irradiada (PS\*) con luz azul y curcumina (n=3).

### 3.3.2. Ninoa

Finalizando los experimentos con la cepa control (CL-Brener), se realizaron 6 experimentos con la cepa Ninoa para determinar el porcentaje de inactivación de *T. cruzi*, se utilizaron las mismas especificaciones de la cepa control. Los primeros 3 experimentos se irradiaron a una potencia de 16 mW. En la figura 3.13 se observan los resultados obtenidos el día de la irradiación. Como ocurrió en el caso de la cepa CL-Brener, en Ninoa no se observan cambios en el número de parásitos en los controles, en el grupo PS\* relativo a los ensayos se obtuvo un porcentaje de inactivación inmediato a la irradiación del 85.64%. También en este caso se realizó un seguimiento a los grupos de estudio durante 3 días posteriores a la exposición a luz.

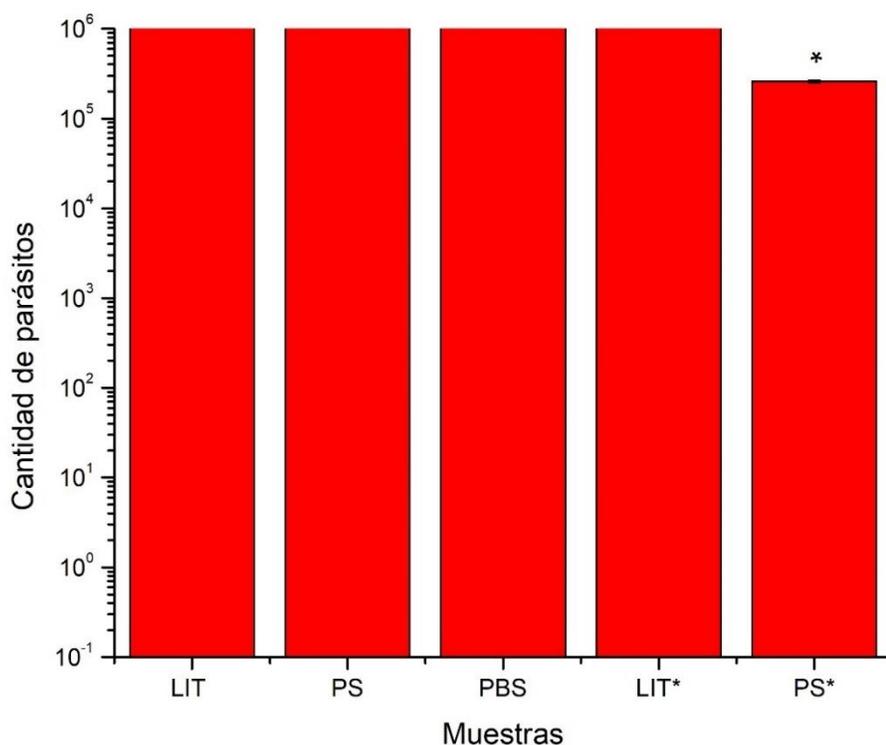


Figura 3.13. Grupos control y resultados de la inactivación de Cepa Ninoa de *T. cruzi* (16 mW) el mismo día de la irradiación, n=3.

En las figuras 3.14, 3.15 y 3.16. se presentan los resultados obtenidos al realizar el conteo de parásitos a cada grupo control y ensayos. Los grupos control no denotaron variabilidad alguna que pudiera indicar algún efecto adverso o contaminación de las muestras, lo que se observa en las gráficas, por lo que nos enfocaremos a describir el proceso que siguió el grupo PS\* que compete a los ensayos. Al día posterior a la irradiación, figura 3.14. se procedió a realizar el conteo de parásitos en cámara de Neubauer de las muestras pertenecientes al grupo de ensayo se identificó un porcentaje de inactivación correspondiente al 92.77%. Al día 2 posterior a la irradiación, figura 3.15, se obtuvo un porcentaje del 97.37% y al último día la cantidad de parásitos reflejaron un porcentaje de 99.75%, figura 3.16.

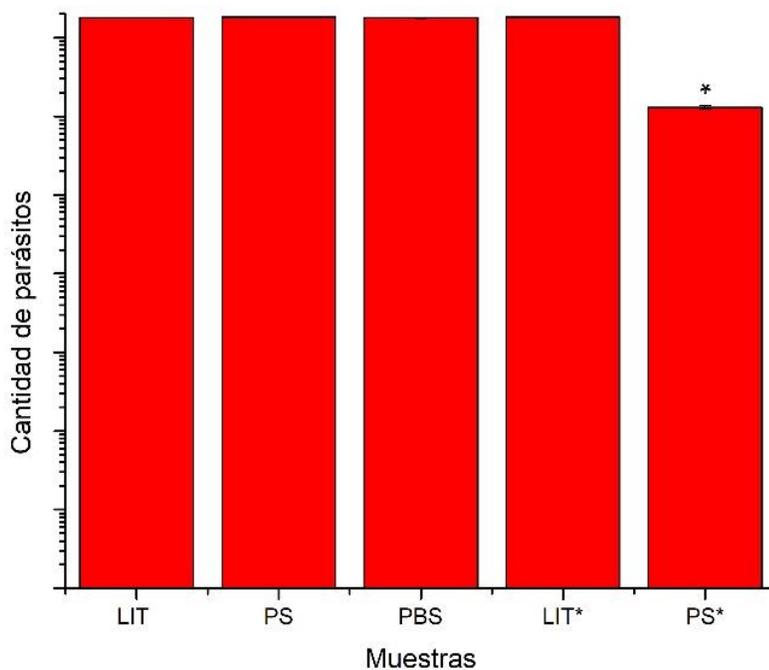


Figura 3.14. Resultados obtenidos en la inactivación de cepa Ninoa de *T. cruzi*. Día 1 Post irradiación (16 mW), n=3.

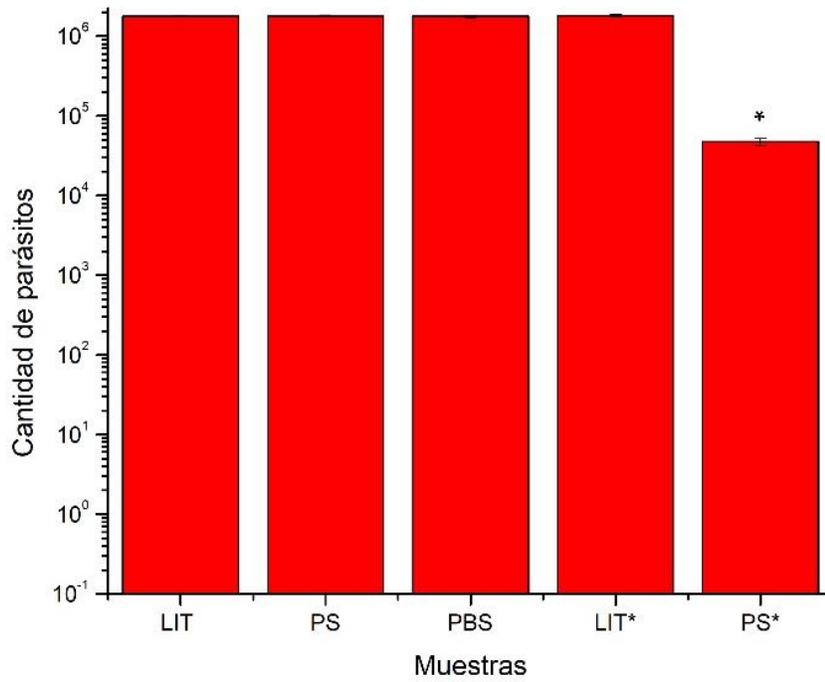


Figura 3.15. Resultados obtenidos en la inactivación de cepa Ninoa de *T. cruzi*. Día 2 Post irradiación

(16 mW), n=3.

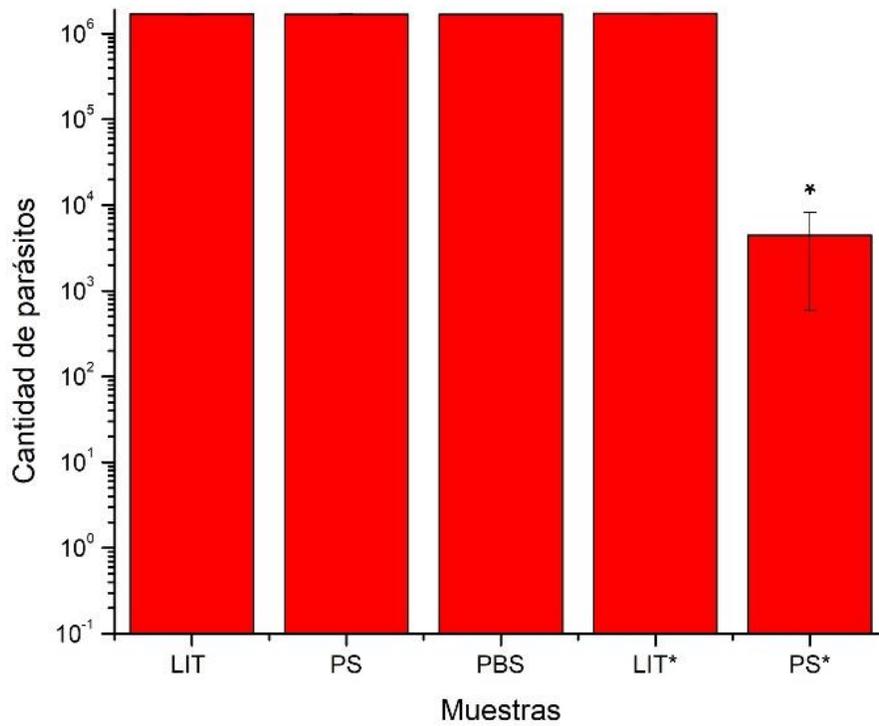


Figura 3.16. Resultados obtenidos en la inactivación de cepa Ninoa de *T. cruzi*. Día 3 Post irradiación

(16 mW), n=3.

Se realizó una comparación entre la cantidad de parásitos encontrados en las muestras en el control 1 (PS) y ensayos (PS)\* a partir del día de la exposición hasta el 3er día de seguimiento. Estos resultados se muestran mas claramente en la figura 3.17.

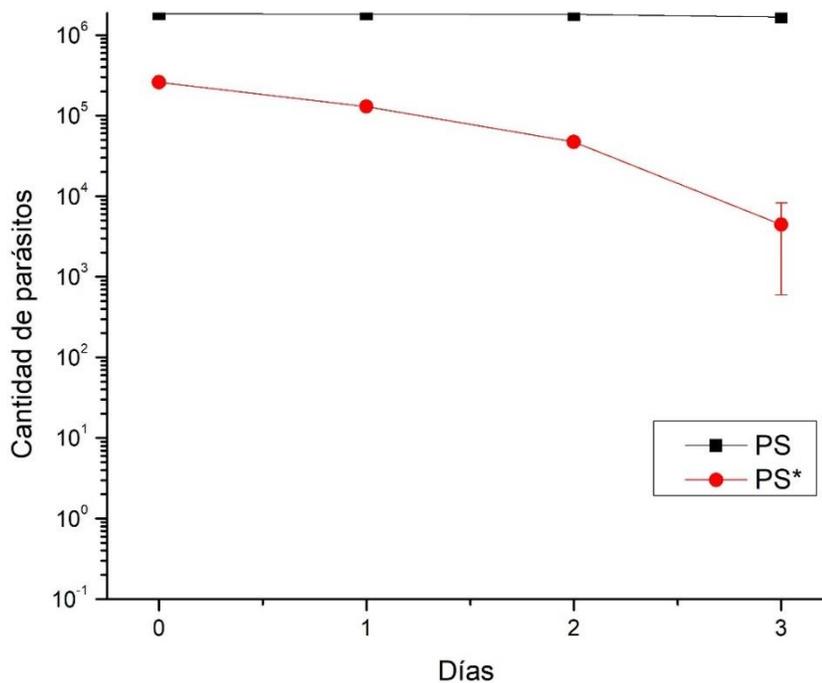


Figura 3.17. Seguimiento de las muestras de la cepa Ninoa control (PS) e irradiada (PS\*) con luz azul y curcumina (n=3).

Para los últimos 3 experimentos realizados con la cepa Ninoa, se utilizó una potencia de 32mW. En las gráficas 3.18. a 3.22 se muestran los resultados.

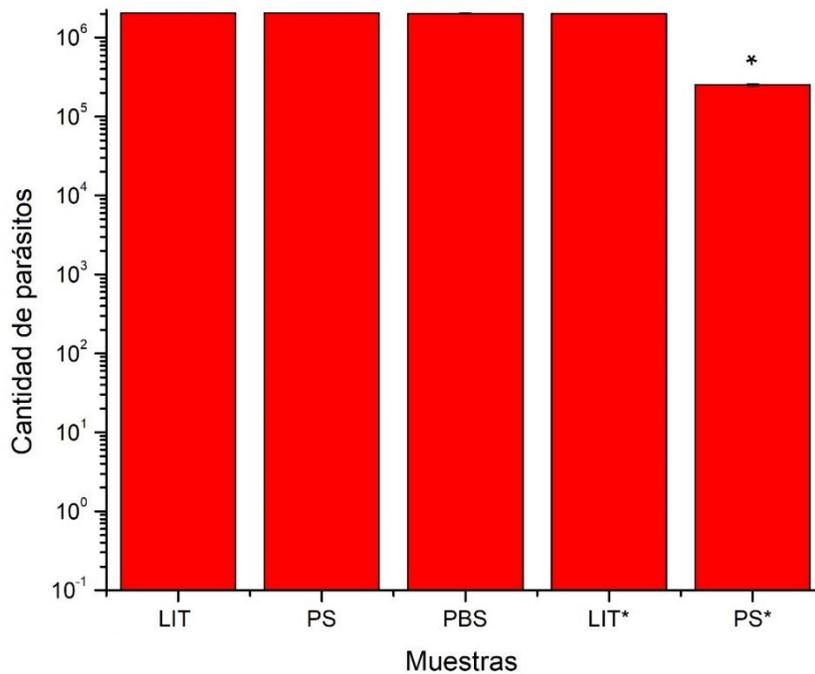


Figura 3.18. Grupos control y resultados de la inactivación de Cepa Ninoa de *T. cruzi* (32 mW) el mismo día de la irradiación, n=3.

En la figura 3.18 se observa el resultado de los experimentos realizados para inactivar cepa Ninoa de *T. cruzi* utilizando una potencia de 32mW, los grupos control LIT, PS, PBS y LIT\* no muestran variabilidad. El grupo de ensayo (PS\*) denota un porcentaje de inactivación inmediato a la irradiación del 87.65%. Al igual que en experimentos anteriores, se realizó el seguimiento a las muestras. Los grupos de control se mantuvieron estables; el grupo PS\* al día 1 de seguimiento mostró un porcentaje de inactivación del 89.30% (figura 3.19), al día 2 de 94.23% (figura 3.20) y un 99.51% de inactivación al día 3 (figura 3.21). En forma resumida estos resultados son presentados en la figura 3.22.

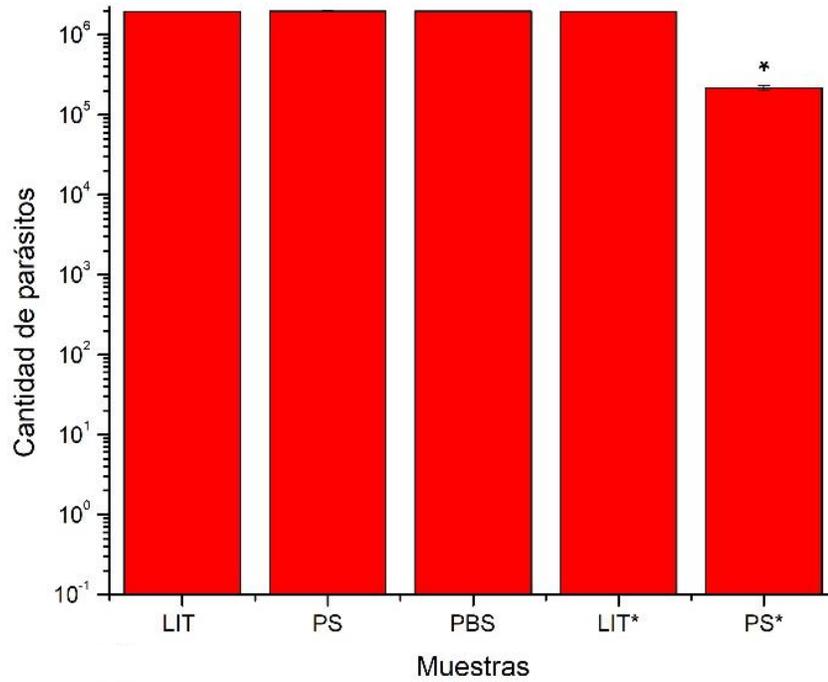


Figura 3.19. Resultados obtenidos en la inactivación de cepa Ninoa de *T. cruzi*. Día 1 Post irradiación (32 mW), n=3.

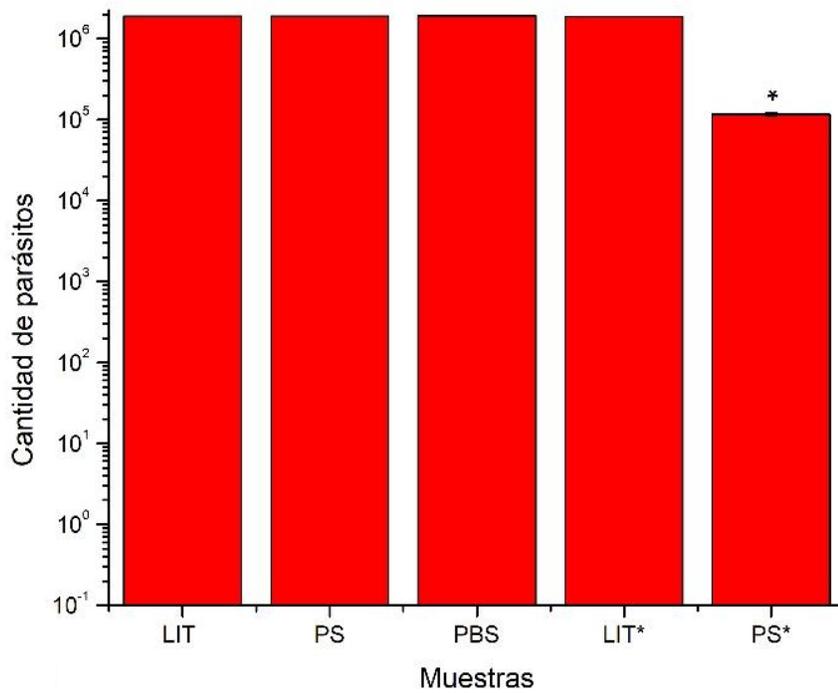


Figura 3.20. Resultados obtenidos en la inactivación de cepa Ninoa de *T. cruzi*. Día 2 Post irradiación (32 mW), n=3.

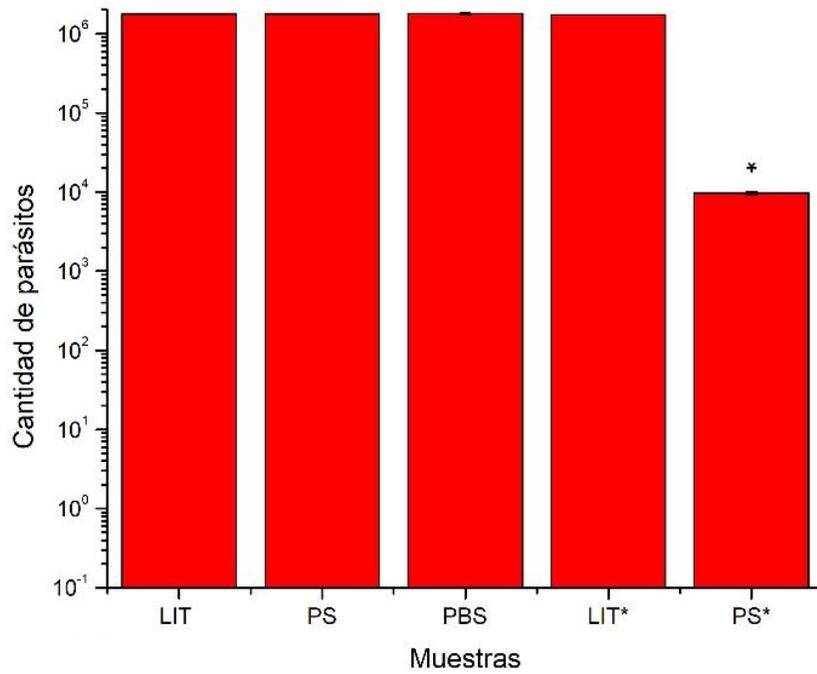


Figura 3.21. Resultados obtenidos en la inactivación de cepa Ninoa de *T. cruzi*. Día 3 Post irradiación (32 mW), n=3.

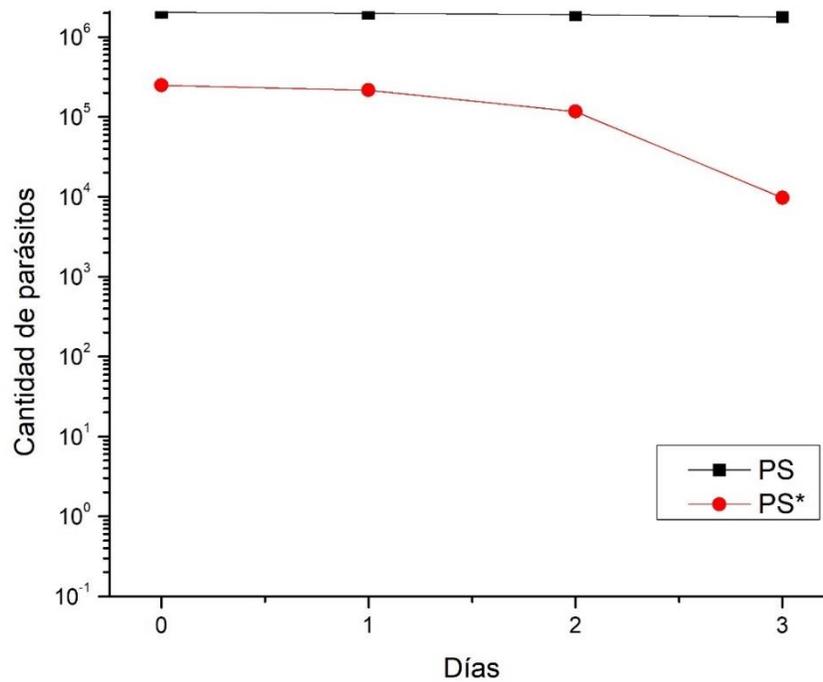


Figura 3.22. Seguimiento de las muestras de la cepa Ninoa control (PS) e irradiada (PS\*) con luz azul y curcumina (n=3).

## 4. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se construyó la curva de crecimiento en cultivos de epimastigotes de las cepas CL-Brener y Ninoa de *T. cruzi*. Partiendo de una concentración inicial de  $1 \times 10^6$  parásitos/mL en un volumen de 5 mL, fueron cultivados a una temperatura constante durante un período de 8 días. Los resultados obtenidos demostraron que la cepa Ninoa (TcI) es más activa que CL-Brener (TcVI). Como se observa en la figura 3.1., la cantidad máxima de parásitos obtenida es alrededor de  $10^7$  parásitos/mL para ambas cepas, su pico de crecimiento fue al 6to día. En otros estudios previamente realizados, se han obtenido aproximadamente  $10^8$  parásitos/mL, con curvas de crecimiento que se encuentran en una escala que va de los 7 a los 21 días. [27, 41,42]

Este abanico de resultados reportados en las curvas de crecimiento se debe a las cepas, DTU's y región de *T. cruzi*. En nuestro caso, los resultados en las curvas de crecimiento de las dos cepas, muestran que Ninoa tiene una mayor actividad que la CL-Brener.

También se construyó la curva de crecimiento de los epimastigotes ajustando el medio de cultivo con una cantidad de curcumina en proporción 1:10 respecto al volumen final del cultivo (5 mL). No se encontró efecto citotóxico alguno derivado de la degradación de la curcumina.

Se evaluó el efecto que produce el uso del método de inactivación fotodinámica en cultivos de *T. cruzi* (de las cepas antes mencionadas) irradiados a una longitud de onda de 450nm, los cuales fueron previamente tratados con una concentración molar de curcumina al  $9.77 \times 10^{-6}$  M. Los experimentos fueron realizados a dos potencias diferentes (16 y 32 mW) con el fin de aumentar el efecto esperado. Los resultados obtenidos muestran también que, la cepa control (CL-Brener) es más susceptible a los efectos producidos por las ERO's respecto a la cepa de estudio (Ninoa). En ambos casos no se observó un efecto en la

fotoinactivación al duplicar la potencia de irradiación, el mismo día de la evaluación. Se presenta un efecto retardado de la inactivación. En estudios previos se ha evaluado el efecto tripanocida de la curcumina diluida en dimetilsulfóxido (DMSO), en células C2C12 infectadas con tripomastigotes de la cepa Sylvio X10/4 y amastigotes de las cepas (Brazil, CA-I/72, Sylvio X10/4 y Sylvio X10/7, se observó un potente efecto anti-*T. cruzi* sobre las formas tripomastigote (Sylvio X10/4) y amastigote (CA-I/72), después de 48h de incubación. En otro estudio realizado se infectaron fibroblastos previamente tratados a diferentes concentraciones de curcumina a 25 y 15  $\mu\text{m}$  para determinar su efecto contra tripomastigotes. Se encontró una disminución en la internalización celular de los mismos en un 75 y 50%, respectivamente. Estos estudios aunados a nuestra investigación, demuestran que la curcumina no solo posee efectos medicinales y antiinflamatorios, sino que puede utilizarse como un potencial antiparasitario. La diferencia de estos respecto a nuestra investigación se halla en que, en el primer estudio descrito, se observa efecto tripanocida a partir de 48h de incubación, y en el segundo, el efecto radica en la disminución de la internalización de los parásitos a las células y no a un efecto que los dañe permanentemente. En consecuencia, en nuestro trabajo al hacer uso del método de inactivación fotodinámica, observamos un importante efecto anti-*T. cruzi* después del período de irradiación (1 hora) con un porcentaje de inactivación > 97% y > 85% en las cepas utilizadas para nuestro estudio (CL-Brener y Ninoa), respectivamente. [43,44]

## 5.-CONCLUSIONES

La cepa Ninoa presenta mayor actividad reproductiva que la cepa CL-Brener. El uso de la curcumina como fotosensibilizador no afecta la cinética de crecimiento normal de las cepas CL-Brener y Ninoa de *T. cruzi*, también se descartan efectos adversos e inhibitorios de crecimiento derivados de los compuestos de su degradación.

La excitación con luz azul (450 nm) de muestras de ambas cepas de *T. cruzi* previamente tratadas con curcumina a una proporción 1:10, denotan un alto grado de actividad tripanocida en contra del estadio epimastigote de *T. cruzi*, inmediato a la exposición de las muestras. Se observó un efecto retardado en la acción de la curcumina y la luz azul en las mismas cepas, presentando un porcentaje de inactivación de CL-Brener del 100% y un porcentaje mayor al 99% en la cepa Ninoa al 3er día posterior a la irradiación. Muy probablemente este efecto es ocasionado por la generación de ERO's durante y/o posterior al proceso de fotoinactivación de los parásitos, que puede evitar la reproducción del parásito a través de su mecanismo natural (fisión binaria).

## 6.-PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, las perspectivas son:

- Irradiar las cepas CL-Brener y Ninoa de *T. cruzi*, manteniendo el tiempo de irradiación, pero aumentando la concentración de curcumina, para determinar si el efecto de inactivación es mayor.
- Investigar acerca del tipo de especies reactivas de oxígeno que se generan y ocasionan la inactivación del parásito.
- Utilizar liposomas para ayudar a la internalización y absorción de curcumina por parte del parásito.
- Analizar la respuesta de la curcumina con técnicas como la espectroscopia de fluorescencia para comprender cuales son los cambios químicos presentes en la molécula.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Murillo-Godínez, G. (2018). Enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). *Medicina interna de México*, 34(6), 959-970. <https://doi.org/10.24245/mim.v34i6.2217>
- [2] Jaramillo Jaramillo L., Ruiz Mejía, C., Martínez Sánchez, L., & Vera Henao, S. (2017). Enfermedad de Chagas: una mirada alternativa al tratamiento. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 69(2), 01-13. Recuperado en 06 de junio de 2021, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602017000200009&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602017000200009&lng=es&tlng=es)
- [3] Lidani, K., Andrade, F. A., Bavia, L., Damasceno, F. S., Beltrame, M. H., Messias-Reason, I. J., & Sandri, T. L. (2019). Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Frontiers in public health*, 7, 166. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>
- [4] Organización Panamericana de la Salud. Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Washington, D.C.: OPS; 2018
- [5] Molina, I., Salvador, F., & Sánchez-Montalvá, A. (2016). Actualización en enfermedad de Chagas [Update Chagas disease]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 34(2), 132–138. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.12.008>
- [6] Salazar-Schettino, P. M., Bucio-Torres, M. I., Cabrera-Bravo, M., Alba-Alvarado, M. C. de, Castillo-Saldaña, D. R., Zenteno-Galindo, E. A., Rojo-Medina, J., Fernández-Santos, N. A., & Perera-Salazar, M. G. (2016). Enfermedad de Chagas en México. *Revista de la Facultad de Medicina (México)*, 59(3), 6-16. Recuperado en 06 de junio de 2021, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0026-17422016000300006&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0026-17422016000300006&lng=es&tlng=es).
- [7] World Health Organization (2012). Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. *World Health Organization technical report series*, (975), v–100.
- [8] World Health Organization (2015). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Releve epidemiologique hebdomadaire*, 90(6), 33–44.
- [9] World Health Organization (2018). Global distribution of cases of Chagas disease, based on official estimates, 2018. Disponible en: [https://www.who.int/docs/default-source/ntds/chagas-disease/chagas-2018-cases.pdf?sfvrsn=f4e94b3b\\_2](https://www.who.int/docs/default-source/ntds/chagas-disease/chagas-2018-cases.pdf?sfvrsn=f4e94b3b_2)
- [10] de Souza W. (2002). Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current pharmaceutical design*, 8(4), 269–285. <https://doi.org/10.2174/1381612023396276>
- [11] Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, de Souza W (2012) Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis* 6(8): e1749. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001749>
- [12] Kenechukwu C. Onyekwelu (2019). Life Cycle of *Trypanosoma cruzi* in the Invertebrate and the Vertebrate Hosts, *Biology of Trypanosoma cruzi*, Wanderley De Souza, IntechOpen. <https://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84639>.

- [13] Parasites-American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). Life Cycle. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention; 2019. <https://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/spanish/dpdx/HTML/TrypanosomosisAmericana>
- [14] de Souza, W., de Carvalho, T. M., & Barrias, E. S. (2010). Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. *International journal of cell biology*, 2010, 295394. <https://doi.org/10.1155/2010/295394>
- [15] CABI, 2021. *Trypanosoma*. Wallingford, UK: CAB International. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/96918#totaxonomicTree>
- [16] de Souza, W. (1984). Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *International review of cytology*. 86,197-283. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)60180-1](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)60180-1).
- [17] Wainszelbaum, M. (2002). *Trypanosoma cruzi*: Mecanismos reguladores de la metacicloogénesis. (Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.). Recuperado de [http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n3467\\_Wainszelbaum](http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n3467_Wainszelbaum)
- [18] Silber, A. (2000). Identificación de dos moléculas de *Trypanosoma cruzi* involucradas en la invasión de las células del huésped. (Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.). Recuperado de [https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n3262\\_Silber.pdf](https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n3262_Silber.pdf)
- [19] Pagura, L. ; Cricco, J. A.; Caracterización de la proteína TcHTE y su relación con el transporte de hemo en *Trypanosoma cruzi*; 22-3-2018.
- [20] Bern, C., Montgomery, S. P., Herwaldt, B. L., Rassi, A., Jr, Marin-Neto, J. A., Dantas, R. O., Maguire, J. H., Acquatella, H., Morillo, C., Kirchhoff, L. V., Gilman, R. H., Reyes, P. A., Salvatella, R., & Moore, A. C. (2007). Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA*, 298(18), 2171–2181. <https://doi.org/10.1001/jama.298.18.2171>
- [21] Enfermedad de Chagas: Tratamiento antiparasitario. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention; 2019. <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/hcp/tratamiento.html>
- [22] Westenberger, S. J., Barnabé, C., Campbell, D. A., & Sturm, N. R. (2005). Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*, 171(2), 527–543. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.038745>
- [23] Murcia, L., Carrilero, B., Saura, D., Iborra, M. A., & Segovia, M. (2013). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas [Diagnosis and treatment of Chagas disease]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 31 Suppl 1, 26–34. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(13\)70111-3](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(13)70111-3)
- [24] Tibayrenc, M. (2003). Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid biology and disease*, 2(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1475-9292-2-12>

- [25] Muñoz, C., Solari, A., Apt, W. & Zulantay, I. (2013). Caracterización de las Unidades Discretas de Tipificación de *Trypanosoma cruzi* según sus marcadores moleculares. *Revista Ibero-latinoamericana de parasitología*, 72(1), 5-21. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/280234266>
- [26] Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M., Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages-Silva, E., Machado, C. R., Andrade, S. G., & Sturm, N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 12(2), 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>
- [27] Quijia Quezada, C.R. (2016). Caracterización biológica e histopatológica de cepas de *Trypanosoma cruzi* aisladas en el Ecuador: Implicación de la diversidad genética del parásito en la virulencia y patogenicidad en el modelo Murino. (Trabajo de Titulación, Universidad de las Fuerzas Armadas, Sangolquí) Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/11848>
- [28] Miles, M. A., Llewellyn, M. S., Lewis, M. D., Yeo, M., Baleela, R., Fitzpatrick, S., Gaunt, M. W., & Mauricio, I. L. (2009). The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on Leishmania: looking back and to the future. *Parasitology*, 136(12), 1509–1528. <https://doi.org/10.1017/S0031182009990977>
- [29] Vega Chirinos, S. & Náquira Velarde, C. (2006) Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la trypanosomiosis americana (enfermedad de Chagas). Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. Disponible en: [https://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Manual\\_Enfermedades\\_Chagas.pdf](https://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Manual_Enfermedades_Chagas.pdf)
- [30] Dimmer, J. A. (2017). Fotosensibilizadores fotodinámicos naturales y potenciales aplicaciones terapéuticas. (Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Córdoba. Departamento de Farmacia) Disponible en: <https://rdu.unc.edu.ar/handle/11086/15282>
- [31] Machado Salamea, M. D. (2013). Estudio in vivo de la eficacia de la fototerapia (Láser Diodo de GaAlAs más sustancia Fotosensibilizante) como coadyuvante de la terapia básica periodontal en el tratamiento de la enfermedad periodontal. (Tesis-Especialista en Periodoncia, Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Postgrados; Quito, Ecuador, 2013) Disponible en: <https://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/2629>
- [32] Hamblin M. R. (2016). Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. *Current opinion in microbiology*, 33, 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.06.008>
- [33] Cormac, H. Delcanale, P., Nonell, S. Viappiani, C. y Abbruzzetti, S. (2020). Photosensitizing proteins for antibacterial photodynamic inactivation. *Translational Biophotonics*, 2 (1-2). <https://doi.org/10.1002/tbio.201900031>

- [34] Muñoz Figueroa, M. A. (2017). Mecanismos de muerte celular inducido por acción de la luz visible y fotosensibilizadores flavínicos en disolución e incorporados en nanopartículas siliadas para aplicación en terapia fotodinámica. (Tesis Doctoral. Pontificia Universidad Católica de Chile. Facultad de Química) Disponible en: <https://1library.co/document/yevox71z-mecanismos-fotosensibilizadores-flavinicos-disolucion-incorporados-nanoparticulas-aplicacion-fotodinamica.html>
- [35] Vara, J. (2017). Desarrollo de fotosensibilizadores de segunda y tercera generación aplicables a terapia fotodinámica. (Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Químicas). Disponible en: <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/15579/13753%202017%20tesis%20vara%20jimena.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [36] Castano, A. P., Demidova, T. N., & Hamblin, M. R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 1(4), 279–293. [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4)
- [37] Mercado Uribe, H. J. (2020). Luz visible contra un enemigo invisible. *Avance y Perspectiva*. Disponible en: <https://avanceyperspectiva.cinvestav.mx/luz-visible-contra-un-enemigo-invisible/>
- [38] Albadalejo-González, J., Sanz D., Claramunt, R. M., Lavandera, J. L., Alkorta, I. & Elguero J. (2015). Curcumin and curcuminoids: chemistry, structural studies and biological properties. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. 81(4). 278-310. [https://analesranf.com/wp-content/uploads/2015/81\\_04/8104\\_02.pdf](https://analesranf.com/wp-content/uploads/2015/81_04/8104_02.pdf)
- [39] Días, L. D., Blanco, K.C. Mfouo-Tynga, I.S., Inada, N.M. & Bagnato, V.S. (2020). Curcumin as a photosensitizer: From molecular structure to recent advances in antimicrobial photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 45 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2020.100384>
- [40] Ortega Zambrano, A. D. (2019) Análisis comparativo para la foto-inactivación microbiana en terapias continuas y parciales. (Tesis de Maestría. Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. División de Electrónica y Computación).
- [41] Santos, C., Ludwig, A., Kessler, R. L., Rampazzo, R., Inoue, A. H., Krieger, M. A., Pavoni, D. P., & Probst, C. M. (2018). Trypanosoma cruzi transcriptome during axenic epimastigote growth curve. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(5), e170404. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170404>
- [42] Pérez, L. (2018). Puesta a punto y establecimiento de cultivo *in vitro* de amastigota axénicos de *Trypanosoma cruzi* como posible modelo de estudio de amastigotas celulares. (Tesis de Grado. Universidad de la República Uruguay. Facultad de Ciencias. Laboratorio de Interacciones Moleculares). Disponible en: <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/19184/1/uy24-19074.pdf>

[43] Souza, J. M., Vieira, T.M., Candido, A. C., Tekuza, D. Y., Rao, G. S., de Albuquerque, S., Crotti, A. Siquiera-Neto, J.L. & Magalhaes, L.G. (2021). *In vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* activity enhancement of curcumin by its monoketone tetramethoxy analog diveratralacetone. *Parasitology & Vector-Borne Diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2021.100031>

[44] Nagajyothi, F., Zhao, D., Weiss, L. M., & Tanowitz, H. B. (2012). Curcumin treatment provides protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology research*, 110(6), 2491–2499. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2790-9>