

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



POTENCIAL INHIBITORIO DE COMPUESTOS OBTENIDOS DE ACTINOMICETOS
CONTRA ESTADIOS DE *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909)

POR

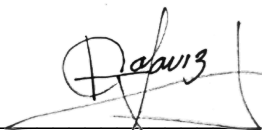
M.C. JORGE ANDRÉS DELGADO GARDUÑO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

2025

**POTENCIAL INHIBITORIO DE COMPUESTOS OBTENIDOS DE
ACTINOMICETOS CONTRA ESTADIOS DE *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909)**

COMITÉ DE TESIS



Dr. Lucio Galaviz Silva

Director de Tesis



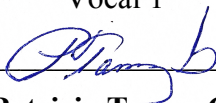
Dra. Itza Eloisa Luna Cruz

Secretario



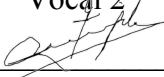
Dr. José Ángel Merino Mascorro

Vocal 1



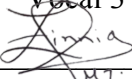
Dra. Patricia Tamez Guerra

Vocal 2



Dra. Ma Guadalupe Rojas Verde

Vocal 3



Dra. Zinnia Judith Molina Garza

Asesor externo



Dra. Katiushka Arévalo Nino

Subdirectora de Posgrado



**SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO**

**POTENCIAL INHIBITORIO DE COMPUESTOS OBTENIDOS DE
ACTINOMICETOS CONTRA ESTADIOS DE *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909)**

DIRECCIÓN DE TESIS



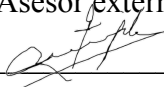
Dr. Lucio Galaviz Silva

Director de Tesis



Dr. Zinnia Judith Molina Garza

Asesor externo



Dra. Ma Guadalupe Rojas Verde

Codirector de Tesis

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

LUGAR DE TRABAJO

Este proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio de Patología Molecular y Experimental del Departamento de Parasitología y el Laboratorio 8 del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección de la Dra. Zinnia Judith Molina Garza.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por siempre respaldarme en todo y proveer de lo que necesité.

A la Dra. Zinnia Molina, por su dirección y apoyo no solo en esta tesis sino en mi vida personal; gracias por confiar en mí y siempre animarme a seguir adelante. Así como el Dr. Lucio Galaviz por permitirme continuar con este proyecto en el laboratorio.

A la Dra. Guadalupe Rojas, por su disposición y apoyo en este proyecto, gracias a usted esta tesis se logró culminar siendo una parte vital.

Al Dr. José Ignacio González, el Dr. Antonio Guzmán, el Dr. Arturo Espinoza y el M.C. Francisco Sánchez, por siempre estar conmigo, por sus consejos y brindarme su cariño durante todos estos años. Son parte importante de mi vida profesional y personal.

A la Dra. Patricia Tamez, al Dr. Carlos Ruiz, la M.C. Alejandra Nicolás, el M.C. Juan Arzave, el Dr. Ezequiel Viveros, el Dr. Juan Manuel Alcocer, la Dra. Itza Luna, la Q.B.P. Melanie Garza, el Dr. Joel Elizondo y el Dr. Ángel Merino, por colaborar en este proyecto, con su apoyo mi tesis logró completarse.

A mis papás, Jorge y Carmen, por amarme, estar conmigo y apoyarme en todo; gracias por mostrarme que siempre estarán para mí, los amo.

A mi hermana, Mely, por ser un elemento importante en mi crecimiento, escucharme y animarme en cada paso, te amo.

A mis abuelitas, Bertha y Loren, por echarme porras y amarme.

A mis padrinos Chuy y Hortencia, Chacha y mi tía Caty, por siempre estar para mí y darme el mejor consejo para mi vida; ustedes me dan una visión fresca.

A Karen Flores, por demostrarme lo valiosa que es tu amistad, tan amorosa y leal; gracias por estar conmigo y apoyarme incondicionalmente.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Ana Cristina González, Gabriel Cázares, Ana Karen Leal, Cynthia Rodríguez, Viviana Martínez, Nancy Rodríguez, Ángel Torres, con

quienes he compartido risas, llantos y experimentos en el laboratorio; gracias por su valiosa amistad y ser partícipes de esta aventura loca y desafiante.

A Carlos, Claudia y Enrique, por ser parte importante de mi vida; gracias por pagar sus impuestos para que CONAHCyT solventara mis gastos.

A Rafael Reyna y Judith Valdez, por estar al pendiente de mí y ser pacientes conmigo.

Al Lic. Gilberto Romo, por orientarme y mostrarme siempre una perspectiva diferente para salir adelante; te aprecio mucho.

A mis muchachos de servicio social a lo largo de este tiempo, Lily, María, Analucia, César, Sofy, Andy, Denisse, Kat, Isa, Wendy e Itzel, quiénes me los llevó en mi corazón por darme su apoyo y cariño.

A mis alumnos, por ser pacientes conmigo.

DEDICATORIA

A Dios y mis padres.

“Ninguna arma forjada contra ti prosperará”

Isaías 54:17

ÍNDICE

COMITÉ DE TESIS	¡Error! Marcador no definido.
DIRECCIÓN DE TESIS.....	¡Error! Marcador no definido.
LUGAR DE TRABAJO	II
AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIA.....	V
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	XII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	5
II.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
II.2 Vías de transmisión	8
II.2.1 Transmisión vectorial	8
II.2.2 Reservorios.....	8
II.2.3 Transfusiones.....	8
II.2.4 Vía congénita	9
II.2.5 Vía oral.....	9
II.3 Enfermedad de Chagas.....	10
II.3.1 Fase aguda.....	10
II.3.2 Fase crónica	10
II.4 Diagnóstico.....	11
II.5 Tratamiento y efectos secundarios.....	12
II.5.1 Benznidazol.....	12
II.5.2 Nifurtimox.....	13
II.5.3 Tratamientos alternativos.....	13
II.5.4 Búsqueda de tratamientos alternativos	14
II.6 Actinomicetos	14
II.6.1 Uso como agentes terapéuticos.....	15
II.6.2 Potencial tripanosomicida	15
III. JUSTIFICACIÓN.....	18

IV. HIPÓTESIS	19
V. OBJETIVO	20
V.1 OBJETIVO GENERAL	20
V.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	21
VI.1 Lugar de trabajo	21
VI.2 Cepas de actinomicetos	21
VI.3 Activación de actinomicetos	21
VI.4 Cultivo de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	21
VI.5 Ensayo de antagonismo de actinomicetos vs. <i>T. cruzi</i>	22
VI.6 Extracción de compuestos	22
VI.7 Evaluación de actividad antiparasitaria de los extractos de ST-C43 y S-C104 contra epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes de <i>T. cruzi</i>	23
VI.8 Viabilidad de los parásitos	23
VI.9 Evaluación de actividad tóxica de los extractos contra <i>Artemia salina</i>	24
VI.10 Evaluación de actividad hemolítica de los extractos contra eritrocitos humanos	25
VI.11 Obtención de tripomastigotes de <i>T. cruzi</i>	26
VI.12 Cultivo celular HUVEC	26
VI.13 Obtención de amastigotes de <i>T. cruzi</i>	26
VI.14 Evaluación citotóxica de los extractos	26
VI.15 Caracterización de los extractos	27
VI.16 Fraccionamiento de los extractos por cromatografía en columna	28
VI.17 Identificación de los compuestos químicos	29
VI.18 Análisis estadístico	29
VII. RESULTADOS	30
VII.1 Extracción de compuestos	30
VII.2 Ensayo de antagonismo de <i>T. cruzi</i> vs. actinomicetos	30
VII.3 Evaluación de actividad tripanosomicida, tóxica, citotóxica y hemolítica de los extractos contra <i>T. cruzi</i>	30
VII.4 Actividad tripanosomicida, tóxica, citotóxica y hemolítica de las fracciones	31
VII.5 Caracterización de los extractos	32
VII.6 Identificación de los compuestos químicos	32
VIII. DISCUSIÓN	34
IX. CONCLUSIÓN	38
X. PERSPECTIVAS	39

X. BIBLIOGRAFÍA.....	40
-----------------------------	-----------

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pág.
Tabla 1. Gradiente de solventes utilizados para los extractos de ST-C43 y S-C104.....	27
Tabla 2. Porcentajes de inhibición del ensayo de antagonismo de ST-C43 y S-C104 contra <i>T. cruzi</i>	29
Tabla 3. Evaluación de actividad tripanosomicida (epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes), tóxica, citotóxica y hemolítica, índice de selectividad de los extractos de ST-C43 y S-C104 (CL ₅₀ en µg/mL, límite inferior y límite superior).....	30
Tabla 4. Evaluación de actividad tripanosomicida (epimastigotes), tóxica y hemolítica de las fracciones de ST-C43 y S-C104 (µg/mL, límite inferior y límite superior).....	30
Tabla 5. Naturalezas obtenidas en los extractos mediante un perfil bioquímico.	31
Tabla 6. Compuestos identificados de ST-C43-EAM-F2 por LC-MS/MS.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
Figura 1. Formas evolutivas de <i>T. cruzi</i> . (a) Epimastigote, (b) amastigote, (c) tripomastigote (de Souza 1999).....	6
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> (CDC 2021).....	7
Figura 3. Estructura química de (a) K-252-C-aglicona estaurosporina y (b) anfomicina.....	32

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Por ciento
<	Menor que
±	Más-menos
-	Menos
°C	Grados Celsius
μL	Microlitros
μM	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CDC	Centers for Disease Control
DNA	Deoxyribonucleic acid
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
et al.	Y colaboradores
g	Gramos
FCB	Facultad de Ciencias Biológicas
GI	Infección gastrointestinal
h	Horas
H ⁺	Ion hidrógeno
IgG	Inmunoglobulina G
kg	Kilogramos
LIT	Medio infusión de hígado y triptona
MET	Microscopía electrónica de transmisión
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
N.A.	No aplica
ng	Nanogramos
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

pH	Potencial de iones hidrógeno
PI	Post-infección
pp.	Páginas
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
S-C104	<i>Streptomyces</i> spp. Chi-104
SD	Desviación estándar
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
ST-C43	<i>Streptomyces thermocarboxydus</i> Chi-43
TAE	Tris-Acetato-EDTA
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
Vol.	Volumen

RESUMEN

La enfermedad de Chagas, cuyo agente causal es *Trypanosoma cruzi*, representa un problema de salud pública, debido a que existen 8 millones de personas infectadas y la cifra va en aumento. El benznidazol y el nifurtimox son fármacos utilizados para la erradicación de esta enfermedad; sin embargo, los efectos secundarios pueden llegar a ser letales en los pacientes. Por otro lado, los actinomicetos son conocidos comúnmente como productores de compuestos con relevancia farmacológica e industrial. Muchos de estos compuestos han sido evaluados y reconocidos como antimicrobianos, pero pocos se han reportado como antiparasitarios. El objetivo del proyecto fue determinar el potencial de compuestos extracelulares de *Streptomyces thermocarboxydus* Chi-43 y *Streptomyces* sp. Chi 104 contra epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes de una cepa aislada en Nuevo León de *T. cruzi*. Los extractos extracelulares de los actinomicetos se obtuvieron mediante agitación en caldo ISP2 y la actividad antiparasitaria del sobrenadante se determinó mediante ensayos de difusión en microplacas de los cuales se determinó la CL₅₀ con un valor de 102-116 µg/mL. Finalmente se comprobó su actividad antiparasitaria con la técnica de MTT y microscopía óptica. Los resultados mostraron no ser tóxicos en el ensayo con *Artemia salina*, no citotóxicas en la línea celular Huvec y no hemolíticas con eritrocitos humanos. Las diferencias de los resultados del ensayo de inhibición se determinaron con un análisis de regresión dosis-respuesta ($p \leq 0.05$) mostrando una diferencia significativa. Los compuestos anfomicina y K252c aglicona estaurosporina fueron identificados como los metabolitos activos mediante LC-MS/MS. Los compuestos bioactivos presentes en los metabolitos extracelulares de *Streptomyces*, especialmente los de ST-C43 con CL₅₀ de 115-124 µg/mL, constituyen una fuente prometedora de nuevos agentes antiparasitarios.

ABSTRACT

Chagas disease, whose causal agent is *Trypanosoma cruzi*, represents a problem because there are 8 million people infected and the number is increasing. Benznidazole and nifurtimox are drugs used to eradicate this disease; However, the side effects can be lethal in patients. On the other hand, actinomycetes are commonly known as producers of compounds with pharmacological and industrial relevance. These microorganisms come from different habitats. Many of these compounds have been evaluated and recognized as antimicrobial, but few have been reported as antiparasitic. The objective of the project is to determine the potential of extracellular compounds of actinomycetes against epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes of a strain isolated in Nuevo León of *T. cruzi*. Extracellular extracts of actinomycetes were obtained by shaking in ISP2 broth, and the antiparasitic activity of the supernatant was determined by microplate diffusion assays, from which the LC₅₀ was determined with a value of 102-116 µg/mL. Finally, its activity was verified using the MTT technique and optical microscopy. In addition, they were non-toxic in the assay with *Artemia salina*, non-cytotoxic in the Huvec cell line, and non-hemolytic with human erythrocytes. The differences in the results of the inhibition assay were determined with a dose-response regression analysis ($p \leq 0.05$), showing a significant difference. The compounds amphomycin and K252c aglycone staurosporine were identified as the active metabolites by LC-MS/MS. The bioactive compounds present in the extracellular metabolites of *Streptomyces*, especially those of ST-C43 with LC₅₀ of 115-124 µg/mL, constitute a promising source of new antiparasitic agents.

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana tiene como agente etiológico al protozooario *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), con una incidencia en América Latina y Estados Unidos estimada de hasta 7 millones de personas infectadas actualmente (WHO 2025). Esta enfermedad está presente en México, América Central y América del Sur, de los cuales la mayoría de los individuos no sabe que están infectados con el parásito. Aunque se menciona que el impacto de esta enfermedad ocurre en zonas rurales, también se ha descrito su importancia en zonas urbanas debido al movimiento de poblaciones de tamaño considerable (CDC 2019). Para esta enfermedad hay un estimado de 200,000 casos nuevos por año (Pereira et al. 2009), y en México 1.1 millones casos (Rojo et al. 2018).

El hemoflagelado, *T. cruzi*, posee distintos tipos de transmisión: el principal es a través del contacto con heces contaminadas de triatominos hematófagos que ingieren tripomastigotes cuando se alimentan de la sangre de un mamífero, además por transfusiones de sangre contaminada, trasplantes de órganos infectados, vía congénita (de madre al feto), vía oral (consumo de alimentos contaminados) y por accidentes de laboratorios (Coura 2015).

Una vez que se adquiere la enfermedad, comúnmente se divide en dos fases, la aguda y la crónica. La fase aguda puede ser asintomática, presentar síntomas que son inespecíficos, o inclusive un cuadro clínico severo en el paciente (Toso et al. 2011). Después de esto, se procede con un periodo variable en el cual no se presentan síntomas. Finalmente se llega a la fase crónica, con duración indefinida, donde puede haber ausencia de síntomas o presentar algunos que son severos, como cardiopatías o malformaciones en algunos órganos como esófago, intestino y colon (Rassi et al. 2010).

Para el tratamiento de la enfermedad de Chagas se utilizan principalmente dos fármacos: benznidazol y nifurtimox, los cuales deben administrarse cuando el paciente se encuentra en la fase aguda (Rodríguez-Pérez 2013). La finalidad del tratamiento de esta enfermedad es prevenir el daño potencial a los órganos del paciente, así como reducir la posibilidad de que se transmita el parásito (Pinheiro et al. 2017). La tasa de recuperación cuando se utilizan estos fármacos es del 70% (McPhee et al. 2013). La desventaja de su uso es el posible desarrollo de reacciones adversas, tales como afectaciones cutáneas, neuropatías, náuseas, regurgitaciones y diarrea; además de su ineficacia en la fase crónica.

Por esta razón es de gran importancia buscar tratamientos alternos que sean eficaces y que no afecten al paciente.

Por otro lado, los actinomicetos han sido la fuente de diversos antibióticos hoy en día, ya que pueden producir una amplia gama de compuestos con actividad antimicrobiana (Genilloud 2017). Sin embargo, el potencial de estos compuestos no ha sido tan explotado en el área de parasitología como en bacteriología (Abdelmohsen et al. 2014a; Ruanpanum y Chamswarn 2016). En este proyecto se evaluó el potencial antiparasitario que poseen compuestos extracelulares de actinomicetos previamente caracterizadas de las cepas *Streptomyces thermocarboxydus* Chi-43 y *Streptomyces* sp. Chi 104 como posible biocontrol contra la cepa de *T. cruzi* aislada en Nuevo León y herramienta para el tratamiento terapéutico de la enfermedad de Chagas.

II. ANTECEDENTES

II.1 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es un protozooario hemoflagelado que pertenece al phylum Euglenozoa y a la clase Kinoplastea. Este parásito es el responsable de la tripanosomiasis americana, también llamada enfermedad de Chagas. El ciclo de vida natural del parásito incluye el contacto con dos tipos de hospederos, uno vertebrado y el otro invertebrado (transmisor). El hospedero invertebrado es un insecto hemíptero hematófago del género *Triatoma* mientras que hospedero vertebrado abarca una variedad de mamíferos en el que el ser humano está incluido. Dentro de este último, *T. cruzi* circula en el torrente sanguíneo y tiene la capacidad de invadir el tejido muscular o cardíaco intracelularmente cuando forma estadios enquistados (Coura 2003).

Este parásito mide 12—30 μm y se manifiesta en tres estadios evolutivos: epimastigote (fase replicativa dentro del vector), tripomastigote (fase infectiva para el humano) y amastigote (fase infectiva en el interior del tejido). El epimastigote es piriforme y posee un kinetoplasto ligeramente elongado localizado en la región anterior al núcleo cercana a la base del flagelo; esta etapa se encuentra en el sistema digestivo medio de *Triatoma* y a su vez se puede mantener viable en medios de cultivo de laboratorio convencionales (Kohl y Bastin 2005).

El tripomastigote es piriforme y delgado, sin embargo, difiere del epimastigote por la curvatura que presenta cuando se encuentra en el torrente sanguíneo del humano, además de poseer un kinetoplasto terminal o subterminal prominente, un núcleo ubicado en el centro del parásito, así como una membrana ondulante que recubre la mayor parte del estadio, lo que permite la motilidad, y un flagelo que recorre la membrana y emerge en el extremo anterior lo que permite su movimiento entre las células sanguíneas. El tripomastigote se subclasifica en metacíclico (forma infectiva del parásito para los mamíferos, la cual está presente en las heces de *Triatoma* y el espacio intercelular de hospederos vertebrados, así como en las glándulas anales de mamíferos como *Didelphis*) y en sanguíneo (presente en el sistema circulatorio del humano y en líneas celulares infectadas *in vitro*) (CDC 2019).

Por su parte, el amastigote es circular y pequeño, con un kinetoplasto en forma de bastón cerca del núcleo. Este estadio se diferencia de los anteriormente mencionados por

poseer en el interior de la célula un flagelo acortado. Esta fase evolutiva puede alojarse dentro de las células de diferentes órganos de los hospederos mamíferos infectados y también puede observarse en cultivo celular cuando a partir de tripomastigotes. Los amastigotes pueden formar nidos cuando realizan la fisión binaria (Figura 1) (Díaz y González 2014).

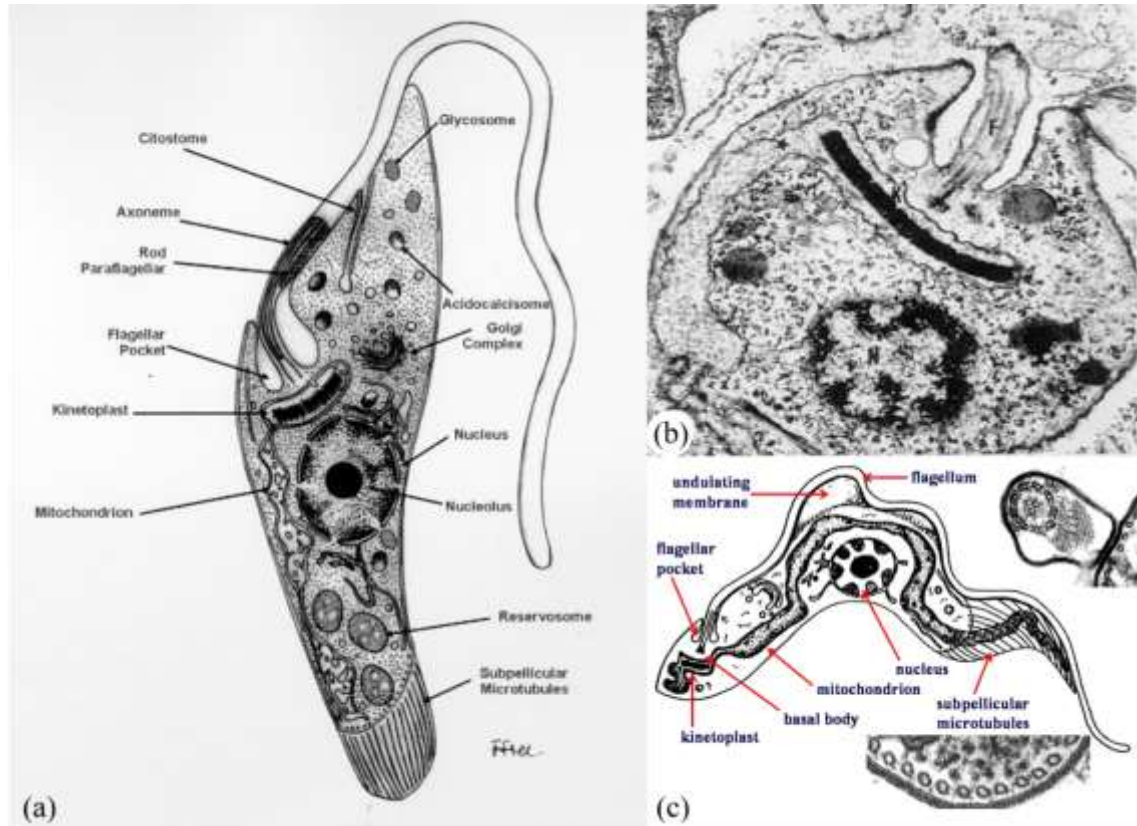


Figura 1. Formas evolutivas de *T. cruzi*. (a) Epimastigote, (b) amastigote, (c) tripomastigote (de Souza 1999).

El ciclo biológico de *T. cruzi* comienza cuando un triatomino infectado se alimenta de la sangre del humano mediante picadura en el rostro en la que simultáneamente expulsa tripomastigotes metacíclicos por deyecciones de heces, las cuales son depositadas cerca del sitio donde ocurrió la mordedura en la piel de la persona. Los tripomastigotes metacíclicos ingresan al humano a través de la herida provocada por el vector o mediante membranas mucosas cuando comienza a utilizar enzimas tipo penetrinas que permiten el paso cuando el hospedero se rasca o a través de lesiones en la piel presentes previo al contacto con el vector. Los tripomastigotes metacíclicos ingresan al torrente sanguíneo del humano e invaden células de órganos como el corazón o del sistema digestivo para transformarse en amastigotes intracelulares. Estos amastigotes realizan la fisión binaria hasta formar nidos presentes en

secciones del tejido del humano. Cuando la carga parasitaria es elevada, las células hospederas se revientan y liberan los amastigotes que se diferencian en tripomastigotes sanguíneos, los cuales pueden reincidir en la infección a tejido de órganos del humano, donde vuelven a convertirse en amastigotes intracelulares. Este proceso provoca que se repita el ciclo en nuevas secciones de los órganos y está asociado con diversas manifestaciones clínicas. Los tripomastigotes sanguíneos no pueden replicarse a diferencia de los metacíclicos. Un vector nuevo se infecta al alimentarse de sangre contaminada de un humano infectado con tripomastigotes sanguíneos, los cuales ingresan al intestino medio del insecto y se transforman en epimastigotes. Estos estadios realizan la fisión binaria para aumentar la carga parasitaria. Finalmente, los epimastigotes se transforman en tripomastigotes metacíclicos infecciosos en el intestino posterior del vector para reiniciar el ciclo (Figura 2) (CDC 2017).

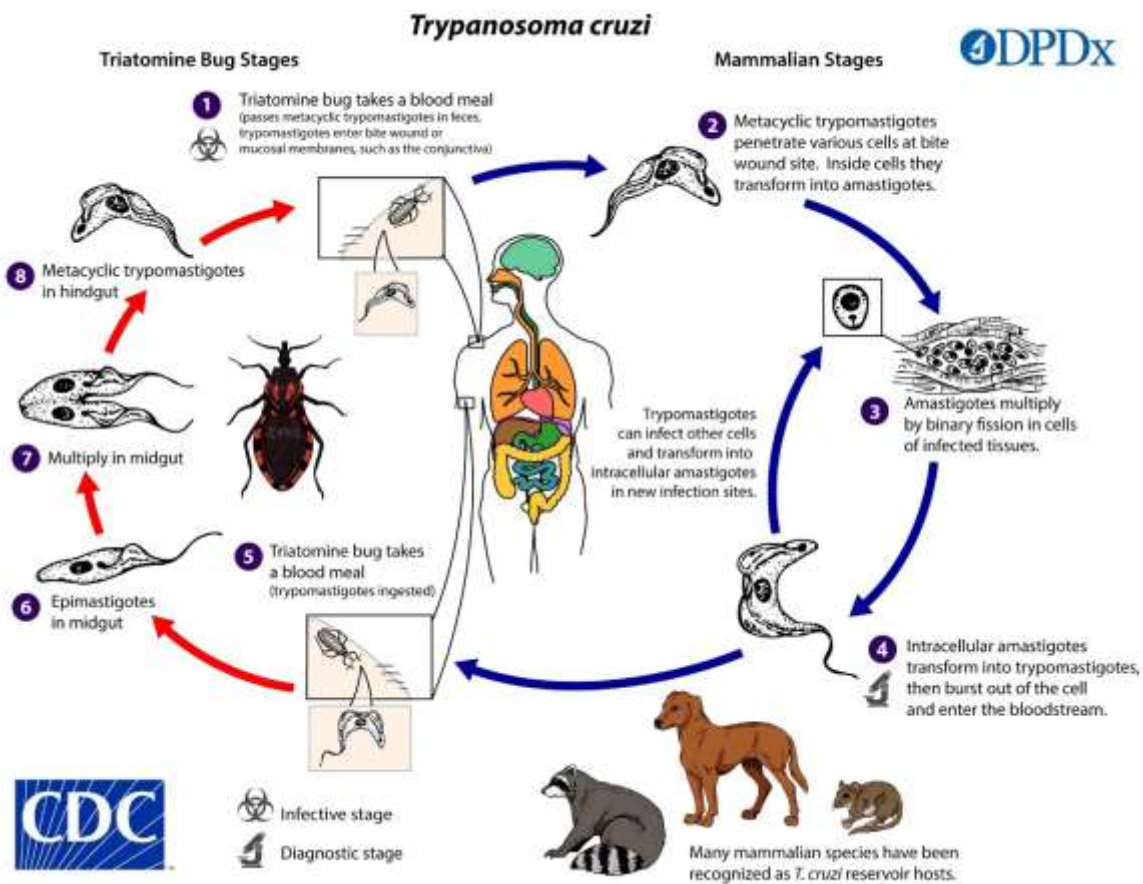


Figura 2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* (CDC 2021).

II.2 Vías de transmisión

II.2.1 Transmisión vectorial

La principal vía de transmisión de *T. cruzi* al humano es mediante el contacto con los vectores triatominos. Existen 141 especies de triatominos transmisores en todo el mundo de las cuales 125 se encuentran solamente en América (Bargues et al. 2010). En México, la especie transmisora del parásito fue *Rhodnius prolixus*, sin embargo, hoy en día se encuentra clasificada como eliminada como un riesgo para transmitir la enfermedad de Chagas (Rojo et al. 2018). No obstante, ocho géneros y 31 especies de triatominos se han reportado como potenciales transmisores de *T. cruzi* en el país, entre las cuales destacan *Dipetalogaster maxima*, *Triatoma* sp., *T. barberi*, *T. dimidiata*, *T. gerstaeckeri*, *T. lecticularia*, *T. longipennis*, *T. mazzotti*, *T. mexicana*, *T. pallidipennis*, *T. phyllosoma*, *T. picturata*, *T. recurva* y *T. rubida* (Secretaría de Salud 2015). En el estado de Nuevo León se han detectado dos especies de chinches, *T. gerstaeckeri* y *T. lecticularia*, de las que se ha logrado aislar el parásito en diferentes regiones de la zona metropolitana (Martínez et al. 2007).

II.2.2 Reservorios

Existen diferentes reservorios que pueden contener a *T. cruzi* sin causar la enfermedad de Chagas, entre los cuales, los principales son animales silvestres como armadillos, marsupiales de la familia Didelphidae, roedores, patos, hurones, murciélagos y primates. En cuanto a los animales domésticos se han reportado perros, gatos y ratas como portadores del protozoario (Filigheddu et al. 2017). En el estado de Nuevo León, existen reportes de zorrillos, zarigüeyas, tlacuaches (*Didelphis marsupialis*), perros y ratas de campo (*Neotoma micropus*) como reservorios del parásito (Galaviz-Silva et al. 2017).

II.2.3 Transfusiones

Las transfusiones sanguíneas representan la vía de transmisión de *T. cruzi* más común después de los vectores debido a la diseminación de la enfermedad de Chagas a sitios donde la prevalencia es baja o nula. Este mecanismo ocurre debido a la migración de personas provenientes de zonas endémicas como América latina hacia países como Estados Unidos, Japón y aquellos pertenecientes a Europa y Oceanía (Gascón et al. 2010). En el caso de

Europa, se ha descrito que existen inmigrantes latinoamericanos que habitan en países de este continente y que representan un riesgo de transmisión cuando donan sangre. En Estados Unidos, este tipo de transmisión es de suma importancia debido a que uno de cada cinco donadores de sangre se reportó como positivo para la enfermedad de Chagas entre 1980—1990, además de que entre 2006—2011 se reportaron +1,400 casos de donantes diagnosticados como seropositivos para *T. cruzi* (Bern et al. 2011).

II.2.4 Vía congénita

La transmisión congénita de la enfermedad de Chagas ocurre cuando una madre infectada con *T. cruzi* transfiere al parásito al feto, lo cual ha sido reportado en regiones del mundo en las cuales los casos por vectores y transfusiones han logrado decrecer. Anualmente se reportan más de 15,000 casos de la enfermedad congénita en países como Brasil, Argentina, Bolivia y Colombia, en el cual ocurre la menor incidencia (Carlier 2011).

II.2.5 Vía oral

La transmisión oral de *T. cruzi* sucede cuando un alimento como frutas, verduras, jugos y producto cárnicos han sido contaminados con diferentes estadios del parásito y son consumidos por un humano. Esto ocurre cuando un triatomino deposita heces con tripomastigotes metacíclicos en la superficie de las frutas. Estas formas pueden llegar a sobrevivir algunas horas o hasta días en el alimento, tiempo en el cual pueden ser consumidos por personas que han invadido el hábitat natural del vector. También puede darse cuando el vector es consumido por completo en ese tipo de alimentos (de Noya et al. 2015).

Otros mecanismos de transmisión oral incluyen el consumo de carne mal cocida de reservorios previamente mencionados y que están infectados con amastigotes presentes en tejido de diferentes órganos, alimentos rociados con orina o secreciones de glándulas odoríferas de animales portadores y la ingesta de sangre contaminada con tripomastigotes de animales en rituales religiosos o prácticas de medicina popular en zonas rurales y selváticas (Thomas et al. 2007).

II.3 Enfermedad de Chagas

II.3.1 Fase aguda

La enfermedad de Chagas comienza cuando la persona presenta síntomas post-infección y se clasifica en fase aguda y crónica. En la fase aguda los síntomas son leves e inespecíficos ya que abarcan fiebre, mialgia, diarrea e inclusive cefalea. Sin embargo, pueden presentarse malestares específicos y que son más agresivos como hepatoesplenomegalia, linfocitos atípica y miocarditis. El signo clínico más representante en un paciente de la enfermedad es el signo de Romana, el cual es un nódulo ubicado en el rostro de la persona, cercano al ojo, que puede ser indoloro en algunos casos. Esto es debido a que el triatomino usualmente se alimenta de la sangre de los humanos en el rostro por la búsqueda de la mayor concentración de agua y el grosor de la piel. La mayoría de los casos agudos de la enfermedad pasan desapercibidos ya que solamente menos del 1% de las personas manifiestan malestares graves o letales, lo que conlleva a un diagnóstico que se desvía por la sintomatología general de los pacientes, lo cual promueve al desarrollo a la fase crónica (Bern et al. 2011; de Noya et al. 2016). Aunado a esto, si el paciente sobrevive a la fase aguda de la enfermedad, su sistema inmune comienza a regular la replicación del parásito, lo que resulta en la reducción de la sintomatología y la parasitemia en un periodo de uno a dos meses (Rassi y de Rezende 2012).

II.3.2 Fase crónica

Posterior a la fase aguda, los pacientes ingresan a la fase crónica de la enfermedad con un período en el que permanecen asintomáticos indefinidamente, sin embargo, el parásito se encuentra viable y ha logrado invadir otros sitios en el humano como tejido de diferentes órganos. El periodo de la fase crónica asintomática termina cuando el paciente desarrolla miocardiopatías, las cuales pueden extenderse hasta años o décadas (Bern 2015). Los signos iniciales de la miocardiopatía incluyen alteraciones en el sistema de conducción, como bloqueo de rama derecha o del fascículo anterior izquierdo, y contracciones ventriculares prematuras que pueden pasar inadvertidas sin monitoreo electrocardiográfico. La enfermedad progresa de forma arritmogénica, con bradicardia sinusal y auriculoventricular, fibrilación o aleteo auricular, bloqueos y taquicardia ventricular (Rassi et al. 2010). Con el tiempo, puede

desarrollarse miocardiopatía dilatada e insuficiencia cardíaca congestiva, acompañada de aneurismas del ventrículo izquierdo. Estos aumentan el riesgo de eventos tromboembólicos y accidentes cerebrovasculares. Incluso sin manifestaciones clínicas, pueden existir alteraciones ecocardiográficas o autonómicas de valor pronóstico incierto. En Brasil, la tasa anual de progresión a miocardiopatía en infectados es del 1.85 % (Sabino et al. 2013).

La segunda afectación más común de la fase crónica de la enfermedad de Chagas es la afectación al sistema gastrointestinal, especialmente el esófago y el colon, debido al daño en las neuronas intramurales (Pinazo et al. 2010). El daño a diferentes secciones del tejido del colon incluye desde alteraciones leves de motilidad y acalasia hasta una inflamación excesiva llamada megaesófago severo, con disfagia, odinofagia, reflujo gastroesofágico, caquexia, tos y regurgitación. El megacolon provoca estreñimiento crónico y, en casos graves, fecaloma, vólvulo o isquemia intestinal (Rueda et al. 2014). Esta forma digestiva es menos común que la miocardiopatía y predomina en algunos países de América del sur como Argentina, Bolivia, Chile, Paraguay, Uruguay, parte de Brasil y casi nula en México y América Central. El daño gastrointestinal está asociado a la variabilidad genotípica de *T. cruzi*, aunque estudios específicos no han confirmado variaciones claras entre cepas que causan o no manifestaciones gastrointestinales (Del Puerto et al. 2010).

II.4 Diagnóstico

El protocolo para diagnosticar la enfermedad de Chagas abarca desde analizar el historial clínico de la persona hasta pruebas confirmatorias que detectan material genómico del parásito. Para comenzar con el diagnóstico es necesario evaluar el historial epidemiológico de la persona, lo que incluye visitas a zonas endémicas de la enfermedad o de la presencia del vector y el consumo de alimentos mal cocidos. Posteriormente se realiza un proceso de descarte de enfermedades con sintomatología similar de origen parasitario (leishmaniosis, malaria o toxoplasmosis), viral (hepatitis, hantaviriosis, arboviriosis, fiebre amarilla o mononucleosis) o bacteriano (fiebre tifoidea, leptospirosis o rickettsiosis). Una vez que se descartó mediante la parte clínica, se procede con métodos microscópicos que pertenecen a la parasitología clásica como la tinción de Wright o Giemsa en un frotis sanguíneo con el fin de observar tripomastigotes o pruebas de rápidas inmunológicas que detectan anticuerpos contra *T. cruzi*. Entre los métodos serológicos utilizados para el

diagnóstico destacan la hemaglutinación indirecta, la inmunofluorescencia indirecta y el ELISA, que emplean antígenos del parásito o extractos solubles para detectar anticuerpos producidos por el paciente. Asimismo, se emplean métodos con mayor especificidad como la inmunocromatografía y el *western blot* por la utilización de antígenos recombinantes o péptidos sintéticos. Si las pruebas iniciales son negativas, deben repetirse tras tres semanas. La inmunofluorescencia indirecta permite confirmar la seroconversión o un aumento de tres títulos serológicos, lo que evidencia infección activa o reciente en el hospedero. Cuando las pruebas microscópicas y de origen inmunológico resultan negativas, se puede optar por el diagnóstico molecular mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), sin embargo, esta prueba está disponible solamente en algunos centros de salud y hospitales. Para esta prueba se utilizan cebadores dirigidos a genes específicos de una cepa o genotipo (Díaz y González 2014; de Noya et al. 2015; Filigheddu et al. 2017).

II.5 Tratamiento y efectos secundarios

Para tratar la enfermedad de Chagas se requiere el uso de dos fármacos, el benznidazol (BNZ) y el nifurtimox (NFX), los cuales han sido aprobados por la FDA y sirven eficazmente cuando se administran en la fase aguda. El propósito de estos medicamentos es controlar la infección y evitar que el parásito invada los órganos del paciente para transformarse en amastigote (Castro et al. 2006).

II.5.1 Benznidazol

El BNZ es el fármaco de que se utiliza para el tratamiento de la enfermedad de Chagas y se presenta en tabletas de 100 mg. El mecanismo de acción del fármaco es que, en una serie de reacciones, las nitroreductasas (NTR) de tipo I, dependientes de NADH, catalizan la reducción del grupo 2-nitroimidazol hasta hidroxilamina mediante un intermediario nitroso, en un proceso de transferencia de dos electrones dividido en dos etapas. Posteriormente, la hidroxilamina resultante participa una serie de transformaciones no enzimáticas que conducen a la liberación de dialdehído glioxal, un metabolito altamente reactivo con capacidad para formar aductos con proteínas, ácidos nucleicos y moléculas pequeñas como el glutatión. Estos metabolitos reactivos son citotóxicos y producen un efecto anti-*T. cruzi*

rápido y localizado tanto sobre las formas intracelulares como extracelulares del parásito (Müller et al. 2018).

Las reacciones adversas más comunes del BNZ incluyen alteraciones cutáneas, neuropatía periférica, náuseas, regurgitación, diarrea, e inclusive ageusia o hipoplasia medular. En caso de que los síntomas sean leves, el tratamiento puede mantenerse. En casos donde la sintomatología presente es moderada, se recomienda suspender temporalmente la medicación, tratar los síntomas y reiniciar la administración de forma gradual. Ante efectos secundarios graves, el tratamiento debe interrumpirse definitivamente para evitar complicaciones mayores (Organización Panamericana de la Salud 2010).

II.5.2 Nifurtimox

Como una alternativa al BNZ, se utiliza el NFX para tratar la enfermedad de Chagas. El fármaco presenta actividad antiparasitaria tanto en formas intracelulares como extracelulares de *T. cruzi* a través de la activación de las nitroreductasas tripanosómicas, las cuales generan diversos metabolitos electrofílicos. Estos metabolitos reaccionan con diferentes macromoléculas como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, lo que provoca múltiples efectos perjudiciales que culminan en la muerte del parásito. Adicionalmente, se ha propuesto que otro posible mecanismo de acción del nifurtimox es la inhibición de la actividad de la deshidrogenasa del tripanosoma.

El NFX presenta una eficacia moderada, con una tasa de curación cercana al 60% en la fase aguda y se recomienda principalmente durante esta etapa o en infecciones crónicas con menos de 10 años de evolución. Entre sus efectos adversos se incluyen reacciones de hipersensibilidad, mielosupresión, agranulocitosis, anorexia, caquexia, alteraciones psicológicas, irritabilidad, hipersomnia, náuseas, emesis, espasmos musculares y diarrea. También se han reportado daños en testículos y ovarios, así como toxicidad en glándulas suprarrenales, colon, esófago y tejido mamario, lo que requiere una vigilancia estrecha durante el tratamiento (Pereira et al. 2009).

II.5.3 Tratamientos alternativos

El BNZ y el NFX han mostrado efectos mutagénicos y carcinogénicos en algunos estudios, por lo que su uso en mujeres embarazadas debe posponerse hasta después del primer

trimestre. La remisión de la enfermedad de Chagas se define por la negatividad serológica, que suele alcanzarse hasta cinco años después de la administración de los fármacos (Bermúdez et al. 2016). No obstante, el desarrollo de nuevos fármacos antiparasitarios ha sido limitado, ya que estas enfermedades afectan principalmente a países con altos niveles de pobreza, en los cuales los recursos económicos para investigación y adquisición de medicamentos son escasos (Wink 2012).

II.5.4 Búsqueda de tratamientos alternativos

El uso de plantas medicinales como alternativa a las drogas sintéticas y la experimentación de sus componentes es una práctica que se ha realizado para tratar diferentes tipos de enfermedades (Rodríguez y Barreto 2015). Se han utilizado diferentes plantas medicinales para evaluar su potencial contra enfermedades parasitarias, dentro de las cuales se incluye Chagas. Algunas de las plantas evaluadas contra *T. cruzi* son *Artemisia mexicana*, *Castela texana*, *Cymbopogon citratus*, *Eryngium heterophyllum*, *Haematoxylum brasiletto*, *Lippia graveolens*, *Marrubium vulgare*, *Persea americana*, *Ruta chalepensis* y *Schinus molle*. De las plantas evaluadas, los extractos metanólicos de *E. heterophyllum*, *H. brasiletto*, *M. vulgare* y *S. molle* presentaron la mayor actividad tripanosomicida, mostraron porcentajes de inhibición del crecimiento entre 88-100% a una concentración de 150 µg/mL (Molina-Garza et al. 2014; Pérez et al. 2017).

Por otro lado, se han evaluado compuestos provenientes de actinomicetos para medir su actividad antiparasitaria y ofrecer una herramienta para tratar enfermedades provocadas por parásitos, de las cuales se incluye Chagas (Inahashi et al. 2015).

II.6 Actinomicetos

Los actinomicetos son de un filo cosmopolita que incluyen a bacterias Gram-positivas filamentosas, pertenecientes a la familia Actinomycetaceae, las cuales viven en ambientes terrestres, marinos y acuáticos (agua dulce); son productores de una gran variedad de metabolitos secundarios, los cuales incluyen 67% de los antibióticos conocidos, además de productos anticancerígenos, antifúngicos y agentes de inmunosupresión, por lo que son de importancia clínica, biotecnológica y agrícola (Barka et al. 2016; Van der Meji et al. 2017).

II.6.1 Uso como agentes terapéuticos

Los actinomicetos son una fuente de diversos compuestos con muchas aplicaciones terapéuticas debido a su diversidad y habilidad de producir compuestos bioactivos. Los actinomicetos son los mayores productores de metabolitos secundarios, de los cuales se incluyen salinosporamida A, salinipirona A, salinipirona B, lodopiridona, arenimicina, sporolida A, arenicolida A, cianosporasid A, salinispirona, entre otros. Representan un 45% de los metabolitos microbianos conocidos (~10,000 compuestos) (Subramani y Aalbersberg 2012). De esta cantidad, 75% provienen del género *Streptomyces* y 25% de actinomicetos raros. Sin embargo, se mencionan algunos géneros que representan una función importante en la producción de antibióticos y metabolitos antimicrobianos de amplio espectro, como: *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Streptoverticillium*, *Actinoplanes*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora* y *Streptosporangium* spp. (Mahajan y Balachandran 2012).

II.6.2 Potencial tripanosomicida

Desde el 2011, se han descrito diferentes ensayos donde evalúan el potencial que tienen compuestos extraídos de actinomicetos. Uno de los primeros reportes por Zin et al. (2011) fue sobre *Streptomyces* sp. SUK7, una cepa de actinomiceto endófito presenta actividad antiparasitaria contra la cepa BS221 de *Trypanosoma brucei brucei* y células Vero (Masand et al. 2015).

Inahashi et al. (2011) aislaron tres nuevos alcaloides antitripanosomales, denominados spoxazomicinas A – C, mediante cromatografía en columna de gel de sílice y HPLC del caldo de cultivo de una nueva especie de actinomicetos endofíticos, *Streptosporangium oxazolinicum* K07-0460T. Las estructuras de las spoxazomicinas se aclararon mediante análisis de cristales de rayos X y RMN y se demostró que son nuevos tipos de antibióticos de la familia de las pioquelinas. La spoxazomicina A mostró actividad antitripanosomal potente y selectiva contra *T. b. brucei* GUTat 3.1.

Steverding et al. (2012) reportaron que cuatro inhibidores de la proteasoma β -lactona- γ -lactámicos de origen natural, producidos por el actinomiceto marino *Salinispora tropica*, mostraron actividad antiparasitaria en el rango nanomolar contra *T. brucei*.

Dashti et al. (2014), extrajeron 1,6-dihidroxifenazina a partir de extractos de *Actinokineospora* sp. EG49 y *Nocardiopsis* sp. RV163, y evaluaron su actividad

antiparasitaria contra la cepa TC 221 de *T. brucei*. De este experimento obtuvieron que la 1,6-dihidroxi fernazina tuvo potencial tripanosomicida contra la cepa causante de la enfermedad del sueño (tripanosomiasis africana).

Abdelmohsen et al. (2014b), realizaron diversas evaluaciones de aislados actinomicetos contra diferentes microorganismos, de los cuales se destaca el género *Mycobacterium*, género que presentó actividad contra *Bacillus* sp. P25 y *T. brucei* TC 221. Asimismo, *Saccharomonospora* sp. SA23 mostró actividad inhibitoria contra *B. sp.* P25, *Escherichia coli* K12, *Fusarium* sp. P21 y *T. brucei* TC 221.

Por otro lado, Abdelmohsen et al. (2014) utilizaron compuestos derivados de lactona producidos por *Streptomyces* sp. obtenida de *Tethya* sp. y *Streptomyces* sp. M027750 contra *T. b. brucei* y obtuvieron que butenólidos exhibieron actividad tripanosomicida. También usaron valinomicina a partir de *Streptomyces* sp. recuperada de *Aplysina aerophoba* y presentó actividad inhibitoria contra *Leishmania major* y *T. b. brucei*. El alcaloide indolocarbazol, obtenido de *Streptomyces* sp. cepa 11 mostró actividad antiparasitaria contra *L. major* y *T. b. brucei*. La quinona benzo-alfa-naftaceno demostró tener actividad inhibitoria contra bacterias Grampositivas como *Mycoplasma gallisepticum*, Gramnegativas y *T. brucei*. Finalmente, demostraron que el alcaloide de dibenzodiazepinona farnesilado diazepinomicina obtenida de *Micromonospora* sp. RV115 resultó tener actividad inhibitoria contra tripomastigotes de *T. brucei*.

En 2015, Inahashi et al. evaluaron la actividad tripanosomicida de actinoalolidos A-E (1-5), obtenidos a partir de la cepa MK10-036 de *Atinoalbomurus fulvus*. En este estudio obtuvieron que estos compuestos tienen actividad inhibitoria contra *T. b. brucei* GUTat3.1, *T. b. rhodensiense* STIB900 y *T. cruzi* Tulahuen C4C8, con diferentes dosis en las cuales presentaron citotoxicidad.

Cheng et al. (2015) realizaron ensayos para determinar la actividad antiparasitaria de *Streptomyces* sp. SBT433, *Streptomyces* sp. SBT348, *Modestobacter* sp. SBT362, *Modestobacter* sp. SBT363, *Nonomuraea* sp. SBT364, *Rhodococcus* sp. SBT367, *Geodermatophilus* sp. SBT381 y *Micromonospora* sp. SBT687 contra *T. b. brucei* TC 221. De estos ensayos obtuvieron que algunos géneros presentaron un mayor potencial inhibitorio que otros, pero que todos mostraron actividad tripanosomicida.

Recientemente, Gamaleldin et al. (2020) realizaron pruebas para medir la actividad tripanosomicida de extractos derivados de *Streptomyces* sp. UR23 y *Micromonospora* sp. UR 17 sobre *T. brucei* en diferentes condiciones de cultivo por parte de los actinomicetos. Finalmente obtuvieron que estos extractos lograron inhibir a la cepa patogénica de *T. brucei* a diferentes concentraciones.

III. JUSTIFICACIÓN

El número de casos de personas con la enfermedad de Chagas va en aumento, debido a las diferentes vías de transmisión del parásito *T. cruzi* como la presencia del vector *T. gerstaeckeri* en el estado de Nuevo León, portadora de la cepa local. Esto provoca diferentes manifestaciones clínicas en los pacientes, desde síntomas leves hasta severos. El tratamiento para esta enfermedad incluye los fármacos benznidazol y nifurtimox, lo que da como resultado que hasta un 70% de los enfermos se recuperen. Sin embargo, la aplicación de estos fármacos representa un riesgo para los pacientes debido a los efectos secundarios o complicaciones que pueden desarrollar. Se requiere de alternativas para poder tratar la enfermedad de Chagas con compuestos que no pongan en riesgo la salud de los pacientes. Esta propuesta incluye la evaluación de compuestos extraídos de actinomicetos con el potencial de control de *T. cruzi*, ya que su uso contra parásitos no se tiene tan bien definido como con bacterias, y poder confirmar si existe un efecto tripanosomicida sin provocar citotoxicidad, como la causada por los fármacos de uso actual.

IV. HIPÓTESIS

Los compuestos extracelulares obtenidos de *Streptomyces* sp. Chi-104 y *S. thermocarboxydus* Chi-43 poseen potencial de inhibición contra epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes de la cepa de Nuevo León de *T. cruzi*.

V. OBJETIVO

V.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad inhibitoria de compuestos extracelulares obtenidos de *Streptomyces* sp. Chi-104 y *S. thermocarboxydus* Chi-43 contra epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes de la cepa de Nuevo León de *T. cruzi* mediante ensayos *in vitro*.

V.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Extraer y purificar compuestos extracelulares a partir de *Streptomyces* sp. Chi-104 y *S. thermocarboxydus* Chi-43.
2. Determinar la actividad tripanosomicida de los extractos obtenidos de los actinomicetos contra epimastigotes de *T. cruzi*.
3. Evaluar la actividad tóxica, citotóxica y hemolítica de los extractos crudos obtenidos de los actinomicetos.
4. Comprobar el efecto tripanosomicida de los extractos en tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi*.
5. Identificar los compuestos de fracciones colectivas de los actinomicetos con mejor actividad antiparasitaria.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.1 Lugar de trabajo

Este proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Patología Molecular y Experimental del Departamento de Parasitología, el Laboratorio 8 del Instituto de Biotecnología y el Laboratorio 2 de Inmunología Molecular, los cuales pertenecen a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

VI.2 Cepas de actinomicetos

Para este proyecto, se utilizaron las cepas de actinomicetos *Streptomyces thermocarboxydus* Chi-43 (ST-C43) y *Streptomyces* spp. Chi-104 (S-C104) donados por la Dra. Ma Guadalupe Rojas Verde del Laboratorio 8 del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León para evaluar el potencial de sus compuestos extracelulares. Estas cepas fueron aisladas de suelo del lago Arareco en Chihuahua, México en abril del 2015.

VI.3 Activación de actinomicetos

A partir de la selección de las cepas de actinomicetos con una mejor actividad hidrolítica, se llevó a cabo la reactivación de las cepas almacenadas a -20 °C. Para ello y en condiciones de esterilidad, se preparó agar avena, el cual contiene por litro: sulfato de magnesio (1 L), fosfato de monopotasio (1 g), nitrato de sodio (1.5 g), avena (1 g) y agar bacteriológico (18 g). Se reactivaron las cepas a partir de viales conservados a -20°C en glicerol al 20%. Se tomaron 5 µL, se inocularon en placas de agar avena estéril y se extendieron en tamiz con ayuda de un asa bacteriológica. Las placas se incubaron a 30 °C durante 5-7 días (Toumatia et al. 2015).

VI.4 Cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*

La cepa de *T. cruzi* fue aislada de *T. gerstaeckeri* en General Terán, Nuevo León, México en 2007 y pertenece a la unidad de tipificación discreta 1 (DTU 1). El cultivo se mantuvo en medio infusión de hígado triptona (LIT: NaCl 4 g, KCl 0.4 g, Na₂HPO₄ 8 g, glucosa 2 g, triptosa 5 g, caldo infusión cerebro 5 g para 1 L suplementado con hemina 20

μM, suero fetal bovino 10% v/v) en su forma epimastigote hasta obtener una concentración de 1×10^6 células/mL (fase exponencial) y se ajustó mediante recuento en cámara de Neubauer. La concentración de parásitos se expresó en el número de epimastigotes por mililitro de medio LIT (parásitos/mL) para iniciar el experimento (Margioto et al. 2016).

VI.5 Ensayo de antagonismo de actinomicetos vs. *T. cruzi*

Se prepararon concentraciones de 1×10^7 - 5×10^7 cel/mL de los actinomicetos en medio ISP2 y 1.2×10^6 cel/mL de *T. cruzi* y se colocaron en una placa de 24 pocillos con el fin de verificar si el crecimiento del parásito es inhibido por la exposición a las cepas de *Streptomyces*. Como control negativo se utilizaron pocillos sin actinomicetos. Las placas se incubaron a 28 °C durante 24 h. Para obtener el porcentaje de inhibición de *T. cruzi* post-exposición, se utilizó una cámara de Neubauer y se calculó la concentración de parásitos viables con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}} \text{ de parásitos inicial}\right)}{\left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}} \text{ de parásitos final}\right)} \times 100$$

VI.6 Extracción de compuestos

Se inocularon 250 mL de caldo International Streptomyces Project-2 Medium (ISP2: extracto de levadura 4 g, extracto de malta 10 g, dextrosa 4 g, agua bidestilada 1 L) con biomasa de ST-C43 y S-C104 tomada a partir de los cultivos de actinomicetos en agar avena (Pérez-Rojas et al. 2015) a 150 rpm a 28 °C durante 15 días. Los cultivos se filtraron con papel Whatman No. 1 (0.22 μm). Posteriormente, se realizó la extracción de los compuestos activos con acetato de etilo ($\text{CH}_3\text{-COO-CH}_2\text{-CH}_3$) (Bavya et al. 2011; Aponte et al. 2015; León et al. 20216) a una proporción de 1:1. Posterior a ello, se agitaron a 150 rpm durante 24 h, para una extracción completa. Se separó la fase orgánica con ayuda de un embudo. Los extractos se concentraron a vacío con un rotavapor (Yamato RE301) (Kannahi y Eshwari 2016; Rao et al. 2017). Finalmente se calculó el porcentaje de rendimiento con base en el peso seco obtenido de los extractos (Kaaniche et al. 2020).

VI.7 Evaluación de actividad antiparasitaria de los extractos de ST-C43 y S-C104 contra epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi*

Se prepararon soluciones de los extractos de ST-C43 y S-C104 a diferentes concentraciones: 50-300 µg/mL diluidos en dimetilsulfóxido (DMSO) 1%. Con el fin de determinar la actividad antiparasitaria del extracto contra *T. cruzi*, se llevó a cabo una prueba de difusión en placa en una microplaca de 96 pocillos. En cada pozo se añadieron 190 µL de medio LIT con 1×10^6 epimastigotes/mL y 10 µL de cada concentración del extracto por triplicado. Como blanco se utilizó el medio LIT sin parásitos con el extracto. De igual manera, para el control positivo se utilizó nifurtimox a 10 µL/mL y como controles negativos DMSO 1% con un volumen igual al de los extractos y medio LIT sin parásitos. Las placas se incubaron a 28 °C durante 72 h y pasado el periodo de incubación se realizó una inspección visual para observar si existe inhibición (Muelas-Serrano et al. 2000; Molina-Garza et al. 2014; Sangkanu et al. 2017).

VI.8 Viabilidad de los parásitos

Para determinar la viabilidad de *T. cruzi* después del ensayo de actividad antiparasitaria se aplicó el método colorimétrico de Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), así como un conteo con la ayuda de una cámara de Neubauer (Pérez et al. 2017).

Para el método de MTT, se adicionaron 10 µL del reactivo a una concentración de 5 mg/mL a cada pozo de la microplaca y se incubó a 27 °C durante 4 h. Después se agregaron 100 µL de duodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%-0.1 N HCl para extraer el formazan y se incubó la microplaca por 4 h (Muelas-Serrano et al. 2000). Finalmente se determinó porcentaje de mortalidad de los epimastigotes indirectamente al obtener la densidad óptica a 570 nm y con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de mortalidad} = \frac{(A_c - A_m) - (A_p - A_{pm})}{A_c - A_m} \times 100$$

Donde:

A_c = Promedio de las absorbancias del control negativo.

A_m = Promedio de las absorbancias del medio LIT solo.

A_p = Promedio de las absorbancias de cada tratamiento.

A_{pm} = Promedio del blanco de cada tratamiento.

En cuanto al conteo en la cámara de Neubauer, se utilizaron 20 μ L de la solución stock extracto/parásito para lograr un conteo de los epimastigotes vivos (Pérez et al. 2017). Para determinar el número de células vivas se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de mortalidad} = \frac{C_c - C_p}{C_c} \times 100$$

Donde:

C_c = Promedio de parásitos contados en el control negativo.

C_p = Promedio de parásitos contados en cada tratamiento.

Para los ensayos antiparasitarios contra los estadios tripomastigotes y amastigotes se realizaron los mismos métodos aplicados a epimastigotes, pero con un periodo de incubación de 24 h.

VI.9 Evaluación de actividad tóxica de los extractos contra *Artemia salina*

Para evaluar el efecto tóxico de los extractos de ST-C43 y S-C104, se realizó el ensayo de letalidad con larvas de *A. salina*, el cual es considerado un método preliminar para medir la toxicidad (Lagarto et al. 2001).

Para esto, se utilizaron quistes de *A. salina* (Royal, Estados Unidos), los cuales se incubaron en solución salina al 3.7%, pH 8, a temperatura ambiente, con aireación por medio de una bomba para acuario y expuestos a luz constante. La solución se suplementó con 0.75 g/L de extracto de levadura (BD Bioxon). Los quistes eclosionaron en aproximadamente 24 h y se obtuvo un gran número de larvas (nauplios). Después de 48 h de la eclosión se realizó el bioensayo en una placa de 24 pozos, por lo que se transfirieron 10 larvas a cada uno. Los extractos fueron evaluados por triplicado a concentraciones de 50-300 μ g/mL. Como control positivo se utilizó dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$, Sigma-Aldrich) a 100 μ g/mL y como control negativo solución salina al 3.7%. Las microplacas se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h bajo iluminación constante. Después del tiempo de exposición, se

contó el número de larvas muertas y vivas. Para considerar el bioensayo como válido, se tomó en cuenta si el porcentaje de mortalidad del control negativo no superó el 10% (Fernández-Calienes et al. 2009).

Los extractos/particiones/fracciones se clasificaron como extremadamente tóxicos ($CL_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$), muy tóxicos ($10 < CL_{50} < 100$), moderadamente tóxicos ($100 < CL_{50} < 1,000$) y no tóxicos ($CL_{50} > 1,000 \mu\text{g/mL}$) (Valdés-Iglesias et al. 2003).

VI.10 Evaluación de actividad hemolítica de los extractos contra eritrocitos humanos

Para este ensayo, las muestras de sangre humana se obtuvieron a partir de un voluntario sano y se colectaron en tubos con anticoagulante EDTA (BD Vacutainer, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA). Los glóbulos rojos se recuperaron de la sangre y se lavaron tres veces con PBS estéril (pH 7.2). A partir del último lavado se preparó una suspensión de eritrocitos al 5% en PBS estéril. Se agregaron concentraciones de 50-300 $\mu\text{g/mL}$ de cada extracto de ST-C43 y S-C104 por triplicado a una solución de PBS, recibieron una suspensión al 5% de eritrocitos humanos y se incubaron a 37 °C durante 30 min. Después de esto, las células se centrifugaron a 3,000 rpm (Sorval Legen Micro 21R, Thermo Fisher Scientific) y el sobrenadante se utilizó para medir la absorbancia de la hemoglobina liberada a 540 nm en un lector de microplacas (Biochrom Asys UVM-340). Para los controles positivo y negativo se utilizaron agua destilada y PBS respectivamente (Zohra y Fawzia 2014).

El porcentaje de hemólisis para cada muestra se calculó con la siguiente formula:

$$\% \text{ hemólisis} = \frac{A_m - A_n}{A_p - A_n} \times 100$$

Donde:

A_m = absorbancia de la muestra

A_p = absorbancia del control positivo

A_n = absorbancia del control negativo

Se consideraron como no hemolíticos a los extractos que presentaron un porcentaje de hemólisis menor de 10% a 1,000 $\mu\text{g/mL}$ (Martínez et al. 2013; Hernández et al. 2014; Alonso-Geli et al. 2015).

VI.11 Obtención de tripomastigotes de *T. cruzi*

Para la obtención de la forma tripomastigote de *T. cruzi* se centrifugaron 10 mL de cultivo de 1.2×10^6 de epimastigotes en término de la fase exponencial a 10,000 g durante 15 min a 10 °C. Los parásitos se suspendieron en orina de triatomo artificial (TAU: NaCl 190 mM, tampón de fosfato 8 mM, pH 6, KCl 17 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM) y se incubaron a 28 °C durante 2 h. Posteriormente se diluyeron en TAU suplementado con L-prolina 10 mM (TAUP) y se incubaron a 27 °C (Contreras et al. 1985; Santos et al. 2006).

VI.12 Cultivo celular HUVEC

Se utilizó una línea celular Human umbilical vein endotelial cells (HUVEC, Sigma-Aldrich) en medio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM, Sigma-Aldrich). A partir de un criopreservado, se realizó una resiembra en la que se desechó el medio de cultivo para después agregar solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y tripsina e incubar durante 5-7 min a 37 °C a 5% de CO₂. Posteriormente se desechó la tripsina para agregar 5 mL de medio DMEM, se incubó durante 24-48 h a 37 °C con 5% de CO₂. Finalmente se realizó un conteo de células con tinción de azul tripán y cámara de Neubauer hasta obtener una confluencia de al menos 80% (Baudin et al. 2007).

VI.13 Obtención de amastigotes de *T. cruzi*

Para la obtención de amastigotes de *T. cruzi* se utilizaron células HUVEC a una concentración de 1×10^5 cel/mL (ajustado con cámara de Neubauer) en placas de 12 pocillos en medio DMEM enriquecido con 10% de suero fetal bovino y se incubaron a 37 °C durante 24 h con 5% de CO₂ y 95% de humedad (Tempone et al. 2005). Posteriormente, las células HUVEC fueron infectadas *in vitro* con los tripomastigotes en una proporción parásito:célula de 10:1 y se incubaron a 37 °C durante 24 h con 5% de CO₂ en medio DMEM enriquecido con 10% de suero fetal bovino. La diferenciación *in vitro* de los amastigotes y las células HUVEC fue realizada por tinción de azul tripan (Neira et al. 2014).

VI.14 Evaluación citotóxica de los extractos

Para este ensayo se utilizaron células Huvec en una concentración de 1.4×10^5 células/mL en placas de 24 pocillos en medio DMEM enriquecido al 10% de suero fetal

bovino y se incubaron a 37 °C durante 72 h con 5% de CO₂ en atmósfera húmeda. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de los extractos obtenidos de ST-C43 y S-C104 (50-300 µg/mL) y se utilizaron células mantenidas sin extractos como control negativo, así como con DMSO 1%. Las células se incubaron a 37 °C durante 24 h y la citotoxicidad se determinó mediante conteo por cámara de Neubauer con azul de tripán y por el método colorimétrico MTT con ayuda de un espectrofotómetro a 560 nm (Zapata et al. 2009). Para obtener el porcentaje de citotoxicidad se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de citotoxicidad} = \frac{\text{DO control negativo} - \text{DO tratamiento}}{\text{DO control negativo}} \times 100$$

El valor obtenido se expresó como concentración letal (CL₅₀) con un 95% de confianza.

Los extractos se clasificaron como altamente citotóxicos (CL₅₀<10 µg/mL), citotóxicos (CL₅₀>10<100 µg/mL), moderadamente citotóxicos (CL₅₀>100<1000 µg/mL) y potencialmente no citotóxicos (CL₅₀>1000 µg/mL) (Osorio et al. 2007).

Además, se calculó el índice de selectividad de los extractos, el cual indica la relación entre la CL₅₀ citotóxica y la CL₅₀ del microorganismo blanco (Rodríguez-Garza et al. 2025), en este caso *T. cruzi*. Para esto se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Índice de selectividad} = \frac{CL_{50} \text{citotoxicidad}}{CL_{50} \text{tripanosomicida}}$$

Los extractos se consideraron como no selectivos contra *T. cruzi* (IS<2), moderadamente selectivos (IS>2<3) y selectivos (IS>3) (Valencia et al. 2011). Entre más alto sea el índice de selectividad, más activo será el extracto contra los parásitos que contra las células de la persona, lo cual reduce la aparición de efectos adversos ocasionados por el extracto (García-Huertas et al. 2018).

VI.15 Caracterización de los extractos

Como evaluaciones preliminares, se aplicaron pruebas bioquímicas a los extractos de ST-C43 y S-C104. Se realizaron las pruebas de Molisch para carbohidratos junto a Antrona para estos y azúcares en general, reactivo de Millon para tirosina (aminoácidos), prueba de Biuret para aminoácidos y péptidos, prueba de Liebermann-Burchard para esteroides y

triterpenos, prueba de Baljet para sesquiterpelactonas, prueba de Shinoda para flavonoides, prueba de Taninos para alcoholes fenólicos, prueba de Dragendorff para alcaloides y pruebas para detección de cumarinas, quinonas y saponinas (Cázares-Jaramillo et al. 2023).

VI.16 Fraccionamiento de los extractos por cromatografía en columna

Previo al fraccionamiento se realizaron pruebas de solubilidad con n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol (todos los reactivos utilizados fueron adquiridos en Sigma-Aldrich) (Birch et al. 2019), sin embargo, el hexano fue descartado de la metodología posterior. Se preparó la columna de fraccionamiento (22 x 300 mm) con 20 g de silica gel 60 G (70-230 μm , 60-200 μm) y 500 mg de los extractos de ST-C43 y S-C104 por separado y realizada con 20 mL de un sistema de solventes de baja a alta polaridad. Primeramente, ambos extractos fueron eluidos con cloroformo en diferentes columnas, después con 20 mL de cloroformo-acetato de etilo (9:1). Las fracciones eluidas fueron nombradas ST-C43-CEA y S-C104-CEA. Después de esto, la proporción de acetato de etilo aumentó gradualmente hasta que quedó solamente acetato de etilo puro en las columnas. Posteriormente, estas fracciones fueron mezcladas con metanol (9:1); la concentración de metanol incrementó gradualmente hasta obtener metanol puro en las columnas. Estas fracciones fueron nombradas S-C43-EAM y S-C104-EAM (Tabla 1). Cada fracción fue evaporada con un rotavapor. Finalmente se realizó una cromatografía en capa fina para unir fracciones con perfiles cromatográficos similares (Sebak et al. 2021).

Tabla 1. Gradiente de solventes utilizados para los extractos de ST-C43 y S-C104.

Gradiente
Cloroformo 100%
Cloroformo-Acetato de etilo 9:1
Cloroformo-Acetato de etilo 8:2
Cloroformo-Acetato de etilo 7:3
Cloroformo-Acetato de etilo 6:4
Cloroformo-Acetato de etilo 5:5
Cloroformo-Acetato de etilo 4:6
Cloroformo-Acetato de etilo 3:7

Cloroformo-Acetato de etilo 2:8
Cloroformo-Acetato de etilo 1:9
Acetato de etilo 100%
Acetato de etilo-Metanol 9:1
Acetato de etilo-Metanol 8:2
Acetato de etilo-Metanol 7:3
Acetato de etilo-Metanol 6:4
Acetato de etilo-Metanol 5:5
Acetato de etilo-Metanol 4:6
Acetato de etilo-Metanol 3:7
Acetato de etilo-Metanol 2:8
Acetato de etilo-Metanol 1:9
Metanol 100%

VI.17 Identificación de los compuestos químicos

Se seleccionó la fracción ST-C43-EAM-F2 debido a su índice de selectividad de >10 para identificar los compuestos presentes. La identificación se realizó mediante cromatografía líquida acoplada a masas por servicio externo en la empresa Accura Monterrey S.A. de C.V.

VI.18 Análisis estadístico

Para los análisis de inhibición se utilizaron análisis de regresión dosis-respuesta con un intervalo de confianza del 95%. Se realizó una prueba PROBIT para calcular el CL₅₀, así como los límites superiores e inferiores. Además de esto se realizó una prueba de significancia de Tukey post hoc para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos con el programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v. 25.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EUA). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y los datos presentados con su desviación estándar, los valores fueron previamente revisados para normalidad y homocedasticidad con la prueba de Shapiro-Wilk y Brown-Forsythe, respectivamente (Al-Adhroey et al. 2010).

VII. RESULTADOS

VII.1 Extracción de compuestos

Después de la concentración de los extractos de ST-C43 y S-C104 se obtuvo un valor de 0.4% de rendimiento después de 15 días de incubación a 28°C a 150 rpm.

VII.2 Ensayo de antagonismo de *T. cruzi* vs. actinomicetos

El número de epimastigotes de *T. cruzi* disminuyó proporcionalmente de acuerdo con la concentración de *Streptomyces*, por lo que ST-C43 y S-C104 lograron inhibir al protozoario en un 97.75% y 97.5% a una concentración de 5×10^7 cel/mL (Tabla 2).

Tabla 2. Porcentajes de inhibición del ensayo de antagonismo de ST-C43 y S-C104 contra <i>T. cruzi</i> .		
Concentración de <i>Streptomyces</i> (UFC/mL)	Mortalidad de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> (% $\pm$ SD)	
	ST-C43	S-C104
1×10^7	93.25 $\pm$ 0.07 ^a	92.33 $\pm$ 2.35 ^a
2×10^7	94.25 $\pm$ 0.14 ^a	93.33 $\pm$ 2.36 ^a
3×10^7	95.17 $\pm$ 1.01 ^a	94.50 $\pm$ 1.47 ^a
4×10^7	96.42 $\pm$ 1.02 ^a	96.00 $\pm$ 3.43 ^a
5×10^7	97.75 $\pm$ 1.89 ^b	97.50 $\pm$ 2.17 ^b

Trypanosoma cruzi a una concentración de 1.2×10^6 células/mL. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Los porcentajes de inhibición son expresados $\pm$ SD con diferencias significativas ($p < 0.05$) indicadas por diferentes letras dentro de la misma columna conforme a la prueba post hoc de Tukey.

VII.3 Evaluación de actividad tripanosomicida, tóxica, citotóxica y hemolítica de los extractos contra *T. cruzi*.

Al realizar los ensayos de inhibición con los extractos de ST-C43 y S-C104 se encontró que poseen una CL₅₀ de 100-110 μ g/mL para epimastigotes, 102-116 μ g/mL para tripomastigotes, pero solamente ST-C43 demostró actividad contra amastigotes. Además de esto, los extractos demostraron ser no tóxicos, no citotóxicos, ni hemolíticos (Tabla 3).

Tabla 3. Evaluación de actividad tripanosomicida (epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes), tóxica, citotóxica y hemolítica, índice de selectividad de los extractos de ST-C43 y S-C104 (CL₅₀ en µg/mL, límite inferior y límite superior).

Actividad	ST-C43	S-C104
Epimastigotes	100 (89-108)	110 (91-121)
Tripomastigotes	102 (91-107)	116 (97-129)
Amastigotes	198 (178-217)	>300
Toxicidad	>1000 (no tóxico)	>1000 (no tóxico)
Citotoxicidad	>1000 (no citotóxico)	>1000 (no citotóxico)
Hemólisis	>1000 (no hemolítico)	>1000 (no hemolítico)
Índice de selectividad	>10	>10

La toxicidad fue evaluada en *A. salina*, la citotoxicidad en células Huvec y la hemólisis con eritrocitos humanos.

VII.4 Actividad tripanosomicida, tóxica, citotóxica y hemolítica de las fracciones

A partir de las fracciones de acetato de etilo-metanol, se aislaron cuatro fracciones de la cepa ST-C43 y tres de la cepa S-C104. Las pruebas de actividad anti-*T. cruzi* mostraron que las fracciones 1 a 4 de ST-C43-EAM presentaron valores de CL₅₀ 105-116 µg/mL epimastigote. Estas fracciones no demostraron ser tóxicas ni citotóxicas, según los ensayos realizados con *A. salina* y células Huvec a concentraciones superiores a 300 µg/mL. Además, las fracciones no mostraron efectos hemolíticos en eritrocitos, a excepción de las fracciones F1 y F3, que evidenciaron actividad hemolítica a concentraciones elevadas (245 y 256 µg/mL, respectivamente). En contraste, las fracciones obtenidas de la cepa S-C104 no presentaron actividad contra *Trypanosoma*, ni toxicidad ni hemólisis, como se resume en la Tabla 4.

Tabla 4. Evaluación de actividad tripanosomicida (epimastigotes), tóxica y hemolítica de las fracciones de ST-C43 y S-C104 (µg/mL, límite inferior y límite superior).

Fracción	Actividad			
	Tripanosomicida	Tóxica	Hemolítica	IS
ST-C43-EAM-F1	105 (96-108)	>1000 (no tóxico)	245 (227-266)	>10
ST-C43-EAM-F2	115 (102-122)	>1000 (no tóxico)	>1000 (no hemolítico)	>10
ST-C43-EAM-F3	107 (100-116)	>1000 (no tóxico)	256 (240-271)	>10

ST-C43-EAM-F4	116 (110-128)	>1000 (no tóxico)	>1000 (no hemolítico)	>10
S-C104-EAM-F1	>1000 (sin actividad)	>1000 (no tóxico)	>1000 (no hemolítico)	N.A.
S-C104-EAM-F2	>1000 (sin actividad)	>1000 (no tóxico)	>1000 (no hemolítico)	N.A.
S-C104-EAM-F3	>1000 (sin actividad)	>1000 (no tóxico)	>1000 (no hemolítico)	N.A.

IS: índice de selectividad; N.A.: No aplica.

VII.5 Caracterización de los extractos

A partir del análisis bioquímico aplicado a los extractos de ST-C43 y S-C104, se obtuvieron resultados positivos para carbohidratos, aminoácidos, péptidos, fenoles, alcaloides, cumarinas y sesquiterpenlactonas presentes en los extractos de los actinomicetos. Por otro lado, se obtuvo un resultado negativo para flavonoides, saponinas, colesterol, esteroides, quinonas y terpenos (Tabla 5).

Tabla 5. Naturalezas obtenidas en los extractos mediante un perfil bioquímico.			
Naturaleza	Resultado	Naturaleza	Resultado
Carbohidratos	+	Fenoles	+
Aminoácidos	+	Sesquiterpenlactonas	+
Flavonoides	-	Quinonas	-
Proteínas	+	Terpenos	-

+: Presencia; -: Ausencia.

VII.6 Identificación de los compuestos químicos

Debido a que únicamente las fracciones de ST-C43-EAM demostraron actividad anti-*T. cruzi*, se eligieron para su análisis mediante LC-MS/MS con el fin de identificar sus compuestos activos. Este análisis permitió la identificación de dos compuestos: K-252-C-aglicona estaurosporina, la cual pertenece a la familia de los alcaloides, y anfomicina, un antibiótico. La Tabla 6 presenta los datos obtenidos por LC-MS/MS para estos compuestos, mientras que sus estructuras químicas se ilustran en la Figura 3.

Tabla 6. Compuestos identificados de ST-C43-EAM-F2 por LC-MS/MS.			
Nombre	Tiempo de retención	Peso molecular	Valor m/z
Anfomicina	12.28	1290.4	1318.6900
K-252-C-aglicona estaurosporina	10.54	311.4	334.0501

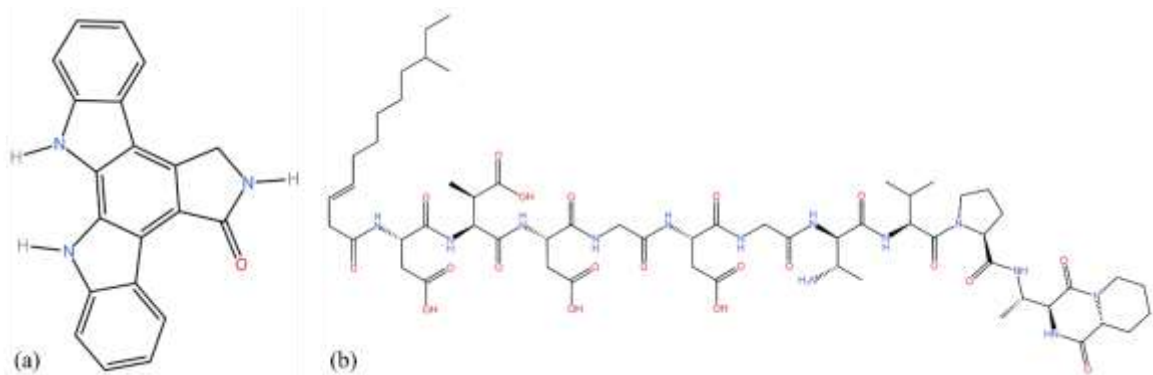


Figura 3. Estructura química de (a) K-252-C-aglicona estaurosporina y (b) anfomicina.

VIII. DISCUSIÓN

En los últimos años, los actinomicetos se han utilizado como grandes productores de diferentes tipos de compuestos y, particularmente, *Streptomyces* es el género que más ha sido explorado (Shepherdson et al. 2023). Estas bacterias han sido ampliamente utilizadas como biocontrol, actividad antitumoral y antiinflamatoria (Salwan y Sharma 2020). Se ha prestado más atención microorganismos como bacterias, hongos, virus y recientemente se les ha dado importancia a parásitos, específicamente protozoarios. Investigaciones anteriores han evidenciado la efectividad de diversas especies de *Streptomyces* frente a protozoos, como el ácido fenazina-carboxílico producido por *S. canus*, que ha mostrado actividad contra *Toxoplasma gondii* y *Plasmodium falciparum* (Pagmadulam et al. 2020), así como el orlistat, aislado de *S. toxytricini*, con efecto sobre *Giardia lamblia* (Argüello-García et al. 2020), y otros actinomicetos que han demostrado actividad frente a *Entamoeba histolytica* (Balakrishnan et al. 2022). En cuanto a parásitos hemoflagelados, se ha reportado que la venturicidina A posee una alta actividad contra *Leishmania donovani* y *T. brucei*, este último responsable de la tripanosomiasis africana (Hauser et al. 2024). No obstante, aún son escasos los estudios que reportan metabolitos bioactivos provenientes de especies de *Streptomyces* con efecto específico contra *T. cruzi* (Cartuche et al. 2020).

En este proyecto, la extracción de compuestos extracelulares producidos por *Streptomyces* obtuvo un 0.04% de rendimiento con medio de cultivo ISP2 en un tiempo de incubación de 15 días, sin embargo, algunas especies que han tenido un valor de hasta 20-30% de rendimiento son *S. fradiae* y *S. lomondensis* en tiempos que van desde 48 horas hasta 21 días (Kaaniche et al. 2020; Tangerina et al. 2020; Ni et al. 2021). Aunque no se ha reportado algo respecto a *S. thermocarboxydus*, se han intentado aumentar los porcentajes de rendimiento en cultivos de fermentación manipulando diferentes parámetros (Yao et al. 2023), por lo que podría indicar que esta especie requiere de más tiempo en cultivo para obtener mayores concentraciones de extractos.

En cuanto a las pruebas de antagonismo de ST-C43 y S-C104 contra *T. cruzi*, los actinomicetos inhibieron el crecimiento de *T. cruzi* en casi su totalidad con porcentajes de 92.33 a 97.75%. Algunos estudios han demostrado que este género ha logrado inhibir bacterias patógenas en porcentajes de hasta el 100% (Butt et al. 2024). En el caso de

protozoos hemoflagelados como *Leishmania* spp., se han documentado efectos antagónicos utilizando concentraciones de *Streptomyces* entre $1\text{-}2 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) (Vivero-Gómez et al. 2025). No obstante, hasta ahora no se han reportado estudios que evalúen el antagonismo contra *T. cruzi* utilizando concentraciones similares de actinomicetos. A pesar de ello, los elevados niveles de inhibición observados en el presente estudio indican que estos *Streptomyces* podrían generar metabolitos bioactivos, como avermectinas, compuestos conocidos por su actividad tripanosomicida, lo que explicaría la mortalidad celular detectada en *T. cruzi* (Qureshi et al. 2021).

Respecto a las pruebas de actividad tripanosomicida de los extractos, se obtuvo CL_{50} de 100 $\mu\text{g/mL}$ de ST-C43 y 110 $\mu\text{g/mL}$ de S-C104 para epimastigotes de *T. cruzi*, lo cual es más elevado a lo reportado por Gamaleldin et al. 2020, contra *T. brucei* con una CL_{50} de 16.6 $\mu\text{g/mL}$ del mismo estadio. De igual manera, se obtuvo un CL_{50} de 102 $\mu\text{g/mL}$ de ST-C43 y 116 $\mu\text{g/mL}$ de S-C104 para tripomastigotes, valores elevados comparados por lo realizado por Martínez-Peinado et al. 2021, quienes obtuvieron un CL_{50} de 1.67 $\mu\text{g/mL}$ en este estadio. Con relación en los bioensayos realizados con amastigotes, se obtuvieron concentraciones de inhibición de 198 $\mu\text{g/mL}$, lo que contrasta con lo reportado por Cartuche et al. 2020, quien reporta dosis de 0.13–4.42 $\mu\text{g/mL}$, por lo que se puede considerar que tuvo nula actividad contra este estadio. Los CL_{50} de los extractos obtenidos para cada estadio de *T. cruzi* se encuentran dentro del rango previamente reportado de 4-150 $\mu\text{g/mL}$ por parte de *Streptomyces* contra *T. brucei* (Valencia et al. 2011; García-Huertas et al. 2018; Birch et al. 2019).

Además de esto, los extractos de ambas cepas no presentaron actividad tóxica en la evaluación con *A. salina*, nula actividad hemolítica con eritrocitos de una persona sana, ni presentaron actividad citotóxica cuando se realizaron ensayos con células Huvec. Estos hallazgos respaldan lo previamente descrito que los productos de actinomicetos, entre los cuales se menciona el género *Streptomyces*, no presentan riesgo para la salud humana (Cuozzo et al. 2023), lo cual fue confirmado con su índice de selectividad de >10 .

De los extractos de ST-C43, las fracciones ST-43-EAM-F1 a F4 conservaron la actividad antiparasitaria, con valores de CL_{50} entre 105-116 $\mu\text{g/mL}$, en concordancia con estudios previos (Zheng et al. 2021). En contraste, las fracciones derivadas de la cepa S-C104 (S-C104-EAM-F1 a F3) no mostraron capacidad inhibitoria frente a *T. cruzi*, lo que podría

atribuirse a la ausencia de compuestos activos o a la falta de interacciones sinérgicas necesarias para su acción (Luan et al. 2020). Por otro lado, las fracciones ST-43-EAM-F1 y F3 presentaron actividad hemolítica a concentraciones de 245-256 µg/mL, respectivamente. Aunque no se detectaron saponinas, compuestos previamente asociados con efectos hemolíticos (Zapata et al. 2009), esta actividad podría estar relacionada con la presencia de otros metabolitos bioactivos con efectos nocivos sobre células humanas (Luan et al. 2020).

En consecuencia, los ensayos posteriores excluyeron tanto a la cepa S-C104 como a las fracciones hemolíticas ST-43-EAM-F1 y F3, debido a su falta de actividad antiparasitaria o por su relación con medidas de seguridad. Esta exclusión podría estar relacionada con la ausencia de grupos de genes biosintéticos en S-C104, responsables de la producción de compuestos con actividad antiparasitaria, a diferencia de ST-C43 (Cerna-Chávez et al. 2024). Se ha informado que la presencia de nitrato reductasa, una enzima que influye directamente en el metabolismo de *T. cruzi*, de manera similar a los fármacos benznidazol y nifurtimox, podría explicar esta diferencia (Nayaka et al. 2020). El perfil bioquímico de los metabolitos extracelulares reveló la presencia de carbohidratos, aminoácidos, fenoles, alcaloides, cumarinas y lactonas sesquiterpénicas, compuestos reconocidos por desempeñar diversos roles biológicos, entre ellos el control biológico y la actividad antitumoral Jakubiec-Krzesniak et al. 2018; Alam et al. 2022; Donald et al. 2022). Los valores moderados de CL50 se ubicaron entre 100 y 191 µg/mL, una dosis considerablemente menor en comparación con las dosis terapéuticas de benznidazol (5–7 mg/kg/día en adultos) y nifurtimox (8–10 mg/kg/día) (Nayaka et al. 2020).

De manera destacada, la fracción ST-43-EAM-F2 contenía anfomicina, un compuesto previamente reportado con actividad antiparasitaria frente a *P. falciparum* y *T. gondii* (Pagmadulam et al. 2020), además de ser conocido por su capacidad para inhibir la síntesis de peptidoglicano en bacterias Grampositivas (Zhang et al. 2023). También se identificó la presencia de K-252-C-Aglicona (estaurosporina), un alcaloide aislado de *Streptomyces* sp. 196 y de *S. staurosporeus*, reconocido por su capacidad para inhibir quinasas (Zhang et al. 2023), así como por sus propiedades antibacterianas (Kumar et al. 2019) y antifúngicas (Li et al. 2014; Khosravi-Babadi et al. 2021). Estos resultados refuerzan observaciones previas que señalan que los compuestos proteicos producidos por *Streptomyces*, particularmente por algunas cepas específicas, pueden ejercer efectos antiparasitarios (Inahashi et al. 2015),

aunque no son los únicos responsables de la actividad contra especies de *Trypanosoma*. La estaurosporina, perteneciente al grupo de los alcaloides, ha sido descrita como inhibidor de la síntesis de ADN en células eucariotas (Maatsuura y Fett-Neto 2015), mientras que la anfomicina, un lipopéptido, actúa bloqueando la síntesis de sacáridos vinculados al dolicol en células eucariotas, proceso necesario para la glicosilación de glicoproteínas (Rubinchik et al. 2011).

En conclusión, este estudio destaca el potencial de *Streptomyces thermocarboxydus* (ST-C43) y *Streptomyces* sp. S-C104 como fuentes prometedoras de compuestos con actividad antiparasitaria frente a *T. cruzi*. Aunque la actividad detectada fue moderada en comparación con reportes anteriores sobre *T. brucei*, la ausencia de toxicidad en modelos de bioseguridad, junto con la identificación de metabolitos bioactivos como la anfomicina y la estaurosporina, respalda su posible aplicación en estrategias de biocontrol. Los hallazgos sugieren que factores como las condiciones específicas de cultivo y posibles interacciones sinérgicas entre compuestos podrían influir en la eficacia antiparasitaria observada. Se recomienda realizar investigaciones adicionales orientadas a la purificación de los compuestos activos, la elucidación de sus mecanismos de acción y el análisis genómico de los grupos de genes biosintéticos, con el objetivo de optimizar el potencial terapéutico de los metabolitos extracelulares producidos por *Streptomyces*.

IX. CONCLUSIÓN

Los metabolitos extracelulares producidos por las cepas ST-C43 y S-C104 mostraron actividad inhibitoria frente a *Trypanosoma cruzi*, con valores de CL₅₀ que variaron entre 102-191 µg/mL. Estos compuestos se caracterizaron por su baja toxicidad, ausencia de citotoxicidad y falta de efectos hemolíticos, además de presentar índices de selectividad favorables.

En particular, las fracciones ST-C43-EAM-F2 y ST-C43-EAM-F4 destacaron por mantener valores de CL₅₀ entre 115-124 µg/mL, junto con un perfil de seguridad compatible con potencial uso terapéutico. El análisis químico permitió identificar anfomicina y estaurosporina K-252-C-aglicona, compuestos con propiedades antiparasitarias previamente descritas. Estos resultados resaltan el potencial de los metabolitos derivados de ST-C43 como candidatos prometedores en el desarrollo de nuevas terapias contra la enfermedad de Chagas. En contraste, las fracciones obtenidas de la cepa S-C104 no evidenciaron actividad tripanocida relevante.

En resumen, los compuestos bioactivos presentes en los metabolitos extracelulares de *Streptomyces*, especialmente los de ST-C43, constituyen una fuente prometedora de nuevos agentes antiparasitarios. Sin embargo, se requieren estudios *in vivo* adicionales, lo que incluye evaluaciones preclínicas, para confirmar su eficacia y seguridad antes de considerar su aplicación clínica.

X. PERSPECTIVAS

Verificar si los compuestos aislados poseen actividad tripanosomicida.

Analizar la permeabilidad de las células utilizadas con el fin de conocer el daño provocado a amastigotes.

Determinar el mecanismo de acción de los compuestos sobre *T. cruzi*.

Establecer la actividad de los compuestos sobre diferentes DTUs de *T. cruzi*.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelmohsen UR, Bayer K, Hentschel U. 2014. Diversity, abundance and natural products of marine sponge-associated actinomycetes. *Natural product reports* 31:381-399. <http://doi.org/10.1039/c3np70111e>
- Abdelmohsen UR, Yang C, Horn H, Hajjar D, Ravasi T, Hentschel U. 2014. Actinomycetes from Red Sea sponges: sources for chemical and phylogenetic diversity. *Marine drugs* 12:2771-2789. <https://doi.org/10.3390/md12052771>
- Al-Adhroey AH, Nor ZM, Al-Mekhlafi HM, Mahmud R. 2010. Median lethal dose, antimalarial activity, phytochemical screening and radical scavenging of methanolic *Languas galanga* rhizome extract. *Molecules* (Basel, Switzerland) 15:8366–8376.
- Alam K, Mazumder A, Sikdar S, Zhao YM, Hao J, Song C, Li A. 2022. *Streptomyces*: The biofactory of secondary metabolites. *Frontiers in Microbiology* 13:968053. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.968053>
- Alonso-Geli Y, Alonso-Moreno Y, Falcón-Diéguez JE, Lucambio-Miró L, Castro-Piñol M. 2015. Caracterización de la fragilidad osmótica de eritrocitos humanos en la anemia drepanocítica. *Rev. Cub. Quim.* 27:110–118.
- Aponte JU, León JQ, Rojas RD, Montero ST, Loayza LS. 2015. Actividad antimicrobiana y sinérgica de metabolitos producidos por *Streptomyces erythrogriseus* M10-77 de origen marino. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 35:17-20.
- Argüello-García R, Leitsch D, Skinner-Adams T, Ortega-Pierres MG. 2020. Drug resistance in *Giardia*: Mechanisms and alternative treatments for Giardiasis. *Advances in parasitology* 107:201-282. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2019.11.003>
- Balakrishnan K, Dharumadurai D, Ramasamy T, Manickam M. 2022. An *In Vitro* Antiamoebic Activity of Actinobacteria. *Methods in Actinobacteriology* 413-417. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1728-1_52
- Bargues MD, Schofield CJ, Dujardin JP. 2010. Classification and phylogeny of the Triatominae. In *American Trypanosomiasis*, BArgues MD y Schofield CJ (1a eds). Elsevier: Ámsterdam, pp. 117-147. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384876-5.00006-X>

- Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk HP, Clpement, C, Ouhdouch Y, van Wezel GP. 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80:1-43. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
- Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, Vaubourdolle M. 2007. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nature protocols* 2:481-485. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(01\)00408-2](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(01)00408-2)
- Bavya M, Mohanapriya P, Pazhanimurugan R, Balagurunathan R. 2011. Potential bioactive compound from marine actinomycetes against biofouling bacteria. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences* 40:578-582.
- Bermudez J, Davies C, Simonazzi A, Real JP, Palma S. 2016. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Trop* 156:1-16. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.12.017>
- Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP. 2011. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clinical microbiology reviews* 24:655–681. <https://doi.org/10.1128/CMR.00005-11>
- Bern C, Martin DL, Gilman RH. 2011. Acute and congenital Chagas disease. In *Advances in parasitology* 75:19-47. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385863-4.00002-2>
- Bern C. 2015. Chagas' disease. *New England Journal of Medicine* 373:456-466. <http://doi.org/10.1056/NEJMra1410150>
- Birch H, Redman AD, Letinski DJ, Lyon DY, Mayer P. 2019. Determining the water solubility of difficult-to-test substances: a tutorial review. *Analytica chimica acta* 1086:16-28.
- Burckhardt RM, VanDrisse CM, Tucker AC, Escalante-Semerena JC. 2020. New AMP-forming acid: CoA ligases from *Streptomyces lividans*, some of which are posttranslationally regulated by reversible lysine acetylation. *Molecular microbiology* 113:253-269.
- Butt UD, Khan S, Liu X, Sharma A, Zhang X, Wu B. 2024. Present status, limitations, and prospects of using *Streptomyces* bacteria as a potential probiotic agent in aquaculture. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 16:426-442. <https://doi.org/10.1007/s12602-023-10053-x>

- Carlier Y, Torrico F, Sosa-Estani S, Russomando G, Luquetti A, Freilij H, Vinas PA. 2011. Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1250. <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001250>
- Cartuche L, Sifaoui I, López-Arencia A, Bethencourt-Estrella CJ, San Nicolás-Hernández D, Lorenzo-Morales J, Fernández JJ. 2020. Antikinetoplastid activity of indolocarbazoles from *Streptomyces sanyensis*. *Biomolecules* 10:657.
- Castro JA, de Mecca MM, Bartel LC. 2006. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol* 25:471-479. <http://doi.org/10.1191/0960327106het6530a>
- Cázares-Jaramillo GE, Molina-Garza ZJ, Luna-Cruz IE, Solís-Soto LY, Rosales-Encina JL, Galaviz-Silva L. 2023. *In vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of methanolic extract of *Bidens pilosa* and identification of active compounds by gas chromatography-mass spectrometry analysis. *Parasites, Hosts and Diseases* 61:405.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2017). American Trypanosomiasis. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2019). American Trypanosomiasis. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2021). Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease). Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>
- Cerna-Chávez E, Rodríguez-Rodríguez JF, García-Conde KB, Ochoa-Fuentes YM. 2024. Potential of *Streptomyces avermitilis*: A Review on Avermectin production and its biocidal effect. *Metabolites* 14:374. <https://doi.org/10.3390/metabo14070374>
- Cheng C, MacIntyre L, Abdelmohsen UR, Horn H, Polymenakou PN, Edrada-Ebel R, Hentschel U. 2015. Biodiversity, anti-trypanosomal activity screening, and metabolomic profiling of actinomycetes isolated from Mediterranean sponges. *PloS one* 10:e0138528. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138528>
- Contreras V, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S. 1985. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16:315–327. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(85\)90073-8](https://doi.org/10.1016/0166-6851(85)90073-8)

- Coura JR. 2003. Tripanosomose, doença de Chagas. *Ciência e Cultura* 55:30-33.
- Coura JR. 2015. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-A comprehensive review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 110:277-282. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276140362>.
- Cuozzo S, De LeBlanc AD, LeBlanc JG, Hoffmann N, Tortella GR. 2023. *Streptomyces* genus as a source of probiotics and its potential for its use in health. *Microbiol. Res.* 266:127248. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127248>
- Dashti Y, Grkovic T, Abdelmohsen UR, Hentschel U, Quinn RJ. 2014. Production of induced secondary metabolites by a co-culture of sponge-associated actinomycetes, *Actinokineospora* sp. EG49 and *Nocardiopsis* sp. RV163. *Marine drugs* 12:3046-3059. <https://doi.org/10.3390/md12053046>.
- de Noya BA, Colmenares C, Díaz Z, Ruiz R, Medina K, Muñoz A, Mauriello L, Cabrera E, Montiel L, Losada S, Martínez J, Espinosa R, Abate T. 2016. Orally-transmitted Chagas disease: Epidemiological, clinical, serological and molecular outcomes of a school microepidemic in Chichiriviche de la Costa, Venezuela. *Parasite Epidemiology and Control* 1:188–198. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2016.02.005>
- de Noya BA, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Muñoz-Calderón A, Noya O. 2015. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 110:377–386. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140285>
- de Souza WD. 2009. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104:89-100.
- Del Puerto R, Nishizawa JE, Kikuchi M, Iihoshi N, Roca Y, Avilas C, Gianella A, Lora J, Dalrico U, Gutierrez FU, Renjel LA, Miura S, Higo H, Komiya N, Maemura K, Hirayama K. 2010. Lineage analysis of circulating *Trypanosoma cruzi* parasites and their association with clinical forms of Chagas disease in Bolivia. *PLoS neglected tropical diseases* 4:e687. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000687>
- Dharmaraj S, Alagarsamy S. 2010. Antagonistic potential of marine Actinobacteria against fish and shellfish pathogens. *Turkish Journal of Biology* 35:1001-30.

- Díaz ML, González CI. 2014. Enfermedad de Chagas agudo: transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* como una vía de transmisión re-emergente. Revista de la Universidad Industrial de Santander 46:177-188. <http://doi.org/10.18273/revsal>
- Donald L, Pipite A, Subramani R, Owen J, Keyzers RA, Taufa T. 2022. *Streptomyces*: Still the biggest producer of new natural secondary metabolites, a current perspective. Microbiology Research 13:418-465.
- Fernández-Calienes AV, Mendiola JM, Monzote LF, García MP, Sariego IR, Acuña DR, Scull RL, Gutiérrez YG. 2009. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. Rev. Cubana Med. Trop. 61:254-258.
- Filigheddu MT, Górgolas M, Ramos JM. 2017. Orally-transmitted Chagas disease. Enfermedad de Chagas de transmisión oral. Med Clin (Barc) 148:125-131. <http://doi.org/10.1016/j.medcli.2016.10.038>
- Galaviz-Silva L, Mercado-Hernández R, Zárate-Ramos JJ, Molina-Garza ZJ. 2017. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs and small mammals in Nuevo León, Mexico. Rev Argent Microbiol 49:216-223. <http://doi.org/10.1016/j.ram.2016.11.006>
- Gamaleldin NM, Bakeer W, Sayed AM, Shamikh YI, El-Gendy AO, Hassan HM, Horn H, Abdelmohsen UR, Hozzein WN. 2020. Exploration of Chemical Diversity and Antitrypanosomal Activity of Some Red Sea-Derived Actinomycetes Using the OSMAC Approach Supported by LC-MS-Based Metabolomics and Molecular Modelling. Antibiotics 9:629. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090629>
- Garcia M, Campa-Cordoba A, Saucedo PE, Casanova M, Medina R, Mazón JM. 2015. Isolation and *in vitro* selection of actinomycetes strains as potential probiotics for aquaculture. Veterinary World 8:170-176.
- García-Huertas P, Olmo F, Sánchez-Moreno M, Dominguez J, Chahboun R, Triana-Chávez O. 2018. Activity *in vitro* and *in vivo* against *Trypanosoma cruzi* of a furofuran lignan isolated from *Piper jericense*. Exp. Parasitol 189:34-42. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.04.009>
- Gascón J, Bern C, Pinazo MJ. 2010. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. Acta Trop 115:22-27. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.07.019>

- Genilloud O. 2017. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. Natural product reports 34:1203-1232. <http://doi.org/10.1039/c7np00026j>
- Hauser DA, Kaiser M, Mäser P, Albisetti A. 2024. Venturicidin A affects the mitochondrial membrane potential and induces kDNA loss in *Trypanosoma brucei*. Agents Chemother 68:e01671-23. <https://doi.org/10.1101/2024.01.12.575445>
- Hernández-Salmerón JE, Prieto-Barajas CM, Valencia-Cantero E, Moreno-Hagelsieb G, Santoyo G. 2014. Isolation and characterization of genetic variability in bacteria with β -hemolytic and antifungal activity isolated from the rhizosphere of *Medicago truncatula* plants. Genet. Mol. Res. 13:4967–4975. <http://doi.org/10.4238/2014.July.4.11>
- Inahashi Y, Iwatsuki M, Ishiyama A, Matsumoto A, Hirose T, Oshita J, Sunazuka T, Panbangred W, Takahashi Y, Kaiser M, Otoguro K, Ōmura S. 2015. Actinoallolides A–E, new anti-trypanosomal macrolides, produced by an endophytic actinomycete, *Actinoallomurus fulvus* MK10-036. Organic letters 17:864-867. <https://doi.org/10.1021/ol5037216>
- Inahashi Y, Iwatsuki M, Ishiyama A, Namatame M, Nishihara-Tsukashima A, Matsumoto A, Hirose T, Sunazuka T, Yamada H, Otoguro K, Takahashi Y, Ōmura S, Shiomi K. 2011. Spoxazomicins A–C, novel antitrypanosomal alkaloids produced by an endophytic actinomycete, *Streptosporangium oxazolinicum* K07-0460 T. The Journal of antibiotics 64:303-307. <https://doi.org/10.1038/ja.2011.16>
- Jakubiec-Krzesniak K, Rajnisz-Mateusiak A, Guspiel A, Ziemska J, Solecka, J. 2018. Secondary metabolites of actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties. Polish journal of microbiology 67:259-272. <https://doi.org/10.21307/pjm-2018-048>
- Kaaniche F, Hamed A, Elleuch L, Chakchouk-Mtibaa A, Smaoui S, Karray-Rebai I, Mellouli L. 2020. Purification and characterization of seven bioactive compounds from the newly isolated *Streptomyces cavourensis* TN638 strain via solid-state fermentation. Microbial pathogenesis 142:104106. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104106>
- Kannahi M, Eshwari NT. 2016. Extraction, purification and antibacterial activity of bioactive compounds from marine *Bacillus* species. Int. J. Pure Appl. Biosci 4.4:244–254.

- Khosravi-Babadi Z, Ebrahimipour G, Wink J, Narmani A, Risdian C. 2021. Isolation and identification of *Streptomyces* sp. Act4Zk, a good producer of Staurosporine and some derivatives. Lett. Appl. Microbiol :72.2, 206–218. <https://doi.org/10.1111/lam.13415>
- Kohl L, Bastin P. 2005. The flagellum of trypanosomes. International review of cytology 244:227-285. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)44006-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)44006-1)
- Kumar P, Kundu A, Kumar M, Solanki R, Kapur MK. 2019. Exploitation of potential bioactive compounds from two soil derived actinomycetes, *Streptomyces* sp. strain 196 and RI. 24. Microbiol. Res. 229:126312. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126312>
- Lagarto AP, Silva RY, Guerra IS, Iglesias LB. 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. Phytomedicine 8:395–400. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00044>
- León J, Aponte JJ, Cuadra D, Galindo N, Jaramillo L, Vallejo M, Marguet E. 2016. Actinomicetos aislados de *Argopecten purpuratus* productores de enzimas extracelulares y con actividad inhibitoria de patógenos marinos. Revista de biología marina y oceanografía 51:69-80. <http://doi.org/10.4067/S0718-19572016000100007>
- Li S, Zhao G, Sun M, He H, Wang H, Li Y, Lu CH, Shen YM. 2014. Identification and characterization of the biosynthetic gene cluster of divergolides from *Streptomyces* sp. W112. Gene 544:93–99. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.04.052>
- Luan X Zhang LJ, Li XQ, Rahman K, Zhang H, Chen HZ, Zhang WD. 2020. Compound-based Chinese medicine formula: From discovery to compatibility mechanism. Journal of ethnopharmacology 254:112687.
- Maatsuura HN, Fett-Neto AG. 2015. Plant Alkaloids: Main Features, Toxicity, and Mechanisms of Action. Plant Toxins 2:1–15. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6728-7_2-1
- Mahajan GB, Balachandran L. 2012. Antibacterial agents from actinomycetes-a review. Frontiers in bioscience 4:240-253. <http://doi.org/10.2741/373>
- Margioto AP, De Abreu AP, Abegg CP, Gomes ML, De Ornelas MJ. 2016. Outcome of oral infection in mice inoculated with *Trypanosoma cruzi* IV of the Western Brazilian Amazon. Acta Tropica 166:212-217. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.019>

- Martinez AFC, Mello FMP, Zucchi TD, Melo IS, Moraes LAB. 2020. Tandem mass spectrometry methods to accelerate the identification of phytotoxic metabolites produced by *Streptomyces* sp. 39 PL. Natural product research 34:210-216.
- Martínez JA, Alejandre R, Paredes E, Martínez MA, Solorio M, Noguera B, Trujillo F, Novelo M. 2007. Biology of three species of North American Triatominae (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) fed on rabbits. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 102:925-930. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007000800006>
- Martínez M, Mancuello C, Pereira C, González F, Prieto R, Rolón M, Álvarez S, Benítez B. 2013. Estudio espectrofotométrico de la actividad hemolítica del extracto crudo de *Phoradendron bathyoryctum* Eichler sobre eritrocitos humanos. Steviana 5:114–121. https://doi.org/10.56152/StevianaFacenV5A6_2013
- Martinez-Peinado N, Martori C, Cortes-Serra N, Sherman J, Rodriguez A, Gascon J, Alonso-Padilla J. 2021. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of metabolism modifier compounds. International journal of molecular sciences 22:688. <https://doi.org/10.3390/ijms22020688>
- Masand M, Jose PA, Menghani E, Jebakumar SRD. 2015. Continuing hunt for endophytic actinomycetes as a source of novel biologically active metabolites. World Journal of Microbiology and Biotechnology 31:1863-1875. <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1950-y>
- McPhee SJ, Papadakis MA, Rabow MW. 2013. Current Medical Diagnosis & Treatment, McPhee SJ, Papadakis MA (50th ed). McGraw Hill: México, p. 1423.
- Molina-Garza ZJ, Bazaldúa-Rodríguez AF, Quintanilla-Licea R, Galaviz-Silva L. 2014. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of 10 medicinal plants used in northeast Mexico. Acta tropica 136:14-18. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.04.006>
- Muelas-Serrano S, Nogal-Ruiz J, Gómez-Barrio A. 2000. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Parasitol Res 86:999–1002.
- Müller-Kratz J, Garcia-Bournissen F, Forsyth CJ, Sosa-Estani S. 2018. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. Expert Review of Clinical Pharmacology 11:943-957. <https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1509704>

- Nayaka S, Muthuraj R, Chakraborty B, Bhat MP, Pallavi SS, Shashiraj KN, Halaswamy HM, Dhanyakumara SB, Airodagi D, Haged K. 2020. A Potential bioactive secondary metabolites and antimicrobial efficacy of *Streptomyces thermocarboxydus* strain KSA-2, isolated from Kali River, Karwar. Curr. Res. Microbiol. Infect. 1:5–13. <https://doi.org/10.31559/CRMI2020.1.1.2>
- Neira L, Stashenko E, Escobar P. 2014. Actividad antiparasitaria de extractos de plantas colombianas de la familia Euphorbiaceae. Revista de la Universidad Industrial de Santander 46:15-22.
- Ni HJ, Lv SY, Sheng YT, Wang H, Chu XH, Zhang HW. 2021. Optimization of fermentation conditions and medium compositions for the production of chrysomycin a by a marine-derived strain *Streptomyces* sp. 891. Preparative Biochemistry & Biotechnology 51:998-1003. <https://doi.org/10.1080/10826068.2021.1885046>
- Organización Panamericana de la Salud. 2010. Guía para la atención clínica integral del paciente con enfermedad de Chagas. Disponible en: https://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=zoonosis-779&alias=207-guia-enfermedad-chagas-7&Itemid=518
- Osorio E, Arango GJ, Jiménez N, Alzate F, Ruiz G, Gutiérrez D, Paco MA, Giménez A, Robledo S. 2007. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. J. Ethnopharmacol 111:630–635. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.01.015>
- Pagmadulam B, Tserendulam D, Rentsenkhand T, Igarashi M, Sawa R, Nihei CI, Nishikawa Y. 2020. Isolation and characterization of antiprotozoal compound-producing *Streptomyces* species from Mongolian soils. Parasitology international 74:101961. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.101961>
- Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo AM, Franco R, Días V, Passos L. 2009. Chagas' Disease as a Foodborne Illness. Journal of Food Protection 72:441–446.
- Pérez KC, Galaviz L, Iracheta JM, Lucero EA, Molina ZJ. 2017. Activity against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) of methanolic extracts of medicinal use plants in Mexico. Revista de Biología Tropical 65:1459-1469.

- Pérez-Rojas F, León-Quispe J, Galindo-Cabello N. 2015. Actinomicetos aislados del compost y su actividad antagonista a fitopatógenos de la papa (*Solanum tuberosum* spp. andigena Hawkes). *Revista mexicana de fitopatología* 33:116-139.
- Pinazo MJ, Cañas E, Elizalde JI, García M, Gascón J, Gimeno F, Gómez J, Guhl F, Ortiz V, Posada EJ, Puente S, Rezende J, Salas J, Saravia J, Torrico F, Torrus D, Treviño B. 2010. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. *Gastroenterologia y hepatologia* 33:191-200. <http://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2009.07.00>
- Pinheiro E, Brum-Soares L, Reis R, Cubides JC. 2017. Chagas disease: review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 50:296-300. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0433-2016>
- Pizzolatti M, Koga A, Gisgard E, Steinde M. 2003. Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. *Phytomedicine* 9:422–426.
- Qureshi KA, Al-Nasr I, Koko WS, Khan TA, Fatmi MQ, Imtiaz M, Prajapati DK. 2021. *In vitro* and *in silico* approaches for the antileishmanial activity evaluations of actinomycins isolated from novel *Streptomyces smyrnaeus* strain UKAQ_23. *Antibiotics* 10:887.
- Rao KVR, Mani P, Satyanarayana B, Rao TR. 2017. Purification and structural elucidation of three bioactive compounds isolated from *Streptomyces coelicoflavus* BC 01 and their biological activity. *Biotech* 7:24. <http://doi.org/10.1007/s13205-016-0581-9>
- Rassi A, de Rezende JM. 2012. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infectious Disease Clinics* 26:275-291. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>
- Rassi AJ, Rassi A, Marin-Neto JA. 2010. Chagas disease. *The Lancet* 375:1388-1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Rodríguez D, Barreto A. 2015. Propiedades biológicas de *Pedilanthus tithymaloides*: una alternativa natural de tratamiento. *CienciActual* 5:40-48.
- Rodríguez-Garza NE, Marín M, Sánchez-Montejo J, Elizondo-Luévano JH, Bazaldúa-Rodríguez AF, Quintanilla-Licea R, Romo-Sáenz CI, Peláez R, Muro A, López-Abán J. 2025. Antiparasitic Activity of *Chalepensis* and *Graveoline* Isolated from *Ruta*

- chalepensis* L.: In Vitro Evaluation Against *Strongyloides venezuelensis*. Pathogens 14:419. <https://doi.org/10.3390/pathogens14050419>
- Rodríguez-Pérez EG. 2013. Parasitología médica. Editorial El Manual Moderno S. A. de C. V., Rodríguez-Pérez EG (1 ed). México.
- Rojo-Medina J, Ruiz-Matus C, Salazar-Schettino PM, González-Roldán JF. 2018. Enfermedad de Chagas en México. Gaceta Médica de México, Rojo-Medina J (154 ed). México, pp. 605-612. <http://doi.org/10.24875/GMM.18004515>
- Ruanpanun P, Chamswarnng C. 2016. Potential of actinomycetes isolated from earthworm castings in controlling root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Journal of General Plant Pathology 82:43-50. <http://doi.org/10.1007/s10327-015-0637-4>
- Rubinchik E, Schneide T, Elliott M, Scott WRP, Pan J, Anklin C, Yang H, Dugourd D, Müller A, Gries K. 2011. Mechanism of action and limited cross-resistance of new lipopeptide MX-2401. Antimicrob. Agents Chemother. 2011, 55, 2743–2754. <https://doi.org/10.1128/aac.00170-11>
- Rueda K, Trujillo JE, Carranza JC, Vallejo GA. 2014. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological scenario for Chagas' disease in Colombia and other South American countries. Biomédica 34:631–41. <http://doi.org/10.1590/S0120-41572014000400017>
- Sabino EC, Ribeiro AL, Salemi VM, Di CLO, Antunes AP, Menezes MM, Ianni BM, Nastari L, Fernandes F, Patavino GM, Sachdev V, Capuani L, de Almeida-Neto C, Carrick DM, Wright D, Kavounis K, Gonzalez TT, Carneiro-Proietti AB, Custer B, Busch MP, Murphy EL. 2013. Ten-year incidence of Chagas cardiomyopathy among asymptomatic *Trypanosoma cruzi*-seropositive former blood donors. Circulation 127:1105-1115. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.123612>
- Salwan R, Sharma V. 2020. Bioactive compounds of *Streptomyces*: biosynthesis to applications. Studies in natural products chemistry 64:467-491. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817903-1.00015-2>
- Sangkanu S, Rukachaisirikul V, Suriyachadkun C, Phongpaichit S. 2017. Evaluation of antibacterial potential of mangrove sediment-derived actinomycetes. Microbial pathogenesis 112:303-312. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.010>

- Sangkanu S, Rukachaisirikul V, Suriyachadkun C, Phongpaichit S. 2017. Evaluation of antibacterial potential of mangrove sediment-derived actinomycetes. *Microb. Pathog.* 112:303–312. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.010>
- Santos CC, Scharfstein J, de A-Lima APC. 2006. Role of chagasin-like inhibitors as endogenous regulators of cysteine proteases in parasitic protozoa. *Parasitol. Res.* 99:323–324. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0195-y>
- Sebak M, Saafan AE, Abdelghani S, Bakeer W, Moawad AS, El-Gendy AO. 2021. Isolation and optimized production of putative antimicrobial compounds from Egyptian soil isolate *Streptomyces* sp. MS. 10. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences 10:1-12.
- Secretaría de Salud. 2015. Lineamientos Para La Vigilancia Epidemiológica de Chagas Por Laboratorio. INDRE-DGE-Secretaría de Salud. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/483705/Lineamientos_Chagas_4T.pdf
- Shepherdson EM, Baglio CR, Elliot MA. 2023. *Streptomyces* behavior and competition in the natural environment. *Current Opinion in Microbiology* 71:102257. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102257>
- Steverding D, Wang X, Potts BC, Palladino MA. 2012. Trypanocidal activity of β -lactone- γ -lactam proteasome inhibitors. *Planta medica* 78:131-134. <http://doi.org/10.1055/s-0031-1280315>
- Stuart KA, Welsh K, Walker MC, Edrada-Ebel R. 2020. Metabolomic tools used in marine natural product drug discovery. *Expert opinion on drug discovery* 15:499-522.
- Subramani R, Aalbersberg W. 2012. Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological research* 167:571-580. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.06.005>
- Tangerina MM, Furtado LC, Leite VM, Bauermeister A, Velasco-Alzate K, Jimenez PC, Pena-Ferreira MJ. 2020. Metabolomic study of marine *Streptomyces* sp.: Secondary metabolites and the production of potential anticancer compounds. *PLoS One* 15:e0244385. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0244385>

- Tempone A, Treiger S, de Andrade H, de Amorim N, Yogi Á, Salerno C, Bachiega D, Lupo F, Bonotto S, Fischer D. 2005. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. *Phytomedicine* 12:382–390.
- Thakare R, Dasgupta A, Chopra S. 2021. Update on nifurtimox for treatment of Chagas disease. *Drugs Today* 57:251-263. <https://doi.org/10.1358/dot.2021.57.4.3251712>
- Thomas ME, Rasweiler IJJ, D'Alessandro A. 2007. Experimental transmission of the parasitic flagellates *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* between triatomine bugs or mice and captive neotropical bats. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102:559-565. <http://doi.org/10.1590/s0074-02762007005000068>
- Toso A, Vial F, Galanti N. 2011. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Revista médica de Chile* 139:258-266.
- Toumatia O, Yekkour A, Goudjal Y, Riba A, Coppel Y, Mathieu F, Sabaou N, Zitouni A. 2015. Antifungal properties of an actinomycin D-producing strain, *Streptomyces* sp. IA1, isolated from a Saharan soil. *Journal of basic microbiology* 55:221-228. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400202>
- Valdés-Iglesias O, Díaz N, Cabranes Y, Acevedo M, Areces A, Graña L, Díaz C. 2003. Macroalgas de la plataforma insular cubana como fuente de extractos bioactivos. *Avicennia* 16:36-45.
- Valencia L, Muñoz DL, Robledo SM, Echeverri F, Arango GJ, Vélez ID, Triana O. 2011. Trypanocidal and cytotoxic activity of extracts of Colombian plants. *Biomedica* 31:552–559.
- Van der Meij A, Worsley SF, Hutchings MI, van Wezel GP. 2017. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS microbiology reviews* 41:392-416. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux005>
- Vivero-Gomez RJ, Largo DF, Cadavid-Restrepo G, Duque-Granda D, Moreno-Herrera CX. 2025. Studying the interactions between microbiomes and *Leishmania* parasites in sand flies: A source of new targets for pathogen control. In *Recent Advances in Parasitomics: Implications for Parasite and Vector Research*, Ramírez-González JD (1ra ed). Springer: Cham, Switzerland, pp. 315–341. https://doi.org/10.1007/978-3-031-70591-5_16

- Will WR, Fang FC. 2020. The evolution of MarR family transcription factors as counter-silencers in regulatory networks. *Current opinion in microbiology* 55:1-8.
- Wink M. 2012. Medicinal plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. *Molecules* 17:12771-12791.
<https://doi.org/10.3390/molecules171112771>
- World Health Organization (WHO). (2020). Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponible en: <https://www.who.int/health-topics/chagas-disease>
- Yao Z, Fan J, Dai J, Yu C, Zeng H, Li Q, Zhou R. 2023. A High-Throughput Method Based on Microculture Technology for Screening of High-Yield Strains of Tylosin-Producing *Streptomyces fradiae*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 33:831.
<https://doi.org/10.4014/jmb.2210.10023>
- Zapata B, Durán C, Stashenko E, Betancur-Galvis L, Mesa-Arango A. 2009. Actividad antimicótica, citotoxicidad y composición de aceites esenciales de plantas de la familia Labiatae. *Revista de la Universidad Industrial de Santander Salud* 41:223-230.
- Zhang M, Zhang Q, Zhang Q, Cui X, Zhu L. 2023. Promising antiparasitic natural and synthetic products from marine invertebrates and microorganisms. *Mar. Drugs* 21:84.
<https://doi.org/10.3390/md21020084>
- Zheng G, Liu P, He W, Tao H, Yang Z, Sun C, Jiang W. 2021. Identification of the cognate response regulator of the orphan histidine kinase OhkA involved in both secondary metabolism and morphological differentiation in *Streptomyces coelicolor*. *Applied microbiology and biotechnology* 105:5905-5914.
- Zin NM, Ng KT, Sarmin NM, Getha K, Tan GY. 2011. Anti-trypanosomal activity of endophytic streptomycete. *Current Research in Bacteriology* 4:1-8.
<http://doi.org/10.3923/crb.2011.1.8>
- Zohra M, Fawzia A. 2014. Hemolytic activity of different herbal extracts used in *Algeria*. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 5:495–500.