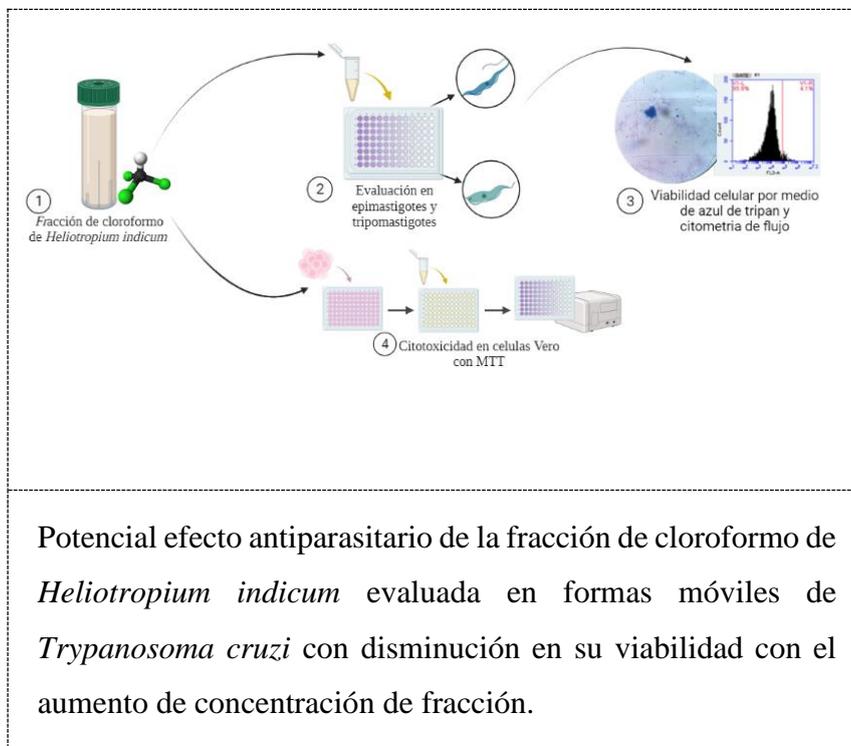


Evaluación de la fracción de cloroformo de *Heliotropium indicum* sobre cultivo de epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Graphical Abstract (GA)



Evaluación de la fracción de cloroformo de *Heliotropium indicum* sobre cultivo de epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

*Yeimy Alejandra Sanabria Martínez**

** Programa de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad Antonio Nariño.*

Dirigido por: cPhD Yuly Elien Bernal Rosas

Resumen

La enfermedad de Chagas es endémica en algunas áreas rurales y tropicales. En la actualidad solo se cuenta con dos antiparasitarios para tratar esta patología, su eficacia varía según la fase en que se encuentre la enfermedad y los reportes evidencian efectos secundarios graves en los pacientes tratados, lo que destaca la necesidad de una mayor investigación y desarrollo de nuevos tratamientos de origen vegetal, con moléculas que contengan potencial y acción biológica, ya que sus compuestos contienen propiedades medicinales, y fitoquímicas importantes. *Heliotropium indicum* es una planta herbácea de zonas tropicales de América que se caracteriza por su gran cantidad de alcaloides de pirrolizidina, flavonoides y terpenoides con actividad antibacteriana, antifúngica y antiparasitaria. Es así que se seleccionó la fracción de cloroformo de esta planta, donde se obtuvo que las concentraciones 200, 150, 100 y 50 $\mu\text{g/mL}$ presentaron efecto tripanocida demostrando un IC_{50} de 23,39 $\mu\text{g/mL}$ frente a epimastigotes y de 75 $\mu\text{g/mL}$ para tripomastigotes después de 72 horas de estímulo.

Por otro lado, se obtuvo que el nivel de infección de epimastigotes tratados fue de 25%, mientras que para tripomastigotes fue del 40%, esto proporciona la primera evidencia sobre el efecto de la fracción cloroformo de *Heliotropium indicum* en *Trypanosoma cruzi*.

Evaluación de la fracción de cloroformo de *Heliotropium indicum* sobre cultivo de epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Abstract

Chagas disease is endemic in some rural and tropical areas. Currently there are only two antiparasitics to treat this pathology, their efficacy varies according to the phase of the disease and reports show serious side effects in treated patients, which highlights the need for further research and development of new treatments of vegetable origin, with molecules that contain biological potential and action, since their compounds contain important medicinal and phytochemical properties. *Heliotropium indicum* is a herbaceous plant from tropical America that is characterized by its large amount of pyrrolizidine alkaloids, flavonoids, and terpenoids with antibacterial, antifungal, and antiparasitic activity. Thus, the chloroform fraction of this plant was selected, where it was obtained that the concentrations 200, 150, 100 and 50 µg/mL had a trypanocidal effect, demonstrating an IC₅₀ of 23.39 µg/mL against epimastigotes and 75 µg/mL for trypomastigotes after 72 hours of stimulation.

On the other hand, it was obtained that the infection level of treated epimastigotes was 25%, while for trypomastigotes it was 40%, this provides the first evidence on the effect of the chloroform fraction of *Heliotropium indicum* on *Trypanosoma cruzi*.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, *Heliotropium indicum*, Efecto tripanocida, Citotoxicidad en Vero.

Introducción

La enfermedad de Chagas, causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, es una de las infecciones parasitarias humanas más importantes en América Latina, afectando aproximadamente a 7 millones de personas, donde las migraciones de pacientes seropositivos para Chagas, han dispersado la enfermedad a países no endémicos de América y el mundo (Organización Mundial de la Salud, 2022).

Esta enfermedad puede ser transmitida por vectores, de forma congénita, por transfusiones de sangre, trasplantes de órganos y/o accidentes en laboratorios (José A Pérez-Molina, 2020). Entre sus mecanismos de transmisión en Colombia, la vía vectorial a partir de las heces de triatominos, y la transmisión oral por el consumo de alimentos contaminados y animales infectados, son las formas que generan mayor letalidad en el país, de hasta el 50% en brotes (MinSalud, 2022).

En Colombia, se estima una población expuesta de 11.916.465 personas provenientes de diversos municipios. Entre ellos se han reportado el mayor número de casos en lugares como Soatá (Boyacá), Mogotes (Santander), Tame (Arauca), Támara y Nunchía (Casanare). Esta distribución demuestra que la enfermedad en Colombia presenta un alto impacto diferenciado en la variedad de áreas geográficas del país (Ministerio de Salud y Protección Social, 2022).

Sin embargo, las condiciones propicias para la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas se encuentran principalmente en poblaciones que viven en condiciones precarias, con bajos estándares de higiene y saneamiento, lo que lleva a asociar esta enfermedad severamente con la pobreza. Aunque se han reportado triatominos positivos en conjuntos residenciales y viviendas modernas (Arciniegas, et al., 2018), estas poblaciones carecen de acceso regular a servicios de atención médica y tienen escaso conocimiento sobre la enfermedad, incluyendo su modo de adquisición, las manifestaciones clínicas y los posibles tratamientos disponibles (Marson, 2016).

T. cruzi presenta un ciclo de vida complejo que implica la infección de hospedadores vertebrados y la transmisión por insectos vectores. Este parásito pasa por tres estadios morfológicos principales: amastigote, epimastigote y tripomastigote. Los epimastigotes residen en el tracto digestivo del insecto vector y se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, que son capaces de infectar a los hospedadores vertebrados. Después de la picadura, los tripomastigotes son liberados en las heces del vector y, una vez en el torrente sanguíneo del hospedador, tienen la capacidad de invadir diversas células. Dentro de las células, los parásitos se transforman en amastigotes y pasan por múltiples ciclos de replicación. Posteriormente, los amastigotes se diferencian nuevamente en tripomastigotes sanguíneos, que son liberados por la lisis celular del hospedador (Murcia et al., 2013).

La enfermedad de Chagas presenta dos fases: Aguda y crónica. La fase aguda, que comienza entre 7 y 10 días después de la infección por *T. cruzi*, se caracteriza generalmente por síntomas leves e inespecíficos similares a los de una gripe, como fiebre, malestar general y hepatoesplenomegalia. En ocasiones, pueden aparecer lesiones cutáneas en el sitio de inoculación, como nódulos cutáneos (chagoma de inoculación) o hinchazón en los párpados con conjuntivitis (signo de Romana). La muerte durante la fase aguda es extremadamente rara y ocurre principalmente debido a miocarditis o meningoencefalitis, siendo más frecuente en pacientes inmunodeprimidos o en etapas tempranas de la vida (Alarcón de Noya et al., 2016).

Después de la fase aguda, la mayoría de las personas infectadas ingresan en una etapa prolongada y asintomática de la enfermedad, conocida como fase crónica indeterminada, durante la cual se encuentran pocos o ningún parásito en la sangre. Durante esta etapa, la mayoría de los afectados desconocen que están portando la infección. Sin embargo, se estima que entre el 20% y el 30% de las personas infectadas experimentarán problemas médicos debilitantes y, a veces, posiblemente mortales a lo largo de su vida (Global Health, Division of Parasitic Diseases, 2016).

Algunos pacientes pueden desarrollar una enfermedad crónica, que en hasta un 30-40% de los casos se caracteriza por cardiomiopatías, arritmias, mega vísceras y raramente, poli neuropatías y accidentes cerebrovasculares. Aún después de más de un siglo de conocerse la enfermedad de Chagas siguen sin resolverse muchos interrogantes, lo que hace la necesidad de mejorar el control epidemiológico, los métodos diagnósticos y terapéuticos (Pérez., J, & Molina, A 2020).

La enfermedad de Chagas se caracteriza por su naturaleza crónica y asintomática, lo que dificulta su diagnóstico temprano y la detección. Los pacientes pueden ser seropositivos sin presentar síntomas iniciales perceptibles. La enfermedad se caracteriza por ser asintomática en las primeras etapas y su desarrollo se extiende a lo largo de un período prolongado de aproximadamente de 12 a 15 años, lo cual dificulta su detección y diagnóstico (Guhl, F.,2020).

Con respecto al tratamiento, en la actualidad existen dos únicos medicamentos, el nifurtimox (NFX) y el benznidazol (BNZ), que presentan contraindicaciones y efectos secundarios en los pacientes medicados. Los estudios muestran variación en las tasas de curación cuando se administran a pacientes en etapa crónica (Yun O., et al, 2009). Algunos efectos adversos de estos antiparasitarios son: Alergias, irritaciones en la piel, dolores de cabeza, fiebre, vómitos, dolor de articulaciones, entre otros. Ambos medicamentos están disponibles en Colombia, su administración está a cargo del Ministerio de Salud, y se pueden encontrar en las Secretarías de Salud departamentales. La orden médica es lo único que se requiere para acceder al tratamiento (Minsalud, 2018).

En la búsqueda de nuevos fármacos para tratar estas enfermedades, se postulan distintos candidatos clínicos para la enfermedad de Chagas incluyendo el posaconazol y ravuconazol, dos inhibidores de la CYP51 (esterol 14 α -desmetilasa), una enzima del citocromo P450 esencial para la biosíntesis de esteroides, sin embargo, se evidenció una baja eficacia contra la enfermedad, cuando se usa en monoterapia (Torrice, F., et al, 2018).

En la actualidad existen distintos tipos de investigaciones que están orientadas a buscar alternativas para la creación de nuevos antiparasitarios con el aprovechamiento de la diversidad vegetal. Esto hace una alternativa potencial de actividad tripanocida, ya que ofrecen una gran fuente en compuestos

bioactivos, principalmente por su alta diversidad estructural en metabolitos secundarios, específicos de especies vegetales, generadas en respuesta a condiciones de estrés celular asociados a supervivencia, respuesta a patógenos y condiciones medioambientales (Xiao J., et al., 2015).

Se evidencio por tanto, que los alcaloides de pirrolizidina puros tales como: heliotrina, monocrotalina, retronecina y senecionina, presentan actividades antitripanosómicas, con valores IC₅₀ (94.68 y 14.35 µg/mL) más altos en comparación con los alcaloides tripanocidas más potentes de los esqueletos de indol, quinolina e isoquinolina, contra formas *Trypanosoma brucei brucei* del torrente sanguíneo, parece evidente que la presencia de un grupo funcional éster con cadenas laterales ramificadas aumenta la lipofilicidad de los tres alcaloides y por lo tanto aumenta su actividad tripanocida (Endalkachew N, et.al,2009).

Los reportes revelan que algunos extractos de plantas que contienen alcaloides de pirrolizidina con actividad antineoplásica, así como los alcaloides de pirrolizidina con importantes propiedades inhibitoras de y/o anti-ulcerogénicas, podrían ser buenas fuentes contra los tripanosomas, ya que estos parásitos son similares a algunos tipos de células cancerosas en su rápido crecimiento dentro de los mamíferos (Barrett., 2000), los efectos citotóxicos se atribuyen principalmente a la actividad del alcaloide de pirrolizidina, específicamente el N-óxido de indicina. Este compuesto interfiere con el ensamblaje de la proteína tubulina en los microtúbulos, lo que resulta en daño en el ADN del parásito y contribuye a su efecto citotóxico (Chandan., et al,2021).

Es por lo anterior que se planteó determinar mediante ensayos de viabilidad celular la actividad de la fracción de cloroformo de la planta *Heliotropium indicum* sobre cultivo de epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*, debido a que en la literatura se ha reportado estudios fitoquímicos con distintas fracciones de *Heliotropium indicum*, donde los resultados revelan la presencia de varios compuestos en el extracto de hojas de esta planta, entre ellos alcaloides, flavonoides, esteroides y terpenoides que pueden tener actividad frente a *Trypanosoma cruzi* (Chandan., et al, 2021).

1. METODOLOGÍA

1.1 Establecer la CI50 de la fracción de Cloroformo de *Heliotropium indicum* sobre epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* mediante ensayos de viabilidad celular.

Para cumplir con este objetivo en primer lugar:

Los Tripanosomas utilizados a lo largo de este trabajo, fueron suministrados por la Pontificia Universidad Javeriana Cepa Y, correspondiente a DTU II, los cuales fueron conservados en un medio bifásico Tobie con adición de sangre, en tubo inclinado, realizado según protocolo de (“NORMAS PARA CULTIVO in vitro DE PARÁSITOS DE LA FAMILIA *TRYPANOSOMATIDAE*” pág. 15-16, 1993) a 27°C, y realizando pases sucesivos cada diez días, en cajas de cultivo 75 mm³ con medio Tobie líquido.

1.1.1 Curva de crecimiento de Epimastigotes

Se realizó la curva de crecimiento partiendo de tres concentraciones diferentes de epimastigotes: 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 . El ensayo se realizó en una microplaca de 96 pozos con 100 uL de las distintas concentraciones por triplicado. Se dejó incubar, realizando conteo en cámara de Neubauer por ocho días.

1.1.2 Producción de Tripomastigotes a partir de infección de células Vero

Las células Vero derivada del riñón del mono verde africano (*Chlorocebus sp*), fueron suministradas por la Universidad Antonio Nariño, crecidas en cajas de cultivo de 75 mm³. Para su mantenimiento se utilizó medio DMEM suplementado con 1% de glutamina, 1 % de penicilina y 10% de suero fetal bovino inactivado.

Para la obtención de los parásitos en su forma tripomastigote se infectaron monocapas de cultivos de células Vero. El ensayo se realizó usando cultivos de epimastigotes en medio Tobie (Niño, A, 2021). Se dejaron en incubación 24 horas a 37°C con 5 % de CO₂, cuando se evidenció la adhesión de las células con un 40% de confluencia, se procedió a infectar con *T. cruzi*, en relación de tres parásitos por células (1:3), ocho parásitos por célula (1:8) y diez parásitos por célula (1:10). Se realizó seguimiento diario, con el fin de visualizar los tripomastigotes resultantes tras la infección en células

Vero.

1.1.3 Colecta de material vegetal, preparación de extracto y fraccionamiento.

La fracción implementada para este trabajo fue tratada y suministrada por la Universidad de Cartagena con vínculo de proyecto aprobado en convocatoria interna de la Universidad Antonio Nariño N°2022226 titulado “Evaluación de compuestos activos frente a *Trypanosoma cruzi*”

Inicialmente se realizó la recolección del material vegetal en la región Caribe de Colombia y fueron identificadas taxonómicamente en el Jardín Botánico Guillermo Piñeres y el Herbario Colección de Referencia Universidad de Cartagena. Posteriormente, se sometió a un proceso de corte y selección de las hojas en buen estado, libre de hongos e insectos. Las hojas fueron pesadas y luego se dejaron secar a 40°C con la finalidad de eliminar el agua, y se logre extraer con facilidad los metabolitos. El material seco, fue triturado con un molino mecánico, donde se buscó disminuir el tamaño de partícula y aumentar la superficie de área de contacto entre la muestra y el solvente. Finalmente, el material fue pesado. El material vegetal pulverizado fue sometido a un proceso de maceración en frío, en un recipiente de vidrio en contacto con cloroformo (CHCl₃) grado cromatográfico durante 24h, el solvente fue separado del material sólido por decantación y se concentró en un rotaevaporador a presión reducida (Espitia Baena et al., 2014) (Beltrán Villanueva et al., 2013).

1.1.4 Bioensayo de la fracción cloroformo de la planta *Heliotropium indicum* sobre epimastigotes de *T. cruzi*.

Se ensayaron los epimastigotes con la fracción de cloroformo a las concentraciones: 200, 150, 100, 50, 25 y 12.5 µg/mL. Se montó en placas de 96 pozos a un volumen final de 300 µl relación 1:1 de parásitos y extractos. Se incubaron por 72 horas, haciendo seguimiento cada 24 horas. El ensayo se realizó por triplicado y teniendo como controles:

CT1 positivo: Epimastigotes 1×10^6 + DMSO al 10%

CT2 positivo: Epimastigotes 1×10^6 + 533 µg/mL de Benznidazol

CT3 negativo: Epimastigotes 1×10^6

CT4 positivo: Epimastigotes 1×10^6 + DMSO al 0.5 %

CT5: Fracción de cloroformo de *Heliotropium indicum* + Tobie

CT6: Tobie.

Para determinar la viabilidad de los epimastigotes se realizó el recuento de parásitos en cámara de Neubauer por la técnica de viabilidad celular por azul de tripan (Pérez, K. et al, 2017).

Con el programa GraphPad Prism 8, se obtuvo la IC50 para cada ensayo, usando un modelo de Log (inhibidor) frente a la respuesta. Se realizaron tres repeticiones independientes, cada una con tres réplicas.

1.1.5 Ensayo de viabilidad celular por citometría de flujo con epimastigotes y tripomastigotes resultantes de bioensayos 1.1.4 y 1.1.6

Se evaluó a través de citometría de flujo con yoduro de propidio (PI) los ensayos realizados. Inicialmente se tomó 100 µl de cada uno de los tratamientos, se centrifugó 10 min a 2500 rpm, se retiraron 80 µL y se adicionaron 80 µL de PBS estéril. Se centrifugó nuevamente, se retiraron 80 µL y se adicionó 80 µL de PBS estéril. Se adicionó 2 µL del fluorocromo, y se incubó por 15 minutos a 28°C para epimastigotes, y 37°C para tripomastigotes. Pasado el tiempo, se realizó agitación por vortex durante 15 segundos y se leyó en el citómetro.

1.1.6 Bioensayo de la fracción cloroformo de la planta *Heliotropium indicum* sobre Tripomastigotes de *T. cruzi*.

Los tripomastigotes obtenidos de células Vero fueron cultivados en medio DMEM modificado de (Sigma-Aldrich), suplementado con SFB 50% (BIOWEST), en placas de 6 pozos, y se dejaron en incubación a 37°C con 5% CO₂. Se enfrentaron los tripomastigotes con la fracción de cloroformo a seis concentraciones diferentes: 200, 150, 100, 50, 25 y 12.5 µg/mL, se montó en placas de 96 pozos a un volumen final de 300 µl relación 1:1 de parásitos y fracción. Se incubaron por 72 horas, haciendo seguimiento cada 24 horas. El ensayo se realizó por triplicado y teniendo como controles:

CT1 positivo: Tripomastigotes 1×10^6 + DMSO al 10%.

CT2 positivo: Tripomastigotes 1×10^6 +533 µg/mL de Benznidazol

CT3 Negativo: Tripomastigotes 1×10^6

CT4 positivo: Tripomastigotes 1×10^6 + DMSO al 0.5 %

CT5: Fracción de cloroformo de *Heliotropium indicum* + DMEM

CT6: DMEM

Para determinar la viabilidad de los tripomastigotes se realizó el recuento de parásitos en cámara de Neubauer por la técnica de viabilidad celular por azul de tripán (Pérez, K. et al, 2017).

Con el programa GraphPad Prism 8, se obtuvo la IC50 para cada ensayo, usando un modelo de Log (inhibidor) frente a la respuesta. Se realizaron tres repeticiones independientes, cada una con tres réplicas.

1.1.7. Citotoxicidad de fracción cloroformo de la planta *Heliotropium indicum* en células Vero

Bioensayo

Para iniciar la preparación de las disoluciones necesarias, se tomó la fracción inicial que presentaba una concentración de 6666 $\mu\text{g/mL}$. En la realización del ensayo de viabilidad se utilizaron 8000 células, en una placa de 96 pozos, a las que se les permitió adherirse durante 24 horas. Pasadas las 24h de adherencia de las células Vero donde se visualizaba una confluencia entre el 60 – 70%, se retiró el medio (DMEM completo), se añadieron 100 μL de los tratamientos (fracción) disueltos en DMEM garantizando concentraciones de 200, 150, 100, 50, 25 y 12.5 $\mu\text{g/mL}$.

Como controles:

CT1 positivo: 8×10^3 células + DMSO al 10%

CT2 positivo: 8×10^3 células + 0.1 mg/mL de DOXO

CT3 positivo: 8×10^3 células + DMSO al 0.5 %

CT4 negativo: 8×10^3 células + DMEM suplementado.

CT5: DMEM suplementado

Pasadas las 24 h de haber colocado el estímulo, se añadieron a los pozos 10 μL de bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 5 mg/mL, las placas se incubaron por 4 horas a 37°C y 5% de CO₂ tiempo que permitió la reducción del formazán, dando a la formación de cristales verificados al microscopio. Después de su formación, se retiró el

medio y se agregó 100 µl de DMSO concentrado, se dejó la placa en la incubadora 37°C y 5% de CO₂ por 20 minutos hasta que se disolvieron los cristales y finalmente se midió la placa a una longitud de onda de 540 nm en el lector de microplacas. Este ensayo también se realizó para 48 y 72 horas de haber colocado el estímulo.

Con el programa GraphPad Prism 8, se obtuvo la IC₅₀ para cada ensayo, usando un modelo de Log (inhibidor) frente a la respuesta. Se realizaron tres repeticiones independientes, cada una con tres réplicas.

Se identifica el nivel de citotoxicidad como:

Citotóxico: Extractos con CI₅₀ menores a 50 µg/mL

Medianamente citotóxico: Extractos con CI₅₀ entre 51 y 100 µg/mL

Levemente citotóxicos: Extractos con CI₅₀ sobre 100 µg/mL Valencia et al., 2011); (Rojas et al., 2010).

1.2 Determinar en las formas móviles tratadas si ocurre un efecto tripanocida o tripanostático, mediante seguimiento de los estadíos por microscopía.

Para cumplir con este objetivo en primer lugar:

1.2.1 Identificación y seguimiento del efecto de la fracción cloroformo de la planta *Heliotropium indicum* sobre epimastigotes y tripomastigotes tratados.

Las seis placas resultantes de ensayos anteriores fueron visualizadas por 24, 48 y 72 horas para evaluar la movilidad del parásito (**Evaluación in vitro de la fracción cloroformo de la planta *Heliotropium indicum* sobre epimastigotes de *T. cruzi*.**) y (**Evaluación in vitro de la fracción cloroformo de la planta *Heliotropium indicum* sobre tripomastigotes de *T. cruzi*.**)

A cada placa se le realizó un cambio de medio, de la siguiente manera: Partiendo de los tratamientos (extracto + parásito) a las 24, 48 y 72 horas se tomó 180 µl de cada tratamiento y se pasaron a tubos Eppendorf estériles, fueron centrifugados a 2500 rpm x 10 min, se eliminó 160 µL donde contenía fracción y residuos metabólicos del parásito, se añadió 160 µL de Tobie para epimastigotes y DMEM para tripomastigotes a los Eppendorf, se agitó suavemente y se montaron en una nueva microplaca de

96 pozos, dejando en incubación a 27°C por 72 horas para epimastigotes y 37°C en el caso de tripomastigotes. Con el fin de observar el comportamiento del parásito después de los tratamientos, se realizó seguimiento mediante microscopía, durante 24, 48 y 72 horas. Teniendo en cuenta parámetros como:

0%, indica nula movilidad y cambio estructural del parásito frente al extracto y controles.

1-25 % indica una escasa movilidad y cambio estructural del parásito frente al extracto y controles.

26-50% indica poca movilidad y cambio estructural del parásito frente al extracto y controles.

51 -75 % indica una movilidad y cambio estructural aceptable del parásito frente al extracto y controles.

76-100% indica una alta movilidad y cambio estructural del parásito frente al extracto y controles.

(Rodrigo., et al,2013)

1.3 Medir el porcentaje de infección en células Vero de los tripanosomas tratados con la fracción cloroformo de la planta *Heliotropium indicum*.

1.3.1 Con las placas resultantes después de la adición de nuevo medio Tobie y DMEM para epimastigotes y tripomastigotes tratados, se realizan cuatro placas de 24 pozos con concentraciones de células 17500 y se procedió a infectar tres pozos por cada réplica, se realizó seguimiento por microscopía, y luego de cumplir las 72 horas, se realizó tinción de giemsa con el fin de visualizar células infectadas y no infectadas.

2. Resultados y discusión

2.1 Establecer la CI50 de la fracción de Cloroformo de *Heliotropium indicum* sobre epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* mediante ensayos de viabilidad celular.

2.1.1 Para la evaluación con el estadio de epimastigotes frente a la fracción cloroformo de la planta *Heliotropium indicum*, primeramente, se realizó una tinción de giemsa para identificar su morfología, como se visualiza en la figura 1, donde se visualiza que el kinetoplasto se encuentra debajo del núcleo, presenta su flagelo libre, una pequeña membrana ondulante, característica de los epimastigotes. Seguidamente se determinó por medio de una curva de crecimiento la fase de crecimiento estacionaria, ya que se tendría ese rango de tiempo para tratamiento y lectura de los ensayos antes de perder su viabilidad, se determinó el número de parásitos por pozo mediante un ensayo de con tres diluciones desde 1×10^6 epimastigotes/mL hasta 1×10^4 epimastigotes/mL, para su seguimiento, se realizó mediante conteo directo de parásitos vivos, en cámara de Neubauer por ocho días (Ver figura 2) donde obtuvimos que su fase logarítmica estaba comprendida en el día 3 al día 6 y que la mejor concentración fue de 1×10^6 epimastigotes/mL.

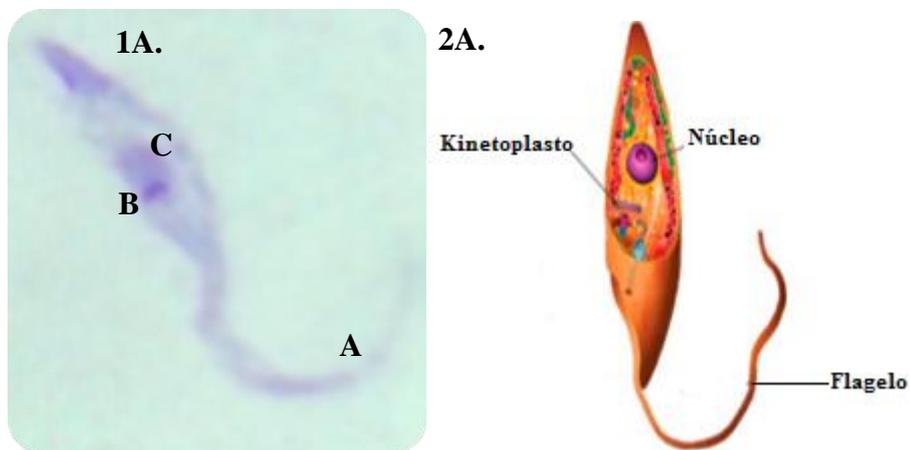


Figura 1. Forma epimastigote de *Trypanosoma cruzi*. 1A. Fuente: propia. Forma flagelar, prolifera en el insecto vector. A. Flagelo libre, B. Kinetoplasto, C. Núcleo. **2A. Fuente: (Teixeira y col.,2011)**

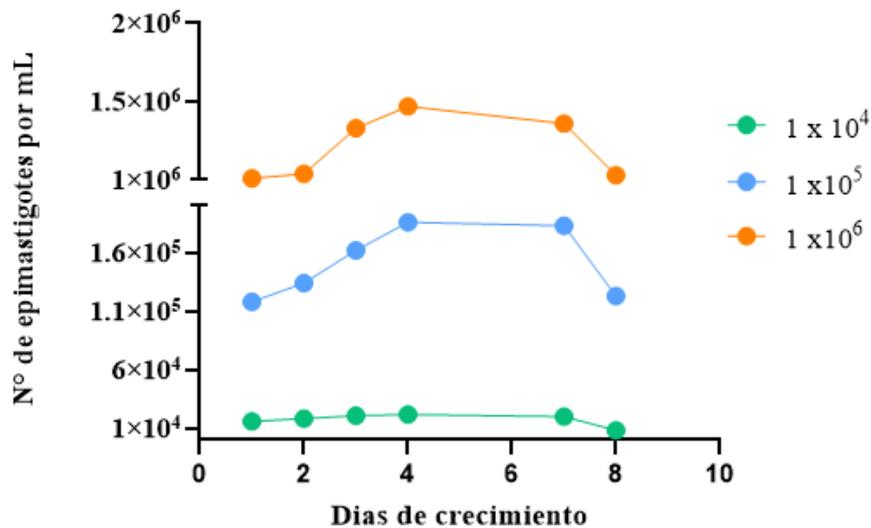


Figura 2. Curva de crecimiento de epimastigotes en medio Tobie.

2.1.2 Una vez establecidas las condiciones de trabajo para el ensayo con epimastigotes de *T. cruzi*, se procedió a evaluar el efecto de la fracción cloroformo obtenida de las hojas de *Heliotropium indicum*. Se probaron seis concentraciones diferentes (200, 150, 100, 50, 25 y 12.5 µg/mL) durante tres períodos de tiempo (24, 48 y 72 horas). Teniendo en cuenta que se realizó como mínimo un recuento de 200 epimastigotes vivos.

Los resultados obtenidos por medio de viabilidad con azul de tripán se muestran en la figura 3. La concentración de 200 µg/mL mostró una supervivencia del 40% de la población a las 24 horas, donde las concentraciones de 150, 100, 50, 25 y 12.5 µg/mL presentaban una supervivencia de más del 50% de la población. En citometría de flujo se obtuvo que en la concentración de 200 µg/mL hubo un 25% de supervivencia, para la concentración de 150 µg/mL un 46%, y para concentraciones de 100, 50, 25 y 12.5 µg/mL presentaban una supervivencia de más del 60% de la población (ver anexo 1).

A las 48 horas, la población de epimastigotes se redujo en un 19% para la concentración de 200 µg/mL, un 22% para la concentración de 150 µg/mL, un 47% para la concentración de 100 µg/mL, en un 50% para la concentración de 50 µg/mL, un 62% para la concentración de 25 µg/mL y se mantuvo en un 88% para la concentración de 12.5 µg/mL. En cuanto a su viabilidad por citometría de flujo se obtuvo que para la concentración de 200 µg/mL, aumentó su porcentaje de supervivencia a 45%, en concentraciones de 150, 100, 50 µg/mL presentaban un 50% supervivencia de la población de

epimastigotes, y en concentraciones de 25 y 12.5 $\mu\text{g/mL}$ presentaban una supervivencia de más del 80% de la población. Se observaron cambios morfológicos y de movilidad. (ver anexo 2)

A las 72 horas, la concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ presentó un 13% de epimastigotes vivos, la concentración de 150 $\mu\text{g/mL}$ un 32%, la concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ un 43%, la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ un 45%, la concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ un 49% y la concentración de 12.5 $\mu\text{g/mL}$ un 82% de epimastigotes vivos. Lo que tuvo relación con lo obtenido en citometría de flujo, la concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ presentó un 15% de supervivencia, la concentración de 150 $\mu\text{g/mL}$ un 31%, las concentraciones de 100,50,25 y 12.5 $\mu\text{g/mL}$ presentaron porcentajes de supervivencia mayores de 60% como se visualiza en la figura 8.

De acuerdo con la clasificación de Osorio et al. en 2007, se clasificaron los resultados obtenidos de la siguiente forma: Altamente activo ($\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$), activo ($10 < \text{IC}_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$), moderadamente activo ($50 < \text{IC}_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$) o no activo ($\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$). Así, la fracción de cloroformo de *Heliotropium indicum* se clasificó a las 24 horas como no activo con un IC_{50} de 150 $\mu\text{g/mL}$, mientras que a las 48 y 72 horas se clasificó como activo con IC_{50} de 50 y 23 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, como se muestra en la tabla 1.

Estos resultados muestran que la fracción de cloroformo de *Heliotropium indicum* tiene un efecto sobre la supervivencia de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, y que la citometría de flujo con yoduro de propidio puede considerarse un método más sensible para evaluar y detectar la viabilidad de los tratamientos en cuanto al cambio morfológico, en comparación con el recuento con azul de tripán. Estas diferencias entre los dos métodos de viabilidad celular podrían estar dadas por nuevas formas morfológicas, donde al contacto con el extracto, el parásito sufre cambios estructurales que no necesariamente son formas apoptóticas. En los últimos años varios autores, reportan que *T. cruzi* es una especie muy heterogénea, y presenta una extensa variedad de formas morfológicas, evidenciadas en nuestros resultados. (Escolano, J, et al, 2022).

Además, existen distintos factores externos tal como lo es, el estrés nutricional, la temperatura y el pH que son inductores de la morfogénesis de *T. cruzi* in vitro, y en este caso factores inducidos por el

contacto con la fracción. Los resultados del presente trabajo muestran que la epimastigote génesis se dispara por la posible presencia de compuestos provenientes del extracto de la planta, que se pueden nombrar como eventos tempranos y tardíos. Los eventos tempranos, ocurridos al contacto de 24 horas, se caracterizan por la aparición de formas redondas que no se multiplican precediendo la transformación hacia epimastigote (Barrios JG, et, al, 2008) mientras que los eventos tardíos corresponden a la presencia de amastigotes que se multiplicaron siguiendo una curva de crecimiento igual a los cultivos axénicos (Souza, W, 2002). Es así como se evidenció que los epimastigotes al entrar en contacto con extractos de plantas inducen cambio de morfología, encontrándose pequeños, redondeados y casi inmóviles, reduciendo el número total y de las rosetas observadas, tal y como lo reporta González en el 2022.

Seguidamente, se ha reportado en la literatura que las plantas *Onosma bulbotrichum* y *Echium amoenum*, pertenecientes a la familia de *Boraginacea* presentaron un efecto tripanocida con fracciones de hexano y metanol en el estadio de epimastigotes a concentraciones de 50 y 200 $\mu\text{g/mL}$, teniendo un efecto perjudicial del 100% (Gohari AR, et, al, 2008). Por otro lado, Arévalo. D, 2017 y colaboradores reportaron que el extracto obtenido de hojas y tallos de *Heliotropium indicum* fue activa contra dos cepas de *Leishmania* spp. a concentraciones mayores de 50 $\mu\text{g/mL}$. Resultado de interés propio porque *Leishmania* spp. y *Trypanosoma cruzi* son microorganismos unicelulares pertenecientes al mismo grupo de los protozoos, como parásitos intracelulares obligados, dependen de una célula huésped para sobrevivir y reproducirse. Estos dos parásitos exhiben ciclos de vida complejos que involucran múltiples formas de desarrollo, pasando por diversas etapas dentro del vector (mosquito o chinche) y el huésped vertebrado. Durante su ciclo de vida, los dos experimentan cambios de forma dentro de las células hospedadoras. La leishmaniasis y la enfermedad de Chagas plantean desafíos significativos en cuanto a su diagnóstico y tratamiento.

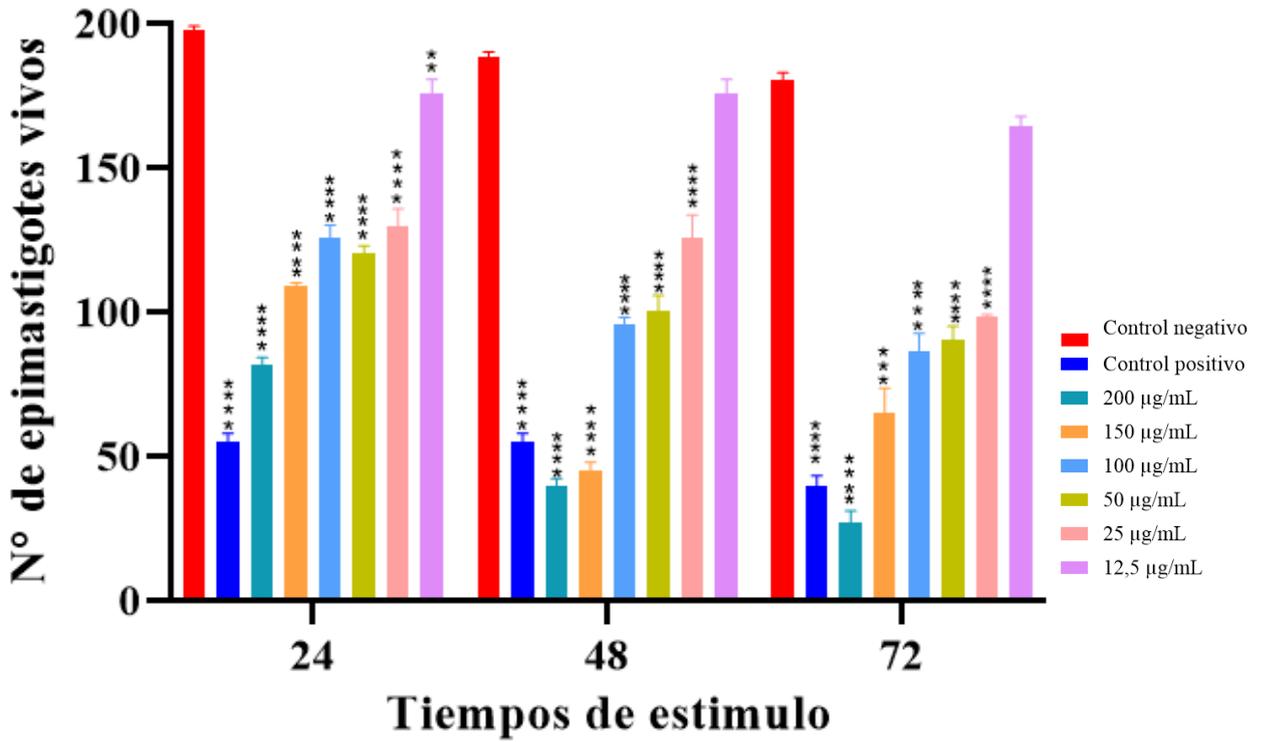
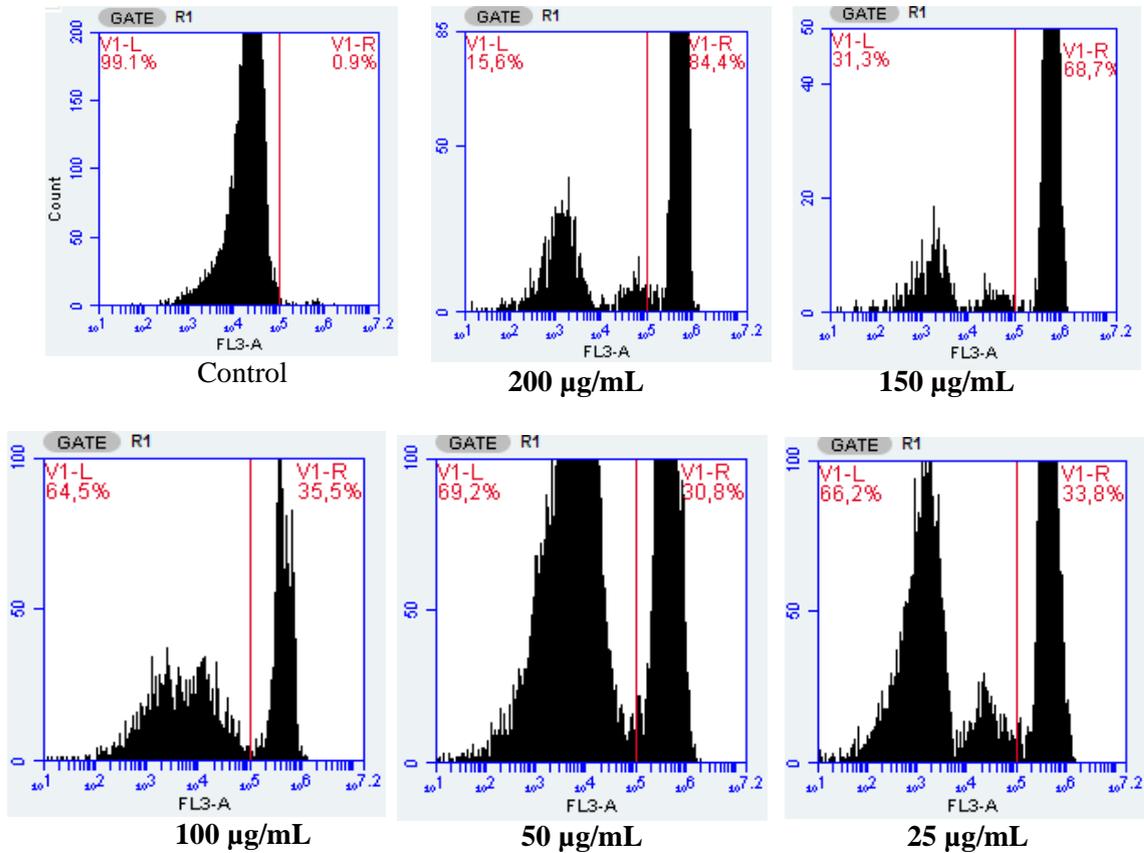
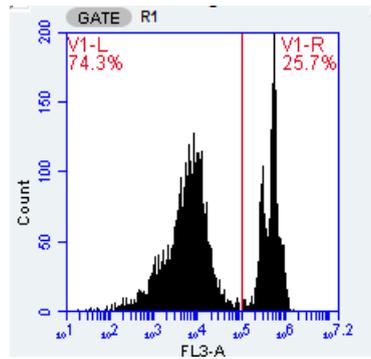


Figura 3. Recuentos de epimastigotes con azul de tripan en cámara de Neubauer en tiempos establecidos.

En cada uno de los tratamientos se evidencia diferencias significativas donde cada * será $<0,0001$.





12.5 µg/mL

Figura 8. Citometría de flujo de epimastigotes tratados con fracción de cloroformo de *Heliotropium indicum* a las 72 horas de contacto.

En V1-L se encontrará el porcentaje de población no apoptótica de epimastigotes, en V1-R se encontrará el porcentaje de población apoptótica de epimastigotes, y FL3-A es el detector de fluorescencia rojo el cual se utilizó por el yoduro de propidio.

Tabla 1. IC50 de epimastigotes en tiempos establecidos de bioensayos.

24 Horas de estímulo	48 Horas de estímulo	72 Horas de estímulo
150,0 µg/mL	50,02 µg/mL	23,39 µg/mL

2.1.4 Para la evaluación con el estadio de tripomastigote frente a la fracción cloroformo de la planta *Heliotropium indicum*, primeramente, se realizó una tinción de Giemsa para identificar su morfología, estos fueron provenientes de células vero después de 10-15 días de infectadas, donde se visualiza en su morfología que es alargado, el núcleo es central, el kinetoplasto se encuentra en la parte inicial del parásito y posee una gran membrana ondulante como se visualiza en la fig. 9, seguidamente se determinó por medio de una curva de crecimiento, su fase de crecimiento estacionaria, ya que se tendría ese rango de tiempo para tratamiento y lectura de los ensayos antes de que pierdan su viabilidad. Donde se pudo determinar que su fase de crecimiento estaba comprendida entre el día 2 al día 4 y la mejor concentración fue de una célula Vero seria infectada por ocho parásitos (1:8) (Ver figura 10).

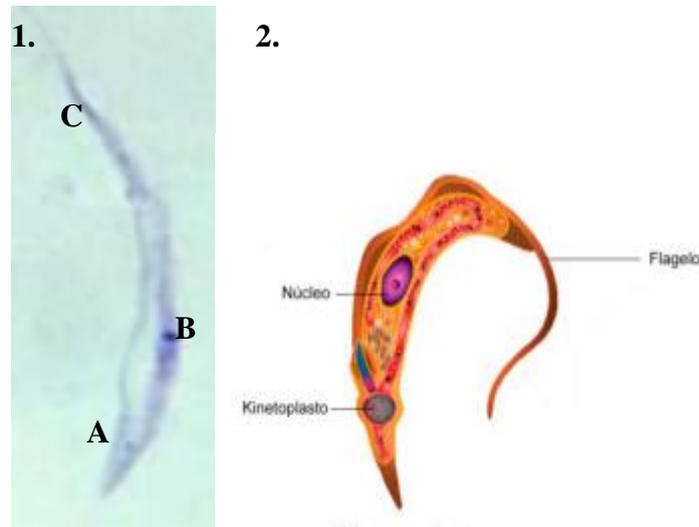


Figura 9. Forma tripomastigote de *Trypanosoma cruzi*. 1.Fuente: propia.

Corresponde a la forma infectiva para el vector y hospedador. A. Kinetoplasto, B. Núcleo, C. Flagelo.
2. Fuente: (Teixeira y col.,2011)

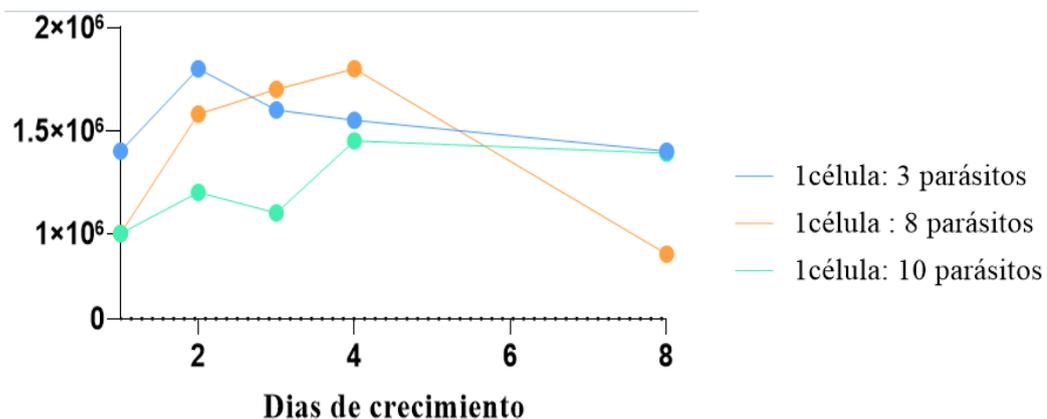


Figura 10. Curva de crecimiento de tripomastigotes en medio DMEM.

2.1.5 Una vez definidas las condiciones de trabajo para el ensayo con tripomastigotes de *T. cruzi*, se realizó la evaluación con la fracción cloroformo obtenidos de las hojas de *Heliotropium indicum*, fueron evaluados a seis concentraciones distintas 200, 150, 100, 50, 25 y 12.5 $\mu\text{g/mL}$ los resultados obtenidos por medio de viabilidad con azul de tripán indican que, tras 24 horas de haber añadido el estímulo, la concentración más alta (200 $\mu\text{g/mL}$) mostró un porcentaje de supervivencia 69% en la población de tripomastigotes. Asimismo, las concentraciones de 150 $\mu\text{g/mL}$ y 100 $\mu\text{g/mL}$ mostraron un porcentaje de supervivencia de 58 % y 74% respectivamente, en cuanto a las concentraciones de 50, 25 y 12.5 $\mu\text{g/mL}$ indicaron un porcentaje de supervivencia 98%, 97 % y 38% respectivamente en comparación con el control negativo, como se visualiza en la figura 11. En citometría de flujo se obtuvo

que en la concentración de 200 µg/mL obtuvo un 82% de supervivencia, para la concentración de 150 µg/mL un 81%, y para concentraciones de 100, 50, 25 y 12.5 µg/mL presentaban una supervivencia de más del 70% de la población (Ver anexo 3). A las 48 horas, la población de tripomastigotes se redujo en un 66% para la concentración de 200 µg/mL, un 55% para la concentración de 150 µg/mL, un 70% para la concentración de 100 µg/mL, en un 94% para la concentración de 50 µg/mL, un 96% para la concentración de 25 µg/mL y se mantuvo en un 74% para la concentración de 12.5 µg/mL. En cuanto a su viabilidad por citometría de flujo se obtuvo que para la concentración de 200 µg/mL aumentó su porcentaje de supervivencia a 83%, en concentraciones de 150, 100, 50 µg/mL presentaron un porcentaje mayor del 70% supervivencia de la población de tripomastigotes, y en concentraciones de 25 y 12.5 µg/mL presentaban una supervivencia de más del 86% de la población. Se observaron cambios morfológicos y de movilidad, tal y como se evidencia en el anexo 4.

A las 72 horas, la concentración de 200 µg/mL presentó un 20% de tripomastigotes vivos, la concentración de 150 µg/mL un 23%, la concentración de 100 µg/mL un 25%, la concentración de 50 µg/mL un 28%, la concentración de 25 µg/mL un 74% y la concentración de 12.5 µg/mL un 80% de supervivencia, como se visualiza en la figura 11. Esto presenta diferencias con lo obtenido en citometría de flujo, la concentración de 200 µg/mL presentó un aumento de 90% de supervivencia, las concentraciones de 150 y 100 µg/mL presentan un porcentaje de supervivencia mayor de 85%, mientras que la concentración de 50 µg/mL presentó un 50% de supervivencia de la población tratada, y por último concentraciones de 25 y 12.5 µg/mL presentaron porcentajes de supervivencia mayores de 90% como se visualiza en la figura 12.

Es por lo anterior, que los resultados muestran que la fracción de cloroformo de *Heliotropium indicum* tiene un menor efecto sobre los tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*, en comparación con epimastigotes, ya que los tripomastigotes poseen una cubierta de glicocalix, una capa compuesta por proteínas y polisacáridos en su superficie, que les brinda protección contra la penetración de ciertos compuestos y preserva su viabilidad, además tienen una mayor resistencia al estrés ambiental y a los agentes tóxicos, debido a su capacidad de adaptación a diferentes ambientes y a su capacidad para

invadir y colonizar los tejidos del huésped (Conrad L, et al, 2010).

Donde se pudo evidenciar por medio de citometría de flujo con yoduro de propidio es un método más sensible para evaluar y detectar la viabilidad de los tratamientos, en comparación con el recuento con azul de tripán. En 2014 se identificó una nueva morfología intracelular llamada zoide, esta forma resulta de la diferenciación inicial de los tripomastigotes metacíclicos a través de la división celular asimétrica, dando como resultado un amastigote y un zoide. Este zoide es una célula con kinetoplasto, pero sin núcleo, que muere rápidamente y es degradada por la célula huésped. Un experimento con tripomastigotes del clon H510 C8 C3 obtenidos in vivo de ratones infectados y sembrados en el medio F69 incubado a $36.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ se observó que los tripomastigotes se transformaron en el siguiente orden: formas regresivas (amastigotes), formas progresivas (tripomastigotes jóvenes) que pasaron nuevamente a amastigotes, presumiblemente a través de formas regresivas y que a su vez evolucionaron hacia formas progresivas y epimastigotes, esto se menciona con el fin de corroborar el efecto encontrado con el estímulo en el desarrollo del trabajo (Zaidenberg, J, 2004).

Es por lo anterior que el efecto tripanocida se clasificó según Osorio et al. en 2007 como la IC50 de tripomastigotes a las 24 horas 115 $\mu\text{g}/\text{mL}$, no fue activo, a las 48 horas 99 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 72 horas 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fue moderadamente activo.

Realizando una revisión de la literatura, la actividad anti trypanosoma podría atribuirse a uno o más de los alcaloides de pirrolizidina, quinonas, o triterpenoides que se han reportado que están presentes en especies de *Heliotropium spp.* *Heliotropium indicum* tiene compuestos como alcaloides de pirrolizidina que se consideran de gran interés farmacológico, biológico y quimiotaxonómico. Estos metabolitos han sido aislados de una amplia variedad de plantas, especialmente de géneros pertenecientes a las *Boraginaceae*.

Así mismo se ha reportado en la literatura que los alcaloides de pirrolizidina puros como: heliotrina, monocrotalina, retronecina y senecionina, mostraron algunas actividades anti tripanosomas, con valores IC50 (94.68 y 14.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$) más altos en comparación con los alcaloides tripanocidas más potentes de los esqueletos de indol, quinolina e isoquinolina, contra formas *Trypanosoma brucei brucei*

del torrente sanguíneo, parece evidente que la presencia de un grupo funcional éster con cadenas laterales ramificadas aumenta la lipofilidad de los tres alcaloides y por lo tanto aumenta su actividad tripanocida. Uno de los mecanismos por los que los alcaloides ejercen su efecto es hacer más permeable la membrana (Endalkachew N, et.al, 2022).

T.brucei y *T.cruzi* hacen parte de la misma familia tripanosomátidos, por ende presentan similitudes dentro de estas ambos parásitos causan enfermedades en humanos y son transmitidos por insectos vectores, tanto *Trypanosoma brucei* como *Trypanosoma cruzi* tienen ciclos de vida complejos que involucran diferentes estadios y cambios de hospedador. Ambos parásitos pasan por etapas en el insecto vector y en el huésped vertebrado, lo que les permite adaptarse a diferentes ambientes y tejidos dentro del hospedador. Los dos parásitos presentan mecanismos de evasión inmunológica sofisticados, pueden evadir la respuesta inmunitaria del hospedador y persistir en el organismo durante períodos prolongados, lo que contribuye a la cronicidad de las enfermedades que causan. Además, las proteínas de membrana de ambos parásitos están implicadas en la patogénesis de las enfermedades que causan. Por ejemplo, en *T. cruzi*, las proteínas de superficie amastigotes (TcS) están relacionadas con la invasión y la adhesión a las células huésped, así como con la respuesta inflamatoria. En *T. brucei*, las glicoproteínas de superficie variable (VSG) desempeñan un papel clave en la evasión del sistema inmunológico del huésped (Alacantara, G,2019). Es por lo anterior que se piensa que puede tener un efecto similar en el estadio tripomastigote, salvo la selectividad que debe presentarse.

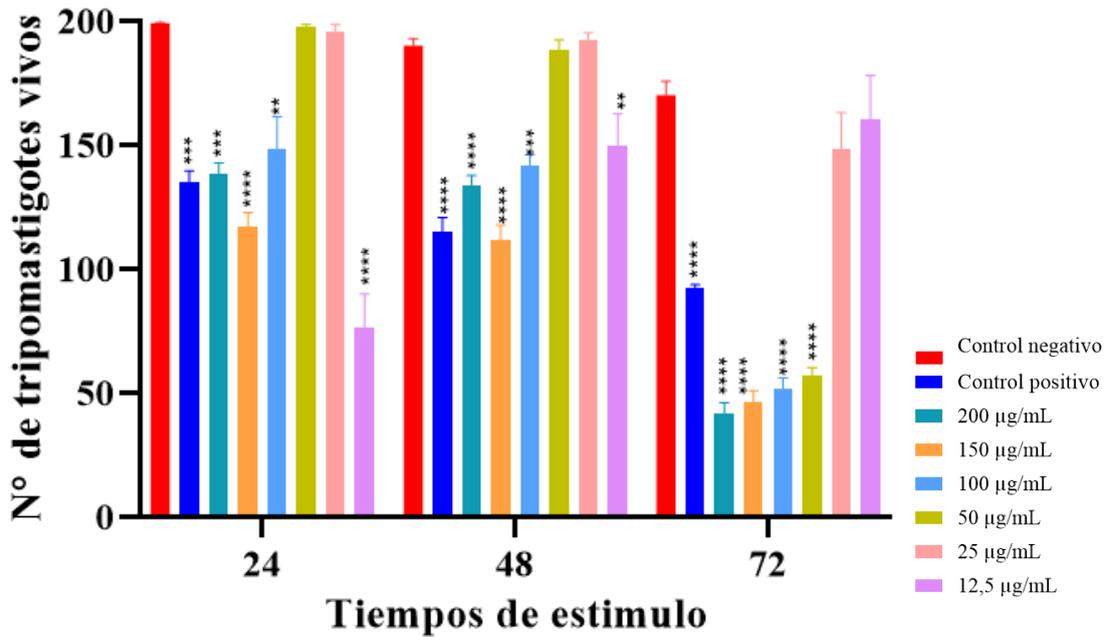
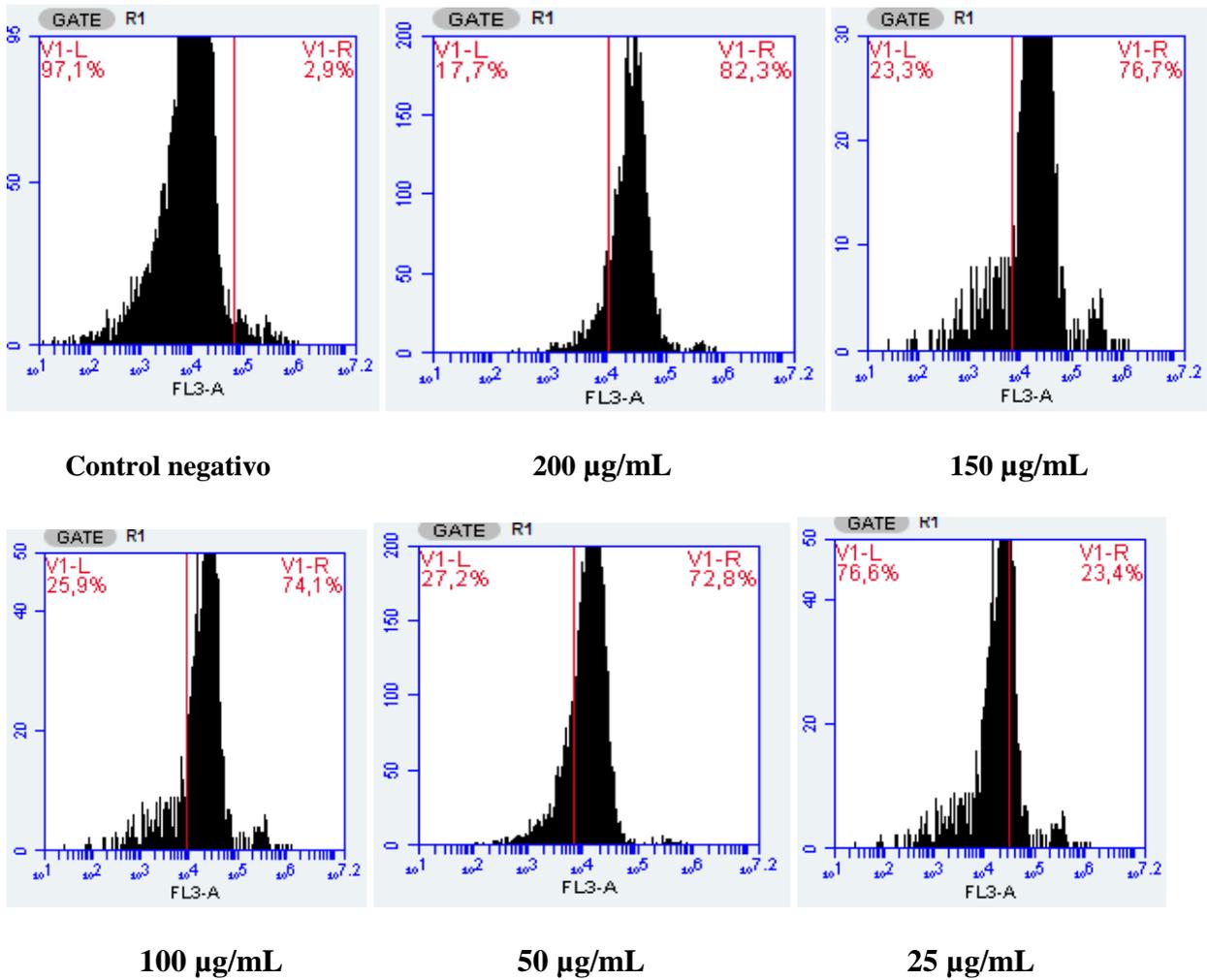
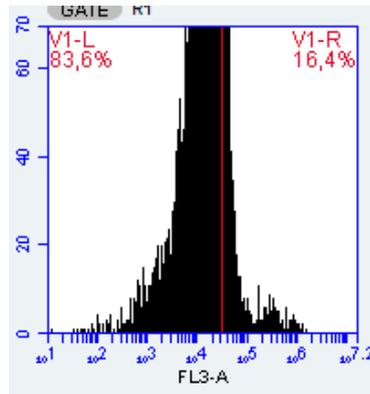


Figura 11. Recuento de tripomastigotes con azul de tripán en cámara de Neubauer. En cada uno de los tratamientos se evidencia diferencias significativas donde cada * será <0,0001.





12.5 µg/mL

Figura 12. Citometría de flujo de tripomastigotes tratados con fracción de cloroformo de *Heliotropium indicum* a las 72 horas de contacto. V1-L se encontrará el porcentaje de población no apoptótica de tripomastigotes, V1-R se encontrará el porcentaje de población apoptótica de tripomastigotes, FL3-A es el detector de fluorescencia rojo el cual se utilizó por el yoduro de propidio.

Tabla 2. IC50 de tiempos establecidos de bioensayos.

24 Horas de estímulo	48 Horas de estímulo	72 Horas de estímulo
115,6 µg/mL	99,77 µg/mL	75,00 µg/mL

2.1.6 Después del cambio de medio, se obtuvieron resultados significativos en los epimastigotes y tripomastigotes tratados. Se realizaron seguimientos microscópicos ópticos durante 24, 48 y 72 horas en placas que contenían epimastigotes y tripomastigotes tratados con la fracción de cloroformo de *Heliotropium indicum* retirada y adición de nuevo medio Tobie y medio DMEM.

En concentraciones de 200, 150 y 100 µg/mL, no se detectó la presencia de tripanosomas móviles en ninguno de los dos estadios ni en los tiempos establecidos (Ver tabla 3 y 4).

En concentraciones de 50 µg/mL, se observó solo un 2% de tripanosomas móviles en epimastigotes y tripomastigotes después de 24 horas. Después de 48 horas, este porcentaje disminuyó a sólo un 1%, y a las 72 horas no se visualizaban tripanosomas móviles. En concentraciones de 25 µg/mL, después de 24 horas de cambio de medio, se observó la presencia de un 5% de epimastigotes móviles y flagelados, y un 10% de tripomastigotes con formas flageladas y circulares. Después de 48 horas, se registró una disminución del 3% en la población de epimastigotes y del 8% en tripomastigotes. Después de 72 horas, solo quedaba el 1% de epimastigotes y el 5% de tripomastigotes en estas

concentraciones. En concentraciones de 12.5 $\mu\text{g/mL}$, después de 24 horas de cambio de medio, se observó un 25% de supervivencia en epimastigotes y un 50% en tripomastigotes. Después de 48 horas, estos porcentajes disminuyeron en un 20% y un 40% respectivamente, y después de 72 horas, se observó un 15% de epimastigotes móviles y un 35% de tripomastigotes con cambios morfológicos como formas circulares y con pequeños flagelos.

Todos los tratamientos fueron comparados con el control negativo, que presentaba un 100% de viabilidad en movimiento e integridad del parásito. Solo se observó una disminución del 7% en el control negativo después de 72 horas debido al espacio y replicación de los mismos (consultar tabla 3).

Tabla 3. Tratamientos con retiro de fracción de cloroformo de *Heliotropium indicum* y adición de nuevo medio Tobie y DMEM.

Epimastigotes	200 $\mu\text{g/mL}$	150 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	12.5 $\mu\text{g/mL}$	CT -	CT+
24 H	0%	0%	0%	2%	5%	25%	100%	60%
48 H	0%	0%	0%	1%	3%	20%	98%	57%
72 H	0%	0%	0%	0%	1%	15%	95%	52%
Tripomastigotes	200 $\mu\text{g/mL}$	150 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	12.5 $\mu\text{g/mL}$	CT -	CT+
24 H	0%	0%	0%	2%	5%	50%	100%	60%
48 H	0%	0%	0%	1%	3%	40%	98%	57%
72 H	0%	0%	0%	0%	1%	35%	95%	52%

2.2 Se determinó la citotoxicidad de estas concentraciones en células Vero, la citotoxicidad se categorizó según Osorio et al, 2007 en los siguientes tres niveles:

Citotóxico, para los extractos con CI50 menores de 50 $\mu\text{g/ml}$

Medianamente citotóxicos, para extractos con CI50 entre 51 y 100 $\mu\text{g/ml}$,

Extractos levemente citotóxicos, para aquellos con CI50 por encima de 100 $\mu\text{g/ml}$

Donde se obtuvo que la fracción de cloroformo de *Heliotropium indicum* a las 24 y 48 horas fue levemente citotóxica, mientras que a las 72 horas fue medianamente citotóxica con un valor de 100 $\mu\text{g/mL}$ lo que indica que la concentración del extracto que causa la muerte del 50% de las células Vero (ver tabla 4).

Comparando valores de IC50 y CC50, podemos obtener una idea del índice de selectividad del

extracto. En este caso, la relación entre la IC50 de epimastigotes y la CC50 es de aproximadamente 4.28 $\mu\text{g/ml}$, mientras que para tripomastigotes es de 1.33 $\mu\text{g/ml}$. Esto indica que la IC50 al ser menor que la CC50, significa que la fracción de cloroformo de *Heliotropium indicum* presenta mayor eficacia contra el parásito que ser toxica para las células Vero (Ver tabla 5).

Tabla 4. CC50 de células Vero con fracción de cloroformo de *Heliotropium indicum* en tiempos establecidos de bioensayos.

24 Horas de estímulo	48 Horas de estímulo	72 Horas de estímulo
149,4 $\mu\text{g/mL}$	110,8 $\mu\text{g/mL}$	100,1 $\mu\text{g/mL}$

Tabla 5. Índice de selectividad de fracción de cloroformo de *Heliotropium indicum* a las 72 horas de estímulo en los dos estadios estudiados.

	IC50	CC50	IS
Epimastigotes	23.39	100	4.28
Tripomastigotes	75		1.33

2.3 Medir el porcentaje de infección en células Vero de los tripanosomas tratados con la fracción cloroformo de la planta *Heliotropium indicum*.

Los epimastigotes y tripomastigotes tratados con concentraciones de 25 y 12.5 $\mu\text{g/mL}$ de la fracción fueron los únicos que sobrevivieron hasta las 72 horas después del cambio de medio. Luego, se infectaron monocapas de células Vero con los epimastigotes recuperados. A las 96 horas de infección, ya se observaron tripomastigotes y aún quedaban epimastigotes libres. De esto se concluyó que las concentraciones más altas (200, 150, 100 y 50 $\mu\text{g/mL}$) provocaron la muerte de toda la población de epimastigotes, mientras que en concentraciones más bajas (25 y 12.5 $\mu\text{g/mL}$) algunos murieron, pero conservaron su capacidad de infección.

En el caso de los tripomastigotes, ocurrió algo similar. Las concentraciones más altas provocaron la muerte de toda la población, mientras que en concentraciones más bajas no se vio afectada la capacidad de infección ni reproducción. A las 48 horas de la infección, se observaron células invadidas por amastigotes.

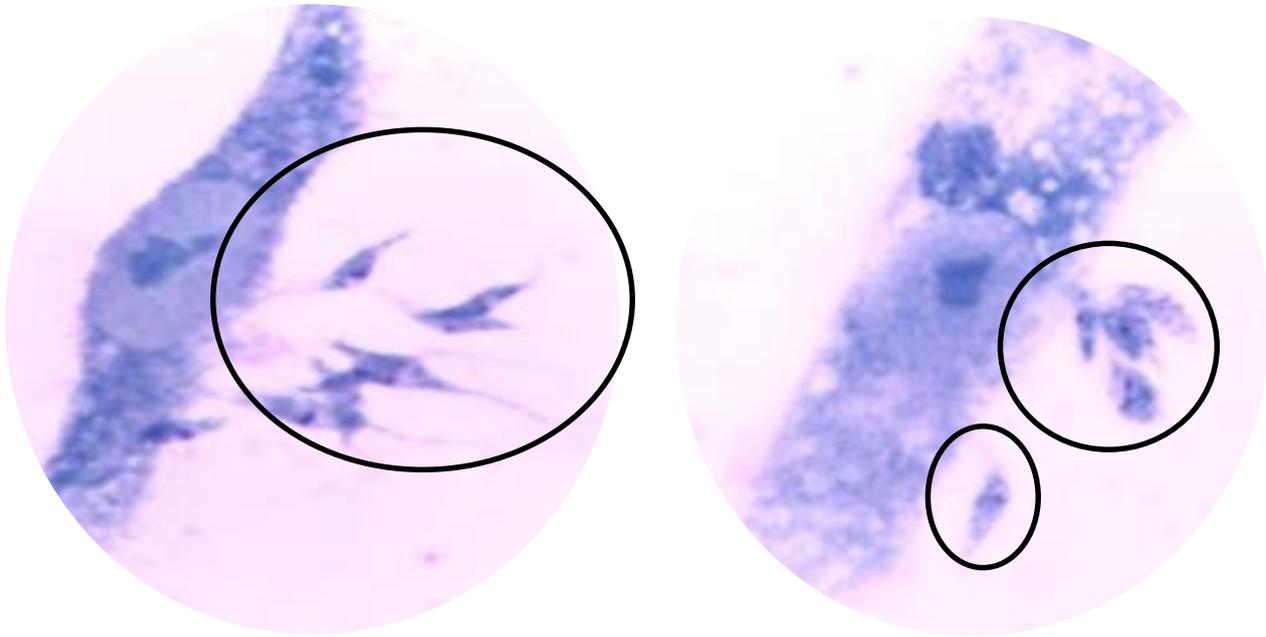


Figura 13. Epimastigotes y tripomastigotes resultantes después de 96 horas de infección con epimastigotes tratados con fracción de cloroformo de *Heliotropium indicum*.

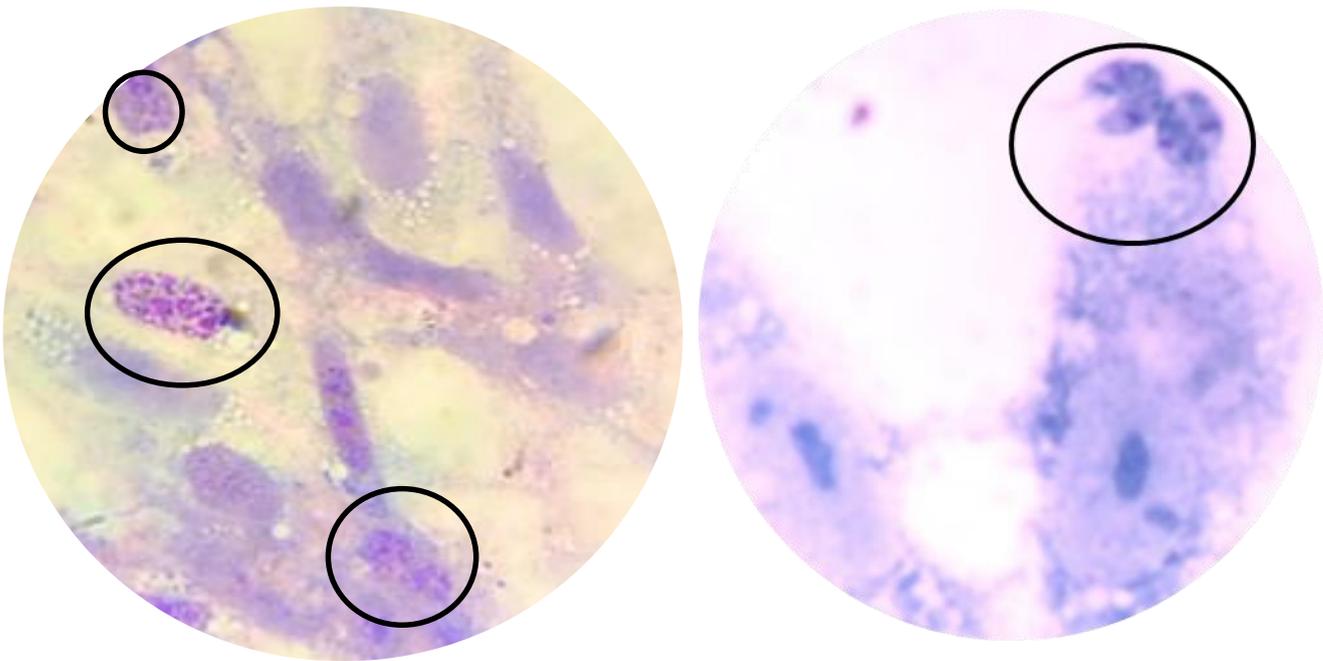


Figura 14. Células invadidas por amastigotes resultantes después de 48 horas de infección con tripomastigotes tratados con fracción de cloroformo de *Heliotropium indicum*.

Nuestros resultados coinciden con los hallazgos reportados por Rodríguez, D. y colaboradores en 2022. En su estudio, demostraron que después de la incubación y eliminación del tratamiento con un extracto de *Clethra fimbriata* a una concentración de 690 $\mu\text{g/mL}$, los epimastigotes tratados recuperaron su capacidad de replicación y no mostraron diferencias significativas en comparación con los parásitos no tratados. Estos resultados indican que el extracto no tuvo efectos restrictivos en

la replicación de los epimastigotes de *T. cruzi*. Por otro lado, se evidenció que la fracción de cloroformo de *Heliotropium indicum* fue eficiente al 100% en la inhibición de la capacidad de replicación de los epimastigotes tratados, utilizando concentraciones que iban desde 200 $\mu\text{g/mL}$ hasta 50 $\mu\text{g/mL}$.

Posteriormente, se realizó una comparación del porcentaje de infección en células Vero de los tripomastigotes tratados utilizando la misma metodología que en nuestro estudio, es decir, mediante tinción de Giemsa. Los resultados reportados indicaron que los tripomastigotes tratados con *Clethra fimbriata* a una concentración de 16.5 $\mu\text{g/mL}$ mostraron una disminución significativa en su capacidad infectiva, con un promedio de 39 células infectadas de un total de 200 células aleatorias. Esto sugiere que la fracción de *Heliotropium indicum* no es completamente efectiva en concentraciones bajas, como 25 $\mu\text{g/mL}$ y 12.5 $\mu\text{g/mL}$, en comparación con los compuestos presentes en *Clethra fimbriata*, sin embargo, estas dos plantas presentan similitudes en algunos compuestos, como terpenos, alcaloides pirrolizidínicos y flavonoides.

3. Conclusiones

En conclusión, los resultados obtenidos demuestran que la fracción cloroformo obtenida de las hojas de *Heliotropium indicum* exhibe un efecto significativo sobre la viabilidad y la mortalidad de los epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*, demostrado por dos métodos de viabilidad.

El efecto de la fracción cloroformo fue más evidente a las 72 horas de estimulación, con un IC₅₀ de 23 $\mu\text{g/mL}$ para los epimastigotes y 75 $\mu\text{g/mL}$ para los tripomastigotes. Se evidenció que tanto los epimastigotes como los tripomastigotes mostraron una respuesta tripanocida a concentraciones de 200, 150, 100 y 50 $\mu\text{g/mL}$, lo cual indica un efecto dosis-dependiente sobre la mortalidad de ambas formas móviles del parásito.

Es importante destacar que, a concentraciones más bajas, como 25 y 12.5 $\mu\text{g/mL}$, el efecto de la fracción cloroformo disminuyó, pero aún se observó un efecto presente. Estos hallazgos indican que

la fracción cloroformo de *Heliotropium indicum* tiene un impacto directo en la viabilidad de los epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*, y que su actividad es más notable a concentraciones más altas.

La fracción cloroformo de *Heliotropium indicum* no solo mostró efectos sobre la viabilidad y mortalidad de los epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*, sino que también indujo cambios morfológicos en estas formas del parásito. Los epimastigotes y tripomastigotes tratados con la fracción cloroformo exhibieron alteraciones en su apariencia estructural, como disminución en el tamaño, distorsión de la forma y deformaciones en la membrana.

El efecto observado en los tripanosomas tratados con la fracción podría atribuirse a uno o más de los compuestos bioactivos presentes en la planta. Se ha informado que especies de *Heliotropium* spp contienen alcaloides de pirrolizidina, quinonas, flavonoides y triterpenoides, entre otros compuestos. Estos componentes bioactivos han sido asociados con propiedades farmacológicas y se ha demostrado que poseen actividad contra diversos parásitos de tipo intestinal y flagelados como *Leishmania*, *T. brusei brusei* y *T. cruzi*.

4. Agradecimientos

A la Universidad Antonio Nariño por ser mi centro de aprendizaje científico y social, para el desarrollo de mi proceso formativo, por el orgullo de decir que soy parte de los bioquímicos de este país, a la universidad de Cartagena por disponer de la fracción para evaluarla, y a la Pontificia Universidad Javeriana por donarnos a los *T. cruzi* implementados para la realización de este trabajo de grado.

A mi directora, Profesora Yuly Elien Bernal por la idea inicial de mi proyecto de investigación, por la disposición, por su orientación y su compromiso con mi trabajo de grado, también por ser ese apoyo en los días donde las cosas no salían de la mejor manera.

A mi familia especialmente a mi mamá Yolanda Martínez, por ser el soporte en distintos aspectos que conllevaron a la finalización de mi carrera, a mis amigas Emily Erazo y Angie Rodríguez que

fueron ese bastón a lo largo de la carrera, donde además de eso contribuyeron a mi formación personal y profesional.

5. Referencias

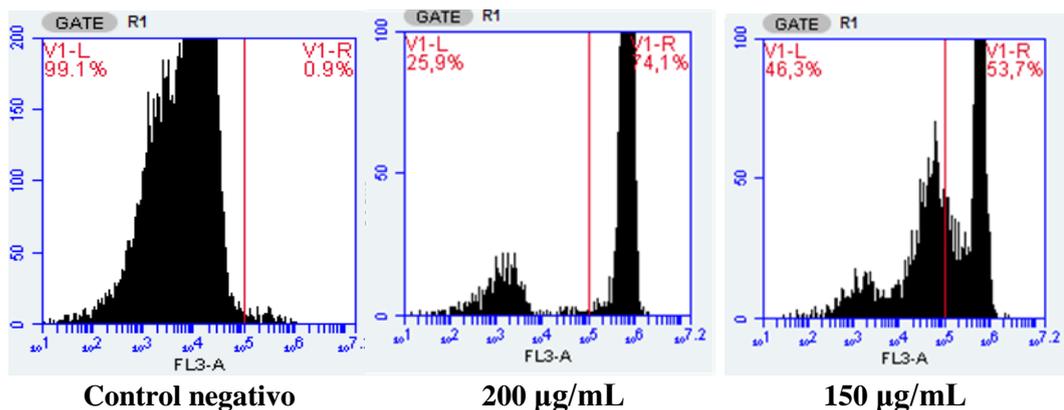
1. Endalkachew Nibret and others, Antitrypanosomal and cytotoxic activities of pyrrolizidine alkaloid-producing plants of Ethiopia, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, Volume 61, Issue 6, June 2009, Pages 801–808, <https://doi.org/10.1211/jpp.61.06.0014>
2. Simoben, C. V., Ntie-Kang, F., Akone, S. H., & Sippl, W. (2018). Compounds from African Medicinal Plants with Activities Against Selected Parasitic Diseases: Schistosomiasis, Trypanosomiasis and Leishmaniasis. *Natural products and bioprospecting*, 8(3), 151–169. <https://doi.org/10.1007/s13659-018-0165-y>
3. Gouhari, A. R., SAEIDNIA, S., HAJI, A. A., NAGHINEZHAD, A., & Yagura, T. (2008). Trypanocidal activity of some medicinal plants against the epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*.
4. Polonio, T., & Efferth, T. (2008). Leishmaniasis: drug resistance and natural products (review). *International journal of molecular medicine*, 22(3), 277–286.
5. Catherine, A., & Neira, N. (n.d.). “Evaluación de la actividad tripanocida de extractos de plantas del género Piper en cultivos de *Trypanosoma cruzi*.” Edu.Co. Retrieved May 28, 2023, from <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/82317/1032465907.%202022.pdf?sequence=4>
6. Investigaciones Fármaco Bioquímicas, M. E. N. C. B. Y. B. I. (n.d.). UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES. Umsa.Bo. Retrieved May 28, 2023, from <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/22719/TM-1951.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
7. J. (n.d.). G r a d o e n F a r m a c i a. Ull.Es. Retrieved May 28, 2023, from <https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/29019/Actividad%20tripanocida%20de%20compuestos%20derivados%20de%20la%20Withaferina%20A.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
8. Durão, R., Ramalhete, C., Madureira, A. M., Mendes, E., & Duarte, N. (2022). Plant terpenoids as hit compounds against trypanosomiasis. *Pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), 15(3), 340. <https://doi.org/10.3390/ph15030340>
9. Fayed, M. A. A. (2021). Heliotropium; a genus rich in pyrrolizidine alkaloids: A systematic review following its phytochemistry and pharmacology. *Phytomedicine plus: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 1(2), 100036. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2021.100036>

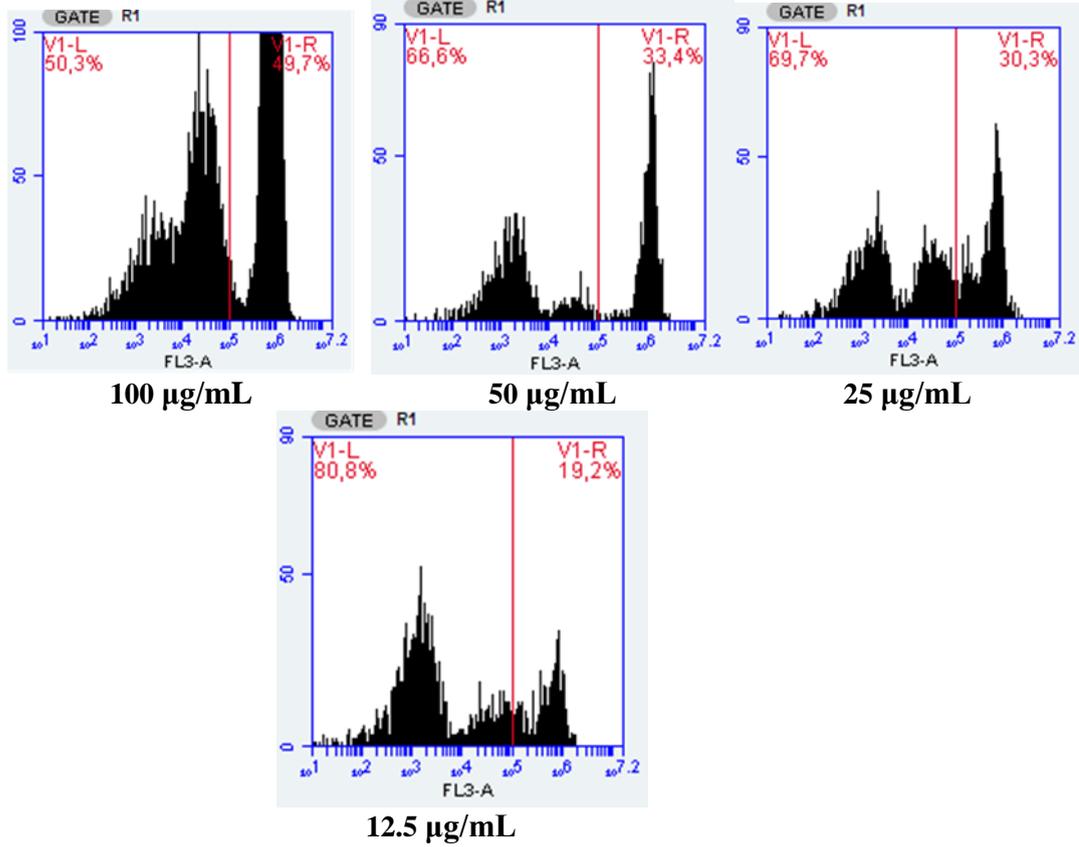
10. Fournet, A., & Muñoz, V. (2002). Natural products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2(11), 1215–1237. <https://doi.org/10.2174/1568026023393011>
11. Franco, C. H., Alcântara, L. M., Chatelain, E., Freitas-Junior, L., & Moraes, C. B. (2019). Drug discovery for Chagas disease: Impact of different host cell lines on assay performance and hit compound selection. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 4(2), 82. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4020082>
12. LINEAMIENTOS PARA LA CONMEMORACION DEL DIA MUNDIAL DE ENFERMEDAD DE CHAGAS 2022 “Ayúdanos a saber cuántos somos y donde estamos.” (n.d.). Gov.Co. Retrieved May 28, 2023, from <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ET/lineamiento-conmemoracion-dia-enfermedad-chagas-2022.pdf>
13. Mesa-Arciniegas, P., Parra-Henao, G., Carrión-Bonifacio, Á., Casas-Cruz, A., Patiño-Cuellar, A., Díaz-Rodríguez, K., Garzón-Jiménez, S., Almansa-Manrique, J., Bernal-Rosas, Y., Hernández-Lamus, C., Pedraza-Toscano, A., & Torres-García, O. (2018). Trypanosoma cruzi infection in naturally infected dogs from an endemic region of Cundinamarca, Colombia. *Veterinary Parasitology (Amsterdam: Online)*, 14, 212–216. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.11.006>
14. Morfogenesis DE Trypanosoma cruzi y amastigotes extracelulares. (n.d.). Siicsalud.com. Retrieved May 28, 2023, from <https://www.siicsalud.com/des/expertoimpreso.php/68373>
15. Pardo-Rodriguez, D., Lasso, P., Mateus, J., Mendez, J., Puerta, C. J., Cuéllar, A., Robles, J., & Cuervo, C. (2022). A terpenoid-rich extract from Clethra fimbriata exhibits anti-Trypanosoma cru zi activity and induces T cell cytokine production. *Heliyon*, 8(3), e09182. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09182>
16. Polonio, T., & Efferth, T. (2008). Leishmaniasis: drug resistance and natural products (review). *International Journal of Molecular Medicine*, 22(3), 277–286. https://doi.org/10.3892/ijmm_00000020
17. Richardson, J. S. M., Sethi, G., Lee, G. S., & Malek, S. N. A. (2016). Chalepin: isolated from Ruta angustifolia L. Pers induces mitochondrial mediated apoptosis in lung carcinoma cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 389. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1368-6>
18. Roy, A. (2015). Pharmacological activities of Indian heliotrope (*Heliotropium indicum* L.): A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. <https://www.semanticscholar.org/paper/af9cd204bb2f84862ad558b8ff18a3b4723f7425>
19. Salem, M., & Werbovetz, K. (2006). Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. *Current Medicinal Chemistry*, 13(21), 2571–2598.

<https://doi.org/10.2174/092986706778201611>

20. Sijm, M., Siciliano de Araújo, J., Kunz, S., Schroeder, S., Edink, E., Orling, K. M., Matheussen, A., van de Meer, T., Sadek, P., Custers, H., Cotillo, I., Martin, J. J., Siderius, M., Maes, L., Brown, D. G., de Nazaré Correia Soeiro, M., Sterk, G., de Esch, I. J. P., & Leurs, R. (2019). Phenylidihydropyrazolones as Novel Lead Compounds Against *Trypanosoma cruzi*. *ACS Omega*, 4(4), 6585–6596. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02847>
21. Valencia, L., Muñoz, D. L., Robledo, S. M., Echeverri, F., Arango, G. J., Vélez, I. D., & Triana, O. (2011). Actividad tripanocida y citotóxica de extractos de plantas colombianas. *Biomedica: revista del Instituto Nacional de Salud*, 31(4), 552. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i4.426>
22. Martín-Escolano, J., Marín, C., Rosales, M. J., Tsaousis, A. D., Medina-Carmona, E., & Martín-Escolano, R. (2022). An updated view of the *Trypanosoma cruzi* life cycle: Intervention points for an effective treatment. *ACS Infectious Diseases*, 8(6), 1107–1115. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00123>
23. Kurup, S. P., & Tarleton, R. L. (2014). The *Trypanosoma cruzi* flagellum is discarded via asymmetric cell division following invasion and provides early targets for protective CD8⁺ T cells. *Cell host & microbe*, 16(4), 439–449. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.09.00>

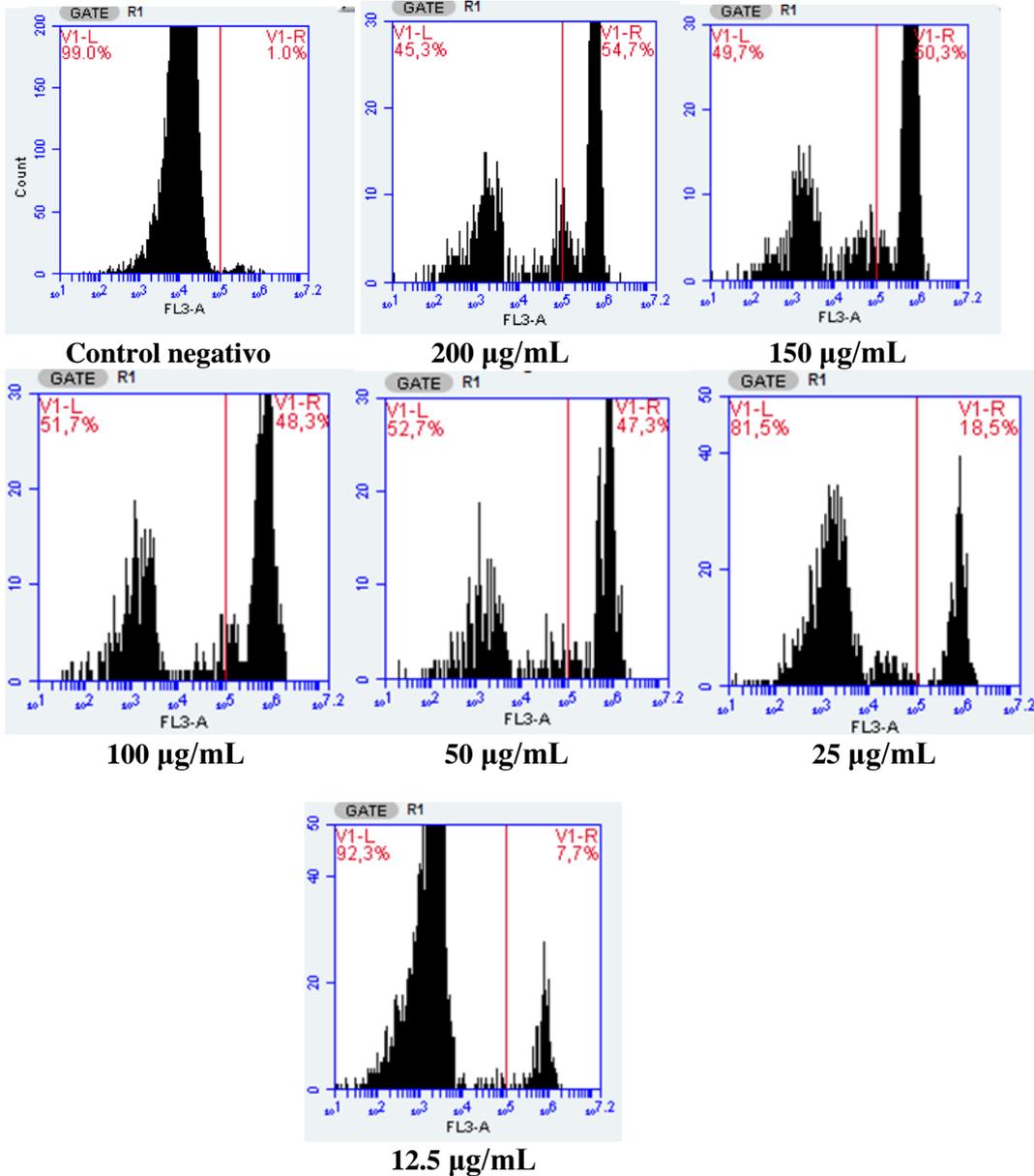
6. Anexos





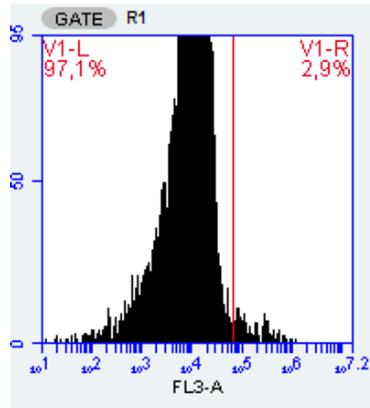
Anexo 1. Citometría de flujo de epimastigotes tratados con fracción de cloroformo de *Heliotropium indicum* a las 24 horas de estímulo.

V1-L se encontrará el porcentaje de población no apoptótica de epimastigotes, V1-R se encontrará el porcentaje de población apoptótica de epimastigotes, FL3-A es el detector de fluorescencia rojo el cual se utilizó por el yoduro de propidio.

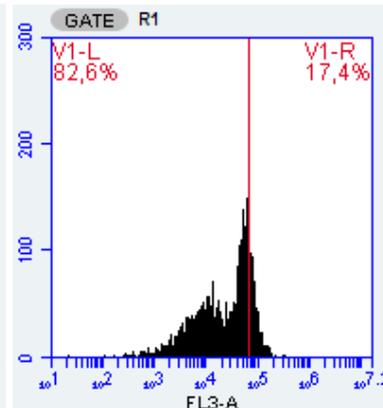


Anexo 2. Citometría de flujo de epimastigotes tratados con fracción de cloroformo de *Heliotropium indicum* a las 48 horas de contacto.

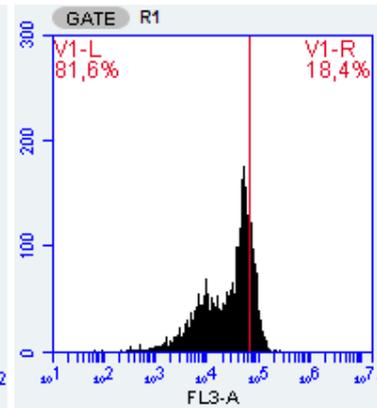
V1-L se encontrará el porcentaje de población no apoptótica de epimastigotes, V1-R se encontrará el porcentaje de población apoptótica de epimastigotes, FL3-A es el detector de fluorescencia rojo el cual se utilizó por el yoduro de propidio.



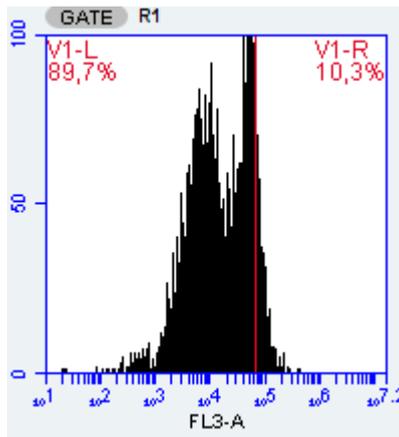
Control negativo



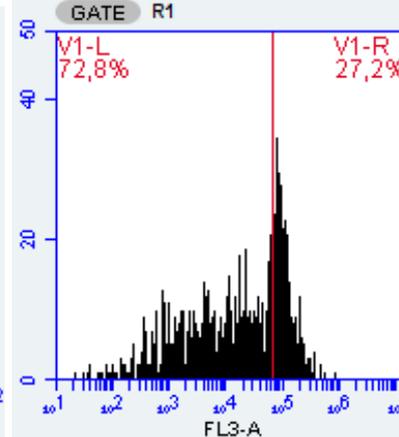
200 µg/mL



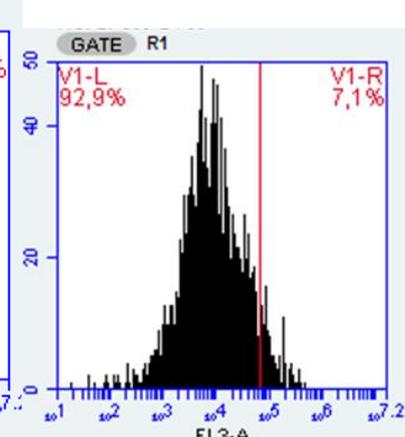
150 µg/mL



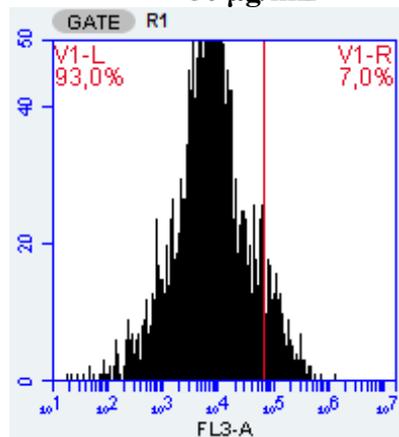
100 µg/mL



50 µg/mL



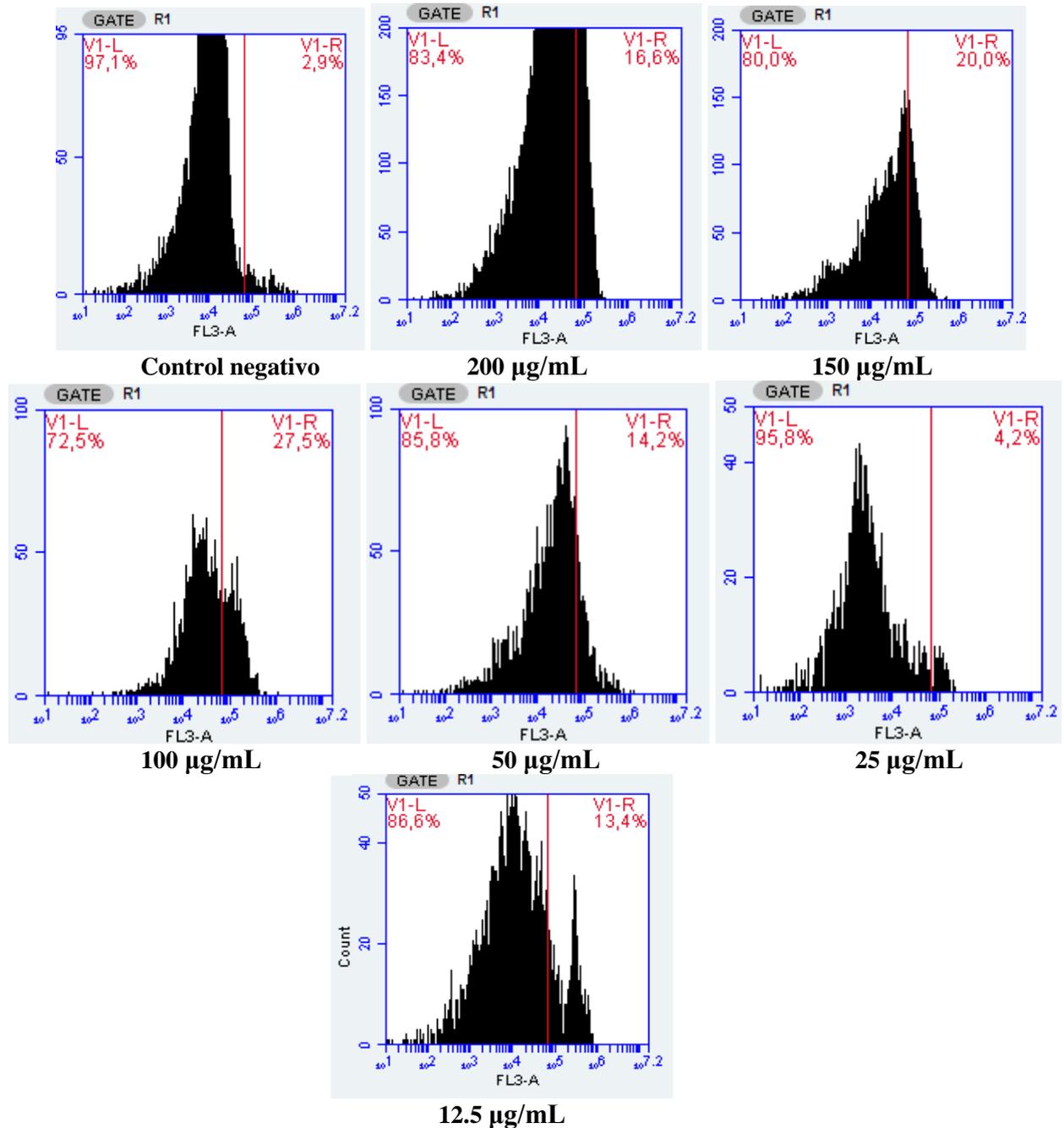
25 µg/mL



12.5 µg/mL

Anexo 3. Citometría de flujo de tripomastigotes tratados con fracción de cloroformo de *Heliotropium indicum* a las 24 horas de estímulo.

V1-L se encontrará el porcentaje de población no apoptótica de tripomastigotes, V1-R se encontrará el porcentaje de población apoptótica de tripomastigotes, FL3-A es el detector de fluorescencia rojo el cual se utilizó por el yoduro de propidio.



Anexo 4. Citometría de flujo de tripomastigotes tratados con fracción de cloroformo de *Heliotropium indicum* a las 48 de estímulo.

V1-L se encontrará el porcentaje de población no apoptótica de tripomastigotes, V1-R se encontrará el porcentaje de población apoptótica de tripomastigotes, FL3-A es el detector de fluorescencia rojo el cual se utilizó por el yoduro de propidio.