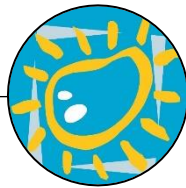
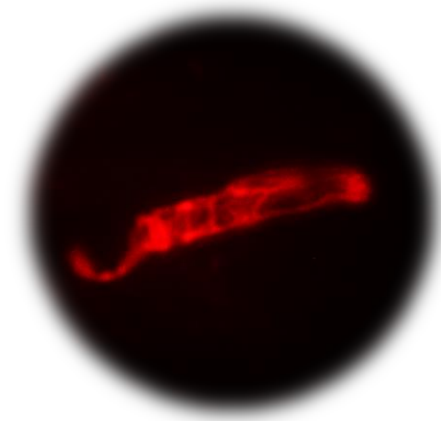


Actividad tripanocida de compuestos derivados de la Withaferina A



TRABAJO FIN DE GRADO
GRADO EN FARMACIA

Julio de 2022



Pablo Alejandro Hernández González

Tutora: Dra. Atteneri López Arencibia

Cotutor: Dr. José Enrique Piñero Barroso

ÍNDICE

1.	Introducción.....	1
1.1.	Epidemiología y transmisión.....	1
1.2.	<i>Trypanosoma cruzi</i> : morfología y ciclo biológico.....	2
1.3.	Manifestaciones clínicas	4
1.4.	Profilaxis y tratamiento.....	5
1.5.	Nuevas perspectivas: compuestos derivados de la <i>withaferina A</i>	6
2.	Objetivos.....	8
3.	Material y métodos.....	9
3.1.	Material.....	9
3.1.1.	Parásitos.....	9
3.1.2.	Líneas celulares de macrófagos murinos.....	9
3.1.3.	Compuestos derivados de la WA.....	9
3.1.4.	Kits comerciales.....	9
3.1.5.	Equipamiento	10
3.2.	Métodos	11
3.2.1.	Ensayos de actividad <i>in vitro</i>	11
3.2.2.	Ensayos de citotoxicidad	11
3.2.3.	Cálculo de la CI_{50} , CC_{50} , IS y CI_{90}	12
3.2.4.	Elucidación de los mecanismos de muerte	12
4.	Resultados y discusión	14
4.1.	Actividad tripanocida y citotóxica. Alteraciones morfológicas.....	14
4.2.	Relaciones estructura – actividad	16
4.3.	Mecanismos de muerte celular.....	17
4.4.	Estudio comparativo y discusión final.....	20
5.	Conclusiones.....	22
	Bibliografía	23

RESUMEN

La enfermedad de Chagas está causada por *Trypanosoma cruzi*, un protozoo transmitido por chinches en países de América Central y del Sur, aunque el flujo migratorio de personas a nivel mundial ha facilitado su diseminación en regiones no endémicas. Frenar su avance resulta complicado, debido a que muchos casos son asintomáticos hasta que llegan a la fase crónica, lo que se suma a la falta de un tratamiento eficaz y seguro para los pacientes. En busca de nuevas alternativas farmacológicas, un compuesto bioactivo de origen natural como la withaferina A, así como derivados semisintéticos obtenidos a partir de la misma, se posicionan como una buena opción para el estudio de propiedades antiparasitarias y citotóxicas. En este trabajo, se han encontrado compuestos incluso más activos que el benznidazol, uno de los fármacos tripanocidas de referencia. Destaca el compuesto PILB₂₈, que presenta un elevado índice de selectividad, y junto a PILB₂₆ y PILB₃₀, demuestra ser capaz de inducir una muerte por apoptosis en las formas epimastigotes de *T. cruzi*, lo que se deduce de los cambios fisiológicos observados tras el tratamiento, como son los descensos en niveles de ATP, condensación de la cromatina o acumulación de especies reactivas de oxígeno. Estos hallazgos resaltan la posibilidad de desarrollar nuevos y potentes fármacos a partir de las withanolidas.

Palabras clave: *enfermedad de Chagas, withanolidas, tratamiento, quimioterapia, apoptosis.*

ABSTRACT

Chagas disease is caused by *Trypanosoma cruzi*, a protozoan transmitted by bedbugs in several Central and South American countries, although global migration has facilitated its spread to non-endemic regions. Stopping its spread is complicated for two reasons: firstly, because many cases are asymptomatic until they reach the chronic phase and, secondly, due to the lack of effective and safe treatment for patients. In the search for new pharmacological alternatives, a natural bioactive compound like withaferin A, as well as semi-synthetic derivatives obtained from it, provides a good option for the study of antiparasitic and cytotoxic properties. Compounds even more active than benznidazole (one of the reference trypanocidal drugs) have been found in this project. The compound PILB₂₈ stands out with a high selectivity index and, together with PILB₂₆ and PILB₃₀, has been shown to induce death by apoptosis in epimastigote forms of *T. cruzi*, what can be deduced from the physiological changes observed after the treatment, such as low ATP levels, chromatin condensation or reactive oxygen species accumulation. These findings highlight the possibility of developing new and potent drugs based on withanolides.

Key words: *Chagas disease, withanolides, treatment, chemotherapy, apoptosis.*

1. Introducción

La enfermedad de Chagas es considerada por la Organización Mundial de la Salud una enfermedad tropical desatendida (ETD), una categoría de 20 patologías que se dan en zonas de pobreza y escasos recursos.¹ En América Latina se suma la presencia del vector, diferentes especies de chinche, facilitando el establecimiento de zonas endémicas; aunque además, en las últimas décadas ha aumentado el número de diagnósticos en regiones donde no hay transmisión vectorial.² Esta problemática se agrava por la alta tasa de casos no diagnosticados, el insidioso curso de la enfermedad, la escasez de tratamientos y su alta toxicidad. Es necesario destinar más recursos a su investigación, no solo para reducir la morbimortalidad de esta enfermedad, sino también para paliar las grandes desigualdades sociales a las que se ven expuestos los pacientes que la sufren.³

1.1. Epidemiología y transmisión

Los países más afectados por el Chagas se encuentran en América, entre el sur de EEUU y el norte de Argentina, de los cuales 21 se consideran endémicos para esta enfermedad.⁴ En ellos se transmite principalmente por vía vectorial, a través del contacto con las heces de las chinches o vinchucas, unos insectos hematófagos que se desarrollan en viviendas de áreas rurales y pobres con paredes sin encalar, techos de paja e interior desordenado, así como en gallineros o corrales.⁵ Estos insectos pertenecen a los géneros *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius* (familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae*).⁶

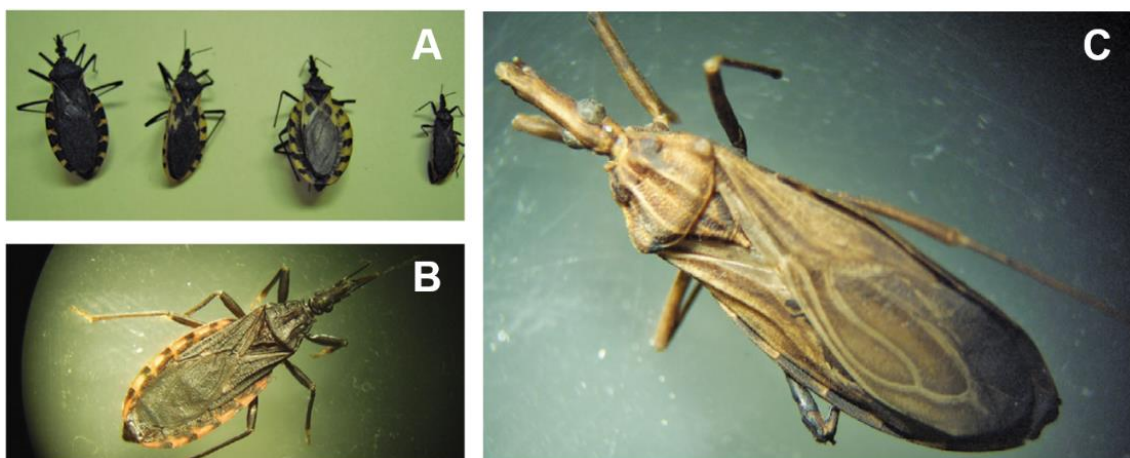


Figura 1: Insectos vectores de la enfermedad de Chagas. A) Cuatro especies de triatóminos; B) *Triatoma barberi*; C) *Rhodnius prolixus*. Adaptada de: [7].

Sin embargo, entre los años 1970 y 1980 comenzó un éxodo rural en Latinoamérica: muchas personas emigraron a regiones no endémicas de Chagas, llevando la enfermedad de forma asintomática y permitiendo su diseminación. Además de la vía vectorial, este parásito puede transmitirse a través de donaciones de sangre u órganos, de madre a hijo (en el parto o durante el embarazo), por accidentes de laboratorio o, incluso, por vía sexual.^{5, 8}

La magnitud de este problema sanitario se refleja en sus datos globales: existen entre 6 y 7 millones de personas infectadas, y alrededor de 70 millones están en riesgo de adquirir la enfermedad (muchas de ellas en riesgo de exclusión social).^{2, 3} Esta produce entre 30.000 - 40.000 nuevos casos anuales, y llega a cobrarse la vida de 10.000 personas cada año. Por tanto, no es de extrañar que la tripanosomiasis americana haya sido bautizada como la “enfermedad silenciosa y silenciada”.⁹

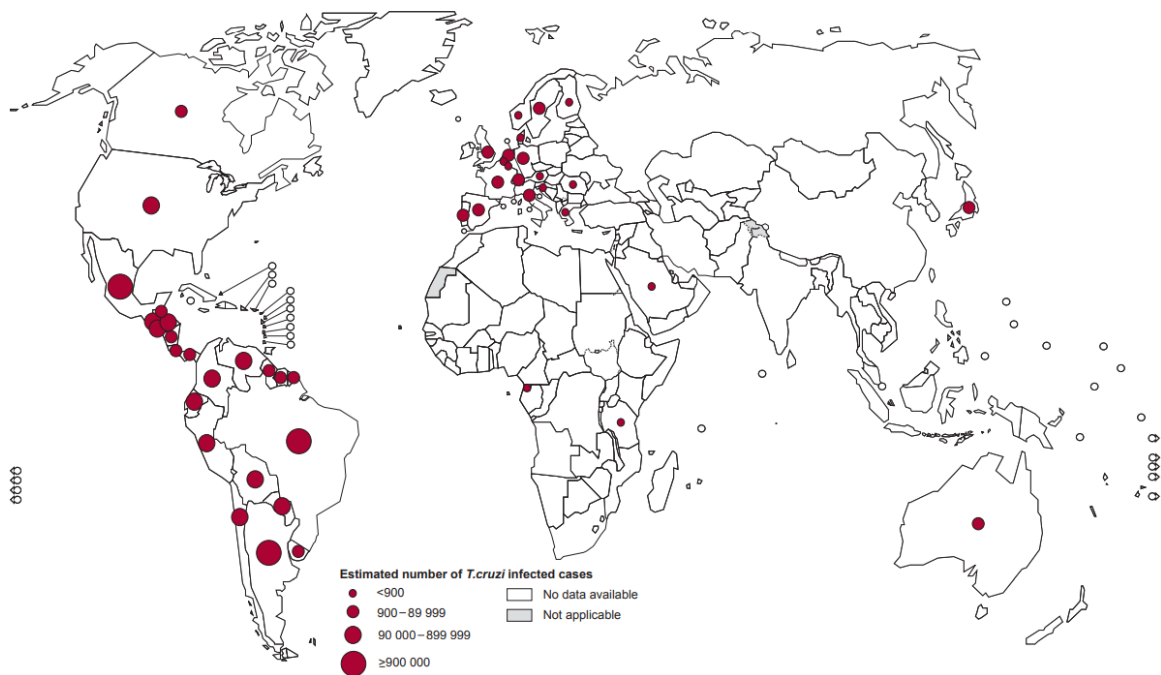


Figura 2: Distribución mundial de la enfermedad de Chagas. Tomada de: [10].

1.2. *Trypanosoma cruzi*: morfología y ciclo biológico

El agente etiológico de la enfermedad de Chagas es el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi*, un kinetoplástico de la familia *Trypanosomatidae* que utiliza a los triatóminos como vectores, y a humanos y otros mamíferos como hospedadores vertebrados.⁴ Este parásito puede adoptar distintas formas, diferenciadas por la posición del kinetoplasto y su morfología, denominadas como epimastigote, amastigote y tripomastigote.⁶

FORMA PARASITARIA	FORMA Y TAMAÑO	NÚCLEO Y KINETOPLASTO	FLAGELO
<i>Epimastigote</i>	20 – 25 µm, aspecto fusiforme	Núcleo central y kinetoplasto en posición anterior al mismo	Forma una pequeña membrana ondulante
<i>Amastigote</i>	2 – 2,5 µm, forma redondeada	Ambos en posición central	No visible
<i>Tripomastigote sanguíneo</i>	20 – 25 µm, forma alargada	Gran núcleo vesiculoso central y kinetoplasto posterior al núcleo, que suele ser de forma esférica	Forma una membrana ondulante a lo largo de todo el parásito, quedando libre en el extremo anterior
<i>Tripomastigote metacíclico</i>			

Tabla 1: Principales características morfológicas de *T. cruzi* [6].

De todas ellas, los tripomastigotes metacíclicos son los que infectan a mamíferos. Salen del tubo digestivo de los reducidos junto a sus heces, cuando estos se alimentan de la sangre humana con ayuda de su probóscide. De esta forma, los parásitos acceden a la pequeña herida que queda o a alguna mucosa. En este momento son internalizados por las células cercanas, escapan de las vacuolas parasitóforas y se diferencian en su forma amastigote, para dividirse por fisión binaria en el citoplasma celular.^{7, 11} Los nuevos parásitos vuelven a transformarse en tripomastigotes, rompen de forma mecánica su célula huésped y se liberan al exterior. Desde aquí, pueden acceder a nuevas células y repetir la multiplicación (presentando especial afinidad por macrófagos y células del bazo, hígado y músculo cardíaco), o ser ingeridos por el reducido cuando este se alimenta del hospedador vertebrado.^{7, 12}

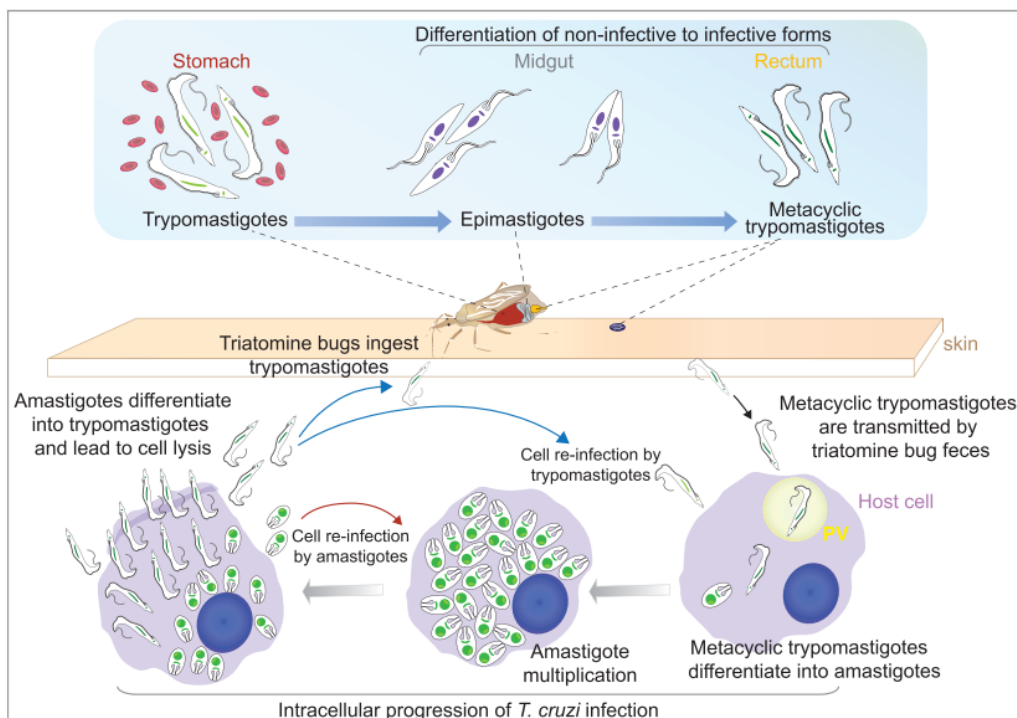


Figura 3: Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*. Tomada de: [13].

Dentro del aparato digestivo del invertebrado, los tripomastigotes sanguíneos avanzan a lo largo del mismo mientras experimentan cambios morfológicos y replicaciones por fisión binaria, pasando por la forma epimastigote y, posteriormente, por la de tripomastigotes metacíclicos, listos para infectar a un nuevo hospedador vertebrado.¹¹

1.3. Manifestaciones clínicas

Dado que *Trypanosoma cruzi* presenta un ciclo complejo en el hospedador vertebrado, el cuadro clínico resultante no es sencillo. La fase aguda suele ser asintomática y durar unas semanas o meses; cuando el paciente experimenta síntomas, suelen ser leves. La replicación del parásito en la zona de entrada da lugar al chagoma de inoculación, un eritema doloroso en la piel, o al signo de Romaña, un edema palpebral unilateral consecuencia del acceso del protozoo a través de la mucosa oftálmica. También puede darse linfadenopatía regional, fiebre irregular o exantemas cutáneos, y en los casos más graves, meningoencefalitis o miocarditis.^{4, 5, 6}

Posteriormente, se establece una fase subclínica o indeterminada, caracterizada por la ausencia de síntomas. Dura entre 15 y 20 años, y en este tiempo el desarrollo del parásito da lugar a daños neuronales y de la microvasculatura, activación o evasión de mecanismos inmunes, etc.^{7, 14} Todo ello desemboca en situaciones patológicas graves que se manifiestan en la fase crónica, como la cardiopatía chagásica (la más frecuente), megacolon y megaesófago. Raramente, se puede ver afectado el sistema nervioso central (SNC), originando neuritis o demencia.¹⁵



Figura 4: Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas. A) Signo de Romaña; B) Cardiopatía chagásica. Adaptada de: [16, 17].

1.4. Profilaxis y tratamiento

Actualmente, existen medidas de prevención que pueden ser muy eficaces, como el control de la transmisión vectorial (uso de insecticidas, erradicación del vector, evitar comida contaminada con vectores o sus heces), análisis de sangre y órganos donados, cribados a mujeres embarazadas, etc. Sin embargo, acabar con la transmisión desde individuos enfermos resulta problemático, pues son pocos los casos que se diagnostican.^{4, 14}

Por otra parte, los tratamientos farmacológicos actuales están muy lejos de ser ideales; son el benznidazol y nifurtimox, fármacos con actividad tripanocida cuyas principales limitaciones son la necesidad de tomarlos durante largos períodos y los efectos adversos que generan, lo que se traduce en una alta tasa de abandono del tratamiento. Además, resultan eficaces en la fase aguda de la enfermedad, pero en las fases indeterminada y crónica su uso llega a ser controvertido.^{4, 18} Otro problema es la variabilidad en la respuesta al tratamiento de las distintas cepas de *T. cruzi*, así como la aparición de resistencias.¹⁹

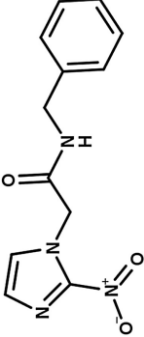
FÁRMACO	MECANISMO DE ACCIÓN	POSOLOGÍA	EFFECTOS ADVERSOS
<p>Benznidazol</p> 	<p>No es del todo conocido. El benznidazol es reducido por nitrorreductasas del parásito, originando compuestos que forman complejos moleculares con su ADN, ARN y proteínas. Inhibe la biosíntesis de estas moléculas y bloquea el sistema antioxidante, haciendo que <i>T. cruzi</i> sea susceptible a los radicales nitroderivados resultantes del metabolismo del fármaco.</p>	<p><i>Adultos:</i> de 5 a 7 mg/kg/día en 2 o 3 tomas.</p> <p><i>Niños de 1 a 10 años:</i> 10 mg/kg/día en 2 tomas.</p> <p>En ambos casos, se administra por vía oral durante 60 – 90 días.</p>	<p>Se dan hasta en un 40% de los pacientes.</p> <p>Los principales son: reacciones de hipersensibilidad, hepatitis, polineuropatía periférica, intolerancia digestiva, anorexia, astenia, cefalea, trastornos del sueño. Raramente, neuropatía y depresión de la médula ósea.</p> <p>Abandono del tratamiento en el 9 – 29 % de los casos.</p>

Tabla 2: Principales características de los fármacos tripanocidas *benznidazol* y *nifurtimox* [4, 18, 20, 21]. Imágenes tomadas de: [22].

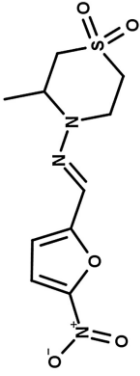
FÁRMACO	MECANISMO DE ACCIÓN	POSOLOGÍA	EFFECTOS ADVERSOS
<p>Nifurtimox</p> 	<p>Actúa fundamentalmente mediante la generación de radicales nitroderivados que llevan a la aparición de especies reactivas de oxígeno (O₂⁻, H₂O₂). Así, el nifurtimox induce un estado de estrés oxidativo en el protozoo.</p>	<p><i>Adultos:</i> de 8 a 10 mg/kg/día.</p> <p><i>Adolescentes:</i> de 12,5 a 15 mg/kg/día.</p> <p><i>Niños de 1 a 10 años:</i> de 10 a 20 mg/kg/día.</p> <p>En todos los casos se administra por vía oral, en 3 o 4 tomas diarias, durante 90 – 120 días.</p>	<p>Se dan hasta en un 61% de los pacientes.</p> <p>Los principales son: reacciones de hipersensibilidad, dolor abdominal, anorexia, náuseas, vómitos, pérdida de peso, polineuritis, depresión de la médula ósea.</p> <p>Abandono del tratamiento en el 14,5 – 75 % de los casos.</p>

Tabla 2 (continuación): Principales características de los fármacos tripanocidas *benznidazol* y *nifurtimox* [4, 18, 20, 21]. Imágenes tomadas de: [22].

Respecto a las manifestaciones clínicas de la fase crónica, se van a paliar con antiarrítmicos, relajantes musculares y laxantes. La cirugía puede resolver un caso de megacolon, pero es peligrosa cuando hay cardiopatía.²³

Con el fin de encontrar mejores alternativas terapéuticas, debe indagarse en la fisiopatología de la tripanosomiasis americana y las diferencias metabólicas entre huésped y parásito. Esto se debe acompañar de métodos experimentales adecuados e investigación en técnicas innovadoras.^{22, 24, 25}

1.5. Nuevas perspectivas: compuestos derivados de la *withaferina A*

Withania somnifera, también conocida como “ashwagandha” o “ginseng indio”, es un arbusto leñoso perteneciente a la familia *Solanaceae*. Se encuentra repartida por regiones tropicales y subtropicales (Islas Canarias, Sudáfrica, India, China, etc.), y ha sido utilizada con fines medicinales desde la antigüedad. Sus raíces poseen un gran número de utilidades clínicas.^{26, 27}

Uno de sus compuestos más interesantes es la *withaferina A*, una lactona esteroidea que ha demostrado tener un perfil farmacológico muy diverso.²⁸ A partir de esta, se han logrado obtener diferentes compuestos capaces de inducir apoptosis en líneas celulares de carcinoma de ovario, presentando además características farmacocinéticas y toxicológicas favorables.²⁹ Asimismo, estudios recientes señalan la actividad de otras withanolidas frente al género *Leishmania*, también mediante un proceso apoptótico.³⁰

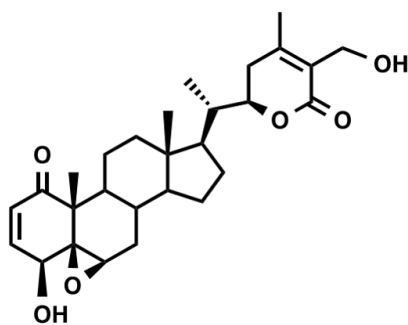


Figura 5: Estructura química de la withaferina A (WA). Adaptada de: [29].

Con todos estos datos, la withaferina A (WA) se alza como una posible alternativa al tratamiento actual de la enfermedad de Chagas. Por ello, en este Trabajo de Fin de Grado se analiza la actividad frente a *Trypanosoma cruzi* de diferentes derivados obtenidos a partir de la WA, y se estudian aspectos básicos de los mecanismos de muerte implicados.

2. Objetivos

- Valorar la actividad tripanocida *in vitro* de compuestos derivados de la withaferina A.
- Valorar la actividad citotóxica de dichos compuestos.
- Calcular el Índice de Selectividad (IS) de los químicos estudiados.
- Estudiar aspectos básicos del mecanismo de muerte de los parásitos.

3. Material y métodos

3.1. Material

3.1.1. Parásitos

Trypanosoma cruzi: cepa Y, aislada de un caso en fase aguda de la enfermedad procedente de Marília (São Paulo, Brasil). Los epimastigotes se cultivaron *in vitro* a 26°C, en condiciones de esterilidad, en medio *Liver Infusion Tryptose* (LIT), suplementado con un 10% de SBF1 (Suero Fetal Bovino Inactivado) y gentamicina.

3.1.2. Líneas celulares de macrófagos murinos

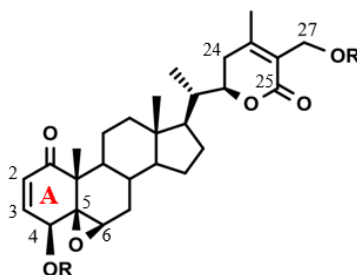
Macrófagos murinos J774A.1: cepa (ATCC # TIB-67) adquirida del American Type Culture Collection (ATCC, LG Promochem, Barcelona, España). Se cultivaron en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco Life Technologies) suplementado con un 10% de SBF1 y gentamicina. Deben mantenerse a 37°C y 5% CO₂.

3.1.3. Compuestos derivados de la WA

Se ensayaron 14 compuestos semisintéticos obtenidos a partir de la WA, añadiendo distintos radicales mediante enlaces tipo éster. Fueron sintetizados en el Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González (IUBO) por el grupo de investigación QUIMIOPLAN, dirigido por la Dra. Isabel López Bazzocchi.

3.1.4. Kits comerciales

- Alamar Blue® reagent (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).
- Cell Titer-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI, USA).
- JC-1 Mitochondrial Membrane, Potential Assay Kit (Cayman Chemical).
- CellRox Deep Red Oxidative Stress Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).
- Vybrant™ Apoptosis Assay Kit #5, Hoechst 33342/Propidium Iodide (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).
- SYTOX® Green (Molecular Probes, Eugene, OR, USA).



COMPUESTO	R (27)	R (4)	COMPUESTO	R (27)	R (4)
PILB ₂₅	Benzoato	H	PILB ₃₂	Butirato	Butirato
PILB ₂₆	p-Nitrobenzoato	H	PILB ₃₃	Bromoacetato	Bromoacetato
PILB ₂₇	Acetato	H	PILB ₃₄	H	Carbamoyl
PILB ₂₈	Acetato	Acetato	PILB ₃₅	Lauroato	H
PILB ₂₉	Propionato	H	PILB ₃₆	Derivado diepóxido*	
PILB ₃₀	Butirato	H	PILB ₃₇	Haloidrina**	
PILB ₃₁	H	Butirato	PILB ₃₈	Lauroato	Lauroato

Figura 6: Estructura química de los derivados de WA. (*): un epóxido se encuentra entre las posiciones 2 y 3, y el otro entre 24 y 25. (**): presenta un grupo OH en la posición 5 y un átomo de Cl en 6. Estos dos compuestos carecen de sustituyentes en 4 y 27. Se indica en rojo el anillo A de la estructura. Adaptada de: [29].

3.1.5. Equipamiento

Pipeta multicanal automática (Eppendorf)	Placas de microtitulación de 96 pocillos
Micropipetas de 1000, 200, 100 y 10 µL (Eppendorf Research)	Cabina de flujo laminar (TELSTAAR AV)
Estufa incubadora (Heraeus)	Centrífuga Beckman Coulter Allegra th 25R
Estufa CO ₂ (Thermo Electron Corporation)	Placas <i>deep-well</i>
Microscopio invertido Leica Dmi8 (Leica)	EVOS FL Cell Imaging System (Invitrogen, ThermoFisher)
Citómetro de imagen Tali® (Life technologies)	Rascadores
Lector de placas EnSpire (Perkin Elmer)	Software: SigmaPlot 12.0, Excel, GraphPad Prism 9.0

Tabla 3: Equipamiento empleado en los ensayos.

3.2. Métodos

3.2.1. Ensayos de actividad *in vitro*

Para estudiar el efecto de los derivados de withaferina sobre los epimastigotes de *T. cruzi*, se recurrió a un método colorimétrico basado en la reducción de la resazurina (Alamar Blue®). Este colorante actúa como indicador del metabolismo celular, aceptando electrones y pasando así de su forma oxidada (azul) a reducida (rosado). El cambio de color es proporcional a la cantidad de células vivas presentes en los pocillos.³¹

El ensayo se realizó en condiciones de esterilidad en una cabina de flujo laminar. Una vez comprobado que los parásitos están en buen estado, se prepara una suspensión de los mismos a una concentración de $2 \cdot 10^5$ células/mL, en un volumen suficiente.

La placa con 96 pocillos se rotula para identificar cada compuesto (uno por columna) y el control negativo. Se añade medio LIT en los pocillos de las placas, luego la disolución con el compuesto correspondiente y se realizan diluciones seriadas. Finalmente, cada pocillo contendrá un volumen de 200 μ L, con los compuestos y los parásitos en medio LIT.

Las placas se incuban durante 3 días a 26°C. Al día siguiente de comenzar la incubación, se añaden 20 μ L de alamar-Blue. Para finalizar, se utiliza un lector de placas para determinar la absorbancia (570 y 630 nm) y fluorescencia (572 nm excitación – 584 nm emisión) de cada pocillo. También se observaron al microscopio para comprobar el estado de los parásitos.

3.2.2. Ensayos de citotoxicidad

Este ensayo pretende establecer la actividad tóxica de los compuestos sobre células de mamífero, empleando para ello macrófagos murinos. Es bastante similar al ensayo de actividad antiparasitaria.

En el interior de la cabina de flujo laminar se pasaron los macrófagos del medio DMEM al medio RPMI sin rojo fenol, para evitar interferencias del color. Tras el recuento de las células se prepara una suspensión con una concentración de $2 \cdot 10^5$ células/mL, con la que se preparan placas en las que se evalúan diferentes concentraciones de los compuestos analizados.

El último paso es añadir alamar-Blue, para luego incubar en la estufa a 37°C con un 5% de CO₂. Transcurridas 24 horas, se lee la fluorescencia y absorbancia de la placa.

3.2.3. Cálculo de la CI₅₀, CC₅₀, IS y CI₉₀.

La Concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀) es la concentración de principio activo capaz de reducir a la mitad el crecimiento de los parásitos. Análogamente, la Concentración Citotóxica 50 (CC₅₀) se refiere a los macrófagos. De la relación entre estos surge el Índice de Selectividad (**IS = CC₅₀/CI₅₀**): cuanto mayor sea este parámetro, mejor perfil farmacoterapéutico tendrá el principio activo.

Para hallar la CI₅₀ y la CC₅₀ de cada derivado de la WA, se representan gráficamente los datos de fluorescencia obtenidos en los ensayos anteriores, frente a la concentración de principio activo de cada pocillo. Los puntos obtenidos son ajustados mediante software (SigmaPlot 12.0) a una ecuación de curva estándar de cuatro parámetros, de la que obtenemos la CI₅₀ y CC₅₀.

El siguiente paso es indagar en los mecanismos de muerte celular inducidos en *T. cruzi* por los compuestos que presentaron un IS aceptable; para ello es necesario estudiar una población de parásitos que esté en su mayor parte en proceso de muerte. Esto se consigue trabajando con la CI₉₀ de cada compuesto, que se puede calcular en la página web de GraphPad, gracias a su opción de cálculos rápidos “*Compute EC_{anything} from EC₅₀*”.[†]

3.2.4. Elucidación de los mecanismos de muerte

Para ello se incuban los parásitos durante 24 horas con la CI₉₀ de los compuestos en medio LIT, en un volumen final de 200 µL. Después, se llevan a cabo los ensayos correspondientes siguiendo el protocolo de los kits comerciales empleados (donde se especifica la concentración de reactivo y de células que se debe emplear, tiempos de incubación, etc.). Los resultados se interpretan con el lector de placas o el microscopio invertido de fluorescencia EVOS FL.

La elección de los ensayos a realizar se basó en varios estudios previos llevados a cabo en el Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias (IUETSPC). Los kits implicados han demostrado gran

[†] Recurso disponible en: <https://www.graphpad.com/quickcalcs/ECanything1/>

eficacia y utilidad, permitiendo obtener resultados consistentes, tanto en kinetoplástidos como en otros organismos, como amebas.^{32, 33, 34, 35, 36, 37}

PRUEBA	REACTIVO COMERCIAL	FUNDAMENTO TEÓRICO	CONSIDERACIONES ESPECIALES
<i>Niveles de ATP</i>	Cell Titer-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	La enzima luciferasa cataliza la reacción de oxidación de la luciferina a oxiluciferina, que emite fluorescencia. El ATP necesario para ello lo aportan las células metabólicamente activas, de forma que la luminiscencia es proporcional a estas.	Tras haber incubado los parásitos, se trasladan de la placa transparente a una opaca; por una parte, para evitar la fotodegradación del reactivo, y por otra, para que la fluorescencia de cada pocillo no interfiera en la lectura de los colindantes.
<i>Potencial de membrana mitocondrial</i>	JC-1 Mitochondrial Membrane, Potential Assay Kit	JC-1 es un colorante catiónico que se acumula en el interior cargado negativamente de las mitocondrias, emitiendo fluorescencia roja en su forma de "agregados-J" (590 nm). Cuando el potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) se reduce, el colorante emite fluorescencia verde en forma de monómeros (529 nm), localizándose fuera de la mitocondria.	
<i>Estrés oxidativo</i>	CellRox Deep Red Oxidative Stress Reagent	Cuando las células no son capaces de eliminar las especies reactivas de oxígeno (ROS) que se generan, sufren estrés oxidativo. El reactivo CellRox, incoloro en su estado reducido, es capaz de reaccionar con estas ROS y oxidarse, emitiendo fluorescencia roja (665 nm).	Debe trabajarse con un control positivo, que se consigue añadiendo H ₂ O ₂ media hora antes de leer los resultados, logrando así la formación de ROS.
<i>Condensación de cromatina y detección de células muertas</i>	Vybrant™ Apoptosis Assay Kit #5, Hoechst 33342/Propidium Iodide	El colorante Hoechst es capaz de unirse a la cromatina de los parásitos y emitir fluorescencia azul (461 nm), de modo que cuando se observa este color intensamente, sabremos que la cromatina está condensada (indicador de apoptosis). El yoduro de propidio (PI) solo es permeable a la membrana de las células muertas, de modo que se une al ADN de estas y emite fluorescencia roja (617 nm).	En la práctica, estos dos ensayos pueden llevarse a cabo de forma conjunta sin que haya interferencias. El PI debe añadirse en último lugar, debido a su posible toxicidad (es teratogénico y mutágeno).
<i>Alteración de la permeabilidad de la membrana</i>	SYTOX® Green	El fluoróforo SYTOX Green solo puede atravesar la membrana celular cuando esta presenta una permeabilidad alterada. En estos casos, accede al interior celular, se une al ADN y emite fluorescencia verde (523 nm).	

Tabla 4: Ensayos para estudiar los mecanismos de muerte celular [38, 39, 40, 41, 42].

4. Resultados y discusión

4.1. Actividad tripanocida y citotóxica. Alteraciones morfológicas.

Los compuestos estudiados fueron nombrados como "PILB", seguido de un número identificativo. En este TFG se ha trabajado desde PILB₂₅ hasta PILB₃₈.

Tras un primer ensayo, se hacen varias repeticiones de los ensayos correspondientes, para minimizar el error de los resultados. Estos quedan reflejados en la **Tabla 5**, y se comparan con los datos disponibles para el benznidazol, ya que es uno de los principios activos de referencia.

COMPUESTO	CI ₅₀ (µg/mL)	CC ₅₀ (µg/mL)	IS
PILB ₂₅	0,219 ± 0,050	1,027 ± 0,077	4,680
PILB ₂₆	0,177 ± 0,035	1,432 ± 0,052	8,101
PILB ₂₇	0,372 ± 0,038	0,419 ± 0,021	1,126
PILB ₂₈	0,103 ± 0,015	3,100 ± 0,154	30,040
PILB ₂₉	0,907 ± 0,078	2,756 ± 0,034	3,038
PILB ₃₀	0,450 ± 0,049	2,862 ± 0,010	6,364
PILB ₃₁	0,659 ± 0,041	2,536 ± 0,034	3,846
PILB ₃₂	1,089 ± 0,175	1,832 ± 0,259	1,682
PILB ₃₃	> 50	51,393 ± 0,921	-
PILB ₃₄	0,994 ± 0,030	3,027 ± 0,151	3,046
PILB ₃₅	10,637 ± 2,300	15,676 ± 1,841	1,474
PILB ₃₆	> 50	26,150 ± 1,229	-
PILB ₃₇	6,167 ± 0,301	19,940 ± 1,465	3,233
PILB ₃₈	> 50	> 200	-
Benznidazol	1,810	104,100	57,514

Tabla 5: Valores de CI₅₀, CC₅₀ e IS de las withanolidas estudiadas y del benznidazol.

Vemos que PILB₃₃, PILB₃₆ y PILB₃₈ presentaron una CI₅₀ muy alta, por lo que no se realizaron estudios posteriores con los mismos. Los demás compuestos presentaron una actividad reseñable, destacando el PILB₂₈, cuya actividad es 17,54 veces mayor que la del benznidazol.

Las placas también se observaron al microscopio para tener una idea del valor aproximado de las CI₅₀, basándonos en el aspecto de los parásitos en comparación con un control negativo. En esta práctica, los epimastigotes del control negativo presentaron una elevada movilidad ondulante y morfología alargada, tanto en rosetas como libres. Tras tratarlos con los derivados de WA

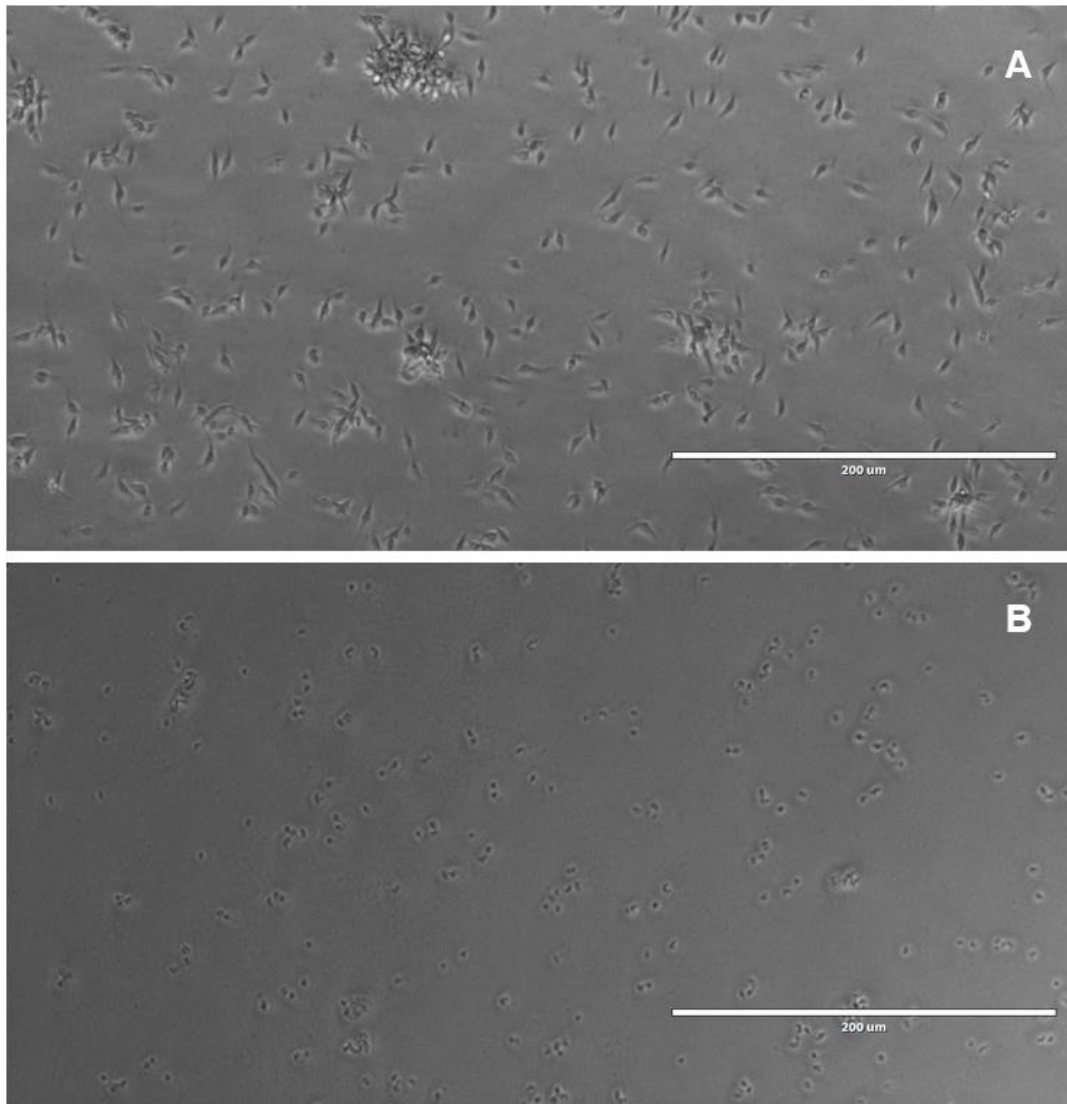


Figura 7: Epimastigotes de *T. cruzi* tras 72 horas de incubación (objetivo de 40X). A) Control negativo; B) Pocillo correspondiente al compuesto PILB₃₂ a una concentración de 5 µg/mL. Fotografías tomadas con el microscopio EVOS FL.

se presentan pequeños, redondeados y casi inmóviles, así como disminuyen en cuanto al número total y a las rosetas observadas (**Figura 7**). Se ha visto que algunos compuestos también producen un agrandamiento de las vacuolas, como PILB₂₆ (**Figura 8**).

Los ensayos de citotoxicidad muestran resultados variados: encontramos desde compuestos inocuos (PILB₃₈) hasta otros cuya toxicidad es muy superior a la del benznidazol, como el PILB₂₇. Además, parece haber correlación entre las propiedades tóxicas y terapéuticas, pues los valores más altos de CI₅₀ coinciden con los más altos de CC₅₀.

En general, la actividad antiparasitaria frente a *T. cruzi* de las withanolidas es buena, pero la elevada toxicidad que presentan es su principal limitación. Esto

se refleja en los valores de IS obtenidos, ya que en ningún caso se mejoran los datos obtenidos por el benznidazol.

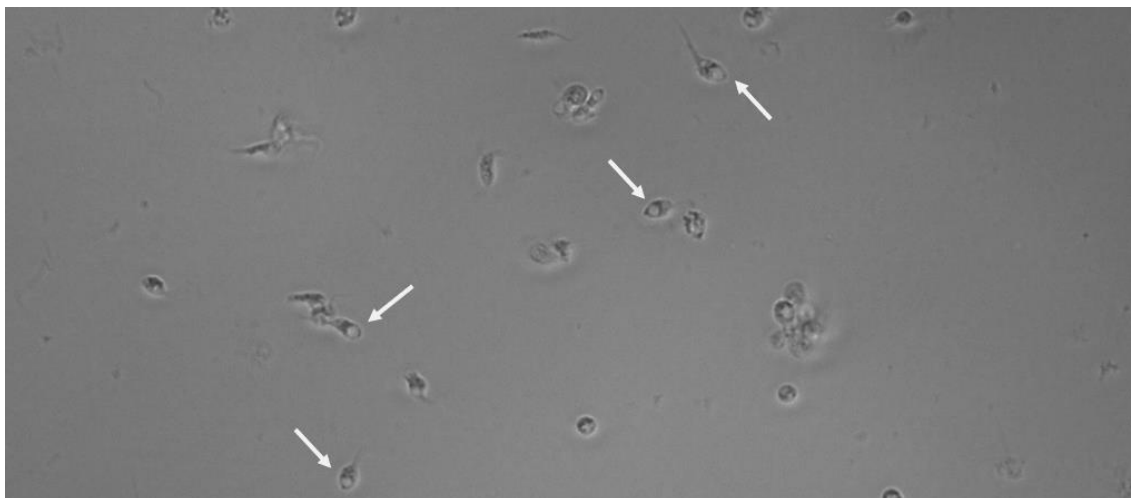


Figura 8: Epimastigotes de *T. cruzi* tras 72 horas de incubación (objetivo de 40X). Pocillo correspondiente al compuesto PILB₂₆ a una concentración de 0,625 µg/mL. Las flechas señalan las vacuolas aumentadas. Fotografías tomadas con el microscopio EVOS FL.

Resulta reseñable PILB₂₈, un compuesto que presenta un IS = 30,04, lo que lo hace un buen candidato para llevar a cabo el estudio de los procesos de muerte celular que desencadena en los parásitos. En menor medida, también resultaron interesantes PILB₂₆ y PILB₃₀, por lo que se incluyen en los estudios de dianas de acción en los parásitos.

4.2. Relaciones estructura – actividad

Las estructuras químicas de los derivados de WA son conocidas, y se pueden relacionar con los resultados observados. En primer lugar, la adición de cadenas alifáticas cortas (acetato, butirato, propionato), un benceno o carbamoil, ha logrado valores de CI₅₀ entre 0 y 1 µg/mL, pero también se relaciona con una alta citotoxicidad (CC₅₀ entre 0 y 3 µg/mL); lo vemos reflejado en los compuestos PILB₂₅ a PILB₃₂, y PILB₃₄.

Por el contrario, la presencia de cadenas alifáticas largas (lauroato, PILB₃₅ y PILB₃₈) o halogenadas (bromoacetato, PILB₃₃; haloidrina, PILB₃₇), así como de grupos epóxido (PILB₃₆), se relaciona con una baja actividad tripanocida y citotóxica. Sin embargo, Fumiko Abe *et. al* (2006) indican que es imprescindible un sistema *enona* en el anillo A para la actividad antiparasitaria⁴³, por lo que PILB₃₆ probablemente sea inactivo por la ausencia de dicha estructura, y no por la presencia de grupos epóxido.

En la búsqueda de fármacos activos es más conveniente realizar modificaciones químicas de la WA que incluyan radicales pequeños y no halogenados. Los compuestos con mejor IS cumplen con esta premisa: PILB₂₈ contiene dos grupos acetato, PILB₂₆ lleva un p-nitrobenzoato, y PILB₃₀, un butirato.

4.3. Mecanismos de muerte celular

○ Niveles de ATP

La primera técnica empleada nos permite determinar el nivel de ATP presente en los parásitos, observándose una disminución muy significativa en los que fueron incubados con los productos analizados. Esto significa que, efectivamente, se produce un importante descenso de los niveles celulares de ATP tras el tratamiento con las withaferinas.

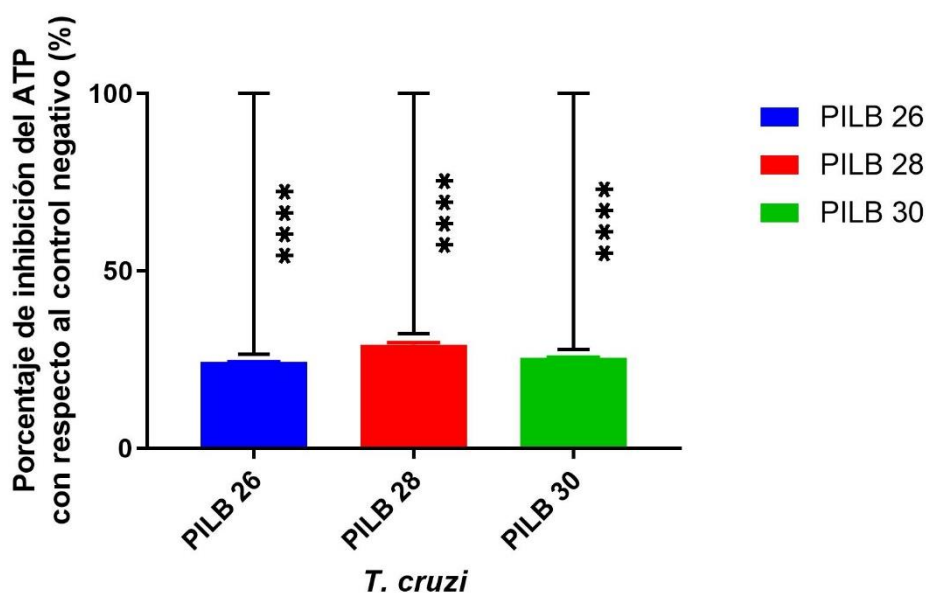


Figura 9: Representación gráfica del cambio en los niveles de ATP de los epimastigotes de *T. cruzi* tratados con withanolidas (CI₉₀) respecto al control negativo (100%). El número de asteriscos hace referencia a la significancia estadística de las diferencias observadas. Elaborada con GraphPad Prism 9.0.

○ Potencial de membrana mitocondrial

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) también se ve alterado. Esto se deduce de la ratio entre la fluorescencia roja y verde, que emiten los parásitos tras ser tratados con el reactivo JC-1, de forma que a menor ratio, menor $\Delta\Psi_m$. En los compuestos analizados se observa cómo el $\Delta\Psi_m$ se ve aumentado. Esto

representa una diferencia respecto a los resultados de otros estudios frente a los parásitos del género *Leishmania*, pues en ese caso el valor de $\Delta\Psi_m$ disminuye.²⁸

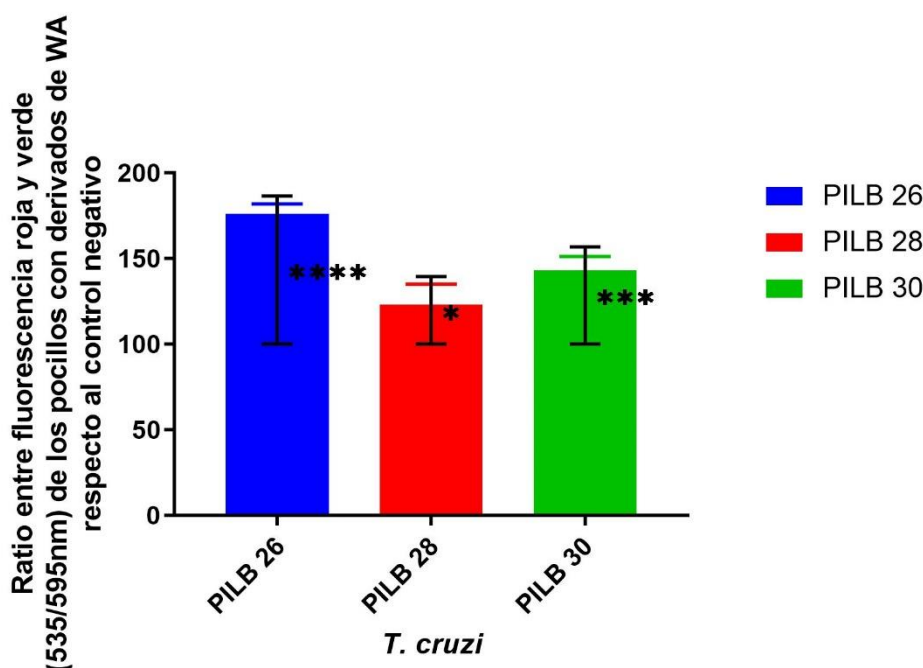


Figura 10: Representación gráfica del cambio en el $\Delta\Psi_m$ de los epimastigotes de *T. cruzi* tratados con withanolidas (CI₉₀) respecto al control negativo (100%). El número de asteriscos hace referencia a la significancia estadística de las diferencias observadas. Elaborada con GraphPad Prism 9.0.

- Estrés oxidativo, condensación de cromatina y permeabilidad de la membrana plasmática

Para interpretar los resultados de los ensayos restantes, recurrimos al microscopio EVOS FL, que permite observar la fluorescencia de los colorantes. Cuando se realizan las pruebas de estrés oxidativo, confirmamos que existen ROS en el interior de las células tratadas que han oxidado al colorante CellRox, haciendo que emita fluorescencia de color rojo intenso.

La última prueba engloba el uso de tres fluoróforos distintos. Por una parte, el colorante de Hoechst se une al ADN de los parásitos, permitiendo distinguir aquellos que presentan cromatina condensada y, por tanto, sufren apoptosis (fluorescencia azul intensa), de los que no (azul más tenue). Por otra, la fluorescencia roja (PI) y verde (SYTOX Green) indican la presencia de células muertas y alteración de la permeabilidad de las membranas, respectivamente. Combinando esta información, también podemos saber si los parásitos están en

fase temprana o tardía de apoptosis. En el primer caso solo se observan de color azul, en el segundo, también se observa la roja.

En los ensayos realizados, se observó que la gran mayoría de los parásitos estaba en fase de apoptosis temprana y sin alteraciones membranales. Aunque menos numerosos, también los había en fase tardía, los cuales sí presentaban alteraciones en la permeabilidad de la membrana.

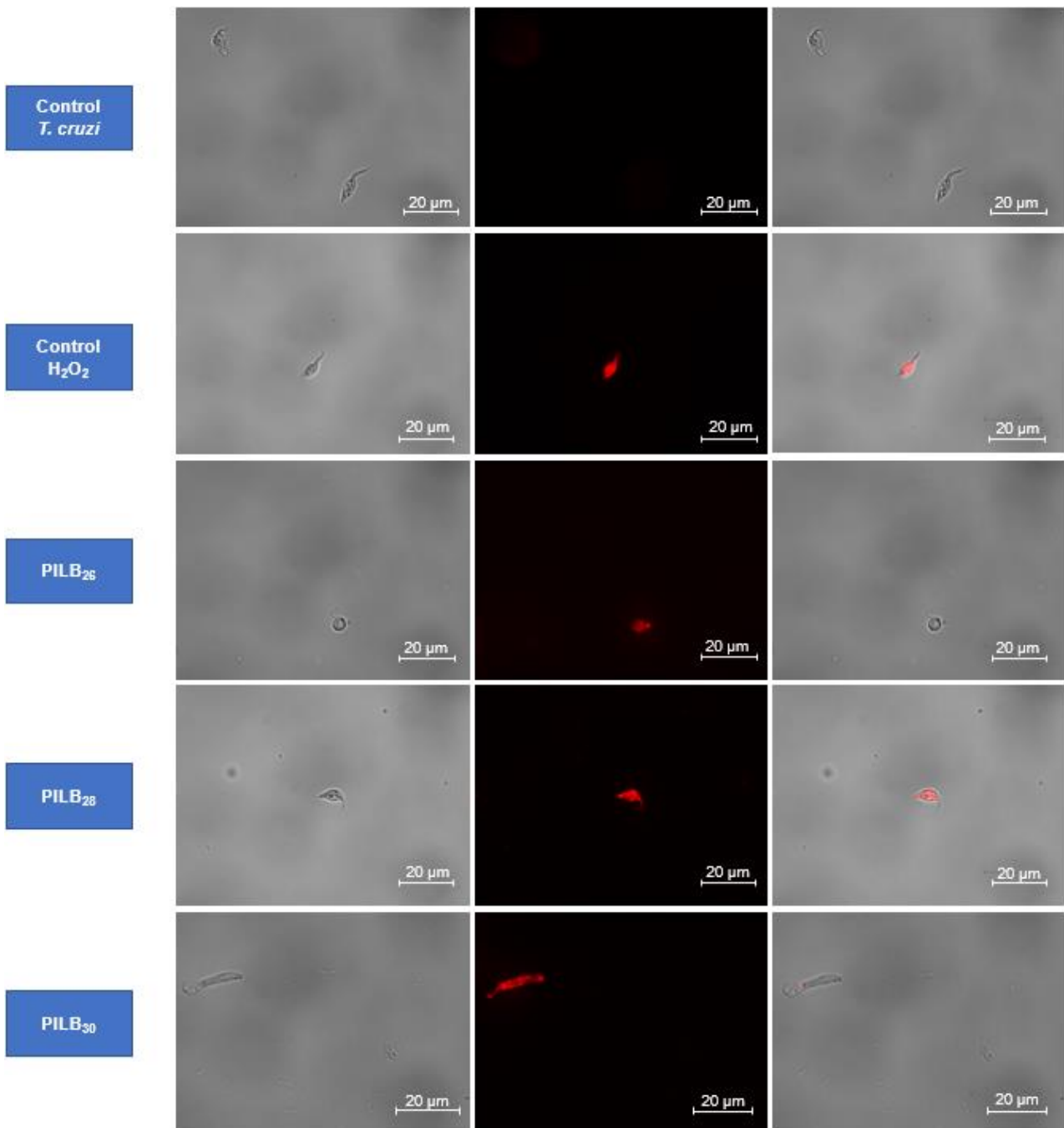


Figura 11: Resultados de la prueba de detección de ROS (objetivo de 100X). Se empleó el kit comercial CellRox. Primera columna: transmisión; segunda columna: fluorescencia roja; tercera columna: combinación de los dos anteriores. Fotografías tomadas con el microscopio EVOS FL.

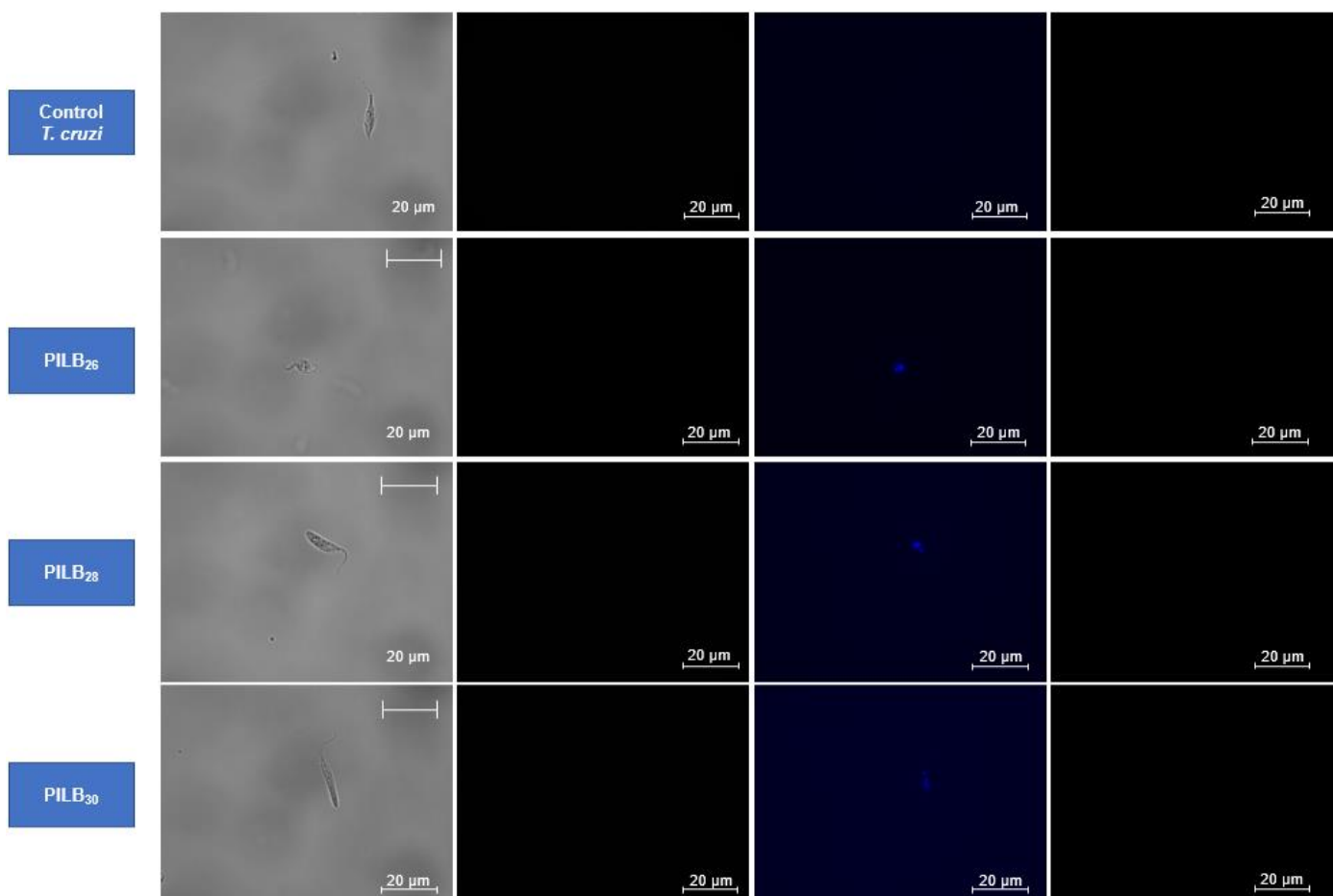


Figura 12: Resultados de la prueba de condensación de cromatina, células muertas y alteraciones en la permeabilidad de la membrana (objetivo de 100X). Se emplearon los kits comerciales Vybrant™ Apoptosis Assay Kit #5 (Hoechst 33342/Propidium Iodide) y SYTOX® Green. Primera columna: transmisión; segunda a cuarta columna: fluorescencias verde, azul y roja, respectivamente.

El mecanismo de muerte celular más probable que están sufriendo los epimastigotes es la muerte celular programada o apoptosis, caracterizada por alteraciones mitocondriales, como descenso en los niveles de ATP por los requerimientos energéticos del proceso, la formación de ROS, condensación de la cromatina, etc.⁴⁴ Este proceso de muerte programada es el que consideramos más interesante en la terapia antiparasitaria, para no generar una excesiva respuesta inflamatoria en el paciente en caso de ser aprobada para su uso en humanos.

4.4. Estudio comparativo y discusión final

Raiza B. Peres *et. al* (2021)⁴⁵ ya estudiaron el potencial tripanocida de numerosos compuestos presentes en plantas, llegando a la conclusión de que los más activos, obtenidos de las hojas de *Aureliana fasciculata*, eran withanolidas. Sin embargo, tuvieron una toxicidad muy alta frente a fibroblastos

murinos y células cardíacas. Otros autores destacan la actividad leishmanicida de estos extractos, incluso frente a formas intracelulares.⁴⁶

Estas lactonas también han sido estudiadas a partir de otras especies. Bravo B., José A. *et al* (2001) llegaron a la conclusión de que los compuestos de *Dunalia brachyacantha* son más activos frente a *Leishmania* que *Trypanosoma*.⁴⁷ Por su parte, Shinya Nagafuji *et al.* (2004) confirmaron que las withanolidas de *Physalis angulata* poseen mayor actividad tripanocida sobre formas tripomastigotes que epimastigotes.⁴⁸

Dentro de este grupo de compuestos, la WA es uno de los más activos, destacando su capacidad antineoplásica, relacionada con la inducción de apoptosis en células cancerígenas. Esto se ha demostrado en líneas celulares y modelos animales experimentales (para tratar glioblastomas, enfermedades dermatológicas, cáncer de mama, etc.).^{29, 49, 50} Este fenómeno también se ha observado en parásitos del género *Leishmania spp.*, evidenciándose con la formación de ROS o alteraciones mitocondriales.^{28, 30}

Los derivados ensayados en este TFG comparten varias características con las withanolidas previamente estudiadas: son inductores apoptóticos activos frente a kinetoplastidos, cuya fuente es de origen vegetal, y que pueden presentar citotoxicidades considerables. Sus respectivos valores de CI₅₀ frente a *T. cruzi* son muy inferiores a los de otros compuestos, incluido el benznidazol, y se han alcanzado IS bastante altos.

En definitiva, las withanolidas representan un amplio abanico de posibilidades terapéuticas contra la enfermedad de Chagas, resultado de una gran variedad de moléculas que parten de la misma estructura. Por tanto, es necesario seguir indagando en los mecanismos farmacológicos, citotóxicos y bioquímicos implicados, así como profundizar en las relaciones estructura actividad, para poder actualizar y mejorar las líneas de tratamiento actuales.

5. Conclusiones

- Los compuestos derivados de la WA han demostrado una potente actividad tripanocida, llegando a superar al benznidazol, fármaco de referencia para la tripanosomiasis americana.
- Los parásitos tratados sufren alteraciones morfológicas y estructurales relevantes en presencia de las withanolidas.
- Los compuestos más activos incluyen cadenas cortas y no halogenadas en las posiciones 4 y 27 de la WA.
- PILB₂₈ se posiciona como el compuesto con mejor IS, seguido de PILB₂₆ y PILB₃₀.
- Los resultados obtenidos evidencian que el mecanismo de muerte celular inducido por los compuestos analizados frente a *T. cruzi* es un proceso de tipo apoptótico.

Bibliografía

1. Organización Mundial de la Salud. Enfermedades tropicales desatendidas [Internet]. Who.int. 14 Nov 2021. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/neglected-tropical-diseases>
2. Organización Mundial de la Salud. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) [Internet]. Who.int. 01 Abr 2021. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
3. Roger M. Mills, MD. Chagas Disease. Epidemiology and Barriers to Treatment. *The American Journal of Medicine* [Internet]. 2020; Vol 133 (11): 1262 - 1265. DOI: 10.1016/j.amjmed.2020.05.022. Disponible en: <https://sci-hub.hkvisa.net/10.1016/j.amjmed.2020.05.022>
4. Pérez-Molina, José A; Molina, Israel. Chagas disease. *The Lancet* [Internet]. 2018; Vol 391 (10115): 82 – 94. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31612-4. Disponible en: [https://sci-hub.hkvisa.net/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://sci-hub.hkvisa.net/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)
5. Maria Carmo Pereira Nunes, Wistremundo Dones, Carlos A. Morillo, Juan Justiniano Encina, Antônio Luiz Ribeiro. Chagas Disease: An Overview of Clinical and Epidemiological Aspects. *Journal of the American College of Cardiology* [Internet]. 2013; Vol 62 (9): 767-776. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046> Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073510971302250X>
6. de Oliveira ABB, Alevi KCC, Imperador CHL, Madeira FF, Azeredo-Oliveira MTV. Parasite-Vector Interaction of Chagas Disease: A Mini-Review. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2018 Mar; Vol 98 (3): 653-655. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0657. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5930897/>
7. Zavala Castro J.E. Enfermedad de chagas y otras tripanosomiasis. Flores M (Ed.), *Parasitología médica*, 5e. McGraw Hill [Internet]. 2019, Disponible en:

- <https://accessmedicina-mhmedical-com.accedys2.bbt.ull.es/content.aspx?bookid=2754§ionid=231293886>
8. Clever Gomes, Adriana B. Almeida, Ana C. Rosa, Perla F. Araujo, Antonio R.L. Teixeira. American trypanosomiasis and Chagas disease: Sexual transmission. *International Journal of Infectious Diseases* [Internet] 2019; Vol 81: 81 - 84. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.01.021>. Disponible en: <https://www.ijidonline.com/action/showPdf?pii=S1201-9712%2819%2930032-3>
 9. Organización Mundial de la Salud. Día Mundial de la Enfermedad de Chagas [Internet]. Who.int. 14 Abr 2022. Disponible en: <https://www.who.int/es/campaigns/world-chagas-disease-day/world-chagas-disease-day-2022>
 10. Control of Neglected Tropical Diseases. Global distribution of cases of Chagas disease, based on official estimates, 2018 [Internet]. Who.int. Disponible en: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/ntds/chagas-disease/chagas-2018-cases.pdf?sfvrsn=f4e94b3b_2
 11. Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* [Internet]. 2001 May 1; Vol 31 (5-6):472 - 481. DOI: 10.1016/s0020-7519(01)00153-9. Disponible en: [https://sci-hub.hkvisa.net/10.1016/s0020-7519\(01\)00153-9](https://sci-hub.hkvisa.net/10.1016/s0020-7519(01)00153-9)
 12. Souza, Wanderley. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design* [Internet]. 2002; Vol 8 (4): 269–285. DOI:10.2174/1381612023396276. Disponible en: <https://sci-hub.hkvisa.net/10.2174/1381612023396276>
 13. Nilmar Silvio Moretti, Renato Arruda Mortara, Sergio Schenkman. *Trypanosoma cruzi*. *Trends in Parasitology* [Internet]. 2020; Vol 36 (4): 404 – 405. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.002>. Disponible en: <https://sci-hub.hkvisa.net/10.1016/j.pt.2019.10.002>
 14. Jeannette Guarner. Chagas disease as example of a reemerging parasite. *Seminars in Diagnostic Pathology* [Internet]. 2019; Vol 36 (3): 164 – 169. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.semmdp.2019.04.008>. Disponible en:

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740257019300401?via%3Dihub>
15. Echeverria, Luis E.; Morillo, Carlos A. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America* [Internet]. 2019; Vol 33 (1), 119–134. DOI: 10.1016/j.idc.2018.10.015. Disponible en: <https://sci-hub.hkvisa.net/10.1016/j.idc.2018.10.015>
 16. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Enfermedad de Chagas [Internet]. Cdc.gov. 18 Oct 2016. Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/enfermedad.html>
 17. Healy, Chris; Viles-Gonzalez, Juan F.; Sáenz, Luis C.; Soto, Mariana; Ramírez, Juan D.; d'Avila, Andre. Arrhythmias in Chagasic Cardiomyopathy. *Cardiac Electrophysiology Clinics* [Internet]. 2015; Vol 7 (2): 251–268. DOI: 10.1016/j.ccep.2015.03.016. Disponible en: <https://sci-hub.hkvisa.net/10.1016/j.ccep.2015.03.016>
 18. Laura Murcia, Bartolomé Carrilero, Daniel Saura, M. Asunción Iborra, Manuel Segovia. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. [Internet]. 2013; Vol 31(1): 26-34. ISSN: 0213-005X. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/parasitologia/ccs-2011-parasitologia.pdf>
 19. Mazzeti AL, Capelari-Oliveira P, Bahia MT, Mosqueira VCF. Review on Experimental Treatment Strategies Against *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Pharmacol* [Internet]. 2021 Mar 31; Vol 13: 409-432. DOI: 10.2147/JEP.S267378. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8020333/>
 20. Ivo S. Caldas, Elda G. Santos & Rômulo D. Novaes. An evaluation of benznidazole as a Chagas disease therapeutic. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* [Internet]. 2019; Vol 20 (15): 1797-1807. DOI: 10.1080/14656566.2019.1650915. Disponible en: <https://sci-hub.hkvisa.net/10.1080/14656566.2019.1650915>
 21. Juan Diego Maya, Bruce K. Cassels, Patricio Iturriaga-Vásquez, Jorge Ferreira, Mario Faúndez, Norbel Galanti, Arturo Ferreira, Antonio Morello. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry*

- and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* [Internet]. 2007; Vol 146 (4): 601 – 620. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.03.004>. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1095643306001735?via%3Dihub>
22. Jadel Müller Kratz. Drug discovery for chagas disease: A viewpoint. *Acta Tropica* [Internet]. 2019 Oct; Vol 198 (105107). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105107>. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X19305212?via%3Dihub>
23. Áurea Pereira, Mónica Pérez. Tripanosomosis. Enfermedad de Chagas y enfermedad del sueño. *Offarm* [Internet]. 2003 Feb; Vol 22 (2): 104 – 111. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-tripanosomosis-enfermedad-chagas-enfermedad-del-13043203>
24. Juan B. Rodriguez, Bruno N. Falcone & Sergio H. Szajmnan. Detection and treatment of Trypanosoma cruzi: a patent review (2011-2015). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* [Internet]. 2016; Vol 26 (9): 993 – 1015. DOI: <https://doi.org/10.1080/13543776.2016.1209487>. Disponible en: <https://sci-hub.hkvisa.net/10.1080/13543776.2016.1209487>
25. Alonso-Padilla J, Rodríguez A. High Throughput Screening for Anti-Trypanosoma cruzi Drug Discovery. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2014; Vol 8 (12): e3259. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003259>. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003259#s4>
26. Dar NJ, Hamid A, Ahmad M. Pharmacologic overview of Withania somnifera, the Indian Ginseng. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2015 Dec; Vol 72 (23): 4445-60. DOI: 10.1007/s00018-015-2012-1. Disponible en: <https://sci-hub.hkvisa.net/10.1007/s00018-015-2012-1>
27. Subhabrata Paul, Shreya Chakraborty, Uttpal Anand, Swarnali Dey, Samapika Nandy, Mimosa Ghorai, Suchismita Chatterjee Saha, Manoj Tukaram Patil, Ramesh Kandimalla, Jarosław Proćków, Abhijit Dey. Withania somnifera (L.) Dunal (Ashwagandha): A comprehensive review

- on ethnopharmacology, pharmacotherapeutics, biomedical and toxicological aspects. *Biomedicine & Pharmacotherapy* [Internet]. 2021; Vol 143 (112175). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112175>. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332221009598?via%3Dihub>
28. Sultana T, Okla MK, Ahmed M, Akhtar N, Al-Hashimi A, Abdelgawad H, Haq IU. Withaferin A: From Ancient Remedy to Potential Drug Candidate. *Molecules* [Internet]. 2021 Dec 20; Vol 26 (24): 7696. DOI: 10.3390/molecules26247696. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8705790/>
29. Nayra R. Perestelo, Gabriel G. Llanos, Carolina P. Reyes, Angel Amesty, Kartheek Sooda, Saeed Afshinjavid, Ignacio A. Jimenez, Farideh Javid, Isabel L. Bazzocchi. Expanding the Chemical Space of Withaferin A by Incorporating Silicon To Improve Its Clinical Potential on Human Ovarian Carcinoma Cells. *J. Med. Chem.* [Internet]. 2019; Vol 62: 4571 –4585. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b00146.
30. Atteneri López Arencibia, Desirée San Nicolás Hernández, Carlos J. Bethencourt Estrella, Ines Sifaoui, María Reyes-Batlle, Rubén L. Rodríguez Expósito, Aitor Rizo Liendo, Jacob Lorenzo Morales, Isabel L. Bazzocchi, José E. Piñero and Ignacio A. Jiménez. Withanolides from *Withania aristata* as Antikinetoplastid Agents through Induction of Programmed Cell Death. *Pathogens* [Internet]. 2019; Vol 8 (4): 172. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens8040172>. Disponible en: https://www.mdpi.com/2076-0817/8/4/172?type=check_update&version=2
31. Rolón, M., Vega, C., Escario, J.A. *et al.* Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res* [Internet]. 2006; Vol 99: 103–107. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0126-y>. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00436-006-0126-y>
32. Olfa Chiboub, Eulalia Capote-Yanes, Ines Sifaoui, María Reyes -Batlle, Rubén L. Rodríguez - Expósito, José E. Piñero, Jacob Lorenzo-Morales. In vitro validation of the amoebicidal activity of commercial eye drops as

- second activity. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* [Internet]. 2021; Vol 15: 144 – 151. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021.02.007>. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211320721000105?via%3Dihub>
- 33.** M. Reyes-Batlle, I. Rodríguez-Talavera, I. Sifaoui, R.L. Rodríguez-Expósito, P. Rocha-Cabrera, J.E. Piñero, J. Lorenzo-Morales. In vitro amoebicidal effects of arabinogalactan-based ophthalmic solution. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* [Internet]. 2021; Vol 16: 9 – 16. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2021.04.005>. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221132072100018X?via%3Dihub#>
- 34.** Atteneri López Arencibia, Inés Sifaoui, María Reyes Batlle, Carlos J. Bethencourt Estrella, Desirée San Nicolás Hernández, Jacob Lorenzo Morales, José E. Piñero. Discovery of New Chemical Tools against *Leishmania amazonensis* via the MMV Pathogen Box. *Pharmaceuticals* [Internet]. 2021; Vol 14 (12): 1219. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph14121219>. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1424-8247/14/12/1219/htm>
- 35.** Carlos J. Bethencourt-Estrella, Samuel Delgado-Hernández, Atteneri López-Arencibia, Desirée San Nicolás-Hernández, David Tejedor, Fernando García-Tellado, Jacob Lorenzo-Morales, José E. Piñero. In vitro activity and cell death mechanism induced by acrylonitrile derivatives against *Leishmania amazonensis*. *Bioorganic Chemistry* [Internet]. 2022; Vol 124 (105872). DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2022.105872>. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045206822002772?via%3Dihub>
- 36.** Carlos J. Bethencourt Estrella, Samuel Delgado Hernández, Atteneri López Arencibia, Desirée San Nicolás Hernández, Inés Sifaoui, David Tejedor, Fernando García Tellado, Jacob Lorenzo Morales, José E. Piñero. Acrylonitrile Derivatives against *Trypanosoma cruzi*: In Vitro Activity and Programmed Cell Death Study. *Pharmaceuticals* [Internet].

- 2021; Vol 14 (6): 552. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph14060552>.
Disponible en: <https://www.mdpi.com/1424-8247/14/6/552/htm>
37. Marvin J. Núñez, Morena L. Martínez, Atteneri López-Arencibia, Carlos J. Bethencourt-Estrella, Desirée San Nicolás-Hernández, Ignacio A. Jiménez, Jacob Lorenzo-Morales, José E. Piñero. In Vitro Susceptibility of Kinetoplastids to Celastrols from *Maytenus chiapensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [Internet]. 2021 May; Vol 65 (6). DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.02236-20>. Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.02236-20>
38. Promega. CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay Technical Bulletin [Internet]. promega.es. Disponible en: https://www.promega.es/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltiter_glo-luminescent-cell-viability-assay/?catNum=G7570#protocols
39. ThermoFisher Scientific. JC-1 Dye for Mitochondrial Membrane Potential [Internet]. thermofisher.com. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-analysis/cell-viability-and-regulation/apoptosis/mitochondria-function/jc-1-dye-mitochondrial-membrane-potential.html>
40. ThermoFisher Scientific. CellROX® Oxidative Stress Reagents [Internet]. thermofisher.com. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2Fmp10422.pdf>
41. ThermoFisher Scientific. Vybrant™ Apoptosis Assay Kits for apoptotic and necrotic cell staining [Internet]. thermofisher.com. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/V13244>
42. ThermoFisher Scientific. SYTOX Green stain [Internet]. thermofisher.com. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/cell-analysis/fluorophores/sytox-green-stain.html>
43. Fumiko Abe, Shinya Nagafuji, Masafumi Okawa, and Junei Kinjo. Trypanocidal Constituents in Plants 6. Minor Withanolides from the Aerial

- Parts of *Physalis angulata*. *Chem. Pharm. Bull.* [Internet]. 2006; Vol 54 (8): 1226 – 1228. Disponible en:
https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/54/8/54_8_1226/_pdf/-char/en
44. Jiménez-Ruiz, A., Alzate, J.F., MacLeod, E.T. *et al.* Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasites Vectors* [Internet]. 2010; Vol 3 (104). DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-104>. Disponible en:
<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-3-104>
45. Peres RB, Fiuza LFA, da Silva PB, Batista MM, Camillo FDC, Marques AM, de C Brito L, Figueiredo MR, Soeiro MNC. In Vitro Phenotypic Activity and In Silico Analysis of Natural Products from Brazilian Biodiversity on *Trypanosoma cruzi*. *Molecules* [Internet]. 2021 Sep 18; Vol 26 (18): 5676. DOI: 10.3390/molecules26185676. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8472459/>
46. Lima SCM, Pacheco JDS, Marques AM, Veltri ERP, Almeida-Lafetá RC, Figueiredo MR, Kaplan MAC, Torres-Santos EC. Leishmanicidal Activity of Withanolides from *Aureliana Fasciculata* var. *Fasciculata*. *Molecules* [Internet]. 2018 Nov 30; Vol 23 (12): 3160. DOI: 10.3390/molecules23123160. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6320798/>
47. Bravo B., José A.; Sauvain, Michel; Gimenez T., Alberto; Balanza, Elfride; Serani, Laurent; Laprévotte, Olivier; Massiot, Georges; Lavaud, Catherine. Trypanocidal Withanolides and Withanolide Glycosides from *Dunalia brachyacantha*. *Journal of Natural Products* [Internet]. 2001; Vol 64 (6): 720 - 725. DOI: 10.1021/np000527p. Disponible en:
<https://sci-hub.hkvisa.net/10.1021/np000527p>
48. Shinya Nagafuji, Hikaru Okabe, Hiroshige Akahane and Fumiko Abe. Trypanocidal Constituents in Plants 4. Withanolides from the Aerial Parts of *Physalis angulata*. *Biol. Pharm. Bull* [Internet]. 2004; Vol 27 (2): 193 – 197. Disponible en:
https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/27/2/27_2_193/_pdf/-char/en
49. Dhami, J., Chang, E. & Gambhir, S.S. Withaferin A and its potential role in glioblastoma (GBM). *J Neurooncol* [Internet]. 2017; Vol 131: 201 - 211.

DOI: <https://doi.org/10.1007/s11060-016-2303-x>. Disponible en:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s11060-016-2303-x>

- 50.** Bungau S, Vesa CM, Abid A, Behl T, Tit DM, Purza AL, Pasca B, Todan LM, Endres L. Withaferin A-A Promising Phytochemical Compound with Multiple Results in Dermatological Diseases. *Molecules* [Internet]. 2021 Apr 21; Vol 26 (9): 2407. DOI: 10.3390/molecules26092407. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8122412/>