

T
1189

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

11225

124225

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



CASA ABIERTA AL TIEMPO

**ACTIVIDAD *in vivo* DEL COMPUESTO acetato de (8-hidroximetilen)-
trieicosanilo AISLADO DE LAS HOJAS DE *Senna villosa* CONTRA
LAS FORMAS DE TRIPOMASTIGOTE Y AMASTIGOTE DE
Trypanosoma cruzi.**

Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

P R E S E N T A

Matilde Jiménez Coello

Comité Tutorial

Dra. Salud Pérez Gutiérrez

Dra. Eugenia Guzmán Marín

Dra. Karla Acosta Viana

Septiembre de 2009.

**“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma
Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT
y además cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93”**

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de
las Unidades Iztapalapa y Xochimilco
___ aprobó la tesis que presentó

Matilde Jiménez Coello

El día 22 de septiembre del año de 2009.

Jurado:

Tutor: Dra. Salud Pérez Gutiérrez  _____

Asesor: Dra. Eugenia Guzmán Marín  _____

Asesor: Dra. Karla Acosta Viana _____

Sinodal: Dr. Miguel Ángel Zavala Sánchez  _____

Sinodal: Dr. Alejandro Azaola Espinosa  _____

DEDICATORIAS.

A **Antonio**, mi compañero de vida.

A **Carlos Fabián**, por ser la razón y alegría de mí ser.

A mis padres, **Carlos y Esperanza** por su profundo amor, cariño incondicional y sabio consejo.

A **Claudia, José Carlos y Diego**, por ser la mejor familia del mundo.

AGRADECIMIENTOS.

A **Karla y Eugenia**, mis amigas, mi equipo y también mis compañeras entrañables, que me han dado su amistad sincera, confianza y guía.

A **Salud**, por su apoyo, orientación y certeza como amiga y directora.

A mis **compañeros del Centro de Investigaciones**: directiva, personal de laboratorio, bioterio, administrativos y manuales, con quienes comparto diariamente en el quehacer universitario.

A mis compañeros del laboratorio de la UAM-X, especialmente al **Dr. Cuahutémoc Perez** y a **Anita Susunaga**, por su apoyo, colaboración y amistad durante mis estancias.

A la Universidad Autónoma de Yucatán.

A la Universidad Autónoma Metropolitana.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Al Programa de Mejoramiento del Profesorado. (PROMEP)

RESUMEN.

Se evaluó *in vivo* la actividad antiprotozoaria del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo obtenido del extracto clorofórmico de las hojas de *Senna villosa* Mill. H.S. Irwin & Barneby Leguminoceae (*S. villosa*) hacia *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Las administraciones oral de las dosis 2.1, 8.4, y 33.6 µg/g inmediatamente posterior a la infección fueron evaluadas durante 28 días en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*. Se observó reducción en la parasitemia de 70.5, 73.8 y 80.9% respectivamente. Se observó una importante reducción (82.2 y 86.25%) en la cantidad de nidos de amastigote en el tejido cardíaco de los animales tratados a las dosis más altas (8.4 y 33.6 µg/g). Fue imposible determinar la LD₅₀ del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo debido a que ninguno de los animales murió, aun empleando dosis de 5000 µg/g, y por consiguiente, no se logró determinar la toxicidad oral aguda *in vivo*. Asimismo, se evaluó la actividad del compuesto 15 días post-inoculación, cuando la parasitemia estaba completamente instaurada en el modelo animal. Los animales tratados durante 15 días recibieron dosis de 16.8 y 33.6 µg/g y se observó una reducción de la parasitemia del 77.6 y 64.1%; respectivamente, al compararlos con animales infectados y no tratados. En los ratones tratados con alopurinol (8.5 µg/g) solamente se observó una inhibición del 29.7%. El número de nidos de amastigotes también fue reducido de manera importante en comparación a los grupos controles en las dos dosis evaluadas. Se realizó un experimento para evaluar la reversión del efecto del compuesto evaluado, y se determinó que la inhibición parasitaria fue reversible cuando se suspende el tratamiento. Bajo ninguna de las condiciones evaluadas se logró erradicar la presencia del agente causal, sin embargo es necesario evaluar dosis más altas (empleando extracto clorofórmico de *S. villosa* debido al bajo rendimiento en la obtención del compuesto), periodos de tratamiento más largos y durante la fase crónica de la enfermedad.

ABSTRACT.

The activity of a (8-hydroxymethylen)-trieicosanyl acetate compound obtained from *Senna villosa* (Mill.) chloroform extracts of H.S. Irwin & Bameby (*S. villosa*) against *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) was evaluated *in vivo*. Oral doses of 2.1, 8.4, and 33.6 µg/g were tested for 28 days in BALB/c mice infected with *T. cruzi*. Reduced parasitemia levels of 70.5, 73.8, and 80.9%, respectively, were observed. A significant reduction in amastigote nests was detected in the cardiac tissue of treated animals at doses of 8.4 and 33.6 µg/g. The LD₅₀ of (8-hydroxymethylen)-trieicosanyl acetate was not determined because of none of the animals died, even at oral doses of 5000 µg/g; consequently, the acute oral toxicity it was not determined because the evaluated compound did not show any toxic clinical sign. Also, the antiprotozoal activity was evaluated 15 days post-infection. Animals were treated during 15 days at doses of 16.8 and 33.6 µg/g, showing reduced parasitemia levels of 77.6 and 64.1% respectively in the evaluated doses, in comparison with mice from positive control group (allopurinol 8.5 µg/g), with only 29.7% of parasitemia reduction. The number of amastigote nests observed in cardiac tissue was significantly reduced in treated mice, resulting in 53 and 82 nests in the cardiac tissue from mice treated at doses of 16.8 and 33.6 µg/g respectively, compared with untreated and allopurinol treated mice (394 and 356 amastigote nests; respectively). The reversion of antiprotozoal effect of (8-hydroxymethylen)-trieicosanyl acetate was determined, animals were infected (5×10^4 trypomastigotes of *T. cruzi*) and simultaneously began the treatment with the (8-hydroxymethylen)-trieicosanyl acetate. The treatment was given only during 20 days (16.8 and 33.6 µg/g), and mice were screened during and after the end of administration of the compound for one week more. The anti-trypanosomal efficiency percentages of the evaluated compound were 66.1 and 68.9%. Even 8 days

after treatment ending, a reduction of 58.6 and 56.29 % of trypomastigotes was observed. The number of amastigote nests was 2.7 minor in mice treated with the highest dose evaluated (33.6 µg/g) than untreated animals. The (8-hydroxymethylen)-trieicosanyl acetate did not show a total elimination of blood stream or cardiac tissue trypanosomiasis, however, it showed an important antiprotozoal activity against *T. cruzi*. Nevertheless, it is necessary to evaluate the antitrypanosomal efficacy of this compound under longer periods of administration, using higher doses (even using the chloroform extract of *Senna villosa* Mill) and even during the chronic phase of the Chagas disease.

INDICE GENERAL.

	<u>Página</u>
I. Introducción	12
II. Marco Teórico	13
2.1 Antecedentes de la enfermedad de Chagas	13
2.2 Datos Históricos de la enfermedad de Chagas	14
2.3 Agente causal	16
2.3.1 Amastigote	16
2.3.2 Epimastigote	17
2.3.3 Tripomastigote	18
2.3.4 Características de las poblaciones de <i>T. cruzi</i>	19
2.4 Epidemiología	23
2.4.1 Prevalencia y tendencia de la enfermedad de Chagas en México	24
2.4.2 Vectores	27
2.4.3 Reservorios	28
2.5 Ciclo de vida	28
2.6 Patogenia	30
2.6.1 Fase aguda	30
2.6.2 Fase indeterminada	32
2.6.3 Fase crónica	33
2.7 Diagnóstico	34
2.8 Tratamiento	39
2.9 Medicina tradicional	46
2.9.1 Plantas con bioactividad hacia <i>Trypanosoma cruzi</i>	47
2.9.2 <i>Senna villosa</i>	53
III. Objetivo general	56
IV Objetivos específicos	57
V. Materiales y Métodos	58
5.1 Obtención del extracto crudo y purificación del compuesto acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo.	58
5.2 Parásitos	59
5.3 Modelo animal	59
5.4 Infección de ratones	59
5.5 Administración oral del compuesto evaluado	59
5.6 Determinación de Dosis Letal Media (DL50) y Toxicidad Oral Aguda	60
5.7 Dosis efecto	61
5.8 Regresión del efecto	63
5.9 Análisis estadístico	63

VI. Resultados y Discusión

6.1 Determinación de la dosis letal media (DL ₅₀) y toxicidad oral Aguda	65
6.2 Dosis efecto	65
6.2.1 Efecto del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo en tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> (inicio de tratamiento 24 h post-infección).	65
6.2.2 Efecto del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo en amastigotes de <i>T. cruzi</i> (inicio de tratamiento 24 h post-infección).	67
6.2.3 Mortalidad	69
6.2.4 Efecto del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo en tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> (inicio de tratamiento 15 días post-infección).	71
6.2.5 Efecto del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo en amastigotes de <i>T. cruzi</i> (inicio de tratamiento 15 días post-infección).	73
6.2.6 Mortalidad	75
6.3 Reversión del efecto	78
6.3.1 Mortalidad	82
6.4 Dosis efectiva media (DE50)	83
VII Conclusiones	86
VIII. Perspectivas de la Investigación	87
IX. Bibliografía	88
X. Anexos (artículo científico y carta de aceptación)	99

INDICE DE FIGURAS.

	Pagina
Figura 1. Modelo histotrópico clonal de la enfermedad de Chagas	22
Figura 2. Número de casos e incidencia de casos de enfermedad Chagas en México de 1986- 2006.	25
Figura. 3. Incidencia de casos de enfermedad Chagas por entidad Federativa en la República Mexicana durante 2006.	25
Figura. 4. Enfermedad Chagas en la República Mexicana. Incidencia de casos por mes, acumulado de 1986-2006.	26
Figura 5. Distribución en la República Mexicana de las 9 especies de triatomos de importancia médica.	27
Figura 6. Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	29
Fig. 7. Lineamientos para la evaluación serológica preestablecidos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas	38
Fig.8. Estructura del crisofanol	54
Fig.9 Estructura del fisción	54
Figura 10 Estructura del compuesto acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo.	54
Figura 11. Efecto del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo sobre la curva de parasitemia en ratones BALB/c infectados con 5×10^4 tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> cepa y con inicio del tratamiento 24 horas después de la infección (medias \pm EE)(* $p > 0.05$).	67
Figura 12. Efecto de acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo sobre el número de nidos de amastigotes en ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i> y con inicio del tratamiento 24 h post-infección (** $p < 0.05$).	68
Figura 13. Efecto de acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo sobre la tasa de mortalidad de ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i> y con inicio de tratamiento 24 h después de la infección. (* $p < 0.05$).	70
Figura 14. Curva de parasitemia en ratones BALB/c infectados con 5×10^4 tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> cepa H4 y tratados 15 días post-infección con acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo a las dosis de 16.8 y 33.6 $\mu\text{g/g}$ durante 28 días. (Valores de las medias \pm EE)	71

Figura 15. Efecto de acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo sobre el número de nidos de amastigotes en ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i> y con inicio de tratamiento a los 15 días después de la infección (Valores de las medias \pm EE)	73
Figura 16. Efecto de acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo sobre la tasa de mortalidad en ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i> y con inicio de tratamiento 15 días post-infección.	76
Figura 17. Curva de parasitemia para evaluar la regresión del efecto en ratones BALB/c infectados con 5×10^4 tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> cepa H4 y tratados con acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo a las dosis de 16.8 y 33.6 $\mu\text{g/g}$ durante los primeros 20 días. (Valor de las medias \pm EE)	79
Figura 18. Efecto de acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo sobre el número de nidos de amastigote 28 días post-infección en ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i> y tratados durante 20 días con las dosis 16.8 y 33.6 $\mu\text{g/g}$.	81
Figura 19. Efecto de acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo sobre la tasa de mortalidad en ratones BALB/c infectados con <i>T. cruzi</i> y tratados solo 20 días post-infección con las dosis 16.8 y 33.6 $\mu\text{g/g}$.	82
Figura 20. Dosis efectiva media de acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo (log) durante su administración durante 28 días en ratones BALB/c infectados con la cepa H4 de <i>T. cruzi</i> .	84

I. Introducción.

La enfermedad de Chagas es un grave problema de salud pública, considerada incurable, distribuida en gran parte del continente americano y causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Debido a las características propias del parásito, es capaz de infectar a un gran número de hospederos susceptibles incluyendo al hombre y a pesar de que fue descrita desde principios del siglo XX, no existe cura farmacológica o inmunológica eficaz para el tratamiento de la enfermedad, por lo que ésta es responsable de una importante cantidad de nuevos casos/año, pérdidas económicas así como de muertes atribuidas a la enfermedad principalmente en América Latina. Los principales fármacos empleados para su tratamiento han sido benznidazole y nifurtimox. Ambos compuestos tienen como denominador común el que su empleo induzca una actividad antiprotozoaria pero con un importante número de efectos adversos en los pacientes tratados (vómito, náuseas, cefaleas, entre otros) por lo que existe la necesidad de desarrollar nuevas alternativas de tratamiento para las personas infectadas. Esta situación motiva a la búsqueda de nuevos agentes con actividad antiprotozoaria originados a partir de recursos naturales que han sido empleados durante mucho tiempo en la Medicina tradicional. En Yucatán, como en la mayor parte del país, la enfermedad está presente, sin embargo también existe una riqueza cultural milenaria que en sus usos y costumbres emplea remedios a partir de plantas medicinales. En este trabajo se presentan los resultados de la evaluación del compuesto acetato de (8-hydroximetilen)-tricosanilo aislado de las hojas de *Senna villosa*, considerado como

un recurso natural de la medicina tradicional de la región con actividad antiprotozoaria contra *T. cruzi*.

II. Marco Teórico.

2.1 Antecedentes de la Enfermedad de Chagas

La tripanosomiasis americana, también conocida como la enfermedad de Chagas, es una enfermedad infecciosa ocasionada por el protozooario flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) en la cual se involucran insectos vectores y reservorios mamíferos, incluyendo al humano. Esta enfermedad se encuentra distribuida ampliamente en el continente americano, desde el sur de los Estados Unidos de Norte América, hasta Argentina. En los 21 países donde se ha descrito su presencia, se estiman 41,200 casos nuevos por año, 28 millones de personas en riesgo de contraer la infección, 2 millones de años vida por inhabilitación laboral y de 12,500 a 20,000 defunciones ocasionadas por la enfermedad de Chagas (OMS, 2007).

También se le atribuye que no menos de 55,585 personas por año conformarían el universo de individuos que necesitarían tratamiento etiológico para la enfermedad de Chagas. Está considerada como la enfermedad parasitaria con mayor carga económica en América Latina debido a su prolongada cronicidad. En general, los programas de control han centrado sus presupuestos y sus estrategias hacia la eliminación de los insectos vectores asociados al hábitat humano, y el paciente infectado ha sido relegado a un segundo plano.

Se ha descrito a la tripanosomiasis americana como una zoonosis muy compleja, que continúa representando una grave amenaza para la salud de los

países de la región. Aunque la enfermedad ha sido tradicionalmente asociada a la pobreza y a las malas condiciones de vivienda, esta se encuentra ampliamente difundida tanto en zonas urbanas como rurales, sin embargo su frecuencia continua siendo mayor en las áreas rurales de todo el continente latinoamericano (OMS, 2007).

2.2 Datos históricos de la Enfermedad de Chagas.

Esta zoonosis parasitaria existe en el continente americano desde hace más de 9.000 años, ya que se ha documentado infección chagásica en comunidades prehistóricas que habitaban el norte de Chile (Apt et al., 2006). La tripanosomiasis americana, conocida como enfermedad de Chagas fue descrita en Minas Gerais, Brasil, en 1909, por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, mientras estudiaba una enfermedad hasta el momento desconocida, que estaba ocasionando la muerte en trabajadores de la construcción de una vía ferroviaria en Lassance, Brasil. El Dr. Chagas, observó que un insecto hematófago, se alimentaba de los trabajadores durante la noche, y mas adelante descubrió flagelados en el contenido intestinal de los insectos. Describió entonces una gran similitud del protozooario con el agente causal de la enfermedad del sueño” en África, e investigaciones posteriores, le permitieron determinar el ciclo de vida de *Trypanosoma*, renombrado después con *cruzi* en honor al mentor de su estudio.

El investigador publicó en aquel entonces diversos trabajos en portugués, destacando el artículo que es considerado como clásico y emblemático “*Ueber eine neue Trypanosomiasisdes Menschen*” (Chagas, 1909). Este trabajo fue de gran

calidad e impacto, ya que describió al agente causal, vectores, signos clínicos en seres humanos, animales y la existencia de reservorios animales de una nueva enfermedad. También en aquel documento refirió la presencia del parásito (entonces conocido como *Schizotrypanum cruzi*) en el tracto digestivo del vector invertebrado, su aislamiento en cultivo agar-sangre y la transmisión a vertebrados de flagelados a partir de triatóminos infectados (Wendel y Brener, 1992).

Mazza fue también el primero en describir la posibilidad de un contagio de la enfermedad de Chagas a través de las transfusiones de sangre (Mazza et al., 1936).

Entre las principales aportaciones de este centro de investigación, estuvieron los estudios de Evrando Chagas y Eurico Villela, cuando en 1922 enfatizaron la acción de *T. cruzi* sobre las alteraciones en el ritmo cardiaco en el miocardio y la cardiopatía chagásica como un signo que puede usarse para determinar la incidencia de la enfermedad. El diagnóstico de la enfermedad fue otra de las interrogantes que los investigadores de Lassance estudiaron. La principal contribución fue la hecha por César Guerreiro y Astrogildo Machado, cuando ellos implementaron para el diagnóstico de Chagas la prueba de fijación de complemento, desarrollada en 1906 originalmente para el diagnóstico de sífilis.

Otra contribución importante fue la de Emille Brumpt, quien propuso la aplicación del xenodiagnóstico para la enfermedad de Chagas. Esta investigadora francesa, también contribuyó con establecer que la infección se da a partir de la contaminación por heces y no por la vía de la inoculación como Chagas supuso, lo que fue confirmado posteriormente por Neiva.

En México, el primer reporte relacionado con la enfermedad de Chagas data de 1928, cuando Hofman describió la presencia de *Triatoma dimidiata* en el país. A finales de la década de los 70's en México fueron creados nuevos centros de investigación para el estudio de enfermedades infecciosas, incluyendo la enfermedad de Chagas.

A principios de la década de los 90's, el interés en la investigación acerca de la enfermedad de Chagas se incrementó dramáticamente tanto en el número como en el tipo de publicaciones realizadas.

2.3 Agente causal

El protozoario *T. cruzi*, es un flagelado del Orden Kinetoplastida y la Familia *Trypanosomatidae*, caracterizado por la presencia de un flagelo y un cinetoplasto (estructura especializada que contiene DNA extranuclear) situado en una sola mitocondria. (Wendel et al., 2002).

El parásito *T. cruzi* es un organismo con un ciclo biológico complejo que involucra un hospedero vertebrado y un insecto vector. Posee estadios estructural y funcionalmente diferentes, con determinantes antigénicos específicos, siendo sus estadios los amastigotes, epimastigotes, tripomastigotes metacíclicos y sanguíneos (Palau, 2000).

2.3.1 Amastigote

El amastigote es de morfología esférica y no tiene flagelo libre. El cinetoplasto se ve como un cuerpo denso cerca del núcleo (Cevallos y Hernández, s/a).

Es la forma intracelular replicativa del parásito en el hospedero vertebrado. Mide de 2-4 μm (Carlier et al., 2003).

Ha sido descrita la entrada de amastigotes extracelulares a células de mamífero *in vitro* (HeLa y Vero) y comparada con la infectividad que pueden tener los tripomastigotes metacíclicos. Con esto, se ha confirmado que los mecanismos de invasión celular para cada uno de los estadios son distintos.

2.3.2 Epimastigote

El epimastigote es la forma replicativa del parásito en el insecto vector y en los medios de cultivo. Tiene un flagelo libre que emerge directamente del citoplasma en la parte anterior del parásito. Tiene una forma elongada (25 μm) y extremadamente móvil (Carlier et al., 2003; Ferreira et al., 2008).

Este estadio es el que coloniza eficientemente el tracto digestivo del insecto vector. La migración de los parásitos a la parte distal o terminal del tracto digestivo del insecto resulta en la diferenciación a tripomastigotes metacíclicos, los cuales tienen capacidad de infectar hospederos mamíferos.

Los epimastigotes de *T. cruzi*, al igual que los promastigotes de *Leishmania* presentan una superficie particularmente rica en carbohidratos en función al ambiente en el que se encuentran. Esto podría tener una función protectora contra las condiciones adversas del tracto digestivo de los insectos vectores. (Lederkremer et al., 2001).

2.3.3 Tripomastigote

El tripomastigote es la forma flagelada del parásito que se encuentra en la sangre del hospedero mamífero (tripomastigote sanguíneo) y en la parte terminal de los tractos digestivos y urinarios de los vectores (tripomastigote metacíclico) siendo más infectivos los tripomastigotes metacíclicos que los sanguíneos. El tripomastigote no se divide, y su flagelo se origina del citosoma (cuerpo basal) adyacente al cinetoplasto. El flagelo va a lo largo del parásito, adherido en algunos puntos al cuerpo del parásito. El flagelo libre confiere motilidad considerable al tripomastigote (Carlier et al., 2003).

Los tripomastigotes metacíclicos originados en el recto del insecto reduído y los cuales tienen capacidad de invadir las células de un hospedero vertebrado cuando son eliminados a través de las heces del insecto y penetran la piel lacerada, son capaces de sobrevivir más de dos horas en el medio ácido (pH 4.5-5.5) de la vacuola fagocítica antes de dirigirse al citosol, ya en forma de amastigote (Gil et al., 2003).

Una densa cubierta de glicoproteínas tipo mucinas cubre la superficie de *T. cruzi* y juega un rol crucial en la infectividad e inmunomodulación del hospedero (Buscaglia et al., 2004). Dichas glicoproteínas tipo mucinas, tienen analogía con las mucinas de los mamíferos y son altamente inmunogénicas (Andrews et al., 1997; Schenkman et al., 1991).

2.3.4 Características de las poblaciones de *Trypanosoma cruzi*

La población de *T. cruzi* no es homogénea, se encuentra compuesta de varias cepas. Aunque es un organismo diploide en el cual algunos intercambios genéticos pueden ocurrir ocasionalmente, la diversidad genética de *T. cruzi* resulta principalmente de la evolución de clonas independientes permaneciendo estables a lo largo del tiempo y el espacio, como sucede con las bacterias (Macedo et al., 2005)

En un consenso científico para agrupar a la mayor parte de las clonas de *T. cruzi*, estas se dividieron en dos grandes grupos llamados *T. cruzi* I y *T. cruzi* II. La distancia genética entre ambos grupos es lo suficientemente considerable para considerar a cada grupo como diferentes subespecies. Aunque ambos grupos pueden causar enfermedad en humanos, *T. cruzi* II (CL) se asocia frecuentemente con el ciclo doméstico de la infección y *T. cruzi* I (G) se ha asociado más al ciclo selvático.

Pacientes de áreas endémicas, pueden haber sido infectados por múltiples contactos con diferentes triatomíneos y asimismo, pudieron alimentar o infectar diferentes individuos. Esta "promiscuidad" propicia la formación de poblaciones multiclonales en hospederos y vectores, permitiendo su aislamiento cuando estas crecen en un medio de cultivo. De hecho, muchos estudios moleculares basados en esquizodemos, identificación de DNA y microsátélites han descrito que muchas cepas de *T. cruzi* son multiclonales. Más aun, estudios en polimorfismos intraespecíficos han demostrado que las cepas de *T. cruzi* presentan un comportamiento muy distinto al esperado por la ley del equilibrio de poblaciones de

Hardy-Weinberg y un fuerte desequilibrio en el linaje-la herencia (la asociación no aleatoria de diferentes pero ligados genes), sugiriendo que la reproducción sexual es rara o ausente y que la estructura de la población es clonal.

En una cepa particular, cada clona representa un linaje que se reproduce por división binaria y permanece inalterada por un gran número de generaciones hasta que las mutaciones ocurren. Entonces, las cepas de *T. cruzi* representan a un cúmulo de clonas que pueden establecerse por relaciones simbióticas pero también compiten ferozmente por fuentes disponibles.

Los patrones o interacciones con el cúmulo de clonas pueden cambiar drásticamente en diferentes ambientes. A través del análisis de RAPD (por sus siglas en inglés Randomly amplified polymorphic DNA) y microsatélites, se ha demostrado que cepas aisladas de vectores o mamíferos selváticos infectados pueden ser genéticamente más complejas que aquellos obtenidos de pacientes durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas; sin embargo, esas cepas son más complejas que las obtenidas de pacientes con enfermedad crónica (Oliveira et al., 1999; Oliveira et al., 1998). Además, considerando el polimorfismo biológico, diferentes clonas de una cepa pueden presentar tropismo hacia diferentes tejidos, y entonces un importante factor determinante del curso clínico de la enfermedad podría ser la "constelación" específica de clonas infectantes en el cúmulo de ellas y sus tropismos específicos.

Este escenario constituye a lo que se le ha denominado como el modelo clonal histotrópico de la enfermedad de Chagas (Macedo et al., 2002). (Figura 1). Este modelo, describe como cepas de *T. cruzi* llegan a ser multiclonales y como esto puede afectar la patogénesis de la enfermedad. a) La estructura de la población es clonal. b) las clonas se dividen por fisión binaria y c) son estables, involucradas solo por mutaciones. Aunque existe probabilidad de una recombinación, no ha sido totalmente demostrado y es probablemente raro. d) Humanos en áreas endémicas pueden infectarse por varios triatomíneos por múltiples contactos, y pueden infectar también a diferentes vectores. e) Esta promiscuidad, propicia la formación de poblaciones multiclonales en hospederos y vectores. Algunas asociaciones son ventajosas selectivamente, formando cepas estables. El número de posibles cepas es muy grande. Las clonas tienen diferentes propiedades incluyendo variedad en el tropismo hacia los tejidos humanos. f) Los antecedentes del hospedero son también importantes para determinar la susceptibilidad a la infección por *T. cruzi* y el desarrollo de la enfermedad de Chagas. g) Por lo que, cuando los humanos se infectan, el repertorio clonal de la cepa infectante podrá determinar que tejidos podrán ser afectados.

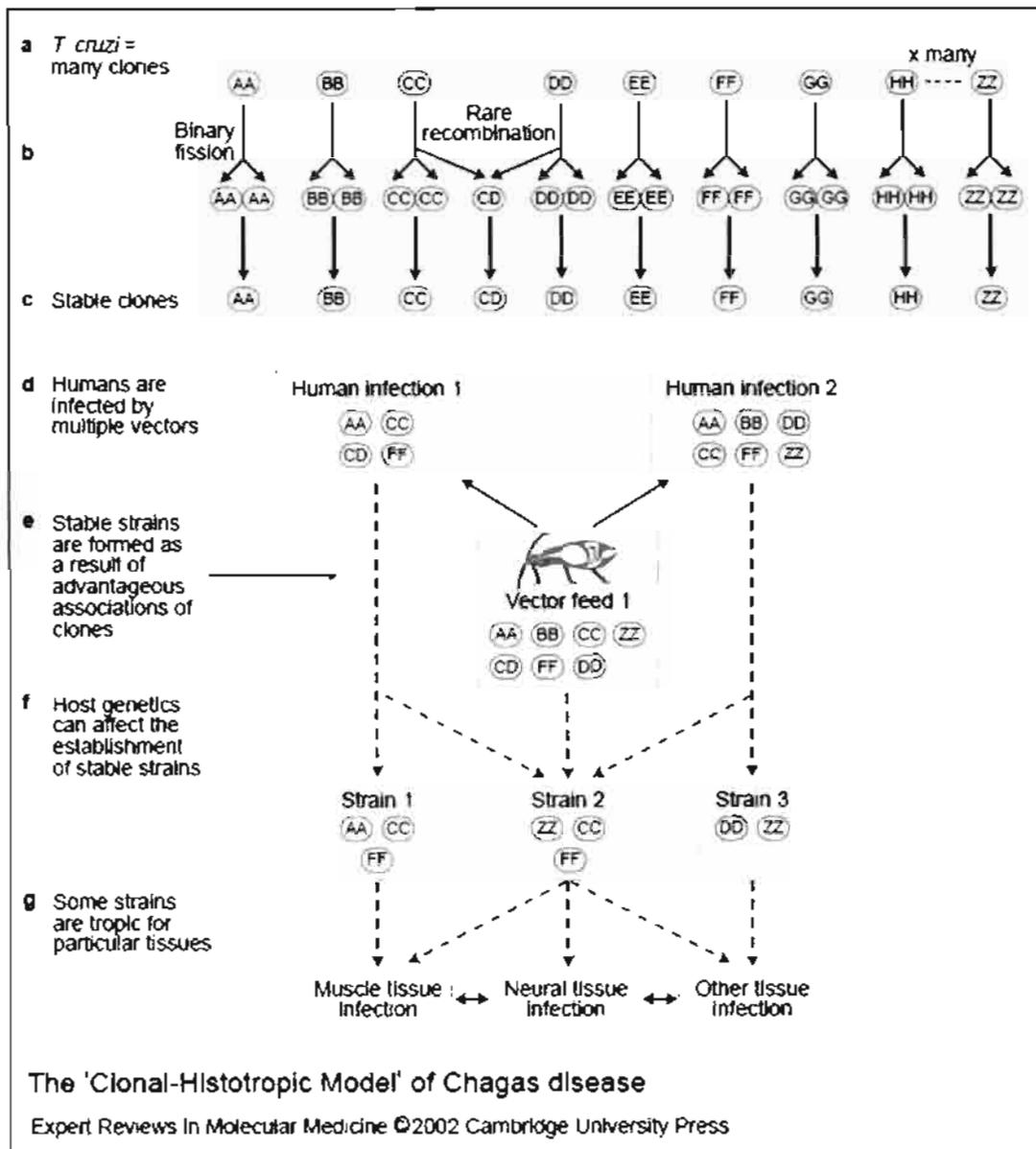


Figura. 1. Modelo histotrópico clonal de la enfermedad de Chagas. (Macedo et al., 2005).

2.4 Epidemiología

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2007, estimó que la enfermedad de Chagas afectaba a unos 15 millones de personas. Unos 28 millones de personas estarían en riesgo de contraer la enfermedad y cada año morirían 12.500 personas.

Actualmente, la enfermedad de Chagas continua siendo un gran problema de salud en 21 países de América Latina, a pesar de la eficacia de medidas preventivas e higiénicas, tales como el eliminar los insectos transmisores, lo cual ha reducido a cero la aparición de nuevas infecciones en al menos dos países en la región (Uruguay y Chile). Con el incremento en la migración de poblaciones, la posibilidad de transmisión por transfusión sanguínea debe considerarse sustancial en los Estados Unidos.

Sin embargo, es importante también tener en cuenta, que los movimientos migratorios de las zonas rurales a las zonas urbanas han cambiado las características epidemiológicas de la enfermedad de Chagas. Se estima que alrededor de 70% de la población latinoamericana vive actualmente en áreas urbanas, cuando las cifras en los años 30 mostraban que el 70% habitaba en las áreas rurales. La infección que había sido primordialmente rural, actualmente es urbana y transmisible principalmente por transfusión sanguínea (Kirchoff et al., 2006). En los últimos decenios, el número de donantes con serología positiva ha sido muy elevado en los países endémicos. Actualmente, en la mayoría de los países de América Latina se ha establecido por ley la obligatoriedad de que los bancos de sangre dispongan de sistemas de detección para prevenir la transmisión de *T. cruzi*

por medio de las transfusiones; sin embargo, varios países aún no decretan la obligatoriedad para el diagnóstico y el tamizaje a nivel nacional (OMS, 2007).

La migración de personas infectadas por *T. cruzi* plantea un problema de salud pública, incluso, en países en donde no existe transmisión vectorial del parásito, como Canadá, Estados Unidos y España, en donde han comunicado casos de transmisión de *T. cruzi* por productos sanguíneos.

El riesgo de transmisión del parásito por una transfusión de sangre es baja (Kirchhoff et al., 2006) , sin embargo debe tenerse en cuenta que el riesgo existe por lo que deben implementarse medidas en los bancos de sangre (Apt et al., 2008) y de igual manera, se han reportado en los últimos años varios casos de trasplantes de órganos (corazones) asociados a la enfermedad de Chagas en los Estados Unidos (Kun et al., 2009).

2.4.1 Prevalencia y tendencia de la enfermedad en México

La presencia de la enfermedad de Chagas en México se ha ido incrementando sustancialmente, no únicamente por la falta de control y prevención de la enfermedad en el país, sino también porque se ha incrementado el número de reportes en todas las entidades federativas en donde se han hecho reportes de la misma así como estudios formales en la mayoría de los estados de la República Mexicana.

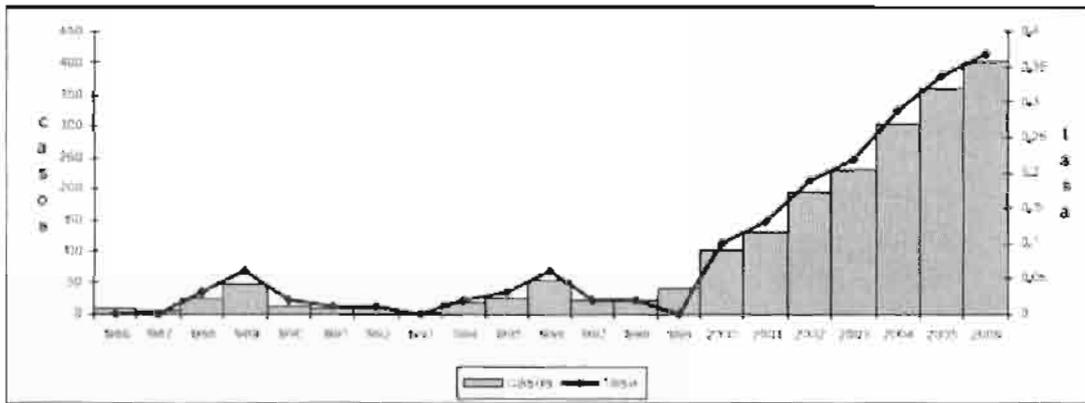


Figura. 2. Número de casos e incidencia de la enfermedad de Chagas en México de 1986-2006. Hasta 2006, se reportó una prevalencia del 3.6 % en México (Figura 2),

siendo los estados de la República Mexicana con mayor número de casos durante 2006: Veracruz, Morelos, Oaxaca, y Quintana Roo, mientras que Aguascalientes, Baja California, Coahuila, Colima, Chihuahua, Hidalgo, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas no presentaron casos durante ese año (Figura 3) (Kuri y Hernández, 2008). En Yucatán, se ha descrito una prevalencia de 15.6% en la población en general y un 5.6% en donantes de sangre (Rodríguez, et al., 1995).

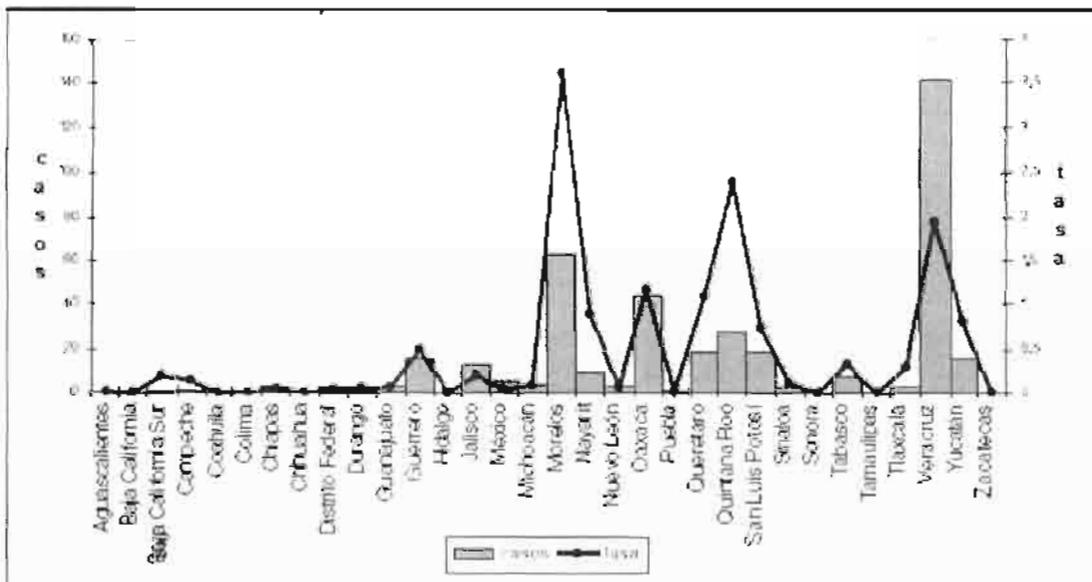


Figura. 3. Incidencia de casos de enfermedad Chagas por entidad Federativa en la República Mexicana durante 2006.

Se ha observado que la incidencia de la enfermedad es constante, durante los últimos 20 años, no teniendo predilección por alguna época del año en especial, pero se observa la mayor incidencia durante el mes de agosto a diferencia de los meses de enero y febrero en donde se observa un menor número de casos (Figura 4) (Kuri y Hernández, 2008).

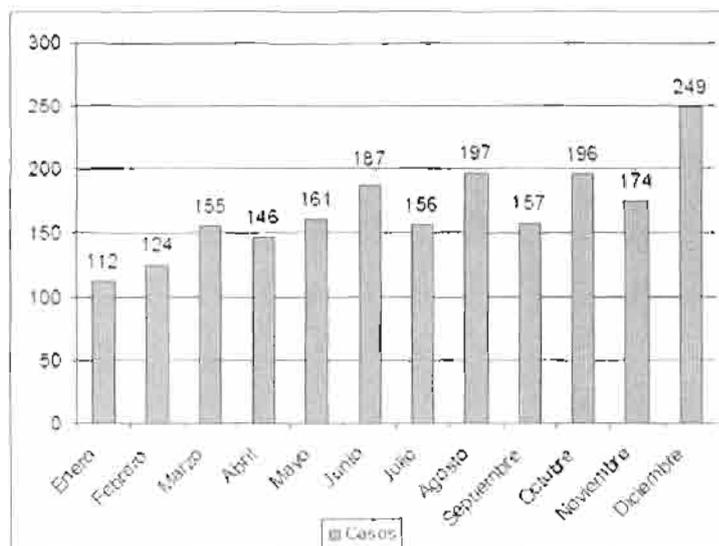


Figura. 4. Enfermedad Chagas en la República Mexicana. Incidencia de casos por mes, acumulado de 1986-2006.

La enfermedad de Chagas se presenta en todos los grupos de edad, registrándose la mayor cantidad de casos en los individuos que tienen 60 años y más, quienes probablemente sean enfermos en fase crónica pero que han sido registrados como casos nuevos en el sistema de información (Kuri y Hernández, 2008).

2.4.2 Vectores

En México, se han colectado ejemplares de 30 especies de triatóminos (comprendidas en 7 géneros) de vectores en todos los estados de la República Mexicana que potencialmente podrían transmitir la enfermedad de Chagas. De estas especies al menos en 21 se ha identificado la infección por *T. cruzi*, las especies que resaltan por su capacidad vectorial son: *Triatoma barberi*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma gerstaeckeri*, y las especies del complejo taxonómico "*Phyllosoma*": *T. longipennis*, *T. mazzottii*, *T. mexicana*, *T. pallidipennis*, *T. phyllosoma* y *T. picturata* (Figura 5). En Yucatán, la única especie que está involucrada con la transmisión de la enfermedad es *Triatoma dimidiata* (figura 5) (Guzmán et al, 1991).

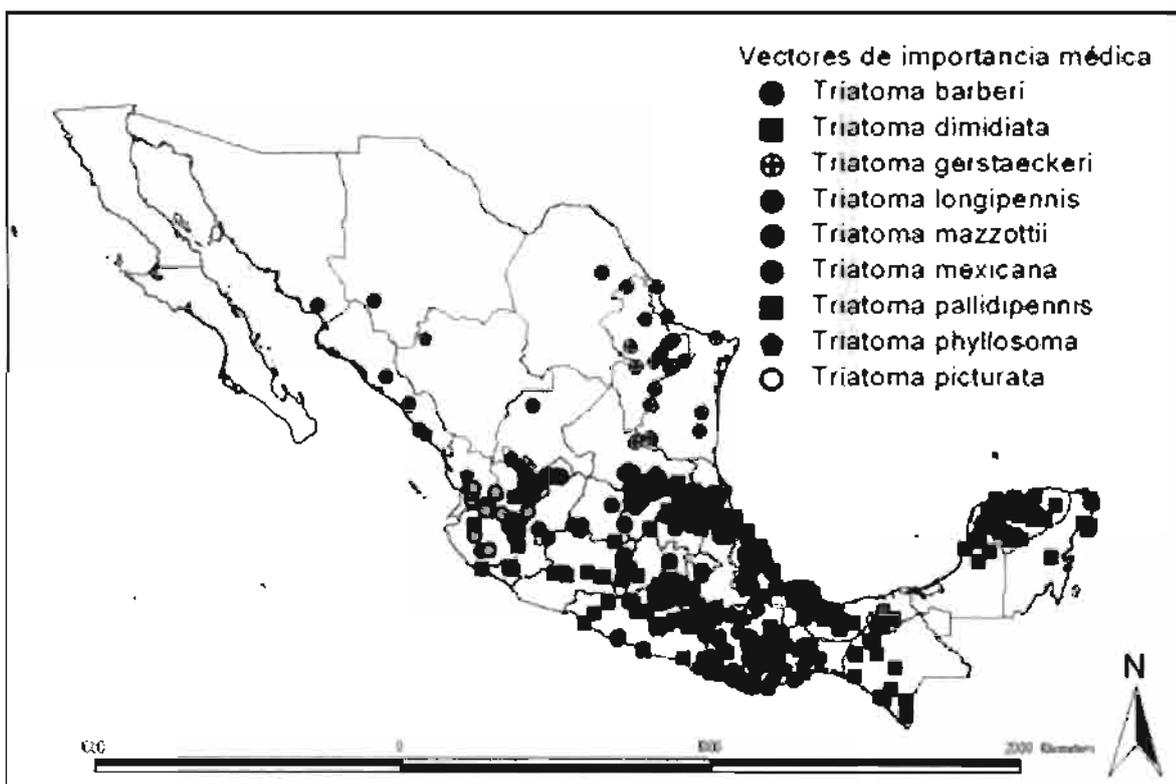


Figura 5. Distribución en la República Mexicana de las 9 especies de triatóminos de importancia médica

2.4.3 Reservorios

Debido a la complejidad de la cadena de transmisión de la enfermedad de Chagas, interviene un gran número de reservorios vertebrados que han contribuido a dificultar la erradicación de esta enfermedad. El parásito se presenta en una gran variedad de cepas e infecta a alrededor de 150 especies comprendidas en 24 familias de animales domésticos y silvestres. (OMS, 2007).

En México, la gran diversidad de fauna, tanto silvestre como de animales domésticos, han favorecido la distribución y transmisión de la enfermedad en todos los estados y escenarios del país, tanto rurales como urbanos.

En el estado de Yucatán, los principales reservorios reportados son: ratón de campo (*Peromyscus yucatanensis* y *Peromyscus leucopus*), gato (*Felis catus*), perro (*Canis familiaris*), tlacuache (*Didelphis virginiana* y *marsupialis*), rata (*Rattus rattus*) y ratón doméstico (*Mus musculus*) (CHAGMEX, 2005).

2.5 Ciclo de vida

Los parásitos se multiplican como epimastigotes en el tracto digestivo del insecto vector. Después de transformarse en tripomastigotes metacíclicos, los parásitos son depositados con las deyecciones del insecto e infectan células del hospedero mamífero en superficies mucosas, como conjuntiva o laceraciones de la piel (como la ocasionada por la probóscide del insecto al momento de alimentarse). Una vez en las células del hospedero, los parásitos se transforman en amastigotes, y después de múltiples ciclos de replicación, se transforman nuevamente en tripomastigotes, esta

vez sanguíneos, los cuales son morfológicamente similares a los tripomastigotes metacíclicos presentes en las heces del vector. La célula infectada se lisa, liberando a los parásitos contenidos, los cuales infectarán células adyacentes o podrán desplazarse hacia otros tejidos o sistemas a través de la circulación sanguínea. El ciclo se completa cuando los tripomastigotes sanguíneos son ingeridos por un insecto vector no-infectado y se transforman diferenciándose a formas infectantes en el tracto digestivo del insecto (Figura 6) (Tanowitz et al., 1992).

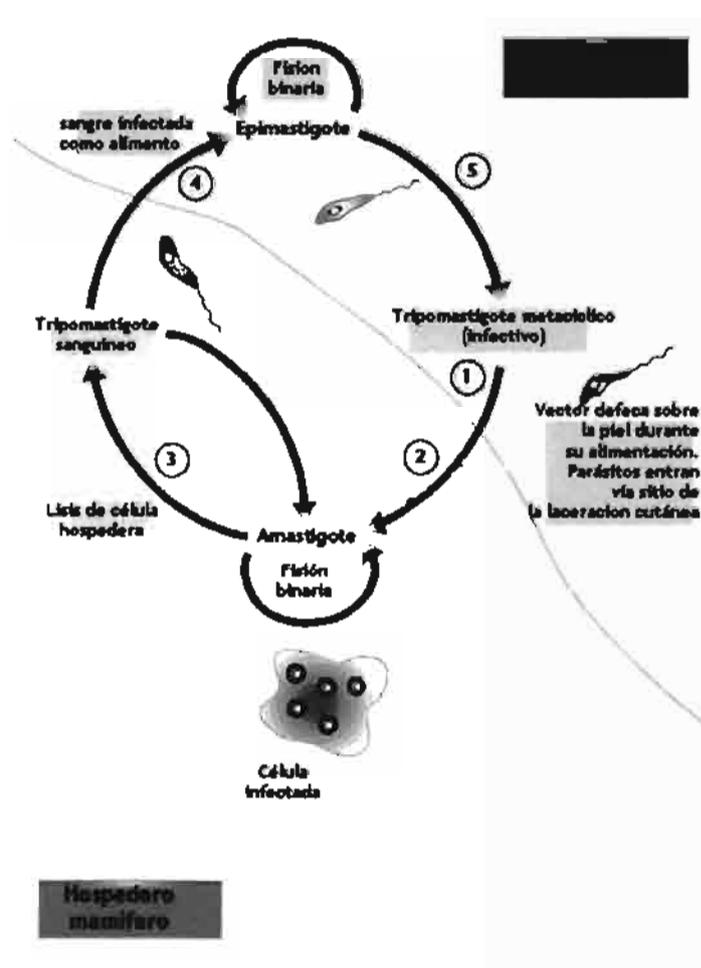


Figura 6. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.

2.6 Patogenia

2.6.1 Fase aguda

Durante esta primera etapa de la enfermedad, es posible identificar en el sitio de entrada del parásito, una lesión inflamatoria conocida como *chagoma de inoculación*. El proceso inflamatorio comienza a extenderse regionalmente y la linfadenopatía local puede ser evidente. Ciclos asincrónicos de replicación parasitaria, destrucción celular y re infección ocurren con las células del sistema reticulo-endotelial.

La mayoría de las personas con tripanosomiasis americana durante la fase aguda, manifestarán únicamente signos clínicos leves. Una gran parte de los pacientes que se encuentran en fase aguda no se percatarán de estarla cursando, un 95% de los casos son asintomáticos (Texeira et al., 2007) Sin embargo, algunos adultos y con menos frecuencia niños, podrán desarrollar síntomas severos después de un periodo de incubación de 7 a 14 días.

Esos síntomas incluyen un edema e inflamación periorbital, unilateral (también conocido como *signo de Romana*) y conjuntivitis. Podrían observarse algunas otras manifestaciones más inespecíficas, incluyendo fiebre, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia, náusea, vómito, diarrea, "rash", anorexia, lasitud e irritación meníngea. Muy pocos pacientes con enfermedad aguda desarrollarán una miocarditis severa. Podrían evidenciarse focos de necrosis miocitolíticos, degeneración acompañada por células inflamatorias y parasitismo de las miofibras. Una mezcla de exudado con leucocitos y polimorfonucleares, así como pseudoquistes conteniendo amastigotes pueden observarse entre las fibras degeneradas.

En modelos animales murinos, la presencia de eosinófilos ha sido también demostrada, pero su relevancia en la enfermedad en humanos no es bien conocida. En personas durante la fase aguda de la infección, se observa un incremento de tamaño del corazón por dilatación, con flacidez y congestión. Los nódulos linfáticos que se encuentran en el sitio en donde emerge la aorta y la arteria pulmonar se observan engrosados. En la superficie del epicardio, los vasos linfáticos y coronarios se encuentran dilatados.

Esos hallazgos de engrosamiento predecirán la presencia de intensa infiltración en el corazón (Texeira et al., 2007). La miocarditis podrá ser clínicamente evidente e incluir taquicardia, falla cardíaca congestiva y cardiomegalia. En algunos pacientes, el electrocardiograma (ECG) puede revelar una prolongación del intervalo P-R, cambios inespecíficos en la onda T aparición de arritmias, bloqueo cardíaco y bajo voltaje. La falla congestiva cardíaca progresiva durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas, es un indicador de una muy mala prognosis para el paciente. La presencia o severidad de una miocarditis aguda podría no estar relacionada necesariamente al desarrollo de una cardiomiopatía chagásica crónica, sin embargo esto no ha sido estudiado prospectivamente.

Durante esta fase los tripomastigotes sanguíneos se encuentran en la sangre periférica y también en el fluido cerebroespinal de pacientes con infección aguda. Otras de las anormalidades reportadas durante esta fase de la infección son: anemia, trombocitopenia, leucocitosis con predominante presencia de linfocitos, función hepática anormal y elevación de los niveles de enzimas cardíacas.

Un muy bajo porcentaje de individuos con enfermedad en fase aguda morirán por complicaciones asociadas con miocarditis aguda o meningo-encefalitis. También se ha descrito que puede presentarse en menor proporción una bronconeumonía. Sin embargo, es difícil conocer números precisos. Texeira et al (2007) considera que aproximadamente <5% de los pacientes morirá durante este periodo, por lo que la tasa de letalidad deberá ubicarse entre 1:25000 y 1:5000.

Los pacientes que pasan por la fase aguda de la enfermedad, se recuperan completamente de 3 a 4 meses y la gran mayoría no demuestra signos aparentes de enfermedad alguna. En aquellos pacientes que fallecen durante la fase aguda de la enfermedad, la presencia de amastigotes es fácilmente demostrable en células cardíacas, esqueléticas así como células gliales.

2.6.2 Fase indeterminada

Durante la fase indeterminada de las infecciones crónicas ocasionadas por *T. cruzi*, los pacientes no demuestran manifestaciones clínicas relacionadas con lesiones cardíacas o digestivas (Macedo, 1999). Estudios realizados a personas que estaban durante esta fase de la enfermedad y fallecieron por accidentes fatales no presentaron lesiones cardíacas, mega esófago o mega colon. Sin embargo, la fase indeterminada de la infección fue establecida por la demostración directa del contacto con el agente, ya que pueden identificarse anticuerpos específicos tanto del tipo IgM y posteriormente IgG, como marcadores genotípicos de infección críptica. En biopsias de alrededor de 20 pacientes se observaron únicamente lesiones inflamatorias muy bajas y discretas en el tejido cardíaco (Mady, et al., 1982).

2.6.3 Fase crónica

Los casos agudos de la infección por *T. cruzi* con la presencia o no de signología clínica, da paso al estado crónico de la enfermedad, el cual puede presentarse en individuos de cualquier grupo etario. Texeira et al, (2006) menciona que una tercera parte de la población de personas infectadas con *T. cruzi* desarrollará manifestaciones clínicas de la enfermedad durante la fase crónica. Los síntomas de la enfermedad de Chagas durante esta fase, afecta al corazón en un 94% de los casos, y esos pacientes son considerados con cardiopatía chagásica de tener la enfermedad cardíaca de Chagas crónica.

Es frecuente observar insuficiencia cardíaca, y se asocia como causa de muerte en un 58% de los pacientes, mientras que las arritmias cardíacas han sido mayormente asociadas con muertes inesperadas en un 36.5%.

El restante 4.5% de los pacientes, con enfermedad de Chagas durante la fase crónica, desarrollan mega síndromes, un estado patológico que involucra a el esófago (desarrollándose mega esófago y mega colon respectivamente). Las diversas afecciones observadas durante la fase crónica afectan por igual tanto a hombres como a mujeres, y se presenta con más frecuencia entre los 30 y 45 años de edad.

Es importante mencionar que los pacientes que demuestran signos de insuficiencia cardíaca, frecuentemente fallecen entre 7 meses a dos años después de haberse iniciado estos signos. En los pacientes con enfermedad de Chagas que presentan manifestaciones cardíacas o gastrointestinales, también se pueden

esperar amplias lesiones que involucran a los sistemas nerviosos periféricos simpático y parasimpático. Estas lesiones nerviosas en pacientes chagásicos explican específicamente la fisiopatología que se observa en el corazón y en los síndromes "megas" descritos en los pacientes en fase crónica.

Además se han reportado arritmias durante la fase crónica de la enfermedad, así como falla cardíaca congestiva, los eventos trombo-embólicos (Oliveira et al., 1983). Otros aspectos patológicos de la cardiopatía ha sido la descripción de arteriosclerosis, arteriolitis necrosante (Okumura et al., 1960; Okumura et al., 1962; Oliveira et al., 1985), mionecrosis, miocitolisis, y contractura de bandas musculares por necrosis. Se pueden observar áreas focales y difusas de hipertrofia en células cardíacas o esqueléticas, con o sin presencia de infiltrado inflamatorio.

2.7 Diagnóstico

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) recomienda que se utilice más de un procedimiento serológico para reducir un posible error en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. La confirmación de la tripanosomiasis americana por diagnóstico serológico se establece cuando hay al menos dos pruebas serológicas positivas (Otani et al., 2009). La Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en inglés de World Health Organization) ha evaluado 18 pruebas de tamizaje entre las que se incluyen 11 pruebas de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés de "Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay") y 7 pruebas de aglutinación. Se consideran como pruebas confirmatorias el Western Blot (WB), la inmunofluorescencia indirecta (IFI), y la radio inmunoprecipitación

(RIPA por sus siglas en ingles de radioimmunoprecipitation assay) (WHO, 2006; Ottani et al., 2009).

La observación microscópica directa microscópica de sangre anti-coagulada es una manera sencilla de observar el parásito en movimiento. También pueden ser observados en la gota gruesa o el extendido fino coloreado con Giemsa (Gonzalez-Kappa, 1996), sin embargo estos procedimientos son poco sensibles.

Cuando no se detecta al parásito después de varios exámenes, puede inocularse un ratón o medio de cultivo específico para *T. cruzi* (Rodríguez et al., 2004). Otra alternativa es el xenodiagnóstico que consiste en la alimentación de vectores no infectados con sangre del paciente y posterior evaluación semanal de sus heces durante 30 días siguientes. El xenodiagnóstico es positivo en casi todos los casos agudos y casi la mitad de los casos crónicos, es un método indirecto que requiere un periodo de tiempo largo para obtener el resultado, y al igual que el hemocultivo, tiene una sensibilidad del 20 al 60 % (Britto, 2009) y una especificidad del 70%. De igual forma, las pruebas serológicas tienen una utilidad limitada en los casos agudos (Acha y Szyfres, 1986), ya que es una fase temprana donde todavía no se encuentra establecida la respuesta inmune.

Por el contrario, el diagnóstico de la fases indeterminada y crónica de la enfermedad de Chagas se realiza principalmente mediante la detección de anticuerpos específicos hacia *T. cruzi*. Existe una gran variedad de métodos disponibles: fijación de complemento, Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y el ELISA, que utilizan usualmente antígenos semi-purificados de epimastigotes o proteínas recombinantes (Apt et al., 2008b)

Un problema persistente con estas pruebas es la ocurrencia de falsos positivos, especialmente en pacientes con otras infecciones parasitarias causadas por agentes que pertenecen a la misma familia que *T. cruzi*, por lo tanto se observan reacciones cruzadas. Por tal motivo, se recomienda que todo caso positivo debe ser confirmado con al menos una segunda prueba y que en todas las pruebas siempre se incluyan controles positivos y negativos conocidos (Figura 7) (Araujo, 1986; Acha y Szyfres, 1986).

En la mayoría de los estudios en los que se reporta la presencia de anticuerpos hacia *T. cruzi* se utilizan hasta tres métodos diagnósticos, en los cuales se consideran positivos cuando hay una reacción de reconocimiento de anticuerpos en al menos dos de las pruebas empleadas (Figura 7) (Lauricella et al., 1998; Machado et al., 2001; Salomone et al., 2003).

La prueba serológica de IFI es considerada como prueba de oro confirmatoria por tener buena sensibilidad y especificidad. Este método consiste en la detección de anticuerpos específicos hacia *T. cruzi*, mediante el empleo de epimastigotes de cultivo axénico con el cual reaccionan los anticuerpos del suero problema y son detectados por un segundo anti-anticuerpo marcado con un fluorocromo, que al visualizarlos en un microscopio de epifluorescencia (con UV) nos permite identificar las reacciones positivas (Rodríguez et al., 2004)

Otra prueba importante considerada como confirmatoria es el Western blot (WB) (Towbin et al., 1979) la cual se basa en la separación de las proteínas totales del parásito en geles de acrilamida que posteriormente son transferidas a una membrana de nitrocelulosa, ésta se hace reaccionar con los sueros problemas, si

existe la presencia de anticuerpos específicos hacia *T. cruzi* estos reconocen los antígenos inmovilizados en la membrana, los cuales son visualizados con anticuerpos especie-específicos marcados (Towbin et al., 1979; Vissoci-Reiche et al., 1998). Se ha descrito que esta prueba tiene una especificidad del 100% y sensibilidad del 86.6 % (Vissoci-Reiche et al., 1998) y se recomienda la utilización de antígenos recombinantes para aumentar la especificidad de la prueba y disminuir las reacciones cruzadas que presentan parásitos que pertenecen a la misma familia que *T. cruzi* (Ramos Ligonio et al., 2006). La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction) ha sido utilizada para detectar parásitos en sangre de pacientes en la fase crónica de la enfermedad, por la baja cantidad de parásitos circulantes que presenta esta fase, también en la fase aguda se ha demostrado que es útil para identificar la presencia del parásito de manera temprana el cual es muchas veces más rápido, sensible y específico que el xenodiagnóstico y el (Russomando et al., 1998; Antas et al., 1999; Gomes et al., 1999; Gurgel-Goncalves et al., 2004), hemocultivo (Gomes et al., 1999; Chiari et al., 1999; Kirchhoff et al., 1996).

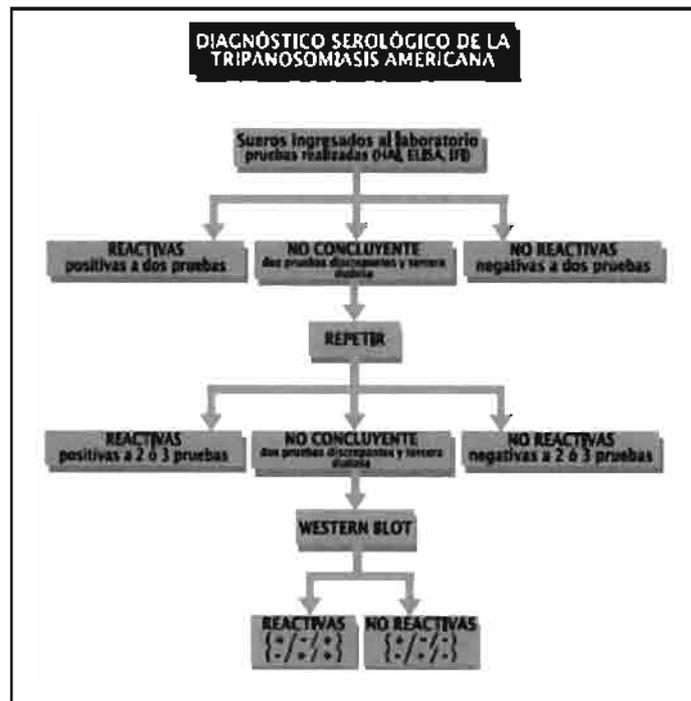


Fig. 7. Lineamientos para la evaluación serológica preestablecidos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

2.8 Tratamiento.

Los fármacos disponibles para el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas desde 1960 hasta principios de la década de 1970, fueron dos medicamentos nitro heterocíclicos: 1) el nitrofurano nifurtimox [3-metyl-4 (nitrofurfurilideneamino)tetrahydro-4H-1,4-thiozine-1,1-dioxide] y 2) el nitroimidazol, beznidazol [N-benzyl-2-nitroimidazol acetamida], siendo utilizados principalmente para el tratamiento de la fase aguda de la enfermedad. Se ha descrito que, independientemente del mecanismo de infección, el paciente debe ser tratado, y aproximadamente el 60% de ellos pueden presentar una respuesta adecuada para el tratamiento de esta fase (Rodríguez-Coura y de Castro, 2002; Urbina y Docampo, 2003).

Una de las principales razones que originan controversia en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, radica en el tiempo en que se instaura el tratamiento en relación a cuando ocurrió la infección. Sin embargo, el tratamiento con estos fármacos en pacientes que se encuentren en la fase crónica adquirida de manera reciente (< 10 años), ofrece una mejor prognosis que aquellos pacientes a quienes se les da tratamiento durante la fase crónica de manera tardía, o a una edad avanzada (> 50 años) (Castro, 2000; Urbina y Docampo, 2003).

El mejor efecto de los fármacos nifurtimox y beznidazol, es sobre las formas extracelulares de *T. cruzi* presentes en la fase aguda, en contraste, no tiene efecto en las formas intracelulares, las cuales se encuentran presentes durante la enfermedad crónica.

Hoy en día, se conoce que actúan por la vía de la generación de radicales libres, a lo cual los parásitos tripanosomatídeos son particularmente sensibles por su limitada capacidad de detoxificación (Urbina, 1999).

Un hecho importante en el tratamiento con estos dos fármacos nitroheterocíclicos, es que la eficiencia de la quimioterapia varía en los pacientes que vienen de diferentes áreas geográficas. Este comportamiento se debe probablemente a que la infección puede ser con diferentes cepas de *T. cruzi*, las cuales tienen diferente susceptibilidad a estos fármacos (Guedes et al., 2006). También se ha descrito que existe variabilidad geográfica en la eficacia del tratamiento (con benznidazol y nifurtimox) de la infección aguda y crónica en modelos animales (Veloso et al., 2001; Camandaroba et al., 2003).

Una de las mayores limitaciones de los nitrofuranos y nitroimidazoles es su delimitada eficacia en pacientes en la fase crónica, que es la presentación clínica más frecuente en Latinoamérica.

Otra importante limitación para el uso de estos fármacos, son los efectos colaterales, que incluyen anorexia, vómitos, polineuropatía periférica y dermatopatías alérgica. Particularmente el benznidazol, también ocasiona efectos tóxicos que difieren en intensidad y tipo. Una de las principales afecciones, está dirigida hacia las reacciones térmicas como hipersensibilidad, dermatitis con erupciones cutáneas, edema generalizado, fiebre, linfadenopatía así como dolor articular y muscular. Los efectos tóxicos más severos del benznidazol son depresión de la médula, trombocitopenia y agranulocitosis. También se ha reportado polineuropatía, paresia y polineuritis de nervios periféricos.

Debido a que el benznidazol es mejor tolerado, este fármaco es considerado por muchos clínicos como de primera elección para el tratamiento de los pacientes diagnosticados con tripanosomiasis americana (Bern et al., 2007) sin embargo la tolerancia hacia el nifurtimox es muy variable. Esta aprobada para ser utilizada en los Estados Unidos de Norteamérica, pero únicamente puede emplearse en protocolos bajo supervisión de la CDC (Centers for Disease Control and preventions por sus siglas en ingles). Los adultos deben ser tratados con una dosis de 5-7 mg/Kg por día, en dos dosis divididas, durante 60 días. Para el caso del nifurtimox, se indica la dosis de 8–10 mg/Kg por día, dividido en 3 dosis, durante 90 días.

Las indicaciones para la terapia antitripanosomal son variables dependiendo de la fase y forma de la enfermedad, así como de la edad del paciente, para determinar en que parte de la escala descrita por la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas se encuentra (Gross et al., 1994) y determinar cual sería la quimioterapia mas indicada.

La terapia farmacológica es recomendada en todos los casos en fase aguda e infección congénita, infección reactivada y en pacientes infectados menores de 18 años que se encuentren en la fase crónica de la enfermedad. (Wegner et al., 1972; Freilij et al., 1995; Sosa Estani et al., 1998; Estani et al., 1999)

Para el caso de los adultos que se encuentran entre 19 a 50 años y que no presenten cardiomiopatía chagásica avanzada, el tratamiento antiprotozoario generalmente deberá ser ofrecido al paciente (Estani y Segura, 1999; WHO, 2002;

Rassi y Luquetti, 2003; Viotti et al., 2006). En el caso de pacientes mayores de 50 años, el riesgo por intoxicación farmacológica puede ser mayor que cuando se tratan a pacientes más jóvenes y el tratamiento es considerado opcional.

2.8.1 Avances en el desarrollo de nuevos tratamientos etiológicos específicos de la enfermedad de Chagas.

a) Inhibidores de la biosíntesis del ergosterol. El *T. cruzi* tiene un requerimiento esencial de esteroides endógenos específicos y no puede usar el colesterol presente en abundancia en sus hospederos vertebrados, por lo que es muy susceptible intrínsecamente a la acción de inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (IBE). Los IBE disponibles comercialmente (ketoconazol, itraconazol, o terbinafina) no son capaces de erradicar al parásito de pacientes infectados. Por otra parte, el posaconazol (Shering Plough) tiene actividad antiprotozoaria por vía oral en mamíferos, y se menciona que podría ser útil para el tratamiento de infecciones por cepas resistentes a nitrofuranos y nitroimidazoles.

b) Inhibidores de cisteína proteasas (cruzipaina). La enzima cruzipaina es una cisteína proteinasa familia de la papaina C1 (Rodríguez-Coura y de Castro, 2002), la cual es responsable de la mayor parte de actividad proteolítica durante los diferentes estadios de *T. cruzi*, por ello, se ha buscado desarrollar inhibidores de dicha enzima con la finalidad de evitar la proliferación de formas flageladas y no flageladas.

Más adelante, Du et al., (2002) describieron nuevos inhibidores como el tiocarbazon, y demostró su actividad tanto bajo condiciones *in vitro* como *in vivo*.

Hasta el momento, el empleo de compuestos específicos para la inhibición de cisteína proteasa es limitado, ya que ha demostrado una baja actividad antiprotozoaria cuando es administrado por vía oral. Estos autores también identificaron diversos inhibidores de la cruzipaina sintéticos que demostraron actividad contra *T. cruzi in vitro*, y sugieren que esas moléculas son prometedoras como la base para el diseño de nuevos fármacos.

c) Inhibidores del metabolismo del tripanotión. El tripanotión y la tripanotión reductasa (TR), cumplen en organismos del orden Kinetoplastida, funciones equivalentes a las del glutatión y la glutatión reductasa de mamíferos en el mantenimiento de nivel de óxido-reducción celular. Por lo que, la TR, ha sido descrita como una enzima exclusiva de los tripanosomas que tiene entonces una función de participar en mecanismos de protección celular contra radicales libres y reacción ante el oxígeno (Chan et al., 1998). Es por ello, que la inhibición de la TR se convierte en un blanco atractivo para buscar alternativas quimioterapéuticas para la enfermedad de Chagas. La inactivación o reducción de la expresión del gen de la TR en *Leishmania donovani* y *Leishmania major*, reduce la habilidad de estos microorganismos para sobrevivir al estrés oxidativo. Algunos estudios han descrito a nuevos compuestos con actividad inhibitoria de la TR, así como, la descripción de que algunas moléculas de las fenotiacinas actúan contra *T. cruzi* y *Leishmania* sp. (Doyle y Weinbach, 1989; Evans y Croft, 1994).

d) Inhibidores de la captación y metabolismo de purinas

T. cruzi, como muchos otros parásitos protozoarios, no puede sintetizar bases purínicas de precursores básicos como: aminoácidos, ribosa 5-fosfato, CO₂, y NH₃ (Rodríguez-Coura y de Castro, 2002). De hecho, se conoce que existen vías "de rescate" en donde reciclan bases libres y nucleótidos liberados por la degradación de ácidos nucleicos u obtenidos a partir del medio ambiente extra-celular. Debido a esta peculiaridad, la vía de "rescate de purinas" y otras vías en donde el parásito busca la absorción de bases libres y nucleótidos se han estudiado como posibles objetivos en el desarrollo de nuevos fármacos con actividad antiprotozoaria (Guedes et al., 2006).

Para *T. cruzi*, la hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRTasa) es responsable del rescate de nucleótidos purínicos. Esto indica que, los inhibidores análogos de sustrato para HGPRTasa tienen el potencial de ser objetivos para la quimioterapia de la enfermedad de Chagas (Rodríguez-Coura y de Castro, 2002).

El alopurinol, es un análogo de la hipoxantina que bien puede ser usado por *T. cruzi* como una molécula precursora en la vía del "rescate de purinas". Ha sido bien descrito que este fármaco tiene actividad contra *T. cruzi* bajo condiciones *in vitro*, en cultivo celular (Berens et al., 1982; de Castro et al., 1987; Nakajima-Shimada et al., 1996) y en modelos murinos (Ávila et al., 1981). A pesar de que en teoría el alopurinol debería ser una buena alternativa para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, en el año de 1995 la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization) no recomendó su uso, debido a su ineficacia para el control de la parasitemia en los pacientes (Lauria-Pires et al., 1988).

Debido a que se considera que los fármacos inhibidores de estas enzimas ocasionan una menor proporción de efectos adversos en los pacientes, se ha propuesto que los inhibidores específicos de HGPRTasa son un buen blanco de acción para la quimioterapia de la enfermedad de Chagas (Ullman y Carter, 1995; Gutteride y coombs 1977; Craig y Eaking, 1997).

Con la finalidad de continuar explorando la búsqueda y desarrollo de compuestos con actividad antiprotozoaria con este mecanismo de acción Freyman et al (2000) han identificado y descrito al menos tres compuestos (inhibidores de HGPRTasa) que tienen actividad tripanostática en cultivos celulares, y fueron efectivos inhibiendo la replicación de la multiplicación de amastigotes. Ese mismo grupo de investigación, identificó a otros inhibidores de la enzima, entre ellos, los biofosfonatos, los cuales son moléculas que normalmente se utilizan en el tratamiento de algunos trastornos esqueléticos como osteoporosis e hipercalcemia (Fernández et al., 2004). El pamidronato y el residronato de que fueron los inhibidores más potentes de la HGPRTasa de *T. cruzi*.

Estas moléculas son capaces de inhibir la enzima farnesil pirofosfato sintasa y demuestra que bloquean la replicación parasitaria bajo condiciones *in vivo*, empleando 1 mg/Kg de peso vivo durante 7 días, y se observa una reducción de hasta el 90% de la parasitemia, menor mortalidad y reducción de la presencia de los parásitos en tejido cardíaco. Los autores proponen que a partir del residronato se desarrollen nuevos y mejores fármacos para el tratamiento de *T. cruzi* (Garzoni et al, 2004).

A pesar de todos los estudios desarrollados con los fármacos disponibles y opciones propuestas para combatir a la enfermedad de Chagas, la terapia farmacológica contra *T. cruzi* no ha sido del todo exitosa, por lo que una alternativa interesante es realizar la búsqueda de nuevos compuestos obtenidos a partir de plantas que han sido utilizadas desde tiempos ancestrales en la medicina tradicional y podrían proveer de opciones de tratamiento antiprotozoario de bajo costo, que sean de baja toxicidad y coadyuven a la resolución de una problemática de gran impacto en la salud pública, tanto a nivel regional como nacional e internacional.

2.9 Medicina tradicional

La medicina tradicional es la suma total del conocimiento, habilidades y prácticas basadas en las teorías, creencias y experiencias indígenas de diferentes culturas, que con explicación o no, se utilizan para el mantenimiento de la salud tanto para la prevención, diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades físicas y mentales. El término "medicina tradicional" se entiende como el conjunto de prácticas curativas relacionadas con una serie de conocimientos y creencias de raíces tanto indígenas como españolas, en torno al medio ambiente natural y social utilizado por el hombre, para el restablecimiento de la salud y el bienestar social (Flores, 1989). Se caracteriza por su existencia y continuidad a través de la tradición oral y la práctica entre la gente del pueblo o grupos populares. En algunos países, los términos de medicina complementaria / alternativa / no convencional, son aplicados también a medicina tradicional (WHO, 2000)

Estos conocimientos se han transmitido de generación en generación para preservar la vida y permitir la reproducción y florecimiento de la propia cultura. Miles de años de observación y experimentación empírica han sido necesarios para la evolución de los diversos sistemas médicos empírico (Carballo et al., 2005)

Las culturas precolombinas de este continente, como lo es la cultura maya, manifestaron grandes avances que han sido recuperados en su mayor parte por la investigación histórica, arqueológica, etnográfica y botánica.

Hasta ahora el campo de investigación sobre la medicina tradicional ha sido abordado principalmente por la antropología, pero cada vez mayor número de disciplinas científicas se incorporan para enriquecer el rescate y la revalorización de este patrimonio cultural que ha contribuido sustancialmente a la conservación de la salud humana, al igual que al desarrollo del conocimiento médico autóctono y de sus recursos (Canales et al., 2006)

La medicina tradicional, ha contribuido en las últimas dos décadas, con importantes aportaciones en diversas partes del mundo para la búsqueda de nuevos fármacos y compuestos de origen natural, principalmente de tipo anti-inflamatorios, anti-microbianos, antimicóticos, antioxidantes y antitumorales (Jayaraman, 2006).

2.9.1 Plantas con bioactividad hacia *Trypanosoma cruzi*

A partir de *Ocotea lancifolia* se aislaron 13 alcaloides isoquinólicos a los cuales se les evaluó su actividad contra tres cepas de *Leishmania* y tripomastigotes de *T. cruzi*. De todos los alcaloides evaluados, el noraporfina caverina ha demostrado actividad antiprotozoaria tanto contra *Leishmania* como con *T. cruzi* (Fournet et al., 2007).

Los extractos clorofórmicos y etanólicos de las hojas de *Portulaca werdermannii* y *P. hirsutissima* fueron evaluados en ensayos de linfoproliferación y en cultivos axénicos de *Leishmania amazonensis* y *T. cruzi*. Ambos extractos demostraron tener potente actividad inhibitoria en la proliferación linfocitaria, por el contrario solo el extracto clorofórmico de ambas plantas inhibió el crecimiento de *L. amazonensis*, pero sin efecto en los cultivos de *T. cruzi*. (Costa et al., 2007).

Así mismo, Fernández et al., (2008) reportaron la actividad *in vitro* de los extractos etanólicos de *Simarouba glauca* DC, *Melaleuca leucadendron* y *Artemisia absinthium* L. contra *Trypanosoma b. brucei*, *T. cruzi*, *Leishmania infantum* y *Plasmodium falciparum*. De las plantas evaluadas en este estudio, únicamente *S. glauca* demostró fuerte actividad contra todos los protozoarios, pero su actividad es considerada por los autores como inespecífica.

Tridax procumbens tenía actividad *in vitro* contra tripomastigotes de *T. cruzi* a una concentración de 1mg/mL (Cáceres et al., 1998). De la corteza de *Tabebuia avellanedae* se obtuvo una o-naftoquinona la β -lapachona que presentó acción inhibitoria *in vitro* sobre el crecimiento de tripanosomas (Dubin et al., 2001) la cual posee también una importante actividad tripanocida, y se ha considerado como una molécula potencial para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Asimismo en extractos obtenidos a partir de 18 plantas usadas en la medicina tradicional China y Mediterránea fueron utilizados para probar su actividad contra epimastigotes de *T. cruzi*; de las cuales, los extractos metanólicos de *Coptis chinensis* y *Ranunculus sceleratus* presentaron los porcentajes de inhibición más

altos con 100% y 97% respectivamente a una concentración de 250 µg/mL; (Schinella et al., 2002).

Las fracciones purificadas *Camellia sinensis* (té verde) en ensayos *in vitro* demostraron actividad tripanocida (Paveto et al., 2004).

Por otra parte, se han demostrado en condiciones experimentales *in vitro*, que los extractos etanólico y diclorometánico de *Chromolaena hirsuta* reducen significativamente la viabilidad de los tripomastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *Leishmania amazonensis*. Seis flavonoides aislados de éstos extractos demostraron un efecto antiproliferativo en el crecimiento de *T. cruzi* y *L. amazonensis* (Taleb et al., 2004).

En ese mismo año, Vieira et al., (2004) realizaron un estudio *in vitro*, donde analizaron a 22 extractos y 43 fracciones de plantas pertenecientes a la familia *Meliaceae* y *Rutaceae*, y determinaron que los extractos de *Conchocarpus heterophyllus* y *Trichilla ranolhoi* presentaron la mayor actividad tripanocida.

También estudios desarrollados con *Calea uniflora* demostraron que dos de los compuestos tipo p-hidroxiacetofenonas poseían actividad *in vitro* hacia tripomastigotes de *T. cruzi* reduciendo el número de parásitos en un 70 - 71% a una concentración de 500 µg/mL (Do Nascimento et al., 2004).

Por otra parte, 32 extractos orgánicos y acuosos pertenecientes a 12 plantas de la medicina tradicional de Argentina mostraron tener actividad contra epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Tulahuen), y comprobaron que *Ambrosia scabra*, *Ambrosia tenuifolia* *Baccharis spicata*, *Eupatorium buniifolium*, *Lippia integrifolia*, *Mulinum spinosum* y *Satureja parvifolia*; así como los extractos acuosos de *E.*

buniifolium, *L. integrifolia*, *M. spinosum* y *S. parvifolia* presentaron actividad tripanocida (Sulsen et al., 2006).

El extracto etanólico de las semillas de la planta *Xylopiya aromatica*, mostró actividad *in vitro* contra epimastigotes de *T. cruzi* a concentraciones mayores de 211.6 µg/mL bajo condiciones *in vitro*, (Tenorio et al., 2006).

Los aceites esenciales del *Origanum vulgare* L. (orégano) y *Thymus vulgaris* L. tienen actividad hacia epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* a una concentración inhibitoria similar a la obtenida con el benznidazol (IC50 50 µg/mL) Santoro et al., (2007).

Por otra parte Saraiva et al (2007), analizó el efecto tripanocida tanto *in vitro* como *in vivo* de seis lignanolactonas; y determinaron que la hinoquinina era la responsable de la mayor actividad *in vitro* contra las formas de epimastigote y amastigote de *T. cruzi*, con un IC50 de 0.67 y 18.36 µM respectivamente.

Los extractos crudos (hexánicos y metanólicos) y 34 compuestos aislados de *Vitex polygama* Cham. y *Siphoneugena densiflora* O. Berg fueron evaluados para determinar su posible actividad tripanocida sobre tripomastigotes de *T. cruzi* y *T. brucei* Gallo et al., (2008), En general, los extractos polares demostraron los mayores efectos y algunos de los compuestos evaluados demostraron buenos resultados.

Otros reportes de plantas originarias de Guatemala han sido descritos, donde se menciona la actividad antitripanosoma de *Neurolaenalobata*, *Tridax procumbens* (Asteraceae), *Solanum americanum* (Solanaceae), *Acalypha guatemalensis* (Euphorbiaceae) y *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) contra tripomastigotes y

amastigotes de *T. cruzi* bajo condiciones *in vitro* y contra tripomastigotes *in vivo* (Cáceres et al., 1998; Berger et al., 1998; Muelas-Serrano et al., 2000).

En Brasil, han sido reportadas diversas resinas exudadas por plantas de la región y se les denomina *propolis*, las cuales han demostrado tener actividad antiprotozoaria. De ellos se han purificado dos compuestos: ácido 2 (2 difenil -4-hidoxicinámico y 2 (2 dimetil -6-carboxietinil- 2H-1-benzopireno, que han demostrado buena actividad contra tripomastigotes sanguíneos (Marcucci et al., 1997).

Asimismo, de las hojas de la planta *Lynchnophora granmongolense* (*Asteraceae*) se obtuvieron 3 compuestos que demostraron actividad antitripanocida: centraterina, goyazensolido y el flavonoide eriodictiol (Grael et al., 2000). Otro compuesto tipo sesquiterpeno lactona fue aislado de la misma planta, y demostró inducir cambios morfológicos en los tripomastigotes de *T. cruzi* a las concentraciones 5-10 µg/mL durante 4 días y a mas altas concentraciones resultó letal para el parasito en unas cuantas horas (Brenigio et al., 2000).

Otro compuesto que demostró bajo condiciones *in vivo* una buena actividad antitripanosoma bajo condiciones *in vivo*, fue el lignano aislado de *Zanthoxylum naranjillo* (*Rutaceae*), que demostró actividad antiprotozoaria contra dos diferentes cepas de *T. cruzi*, principalmente contra tripomastigotes pero no demostró actividad contra amastigotes (Cunha et al., 2003).

Polygala sabulosa y *Polygala paniculada* (*Polygalaceae*) así como *Miconia fallax* y *Miconia stenostachya* (*Melastomataceae*) son otras de las plantas de Brasil de las cuales han sido aislados ácidos triterpenos con actividad lítica hacia tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* (Pizzolatti et al., 2003).

De igual forma, se ha descrito que a partir de las hojas de la planta *Myrospermum frutencens* (*Fabaceae*) originaria de Panamá, se aislaron 5 compuestos tipo diterpenos, de los cuales dos de ellos demostraron su mejor actividad contra tripomastigotes y otros dos demostraron una actividad más fuerte hacia amastigotes de *T. cruzi*.

En México se han estudiado una gran variedad de plantas con el fin de buscar alternativas de tratamiento contra *T. cruzi* y otros tripanosomatídeos. Se han estudiado más de 40 familias y 65 especies de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con actividad contra *T. cruzi* (Acosta-Viana y Guzmán-Marín, 2008). Algunas de estas plantas son: *Aristolochia taliscana* (*Aristolochiaceae*) y se le atribuye su actividad a la presencia de lignanos en sus raíces, *American Persea* Mill (*Lauraceae*), de la cual obtuvieron dos compuestos de los extractos metanólicos de las semillas, 1,2,4-trihidroxiheptadecano y 1,2,4 trihiroxinonadecano (Abe et al., 2003; Abe et al., 2005), ambos con una actividad moderada hacia *T. cruzi*. Así mismo, se han realizado estudios de las familias *Asteraceae*, *Araceae*, *Moraceae*, *Solanaceae*, y *Rhamnaceae*, atribuyendo su actividad antitripanosoma en estas familias de plantas debido a la rica presencia de alcaloides, que interfieren en la replicación parasitaria por ocasionar alteraciones metabólicas y estructurales en los epimastigotes (Chabala et al., 1991; Cavin et al., 1997; Fournet et al., 1998).

Camacho et al., (2000) describió que a partir de los extractos crudos de la planta *Celaenodendron mexicanum*, se obtuvo un compuesto triterpeno carboxílico, con actividad antiprotozoaria hacia promastigotes y amastigotes de *Leishmania*

donovani, así como hacia tripomastigotes sanguíneos de *Trypanosoma brucei* a una IC50 de 14.9 y 17 μ M, respectivamente.

También se han realizado ensayos con extractos crudos de varias plantas medicinales mexicanas contra epimastigotes de *T. cruzi* bajo condiciones *in vitro*, y se ha demostrado que 18 de 43 extractos analizados presentaron actividad hacia *T. cruzi* a una concentración de 2mg/mL, y 13 mostraron actividad cuando emplearon 1mg/mL (Abe et al., 2002).

La actividad de *Persea americana* fue evaluada hacia epimastigotes y tripomastigotes mostrando una ligera actividad (Abe et al, 2005). En un estudio *in vitro* del extracto acuoso y del aceite esencial de las hojas de la planta *Chrysactinia mexicana*, se observó que ambos poseen principios bioactivos que inhiben el crecimiento del parásito. (Esparza et al., 2005). Finalmente, otra de las plantas medicinales mexicanas que ha demostrado actividad antiprotozoaria es *Senna villosa*, por lo que a continuación se hace referencia de sus propiedades.

2.9.3 Senna villosa

La planta *Senna villosa* (*S. villosa*), es una leguminosa utilizada desde tiempos ancestrales dentro de la medicina tradicional maya del sureste mexicano. En trabajos previos con *S. villosa* se ha descrito la presencia de múltiples compuestos, tales como las quinonas antracénicas fision (1,8 dihidroxi, 3 metoxi, 6 metil, 9-10 antraquinona) y el crisofanol (1,8, dihidroxi 3 metil 9-10 antraquinona) (Figuras 8 y 9) (Mena et al., 1996)

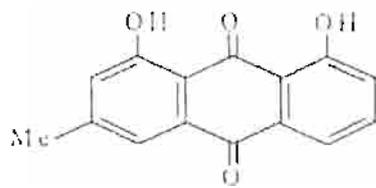


Fig.8. Crisofanol

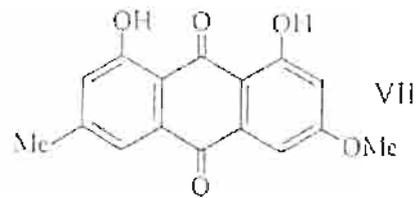


Fig. 9. Fision

Así mismo, se ha reportado la actividad antimicótica de los extractos metanólico, clorofórmico y hexánico de las hojas de *S. villosa* particularmente hacia *Candida albicans* y *Aspergillus niger* y también se ha reportado actividad antimicrobiana sobre bacterias gram positivas como *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, demostrando que el extracto hexánico es el que presentó mayor actividad antimicrobiana. También se ha reportado que el extracto diclorometánico de hojas de *S. villosa* posee principios bioactivos importantes que inhiben el crecimiento de *T. cruzi in vitro* que muy probablemente coinciden con los compuestos obtenidos a partir del extracto clorofórmico.

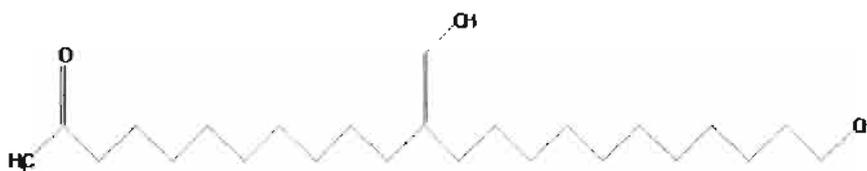


Fig. 10. Estructura del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo.

Por otra parte, Guzmán y cols.; (2004) describieron que los extractos metanólico, clorofórmico y acuoso de *S. villosa*, tienen actividad significativa hacia los estadios de epimastigote y tripomastigote de *T. cruzi*.

El extracto clorofórmico de esta planta, a las concentraciones de 1.65, 3.3 y 6.6 µg/mL demostraron actividad similar a la violeta de genciana y al alopurinol.

Recientemente Guzmán et al., (2008), demostraron que el acetato de (8-hidroximetilen)-tricosanil (Fig 10) aislado del extracto clorofórmico de *Senna villosa*, tiene una eficiente actividad *in vitro* contra *T. cruzi* particularmente hacia los estadios de epimastigote y tripomastigote a las concentraciones de 1.65, 3.3 y 6.6 µg/mL.

Estos resultados permitieron comprobar la eficiencia del compuesto puro aislado de la planta con una respuesta superior a la obtenida *in vitro* con violeta de genciana y demostrando que no producía citotoxicidad en una línea celular de mamífero. Debido a la actividad demostrada del compuesto contra *T. cruzi* en los estos estudios previos, se propuso determinar si el acetato de (8-hidroximetilen)-tieicosanilo tenía actividad contra el parásito bajo condiciones experimentales *in vivo*.

III. Objetivo general

Determinar la actividad antiprotozoaria *in vivo* del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo obtenido a partir del extracto clorofórmico de las hojas de *Senna villosa* contra las formas de tripomastigote y amastigote de *Trypanosoma cruzi*.

IV. Objetivos específicos

1. Determinar la actividad antiprotozoaria *in vivo* de acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo contra *T. cruzi* bajo condiciones *in vivo*.
2. Determinar toxicidad oral aguda de acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo en un modelo animal.
3. Determinar la curva de dosis-efecto *in vivo* de acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo evaluando su actividad sobre *T. cruzi* en animales infectados y tratados inmediatamente.
4. Determinar la curva de dosis-efecto *in vivo* de acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo evaluando su actividad contra *T. cruzi* en animales infectados y tratados 15 post-infección.
5. Determinar la regresión del efecto del compuesto estudiado en el modelo animal infectado con *T. cruzi*.

V. Materiales y Métodos.

5.1 Obtención del extracto crudo y purificación del compuesto acetato de (8-hidroximetilen)-tricosanilo.

En un matraz balón de 12 L provisto de un refrigerante en posición de reflujo se colocó 1 kg de hojas secas y molidas y 5 L de cloroformo, la mezcla se calentó a temperatura de reflujo durante 4 horas, se dejó enfriar y posteriormente se filtró. El cloroformo se eliminó en un evaporador rotatorio a presión reducida y se liofilizó. Bajo este procedimiento, se obtiene un rendimiento del extracto del 5%.

El extracto clorofórmico (30 gr), se separó por cromatografía en columna empacada con gel de sílice 60 malla 70-230 (Merck). La columna fue eluida con hexano, incrementando la polaridad con acetato de etilo. Se colectaron 10 fracciones de 150 mL, a las cuales se les eliminó el disolvente en un evaporador rotatorio a presión reducida y posteriormente a sequedad "baño María". La fracción que presentó mayor efecto inhibitorio (F-5) se separó en una segunda cromatografía en columna, usando cloroformo como eluyente, incrementando la polaridad con acetato de etilo y se cristalizó con cloroformo para obtener un sólido blanco con un p.f 72-74°C y se obtiene un rendimiento del extracto de 2.7% (Guzmán et al., 2008).

Para determinar la pureza del compuesto, una muestra del sólido se analizó por cromatografía de gases en un cromatógrafo Varian Modelo 3800 con una columna de Megaboro DBI de 30 m usando N₂ como gas acarreador y un detector de ionización de flama FID (Guzmán et al., 2008).

5.2 Parásitos

Se utilizó la cepa H4 de *T. cruzi* autóctona del estado de Yucatán, aislada de humano. Esta cepa fue mantenida por medio de pases sucesivos de ratón a ratón cada 3 a 4 semanas (Barrera-Pérez et al., 2001).

5.3 Modelo animal

Se utilizaron ratones hembras de la cepa BALB/c, de 8 semanas de edad, de 18 gr de peso (OECD, 2001) mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura (18° C), humedad e iluminación.

5.4 Infección de ratones

Para la infección de los ratones, el inóculo se obtuvo de los ratones infectados con la cepa H4 mantenida mediante pases sucesivos de ratón a ratón. Cada ratón fue inoculado por vía intraperitoneal (IP) con 50,000 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* obtenidos de un corte en la cola. El inóculo se elaboró con una solución de NaCl al 0.85% y EDTA (0.05%).

5.5 Administración oral del compuesto evaluado

Se prepararon soluciones con el acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo a las diferentes dosis evaluadas (2.1, 8.4 y 33.6 µg/g) disueltas en un amortiguador de

fosfatos (PBS, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM y KH₂PO₄ 1.4 mM pH 7.4).

Debido a que el compuesto estudiado no fue soluble, se mezcló con 4 partes iguales de polivinilpirrolidona (PVP, Sigma, EUA) disuelta en cloroformo, una vez homogénea la mezcla, se evaporó el disolvente al vacío a 28°C. Después de este procedimiento, el extracto se reconstituyó en PBS.

Se administró acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo empleando la cantidad de compuesto requerida para cada dosis a evaluar, reconstituido en un volumen de 50 µL/día/animal.

5.6 Determinación de dosis letal media (DL50) y toxicidad oral aguda

Para la determinación de la DL50 se utilizó la metodología sugerida por la Agencia de Protección Ambiental (EPA por sus siglas en inglés de Environmental Protection Agency) en el 2002, denominada procedimiento "arriba y abajo" (Up-and-Down Procedure) específico para el cálculo óptimo de la toxicidad oral aguda empleando un número reducido de animales en comparación a los métodos previamente utilizados para la determinación de la DL50.

La EPA, menciona que para la evaluación de la toxicidad oral aguda de compuestos que no se tiene conocimiento previo en modelos animales, tal y como el acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo evaluado en este estudio, se recomienda seguir determinados lineamientos basados prácticamente en administrar una dosis inicial del compuesto de 175 mg/kg (o 175 µg/g proporcionalmente en organismos pequeños), y evaluar cualquier signo de toxicidad que pudiera observarse en el

animal, de manera que si este sobrevive durante 48 horas, puede incrementarse la dosis a una progresión de 0.5 log, y es decir, la siguiente dosis sería de 550 mg/kg. Así mismo, si el animal muere dentro del rango de tiempo mencionado, al siguiente animal se le otorgaría una dosis con esa misma progresión pero hacia abajo, es decir de 55 mg/kg.

La realización de este procedimiento, se acompaña del registro de los resultados en un software específico (AOT425) otorgado también por la EPA, el cual mediante la introducción de los datos de muerte o sobrevivencia de los animales a las diferentes dosis, nos indica la siguiente dosis a utilizar (hacia arriba o hacia abajo) y en un momento dado al finalizar el experimento, para que con todo esto se realice un cálculo de una dosis letal media aproximada y también cuales serían los intervalos de confianza de dicha dosis (OECD, 2001).

5.7 Dosis efecto

La actividad antiprotozoaria del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo fue evaluada a las diferentes dosis experimentales y los grupos control, en función de la parasitemia cuantificada en cada grupo estudiado, se establecieron curvas de parasitemia, y por otra parte, al final de la evaluación, se sacrificaron a los animales y se determinó de la invasión parasitaria al tejido cardiaco mediante la cuantificación de nidos de amastigotes presentes tanto en animales tratados como en no tratados, además se registró la mortalidad de todos los individuos incluidos en los bioensayos.

Para determinar la parasitemia se observaron y contaron los tripomastigotes sanguíneos obtenidos de la cola de cada ratón: se tomaron 0.5 mL de sangre con

una pipeta de blancos, se completó con solución salina al 0.85% con EDTA al 10% y se contaron en la cámara de Neubauer. El conteo de parásitos se realizó cada 4 días hasta la conclusión del bioensayo (día 28).

La invasión a tejido cardíaco se determinó por la presencia de nidos de amastigotes. El corazón de cada ratón se obtuvo al sacrificar a los ratones infectados al concluir el bioensayo. El órgano obtenido se procesó según la técnica para la obtención de cortes histológicos mediante la inclusión en parafina, descrita por Jörg et al., (2005). Las muestras fueron teñidas con hematoxilina-eosina (HE) para realizar la búsqueda y conteo de los nidos de amastigotes.

Para cada corte histológico se contaron 100 campos microscópicos con el objetivo de 40x. La variación en la presencia de nidos de amastigotes entre grupos fue el principal parámetro para evaluar replicación del parásito en ese estadio y determinar si existían diferencias entre individuos tratados y no tratados.

La mortalidad fue evaluada en función del porcentaje de los ratones que murieron espontáneamente, antes de la terminación de los bioensayos (Fajardo, 1998; Galanti et al, 1994).

Los bioensayos en donde se evaluó la actividad del acetato de (8-hidroximetil)-trieicosanilo a dosis de 2.1, 8.4 y 33.6 $\mu\text{g/g}$, se realizaron en animales infectados y tratados inmediatamente. También se realizaron bioensayos bajo el esquema de la infección de animales e inicio de su tratamiento 15 días post-inoculación evaluando las dosis 16.8 y 33.6 $\mu\text{g/g}$. Durante la realización de los bioensayos como control negativo se incluyó a un lote de ratones infectado y no

tratado (50 μ L PBS pO/diariamente) y como control positivo se estudio a un lote de ratones infectados y tratados con alopurinol (8.5 μ g/gr cada 24 horas).

5.8 Regresión del efecto

Con la finalidad de corroborar si la reducción de la parasitemia observada bajo condiciones *in vivo* era realmente atribuible a la actividad del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo, se realizó un bioensayo en donde se emplearon ratones infectados bajo las mismas condiciones de los estudios de dosis-efecto, pero se administraron las dosis 16.8 y 33.6 μ g/mg durante un periodo mas corto de tratamiento (20 días) y se le dio seguimiento a los individuos durante los 28 días (desde la inoculación, tratamiento, suspensión del tratamiento y 8 días posteriores a la suspensión), con la finalidad de evaluar (mediante conteo de parásitos en sangre) el posible incremento o reducción de la parasitemia en los días subsecuentes inmediatos a la suspensión del tratamiento. Es decir, como se comportaba la parasitemia una vez retirada la administración del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo

5.9 Análisis estadístico.

El análisis de los datos obtenidos entre los grupos experimentales se realizó aplicando la prueba estadística de ANOVA de una vía, tomando como valor de significancia una $p < 0.05$ y para determinar si existen diferencias significativas entre los grupos estudiados, se utilizó la prueba estadística de DHS de Tukey (Diferencia Significativa Honesta). En el caso de los demás experimentos se utilizó la prueba

estadística de t de Student. (Hoel, 1984; Levin, 1979). Asimismo, con la finalidad de determinar cuál era la dosis que tenía capacidad de inhibir el 50% de la replicación parasitaria durante los bioensayos, se graficaron las diferentes respuestas obtenidas con todas las dosis evaluadas en logaritmo, a fin de determinar cuál de todas las dosis era la dosis efectiva media en los animales tratados en comparación a la respuesta observada en los animales infectados y no tratados.

VI. Resultados y discusión.

6.1 Determinación de dosis letal media (DL50) y toxicidad oral aguda.

Con el fin de determinar la toxicidad oral del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo, se utilizó el procedimiento descrito por OCDE (2001) en la que se evaluaron distintas dosis del compuesto (175, 550, 1750 y 5000 $\mu\text{g/g}$). Al seguir este procedimiento no se observaron signos clínicos asociados con toxicidad oral. Cuando se administró la dosis de 5000 $\mu\text{g/g}$, se observó ligera letargia en el 66 % de los animales de este grupo, sin embargo, este efecto fue reversible 24 horas después de la administración.

Con estos resultados se demostró que la administración por vía oral del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo, aun a la dosis más alta evaluada (5000 $\mu\text{g/g}$) no ocasionó efectos de toxicidad oral aguda. Esto coincidió con lo reportado previamente *in vitro* por Guzmán et al., (2008), en este estudio el compuesto a una concentración de 6.6 $\mu\text{g/mL}$ no demostró actividad tóxica hacia la línea celular Vero (células de riñón de mono verde africano).

6.2 Dosis Efecto

6.2.1 Efecto del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo en tripomastigotes de *T. cruzi* (inicio de tratamiento 24 h post-infección).

Durante la evaluación del efecto del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo, se observó que las tres diferentes dosis evaluadas demostraron actividad sobre tripomastigotes de *T. cruzi*, pero ninguna tuvo la capacidad de eliminar completamente a los parásitos.

Al día 24, se observó una inhibición de la replicación parasitaria del 75.8, 75.9 y 82.8 % en los animales tratados con las dosis de 2.11, 8.4 y 33.6 µg/g respectivamente. Al final del experimento, se observó una inhibición de la replicación parasitaria del 70, 73.8 y 80.9 % para las dosis 2.11, 8.4 y 33.6 µg/g respectivamente, en comparación con el grupo control negativo.

Aunque el acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo no fue capaz de eliminar completamente los parásitos en los animales tratados, la mortalidad fue menor en comparación con los no tratados ($p < 0.05$) o los tratados con alopurinol (8.5 µg/g), estos resultados coinciden con otros estudios que también describen a algunos extractos obtenidos a partir de plantas con actividad tripanocida reducen sin eliminar completamente a los parásitos de la circulación (Asuzu y Chineme, 1990, Cunha et al., 2006) pero aun así, se incrementa la sobrevivencia de los animales tratados. Es importante destacar que la cepa con la que se evaluó la actividad antiprotozoaria (H4) ha sido previamente descrita como de alta virulencia y aun así a la dosis de 33.6 µg/g inhibió en mas de un 50% la replicación parasitaria durante toda la duración del bioensayo (ver Fig. 11).

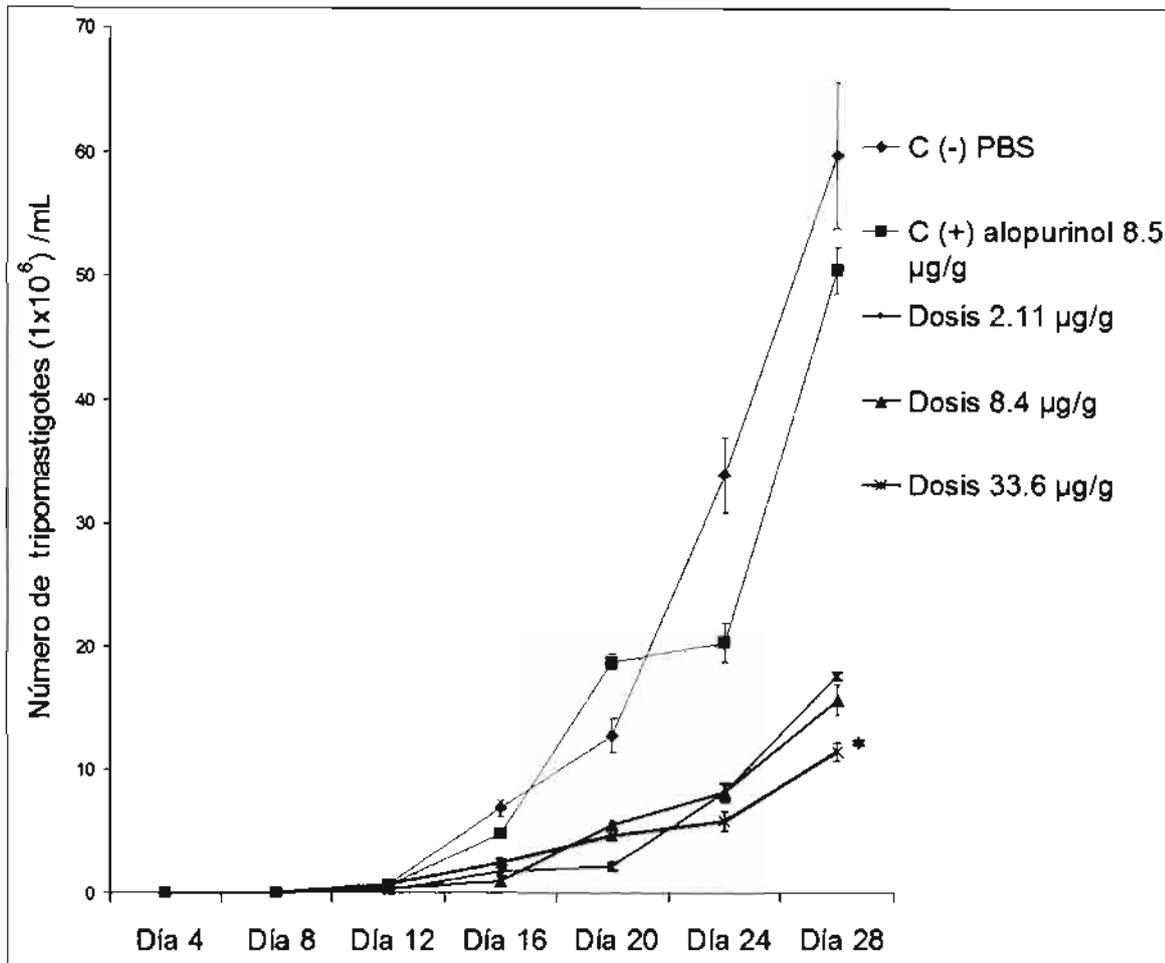


Figura 11. Efecto del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo sobre la curva de parasitemia en ratones BALB/c infectados con 5×10^4 tripomastigotes de *T. cruzi* cepa H4 y con inicio del tratamiento 24 horas después de la infección (medias \pm EE)(* $p > 0.05$).

6.2.2 Efecto del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo en amastigotes de *T. cruzi* (inicio de tratamiento 24 h post-infección)

Después del día 28, los animales de este bioensayo, tanto experimentales como controles fueron sacrificados y sus corazones fueron procesados como se describe en la metodología correspondiente con el fin de examinarse microscópicamente para cuantificar el número de nidos de amastigotes en cada uno de los individuos.

Bajo estas condiciones se observó que en los grupos tratados con las dosis más altas (8.4 y 33.6 $\mu\text{g/g}$) se redujo la cantidad de nidos, en un 81 y 86.11% respectivamente, en comparación con los individuos no tratados ($p < 0.05$). Así mismo tuvieron menor cantidad de nidos que los del grupo control positivo (alopurinol) y los animales que fueron tratados con la dosis 2.11 $\mu\text{g/g}$ (Figura 12).

Por otra parte, en los individuos tratados con las dosis 8.4 y 33.6 $\mu\text{g/g}$, se observó una importante reducción en la cantidad de nidos de amastigotes con un 81 y 86.11 % menos en comparación con los animales no tratados.

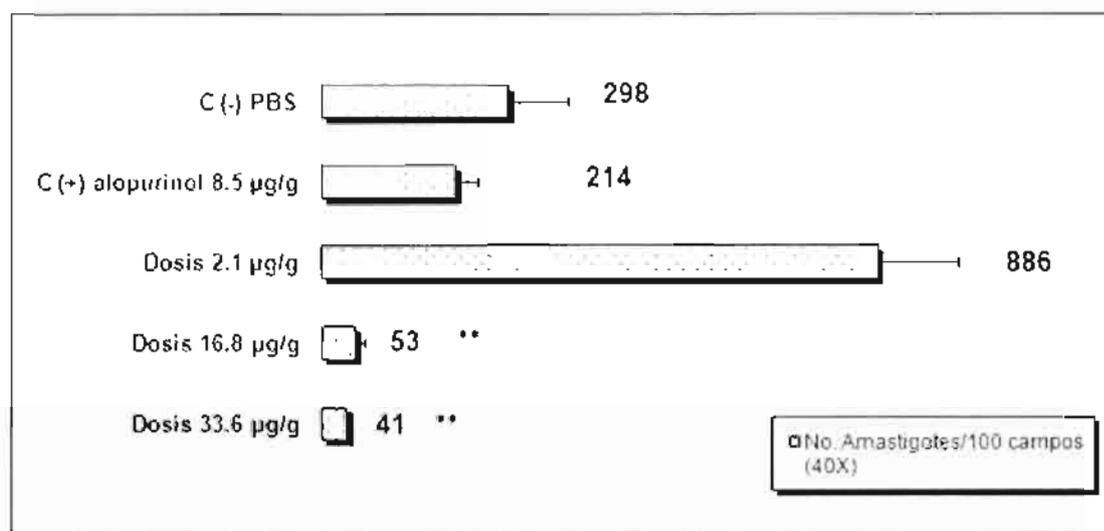


Figura 12. Efecto de acetato de (8-hidroximetilfen)-trieicosanilo sobre el número de nidos de amastigotes en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* y con inicio del tratamiento 24 h post-infección (** $p < 0.05$).

La cepa H4 de *T. cruzi* aislada de un caso clínico severo, caracterizada previamente (Barrera-Peréz et al., 2001) tiene especial tropismo para invadir y causar lesiones importantes en tejido cardíaco en ratones NIH, efecto que se pudo observar en los ratones BALB/c infectados y que no recibieron tratamiento alguno en este estudio.

Considerando que, aun cuando se ha descrito que el alopurinol es capaz de inhibir la replicación de amastigotes en una línea celular (Nakajima-Shimada et al., 1996; Paulino et al., 2005), en los resultados obtenidos en este estudio únicamente se observó un ligero efecto en la disminución (28.1 %) del número de nidos de amastigote de los animales tratados con este compuesto en comparación con los no tratados ($p>0.05$), pero en cambio, en los individuos que fueron tratados con las dosis más altas (8.4 y 33.6 $\mu\text{g/g}$) del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo, se observó una importante reducción (del 82.2 y 86.25% respectivamente) en la cantidad de nidos de amastigotes en tejido cardíaco ($p=<0.05$), aun teniendo en cuenta que la virulencia de la cepa empleada y que la cantidad de parásitos inoculados fue alta.

6.2.3 Mortalidad

La mortalidad registrada en los animales tratados con las tres dosis evaluadas (2.1, 8.5 y 33.6 $\mu\text{g/g}$) fue del 20%, este porcentaje fue mucho menor ($p=<0.05$) que para los animales tratados con alopurinol (70 %) y que los animales que no recibieron tratamiento alguno (50%) (Figura 13).

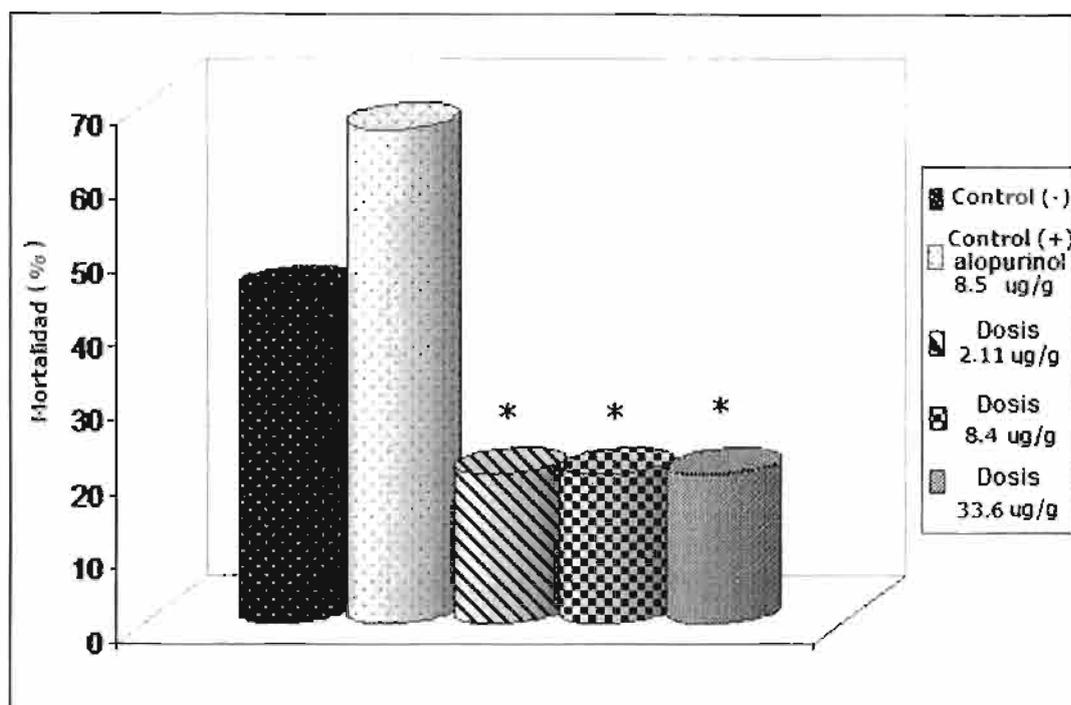


Figura 13. Efecto de acetato de (8-hidroxitileno)-trieicosanilo sobre la tasa de mortalidad de ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* y con inicio de tratamiento 24 h después de la infección. (* $p < 0.05$).

En el presente estudio se pudo observar anorexia, emaciación y diarrea en los animales tratados con alopurinol (control positivo), también se observó una mortalidad alta (70%), todavía mayor que la de los animales no tratados (50%).

La mortalidad registrada en los animales no tratados de este estudio, coincide con la mortalidad descrita previamente y atribuida al comportamiento de la cepa H4 (Barrera-Pérez *et al.*, 2001). En cambio en los animales administrados con acetato de (8-hidroxitileno)-trieicosanilo, la mortalidad fue menor (únicamente del 20%) (Figura 13) y que la reducción del número de nidos de amastigotes fue proporcional a la reducción del número de tripomastigotes sanguíneos cuantificados en los individuos tratados.

6.2.4 Efecto del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo en tripomastigotes de *T. cruzi* (inicio de tratamiento 15 días post-infección).

La respuesta observada en los animales que fueron infectados pero tratados 15 días posteriores a la infección, fue distinta a la que se registró en los experimentos anteriores. Bajo estas condiciones, en las que la parasitemia ya estaba establecida cuando se administró el acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo, se pudo observar que este compuesto tuvo la capacidad de disminuir el número de parásitos circulantes en sangre, sobre todo a la dosis 33.6 $\mu\text{g/g}$ en la cual hubo un 80.9% de disminución de la parasitemia (Figura 14) respecto a la parasitemia observada en los animales no tratados.

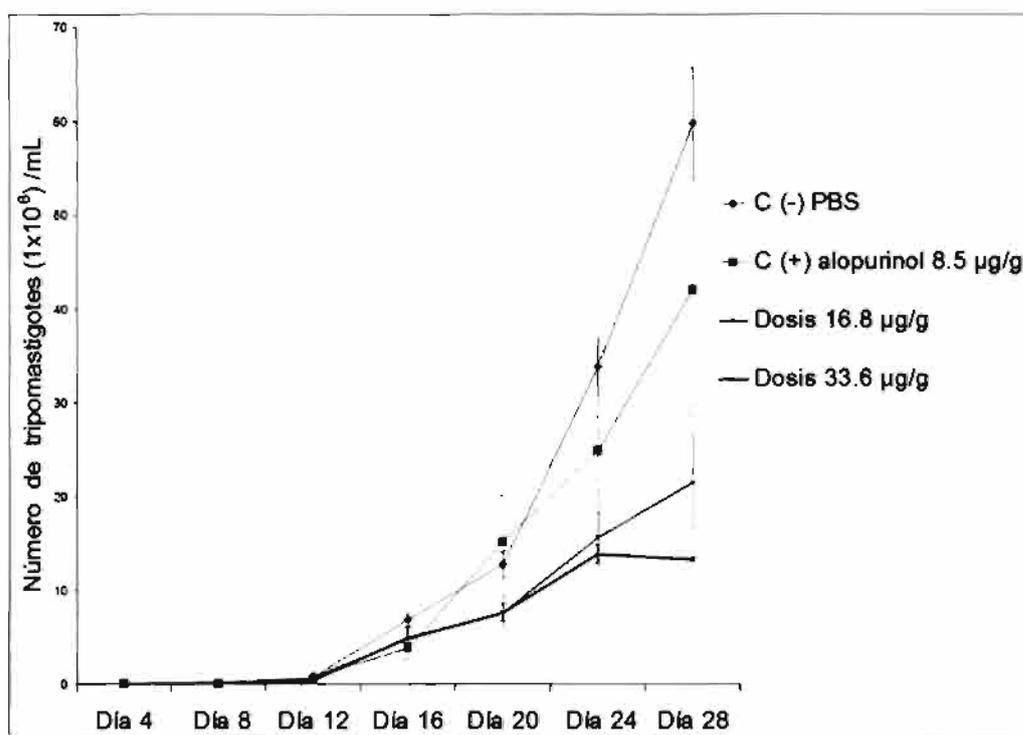


Figura 14. Curva de parasitemia en ratones BALB/c infectados con 5×10^4 tripomastigotes de *T. cruzi* cepa H4 y tratados 15 días post-infección con acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo a las dosis de 16.8 y 33.6 $\mu\text{g/g}$ (Valores de las medias \pm EE).

En este trabajo, la mayor inhibición de la parasitemia se comenzó a observar entre el día 20 y 24, donde fue de más del 50% a diferencia de la parasitemia en los controles (positivos y negativos). Con las dosis evaluadas (16.8 y 33.6 $\mu\text{g/g}$) se registraron niveles de parasitemia menores al 50% hasta el final del experimento (día 28), observándose una mayor inhibición de la replicación parasitaria en los individuos tratados con la dosis 33.6 $\mu\text{g/g}$ ($p > 0.05$).

La actividad antitripanosomal observada, coincide con otros estudios *in vivo* con diferentes tripanosomatídeos en los cuales se emplean extractos de plantas medicinales (Aderbauer et al., 2008), fracciones de los mismos (Cáceres et al., 1998), compuestos obtenidos a partir de extractos crudos obtenidos de recursos vegetales (Sülsen et al., 2008; Saraiva et al., 2007; Cunha et al., 2006; Dantas et al., 2006) y otros derivados indirectos de las plantas, como los extractos de propóleo verde brasileño (Salomao et al., 2009) pero al igual que la actividad de acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo, ninguno es capaz de producir una eliminación total del parásito.

Cabe mencionar que si se comparan los resultados de la actividad del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo con el estudio reportado por Saraiva y colaboradores (2007), en donde evalúan un compuesto con actividad hacia *T. cruzi* obtenido a partir del extracto crudo de *Zanthoxylum naranjillo*, al administrar dosis de 40 $\mu\text{g/g}$ se observa una eficiente respuesta antiprotozoaria, pero sin embargo Saraiva y su grupo utilizan una menor dosis de inoculación de parásitos y emplean una cepa menos virulenta (cepa Y).

6.2.5 Efecto del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo en amastigotes de *T. cruzi* (inicio de tratamiento 15 días post-infección)

Con el fin de identificar y cuantificar microscópicamente el número de nidos de amastigotes en cada uno de los individuos, el día 28 del bioensayo, fueron sacrificados todos los animales de los lotes, experimentales y controles; sus corazones fueron procesados como se describe en la metodología correspondiente.

Bajo estas condiciones, se observó una menor cantidad de nidos de amastigotes en los individuos tratados con las dosis 16.8 y 33.6 $\mu\text{g/g}$ (Figura 15). Aunque a la mayor dosis evaluada (33.6 $\mu\text{g/g}$) no se observó un menor número hay diferencia significativa en el número de nidos presentado con la dosis 16.8 $\mu\text{g/g}$, es importante mencionar que el tamaño de los nidos establecidos en el tejido cardiaco de los ratones fue menor que en los de los animales tratados a la dosis 16.8 $\mu\text{g/g}$.

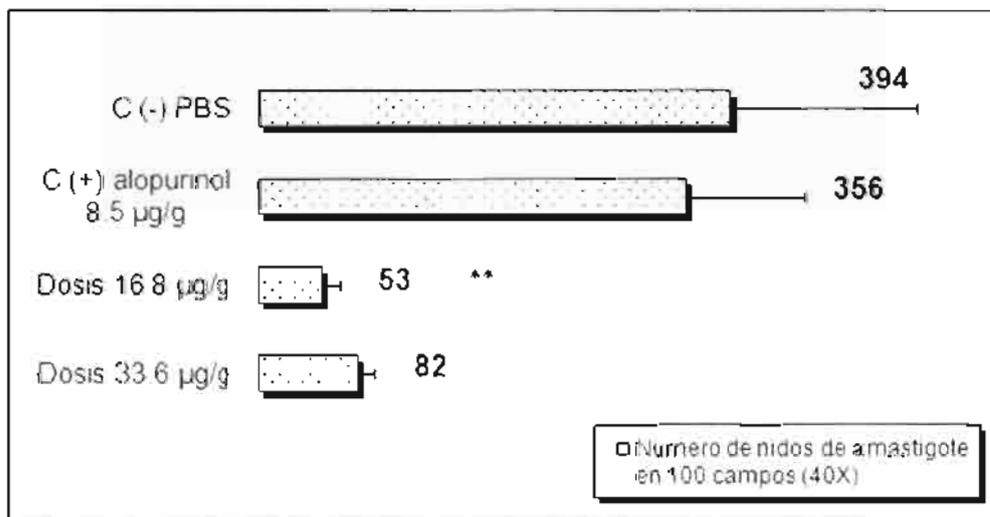


Figura 15. Efecto de acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo sobre el número de nidos de amastigote en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* y con inicio de tratamiento a los 15 días después de la infección (Valores de las medias \pm EE)

El tratamiento con acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo demuestra una reducción en la cantidad de nidos en tejido cardíaco en los animales tratados y aunque existen pocos estudios en los cuales se mide el efecto de extractos y compuestos obtenidos a partir de plantas con actividad antiprotozoaria hacia el estadio intracelular amastigote de *T. cruzi* (Weniger et al., 2006; Luize et al., 2006; Mesquita et al., 2005; De Souza et al., 2005; Araya et al., 2003; Schmeda-Hirschmann et al., 2001; Bonay et al., 1998), muchos de ellos han demostrado poseer actividad hacia amastigotes pero no son selectivos entre la presencia de los parásitos y las células de mamífero, ocasionando toxicidad sobre el modelo de estudio (Schmeda-Hirschmann et al., 2001) y además, la generalidad de los estudios en amastigotes evalúan el efecto bajo condiciones *in vitro*. En nuestro trabajo los resultados observados del efecto del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo sobre los amastigotes con las dos dosis más altas (16.8 y 33.6 µg/g) e iniciado el tratamiento 15 días post-infección, permiten demostrar que los animales que recibieron tratamiento, registraron una importante reducción en la cantidad y tamaño de los nidos de amastigote en el tejido cardíaco, aunque ya tengan varios días de que han sido infectados, por lo que se trata de emular una situación en donde se podría comenzar un tratamiento en un individuo infectado en un escenario real.

En los controles positivos, el tratamiento con alopurinol (8.4 µg/g) no demostró una actividad anti- *T. cruzi* significativa al igual que cuando se administró simultáneamente al inicio de la infección, probablemente debido a que en el día 15 post-infección, al estar establecida perfectamente la parasitemia, una mayor proporción de parásitos ya se internalizaron en el tejido cardíaco, y bajo esas

condiciones probablemente se requiera una mayor concentración del compuesto disponible en este tejido, y solo de esa forma, a mayores dosis administradas, puede producir una inhibición de la replicación y formación de mayor cantidad de nidos.

Así mismo, en los animales que sean tratados con dosis menores del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo, inducirían a que su presencia en menor proporción en el torrente sanguíneo, únicamente contribuiría a generar un ambiente hostil para los tripomastigotes sanguíneos, induciendo con ello a una mayor internalización del parásito hacia el tejido cardíaco, y es por ello que se observó un incremento en la cantidad de nidos en los ratones que fueron tratados con una dosis menor durante la infección y tratamiento inmediato. Por el contrario, en las dosis más altas evaluadas se observó una reducción importante en comparación de los individuos de los lotes controles (positivos y negativos) tanto en animales tratados después de la infección así como los que iniciaron el tratamiento 15 días post-infección.

La actividad antiprotozoaria de acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo demostró buen efecto sobre los amastigotes, razón por la que podría estar demostrando la actividad contra *T. cruzi* aunque los individuos presenten una infección establecida.

6.2.6 Mortalidad

La mortalidad registrada en los individuos que recibieron tratamiento con las dosis 16.8 y 33.6 $\mu\text{g/g}$ 15 días post-infección fue del 60 y 80% respectivamente, menor a la observada en los animales no tratados y ratones tratados con alopurinol (8.4 $\mu\text{g/g}$) en los cuales la tasa de mortalidad fue del 100 y 80% respectivamente (Figura 16).

El efecto parasitostático observado sobre los estadios tripomastigote y amastigote influyen en la presentación de una menor mortalidad en los individuos tratados con las dosis más altas evaluadas (16.8 y 33.6 $\mu\text{g/g}$). Es importante tomar en cuenta que la cepa H4 es considerada virulenta, y capaz de ocasionar más del 50% de mortalidad en ratones NIH, y así mismo es importante considerar que los ratones BALB/c son más susceptibles en comparación a otras especies de roedores también utilizados como modelos animales, por esta razón, probablemente la mortalidad fue tan alta en este experimento, y sea necesario ajustar condiciones experimentales (como una menor cantidad de inóculo, cepas menos virulentas entre otros) que permitan la evaluación adecuada del compuesto empleando este diseño experimental (infección y tratamiento 15 días después).

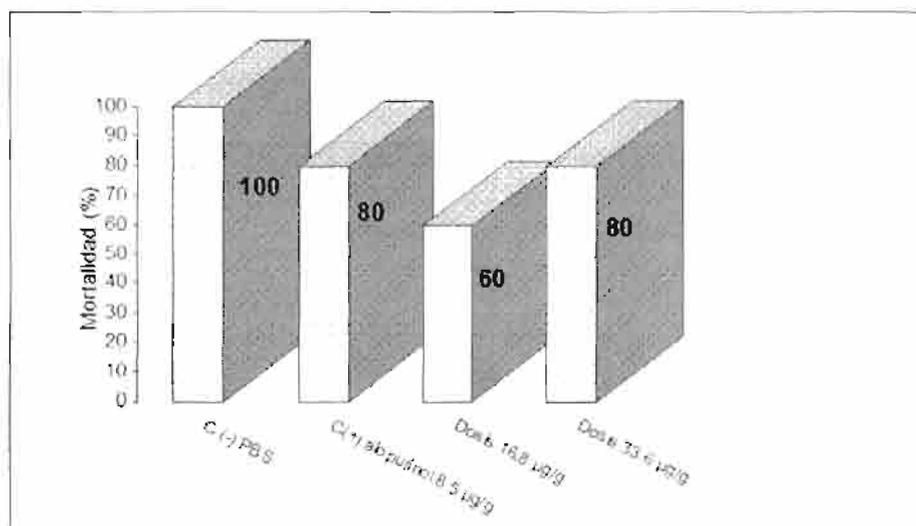


Figura 16. Efecto de acetato de (8-hidroximetileno)-trieicosanilo sobre la tasa de mortalidad en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* y con inicio de tratamiento 15 días post-infección.

Existe un trabajo *in vivo* en el cual se estudia el efecto del compuesto psilostaquina (un sesquiterpeno lactona aislado de *Ambrosia tenuifolia*), administrado

5 días post-infección, y se evaluó su efectividad sobre la tasa de mortalidad de ratones infectados con *T. cruzi*. En este estudio reportan una tasa de sobrevivencia del 100% cuando utilizan la dosis 1 µg/gr del compuesto psilostaquina, si lo comparamos con el efecto del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo sobre la tasa de mortalidad de los ratones BALB-c infectados con la cepa H4, este compuesto demostró una menor sobrevivencia que la producida por psilostaquina (Sulsen et al., 2008). Sin embargo, aunque en ambos estudios se utilizan cepas altamente virulentas (H4 y RA), un punto importante al comparar los resultados de estos dos estudios es que para el caso de psilostaquina se empleó un inóculo de parásitos 10 veces menor que en nuestro estudio, lo que indica que acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo esta demostrando un efecto antiprotozoario *in vivo* aun ante el desafío con una alta concentración del inóculo.

Es necesario desarrollar más estudios de investigación evaluando la actividad del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo *in vivo* con un inóculo de parásitos menor al utilizado (como ocurriría de manera natural), en donde el desafío no sea tan agresivo para el modelo animal y permita una mejor visualización del efecto antitripanocida. Así mismo, se requiere conocer con mayor precisión sobre la farmacodinamia de acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo en el modelo animal, así como enriquecer estos hallazgos con otros ensayos para determinar la eficiencia de este acetato cuando se administra durante mayores periodos de tiempo, a dosis más altas o durante la fase crónica de la enfermedad.

6.3 Reversión del efecto

Con la finalidad de evaluar si el efecto de inhibición de la replicación parasitaria era atribuible a la actividad del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo sobre los diferentes estadios de *T. cruzi* evaluados (tripomastigote y amastigote), se realizó un ensayo en donde el modelo animal fue infectado y se le administró el tratamiento a las 24 horas post-infección, pero únicamente durante 20 días, empleando las dosis 16.8 y 33.6 $\mu\text{g/g}$, ya que estas son las que habían demostrado mejor actividad antiprotozoaria en los bioensayos donde de dosis-efecto.

Una vez transcurrido este tiempo, se suspendió la administración del compuesto, y los animales fueron monitoreados durante 8 días más, observándose que con ambas dosis se inhibió la replicación parasitaria, sin embargo cuando se suspendió la administración del tratamiento, se observó un abrupto incremento de la replicación parasitaria principalmente 8 días después, pero aun con ello, los niveles de parasitemia nunca llegaron a ser tan elevados como en el caso de los individuos pertenecientes a los lotes control (positivos y negativos) (Figura 17).

Cabe mencionar, que a pesar de que se observó una menor parasitemia en los individuos tratados con la dosis 33.6 $\mu\text{g/g}$ al día 20, en comparación a los individuos de los lote control, cuatro días después de haber sido suspendida la administración del tratamiento con el compuesto la parasitemia todavía era mucho menor respecto a los demás grupos, sin embargo, para el día 28, se observó un incremento mayor en la replicación parasitaria, que se registró un valor incluso mas alto que la de los animales que recibieron la dosis de 16.8 $\mu\text{g/g}$.

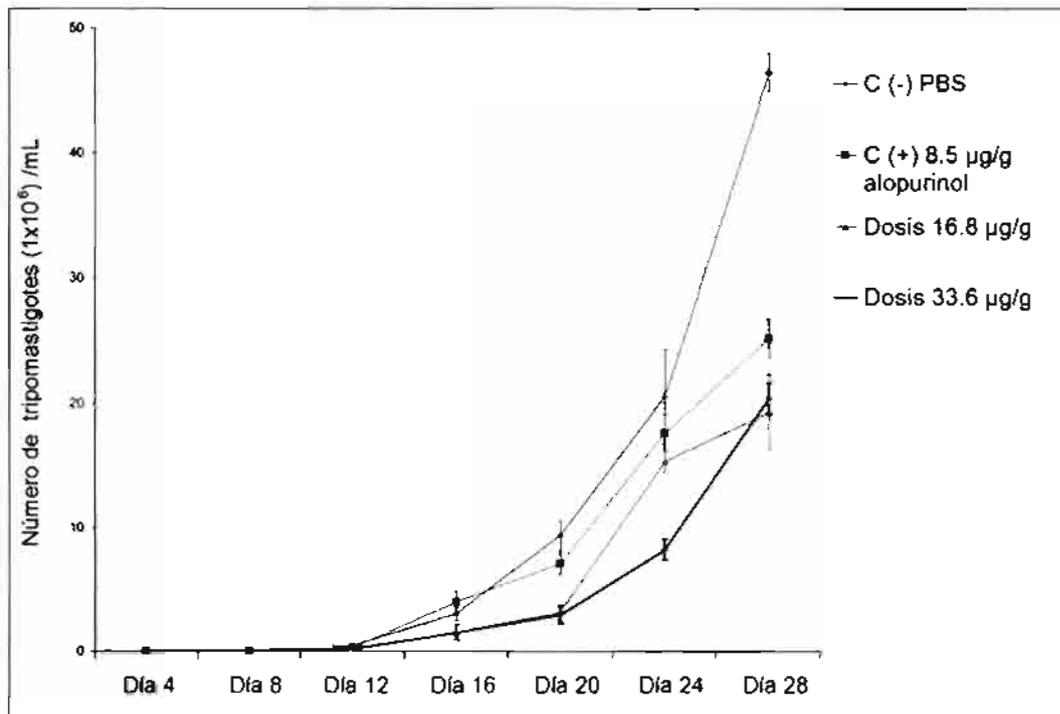


Figura 17. Curva de parasitemia para evaluar la regresión del efecto en ratones BALB/c infectados con 5×10^4 tripomastigotes de *T. cruzi* cepa H4 y tratados con acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo a a las dosis de 16.8 y 33.6 $\mu\text{g/g}$ (Valor de las medias \pm EE).

Estos resultados permiten demostrar que mientras se esta administrando el acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo es eficiente para promover una inhibición de la replicación de *T. cruzi*, ya que al interrumpir la administración del compuesto, se reactiva la parasitemia de una manera exponencial, lo que conduce a una exacerbación de la infección en el hospedero. Bajo estas condiciones experimentales, la parasitemia no pudo ser completamente abatida en los individuos tratados con el compuesto estudiado. Sin embargo la observación del efecto antiprotozoario sobre los estadios amastigote y tripomastigote sanguíneo pueden dar la pauta para la evaluación de la administración del compuesto por periodos mas largos y dispositivos de liberación lenta, a fin de evitar una menor colonización del tejido cardiaco por *T. cruzi* debido a la replicación parasitaria.

Cabe mencionar que, debido a la virulencia de la cepa empleada y a la cantidad de inóculo utilizado, al suspender el tratamiento se registró un incremento tan agresivo de la replicación parasitaria, se desencadenan con ese evento diversos mecanismos que afectan la integridad del hospedero tal y como una mayor proporción de muerte celular programada (Fernández-Presa et al., 2000) hay una alteración en el funcionamiento hepático (Ragonha et al., 2006) y se incrementa también la probabilidad de presentar una falla cardiaca congestiva (Taniwaki et al., 2006), por lo que todos estos eventos juntos pueden conducir a una mala prognosis para el paciente.

La mayor actividad antiprotozoaria sobre el estadio amastigote fue observada en los individuos del experimento “reversión del efecto” fue la de los individuos tratados con la dosis más alta (33.6 $\mu\text{g/g}$) siendo 2.7 veces menor que la de los animales del control negativo (Figura 18). Por otra parte en los animales tratados con la dosis 16.8 $\mu\text{g/g}$ y los individuos del lote control positivo (alopurinol 8.5 $\mu\text{g/g}$) también se observó una reducción en la cantidad de nidos, en comparación a los individuos no tratados.

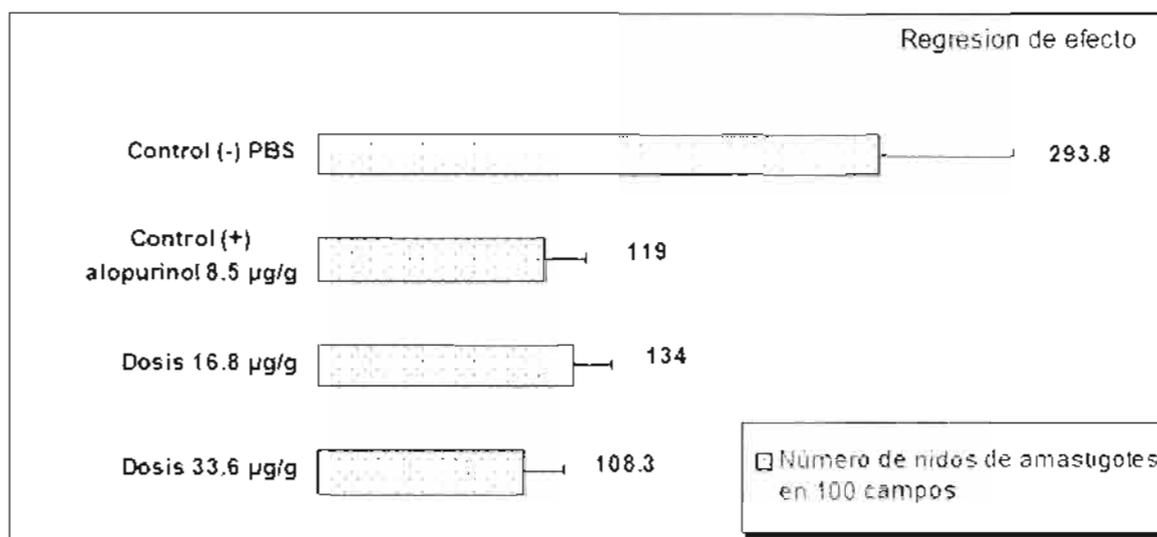


Figura 18. Efecto de acetato de (8-hidroximetil)-trieicosanilo sobre el número de nidos de amastigote 28 días post-infección en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* y tratados durante 20 días con las dosis 16.8 y 33.6 µg/g.

La infección de los cardiomiocitos por *T. cruzi* ocasiona un desbalance de la regulación del calcio citosólico (Ca^{+}) que puede conducir a una importante alteración en la homeostasis cardíaca, y afecta la contractibilidad miocárdica, funciones de los microfilamentos y puede presentarse falla cardíaca (Taniwaki et al., 2006). Relativo a esto, se ha evidenciado que a mayor número de parásitos presentes en el tejido cardíaco, se incrementan los niveles de óxido nítrico (NO), el cual es un importante regulador fisiológico del Ca^{+2} (Campbell et al., 1996) y de la contractibilidad miocárdica (Kelly et al., 1996). Cabe mencionar que el incremento de las concentraciones de NO, contribuyen a ocasionar un daño progresivo al miocardio que finalmente conduce a una falla cardíaca (Massion et al., 2003). Todo esto justifica la búsqueda de compuestos que contribuyan a inhibir la replicación de

amastigotes en el tejido cardíaco, con la finalidad de que a menor cantidad de parásitos, haya una menor proporción de daño tisular a dicho tejido.

6.3.1 Mortalidad

Los individuos incluidos en el ensayo de reversión del efecto demostraron una mortalidad menor que en los individuos no tratados, y la mortalidad de los ratones tratados a la dosis 16.8 µg/g del compuesto, fue similar a la de los individuos tratados con alopurinol, sin embargo, los individuos tratados con la dosis más alta (33.6 µg/g) registraron una mortalidad mas alta que los ratones del lote control positivo (Figura 19).

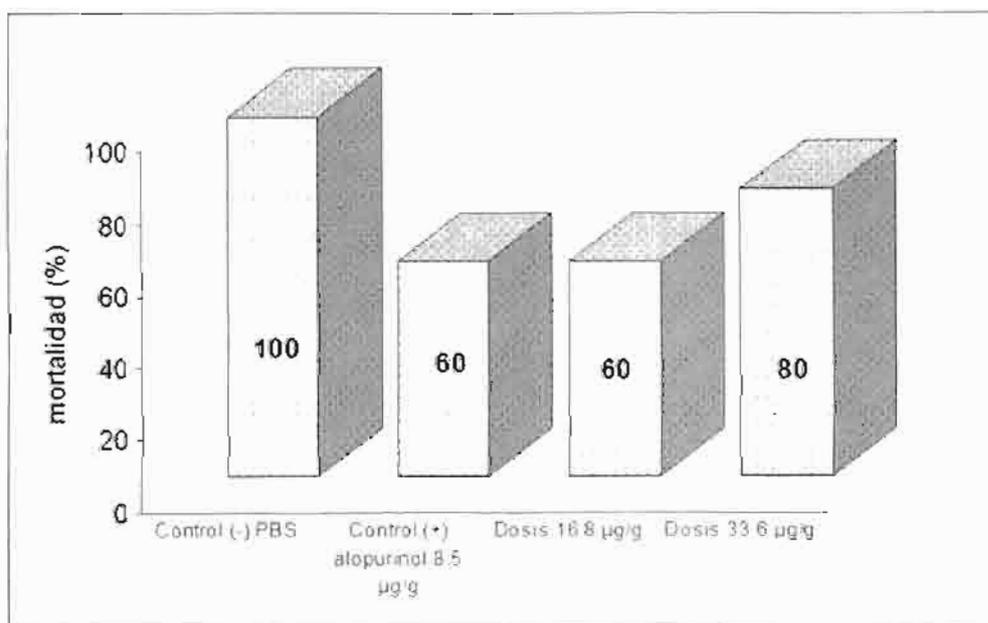


Figura 19. Efecto de acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo sobre la tasa de mortalidad en ratones BALB/c infectados con *T. cruzi* y tratados durante 20 días después de la infección con las dosis 16.8 y 33.6 µg/g.

La respuesta observada en los diferentes lotes que recibieron tratamiento con el acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo, fue debido a que el tratamiento fue interrumpido abruptamente durante la fase aguda de la infección, por lo que probablemente un tratamiento con las dosis más eficientes (16.8 o 33.6 $\mu\text{g/g}$) durante mayores periodos de tiempo, permitirían que los individuos tuvieran mejores posibilidades de sobrevivencia ante la infección por el parásito.

6.4 Dosis efectiva media

Los resultados en la evaluación de la actividad del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo bajo condiciones *in vivo* demostraron que ninguna de las dosis evaluadas pudo eliminar completamente la presencia de tripomastigotes sanguíneos en los animales tratados, sin embargo la administración del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo fue capaz de reducir la parasitemia por una aparente actividad inhibitoria (Figura 20).

La actividad antiprotozoaria de este compuesto comparada con la del alopurinol comercial (8.5 $\mu\text{g/g}$) fue mayor durante todo el periodo de los bioensayos, y es importante destacar que acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo tiene un excelente potencial como compuesto bioactivo no tóxico y con una buena actividad antiprotozoaria. La dosis de 33.6 $\mu\text{g/g}$ fue la única que fue capaz de inhibir la replicación parasitaria en un 50% o mas durante el tiempo de desarrollo del ensayo.

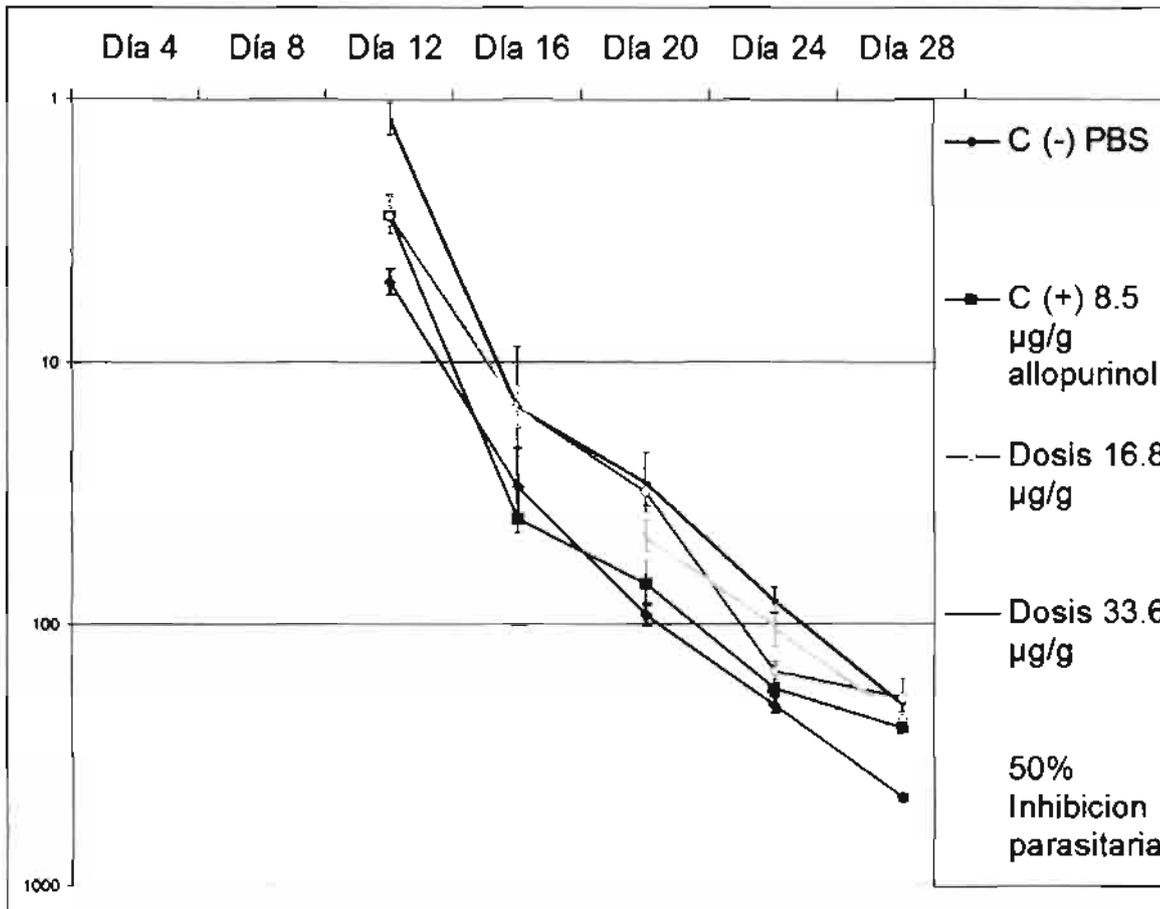


Figura 20. Dosis efectiva media de acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo (en logaritmo) durante su administración durante 28 días en ratones BALB/c infectados con la cepa H4 de *T. cruzi*

Con todos los resultados obtenidos en este trabajo, se observó que principalmente cuando el compuesto se administró simultáneamente después de la infección, demostró actividad sobre el estadio intracelular replicativo amastigote, sin embargo la efectividad del tratamiento con el acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo no fue absoluta. Por lo que se requiere continuar evaluando a este compuesto considerando que ha demostrado una actividad antiprotozoaria contra tripomastigotes y amastigotes durante diferentes esquemas de estudio bajo condiciones *in vivo*.

Es importante resaltar que sería interesante la evaluación de dosis mas altas de acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo que las estudiadas en este trabajo (16.8 y 33.6 $\mu\text{g/g}$), sin embargo una limitante para ello es que el rendimiento del compuesto a partir del extracto de *S. villosa* es bajo (2.7%), por lo que una buena alternativa es el evaluar dosis mas altas administrando directamente el extracto cloroformico, a fin de estandarizar su obtención y dosificación bajo condiciones *in vivo* para en un futuro, sea propuesto como un fitomedicamento. Así mismo, es necesario evaluar cual es la actividad antiprotozoaria hacia otras cepas de *T. cruzi*, incrementar los periodos de evaluación (principalmente evaluar la actividad antiprotozoaria durante la fase crónica de la enfermedad) y diferentes vías de administración, en conjunto con estudios de farmacodinamia y el desarrollo de trabajos de investigación que permitan determinar cual es el mecanismo de acción responsable de la actividad antiprotozoaria hacia el parásito.

VII. Conclusiones.

- La administración del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo en ratones BALB/c infectados con 50,000 tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* reduce el número de parásitos en su forma de amastigote, sin producir toxicidad oral aguda aun a dosis de 5,000 µg/g.
- La dosis de 33.6 µg/g tiene mejor efecto tanto contra tripomastigotes como para amastigotes cuando se inicia el tratamiento 24 horas post-infección y solo contra amastigotes cuando se inicia el tratamiento 15 días post-infección.
- Existe una marcada reversión del efecto del acetato de (8-hidroximetilen)-trieicosanilo cuando se suspende el tratamiento en animales infectados experimentalmente.
- Este estudio aporta un diseño experimental eficiente en donde se puede evaluar la respuesta contra el estadio amastigote de *T. cruzi* bajo condiciones experimentales *in vivo*, el cual puede ser utilizado y mejorado para investigaciones posteriores.

VIII. Perspectivas de la investigación.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, es necesaria la evaluación del acetato de (8-hidroximetil)-trieicosanilo o por su bajo rendimiento, la evaluación del extracto cloroformico de las hojas de *S. villosa* bajo las siguientes condiciones: 1) Administración de dosis mas altas; 2) administración del tratamiento durante periodos mas prolongados; 3) evaluar tratamientos utilizando diferentes vias de administración; 4) evaluar de la actividad antiprotozoaria durante la fase crónica de la infección; 5) evaluar la actividad antiprotozoaria hacia otras cepas de *T. cruzi*; 6) desarrollar estudios que permitan determinar la farmacocinética del extracto; 7) Determinar el mecanismo de acción antiprotozoaria en los diferentes estadios de *T. cruzi*.

IX. Bibliografía.

- 1) Abe, F.; Nagafuji, S.; Yamauchi, T.; Okabe, H.; Maki, J. Trypanocidal Constituents in Plants 1. Evaluation of Some Mexican Plants for Their Trypanocidal Activity and Active Constituents in Guaco, Roots of *Aristolochia taliscana*. Biol. Pharm. Bull. 2002, 25, 1188-1191.
- 2) Aderbauer B, Clausen PH, Kershaw O, Melzig MF. In vitro and in vivo trypanocidal effect of lipophilic extracts of medicinal plants from Mali and Burkina Faso. J Ethnopharmacol. (2008) 19:225-231.
- 3) Acha, P.N.; Szyfres, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud. Washington. EUA. 1986; 2 ed. pp. 509-602.
- 4) Acosta K.Y y Guzman E. (2008) Natural products with activity against protozoa of medical importance. Trends and Advances in Medicinal plants. Ed. Perez Gutierrez M.S. Research Signpost. 2008. 99-122.
- 5) Antas, P.R.Z.; Medrano-Mercado, N.; Torrico, F.; Ugarte-Fernández, R.; Gómez, F.; Correa-Oliveira, R.; Chavez, A.C.L.; Romanha, A.J.; Araújo-Jorge, T.C. Early, intermediate, and late acute stages in Chagas' disease: a study combining anti-galactose IgG, specific serodiagnosis, and Polymerase Chain Reaction analysis. Am J Trop Med Hyg. 1999, 61, 2, 308-314.
- 6) Apt BW, Heitmann GI, Jercic L M.II, Jofré M L, Muñoz C. V P, Noemí H II. Guidelines for the Chagas disease: Part III. Chagas disease in donors to blood banks. Rev. chil. infectol. 2008. 25: 285-288.
- 7) Apt BW, Heitmann GI, Jercic L M.II, Jofré M L, Muñoz C. V P, Noemí H II. Guidelines for the Chagas disease: Part V. Laboratory diagnosis of Chagas disease. Revista chilena de infectologia. 2008b, 25: 378-383 .
- 8) Araujo, F.G. Analysis of *Trypanosoma cruzi* antigens bound by specific antibodies and by antibodies to related trypanosomatids. Infection and Immunity 1986, 53, 1, 179-185.

- 9) Araya JE, Neira I, da Silva S, et al. Diterpenoids from *Azorella compacta* (Umbelliferae) active on *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98:413-418.
- 10) Avila JL, Avila A, Muñoz E. Effect of allopurinol on different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg.* 1981. 30:769-774.
- 11) Asuzu IU, Chineme CN (1990): Effects of *Morinda lucida* leaf extract on *Trypanosoma brucei brucei* infection in mice. *J Ethnopharmacol* 30:307-313.
- 12) Berens RL, Marr JJ, Steele da Cruz FS, Nelson DJ. Effect of allopurinol on *Trypanosoma cruzi*: metabolism and biological activity in intracellular and bloodstream forms. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982. 4:657-661.
- 13) Bonay P, Duran-Chica I, Fresno M, Alarcon B, Alcina A. Antiparasitic effects of the intra-Golgi transport inhibitor megalomicin. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2668-2673.
- 14) Britto C (2009) Diagnóstico Molecular de la enfermedad de Chagas. Laboratorio de Biología Molecular y Enfermedades Endémicas, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. URL: http://www.fiocruz.br/chagas_esp/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=168 [consultado en mayo de 2009]
- 15) Cáceres A, López B, González S, Berger I, Tada I, Maki J. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *J Ethnopharmacol.* 1998 62:195-202
- 16) Camandaroba EL, Reis EA, Goncalves MS, Reis MG, Andrade SG. *Trypanosoma cruzi*: susceptibility to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the highly resistant Colombian strain. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2003;36:201-209.
- 17) Campbell DL, Stamler JS, Strauss HC Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes. Dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. *J Gen Physiol* .1996. 108:277-293

- 18) Canales Martínez M, Hernández Delgado T, Caballero Nieto J, Alfonso Romo De Vivar Romo A., Durán Díaz A , Lira Saade R. Análisis Cuantitativo Del Conocimiento Tradicional De Las Plantas Medicinales En San Rafael, Coxcatlán, Valle De Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, Acta Botanica Mexicana. 2006. 75: 21-43.
- 19) Carballo Ma, Cortada C.M., Gadano A.B. Riesgos Y Beneficios En El Consumo De Plantas Medicinales. Medicinal Herbs: Risks And Benefits In Their Uses. 2005. Theoria, 14 : 95-108.
- 20) Chan C, Yin H, Garforth J, McKie JH, Jaouhari R, Speers P, Douglas KT, Rock PJ, Yardley V, Croft SL, Fairlamb AH. Phenothiazine inhibitors of trypanothione reductase as potential antitrypanosomal and antileishmanial drugs. J Med Chem. 1998. 41:148-156. Erratum in: J Med Chem 1998. 41: 4910.
- 21) Chiari, E. Chagas Disease Diagnosis using Polymerase Chain Reaction, Hemoculture and Serologic Methods. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 1999. 94: 299-300.
- 22) Costa, J.F.O., Kiperstok, A.C., David, J.P.d.L., David, J.M.c., Giulietti, A.M., de Queiroz, L.P., dos Santos, R.R., Soares, M.B.P., 2007, Anti-leishmanial and immunomodulatory activities of extracts from *Portulaca hirsutissima* and *Portulaca werdermannii*. Fitoterapia 78. 510-514.
- 23) Cunha WR, Crevelin EJ, Arantes GM, Crotti AE, Andrade e Silva ML, Furtado NA, Albuquerque S, Ferreira Dda S. A study of the trypanocidal activity of triterpene acids isolated from *Miconia* species. Phytother Res. 2006. 20:474-478
- 24) Dantas AP, Olivieri BP, Gomes FH, De Castro SL. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. J Ethnopharmacol. 2006.103:187-193.
- 25) de Castro SL, Meirelles Mde N, Oliveira MM. *Trypanosoma cruzi*: adrenergic modulation of cyclic AMP role in proliferation and differentiation of amastigotes *in vitro*. Exp Parasitol. 1987. 64:368-375.

- 26) De Souza VA, da Silva R, Pereira AC, et al. Trypanocidal activity of (-)-cubebin derivatives against free amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem Lett* 2005; 15: 303-307.
- 27) do Nascimento, A. M.; Salvador, M. J.; Candido, R. C.; de Albuquerque, S.; de Oliveira, D. C. Trypanocidal and antifungal activities of p-hydroxyacetophenone derivatives from *Calea uniflora* (Heliantheae, Asteraceae). *J. Pharm. Pharmacol.* 2004. 56: 663-669.
- 28) Doyle PS, Weinbach EC. The activity of tricyclic antidepressant drugs against *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol.* 1989. 68:230-234.
- 29) Dubin, M.; Fernandez, S.; Stopanii, A. Citotoxicidad de la β -lapachona una o-naftoquinona con posibles usos terapéuticos. *Med.* 2001. 61: 343-350.
- 30) Estani SS, Segura EL. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in the undetermined phase: experience and current guidelines of treatment in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94(suppl 1):363-365.
- 31) Evans AT, Croft SL. Antileishmanial actions of tricyclic neuroleptics appear to lack structural specificity. *Biochem Pharmacol.* 1994; 4:613-616.
- 32) Fajardo Vázquez O. (1998). Determinación de la bioactividad del extracto diclorometánico de hojas de *Senna villosa* contra *Trypanosoma cruzi*. Tesis Facultad de Química, UADY
- 33) Fernández D, Wenck MA, Craig SP 3rd, Delfino JM. The purine transferase from *Trypanosoma cruzi* as a potential target for bisphosphonate-based chemotherapeutic compounds. *Bioorg Med Chem Lett.* 2004 6:4501-4504.
- 34) Flores, J. S. Plantas medicinales de la flora yucatanense, usos y manejos entre los mayas. *Rev. UADY*, 1989, 170, 68-80
- 35) Fournet, A., Ferreira, M.E., Rojas de Arias, A., Guy, I., Guinaudeau, H.I.n., Heinzen, H. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. *Fitoterapia* 2007, 78:382-384.
- 36) Freilij H, Altcheh J. Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. *Clin Infect Dis.* 1995. 21:551-555.

- 37) Freymann DM, Wenck MA, Engel JC, Feng J, Focia PJ, Eakin AE, Craig SP. Efficient identification of inhibitors targeting the closed active site conformation of the HPRT from *Trypanosoma cruzi*. *Chem Biol*. 2000. 7:957-68.
- 38) Gallo, M.B.C., Marques, A.S.F., Vieira, P.C., da Silva, M.F.t.d.G.F., Fernandes, J.o.B., Silva, M.r., Guido, R.V., Oliva, G., Thiemann, O.v.H., Albuquerque, S.r., Fairlamb, A.H. Enzymatic inhibitory activity and trypanocidal effects of extracts and compounds from *Siphoneugena densiflora* O. Berg and *Vitex polygama* Cham. *Zeitschrift für Naturforschung. C. Journal Of Biosciences* 2008. 63: 371-382.
- 39) Garzoni LR, Waghabi MC, Baptista MM, de Castro SL, Meirelles Mde N, Britto CC, Docampo R, Oldfield E, Urbina JA. Antiparasitic activity of risedronate in a murine model of acute Chagas' disease. *Int J Antimicrob Agents*. 2004. 23:286-290.
- 40) Gomes, M.L.; Galvao, L.M.C.; Macedo, A.M.; Pena, S.D.J; Chiari, E. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg*. 1999. 60: 205-210.
- 41) González-Kappa, S. *Trypanosoma cruzi*. En Bausualdo J.A.; Coto, C.E.; Torres, R.A.; Ed. *Microbiología Biomédica*. Buenos Aires, Argentina. Atlante. 1996. 903-913.
- 42) Gross PA, Barrett TL, Dellinger EP, et al; Infectious Diseases Society of America. Purpose of quality standards for infectious diseases. *Clin Infect Dis*. 1994. 18:421.
- 43) Gurgel-Goncalves, R.; Ramalho, E.D.; Duarte, M.A.; Palma, A.R.T.; Abad-Franch, F.; Carranza, J.C.; Cuba-Cuba, C.A. Enzootic transmission of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Federal District of Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 2004. 46: 323-330.
- 44) Gutteridge, W. E. & Coombs, G. H. (1977). Protein metabolism. In *Biochemistry of Parasitic Protozoa*, pp. 98–99. Baltimore: University Park Press.

- 45)Guzmán-Marín, E.S.; Barrera-Pérez, M.A.; Rodríguez-Félix, M.E.; Escobedo-Ortegón, F.J.; Zavala-Velázquez, J.E. Índices entomológicos de *Triatoma dimidiata* en el Estado de Yucatán. *Revista Biomédica*. 1991. 2, 1, 20-29.
- 46)Guzmán E., González R., Flores S., Zavala J., Rosado M., Pérez S. Activity of *Senna villosa* against *Trypanosoma cruzi*. *Pharm Biol* 2004. 42:504-507
- 47)Guzman E., Perez C., Zavala M.A., Acosta-Viana K.Y., Perez S. Antiprotozoal activity of (8-hydroxymethylen)-trieicosanyl acetate isolated from *Senna villosa*. *Phytomedicine* 2008. 15: 892-895.
- 48)Hoel P. (1984) Estadística elemental. Edit. Continental, 4ª edición. Mexico D.F. 290-300
- 49)Jayaraman KS. Break with tradition. *Nature*. 2006. 27:342-343
- 50)Jörg M, Storino R, Zanetto U, Hemmington R. (2005) Conjunto antigénico del *T.cruzi* fijado en el sistema exitoconductor e intersticialmente en miocardio de paciente chagásico asintomático (periodo indeterminado) muerto por accidente. Memorias del 1er Simposio Virtual de Enfermedad de Chagas. Federación Argentina de Cardiología. Tomado de URL: [http:// www fac.org.ar/fec/chagas/c23jorg/c23jorg.htm](http://www.fac.org.ar/fec/chagas/c23jorg/c23jorg.htm)
- 51) Kirchhoff L.V., Paredes P., Lomeli-Guerrero A., Paredes-Espinoza M., Ron-Guerrero C. S., Delgado-Mejía M., and Peña-Muñoz J G. Transfusion-associated Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: implications for transfusión medicine in the United States. *Transfusion*. 2006. 46: 298-304.
- 52)Kirchhoff, L.V.; Votava, J.R.; Ochs, D.E.; Moser, D.R. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Clinical Microbiology* 1996. 35:1171-1175.
- 53)Kirchhoff LV, Paredes P, Lomeli-Guerrero A, Paredes-Espinoza M, Ron-Guerrero CS, Delgado-Mejía M, Peña-Muñoz JG. Transfusion-associated Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: implications for transfusion medicine in the United States. *Transfusion*. 2006. 46 : 298-304.
- 54)Kun H, Moore A, Mascola L, Steurer F, Lawrence G, Kubak B, Radhakrishna S, Leiby D, Herron R, Mone T, Hunter R, Kuehnert M; Chagas Disease in

- Transplant Recipients Investigation Team. Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. Clin Infect Dis. 2009. 1; 48: 1534-1540.
- 55) Lauria-Pires L, de Castro CN, Emanuel A, Prata A. [Ineffectiveness of allopurinol in patients in the acute phase of Chagas disease] Rev Soc Bras Med Trop. 1988. 21:79.
- 56) Lauricella, M.A; Castañera. M.B; Gurtler, R.E; Segura, E.L Immunodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease) infection in naturally infected dogs. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 1998. 93:501-507
- 57) Levin J (1979) Fundamentos de estadística en la Investigación Social. Edit. Harla, México, D.F. 164-166
- 58) Luize PS, Ueda-Nakamura T, Filho BP, et al. Ultrastructural alterations induced by the neolignan eupomatenoid-5 on epimastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res 2006. 29: 2126-2130.
- 59) Macedo V. Indeterminate form of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999. 94(Suppl 1):311-16.
- 60) Machado, E.M.M.; Fernández, A.J.; Murta, S.M.; Victor, R.W.A.; Camilo-Junior, D.J.; Pinheiro, S.W.; Reis-Lopes, E.; Adad, S.J.; Romanha, A.J.; Pinto-Dias J.C. A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. Am J Trop Med Hyg. 2001. 65: 958-965.
- 61) Massion PB, Feron O, Dessy C, Balligand JL. Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. Circ Res. 2003, 93:388-398
- 62) Mesquita ML, Desrivot J, Bories C, et al. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005. 100: 783-87.
- 63) Nakajima-Shimada J, Hirota Y, Aoki T. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth in mammalian cells by purine and pyrimidine analogs. Antimicrob Agents Chemother. 1996. 40:2455-2458.
- 64) OECD. (2001) Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure (Updated Guideline, adopted 20th December 2001). Disponible en: www.epa.gov/oppfead1/harmonization/docs/E425guideline.pdf. Consultado en Enero 7, 2007.

- 65) Okumura, M., A. Correa-Neto, and A. C. Silva. Contribuição para o estudo da patogenia das lesões vasculares na doença de Chagas experimental em camundongos branco. *Rev. Paul. Med.* 1962. 61:265-266.
- 66) Okumura, M., T. De Brito, L. H. P. Silva, and A. Correa-Neto. The pathology of experimental Chagas' disease in mice. I. Digestive tract changes with a reference to necrotizing arteritis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 1960. 2:17-28.
- 67) Oliveira, J. S. A natural human model of intrinsic heart nervous system denervation: Chagas' cardiopathy. *Am. Heart J.* 1985. 110:1092-1098.
- 68) Oliveira, J. S. M., R. R. C. Correa De Araujo, M. A. Navarro, and G. Muccillo. Cardiac thrombosis and thromboembolism in chronic Chagas' heart disease. *Am. J. Cardiol.* 1983. 52:147-151.
- 69) Otani MM, Vinelli E, Kirchhoff LV, Del Pozo A, Gaby Vercauteren AS, Sabino EC. WHO comparative evaluation of serologic assays for Chagas disease. *Transfusion.* 2009. 49:1076-1082
- 70) Paveto, C.; Güida, M.; Esteva, M.; Martino, V.; Coussio, J.; Flawiá, M. Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of Green Tea (*Camellia sinensis*) Catechins. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2004. 48:69-74.
- 71) Ragonha L H O, Abrahão A A C, Sala M A, Lopes RA., Ribeiro R D, Prado J. JC Morphometrical Study of the Mouse Liver in the Experimental Chagas' Disease. *Int. J. Morphol.* 2006. 24: 383-390.
- 72) Ramos-Ligonio, A.; Ramírez-Sánchez, M.E.; González-Hernández, J.C.; Rosales-Encina, J.L.; Lopez-Monteón, A. Prevalence of antibodies against *Trypanosoma cruzi* in blood bank donors from the IMSS General Hospital in Orizaba, Veracruz, Mexico. *Salud Pública de México* 2006. 48, 1: 13-21.
- 73) Rassi A, Luquetti AO. Specific treatment for *Trypanosoma cruzi* infection (Chagas disease). In: Tyler KM, Miles MA, eds. *American Trypanosomiasis*. Boston, MA: Kluwer Academic Publishers; 2003. 117- 125.
- 74) Rodríguez, E.M.; Briceño, L.; Chiurillo, M.A.; Mosca, W.; Campos, Y. *Tripanosomiasis Americana. Aspectos teóricos*. En *Curso Latinoamericano Sobre Enfermedades Infecciosas*. 2004.

- 75)Rodríguez, M. E.; Zavala, V. J.; Barrera, M.; Guzmán, M. E.; Ramírez, S. M.; Alvarez, M. R. Riesgo de transmisión de la enfermedad de Chagas por donantes de sangre. *Rev. Biomed.* 1995. 6:70-75.
- 76)Rodrigues Coura J, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002. 97:3-24.
- 77)Russomando, G.; De Tomassone, M.M.C.; De Guillen, I.; Acosta, N.; Vera, N.; Almiron, M.; Candia, N; Calcena, M.F.; Figueredo, A. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the Polymerase Chain Reaction. *Am J Trop Med Hyg.*1998. 59, 3: 487-491.
- 78)Salomone, O.A.; Basquiera, A.L.; Sembaj, A.; Aguerri, A.M.; Reyes, M.E.; Omelianuk, M.; Fernández, R.A.; Enders, J.; Palma, A.; Barral, J.M.; Madoery, R.J. *Trypanosoma cruzi* in persons without serologic evidence of disease, Argentina. *Emerging Infectious Disease* 2003. 9: 1558-15562.
- 79)Santoro, G.; Graças-Cardoso, M.; Guimarães, L.; Salgado, A.; Menna-Barreto, R.; Soares, M. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol. Res.* 2007. 100, 783-790.
- 80)Saraiva J, Vega C, Rolon M, da Silva R, E Silva ML, Donate PM, Bastos JK, Gomez-Barrio A, de Albuquerque S. *In vitro* and *in vivo* activity of lignan lactones derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res.* 2007. 100:791-795.
- 81)Schenkman, S., Jiang, M. S., Hart, G. W., and Nussenzweig, V. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell.* 1991. 65:1117–1125
- 82)Schinella, G. R.; Tournier, H. A.; Prieto, J. M.; Ríos, J. L.; Buschiazzi, H.; Zaidenberg, A. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth by medical plant extracts. *Fitoterapia.* 2002. 73: 569-575.
- 83) Schmeda-Hirschmann G, Astudillo L, Bastida J, et al. Cryptofolione derivatives from *Cryptocarya alba* fruits. *J Pharm Pharmacol* 2001. 53: 563-67.

- 84) Sosa Estani S, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yampotis C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1998. 59 :526-529.
- 85) Sülsen VP, Frank FM, Cazorla SI, Anesini CA, Malchiodi EL, Freixa B, Vila R, Muschietti LV, Martino VS. Trypanocidal and leishmanicidal activities of sesquiterpene lactones from *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (Asteraceae). *Antimicrob Agents Chemother.* 2008. 52:2415-2419.
- 86) Sulsen, V.; Guida, J.; Paveto, C.; Muschietti, L.; Martino, V. *In vitro* evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine. *Parasitol Res.* 2006. 98: 370-374.
- 87) Taleb, S. H.; Salvador, N. J.; Balanco, J. M.; Albuquerque, S.; de Oliveira, D.C. R. Antiprotozoal Effect of Crude Extracts and Flavonoids Isolated from *Chromolaena hirsuta* (Asteraceae). *Phytother Res.* 2004. 18, 250-254.
- 88) Taniwaki NN, Machado FS, Massensini AR, Mortara RA. *Trypanosoma cruzi* disrupts myofibrillar organization and intracellular calcium levels in mouse neonatal cardiomyocytes. *Cell Tissue Res.* 2006. 324:489-496.
- 89) Ullman B, Carter D. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase as a therapeutic target in protozoal infections. *Infect Agents Dis.* 1995. 4:29-40. Review.
- 90) Veloso VM, Carneiro CM, Toledo MJ, et al. Variation in susceptibility to benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parental strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001. 96:1005-1011
- 91) Viotti R, Vigliano C, Lococo B, et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med.* 2006. 144:724-734.
- 92) Vissoci-Reiche, E.M.; Cavazzana, M.; Okamura, J.R.H.; Tagata, E.C.; Jankevicius, S.I.; Jankevicius, J.V. Evaluation of the Western Blot in the confirmatory serologic diagnosis of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1998. 59: 750-756.

- 93)Wegner DH, Rohwedder RW. The effect of nifurtimox in acute Chagas' infection. *Arzneimittelforschung*. 1972, 22:1624-1635.
- 94)Weniger B, Vonthron-Senecheau C, Kaiser M, Brun R, Anton R. Comparative antiplasmodial, leishmanicidal and trypanocidal activities of several biflavonoids. *Phytomedicine* 2006. 13: 176-180.
- 95)WHO Expert Committee. Control of Chagas Disease. Brasilia, Brazil: World Health Organization; 2002. WHO technical report series 905
- 96)WHO.http://www.who.int/diagnostics_laboratory/evaluations/chagas/en.html
(consultado Abril 2006)
- 97)Zulantay I, Honores P, Solari A, Apt W, Ortiz S, Osuna A, Rojas A, López B, Sánchez G. Use of polymerase chain reaction (PCR) and hybridization assays to detect *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004. 48:253-257..

X. Anexos.

Anexo 1. Carta de aceptación.

Decision Letter (NPHB-2009-0144.R1)

From: pezzuto@hawaii.edu

To: mjcoello@uady.mx

CC:

Subject: Pharmaceutical Biology - Decision on Manuscript ID NPHB-2009-0144.R1

Body: 16-Apr-2009

Dear Mrs Jimenez-Coello

Ref: Anti-trypanosomal *in vivo* activity of (8-hydroxymethylen)-tricosanyl acetate against infective forms of *Trypanosoma cruzi*

Our referees have now considered your paper and have recommended publication in *Pharmaceutical Biology*. We are pleased to accept your paper in its current form which will now be forwarded to the publisher for copy editing and typesetting. The reviewer comments are included at the bottom of this letter, along with those of the editor who coordinated the review of your paper.

You will receive proofs for checking, and instructions for transfer of copyright in due course.

The publisher also requests that proofs are checked and returned within 48 hours of receipt.

Thank you for your contribution to *Pharmaceutical Biology* and we look forward to receiving further submissions from you.

The publisher revised the format of the articles to bring all their journals into a similar format. These instructions to authors have been posted since the beginning of 2009 (www.informaworld.com/nphb). We allowed papers that had been already submitted to be processed in the old format, giving authors time to read and incorporate the new instructions. As of April 1, all new manuscripts should follow the new instructions to authors, and thus are being returned for that reason. Due to the current backlog of accepted articles, the new format will not be evident for several issues. A copy of the 2009 instructions to authors is attached.

Sincerely,

John M. Pezzuto, Ph.D.

Editor-in-Chief
Pharmaceutical Biology

Professor and Dean
College of Pharmacy
University of Hawaii at Hilo
34 Rainbow Drive
Hilo, Hawaii 96720

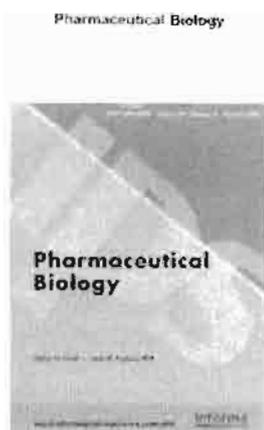
Reviewer[s]' Comments to Author:

Editor's Comments to Author:

Visit www.informapharmascience.com and sign up for free eTOC alerts to all Informa Pharmaceutical Science journals

Date Sent: 16-Apr-2009

Anexo 2. Artículo de investigación.



Anti-trypanosomal in vivo activity of (8-hydroxymethylen)-tricosanyl acetate against infective forms of *Trypanosoma cruzi*

Journal:	Pharmaceutical Biology
Manuscript ID:	NPB-2009-0144-11
Manuscript Type:	Original paper
Date Submitted by the Author:	16-Apr-2009
Complete List of Authors:	Améz-Castro, Majido; Universidad Autónoma de Yucatán, Depto. Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Laboratorio de Biología Celular, UAM-Kuchmuc Acosta-Viana, Karla; Universidad Autónoma de Yucatán, Depto. Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Laboratorio de Biología Celular Guzmán-Morín, Eugenia; Universidad Autónoma de Yucatán, Depto. Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Laboratorio de Biología Celular Pérez-Gutiérrez, María Salud; Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Departamento de Sistemas Biológicos Pérez-González, Guadalupe; Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Departamento de Sistemas Biológicos
Keywords:	Anti-trypanosomal, Senna villosa, natural products, essential

URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-009-0001-0> Email: amendez@uay.mx

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



URL: <http://w.manuscriptcentral.com/inpb>; Email: pezzuto@hawaii.edu

Title of the manuscript: Antitrypanosomal activity of (8-hydroxymethyl)-trileicosanyl acetate against infective forms of *Trypanosoma cruzi*

Abbreviated title version: *In vivo* antitrypanosomal activity of *S. villosa*

Name	Affiliation
JIMENEZ-COELLO MATHIEF	- Laboratorio de Biología Celular, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México - Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, UAM-X, México D.F., México
ACOSTA-VIANA KARLA YOLANDA	- Laboratorio de Biología Celular, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.
GUZMAN-MARIN EUGENIA DEL SOCORRO* (corresponding author)	- Laboratorio de Biología Celular, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México
PEREZ GONZALEZ CUAHUDEMOC	- Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calz. del Hueso 1160 CP 04960 México D.F. A.P. 23-181 México
PÉREZ GUTIÉRREZ MARÍA SALÚ	- Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calz. del Hueso 1160 CP 04960 México D.F. A.P. 23-181 México

*Laboratorio de Biología Celular, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" Universidad Autónoma de Yucatán, Ave. Itz'at 4490 X 59 C. P. 97000 Mérida Yucatán, México. Tel. +52 999 924 5735 ext. 120. Email: gmarin@uady.mx

Antitrypanosomal activity of (8-hydroxymethylen)-tricosanyl acetate against infective forms of *Trypanosoma cruzi*

JIMENEZ-COELLO M.^{1*}, ACOSTA-VIANA K.Y.¹, GUZMAN-MARIN E.S.², PEREZ-G.C.³, AND PEREZ-G.M.S.³

¹Laboratorio de Biología Celular, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Héctor Nogueira" Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida Yucatán, México.

²Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas, UAM-X, México D.F., México.

³Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Col: del Huevo 1100 CP 04900 México D.F. A.P. 23-181 México.

Abstract

The activity of a (8-hydroxymethylen)-tricosanyl acetate compound obtained from chloroform extracts of *Senna villosa* (Mill.) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosaceae) (*S. villosa*) against *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) was evaluated *in vivo*. Oral doses of 2.4, 8.4, and 33.6 µg/g were tested for 28 days in BALB/c mice infected with *T. cruzi*. Reduced parasitemia levels of 70.5, 73.8, and 80.9%, respectively, were observed. A significant reduction in amastigote nests was detected in the cardiac tissue of treated animals at doses of 8.4 and 33.6 µg/g. The LD₅₀ of (8-hydroxymethylen)-tricosanyl acetate was impossible to determine because none of the animals died, even at oral doses of 500 µg/g; consequently, it was impossible to determine the acute oral toxicity *in vivo*.

Keywords: American trypanosomiasis, antiprotozoal, BALB/c mice, natural products, *Senna villosa*.

Introduction

Chagas' disease (American trypanosomiasis) is the most important endemic parasitic disease in Latin America (Tarleton et al., 2007), with an estimated 15 million [prevalent infections](#) and 28 million at risk of infection in 21 countries of the American continent (WHO, 2007). The disease is caused by *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), a flagellated protozoan, and it is widely distributed from Mexico to Argentina (Milei et al., 2009).

Benznidazole (*o*-(5-benzyl-2-nitro-1-imidazole-acetamide) and nifurtimox [3-methyl-4'-nitrofurfurylidene-amino-*s*-tetrahydro-(1,4)-thiazin-5(1*H*)-dioxide] are currently the first-line drugs employed to treat Chagas' disease (Castro et al., 2006). However, benznidazole is not readily available in Latin America and nifurtimox is no longer produced. Allopurinol (Paulino et al., 2005; Nakajima-Shimada et al., 1988; Berens et al., 1982), gentian violet, ketoconazole (Lima et al., 2004; Santa-Filiz et al., 2005), and itraconazole (Apt et al., 1998; Apt et al., 2003; Coimbra et al., 2006) are also used to treat Chagas' disease, but they are associated with numerous toxic effects.

Traditional Mexican medicine uses a great variety of plants to combat infectious diseases, one of which is *Solanum ellaeagnifolium* (Mill.) Swin. & Barnby ([Lycopersaceae](#)), commonly known as Salche, is widely distributed in the south of Mexico and in the Caribbean, and grows at an altitude range of 10 to 1600 m above sea level. The antimicrobial, antifungal, and antiprotozoal properties of *S. ellaeagnifolium* have been previously reported (Mena et al., 1997; Flores, 2001; Guzman et al., 2004).

A recent study described the structure of *o*-(8-hydroxymethylene)-triacetonyl acetate, a compound isolated from the chloroform extract of *S. ellaeagnifolium* that was tested against epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. This compound exhibited significant activity against both forms of the parasite at concentrations of 3.3 and 6.6 µg/ml (Guzman et al., 2006).

1
2 The present study evaluated the *in vivo* antiprotozoal activity of (8-
3 hydroxymethyl)tricosanyl acetate against infective forms (blood trypomastigotes
4 and amastigotes) of *T. cruzi*.
5
6

9 Materials and methods

11 Plant material

12 *Sesuvia villosa* was collected from the rural community of Komchen town, 17 km away
13 from Mérida, Yucatan State, Mexico, from July through September 2005, 2006, and
14 2007. The plant species was authenticated by Dr. Salvador Flores-Guido and a voucher
15 (0284) was deposited at the herbarium of Universidad Autónoma de Yucatán (UADY).
16 Leaves were separated and dried in the shade at room temperature.
17
18
19
20
21
22
23
24
25

26 Extraction and isolation of (8-hydroxymethyl)tricosanyl acetate

27 Dried and powdered leaves (500 g) were mixed with CHCl₃ (3 L). The mixture was
28 refluxed for 4 h and filtered (Guzman et al., 2004). The solvent was evaporated, and the
29 residue was chromatographed on silica gel (70–230 mesh) and eluted with hexane
30 with increasing the polarity with ethyl acetate. The (8-hydroxymethyl)tricosanyl
31 acetate component was obtained from fraction 5 and recrystallized from chloroform
32 (Guzman et al., 2008).
33
34
35
36
37
38
39
40

41 Parasites and experimental animals

42 Trypomastigotes of *T. cruzi* strain H4 were used. The selected strain is capable of
43 yielding a mortality rate of 50% in mice after 30 days of inoculation, and demonstrates
44 a particular tropism towards cardiac tissue (Barrera-Pérez et al., 2001). BALB/c mice
45 were maintained on a 12:12 h light-dark cycle and had access to food and water *ad*
46 *libitum*. Each mouse was IP-inoculated with 5×10^7 trypomastigotes of *T. cruzi*.
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Acute Oral Toxicity

The acute oral toxicity of α -hydroxymethylen-tricosanyl acetate was evaluated in BALB/c mice as directed by the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD, 2001). The evaluated doses were 175, 550, and 1750 μ g/g. The toxicity evaluation ended when the highest dose evaluated (5000 μ g/g) was administered to 3 mice and none died.

In vivo antiprotozoal activity against trypomastigotes of *T. cruzi*

The antiprotozoal activity of α -hydroxymethylen-tricosanyl acetate was evaluated at 3 doses: 2.1, 8.4, and 33.6 μ g/g in $n = 10$ mice in each group. The compound was resuspended in 50 μ L of phosphate buffered saline (PBS, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, and 1.4 mM KH₂PO₄, pH 7.4) per mouse, and administered orally every 24 h for 28 days.

As a negative control, a group of infected mice received only 50 μ L orally of the vehicle (PBS). A positive control group included infected mice treated orally with atlopanolol (8.5 μ g/g) diluted in 50 μ L of PBS every day for the entire duration of the study.

Mice were examined every 4 days for 28 days after the time of infection to estimate the degree of parasitemia (blood trypomastigote counts) in all mice included in the assay. Treated animals were compared to the control groups, and the day at which each mouse died was recorded. All procedures were conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care.

Antiprotozoal activity against amastigote nests of T. cruzi

To determine the activity of *o*-hydroxymethyl-*n*-tricosanyl acetate against the intracellular amastigote form of *T. cruzi*, cardiac tissue samples from treated and untreated mice were collected and fixed in formaldehyde (10%).

Paraffin-embedded tissue sections were stained with hematoxylin-eosin (H&E) and examined under a light microscope. Four nonconsecutive slides from the heart of each mouse were examined in a blinded fashion. The number of amastigote nests was quantified in 100 zones for each heart.

Statistical analyses

Data are expressed as means \pm SEM. Statistical analyses were performed using the Student's *t*-test ($p < 0.05$), and ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test was used to compare more than two groups.

Results

Results of the acute oral toxicity evaluation

There were no signs of lethal toxicity at any of the evaluated doses of the compound (oral administration). After administration of the highest dose (300 $\mu\text{g/g}$), slight lethargy was observed in 66% ($n = 3$), as indicated by OECD (2001) of the treated mice but they demonstrated a complete recovery 24 h later.

In vivo antiprotozoal activity against trypomastigotes of T. cruzi

In vivo evaluation of *o*-hydroxymethyl-*n*-tricosanyl acetate at doses of 2.11, 8.4, and 33.6 $\mu\text{g/g}$ demonstrated antiprotozoal activity against blood forms of *T. cruzi*, but none of the doses (even at 33.6 $\mu\text{g/g}$) resulted in complete elimination of the parasites.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

from the bloodstream. At doses of 2.1 and 8.4 $\mu\text{g/g}$, a reduction in parasitemia of 75.8 and 75.9%, respectively, was observed in comparison to untreated mice. The highest activity of the compound (80.9%) was obtained at a dose of 33.6 $\mu\text{g/g}$ ($p < 0.05$) (Figure 1). At day 28, 175.2 , 156.2 , and 114×10^4 parasites/ml, were detected in animals treated at doses of 2.1, 8.4, and 33.6 $\mu\text{g/g}$, respectively, compared to 597.5×10^4 parasites/ml, in the untreated mice.

Antiprotosol activity against amastigote nests of T. cruzi

An increased number of amastigote nests was observed in the cardiac tissue of the negative control mice (untreated). Animals treated with atropurinol or with the lowest dose evaluated (2.1 $\mu\text{g/g}$) also demonstrated a greater amount of amastigote nests in the cardiac tissue (Figure 2), whereas mice treated with higher doses (8.4 and 33.6 $\mu\text{g/g}$) displayed fewer amastigote nests ($p < 0.05$).

Mortality

Mortality was lower (20% for 10 mice; $p < 0.05$) in the group treated with *o*-hydroxymethylene-tricicosanyl acetate at all doses evaluated (2.1, 8.4, and 33.6 $\mu\text{g/g}$) compared to mice treated with atropurinol (70% for 10 animals) and to untreated mice (50%) (Figure 3).

Discussion

The results obtained in the present study demonstrate that *o*-hydroxymethylene-tricicosanyl acetate does not produce signs of oral acute toxicity, even when high doses (33.6 $\mu\text{g/g}$) are used.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The absence of acute oral toxicity in treated mice was similar to the findings obtained in studies performed by Guzman et al. (2008) using (8-hydroxymethylen)tricosanyl acetate in *Vero* cells, in which no cytotoxic activity was observed during the evaluation. Considering that the ideal active antiprotozoal compound should be innocuous to mammalian host cells (Schmeda et al., 2001), (8-hydroxymethylen)tricosanyl acetate appears to be promising as a new antitrypanosomal agent. However, it will be necessary to evaluate the probable long-term toxicity of the compound in animal models to determine whether it is safe.

Treatment of infected mice with (8-hydroxymethylen)tricosanyl acetate revealed antiprotozoal activity against *T. cruzi* trypomastigotes. The antiprotozoal activity was observed at all doses evaluated (2.1, 8.4 and 33.6 µg/g) (Figure 1c) but the antiprotozoal activity against the amastigote forms was only observed when higher doses (8.4 and 33.6 µg/g) were used (Figure 2c). The antiprotozoal activity against *T. cruzi* found in the present study is similar to the *in vitro* activity previously reported by Guzman et al. (2004, 2008).

The antiprotozoal activity of the methanol, aqueous, and chloroform extracts of *S. villosa* against *T. cruzi* have also been previously reported *in vitro* (Guzman et al., 2004). In another study, (8-hydroxymethylen)tricosanyl acetate displayed antiprotozoal activity against the epimastigote and trypomastigote forms of *T. cruzi* *in vitro* (Guzman et al., 2008). At all 3 doses evaluated, the antiprotozoal activity of (8-hydroxymethylen)tricosanyl acetate under *in vivo* conditions was not able to completely eliminate trypanosomes from the bloodstream. However, it is remarkable that the mice treated with the highest dose evaluated (33.6 µg/g; see figure 1) exhibited a significant reduction in parasitaemia, demonstrating the strongest antiprotozoal activity in comparison with untreated and allopurinol-treated mice.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

These results suggest that (8-hydroxymethylen)-tricosanyl acetate has promising potential as an active compound, as it is apparently not toxic and possesses superior antiprotozoal activity against *T. cruzi* (3.4 times more active against blood trypomastigotes than allopurinol (8.5 µg/g) in infected mice treated for 28 days at a similar dose (8.4 µg/g)). *S. villosa* also demonstrated efficient *in vitro* antiprotozoal activity against *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* (IC₅₀ of 1.53 and 32 µg/mL, respectively). Thus, *S. villosa* should be considered as a plant with significant potential for antiprotozoal activity (Cabrera et al., 2006).

The (8-hydroxymethylen)-tricosanyl acetate demonstrated effectiveness against the epimastigote form. However, even when the parasitemia level was reduced using a dose of 2.1 µg/g, a large number of amastigote nests were found in the cardiac tissue (Figure 2). This probably implies that the trypomastigotes activated an evasion mechanism upon exposure to a hostile environment in the bloodstream due to the presence of (8-hydroxymethylen)-tricosanyl acetate. These adverse conditions could induce parasite internalization, promoting greater tissue invasion, differentiation of the parasites to amastigote forms, and greater multiplication in cardiac tissue. On the other hand, treatment of infected mice with a low dose of (8-hydroxymethylen)-tricosanyl acetate may not permit good bioavailability of the compound in cardiac tissue, making this tissue an ideal place to escape the antiprotozoal activity. However, when the dose of (8-hydroxymethylen)-tricosanyl acetate was increased, the number of amastigote nests decreased significantly.

The H4 strain of *T. cruzi* can produce cardiac lesions with a mortality of up to 50% thirty days post-inoculation, and produces a high parasitemia level in infected mice (Barera-Perez et al., 2001), which is similar to the mortality rate observed in untreated mice in the present study (figure 3). But even with the high virulence of the H4 strain,

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

treatment of infected mice with α -hydroxymethyl- α -trienicosanyl acetate at a dose of 33.6 μ g/g revealed a significant reduction in the number of trypomastigotes, which resulted in about 30% lower parasitemia over the course of the study (Figure 1).

Mortality in mice treated with α -hydroxymethyl- α -trienicosanyl acetate was lower compared to negative control mice (Figure 2). These results are similar to those obtained in other studies reporting the trypanocidal activity of plant extracts and compounds isolated from natural sources under *in vivo* conditions (Asuzu & Chirine, 1990; Cunha et al., 2006). The reduction in mortality could be associated with the bloodstream parasitemia level and the amount of amastigote nests in the cardiac tissue. Morio-Neto et al. (2007) described myocarditis in the heart and gastroenteric tract during the acute phase of Chagas' disease, showing a clear relationship between the level of parasitemia in the bloodstream and that in target organs. The concentrated presence of the parasite in cardiac tissue induces an intensive inflammatory process, myocarditis, and is correlated with the severity of clinical heart failure (Higuchi et al., 1987). Tissue damage and clinical progression are worse, and survival is decreased in patients with Chagas' heart damage compared with patients presenting non-inflammatory forms of dilated cardiomyopathy (Cristas et al., 2005). This would probably explain the results obtained for α -hydroxymethyl- α -trienicosanyl acetate-treated mice, which displayed a reduced number of cardiac amastigote nests and a slight inflammatory process, leading to a lower mortality rate.

The drugs most commonly used to treat Chagas' disease, such as nifurtimox, benznidazole, and allopurinol, induce only limited antiparasitic activity, mainly during the acute phase of the disease. In addition, these drugs produce undesirable side effects in patients such as anorexia, weight loss, nausea, diarrhea, and others (Fourcet & Muñoz, 2002). In the present study, secondary effects attributable to allopurinol were

1
2
3 clearly observed in treated mice (mainly anorexia, weight loss, and diarrhea), as
4 previously described (Horuchi et al., 2009). Mortality in this group was higher
5 compared to mice treated with *o*-hydroxymethylbenzotricosanyl acetate and untreated
6 mice (negative controls) (Figure 3). During acute infection of mice with *T. cruzi*, a
7 significant increase in the levels of glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) and
8 glutamate pyruvate transaminase (GPT) occurs (Dantas et al., 2006), indicating
9 hepatotoxicity. For this reason, the probability of developing hepatic insufficiency
10 increases in infected and allopurinol-treated mice, leading to higher mortality.
11
12
13
14
15
16
17

18 Although allopurinol exhibits considerable antiprotezoal activity against
19 amastigotes in the *Yerov* cell line (Nakajima-Shimada et al., 1996; Paulino et al., 2005),
20 the *in vivo* results demonstrated only a slight reduction of the number of amastigote
21 nests present in mice treated with allopurinol compared to untreated mice ($p < 0.05$).
22 When mice were treated with 8.4 and 32.6 $\mu\text{g/g}$ of *o*-hydroxymethylbenzotricosanyl
23 acetate, a significant reduction ($p < 0.05$) of amastigote nests was observed in the cardiac
24 tissue (Figure 2). The lack of *in vivo* activity by allopurinol may be due to the low
25 incorporation of the drug into the vertebrate stages of many *T. cruzi* strains (Ayala &
26 Ayala, 1981; Ayala et al., 1981) and inadequate pharmacokinetic properties (Urbina,
27 1999). Moreover, Horuchi et al. (2009) found that normal mice that were administered
28 high doses of allopurinol showed abnormal pyrimidine metabolism along with renal
29 toxicity, which complicates the course of Chagas' disease in infected animals.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41

42 The antiprotezoal activity of *o*-hydroxymethylbenzotricosanyl acetate observed
43 against both parasitic forms (trypomastigote and amastigote) in infected mice may be
44 responsible for the reduction of amastigote nests observed in infected mice, resulting in
45 reduced mortality (Figure 3). Biotransformation of *o*-hydroxymethylbenzotricosanyl
46 acetate is apparently non-toxic, and, consequently, better results were observed using
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

this compound compared to mice treated with allopurinol. It will be necessary to evaluate the pharmacodynamics of 2-hydroxy-methylene-triethyl-saralacetate in animal models, as well as the antiproteoal activity of the compound when treating infected mice for longer periods of time, at higher doses, when using different *T. cruzi* strains and during the chronic phase of Chagas' disease.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge PROMEP (Programa de Mejoramiento del Profesorado) for financial support: "Actividad *in vivo* del compuesto aislado de las hojas de *Sesuvia edulis* contra las formas de tripomastigote y amastigote" Registration number: CIRB-05622.

We gratefully acknowledge CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) for financial support (reference number 154225) of the PhD studies at UAAEX.

References

- Apt BW, Aguilera X, Arribada A, Pérez C, Miranda C, Sánchez G, Zulantay L, Cortés P, Rodríguez I, and Juri D (1998): Treatment of chronic Chagas disease with itraconazole and allopurinol. *Am J Trop Med Hyg* 59:133-138.
- Apt W, Arribada A, Zulantay L, Solari A, Sánchez G, Miranda K, Coronado X, Rodríguez I, Gil LC, Ostua A (2005): Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the results of clinical and parasitological examinations 11 years post-treatment. *Ann Trop Med Parasitol* 99:733-741.
- Asuzu JU, Chineme CN (1990): Effects of *Morinda lucida* leaf extract on *Trypanosoma brucei brucei* infection in mice. *J Ethnopharmacol* 30:307-313.
- Avila JL, Avila A (1981): *Trypanosoma cruzi*: effect of allopurinol in the treatment of mice with experimental acute Chagas disease. *Exp Parasitol* 31: 294-298.
- Avila JL, Avila A, Casanova I (1981): Effects of Allopurinol on different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 39: 769-774.
- Barrera-Pérez MA, Rodríguez-Félix ME, Garmán-Marín E, Zavala-Velázquez J (2001): Biological behaviour of three strains of *Trypanosoma cruzi* from Yucatan, Mexico. *Rev Biomed* 12: 224-230.
- Berens RL, Marr J, Seete da Cruz ES, Nelson DJ (1982): Effect of allopurinol on *Trypanosoma cruzi*: Metabolism and biological activity in intracellular and bloodstream forms. *Antimicrob Agents Chemother* 22:657-661.
- Calzada F, Yepes-Muñoz L, Aguilar A (2006): *In vitro* susceptibility of *Eutimaeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *J Ethnopharmacol* 108: 367-376.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- Castro JA, de Mecca MM, Bartel LC (2006) Toxic side effects of drugs used to treat Chagas disease (American trypanosomiasis). *Braz Exp Toxicol* 25:471-479
- Coronado X, Zulantay I, Rozas M, Apt W, Sanchez G, Rodriguez J, Ortiz S, Solari A (2006) Dissimilar distribution of *Trypanosoma cruzi* clones in humans after chemotherapy with allopurinol and itraconazole. *J Antimicrob Chemother* 58:216-219
- Cunha WR, Crevelin EJ, Arantes GM, Gosti AP, Andrade Silva ML, Furtado NA, Albuquerque S, Ferreira DS (2006) A study of the trypanocidal activity of triterpene acids isolated from *Miconia* species. *Phytother Res* 20:474-478
- Dantas AP, Olivieri BP, Gomes FH, IV, Castro SL (2006) Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected mice with propolis promotes changes in the immune response. *J Ethnopharmacol* 103:187-193
- Flores SJ (2001) Leguminosae. Botánica, etnobotánica y ecología. Flora de Yucatán. Universidad Autónoma de Yucatán. Pp 157
- Fornet A, Muñoz V (2002) Natural products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs. *Curr Top Med Chem* 2:1215-1237
- Freitas HF, Chizzola PR, Paes AT, Lima AC, Mansur AJ (2005) Risk stratification in a Brazilian hospital-based cohort of 1220 outpatients with heart failure: Risk of Chagas heart disease. *Int J Cardiol* 102:239-247
- Guzmán E, González R, Flores S, Zavala J, Rosado M, Pérez S (2004) Activity of *Senega villosa* against *Trypanosoma cruzi*. *Pharm Biol* 42:504-507
- Guzmán E, Pérez C, Zavala MA, Acosta-Viana KY, Pérez S (2005) Antiprotozoal activity of (8-hydroxymethyl)- α -tricosanyl acetate isolated from *Senega villosa*. *Phytomedicine* 15:892-895

- 1
2
3
4 Higuchi ML, De Moraes CE, Pereira Barreto AC, Lopes FA, Stolt S, Bellotti G, Pileggi
5 E (1987). The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic
6 Chagas disease: A study based on endomyocardial biopsies. *Clin Cardiol* *10*:65-70
- 7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
- Honuchi H, Ota M, Nishimura S, Kaneko H, Kasahara Y, Ohta T, Komoriya K (2000).
Allopurinol induces renal toxicity by impairing pyrimidine metabolism in mice. *Life Sci*
66:2051-2070
- Lira R, Contreras LM, Rita RM, Urbina JA (2004). Mechanism of action of anti-
proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma*
cruzi: potentiation of *in vitro* activity by the steroid biosynthesis inhibitor ketoconazole. *J*
Antimicrob Chemother *47*:537-546
- Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simoes MV (2007). Pathogenesis of
chronic Chagas heart disease. *Circulation* *115*:1109-1123
- Mena JG, Pech SG, Brito L (1997). Anthraquinones from *Senecio villosa* Mill. *Rev*
Latinoamer Quim *25*:128-131
- Milici J, Guzmán-Guttenberg RA, Grana DE, Stormo R (2009). Prognostic impact of
Chagas disease in the United States. *Am Heart J* *157*:22-29
- Nakajima-Shimada J, Hirota Y, Aoki T (1986). Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth
in mammalian cells by purine and pyrimidine analogs. *Antimicrob Agents Chemother*
40:2455-2459
- OECD (2001). Acute Oral Toxicity: Ups-and-Down Procedure (Updated Guideline
adopted 2006, December, 2001). Available at
www.oecd.org/dataoecd/4/42/42599d3e.pdf. Accessed 15 November
2008.
- Paulino M, Inhorn E, Dubin M, Aguilera-Morales S, Tapia O, Stoppani AV (2005).
The chemotherapy of Chagas disease: An overview. *Mex Rev Med Chem* *5*:499-501

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Santa-Rita RM, Lira R, Barbosa HS, Urbina JA, de Castro SL (2005): Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and Ketocanazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): Colony and ultrastructural analysis. *J Antimicrob Chemother* 55:780-784

Schmeda-Hirschmann G, Astudillo L, Bastida J, Godina C, Rojas de Arias A, Ferreira ME, Inchausti A, Yabluff G (2001): Cryptofoline derivatives from *Cryptococcus alba* fungi. *J Pharm Pharmacol* 53:563-567

Tarfleten RL, Reithinger R, Urbina JA, Kitron U, Günter RL (2007): The challenges of Chagas disease: grim outlook or glimmer of hope. *PLoS Med* 4:e33

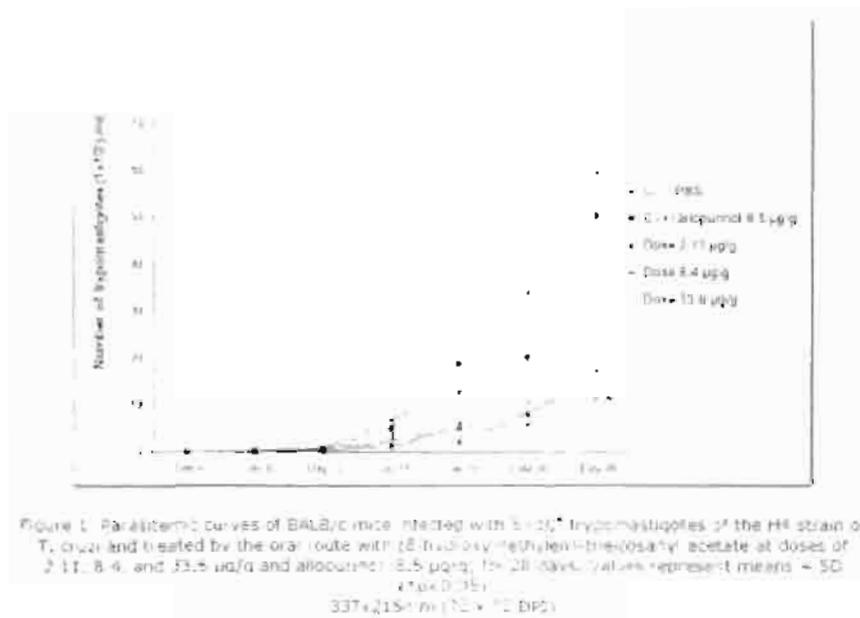
Urbina J (1999): Parasitological view of Chagas disease: Is it curable? Is it preventable? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94:349-355

WHO (2007): Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Training in Tropical Disease (TDR). *TDR/SWG/09*

.....

Deleted: y

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

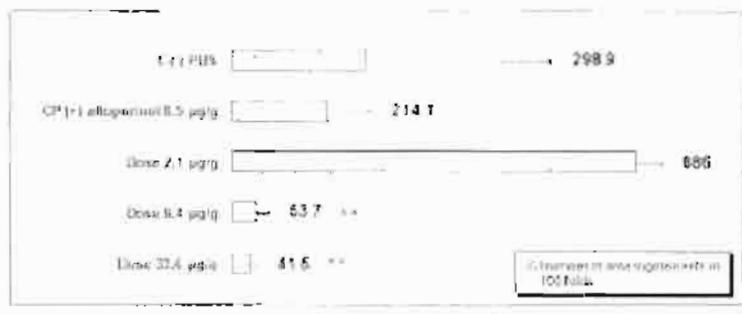


Figure 2. Effect of 18-hydroxymethyl-19-methylsilyl acetate on the number of amastigote nests observed in BALB/c mice infected with T. cruzi and treated at doses of 2.1, 6.4, and 33.6 µg/g (Fig. 2.3).

240x177mm (72 x 72 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

