

T  
537

90916

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Casa abierta al tiempo**

ACTIVIDAD *IN VITRO* DE DIFERENTES EXTRACTOS DE LAS HOJAS DE  
*Senna villosa* CONTRA LAS TRES ETAPAS EVOLUTIVAS DE *Trypanosoma*  
*cruzi*.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A:

**M. en C. EUGENIA DEL SOCORRO GUZMÁN MARÍN**

Directoras de Tesis:

Dra. María Salud Pérez Gutiérrez

Dra. María del Refugio González Losa

Asesor

Dr. Raúl Guillermo Enríquez Habib

México D.F.

Noviembre de 2004

EL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA SE ENCUENTRA EN EL PADRÓN DE POSGRADOS DE EXCELENCIA DEL CONACYT Y CUENTA CON APOYO BAJO EL CONVENIO PFP-20-93.

MI TOTAL RECONOCIMIENTO AL PROMEP POR LA BECA ECONÓMICA, CON FOLIO UADY 107 y No. DE CONVENIO UADY 2002-03-01, OTORGADA PARA LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO DOCTORAL.

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

**M. en C. Eugenia del Socorro Guzmán Marín**

El día 26 de noviembre de 2004

**Sinodales:**

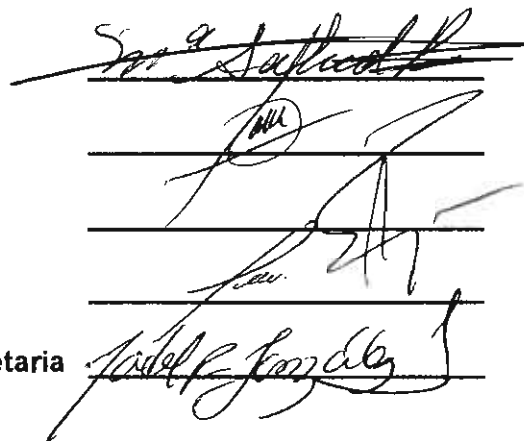
**Dra. María Salud Pérez Gutiérrez: Presidenta**

**Dr. Héctor Antonio Ponce Monter: Vocal**

**Dr. Raúl Guillermo Enríquez Habib: Vocal**

**Dr. Héctor Manuel Luna Contla: Vocal**

**Dra. María del Refugio González Losa: Secretaria**



The image shows five handwritten signatures in black ink, each written over a horizontal line. The signatures are: 1. Dra. María Salud Pérez Gutiérrez (Presidenta), 2. Dr. Héctor Antonio Ponce Monter (Vocal), 3. Dr. Raúl Guillermo Enríquez Habib (Vocal), 4. Dr. Héctor Manuel Luna Contla (Vocal), and 5. Dra. María del Refugio González Losa (Secretaria). The signatures are written in a cursive style.

## **COMITÉ TUTORIAL**

### **DIRECTORES DE TESIS**

#### **DRA. MARÍA SALUD PÉREZ GUTIÉRREZ**

Profesor Titular "C". Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.  
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I.

#### **DRA. MARÍA DEL REFUGIO GONZÁLEZ LOSA**

Profesor Investigador Titular "B". Universidad Autónoma de Yucatán, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi". Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I.

### **ASESOR**

#### **DR. RAÚL GUILLERMO ENRÍQUEZ HABIB**

Investigador Titular "C". Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Química. Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel III.

### **SINODALES**

#### **DR. HÉCTOR MANUEL LUNA CONTLA**

Profesor Titular "C". Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco.  
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I.

#### **DR. HÉCTOR ANTONIO PONCE MONTER**

Profesor Investigador Titular "C" Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.  
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II.

El trabajo de Tesis fue desarrollado en los Laboratorios:

304 del Edificio G del Departamento de Sistemas Biológicos Unidad Xochimilco  
de la Universidad Autónoma Metropolitana

Biología Celular del Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" de  
la Universidad Autónoma de Yucatán.

## RECONOCIMIENTOS

El logro de ésta meta ha sido posible por el apoyo y las facilidades otorgadas por personal académico, administrativo, compañeros y amigos, a quienes expreso mi más sincera gratitud.

A la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

A la Universidad Autónoma de Yucatán.

Al Dr. Rubén Román Ramos, Coordinador del Doctorado en Ciencias Biológicas.

Al personal del laboratorio 304 del Edificio G del Departamento de Sistemas Biológicos de la UAM-X por el apoyo brindado y permitirme ser parte de él.

A la Directiva del Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" Unidad Biomédica, por el apoyo y la confianza que me brindaron, aspectos muy importantes para lograr esta meta.

Al personal del Laboratorio de Biología Celular del Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" Unidad Biomédica.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis tutoras:

Dra. María Salud Pérez Gutiérrez y Dra. María del Refugio González Losa, un especial agradecimiento por su apoyo incondicional, sus comentarios y sugerencias, logrando la conclusión de este trabajo.

A mi asesor:

Dr. Raúl Guillermo Enríquez Habib, por su apoyo y asesoría para la culminación de éste trabajo.

A mis sinodales:

Dr. Héctor Manuel Luna Contra y Dr. Héctor Antonio Ponce Monter, por su tiempo, comentarios y sugerencias.



# **INDICE**

<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	3
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	6
1.1 Enfermedad de Chagas	8
1.1.1 Generalidades	8
1.1.2 Agente causal	11
1.1.3 Morfología	12
1.1.4 Ciclo biológico	15
1.1.5 Fases de la infección	17
1.1.6 Criterios de curación de la enfermedad de Chagas después del tratamiento	21
1.1.7 Pronóstico de la enfermedad	22
<b>II. ANTECEDENTES</b>	
2.1 Agentes quimioterapéuticos contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
2.1.1 Benznidazol	26
2.1.2 Actinomicina D	26
2.1.3 Violeta de genciana	27
2.1.4 Anfotericina B	27
2.1.5 Fenotiacidas	27
2.1.6 Ketoconazol	28
2.1.7 Alopurinol	28
2.1.8 Naftoquinonas	28
2.1.9 Agentes quelantes	29
2.1.10 Carboxamidas	30
2.1.11 Citocalasina B o D	30
2.2 Productos naturales	30
2.2.1 Taxol	30
2.2.2 Alcaloides	31
2.2.3 Antioxidantes fenólicos	31
2.2.4 Ácido gálico	31
2.2.5 Hidroquinonas, monoterpenos y piquerol A	32
2.3 Planta	43
2.3.1 <i>Senna villosa</i>	43
<b>III. OBJETIVO GENERAL</b>	45
<b>IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	46
<b>V. HIPÓTESIS</b>	47

<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
6.1 Parásitos	48
6.2 Material biológico	48
6.3 Preparación de los extractos	49
6.4 Preparación de los extractos para los bioensayos	49
6.5 Separación del extracto clorofórmico	50
6.6 Pruebas fitoquímicas	51
6.7 Bioensayo antiparasitario	53
6.8 Curvas de crecimiento	54
6.9 Transformación de epimastigotes a tripomastigotes	55
7.0 Transformación de tripomastigotes a mastigotes	55
7.1 Aislamiento de tripomastigotes y amastigotes de células VERO	56
7.2 Dosis-efecto ( $DL_{50}$ )	56
7.3 Regresión del efecto	57
7.4 Ensayo de citotoxicidad	58
7.5 Análisis de datos	59
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	60
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	104
<b>IX. REFERENCIAS</b>	105
<b>X. ANEXOS</b> (Artículo publicado con los resultados obtenidos)	

## **RESUMEN**

El protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), es el agente causal de la Tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas y es transmitido al humano por insectos vectores de la familia Reduviidae, de manera especial *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*.

La enfermedad de Chagas se encuentra ampliamente distribuida en Centroamérica y Suramérica, con aumento importante de la morbilidad y mortalidad constituyendo un grave problema de salud, social y económico en países de América Latina.

La quimioterapia contra la enfermedad de Chagas es un problema sin resolver, debido a la toxicidad de los fármacos disponibles y el desarrollo de la resistencia a las mismas. Una posible solución a esos problemas es encontrar sustancias contra *T. cruzi* y una fuente potencial son los productos naturales, usados comúnmente en la medicina tradicional.

*Senna villosa*, es una planta utilizada en la medicina tradicional, utilizada en la región Maya, la cual tiene actividad antimicrobiana contra bacterias grampositivas y hongos. Con estos antecedentes, decidimos estudiar los extractos metanólico, clorofórmico y acuoso de las hojas de *S. villosa* contra epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*, los cuales presentaron inhibición del crecimiento de ambas fases del parásito en concentraciones de 1.65, 3.3 y 6.6 µg/mL.

Se observó que los extractos metanólico y clorofórmico tienen mayor actividad inhibitoria respecto al extracto acuoso en ambas fases del parásito y solo se encontró diferencia significativa respecto al extracto acuoso. Al separar el extracto

clorofórmico por cromatografía en columna, se obtuvieron 28 fracciones, las cuales se homogeneizaron por medio de cromatografía en capa fina y se probaron contra epimastigotes y tripomastigotes a las concentraciones de 1.65, 3.3 y 6.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . De estas fracciones obtenidas, la 5 demostró mayor actividad contra el parásito, respecto a las demás fracciones probadas. El estudio fitoquímico demostró la presencia de flavononas, esteroides y terpenos.

De la fracción 5 en una segunda cromatografía en columna, se obtuvo un sólido blanco que se ha denominado sólido A, con el cual se realizaron bioensayos, encontrando la mejor actividad inhibitoria en la concentración de 6.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contra ambas fases del parásito. Asimismo, con una tercera cromatografía en columna se obtuvo otro sólido al cual se le designó como sólido B y se realizaron los bioensayos correspondientes, encontrándose inhibición más alta con 6.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

El sólido B se sometió a un análisis por cromatografía de gases-masas y se encontró que este sólido es una mezcla de seis compuestos que son metil-cetonas lineales.

Con el sólido B se hizo una curva de concentración-efecto, encontrando que la inhibición del parásito es concentración-dependiente y la dosis-letal<sub>50</sub> (DL<sub>50</sub>) correspondió a 158.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contra ambas formas del parásito.

En la fase de amastigotes los bioensayos se llevaron a cabo en la línea celular Vero, con los extractos acuoso, metanólico, clorofórmico, la fracción 5, el sólido A y el sólido B, en todos los casos se observó baja actividad en esta fase del parásito y sin embargo no presentaron toxicidad celular.

Con los resultados obtenidos podemos concluir que la actividad tripanostática y tripanocida de los compuestos obtenidos *Senna villosa* es significativa.

## ABSTRACT

The haemoflagellate protozoan *Trypanosome cruzi* (*T. Cruzi*), is the causal agent of Chagas disease which is transmitted to the human body by insects from the *Reduviidae* family, especially *Triatoma*, *Rhodnius* and *Panstrongylus*.

Chagas' disease is found widely distributed in Central and South America. The high morbidity and mortality rates of the disease cause very important health, social and economic problems in Latin American countries.

Chemotherapy against Chagas' disease is unsatisfactory due to the toxicity of the available drugs and the development of drug resistance. One possible solution to these problems is to find drugs which have already been developed for other uses in humans and have thereby been proved to have low toxicity. An example of this approach is offered by the potential use of natural products, commonly used in traditional medicine.

*Senna villosa* is a medicinal plant traditionally used in the Mayan region. It has antimicrobial activity against grampositive bacteria and fungus. With this background in mind, we decided to study the methanol, chloroform and aqueous extracts from the leaves of *S. Villosa* against the epimastigotes and trypomastigotes of *T. cruzi*. They all demonstrated an inhibition of growth in both phases of the parasite at concentrations of 1.65, 3.3 and 6.6 µg/ml.

It was observed that methanol and chloroform extracts show a higher inhibition of growth than the aqueous extract against both forms of the parasite, and the only significant difference observed was between the aqueous extract and the methanol and chloroform extracts.

The chromatographic separation of the active chloroform extract provided 28 fractions which were analyzed by Thin Layer Chromatography (TLC) and tested against the epimastigotes and trypomastigotes from *T. cruzi* at concentrations of 1.65, 3.3, and 6.6 µg/ml. Of the 28 fractions obtained, fraction 5 showed greatest activity against the parasite. Phytochemical study of fraction 5 demonstrated the presence of flavonones, steroids and terpenes which might explain its activity.

A second chromatography was carried out on fraction 5 and a white solid denominated solid A was obtained on which a bioassay was performed in triplicate, and the highest inhibitory effect was achieved at 6.6 µg/ml against both phases of the parasite.

The solid B was analyzed by GC/MS and main reported mixed six compounds are methyl-cetone lineal.

In the same way another solid, denominated solid B, was obtained and the corresponding bioassays in triplicate were carried out. The highest inhibitory effect against growth of epimastigotes and trypomastigotes was found at 6.6 µg/ml.

A concentration/effect curve was elaborated for solid B, with the finding that the inhibition of the parasite is concentration dependent and the lethal doses<sub>50</sub> (LD<sub>50</sub>) corresponded to 158.4 µg/ml against both forms of the parasite.

*In vitro* bioassays on amastigote forms of *T. cruzi* were carried out on VERO cells with the aqueous, methanol and chloroform extracts, fraction 5, solid A and solid B. Low activity was observed in each one of these cases in this phase of the parasite, and no cellular toxicity was observed.

From these results we can conclude that trypanostatic and trypanocidal activity of the compounds obtained from *S. villosa* is significant.

# **INTRODUCCIÓN**

Al inicio del siglo XXI la farmacognosia alcanza relevancia como resultado del crecimiento explosivo del uso de remedios herbolarios en la práctica de la farmacia moderna, sobre todo en Europa y América de Norte, ampliando sus áreas de investigación hacia aspectos de biología celular y molecular en relación a productos naturales y fitoterapia, aunado al desarrollo de métodos analíticos tradicionales y fitoquímica. El estudio sistemático de los remedios herbolarios ofrece a los grupos de estudiosos de la farmacognosia, una atractiva área de investigación, sobre los principios biológicamente activos de fitomedicinas, su modo de acción, sus interacciones, el control de calidad y el desarrollo de ensayos clínicos (Kinghorn AD, 2001).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) a partir de la Declaración de Alma Ata, propuso apoyar la utilización de los recursos tradicionales, así como de los propios de la medicina generada en el modelo biomédico (Taddei-Bringas GA y cols., 1999). Esta organización reporta más de 20,000 especies de plantas diferentes que han sido empleadas con propósitos medicinales por las poblaciones humanas. Además el 80% de las personas que habitan en países en vías de desarrollo, dependen aún de las medicinas tradicionales para el cuidado primario de la salud (OMS, 1978).



En este contexto los conocimientos de la Medicina Tradicional Maya, han sido ampliamente usados para la atención de diversos problemas relacionados con la salud del hombre. En virtud de lo cual, en las comunidades indígenas y de escasos recursos de esta región, algunas de las enfermedades infectocontagiosas se tratan de manera empírica, aplicando estos conocimientos.

Es importante señalar que diversos estudios en el campo de la antropología médica, han documentado desde hace varios años, la interrelación de los remedios de la herbolaria que existe entre los pobladores de una localidad, los curanderos y el personal de salud institucional, médico y paramédico (Taddei-Bringas GA. y cols., 1999).

Con el presente estudio se pretende generar conocimientos de utilidad que brinden un sustento científico sobre el empleo de las plantas medicinales de la región maya, para el tratamiento de enfermedades parasitarias, entre las que se encuentra la enfermedad de Chagas, cuyo agente etiológico es *Trypanosoma cruzi*, cumpliendo de esta manera, con el compromiso de la comunidad académica de responder a las necesidades que demanda la sociedad sobre la generación de nuevos conocimiento que repercutan en su beneficio.

Es necesario señalar que ninguno de los compuestos estudiados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas han sido considerados seguros, completamente efectivos y de bajo costo, por lo que en este estudio, se evalúa la actividad antitripanocida de la planta *Senna villosa*, que se utiliza en la medicina tradicional maya como antiinflamatorio, cicatrizante, en el tratamiento del acné y de los trastornos de la menstruación (Pech G, 1996).

## 1.1 Enfermedad de Chagas

### 1.1.1 Generalidades

La Tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas es un grave problema de salud pública en casi todos los países del Continente Americano, debido a la interacción de factores geográficos y ecológicos que intervienen en la epidemiología de la enfermedad, propiciando una mayor transmisión por medio del vector.

La OMS reporta que el número de personas infectadas es de 15 a 20 millones, aproximadamente, es la causa de 60,000 óbitos por año y aproximadamente 50,000 pacientes mueren cada año por la enfermedad, además 100 millones se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad (WHO, 1998). En la república mexicana, en los últimos años se refieren aproximadamente 3 millones de personas infectadas (WHO, 1995; Gloss G y cols., 1990; Hagar J, 1991; Fernández-Ferreira E, 1999; Moncayo A, 1997).

El agente etiológico de esta patología es el *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*, protozooario hemoflagelado, que es transmitido a los humanos y otros mamíferos por insectos vectores correspondientes a 3 géneros: *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*. Así mismo, muchos animales silvestres y domésticos son considerados reservorios (perro, roedores, zarigüeya), los cuales con frecuencia

conviven con el hombre (Guzmán E y cols., 1994; Zavala J y cols., 1996; Schvartzapel AJ, 1997).

Otras vías de transmisión son la transfusión sanguínea, el paso trasplacentario, la manipulación de animales infectados, la leche materna, accidentes en el laboratorio y en menor importancia la vía oral (Barrera M y cols., 1991; Rodríguez-Félix ME, 1995; Galel SA, 1996).

La infección de los triatomíneos con *T. cruzi* es un indicador de la posible existencia de hospederos vertebrados portadores de tripomastigotes coexistiendo en el mismo ecotopo.

Asimismo, es importante señalar que la magnitud con que se reporta la enfermedad, varía de acuerdo a múltiples factores que dependen del hospedero humano, de los transmisores y de las cepas del parásito.

Las manifestaciones clínicas varían desde una infección inaparente hasta alteraciones cardíacas graves, que conllevan a una considerable disminución de la vida productiva de las personas que la padecen, incluso, puede ocasionarles la muerte.

El pronóstico de la enfermedad es incierto, ya que no se cuenta con un fármaco específico con la capacidad de destruir al parásito y que a la vez carezca de efectos adversos, por lo que cuando se instala la fase aguda de la enfermedad, ésta puede prolongarse hasta dos meses, debido a que los pacientes chagásicos no pueden eliminar los parásitos, aunque algunos pueden retrasar la proliferación e infectividad con sus mecanismos de defensa (Brener Z, 1980; Barrera M y cols., 1990; Bestetti RB y cols., 1997; Andrade ZA, 1991).

La quimioterapia de la enfermedad de Chagas es un problema sin resolver, por lo que se continúa en la búsqueda de fármacos alternativos. Actualmente se cuenta con dos compuestos nitroheterocíclicos utilizados en la clínica, los cuales son restringidos por su alta toxicidad. Se han estudiado un gran número de compuestos por diferentes vías de administración, principalmente dirigidos a inhibir la proliferación de epimastigotes, una de las tres fases evolutivas del parásito, como los derivados de purinas y los inhibidores de la tripanotiona reductasa (Henderson y cols., 1988, Docampo R, 2001).

El desarrollo de fármacos contra *T. cruzi* ha ocurrido en dos fases:

1.- En 1960 al desarrollarse fármacos de manera empírica, ya que el tratamiento se basaba principalmente en las observaciones clínicas y 2.- en los años setentas con el uso de nifurtimox y benznidazol.

Dada la situación, se requiere la identificación de compuestos alternativos y sustitutos para el nifurtimox y el benznidazol, lo cual es vital para abrir campos de investigación que ofrezcan beneficios potenciales de índole social e impacto económico, en cuanto a la cura de la enfermedad de Chagas, suceso de gran interés a nivel de países en vía de desarrollo.

A partir de 1980 se llevaron a cabo estudios sobre los mecanismos de acción de una gran variedad de fármacos y aproximadamente el 50% de los compuestos investigados entre el período de 1980 a 1992, se estudió solamente su efecto sobre la proliferación de la fase evolutiva de epimastigote (de Castro SL, 1993).

Actualmente ha resurgido el interés por los productos naturales y sus derivados como constituyentes de fármacos de uso clínico. En la región maya se utiliza

*Senna villosa* (Saalch'e), en la medicina tradicional, la cual tiene actividad antimicrobiana contra bacterias gram positivas y hongos, en virtud de lo cual se propone determinar si también tiene actividad tripanocida y cual es el compuesto bioactivo contra *T. cruzi*.

### **1.1.2 Agente causal**

*Trypanosoma cruzi* es un protozooario hemoflagelado perteneciente a la familia de los *Trypanosomatideos*, orden de los Kinetoplastideos y a la clase *Zoomastigina*. Esta familia comprende parásitos de vida libre, monogénicos y digénicos de invertebrados y plantas, así como, parásitos digénicos de invertebrados y vertebrados como los géneros *Trypanosoma* y *Leishmania* (McGhee RB y cols., 1980; Markell E y cols., 1990; Tay-Zavala J y cols., 1991). El parásito presenta un ciclo de vida complejo que involucra cuatro estadios de desarrollo, dos en el insecto vector y otros dos en el hospedero mamífero. Existen además otros estadios intermedios que hacen más complejo el ciclo vital. Los estadios se definen por su forma, por la posición del cinetoplasto respecto al núcleo y por la región de donde emerge el flagelo y son: epimastigote, tripomastigote sanguíneo, tripomastigote metacíclico y amastigote (Brenner Z, 1971; Kirchhoff LV, 1993; Kirchhoff LV, 1995).

### 1.1.3 Morfología

Epimastigote: es de forma fusiforme de 20-25  $\mu\text{m}$  de longitud, se encuentra en el insecto vector y en los medios de cultivo, asimismo, es la forma replicativa y no infectiva para el hospedero mamífero incluyendo al hombre. El cinetoplasto se encuentra en posición anterior muy cercano al núcleo y tiene un flagelo que forma una pequeña membrana ondulante, presenta una forma de multiplicación por fisión binaria longitudinal que se realiza en el intestino de los triatomíneos, dando lugar a los tripomastigotes metacíclicos (Mandell y Velasco, 1991) (Figura 1)

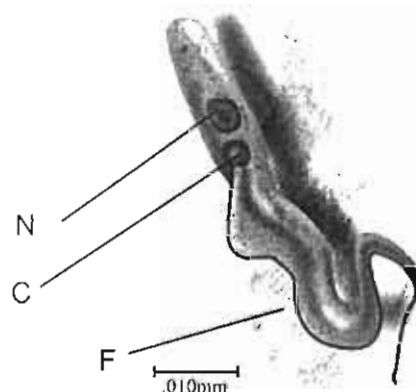


Figura 1.- Morfología de un epimastigote: C, cinetoplasto; F, flagelo; N, núcleo

Tripomastigote metacíclico: es de forma alargada, mide 20-25  $\mu\text{m}$  de longitud, un cinetoplasto generalmente esférico subterminal posterior al gran núcleo vesiculoso que posee, conformado principalmente por DNA y una única mitocondria. A lo

largo del cuerpo emergiendo del extremo posterior, presenta un flagelo con una membrana ondulante. Es la fase no replicativa, infectiva para el humano u otros mamíferos, es el producto de la diferenciación de los epimastigotes en el intestino posterior del insecto vector, el cual al emitir sus deyecciones elimina esta fase del parásito para posteriormente penetrar por mucosas o soluciones de continuidad en el hospedero mamífero e infectarlo (Markell E y cols., 1990; Tay-Zavala J y cols., 1991).

Tripomastigote sanguíneo (Figura 2): morfológicamente es igual al tripomastigote metacíclico, es la fase que proviene de la diferenciación de la fase de amastigote, no es replicativo pero si infectivo, ya que puede infectar nuevas células o pasar al insecto vector y cerrar el ciclo biológico del parásito (Koerich LB y cols., 2000; Wainszelbaum MJ y cols., 2003).

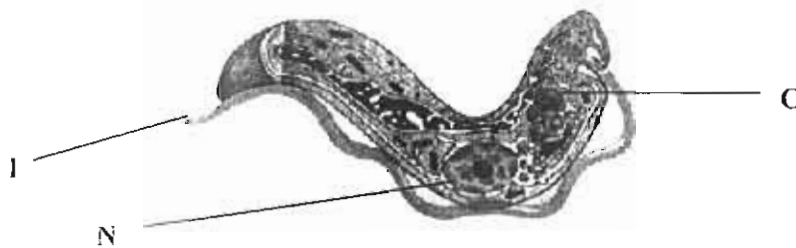


Figura 2.- Morfología de un tripomastigote sanguíneo y metacíclico: F, flagelo; C, cinetoplasto; N, núcleo; Mo, membrana ondulante.

Amastigote (Figura 3): es la forma intracelular en el hospedero mamífero, es redondeado de 2-2.5  $\mu\text{m}$  con el flagelo interno dentro de una bolsa, con un gran

núcleo y un cinetoplasto compacto en forma de bastoncito o esférico. Es una forma replicativa, producto de la diferenciación de tripomastigotes metacíclicos y sanguíneos con capacidad de infectar otras células además de las del sistema reticuloendotelial (Faust C, 2003).

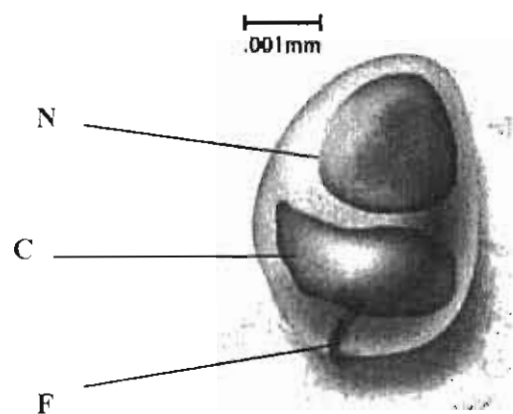


Figura 3.- Morfología de un amastigote: N, núcleo; F, flagelo; C, cinetoplasto.

Tanto el amastigote como el epimastigote se multiplican por fisión binaria con la siguiente secuencia: a) el corpúsculo basal del flagelo se replica y crece un nuevo flagelo a lo largo del viejo; b) el cinetoplasto se divide en dos como consecuencia de la división de las mitocondrias; c) el núcleo se divide mitóticamente, los cromosomas en anafase emigran a lo largo del cariosoma alargado, mientras que la envoltura nuclear permanece intacta; d) se inicia una hendidura en la posición



terminal anterior, dando como resultado la formación de dos nuevos parásitos (Brown HM, 2000).

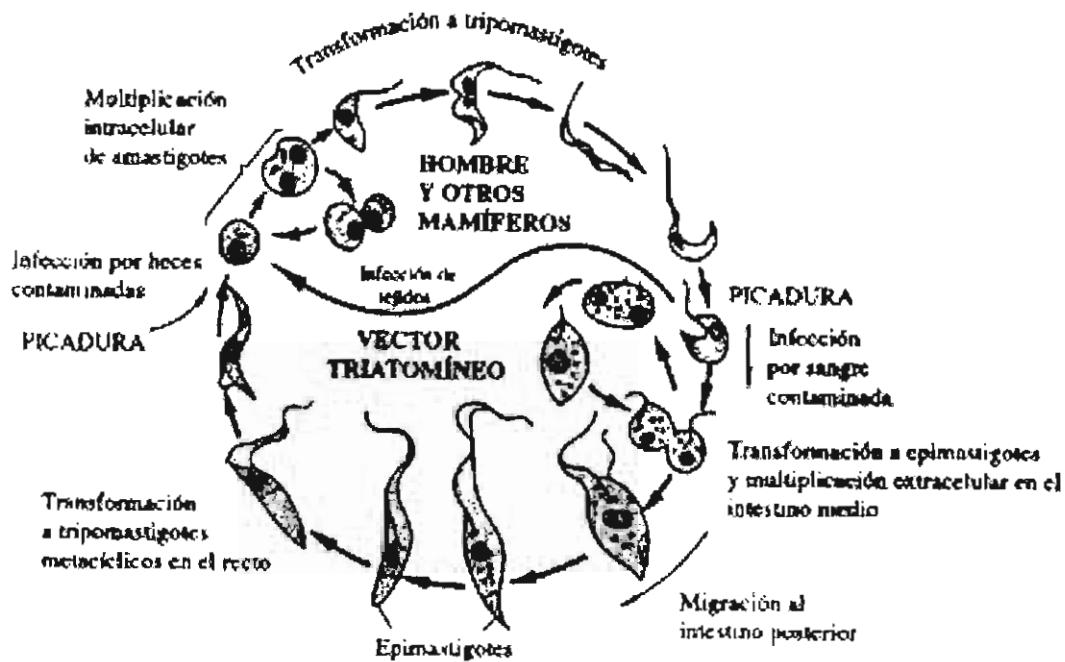


Figura 4.- Ciclo vital de *Trypanosoma cruzi* en el hombre, en reservorios mamíferos y en el triatómineo. Tripomastigotes en sangre de mamíferos, epimastigotes en el intestino posterior del vector y amastigotes intracelulares.

#### 1.1.4 Ciclo biológico

El ciclo biológico del parásito (Figura 4) inicia cuando el insecto vector adquiere los tripomastigotes al alimentarse de hospederos mamíferos infectados. En el tubo

digestivo del insecto, en el transcurso de 8-10 días se desarrolla un ciclo, durante el cual las formas de tripomastigotes ingeridas con la sangre, se transforman en el estómago del insecto en epimastigotes, los cuales avanzan al intestino medio donde se multiplican por fisión binaria longitudinal para finalmente proliferar y transformarse en tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior del insecto, el cual elimina estas formas con las deyecciones, las cuales son la forma infectiva para los hospederos mamíferos. La infección no se verifica mediante la picadura, ya que los tripomastigotes no se eliminan con la saliva del triatoma. Durante la picadura el insecto defeca y elimina en las heces las formas infectantes, que atraviesan la piel a través de la pequeña herida ocasionada por la probóscide del insecto o de erosiones mínimas que el individuo se provoca al rascarse, en ocasiones los parásitos penetran también a través de la conjuntiva. Una vez que han atravesado piel o mucosas, penetran a los macrófagos subcutáneos locales y adquieren la forma de amastigote infectando nuevos macrófagos en cuyo interior se reproducen rápidamente y a los 4 o 5 días se rompen transformándose en tripomastigotes sanguíneos para diseminarse por vía hematológica a todo el organismo invadiendo diversos tejidos y órganos (corazón, músculos, etc.) en donde nuevamente adquieren la forma de amastigote, proliferan abundantemente y determinan las lesiones típicas de la enfermedad.

El ciclo biológico se completa cuando un triatomineo se alimenta de un mamífero infectado y adquiere el parásito (Lammel EL y cols., 1985; Mortara RA y cols., 1999; Rose NR, 1998).

### 1.1.5 Fases de la infección

La Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es una parasitosis de larga evolución cuya sintomatología es tan variada como las diferentes lesiones que produce el agente etiológico, de manera que comprende dos procesos diferentes:

1.- La infección con *T. cruzi*, que no produce signos ni síntomas patológicos y solo se manifiesta por presencia transitoria de tripanosomas o de inmunoglobulinas específicas en la sangre.

2.- La enfermedad de Chagas, durante la cual se pueden presentar tres fases:

a) Fase aguda: que de ordinario se presenta en niños, llamada también de inicio, la cual tiene una duración de 20 a 30 días, con un período de incubación variable entre 7 y 14 días y con un tiempo medio de una semana, durante la cual se encuentran parásitos en sangre periférica.

Al inicio, la enfermedad puede ser asintomática o presentar fiebre elevada, seguida frecuentemente a las 2 semanas, por un depósito de material mucoide en los tejidos que causa tumefacción dura y piel seca, a menudo de todo el cuerpo, con escalofríos, cefalea, mialgias, taquicardia, adenopatías, astenia, adinamia, hepatomegalia y esplenomegalia. Se pueden presentar signos conocidos como "puerta de entrada" y son: el complejo oftalmoganglionar o Signo de Romaña, que se caracteriza por edema bpalpebral unilateral con adenopatía periauricular satélite, que ocurre solo en el 50% de los casos agudos (Figura 5) y el Chagoma de inoculación que se caracteriza por lesiones inflamatorias en piel que pueden

ser focales, nodulares, eritematosas, endurecidas o descamativas (Primavera KSC y cols., 1990).

Clínicamente se puede presentar taquicardia, cardiomegalia leve o insuficiencia cardíaca congestiva, que se manifiesta en el electrocardiograma con arritmias sinusales, trastornos de conducción intraventricular como bloqueos de rama y miocarditis que generalmente son de mal pronóstico.

Las cepas neurotropas invaden principalmente la neuroglia, ocasionando una reacción inflamatoria apareciendo una encefalitis que produce ansiedad, irritabilidad, embotamiento mental y a veces coma, acompañados tal vez de signos de irritación meníngea.

Esta fase afecta principalmente a niños (40-50%), en los cuales puede ocasionar muerte súbita por cuadros de miocarditis y meningoencefalitis, siendo esta última causa de muerte en el 50% de los casos. En los niños coinfectados con el virus de inmunodeficiencia humana la infección es grave y la medicación específica para *T. cruzi* puede provocar efectos adversos de mediana intensidad.

La miocarditis se manifiesta con taquicardia, debilidad, dolor torácico y alteraciones electrocardiográficas, apareciendo insuficiencia cardíaca congestiva.

La muerte puede sobrevenir por insuficiencia miocárdica o paro cardíaco.

Asímismo, ocurre invasión de células adiposas, por lo que aparecen numerosos nódulos subcutáneos hipersensibles que se denominan lipochagomas (Prata A, 1994; Faust C, 2003).



Figura 5.- Signo de Romaña, más frecuente en niños y caracterizado por edema bpalpebral unilateral, acompañado de linfadenopatía periauricular y conjuntivitis.

b) Fase Indeterminada: se caracteriza por ser una fase asintomática o de latencia con evidencia parasitológica ocasional y/o serología positiva, con alteraciones electrocardiográficas o digestivas y linfadenopatía generalizada, las cuales pueden durar 30 años y de éstas el 30% pueden evolucionar a la fase crónica y en algunos casos puede ocurrir muerte súbita (Rossi M y cols., 1990; Marín-Neto JA y cols., 1999; Abate T y cols., 1993).

c) Fase crónica: los síntomas crónicos en adultos son el resultado de arritmias y dilatación del corazón, esófago y colon. También se ha descrito el crecimiento anormal del hígado, intestino, esófago, ureteros y vejiga. La parasitemia persistente contribuye al desarrollo de la patología crónica, y las lesiones

nerviosas que se producen durante la fase aguda de la infección son responsables de las manifestaciones tardías de la fase crónica. Los síntomas de esta fase guardan relación probablemente con la lesión producida en la fase crónica, por lo que la gravedad de los síntomas depende de la localización principal de los parásitos intracelulares en este momento. Las células consideradas blanco son los cardiomiocitos, esta interacción cardiomiocito-parásito es facilitada por receptores de manosa localizados en la superficie de las células del músculo cardiaco y el incremento de la invasión del *T. cruzi* depende de los niveles de calcio y de mecanismos dependientes de la cinasa PI3 asociada a la membrana plasmática de los cardiomiocitos (Zavala J y cols., 1995; Mendoza J y cols., 1995; Burleigh BA y cols., 2002; Woosley AM y cols., 2003; Faust C, 2003).

Se han descrito síntomas cardiacos, meningoencefalíticos, mixedematosos, pseudomixedematosos y suprarrenales. Se producen alteraciones del peristaltismo debido a la destrucción de los ganglios autónomos del interior de la pared del colon. La disfagia es el síntoma principal del megaesófago, dando lugar a regurgitación de alimentos no digeridos.

La forma cardiaca, afecta aproximadamente al 50% de los pacientes con síntomas crónicos, los cuales presentan signos de miocarditis con bloqueo auriculoventricular, adelgazamiento apical del ventrículo izquierdo, dilatación de ventrículos y aurículas, lesiones inflamatorias del miocardio, rara vez lesiones pericárdicas y diversos grados de fibrosis, inducidas por la interleucina-1 (Lauria-Pires L, 2000; Tareleton RL y Zhang L, 1999).

La prevención y el control de las infecciones agudas podrían reducir el número de lesiones nerviosas y por lo tanto, modificar el panorama de las patologías crónicas (Prata A, 1994; Machado ER y cols., 1998; Leal MN y cols., 1999; Monteón-Padilla V y cols., 2001; Faust C, 2003; Petersen CA y col., 2003).

#### **1.1.6 Criterios de curación de la enfermedad de Chagas después del tratamiento**

Los criterios de curación incluyen la negativización de la parasitemia demostrada por hemocultivo y algunas pruebas serológicas. Para confirmar los resultados negativos se requiere aplicar por lo menos dos técnicas serológicas y éstas pueden ser hemaglutinación directa o indirecta, inmunofluorescencia, reacción de fijación de complemento y ELISA. Otros métodos de diagnóstico incluyen el examen microscópico de la interfase de células después de centrifugar sangre y el hemocultivo. Estos métodos muestran diferente sensibilidad y especificidad. Durante la fase aguda el xenodiagnóstico es la prueba más sensible (92%), la cual puede ser usada también para el estudio de la susceptibilidad de los animales de laboratorio ante diferentes cepas de *T. cruzi*. Mientras el xenodiagnóstico se ha mostrado negativo después del tratamiento con tripanocidas efectivos, pruebas serológicas convencionales como la inmunofluorescencia y la fijación de complemento persisten positivas. Consecuentemente la evaluación de la curación es aún controversial. Por medio de la prueba de lisis mediada por el complemento (CML), se detectaron anticuerpos líticos (LA) de *T. cruzi* que se adosan a los epitopos de tripomastigotes vivos y están relacionados con la resistencia del

huésped a la infección. La serología de anticuerpos convencionales (CSA) detecta inmunoglobulinas en sueros de pacientes con infecciones chagásicas, pero a diferencia de los LA, no reconoce tripomastigotes vivos. La presencia de LA se ha usado como un importante criterio de evaluación en la curación de la enfermedad de Chagas. Además, puesto que en algunos pacientes ambos tipos de anticuerpos desaparecen después del tratamiento eficaz, estos resultados sugieren que la curación de la enfermedad de Chagas no se basa solamente en el xenodiagnóstico negativo, sino también en la eliminación de los anticuerpos detectados por serología convencional y por la prueba de CML (Mandell E y Voge M 1991; Kang Y y cols. 1998).

### **1.1.7 Pronóstico**

En la fase aguda de la enfermedad de Chagas, el pronóstico depende de una serie de factores, tales como la edad, el estado de nutrición, el sistema inmune, el tipo y la intensidad de las manifestaciones presentadas por el paciente. Casi siempre la enfermedad tiene carácter más grave en los lactantes sobre todo en los de corta edad, a los que le puede ocasionar la muerte. En las zonas endémicas, donde la enfermedad es muy frecuente, el mal de Chagas es un factor importante de mortalidad infantil.

El pronóstico de la cardiopatía chagásica crónica es variable y depende principalmente, del grado de aumento del corazón, del tipo de trastorno del ritmo



cardiaco, del grado de insuficiencia cardiaca y de la tendencia evolutiva de la infección. La muerte puede sobrevenir súbitamente (inclusive en sujetos que aparentemente se hallan sanos), o bien luego de un tiempo de padecimiento imputable a falla del corazón (Hoft DF y cols., 2002; Kierszenbaum F, 1999; Girones N y cols., 2003).

## **II. ANTECEDENTES**

### **2.1 Agentes quimioterapéuticos contra *Trypanosoma cruzi***

Actualmente no existe un tratamiento efectivo contra la enfermedad de Chagas y los fármacos disponibles solamente destruyen a los parásitos extracelulares. Un 60% de los tratamientos resultan efectivos durante la fase aguda de la enfermedad, lo que lleva a la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos.

El agente tripanocida ideal debe ser:

- a) Selectivo y potente, tanto contra amastigotes intracelulares como contra tripomastigotes extracelulares;
- b) De acción tripanocida rápida y completa;
- c) Efectivo para impedir la evolución de las formas agudas e indeterminadas de la infección;
- d) Su farmacodinamia debe alcanzar niveles efectivos tripanocidas de concentración del fármaco en el plasma sanguíneo, en fluidos biológicos y en tejidos y además no debe inducir resistencia del parásito al medicamento
- e) Estable y de preferencia, efectivo por vía de administración oral.

El tratamiento de las infecciones por *T. cruzi* es considerado uno de los más insatisfactorios. Aunque ya se han descrito variaciones en cuanto a la susceptibilidad del parásito al nifurtimox y al benznidazol en ratones infectados crónicamente con cepas de *T. cruzi*, sería importante conocer la prevalencia de las distintas cepas y su respuesta a los medicamentos disponibles. Durante las seis décadas pasadas se han probado más de 100 productos experimentales con diferentes estructuras químicas para el tratamiento de las infecciones producidas por *T. cruzi*, pero sólo algunos de ellos han completado la fase preclínica con éxito relativo; por ejemplo: bisquinaldina (1937), 8-amino-quinilinas (1949), 5-nitrofuranos (1952), nitroimidazoles (1961), nitrotiazoles (1966), 2-nitroimidazoles (1968) y alopurinol (1968).

También se han usado compuestos arsenicales trivalentes, fenantridinos, ribofuranocipurinas, nitrofurazona y levofuraltadona, los cuales ocasionan efectos adversos como polineuritis y anemia hemolítica, relacionados con deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y depresión de la médula ósea, por lo que se prohibió su uso. Solamente dos compuestos tripanocidas han sido aceptados, registrados y comercializados por autoridades nacionales de salud en países de América Latina: nifurtimox (1972-1992), actualmente removido del mercado y benznidazol disponible desde 1975. Las tetraciclinas son inactivas y los esteroides están contraindicados. La quimioterapia está contraindicada en mujeres grávidas y con niños en lactancia materna. Se recomienda tratar a los donadores de tejidos y órganos dos semanas antes de la donación, y a los recipientes, dos semanas después de la intervención.

**2.1.1 Benznidazol:** (N-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamina; RO7-1051), nombre comercial Rochagan (Roche Company), actúa inhibiendo la síntesis de proteína y del RNA del parásito, a concentración de 100 mg/kg/h provoca inhibición total de la producción de proteína y 100 mg/kg/día mantiene niveles plasmáticos máximos y mínimos por encima de la concentración mínima inhibitoria.

Se elimina por biotransformación, 70% en orina, durante las 72 horas después de terminado el tratamiento, y sólo una pequeña cantidad se elimina por las heces. No se observa aumento significativo en la frecuencia de aberraciones cromosómicas, ni en las células de médula ósea, ni en los micronúcleos de las células de sangre periférica de los animales expuestos aguda o crónicamente al benznidazol *in vivo*. Ocasiona exantema multiforme, anorexia, artralgias, cefalea, neuropatías como: parestesia e hiperestesia, cólicos, náusea, vómitos y epigastralgia.

Es importante señalar que estudios en bacterias y células de mamíferos han demostrado que tanto el nifurtimox como el benznidazol causan serios efectos colaterales, sobre todo cuando deben ser administrados durante períodos prolongados (Souza SC y cols., 1991).

**2.1.2 Actinomicina D:** antibiótico que actúa bloqueando la capacidad infectiva, retardando la inmunogenicidad protectora en ratones, contra la infección virulenta (Queiroz da Cruz y cols., 1991).

A concentración de 50  $\mu\text{g/mL}$  causa las siguientes modificaciones sobre tripomastigotes: pérdida de la capacidad de replicarse en medio de cultivo, en sangre y en tejidos de ratón; incapacidad para penetrar en células Vero e imposibilidad de replicarse dentro de macrófagos normales e incapacidad de inducir lesiones histológicas propias de la enfermedad de Chagas (Antuñano F, 1997).

**2.1.3 Violeta de genciana:** se utiliza en bancos de sangre a una concentración de 125 mg/500mL, tiene efecto inhibitorio contra el estadio de tripomastigote. Su uso está restringido por la coloración que adquieren los tejidos y la piel (WHO, 1995).

**2.1.4 Anfotericina B:** antibiótico polieno con actividad contra tripomastigotes, es un compuesto complejo con lípidos de membrana, principalmente esteroides, por lo que incrementa la permeabilidad del parásito, causando su destrucción (de Castro SL y cols., 1992).

**2.1.5 Fenotiacidas:** inhibe el AMPc-fosfodiesterasa de *T. cruzi*, lo que posiblemente induce un incremento de los niveles de AMPc, lo cual podría interferir con la proliferación y diferenciación del parásito (Croft SL y cols., 1988; Lacuara JL y col., 1991; de Castro SL y col., 1992).

**2.1.6 Ketoconazol:** 1-acetil-4-(4)-(2-2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-ilmetil)-1-3-dioxalan-4-yl metoxifenil piperazina, efectivo sobre cultivo de tejidos infectados y sobre infecciones agudas, pero no es efectivo en casos crónicos. En epimastigotes y tripomastigotes induce una alteración en el metabolismo del esterol con acumulación de precursores metilados de ergosterol (McCabe RE y cols., 1988; Goad LJ y cols., 1989). Combinando el ketoconazol con ergosterol, se potencia el efecto sinérgico de ambos sobre la infección con *T. cruzi*, tanto *in vitro* como *in vivo* (Urbina JA y cols., 1991).

**2.1.7 Alopurinol:** (4-hidroxipirazolo (3,4-d) pirimidina). Pertenece a inhibidores de la biosíntesis de nucleótidos en la vía de las purinas. Inhibe la acción de la xantina oxidasa, la cual reduce la oxidación de hipoxantina a xantina del ácido úrico (Becerra RC y cols., 1999).

Es efectivo tanto *in vitro* como *in vivo*, con variaciones dependiendo de la actividad del fármaco sobre la cepa usada del parásito. Estas variaciones se relacionaron con diferencias en la ribonucleósido fosfotransferasa o nucleósido cinasa y en la habilidad de transportar el fármaco y en la acumulación del nucleótido (Ávila JL y cols., 1987; Lauria-Pires L y cols., 1988; Gallerano RH y cols., 1990).

**2.1.8 Naftoquinonas:** puede ser activo contra tripomastigotes. Derivados de naftoquinoneimina son efectivos contra epimastigotes e infecciones experimentales, afectando la permeabilidad de la membrana citoplásmica del

parásito lo que sugiere que los radicales de oxígeno pueden estar implicados en este proceso (Tarlovsky MN y cols., 1990).

**2.1.9 Agentes quelantes:** algunos agentes quelantes y sus derivados son tan efectivos o superiores al benznidazol. Los compuestos más efectivos incluyen: N,N,N', N'-tetrakis(2-piridilmetil) etilenediamina; dietilamina-N-carboditioato de sodio; piperidina-N-carboditioato de sodio y varios de sus análogos; un número de otros carboditioatos con dos grupos no polares en el nitrógeno y disulfito de tetraetiltiuram, un profármaco de dietilamina-N-carboditioato de sodio, ampliamente usado en el tratamiento del alcoholismo. La introducción de grupos polares iónicos y no iónicos en la molécula quelante generalmente resulta en la pérdida de la actividad tripanocida. Los datos de dosis-respuesta *in vitro* indican que algunos de estos compuestos inhiben los epimastigotes de *T. cruzi* a concentraciones tan bajas como 0.625 µg/mL. Este hecho podría tener gran importancia al impedirse la formación de tripomastigotes a expensas de los epimastigotes. Se propone que la acción de estos compuestos se debe a su habilidad de interferir con el metabolismo de los metales esenciales en sitios intracelulares del epimastigote (hierro, cobre o zinc). El desarrollo de quelantes específicamente diseñados para inhibir selectivamente el metabolismo de metales esenciales de *T. cruzi* debe producir una generación nueva de fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

**2.1.10 Carboxamidas:** son potentes inhibidores de las infecciones producidas por *T. cruzi* en ratón. Los compuestos más activos son el 1-(4-clorobenzil) y 1-(3,4-diclorobenzil) respectivamente, los cuales son aproximadamente siete veces más potentes que el nifurtimox para suprimir los niveles de parasitemia en las infecciones agudas por *T. cruzi* en el ratón.

**2.1.11 Citocalasina B o D:** en células musculares del citoesqueleto de corazón se inhibe la incorporación de los parásitos entre 65 y 75% después de un proceso de pretratamiento de una a tres horas directo a las células cardíacas. Durante el proceso de internación del parásito se observan extensiones de sarcolema dentro de la vacuola citoplásmica, lo que sugiere que el evento citolítico puede involucrar la internación de una membrana propia en las formas metacíclicas de *T. cruzi*. (Antuñano F, 1997).

## **2.2. Productos Naturales**

**2.2.1 Taxol:** sustancia aislada de *Taxus brevifolia* presenta actividad antitumoral, interfiere con la proliferación de epimastigotes, previniendo la división celular completa pero, permite la multiplicación de organelos y esto sugiere que puede comprender la estabilización parcial del citoesqueleto (Baum SG y cols., 1981; Sepúlveda-Boza S, 1996).



**2.2.2 Alcaloides** y derivados de **carboxamida**: grupo heterogéneo de sustancias básicas nitrogenadas fisiológicamente activas y aisladas de hongos, como, el ácido lisérgico en criptógamas vasculares (*Equisetum*, *Lycopodium*, etc.) y en aproximadamente 86 familias de angiospermas.

La familia *Solanaceae* es rica en alcaloides, algunos se han utilizado para el tratamiento de ciertas enfermedades entre las que se encuentra la enfermedad de Chagas, demostrando que interfieren en la proliferación de epimastigotes por alteraciones estructurales y metabólicas y en la supresión de la parasitemia respectivamente (Domínguez XA, 1979; Cavin J y cols., 1987; Furnet A y cols., 1988; Chabala JC y cols., 1991).

**2.2.3 Antioxidantes fenólicos**: frecuentemente utilizados en la industria alimenticia, BHT (2,6-di-etil-butil-4-hidroxitolueno) y BHA (2-mono y 2,6-di-etil-butilato 4-hidroxianisoles), capaces de sustituir al cristal violeta en la esterilización de la sangre usada en transfusiones. Estos compuestos tienen baja toxicidad y presentan actividad antitripanocida (Letelier ME y cols., 1990; Morillo A y cols., 1994; Sepúlveda-Boza S, 1996).

**2.2.4 Ácido gálico**: obtenido de *Allium sativum* oriundo de Asia, actúa sobre epimastigotes, inhibe la respiración del parásito, ocasionando cambios en la motilidad y en la forma, lisis de parásitos y hemólisis (Antuñano F, 1997).

**2.2.5 Hidroquinona, monoterpenos y piquerol A:** obtenidos de *Oxandra espintana* tienen actividad tripanocida contra epimastigotes a concentración de 100 µg/mL (Domínguez XA, 1979; Hocquemiller T y col., 1991).

Es importante señalar que los productos naturales fueron de inicio la fuente de todos los fármacos, por lo que la purificación de sustancias medicinales a partir de plantas fue la preocupación principal de la química medicinal durante el siglo XIX (de Castro SL, 1993; Kinnamon KE y cols., 1998).

Entre los trabajos que se han realizado en compuestos naturales contra miembros de la familia Tripanosomatidae se encuentran los de Fournet A (1995) en Bolivia, quien utilizó dos aceites esenciales extraídos de dos plantas medicinales (*Minthostachys andina* y *Hedomea mandonianum*), de las cuales el primero mostró actividad insecticida del 30 al 50% de mortalidad contra vectores de la enfermedad de Chagas (*Rhodnius neglectus* y *Triatoma infestans*) (Fournet A, 1996).

Sepúlveda y cols. (1995), estudiaron los metabolitos activos de diversos productos naturales como miconidin derivado de la hidroxiquinona y los monoterpenos espintenol y piquerol A, demostrando actividad tripanocida, ya que a concentraciones mínimas inhiben el crecimiento y motilidad de epimastigotes, así como, daño irreversible al DNA y asimismo, sugieren que puedan utilizarse estos productos como quimioprolifáticos en los bancos de sangre (Sepúlveda-Boza S y cols., 1995).

Freiburghaus (1996) en África, estudió extractos de éter, diclorometano, metanol y acuoso de 24 plantas medicinales provenientes de 19 familias, las cuales

presentaron actividad tripanocida contra *Trypanosoma brucei rhodesiense*, agente causal de la Tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño, así como, efecto de citotoxicidad en fibroblastos humanos (Freiburghaus F y cols., 1996).

En Uganda, estudiaron 9 plantas, demostrando actividad tripanocida *in vitro* contra *T. brucei rhodesiense* (Freiburghaus F y cols., 1996) y en Etiopía se estudiaron hojas y raíces de *Moringa stenopetala* contra tripomastigotes de *T. brucei*, *T. cruzi* y contra amastigotes de *L. donovani*, encontrando actividad únicamente contra tripomastigotes a una concentración de 9.2 y 10 µg/mL (Mekonnen Y y cols., 1999).

Se realizó un tamizaje de plantas propias de Guatemala, usando el extracto de 13 de ellas para el tratamiento de infecciones protozoarias. Se demostró actividad contra bacterias y hongos y entre los protozoarios se evaluó *T. cruzi* en sus fases de epimastigotes y tripomastigotes *in vitro* y contra tripomastigotes *in vivo*.

Se encontró que *Neurolaena lobata*, *Salanum amaricanum*, *Acalypha guatemalensis*, *Petiveria alliacea* y *Tridax procumbens* presentaron actividad contra *T. cruzi*. Así mismo se demostró sobre nauplos de *Artemia salina*, que dichos extractos no son tóxicos para las células (Cáceres A y cols., 1998; Berger I y cols., 1998).

Cavin y colaboradores (1987) obtuvieron alcaloides de diversas plantas y realizaron estudios contra epimastigotes de *T. cruzi*. (Cavin J y cols., 1987) .

Goulart (1997) estudió la influencia de los potenciales redox sobre la actividad tripanocida, utilizando quinonas en bioensayos *in vitro* contra tripomastigotes, observando que a un potencial mayor a  $-0.72$  V, las quinonas presentaban

actividad contra el parásito y a potencial menor eran inactivas (Goulart M y cols., 1997).

Marcucci (1997), logró purificar dos compuestos fenólicos: ácido 2(2-difenil-4-hidroxicinámico y el 2(2-dimetil-6-carboxietinilo-2H-1-benzopireno, de una resina llamada Propolis, exudada por diversas plantas brasileñas, presentaron bioactividad en contra de tripomastigotes sanguíneos, expuestos a las resinas durante 24 horas a 4°C (Marcucci M y cols., 1997)

En 1997, Ferreira estudió 72 extractos de plantas brasileñas contra tripomastigotes de *T. cruzi*, a una concentración de 2.5 mg/ml, observando que 42 extractos fueron activos, ya que eliminaron al parásito y 3 extractos fueron medianamente activos, ya que eliminaban al parásito entre 40-80% en 24 horas (Ferreira F y cols., 1997).

Entre la flora brasileña se han obtenido derivados heterocíclicos sintéticos con actividad de quinonas (naftooxazol y naftoimidazol), obtenidos de naftoquinonas de *Tabebuia sp.* con actividad lítica contra tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi*. Estos derivados son candidatos potenciales para pruebas experimentales utilizándolos como agentes que se intercalan en el DNA del parásito repercutiendo en el crecimiento y proliferación del mismo (Pinto AV y cols., 1997).

La actividad de la naftoquinona lapachol y del producto de ciclización del beta-lapachona obtenidos de tres géneros de *Tabebuia* se evaluaron contra tripomastigotes de *T. cruzi*. Los resultados demostraron la tendencia tripanocida del esqueleto imidazólico e indica que podría ser usado como una molécula con

valor potencial para la quimioterapia de la enfermedad de Chagas (Pinto CN y cols., 2000).

Del extracto de acetato de etilo de *Lychnophora granmongolense* (Asteraceae) se obtuvieron tres compuestos con actividad tripanocida: centracerina, goyazensolida y el flavonoide eriodictiol (Grael CF y cols., 2000). Así mismo, la dehidroleudina, una lactona sesquiterpénica aislada de la misma planta, induce cambios morfológicos en tripomastigotes de *T. cruzi*, a concentraciones entre 5 y 10 µg/mL en 4 días y a concentraciones muy elevadas es letal para los parásitos en pocas horas (Brenjio SD y cols., 2000). De plantas de Guatemala como *Neurolaena lobata* también se aislaron lactonas sesquiterpénicas que presentan actividad contra promastigotes de *Leishmania* spp. y tripomastigotes de *T. cruzi* (Berger I y cols., 2001).

Se conocen los efectos antiprotozoarios de diferentes familias de plantas de América Central y América del Sur entre las que se encuentran: Asteraceae, Araceae, Moraceae, Solanaceae, Rhamnaceae, Zingiberaceae, Leguminosae y Sapotaceae. La mayoría de los extractos obtenidos tuvieron efecto sobre *T. cruzi* y *Tricomonas vaginalis*, (Muelas-Serrano S y cols., 2000).

También se han estudiado nueve especies del género Rutaceae entre las que se encuentra *Almeidea coerulea*, *Pilocarpus spicatus* y *Conchocarpus inopinatus*, contra la forma de tripomastigote de *T. cruzi*, se aislaron 32 extractos crudos, de los cuales 8 presentaron significativa actividad tripanocida a una concentración de 2 mg/mL, inhibiendo el crecimiento en un 97.3% (Mafezoli J y cols., 2000).

Además se ha demostrado la actividad tripanocida de 33 extractos de las siguientes plantas: *Eugenia uniflora*, *Acacia artaxacantha*, *Terminalia ivorensis*, *Terminalia superba* y *Alchornea cordifolia* contra la fase de tripomastigotes inhibiendo su crecimiento en un 66.7% a concentraciones entre 13 y 79 µg/mL y ocasionando lisis de los parásitos a concentraciones mayores entre 112 y 137.50 µg/mL ( Adewunmi CO y cols., 2001).

La guanilhidrazona ha demostrado actividad tripanocida. Se han sintetizado 22 derivados de este metabolito aromático y la actividad se ha estudiado *in vivo*, encontrándose inhibición del crecimiento de tripomastigotes de *T. cruzi*. Una segunda generación de guanilhidrazonas, que también presentaron efecto sobre tripomastigotes son en su mayoría derivados metoxilados, los cuales en estudios *in vivo* utilizados a concentraciones de 100 mg/kg/día, demostraron actividad lítica contra tripomastigotes sanguíneos, reduciendo en un 92% los parásitos (Messeder JC y cols., 1995; Messeder JC y cols., 1999).

Muelas-Serrano (2000), realizó un tamizaje con extractos de plantas de América con *T. cruzi* y *Trichomonas vaginalis in vitro*, utilizando cultivos de epimastigotes, demostrando inhibición de la proliferación de *T. cruzi* (Muelas-Serrano S y cols., 2000).

Se estudió la actividad tripanocida de 15 extractos crudos obtenidos de *Penicillium verrucosum*. Se encontró que los extractos metanólico y etanólico fueron los de mayor actividad inhibitoria (35%) (Rojas D de A y cols., 1994, Foumet A y cols., 1997).

Otros metabolitos secundarios reportados con actividad antitripanocida, son los obtenidos de diversas plantas de la familia Bromeliaceae (*Echinodorus grandiflorus*, *Quesnelia quesneliana* y *Nidularium innocentii*), entre los que se encuentran flavonoides, terpenoides y esteroides, los cuales han sido utilizados en la medicina tradicional como antiinflamatorios, antihelmínticos, analgésicos y diuréticos, demostrando actividad tripanocida sobre tripomastigotes de *T. cruzi* en un 100% (Stutz CM y cols., 1999; Gibaldi D y cols., 1999; Soares ROA y cols., 1999).

Derivados oxazolinicos, imidazólicos, pirrolidínicos, piránicos y ciclopentánicos obtenidos de plantas brasileñas del género *Tabebuia*, demostraron actividad inhibitoria contra tripomastigotes (Polaquevitch PF y cols., 1999).

Alquil-lisofosfolípidos (edelfosina, ilmosfosina y metilfosina) utilizados para estudios sobre quimioterapia de cáncer se han probado contra las tres fases evolutivas de *T. cruzi*, los cuales presentaron actividad lítica contra el parásito, al causar daño a la membrana plasmática como se describe en el caso de células tumorales, así mismo, causan otras alteraciones como, inclusiones lipídicas y vacuolización progresiva del citoplasma.

La edelfosina inhibe entre el 40-57% el proceso de metacicloogénesis al inhibir la proliferación y diferenciación del *T. cruzi*, así como, la interiorización a las células del músculo cardíaco (Santa Rita RM y cols., 1999).

Dada la dificultad para demostrar al *T. cruzi* en la fase aguda de la enfermedad de Chagas, tanto por metodología de laboratorio (ELISA) como por parámetros clínicos, se realizó un seguimiento de pacientes en la fase no aguda. Se demostró

la tendencia de los anticuerpos específicos a disminuir o desaparecer después del tratamiento con benznidazol a dosis de 200 mg/kg/día durante 60 días. Ninguno de los pacientes fue negativo al final del tratamiento y solo el 18% de los niveles de anticuerpos disminuyó en la fase indeterminada de la enfermedad y el 9.5% en la fase crónica (Baptista R y cols., 1999).

Se evaluó el compuesto megazol [2-amino-5(1-metil-5-nitro-2-imidazolil)-1,3,4-tiadiazol] con espectro antibacteriano y antiparasitario con actividad mutagénica, contra tripomastigotes en ratones infectados, obteniéndose disminución de la parasitemia y demostrando mayor actividad que el benznidazol (Fernández-Ferreira E y cols., 1999; Albuquerque CN y cols., 1999).

Lignanos obtenidos del extracto hexánico de hojas de *Zanthoxylum naranjillo* (Rutaceae) con actividad contra *Plasmodium falciparum*, se probaron *in vitro* e *in vivo* contra tripomastigotes de *T. cruzi*, de los cuales tres fueron inactivos, tres fueron parcialmente activas (hibalactona, querofilina y cubebina) y el metilpluviatolide fue el más activo contra tripomastigotes sanguíneos, pero inactivo contra amastigotes (Bastos JK y cols., 1999).

Derivados de criptofolione aislados de las frutas maduras de *Cryptocarya alba*, previamente aislado de *C. latifolia* y *C. myrtifolia*, mostraron actividad sobre tripomastigotes de *T. cruzi*, reduciendo su número en un 77% a 250 µg/mL, asimismo se demostró actividad en amastigotes. Tanto el efecto citotóxico como el tripanocida fueron similares, por lo que el compuesto presenta poca selectividad para ambas formas del parásito (Schmeda-Hirschmann y cols., 2001).



De plantas provenientes de Camerún, como la *Reneilmia cincinnata*, se aislaron sesquiterpenos, los cuales fueron probados contra la virulencia de las cuatro especies de *Plasmodium*, utilizando concentraciones entre 1.5 hasta 31.9 µg/mL. Así mismo se aislaron diarilheptanoides de *Aframomum letestuianum*, probados contra *T. brucei* encontrando el mismo efecto que los sesquiterpenos (Tsopmo A, 2002).

Así mismo, se estudiaron plantas originarias de Sudán, China y del Mediterráneo, contra epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* ocasionando inhibición del crecimiento a concentraciones entre 1.7 y 10.7 µg/mL (Schinella GR y cols., 2002; Ali H y cols., 2002, Abe F y cols., 2002).

Se investigaron los extractos polares y no polares de 44 plantas colombianas, como alternativa para quimioterapia contra *Plasmodium falciparum*, *Leishmania* y *T. cruzi*. La actividad antiprotozoaria *in vitro* se determinó usando promastigotes, amastigotes y epimastigotes. Entre las plantas seleccionadas, 15 presentaron buena o muy buena actividad contra dichos parásitos: *Aspidosperma magalocarpon*, *Camptosperma panamense*, *Conobea scoparioides*, *Guarea polymera*, *Guarea guidonia*, *Guatteria amplifolia*, *Huberodendron patinoi*, *Hygrophila guianensis*, *Jacaranda caucana*, *Marila laxiflora*, *Otaba novogranatensis*, *Otaba parviflora*, *Protium amplium*, *Swinglea glutinosa* y *Tabernaemontana obliqua* (Weniger B y cols., 2001).

Entre la medicina tradicional mexicana se conocen 39 plantas cuyos extractos crudos se han estudiado contra *T. cruzi* ocasionando trastornos en la motilidad de

epimastigotes *in vitro*. De éstas, *Aristolochia taliscaana* presenta mejor actividad a una concentración de 25 a 75 µg/mL después de 48 horas (Abe F y cols., 2002).

Otros compuestos estudiados con actividad antitripanocida, fueron seis lactosas sesquiterpénicas: helenalina, mexicanina, 1-11- $\alpha$ 13-acetato de hidrohelenalina, chamisonolida, ivalina e isoalantolactona, aislados de *Arnica* e *Inula*, los cuales presentaron actividad biológica contra tripomastigotes de *T. brucei rhodesiense* y *T. cruzi* (Schmidt TJ y cols., 2001).

Así mismo, se han aislado cinco ácidos triterpénicos obtenidos del extracto de cloruro de metileno de hojas de *Miconia fallax* y *Miconia stenostachya*, plantas brasileñas; los ácidos ursólico, oleico y gipsogénico tuvieron actividad tripanocida contra las formas sanguíneas del *T. cruzi*, demostrando un 91% de lisis. Estos resultados son similares a los obtenidos con otros ácidos diterpénicos donde la presencia de grupos polares fueron importantes por su actividad tripanocida. Otras plantas brasileñas con actividad tripanocida son *Polygala sabulosa* y *Polygala paniculata* (Cunha WR y cols., 2003; Pizzolatti MG y cols., 2003).

De *Dracocephalum komarovi*, planta propia de Uzbekistán, se han aislado nuevos icetexano diterpénico (cicloculterona, komaroviquinona, 20-diterpen norabietan y dracocefalona). El komaroviquinona presentó *in vitro* fuerte actividad tripanocida contra epimastigotes de *T. cruzi* (Uchiyama N y cols., 2003).

Así mismo, se han considerado compuestos alquilantes (clorambucil) como alternativa para el tratamiento de la fase aguda experimental de la enfermedad de Chagas, los cuales previenen la división celular del parásito al inhibir la síntesis

enzimática, reduciendo el crecimiento y la viabilidad de las tres fases evolutivas del parásito (Silva CF y cols., 1999).

Dentro de las actividades del Programa de Grupos de la Biodiversidad de la Cooperativa Internacional de Panamá, se reporta el aislamiento de cinco nuevos casana diterpénico, obtenidos de las hojas de *Myrospermum frutencens*. Dos de ellos, presentaron mayor actividad contra tripomastigotes y 2 más presentaron mayor actividad contra las formas intracelulares del *T. cruzi* (Torres-Mendoza D y cols., 2003).

Es importante señalar que en el caso de compuestos aislados de plantas y/o derivados de estos, únicamente ha sido evaluada su actividad contra el parásito, pero no han sido utilizados en la clínica.

En la región Maya del estado de Yucatán, se encuentra una rica variedad de plantas medicinales utilizadas por los indígenas, entre las que se encuentra *Senna villosa*, la cual pertenece a la subfamilia *Caesalpinoideae*, se le conoce también como *Cassia villosa*, y los nombres populares maya son: Salché o Saalch'e, Box Saalch'e, Tsalche, Tuy'ache y Zalché, se utiliza en la medicina tradicional para secar granos, ayudar a la cicatrización, curar ronchas, corrección de la menstruación y como laxante (Pech G, 1996).

Recientemente se demostraron propiedades antifúngicas, contra bacterias Gram positivas y contra *Trypanosoma cruzi*, realizándose un análisis previo del extracto diclorometánico en ensayos *in vitro* con la forma de epimastigote del parásito, encontrando que presenta una actividad importante contra éste flagelado,

actuando como un parasitostático, ya que no se observó la eliminación del *T. cruzi*, sino que al parecer afecta su replicación (Fajardo O, 1998).

Con base en estos resultados se propone éste trabajo con la finalidad de evaluar los compuestos bioactivos obtenidos de *Senna villosa*, determinar las concentraciones adecuadas para su acción *in vitro*, así como, evaluar su efectividad y realizar los primeros ensayos con el fin de determinar el mecanismo de acción contra *T. cruzi*.

## 2.3 Planta

### 2.3.1 *Senna villosa*



Figura 6. *Senna villosa*, conocida de manera popular en la población maya como Saalché.

Los géneros *Senna* pertenecen a la subfamilia Caesalpinoideae y comprende árboles o arbustos con hojas pinadas o bipinnadas con flores zigomorfas.

Es un arbusto de 1 a 3 m de alto, estrellado-tormentoso, de ramas expandidas, la corteza es de color café con tonalidades verdosas, sus hojas son de color verde, acuminadas de bordes enteros y dispuestas en forma alterna con 3-4 pares de hojuelas largamente ovaladas de 2.5 a 6.5 cm. Las flores son hermafroditas de color amarillo dispuestas en racimos terminales, con cáliz tubuloso, corola acampanada, pétalos con estivación imbricada y estambres libres. El fruto es una vaina de 4 a 5 mm de ancho, carnosa, pubescente de una sola cavidad, con estrangulaciones entre las semillas que carecen de endospermos, con cotiledones delgados y membranosos (Pech G, 1996; Aguilar J, 1990).

Esta planta se encuentra en Chiapas, sureste de Oaxaca, Puebla, Baja California y el sureste de México desde el centro de Veracruz hasta Yucatán.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la actividad *in vitro* de los diferentes extractos de las hojas de *Senna villosa*, contra epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Obtener los extractos clorofórmico, acuoso y metanólico de hojas de *Senna villosa*.
- Determinar la actividad *in vitro* de los extractos obtenidos de las hojas de *Senna villosa* en epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
- Aislar el compuesto de *Senna villosa* con actividad contra epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
- Determinar la actividad *in vitro* de los compuestos aislados de *S. villosa* contra tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi*.
- Determinar *in vitro* la curva dosis-efecto de los compuestos aislados de *Senna villosa* contra tripomastigotes y amastigotes *T. cruzi*.
- Determinar la regresión del efecto de los compuestos aislados de *S. villosa* contra tripomastigotes y amastigotes *T. cruzi*.
- Determinar la dosis letal media (DL50) de los compuestos aislados de *Senna villosa* contra tripomastigotes y amastigotes *T. cruzi*.
- Determinar *in situ* el efecto de los compuestos aislados de *S. villosa* contra tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi*.



# HIPÓTESIS

La planta *Senna villosa* tiene actividad antiprotozoaria *in vitro* por lo tanto tiene compuestos que inhiben los tres estadios evolutivos de *Trypanosoma cruzi*.

# **MATERIAL Y METODOS**

## **Material biológico**

### **Parásitos**

Se utilizó la cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, aislada de humano y mantenida mediante pases sucesivos en el medio de cultivo de LIT (infusión de hígado y triptosa), enriquecido con 10% de suero fetal bovino (SFB) los cultivos se mantuvieron a 28°C.

### **Material biológico**

Las hojas de *Senna villosa* fueron recolectadas en el municipio de Molas, en el estado de Yucatán, durante los meses de julio a septiembre de 2002 y fue autenticada por el Dr. Salvador Flores Guido. Un espécimen se depositó en el herbario de la Facultad de Biología de la Universidad Autónoma de Yucatán (10,284). Las hojas de la planta se secaron a la sombra y posteriormente se molieron.

## **Material y Métodos**

### **Preparación de los extractos**

En un matraz balón de 12 L provisto de un refrigerante en posición de reflujo, se colocaron 1kg de las hojas secas y molidas y 5 L de disolvente (cloroformo, metanol o agua), la mezcla se calentó a temperatura de reflujo durante 4 horas, se dejó enfriar y posteriormente se filtró y el cloroformo o metanol se eliminó en un evaporador rotatorio a presión reducida y el agua se liofilizó.

### **Preparación de los extractos para los bioensayos**

En una solución de buffer de fosfatos (PBS) pH 7.6, se disolvió el extracto clorofórmico, metanólico o acuoso, después se le adicionó ácido N-2-hidroxietil piperazina-N'-etanosulfónico 1M (HEPES), hasta neutralizar la solución, posteriormente se centrifugó por 5 min a 14,000 rpm, se tomó la fracción soluble, que se esterilizó por filtración con membranas millipore de 0.22  $\mu\text{m}$  y finalmente se conservó en congelación hasta su uso.

El disolvente empleado (PBS alcalinizado y neutralizado con HEPES) se esterilizó de la misma forma que la fracción soluble.

## Separación del extracto clorofórmico

El extracto clorofórmico (30 gr), se separó por cromatografía en columna empacada con sílica gel 60 malla 70-230 (Merck). La columna se eluyó con hexano, incrementando la polaridad con acetato de etilo. Se colectaron fracciones de 150 mL, a las cuales se les eliminó el disolvente en un evaporador rotatorio a presión reducida. Se obtuvieron 28 fracciones, las cuales se juntaron cuando presentaron el mismo patrón en cromatografía de placa fina, para la cual se usaron cromatofolios AL TLC Merck, de sílica gel F<sub>254</sub> de 0.25 mm de espesor, con indicador fluorescente. Los cromatogramas se observaron con una lámpara de luz UV de onda corta (254 nm), se obtuvieron finalmente 10 fracciones.

La actividad de las fracciones se obtuvo igualmente por bioensayos con curvas de crecimiento tanto en epimastigotes como en tripomastigotes a las concentraciones: 1.65, 3.3 y 6.6 µg/mL.

La fracción que presentó mayor efecto inhibitorio se separó por una segunda cromatografía en columna, usando cloroformo como eluyente, incrementando la polaridad con acetato de etilo y se cristalizó de cloroformo (p.f 72-74°C) para obtener un sólido blanco denominado sólido A y se volvió a determinar su efecto tripanocida a concentraciones de: 1.65, 3.3 y 6.6 µg/mL.

El sólido blanco se separó por una tercera cromatografía en columna empacada con sílica gel 60, la cual se eluyó con cloroformo, incrementando la polaridad con acetato de etilo, obteniéndose 7 fracciones, las cuales se evaporaron a sequedad a Baño de María. Las fracciones 1, 2 y 4 se cristalizaron de cloroformo para

obtener así, un sólido blanco, al cual se le denominó sólido B con p.f 72-74°C que se preparó a las concentraciones ya mencionadas para realizar los bioensayos.

Una muestra del sólido blanco se analizó por cromatografía de gases en un cromatógrafo Varian Modelo 3800 con una columna de Megaboro DBI de 30 m usando N<sub>2</sub> como gas acarreador y un detector de ionización de flama FID.

Con el fin de conocer la composición del sólido blanco, se analizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

## Pruebas fitoquímicas

1.- Se realizaron las siguientes pruebas: 1.- método rápido de Webb para detección de alcaloides. Se mezcló 0.1 a 0.5 g del extracto clorofórmico de *Senna villosa* con HCl al 5% para formar una suspensión de 2 mL de filtrado. La suspensión obtenida se vertió en un matraz Erlenmeyer y se colocó a baño de María a 80°C. La mezcla se calentó durante 4 horas moviéndola periódicamente, después se dejó enfriar y se filtró. Se prepararon alícuotas de 0.2 mL con volúmenes de 0.1 mL de reactivos de Mayer, Wagner y Dragendorff. Los resultados se registraron como abundante (+++), moderado (++) , escaso (+), dudoso (+) y negativo (-) (Domínguez XA, 1979).

2.- Arrastre de vapor para detección de aceites esenciales. En un matraz balón de 5 L, se colocaron 500 g de las hojas secas y molidas y 1.5 L de agua, la mezcla se

destiló hasta que el agua que se recolectó no tuvo olor o hasta que éste haya disminuido. El agua que se recolectó se extrajo con cloroformo y el disolvente se eliminó en un evaporador rotatorio a presión reducida.

3.- Prueba de Shinoda para detección de flavonoides. El extracto clorofórmico de *Senna villosa* se mezcló con magnesio y unas gotitas de ácido clorhídrico concentrado, observándose de inmediato una coloración anaranjada, roja, roja azulosa o violeta si están presentes flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas. Ocasionalmente los flavonoles (incluyendo sus 3-éteres y glicósidos), las flavononas y flavononoles dan coloración verde o azul.

Prueba de Marini-Bettólo para detección de flavonoides. El extracto se mezcló con pentacloruro de antimonio en tetracloruro de carbono produciendo colores rojo oscuro o violeta para flavonoides y amarillo o naranja para flavonas.

4.- Prueba de Salkowski para detección de esteroides. Similar a la prueba de Lieberman-Buchard, 1-2 mg del extracto clorofórmico se mezcló en 1 mL de cloroformo, se adicionó 1 mL de ácido sulfúrico, produciendo coloración amarilla o roja.

5.- Prueba de Lieberman-Buchard para detección de terpenos. Se mezcló 1-2 mg del extracto clorofórmico con 1 mL de ácido acético y 1 mL de cloroformo, se enfrió a 0°C y se añadió una gota de ácido sulfúrico. Si aparecen colores azul, verde, rojo o anaranjado, la prueba se considera positiva.

6.- Pruebas para detección de quinonas, se mezcló el extracto clorofórmico con ácido sulfúrico para obtener colores rojo o púrpura.

Prueba para detección de cumarinas y lactonas se mezcló el extracto clorofórmico con hidróxido de sodio para obtener color púrpura (Dominguez XA, 1979).

## **Bioensayo antiparasitario**

En una solución de buffer de fosfatos (PBS) pH 7.6, se disolvió cada uno de los extractos obtenidos de *Senna villosa*, ya disuelto, se le adicionó 1M de HEPES, hasta neutralizar la solución, posteriormente se centrifugó por 5 minutos a 14,000 rpm, se tomó la fracción soluble, la cual se esterilizó por filtración con membranas millipore de 0.22  $\mu\text{m}$  y finalmente se conservó en congelación.

El disolvente empleado (PBS alcalinizado y neutralizado con HEPES) se esterilizó de la misma forma que la fracción soluble como control positivo.

Se usó una solución de violeta de genciana a una concentración de 17.5 mg/mL, se centrifugó por 5 minutos a 14,000 r.p.m., tomándose la fracción soluble, para después esterilizarla por filtración con membranas millipore de 0.22  $\mu\text{m}$ , y se conservó en congelación.

De la misma manera se preparó alopurinol a una concentración de 50 mg/mL y como control negativo, se utilizó medio de LIT (infusión de hígado y triptosa).

Con el fin de medir el efecto de cada extracto sobre el crecimiento del parásito, se realizaron tres curvas de crecimiento por cada extracto de la siguiente manera:

## Curvas de crecimiento

Para todas las curvas de crecimiento se usaron los mismos controles negativos y positivos.

El bioensayo se realizó en medio líquido de LIT suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calentamiento a 56°C por 30 minutos (IFBS) y sin la hemina. En frascos para cultivo celular con 3 ml del medio LIT, se inocularon con  $5 \times 10^6$  parásitos de la cepa Y de *Trypanosoma cruzi* en el estadio de epimastigote y 50  $\mu\text{L}$  de los extractos o compuestos a estudiar, todos los frascos se incubaron a 28°C, durante 10 días, cada 24 hrs se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  del extracto o compuesto al frasco que le corresponde, al control negativo solo se le adicionó medio de LIT sin suero fetal bovino y hemina. Cada 24 horas se contó el número de parásitos viables, de la siguiente manera: se tomaron 10  $\mu\text{L}$ , de cada frasco y se les adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de azul de tripano al 0.4% y 80  $\mu\text{L}$  de formalina al 1%, de esta mezcla se tomaron 10  $\mu\text{L}$ , los cuales se depositaron en la cámara de Neubauer y se contaron cuatro cuadros en forma diagonal de cada cuadrante para la cuenta de leucocitos. El número de parásitos contados se multiplicó por 100,000 para obtener el número total de parásitos vivos por mL. El conteo se realizó en el objetivo de 40x.

Los bioensayos se realizaron por triplicado, con cada uno de los extractos, las fracciones obtenidas por cromatografía y el sólido blanco obtenido al final.



### **Transformación de epimastigotes a tripomastigotes**

Los epimastigotes se mantuvieron en medio de LIT y se cosecharon al final de la fase exponencial de crecimiento, por centrifugación a 3000 rpm por 10 minutos y lavados 3 veces bajo las mismas condiciones en buffer de fosfatos a pH 7.6 y finalmente se añadió medio para los ensayos.

Los epimastigotes fueron inoculados en frascos (Nunc) de 75 cm<sup>3</sup> conteniendo 3 mL de medio de LIT suplementado con 10% de IFBS alcanzando una concentración final de  $5 \times 10^6$  parásitos/mL (control).

Se adicionó a cada tubo 100 mEq de NaCl/L y se incubaron a 28°C durante 12 días (Osuna A y cols., 1990).

### **Transformación de tripomastigotes a amastigotes**

Las formas metacíclicas obtenidas con la técnica descrita previamente con una densidad de  $5 \times 10^6$  parásitos/mL, fueron transferidos a 10 mL de medio esencial mínimo (MEM Gibco) suplementado con 10% de IFBS y ajustado a pH 7.6 .

La viabilidad fue determinada por microscopía con azul tripano a una concentración de 0.4%.

El número de parásitos fue determinado en una cámara de Neubauer, después de remover los parásitos por centrifugación a 1000 rpm por 10 minutos.

## **Aislamiento de tripomastigotes y amastigotes de células Vero**

Las células Vero se incubaron a 37°C con atmósfera de aire con 5% de CO<sub>2</sub> en frascos (Nunc) de 75 cm<sup>3</sup>, usando 10 mL de medio (MEM Gibco) suplementado con 10% de IFBS y ajustado a pH 7.6 a una densidad de 4 x 10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup>.

Las células fueron infectadas con tripomastigotes, cuando se hicieron confluentes formando una monocapa. Se prepararon microplacas colocando 100 µL de tripomastigotes en cada pozo a una relación parásito/célula de 5:1, con un tiempo de infección de 48 y 72 horas.

Las placas se revisaron con un microscopio invertido.

El cultivo de monocapas de células Vero se incubó a 37°C durante 4 o 5 días. El sobrenadante fue colectado cada 24 horas y centrifugado a 500 rpm por 5 minutos. Los tripomastigotes contenidos en la pastilla, fueron resuspendidos en medio fresco.

La citotoxicidad de los extractos y las fracciones obtenidas de la planta, fue determinada en las células Vero con 95% de viabilidad, usando la prueba de exclusión del colorante utilizando azul tripano.

### **Dosis-efecto (DL<sub>50</sub>)**

La cepa Y de *T. cruzi* se incubó en 20 mL de medio Diamond suplementado con 2.5% de SFB a 28°C durante 3 días.

Se utilizaron frascos del cultivo que se prepararon de la misma manera como se describe en las curvas de crecimiento y se les adicionó 1.65, 3.3 o 6.6  $\mu\text{g/ml}$  con un incremento de la concentración (13.2, 19.8, 26.4, 33 y 39.6, 79.2, 118.2, 158.4 y 198.0  $\mu\text{g/mL}$ ) del extracto clorofórmico de *S. villosa* o del sólido aislado. Como control se utilizó solamente el medio de cultivo. Los frascos fueron incubadas a 28°C durante 1 hora.

Los parásitos se cosecharon por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos y se lavaron 2 veces con 3 mL de PBS. Las pastillas fueron resuspendidas en 3 mL de PBS y los parásitos se contaron en la cámara de Neubauer. El conteo se realizó diariamente con la concentración correspondiente para eliminar el 50% de los parásitos, expresado como  $DL_{50}$ .

### **Regresión del efecto**

La cepa Y de *T. cruzi* se incubó en 80 mL de medio de Diamond suplementado con 2.5% de SFB a 28°C durante 4 días, posteriormente se tomaron 10 mL del cultivo y se centrifugó, enseguida se lavó 2 veces con PBS y la pastilla se resuspendió en 3 mL de PBS estéril.

Una muestra de parásitos a una concentración de  $10^6$  fueron incubados con 0.66, 0.66 y 6.6  $\mu\text{g/mL}$  del extracto de la planta. El control fue una muestra incubada en PBS sin el extracto, durante 24 y 48 horas.

## Ensayo de citotoxicidad

La cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, aislada de humano se mantuvo mediante pases sucesivos en el medio de cultivo de LIT enriquecido con suero fetal bovino a 28°C. Los epimastigotes se cosecharon al final de la fase exponencial por centrifugación a 3000 x g durante 10 minutos y se lavaron 3 veces en solución salina de fosfatos a pH 7.2, bajo las mismas condiciones y finalmente fueron inoculados en frascos de cultivo de 75 cm<sup>3</sup> (Nunc) conteniendo 2 mL de medio Grace, adicionado con 100 mEq/L de NaCl suplementado con 10% de suero fetal bovino y mantenidos a 28°C por 12 días, quedando al final una concentración de parásitos de 5 x 10<sup>6</sup> (Osuna A y col., 1990).

Las células Vero fueron incubadas a 37°C en frascos de cultivo de 75 cm<sup>3</sup> (Nunc), en medio Grace modificado suplementado con 10% de suero fetal bovino y ajustado a pH 7.2, en atmósfera de aire con 5% de CO<sub>2</sub>.

Las células se sembraron en microplacas Costa de 96 pozos a una concentración de 2 x 10<sup>5</sup>/mL en un volumen final de 100 µL, incubadas durante 24 horas a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%. Los tripomastigotes fueron adicionados a una relación 5:1 parásito-célula e incubados nuevamente a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas y posteriormente fueron expuestas a los extractos y fracciones de *Senna villosa* a

las concentraciones y condiciones utilizadas en los experimentos anteriores, por 48 horas antes de teñirlas y analizarlas al microscopio.

El grado de viabilidad de células y parásitos se determinó con la prueba de exclusión del colorante con azul de tripano, por medio del conteo de 100 células y/o parásitos (Schmeda-Hirschmann y cols., 2001).

### **Análisis de datos.-**

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), para los bioensayos.

En el caso de los demás experimentos se utilizó la prueba estadística de  $t$  de Student (Hoel P, 1984; Levin J, 1979).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En la búsqueda de nuevos agentes quimiopreventivos y quimioterapéuticos contra la enfermedad de Chagas, han sido diversas las sustancias naturales obtenidas de plantas utilizadas en la medicina tradicional de diversos países.

Éstas sustancias contienen un amplio rango de tipos de estructuras que han sido probadas contra cultivos de *T. cruzi* o mamíferos infectados (Sepúlveda y cols., 1995).

En el presente estudio, se determinó la actividad inhibitoria de *Senna villosa* sobre el crecimiento de epimastigotes, tripomastigotes y amastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Los bioensayos se realizaron con curvas de crecimiento para cada extracto. De los 3 extractos obtenidos se encontró que tanto el extracto metanólico como el clorofórmico en concentraciones de 1.65 µg/mL, 3.3 µg/mL y 6.6 µg/mL (Figuras 7, 8 y 9) inhibieron el crecimiento del parásito, sin presentar diferencias significativas entre uno y otro ( $p \leq 0.05$ ). En la Figura 7, se observa en epimastigotes, la actividad inhibitoria de los extractos clorofórmico y metanólico a una concentración de 1.65 µg/mL, en comparación con el control negativo. En los cultivos con el extracto metanólico, el crecimiento fue discreto hasta el 5º día con posterior inhibición del 60% hasta el 10º día. Siendo esta inhibición más marcada

en los cultivos con el extracto clorofórmico (70% de inhibición). El efecto del extracto acuoso a estas concentraciones fue mucho menor a una concentración de 1.65  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se obtuvo crecimiento hasta el 4<sup>o</sup> día y a partir del 5<sup>o</sup> empezó a declinar manteniéndose en fase estacionaria con una inhibición del 45%. En el caso del control positivo con violeta de genciana, se observó un pico de crecimiento máximo al 4<sup>o</sup> día.

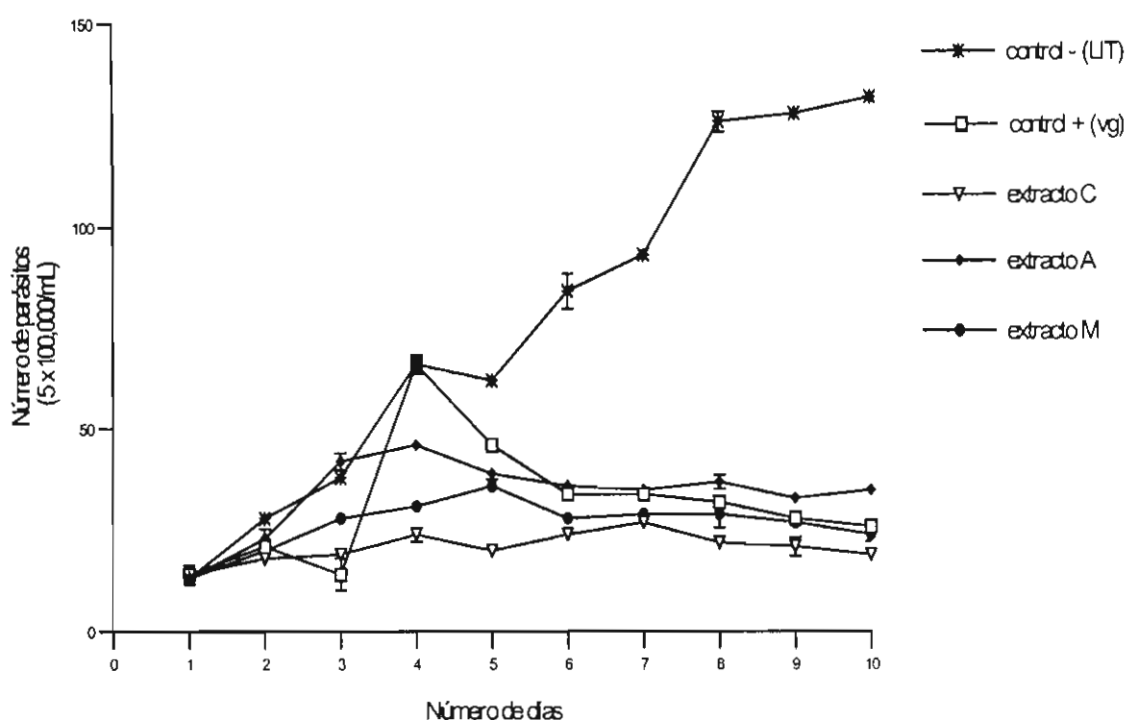


Figura 7. Curva de crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con los extractos metanólico, clorofórmico y acuoso de *Senna villosa* en una concentración de 1.65  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Cuando se aumenta la concentración a 6.6 µg/mL (Figura 9), no hay diferencias significativas entre los tres extractos y el control positivo. Es importante señalar que con el extracto acuoso durante los primeros cuatro días hubo aumento del crecimiento por lo que se observó el cultivo en fase exponencial de epimastigotes, a diferencia de los otros dos extractos, en los cuales a partir del quinto día inician su efecto competitivo, lo cual se observa en la fase de declinación de la curva, con franca disminución del crecimiento del parásito llegando al 80% el décimo día. Se encontró diferencia significativa entre el extracto acuoso y los extractos metanólico y clorofórmico ( $p \leq 0.05$ ), sin embargo es importante señalar que entre los dos últimos extractos no hubo diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) y que la actividad biológica demostrada del extracto clorofórmico fue similar a la obtenida con la violeta de genciana.



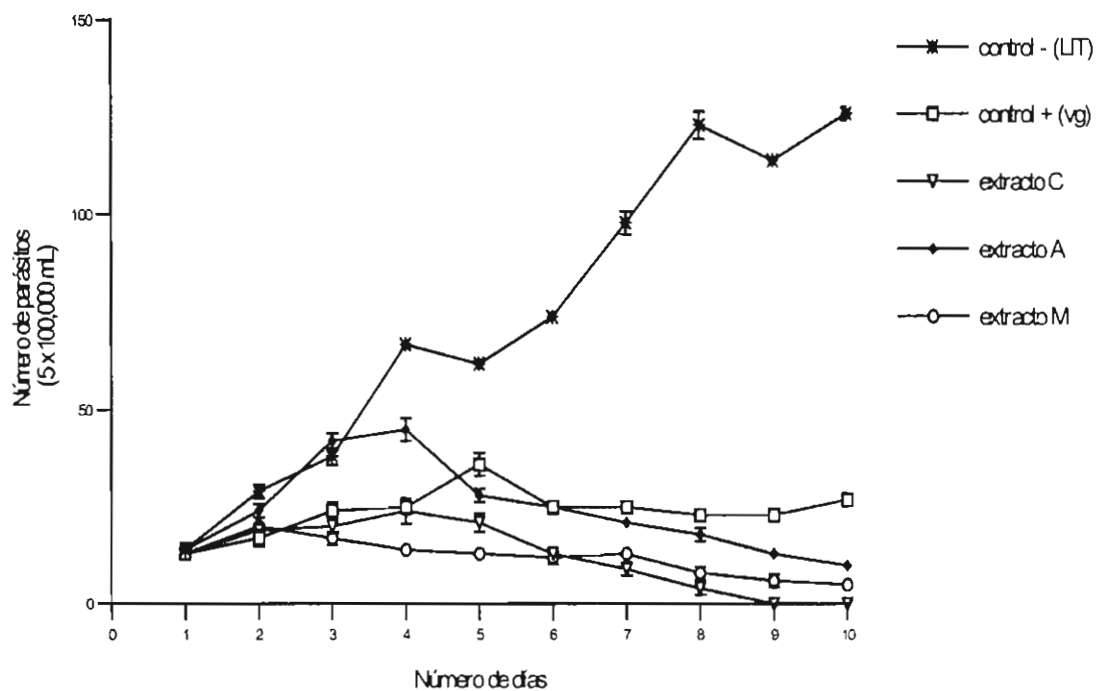


Figura 9. Curva de crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso de *Senna villosa* a una concentración de 6.6 µg/mL.

Con los extractos clorofórmico y metanólico en concentraciones de 1.65 µg/mL (Figura 10), se observó inhibición del crecimiento de tripomastigotes al 4º día y una disminución de hasta 60% del crecimiento de los tripomastigotes al décimo día de la aplicación de los extractos. La inhibición producida por ambos extractos fue similar y el control positivo con violeta de genciana, sin embargo, la inhibición fue menor.

Respecto al extracto acuoso a partir del quinto día presentó inhibición del crecimiento del 40%.

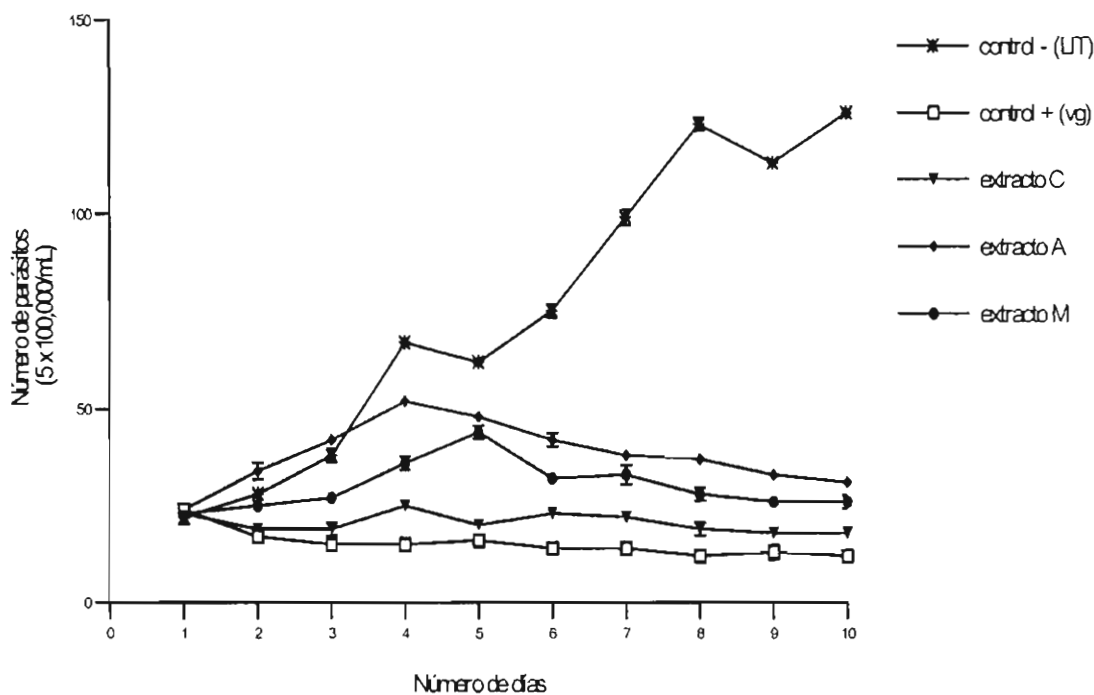


Figura 10. Curva de crecimiento de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* con los extractos metanólico, clorofórmico y acuoso de *Senna villosa* a una concentración de 1.65 µg/mL.

A una concentración de 3.3 µg/mL de los extractos metanólico y clorofórmico se observó una actividad inhibitoria del 72% de los tripomastigotes (Figura. 11) comparados con el control negativo, el cual presentó un crecimiento continuo de los parásitos. Los resultados obtenidos con estos dos extractos no mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). En cambio los cultivos con el extracto acuoso

presentaron crecimiento hasta el 4º día y a partir del 5º día disminuyeron en un 40%, con respecto al control positivo violeta de genciana.

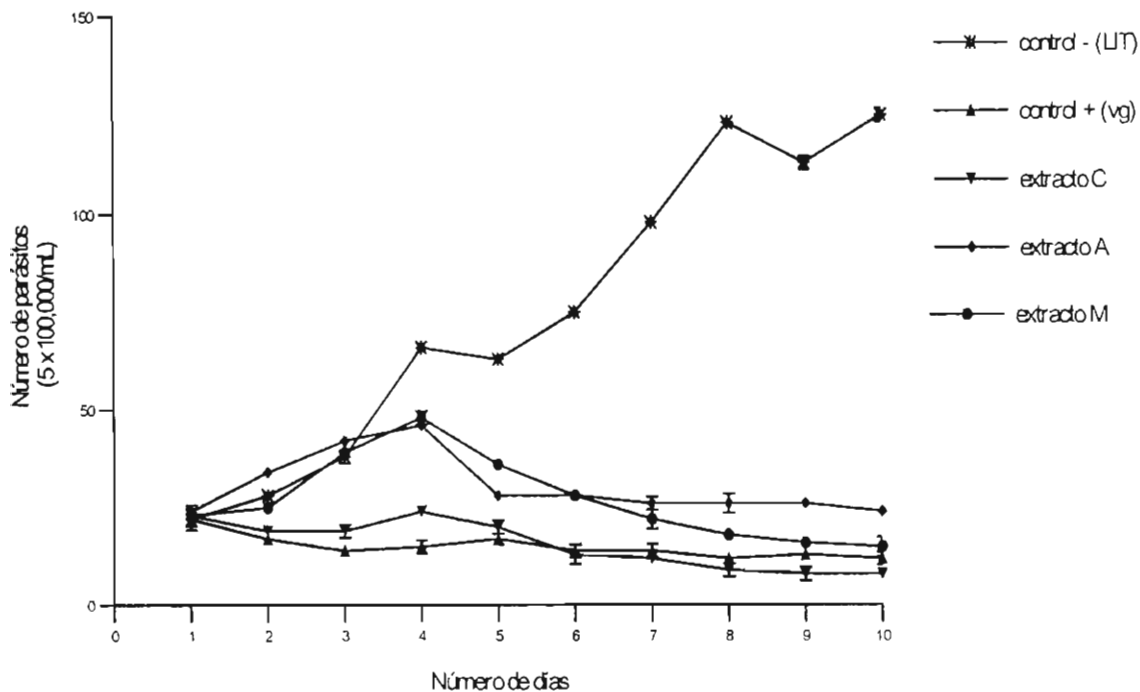


Figura 11. Curva de crecimiento de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* con los extractos metanólico, clorofórmico y acuoso de *Senna villosa* a una concentración de 3.3 µg/mL.

La Figura 12, muestra la curva de crecimiento de tripomastigotes, con los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso a concentraciones de 6.6 µg/mL, los controles negativo y positivo con violeta de genciana, se observa que la inhibición fue de un 100% en los cultivos con el extracto clorofórmico y de 92% con el

extracto metanólico, por lo que no se encontraron diferencias significativas entre los dos extractos y el control positivo ( $p \leq 0.05$ ), sin embargo, con el extracto acuoso, la disminución del crecimiento del parásito, fue menor ( $p \leq 0.05$ ).

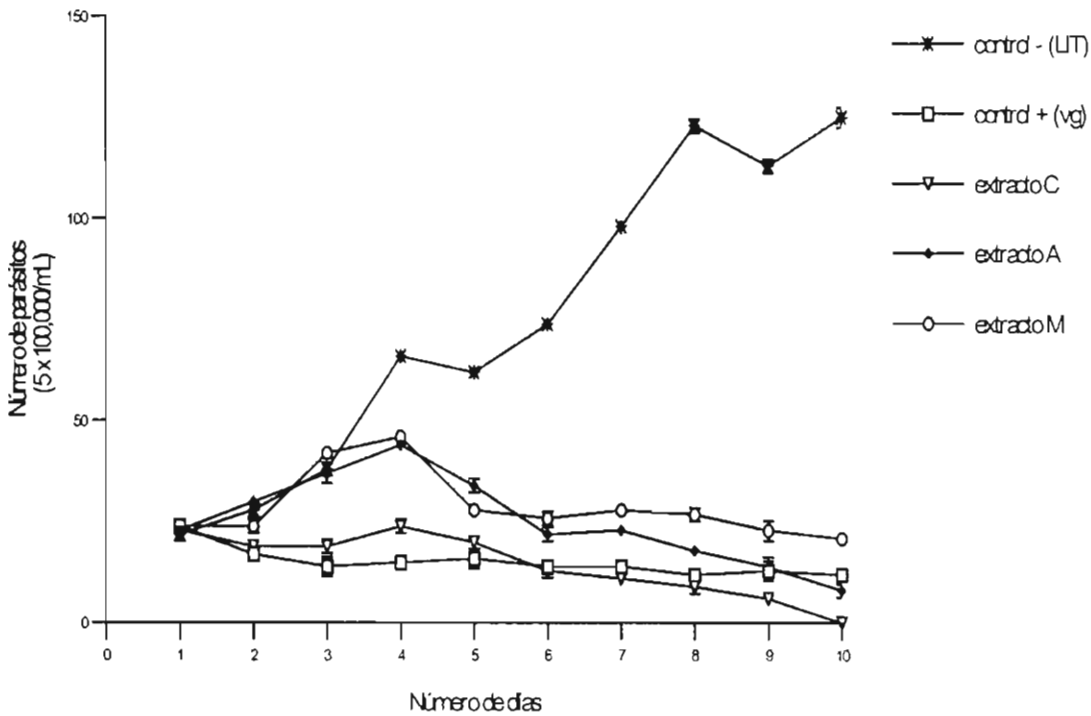


Figura 12. Curva de crecimiento de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* con los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso de *Senna villosa* a una concentración de 6.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

De manera general se puede decir que el efecto de los tres extractos inicia al quinto día de la aplicación a las concentraciones utilizadas: (1.65, 3.3 y 6.6

$\mu\text{g/mL}$ ), observándose actividad inhibitoria importante con los extractos clorofórmico y metanólico y mientras que el extracto acuoso ejerce una inhibición menor (20, 40 y 40% a las concentraciones respectivas) ( $p \leq 0.05$ ).

Dado que no hubo diferencia significativa entre los extractos metanólico y clorofórmico se decidió utilizar el extracto clorofórmico para continuar con el aislamiento y la purificación del o de los compuestos activos de las hojas de *Senna villosa*.

Asimismo, se prepararon 3 diluciones de dicho extracto: 0.33, 0.033 y 0.0033  $\mu\text{g/mL}$  para obtener la concentración mínima inhibitoria contra epimastigotes y tripomastigotes, observándose que en ambas fases del parásito hubo una disminución del crecimiento de 50% con la dilución de 0.33  $\mu\text{g/mL}$ .

El análisis fitoquímico del extracto clorofórmico, mostró la presencia de flavononas, terpenos y esteroides.

La separación del extracto clorofórmico por cromatografía en columna dió como resultado 28 fracciones, las que tuvieron un mismo patrón en cromatografía en placa fina se juntaron, obteniéndose finalmente 10 fracciones. Se realizaron los bioensayos con curvas de crecimiento tanto en epimastigotes como en tripomastigotes a las concentraciones: 1.65, 3.3 y 6.6  $\mu\text{g/mL}$ , encontrando mayor efecto inhibitorio del crecimiento del parásito, en la fracción 5 y esta fracción no presenta diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ), en comparación con el control positivo (violeta de genciana) (Figuras 13, 14 y 15).

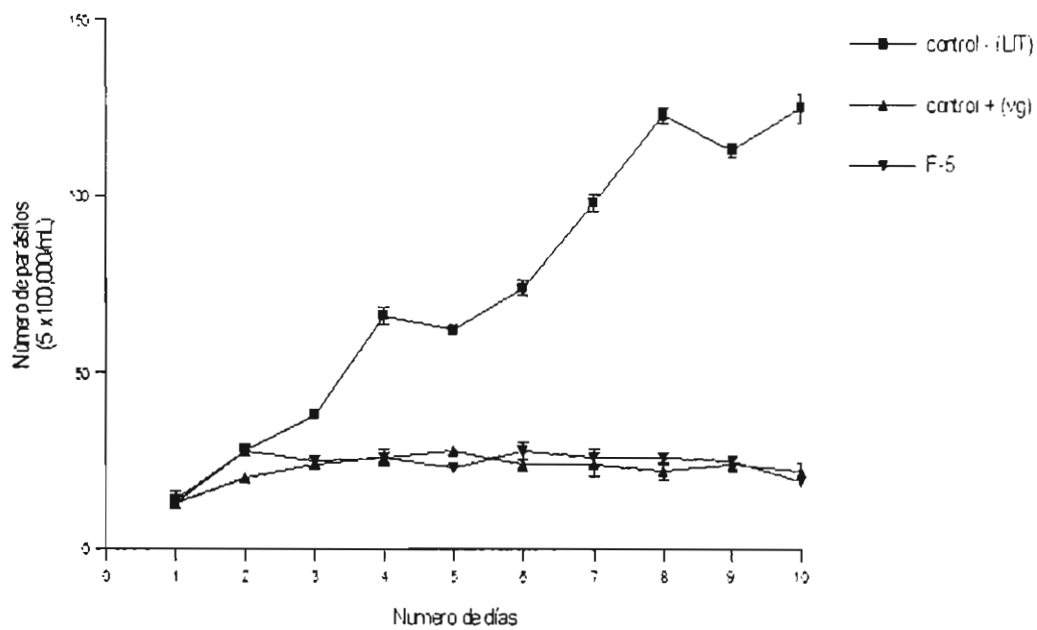


Figura 13. Curva de crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con la fracción 5 obtenida del extracto clorofórmico de *Senna villosa* a una concentración de 1.65 µg/mL.

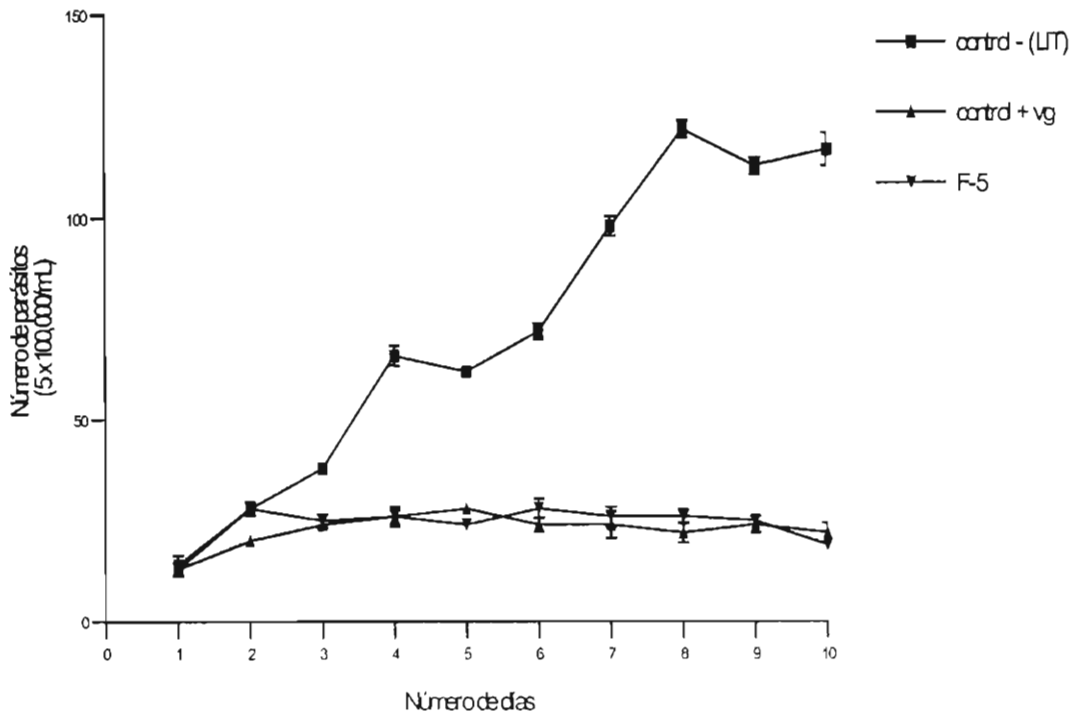


Figura 14. Curva de crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con la fracción 5 obtenida del extracto clorofórmico de *Senna villosa* a una concentración de 3.3 µg/mL.

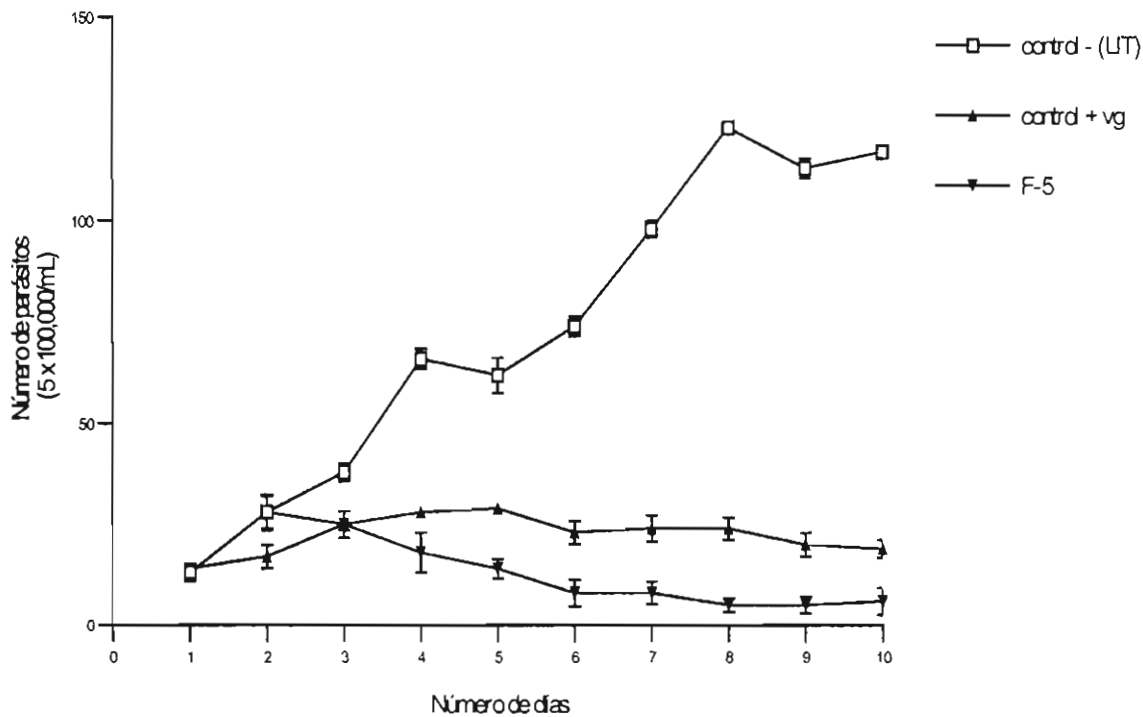


Figura 15. Curva de crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con la fracción 5 obtenida del extracto clorofórmico de *Senna villosa* a una concentración de 6.6  $\mu\text{g/mL}$ .

A una concentración de 1.65  $\mu\text{g/mL}$ , se observa que con la fracción 5, hay un menor crecimiento del parásito (tripomastigotes), en la (Figura. 16) se observa una inhibición de 60% del crecimiento que es el mismo que el obtenido con el extracto clorofórmico a esta concentración, la inhibición del parásito en tripomastigotes a una concentración de 3.3  $\mu\text{g/mL}$  es de 72% (Figura. 17) y a una concentración de 6.6  $\mu\text{g/mL}$ , es del 82% (Figura. 18) similar a lo observado con la fase de epimastigotes.



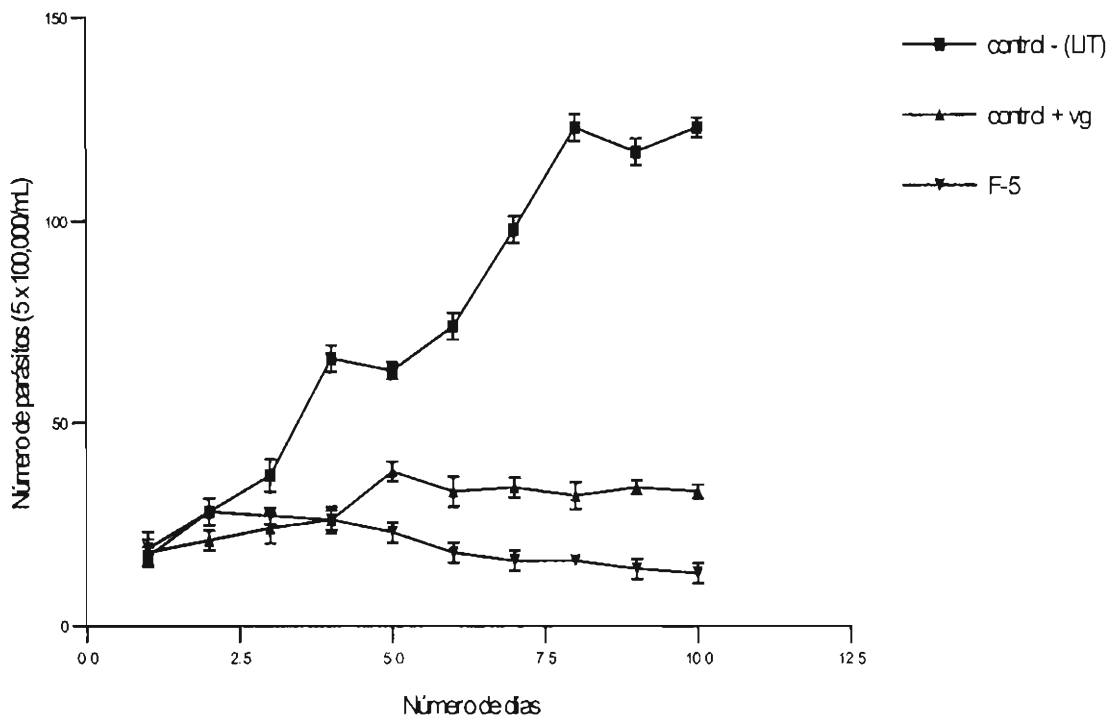


Figura 16. Curva de crecimiento de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* con la fracción 5 obtenida del extracto clorofórmico de *Senna villosa* a una concentración de 1.65  $\mu\text{g/mL}$ .

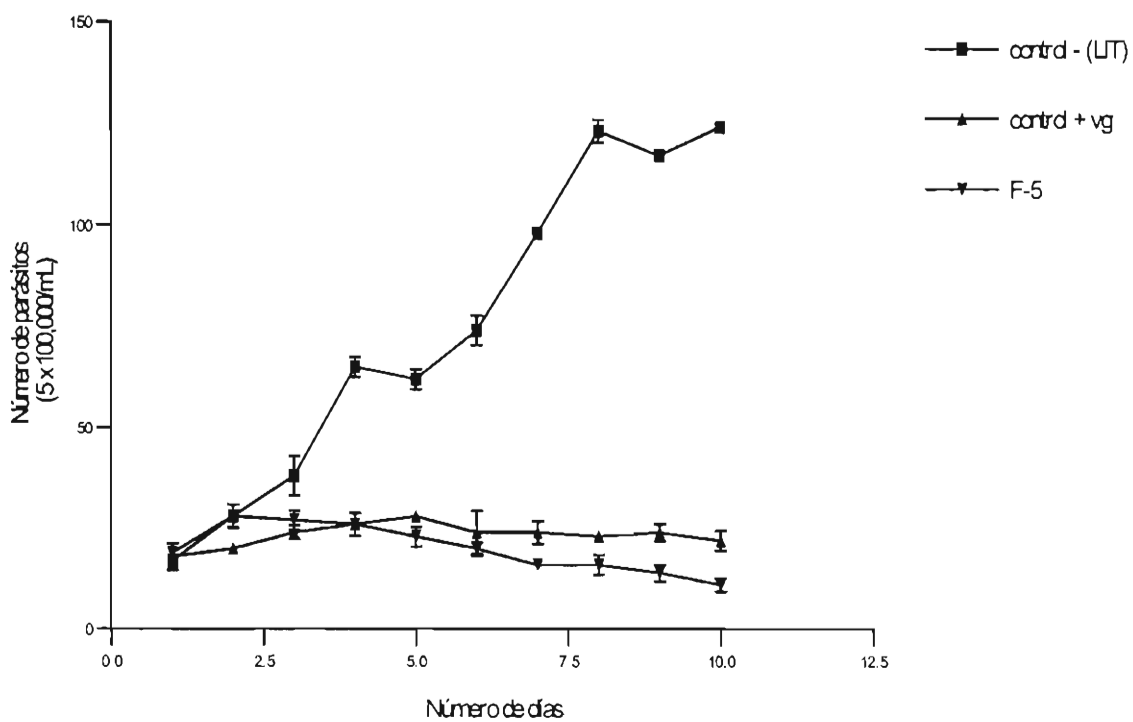


Figura 17. Curva de crecimiento de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* con la fracción 5 obtenida del extracto clorofórmico de *Senna villosa* a una concentración de 3.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

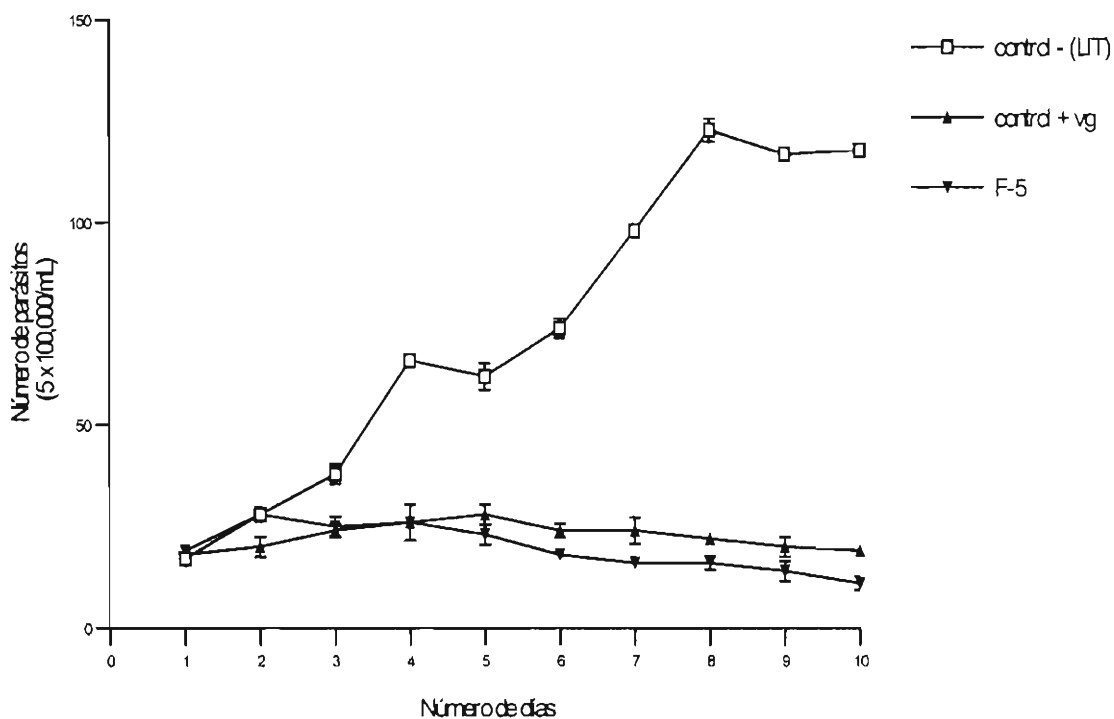


Figura 18. Curva de crecimiento de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* con la fracción 5 obtenida del extracto clorofórmico de *Senna villosa* a una concentración de 6.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Con la separación cromatográfica de la fracción 5, se obtuvieron 24 fracciones, las cuales se juntaron por cromatografía en placa fina, quedando finalmente 12 fracciones. De las fracciones 5-6-7 se aisló un sólido blanco, denominado sólido A, el cual se filtró y se le realizaron bioensayos, *in vitro*.

A las concentraciones de 1.65, 3.3 y 6.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del sólido A, se observó la inhibición del crecimiento de epimastigotes siendo más marcada en la concentración de 6.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con una inhibición del 95%, con 3.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de 72% y con 1.65  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de 58% ( $p < 0.05$ ) (Figura. 19).

A estas concentraciones también se inhibió el crecimiento de tripomastigotes (Figura 20).

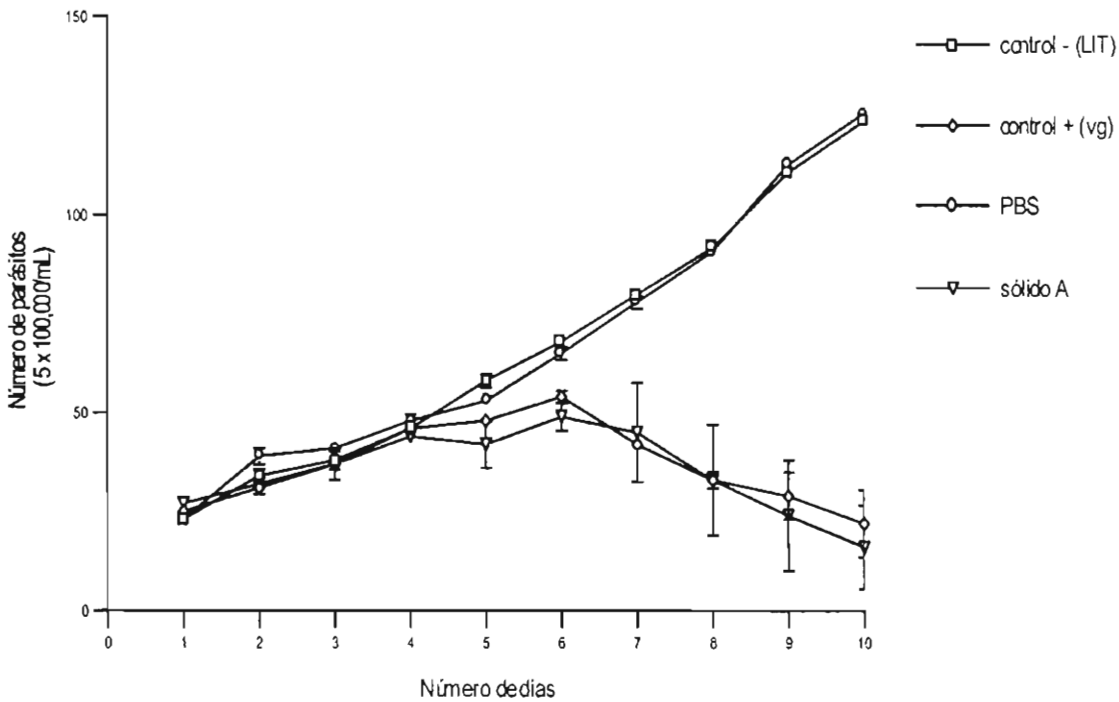


Figura 19. Curva de crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con el sólido A obtenido de la F5 de *Senna villosa* a una concentración de 6.6  $\mu\text{g/mL}$ .

De manera general el porcentaje de inhibición en tripomastigotes fue ligeramente menor, 54% a la concentración de 1.65  $\mu\text{g/mL}$ , 72% a la concentración de 3.3  $\mu\text{g/mL}$  y 93% a la concentración de 6.6  $\mu\text{g/mL}$ , de la misma manera que en el caso de los epimastigotes, se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de 1.65 y 6.6  $\mu\text{g/mL}$  respecto a los controles positivos.

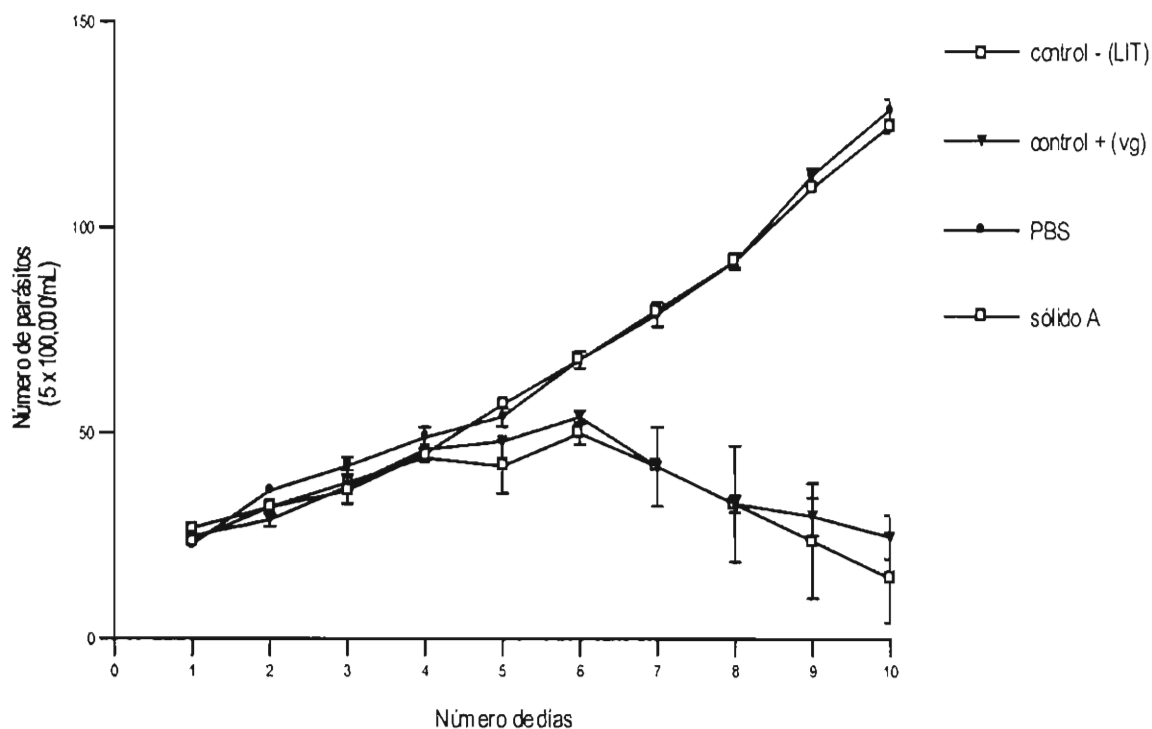


Figura 20. Curva de crecimiento de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* con el sólido A obtenido de la F5 de *Senna villosa* a una concentración de 6.6  $\mu\text{g/mL}$ .

Es importante resaltar que hubo inhibición tanto de epimastigotes como de tripomastigotes a una concentración de 3.3  $\mu\text{g/mL}$ . El porcentaje de inhibición con el sólido A es de 75% y comparado con la concentración anterior no muestra diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ).

A una concentración de 6.6  $\mu\text{g/mL}$ , en ambas fases del parásito la inhibición fue del 82% con el sólido A, respecto al 80% del control positivo.

Cabe señalar que la actividad del extracto clorofórmico, la fracción 5 y el sólido A

obtenidos, no presenta diferencias significativas en cuanto al porcentaje de

Inhibición en ambas fases del parásito.

Con el objeto de purificar el sólido A bioactivo, se sometió a una tercera separación por cromatografía en columna. Se colectaron fracciones de 100 mL, se obtuvieron 15 fracciones y de las fracciones 1, 2 y 4 se obtuvieron sólidos que se prepararon para realizar el bioensayo correspondiente, tanto en cultivos de epimastigotes como de tripomastigotes, encontrándose mayor actividad en la fracción 2, al cual se le denominó sólido B, donde a la concentración de 6.6 µg/mL hubo inhibición de epimastigotes de un 90% y de tripomastigotes en un 84%, resultados similares a los obtenidos con la fracción 5 de la primera y segunda cromatografía (Figuras. 21 y 22).

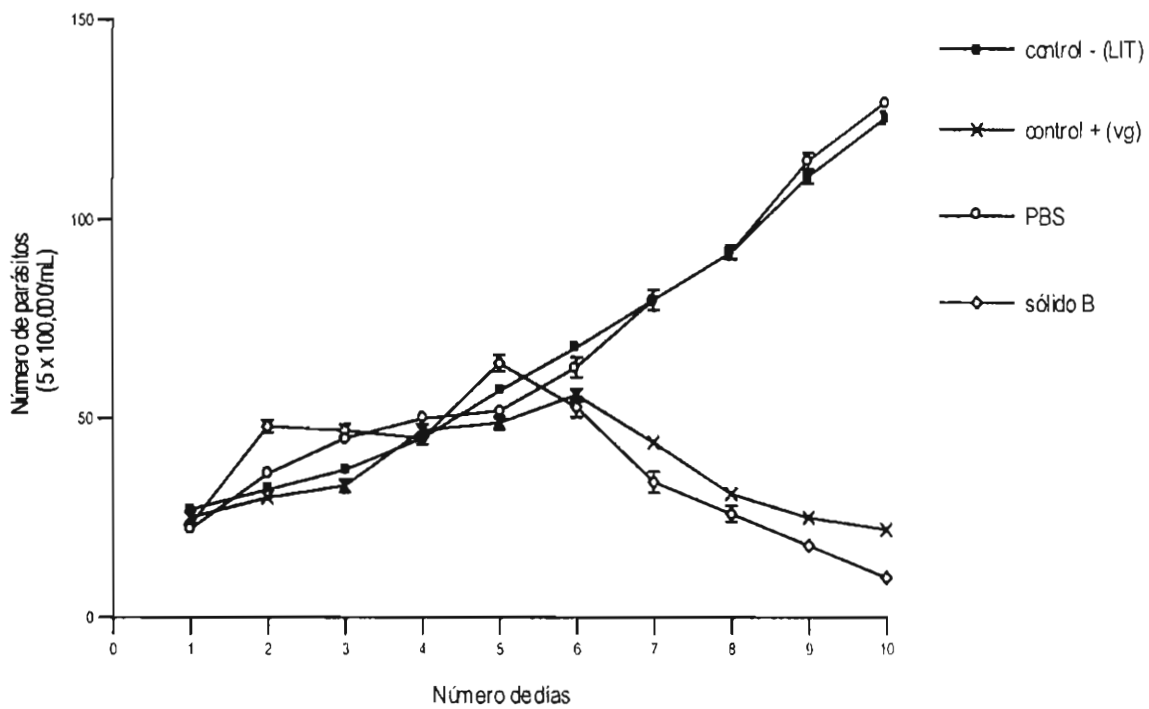


Figura 21. Curva de crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* con el sólido B del extracto clorofórmico de *Senna villosa* a una concentración de 6.6  $\mu\text{g/mL}$ .

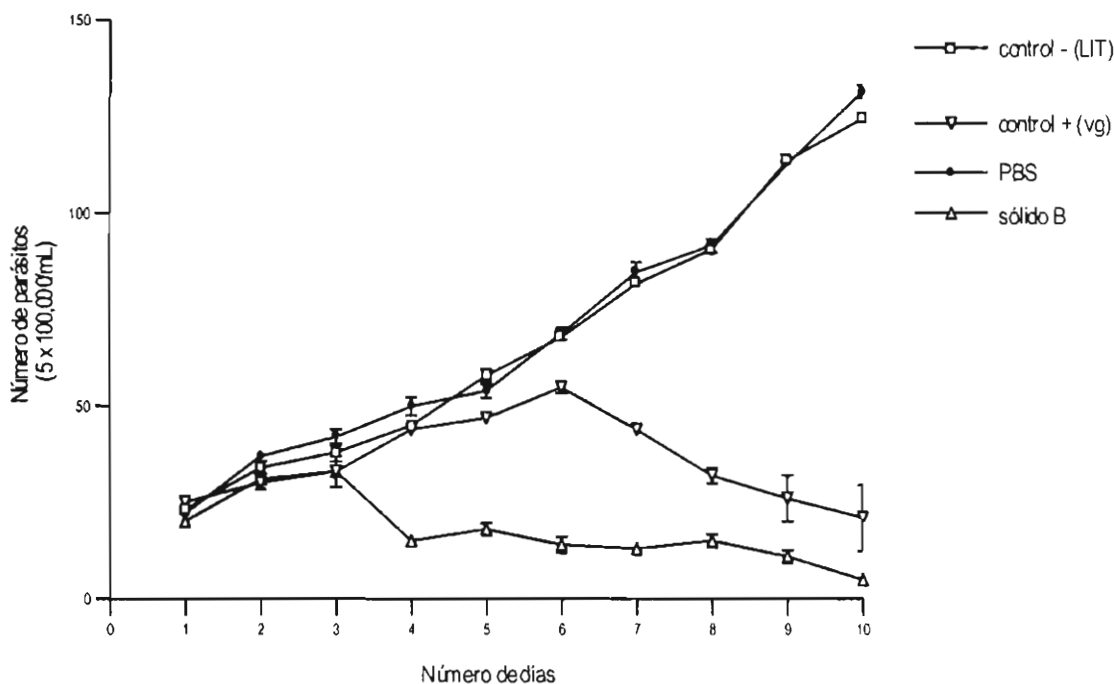


Figura 22. Curva de crecimiento de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* con el sólido B del extracto clorofórmico de *Senna villosa* a una concentración de 6.6  $\mu\text{g/mL}$ .

Se observó que el sólido obtenido de la separación por cromatografía líquida de alta resolución cambió de color, lo cual se consideró indicativo de su fácil descomposición, lo cual se corroboró con el ensayo biológico al no tener efecto inhibitorio.

Así mismo, el sólido B se sometió a un análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas. Se encontró que este sólido es una mezcla de seis compuestos, los cuales tienen un tiempo de retención de: 12.92 (1), 13.45 (2),



14.90 (3), 15.65 (4), 17.75 (5) y 18.85 (6), con un ión molecular de: 380 , 368, 408, 392, 436 y 504 (Figura 23-29) respectivamente.

Los espectros de masas indican que se tienen dos series de compuestos lineales que difieren en el tamaño de la cadena. Los compuestos 1, 2 y 5 corresponden a metil cetonas con 24, 26 y 28 átomos de carbono respectivamente, ya que los espectros de masas de estos tres compuestos presentan un pico en  $m/z$  43 ( $C_2H_3O$ ) (Gupta MM y cols., 1991). Además el ion en  $m/z$  85 ( $C_5H_9O$ ) que corresponde a un reordenamiento de McLafferty (Creswell JC y cols., 1980) son congruentes con  $m/z$  339 ( $C_{23}H_{47}O$ ) para el compuesto 5,  $m/z$  311 ( $C_{21}H_{43}O$ ) para el compuesto 2 y  $m/z$  282 ( $C_{19}H_{38}O$ ) para el compuesto 1. Estos tres compuestos presentan una primera pérdida de agua ( $m/z$  18), lo cual corresponde a un hidroxilo terminal (Castells J y cols., 1998). Los compuestos 3 y 4 también son metil cetonas ya que también presentan los iones  $m/z$  43 y 85. Estos dos compuestos tienen en su estructura un ciclohexilo terminal, una doble ligadura y un hidroxilo secundario. El compuesto 3 tiene 24 átomos de carbono y al compuesto 4 le corresponden 26 átomos de carbono. Los espectros de masas son consistentes con las estructuras propuestas. Los iones  $m/z$  83 ( $C_6H_{11}$ ), 97 ( $C_7H_{13}$ ) y 111 ( $C_8H_{15}$ ) se deben al rompimiento del ciclohexilo terminal (Mishra M. y cols., 2000). Al compuesto 6 no fue posible asignarle una estructura.

Las estructuras propuestas son congruentes con las señales del espectro Infrarrojo  $\nu_{KB}$  cm 3402 (-OH), 1734 (C=O de cetona) (Figura 30) y la señal de 173.6 del espectro  $^{13}C$ -RMN que se puede suponer que corresponde al carbono de los carbonilos de las metil cetonas (Hesse M. y cols., 1997). Las señales de

64.2 y 62.9 es posible asignarlas a carbonos  $sp^3$  unidos a oxígeno (Figura 31).

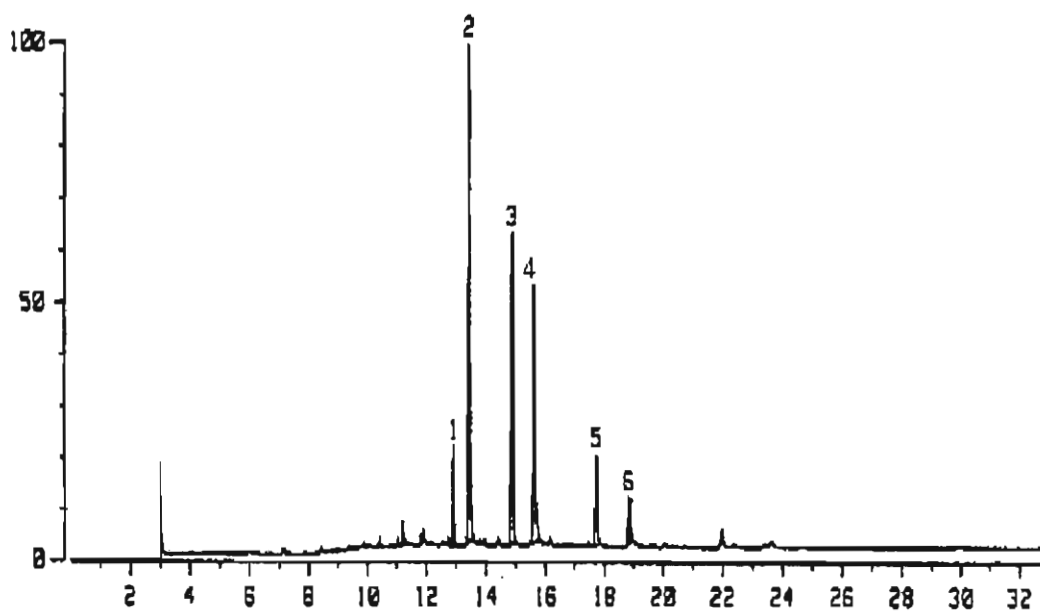


Figura 23. Cromatograma del sólido B determinado en un cromatógrafo de gases HP 5890.

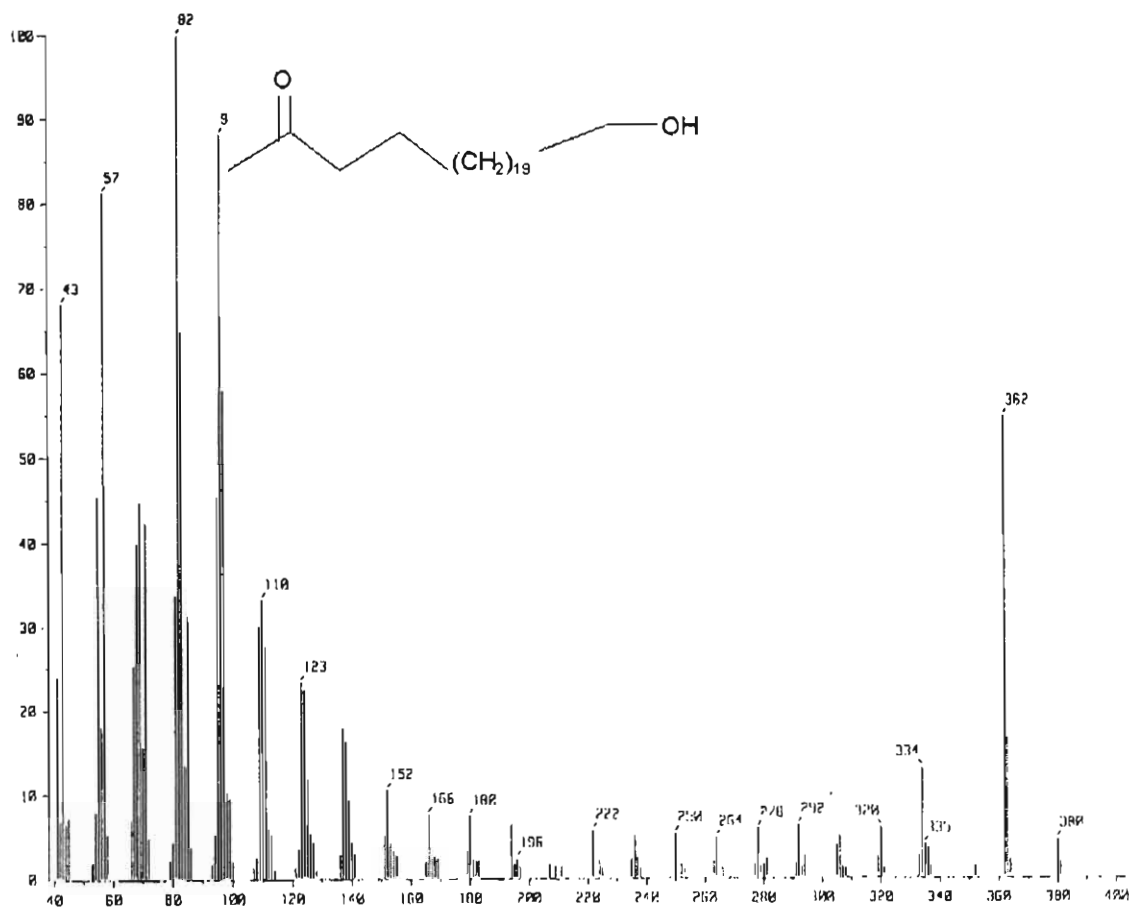


Figura 24. Espectro del compuesto 1 del sólido B obtenido en un espectrómetro de masas.

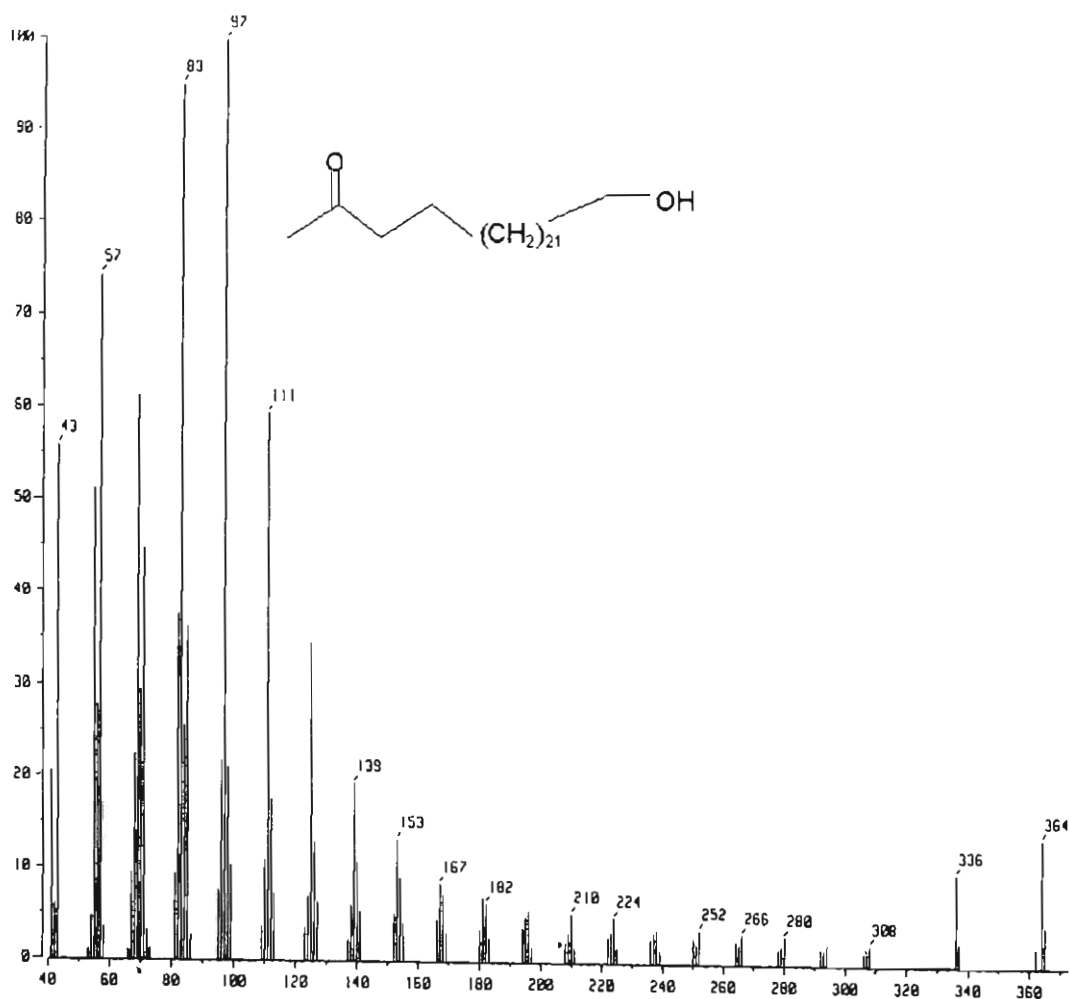


Figura 25. Espectro del compuesto 2 del sólido B obtenido en un espectrómetro de masas.

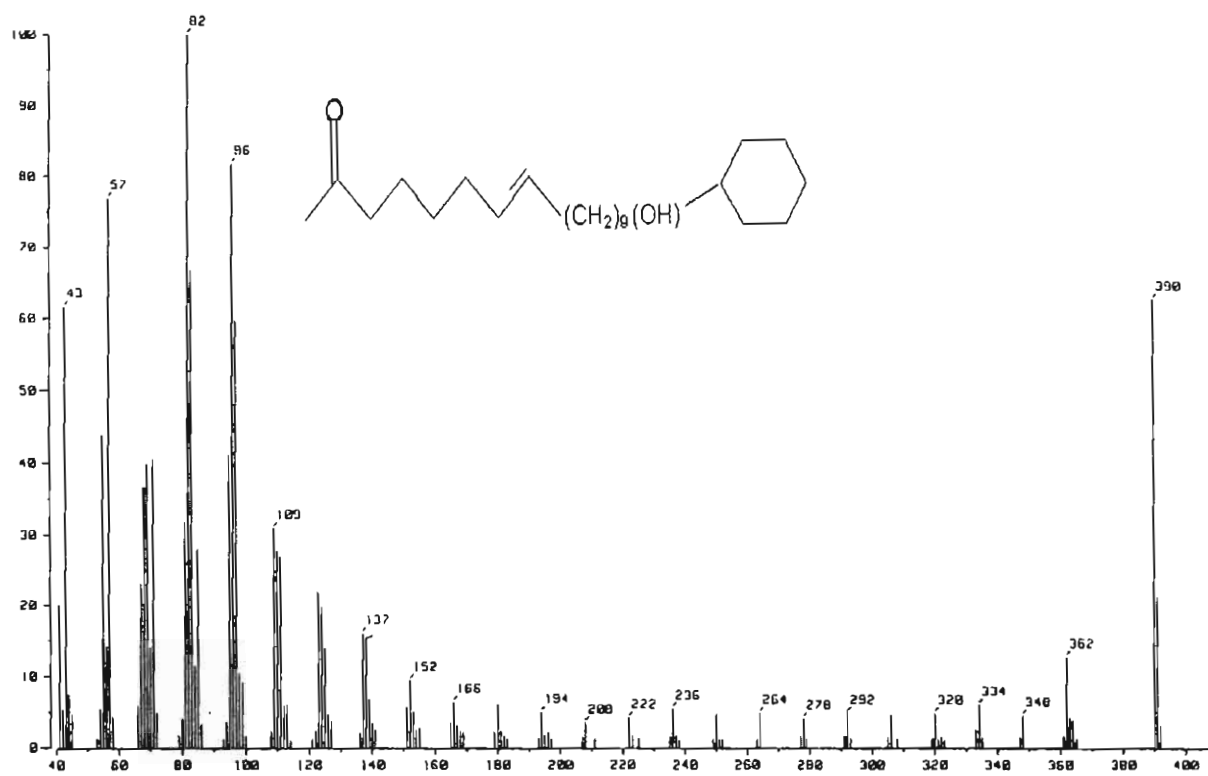


Figura 26. Espectro del compuesto 3 del sólido B obtenido en un espectrómetro de masas.

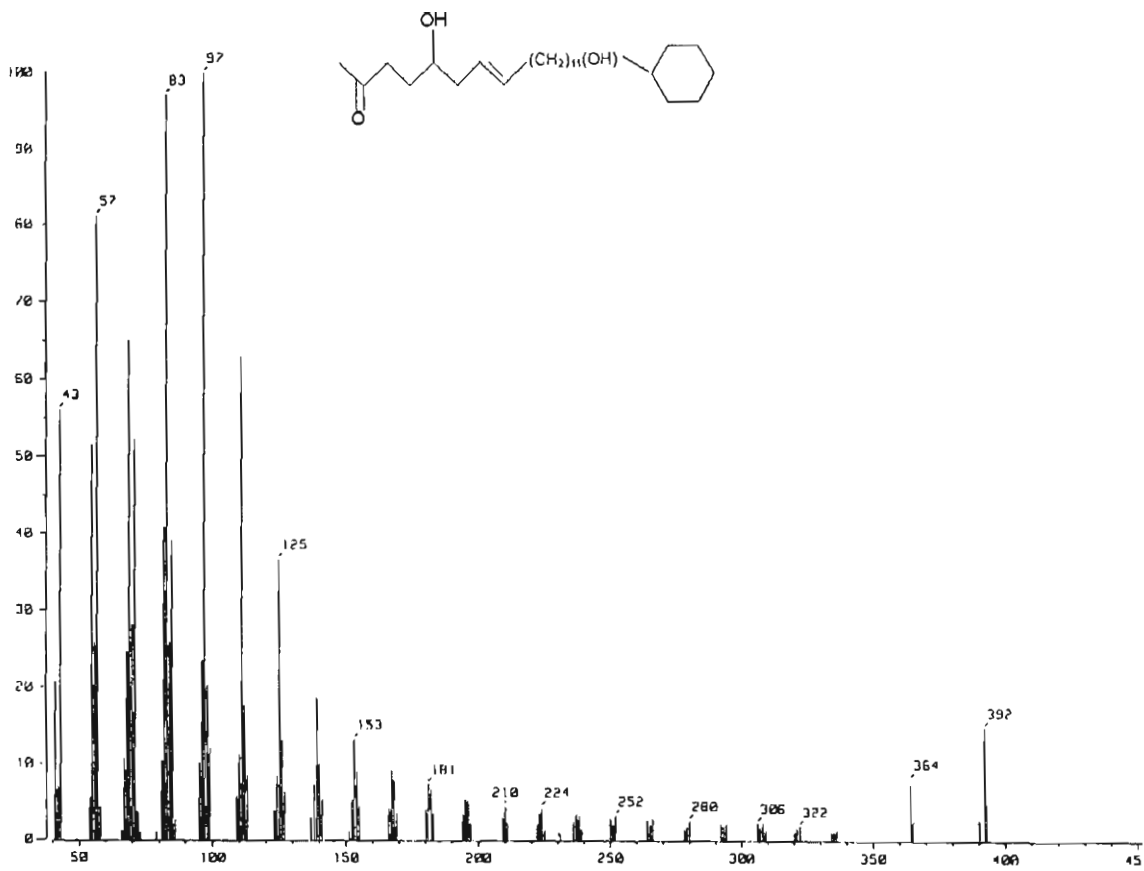


Figura 27. Espectro del compuesto 4 del sólido B obtenido en un espectrómetro de masas.

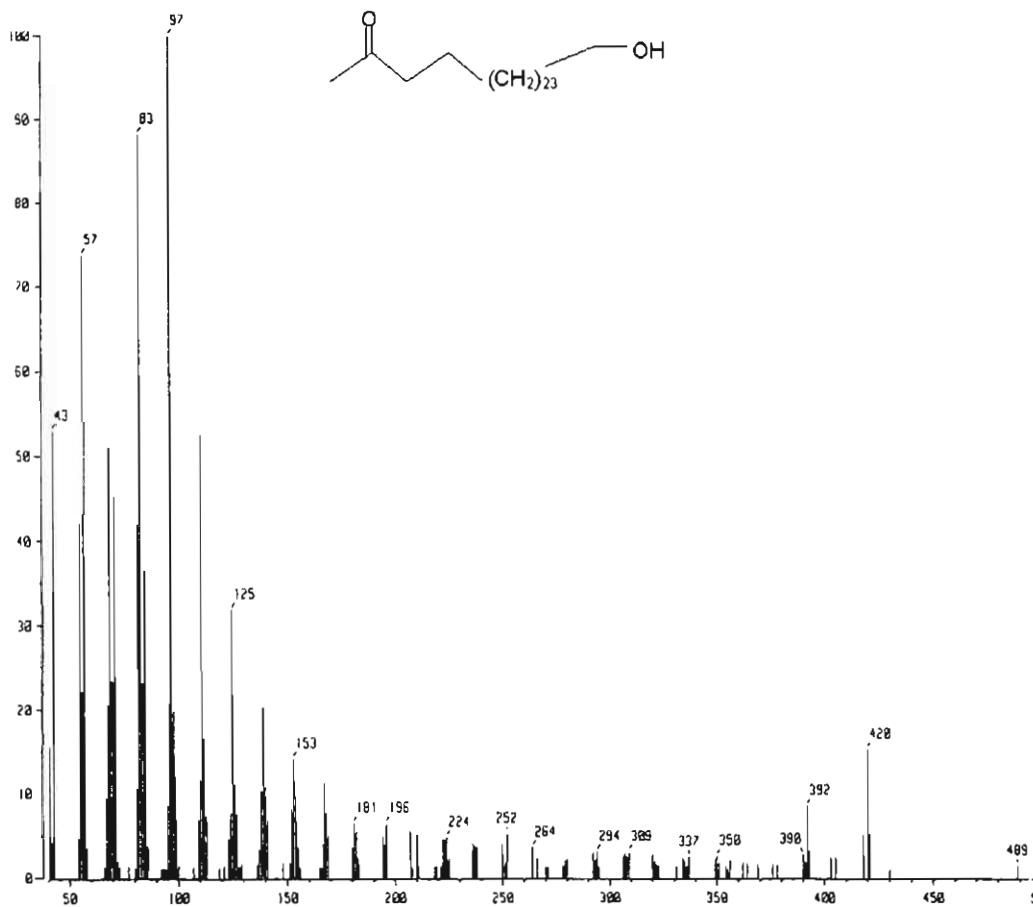


Figura 28. Espectro del compuesto 5 del sólido B obtenido en un espectrómetro de masas.



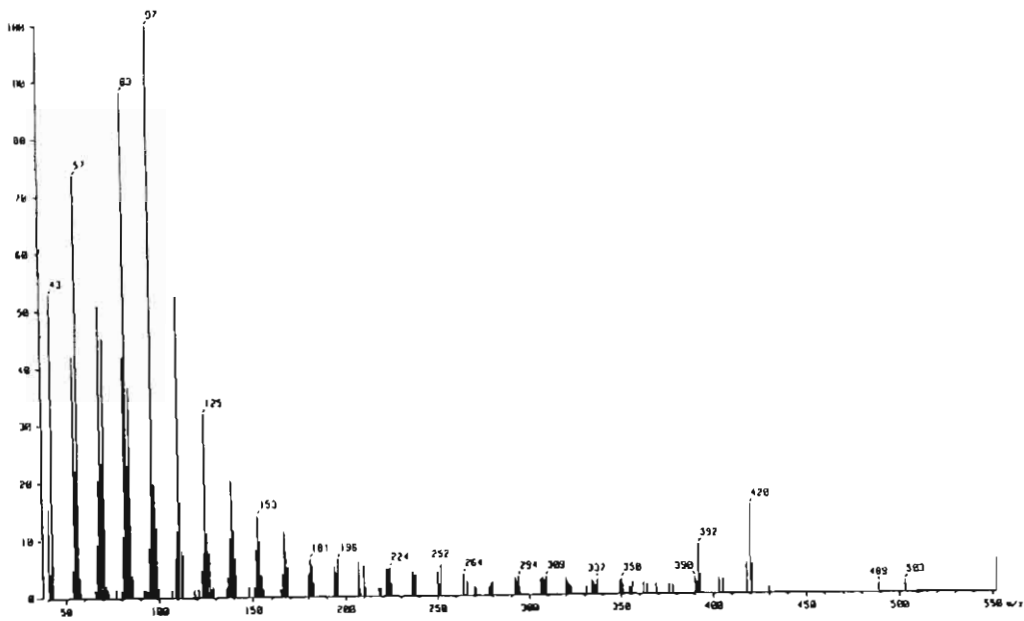


Figura 29. Espectro del compuesto 6 del sólido B obtenido en un espectrómetro de masas.

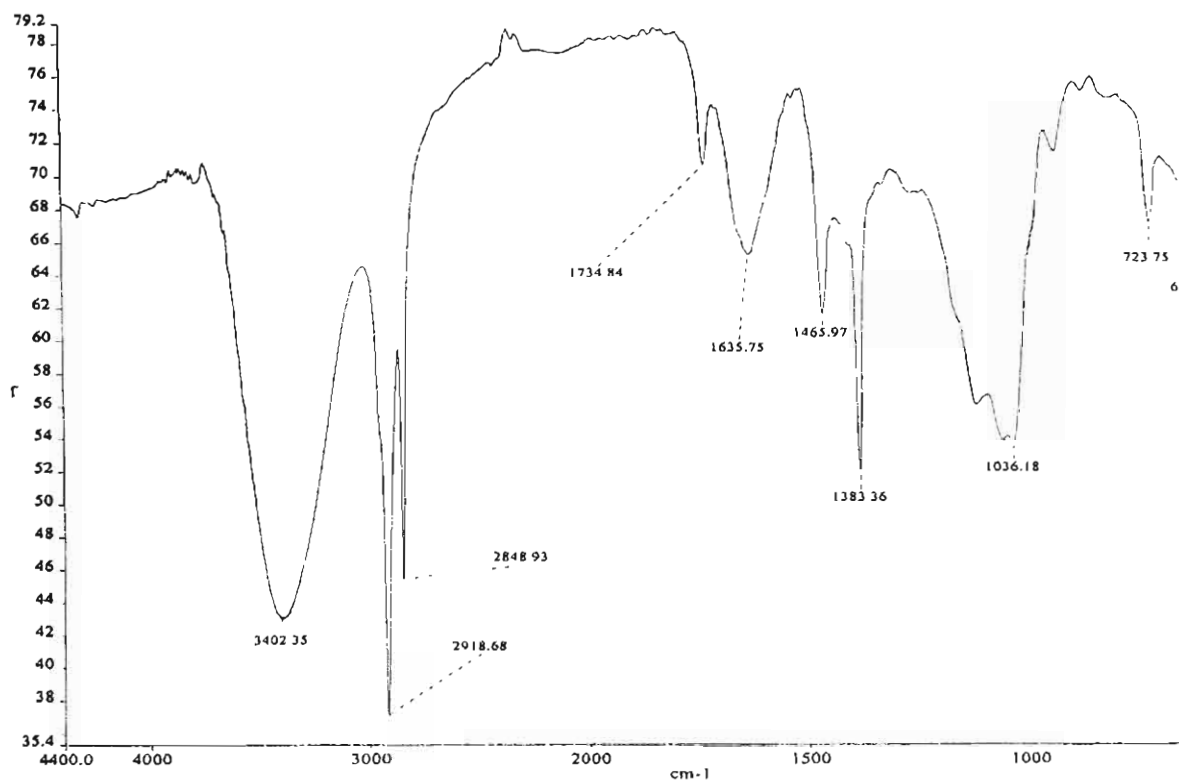
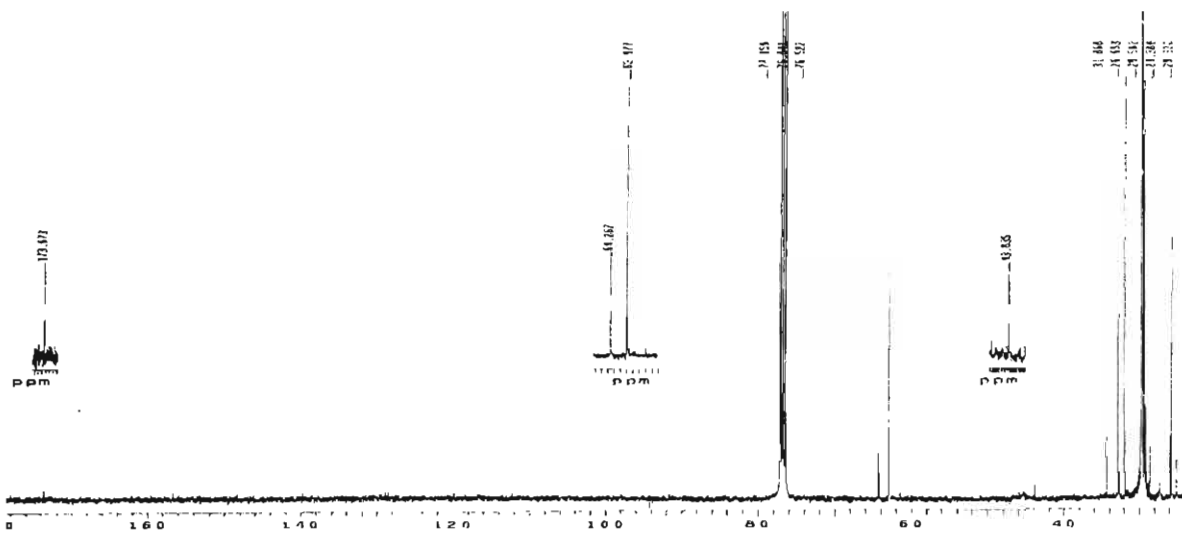


Figura 30. Espectro Infrarrojo del sólido B.



Del sólido blanco B se prepararon concentraciones 1.65, 3.3 y 6.6  $\mu\text{g/mL}$  y así mismo, se utilizaron concentraciones incrementadas: 13.2, 19.8, 26.4, 33.0 y 39.6  $\mu\text{g/mL}$  para determinar la curva concentración-efecto.

En la Figura 32 puede observarse que la inhibición del crecimiento de los epimastigotes es concentración-dependiente. Con el control negativo hubo crecimiento constante de los tripomastigotes y en el caso de la violeta de genciana hubo inhibición, sin embargo las diferencias no fueron significativas respecto al sólido.

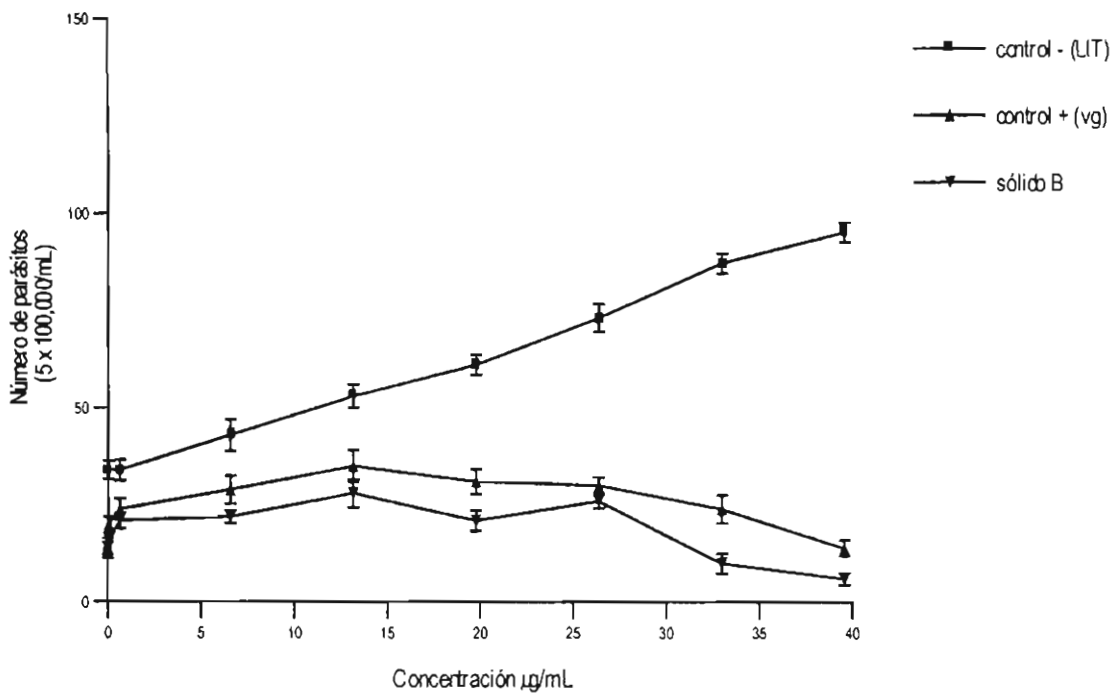


Figura 32. Curva concentración-efecto del sólido B obtenido del extracto clorofórmico de *Senna villosa* contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

En la figura 33 puede observarse inhibición del crecimiento de los tripomastigotes, comensando desde la concentración de 1.65  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con el sólido blanco B, observándose una inhibición del crecimiento de los parásitos concentración-dependiente. Respecto a los controles, se puede observar que en el control negativo hubo crecimiento constante de los tripomastigotes y en el caso del control positivo, hubo inhibición con diferencias, aunque no significativas respecto a la fracción 5. Así mismo, es importante señalar que no se observan diferencias significativas entre ambas fases del parásito ( $p > 0.05$ ).

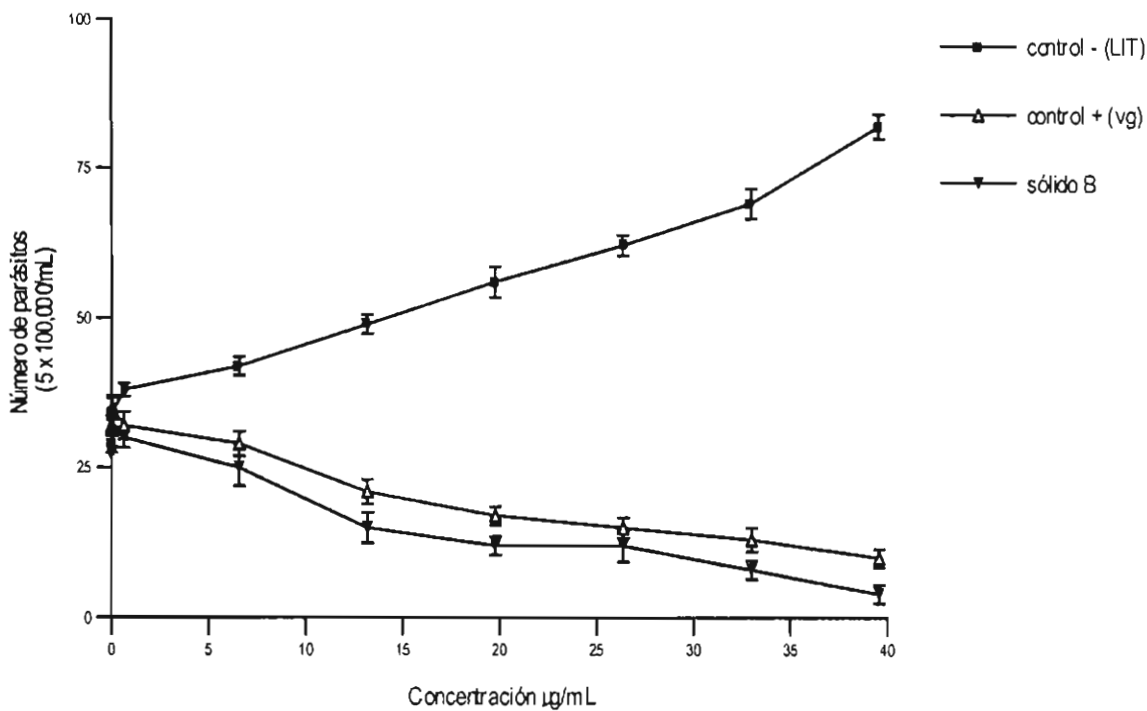


Figura 33. Curva concentración-efecto del sólido blanco activo B obtenido del extracto clorofórmico de *Senna villosa* contra tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Se utilizó el bioensayo, con el sólido blanco B dejando los cultivos con las concentraciones incrementadas utilizadas en la curva concentración-efecto (concentraciones de 1.65 a 39.6  $\mu\text{g/mL}$ ), sin añadir otra concentración, observándose inhibición del crecimiento a partir de la dilución 1.65  $\mu\text{g/mL}$ , tanto en epimastigotes como en tripomastigotes. Los cultivos se mantuvieron sin añadir nueva concentración y después de 24 y 48 horas se pudo observar que el efecto inhibitorio inicial es irreversible, ya que no hubo crecimiento de parásitos durante este período de tiempo y la curva de crecimiento se mantuvo en fase estacionaria. Se realizaron bioensayos utilizando el sólido blanco B en varias concentraciones de orden letal, partiendo del doble de concentración utilizada para la curva de dosis-letal: 79.2, 118.8, 158.4 y 198.0  $\mu\text{g/mL}$ . Observándose franca disminución del crecimiento. Es importante señalar que a la concentración de 118.8  $\mu\text{g/mL}$ , se observó el 50% de los tripomastigotes muertos, a la concentración de 158.4  $\mu\text{g/mL}$  el 71.4% estaban muertos y a 198.0  $\mu\text{g/mL}$  todos los parásitos murieron (Figuras 34 y 35).

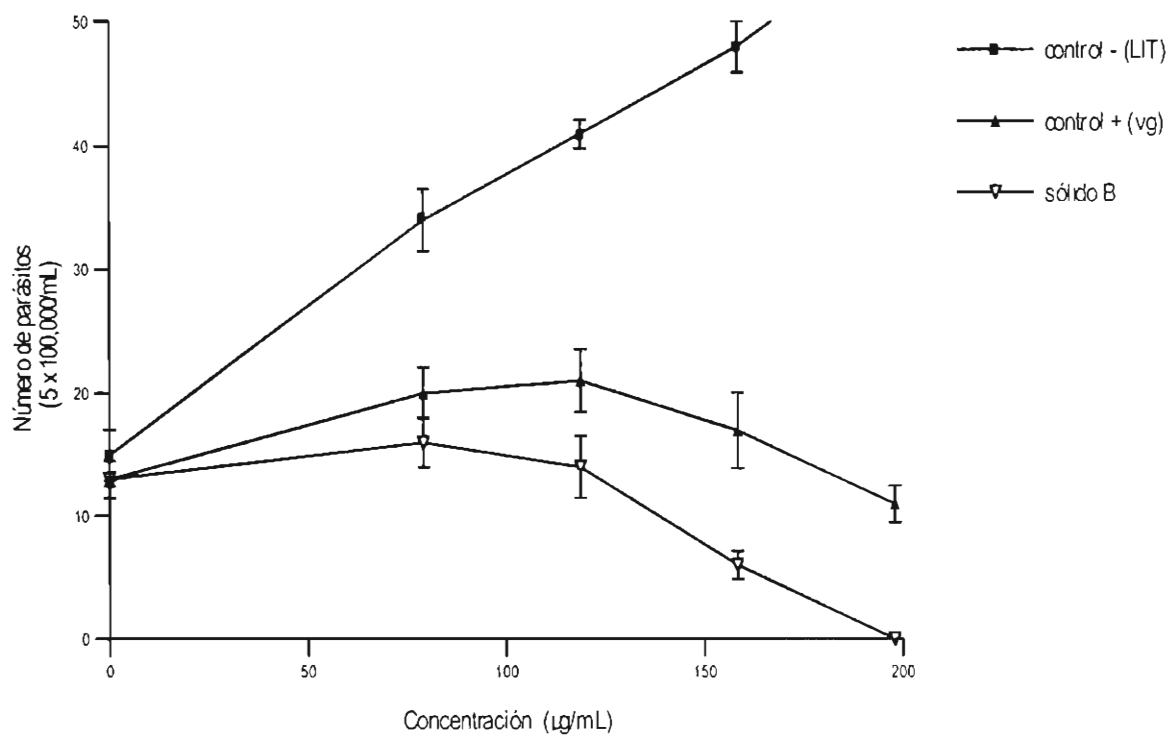


Figura 34. Curva concentración-lethal ( $DL_{50}$ ) del sólido blanco B activo obtenido del extracto clorofórmico de *Senna villosa* contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

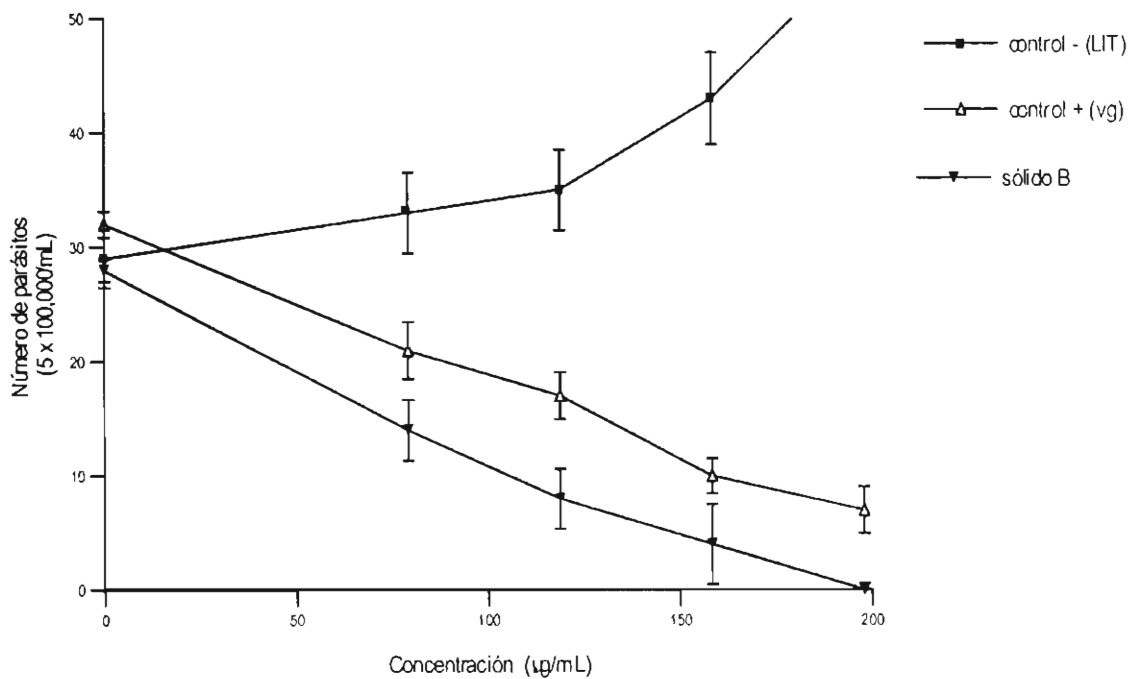


Figura 35. Curva concentración-letal ( $DL_{50}$ ) del sólido blanco B activo obtenido del extracto clorofórmico de *Senna villosa* contra tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

Con el sólido B se realizaron bioensayos en cultivos de epimastigotes y tripomastigotes, observándose inhibición de ambas fases del parásito, sin encontrar diferencias significativas entre ambas ( $p \leq 0.05$ ).

Asimismo, es importante señalar que en el ensayo biológico, la concentración mínima necesaria del sólido blanco B para causar inhibición del crecimiento de los



tripomastigotes en la mitad de la población es de 13.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , la cual corresponde a la dosis efectiva media ( $\text{DE}_{50}$ ).

## CITOTOXICIDAD

Para realizar los ensayos de citotoxicidad se utilizó cultivo de células Vero y contra la fase de amastigote de *T. cruzi*, con los extractos de *S. villosa*, las cuales fueron infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi*.

La tabla 1, muestra la actividad de los extractos, de la fracción 5 (F5) del extracto clorofórmico, así como, el sólido obtenidos de la fracción 5, aplicadas a una concentración de 6.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contra las células infectadas con tripomastigotes, los cuales al penetrar las células se transforman en amastigotes. La mejor actividad, aunque baja, se puede observar con el extracto clorofórmico, la fracción 5 y los compuestos de la fracción 1 y la fracción 2 de la fracción 5. Tanto el extracto metanólico como el acuoso presentan poca actividad tripanocida.

Las medias  $\pm$  la desviación estándar fueron calculadas de tres experimentos independientes. Es importante señalar que la violeta de genciana utilizada como control positivo, no mostró actividad contra la fase de amastigotes y que en general en ningún caso se pudo observar citotoxicidad durante el tiempo de duración del experimento (72 horas).

Tabla 1.- Efecto citotóxico de los extractos, fracción 5 y sólido B de *S. villosa* sobre células Vero infectadas con *T. cruzi*.

Compuestos <i>S. villosa</i> 6.6 µg/mL	Citotoxicidad	Efecto tripanocida
Control neg s/p	3±0	0±0
Control neg c/p	9±4	38±5.1
Control + vg	10±2	4±1.1
Extracto C	12±3	13±1.1
Extracto M	17±1	7±0.5
Extracto A	14±0	4±1.0
Fracción 5	14±1	10±1.1
Sólido B	12±2	8±0.5
DMSO	5±1	4±1.0

Los datos están representados como % de células y/o parásitos muertos promedios±s.d +: > 40% de viabilidad.  $p \leq 0.05$ .

Se utilizaron concentraciones incrementadas del sólido B utilizadas en la curva concentración-efecto: 13.2, 19.8, 26.4, 33.0 y 39.6 µg/mL para determinar la concentración-efecto, así como, varias concentraciones de orden letal, partiendo del doble de concentración utilizado para la curva de concentración-letal: 79.2, 118.8, 158.4 y 198.0 µg/mL, observándose franco aumento de la

actividad directamente proporcional al aumento de la concentración de los extractos, la fracción y el sólido blanco A y B (Figuras 36 y 37).

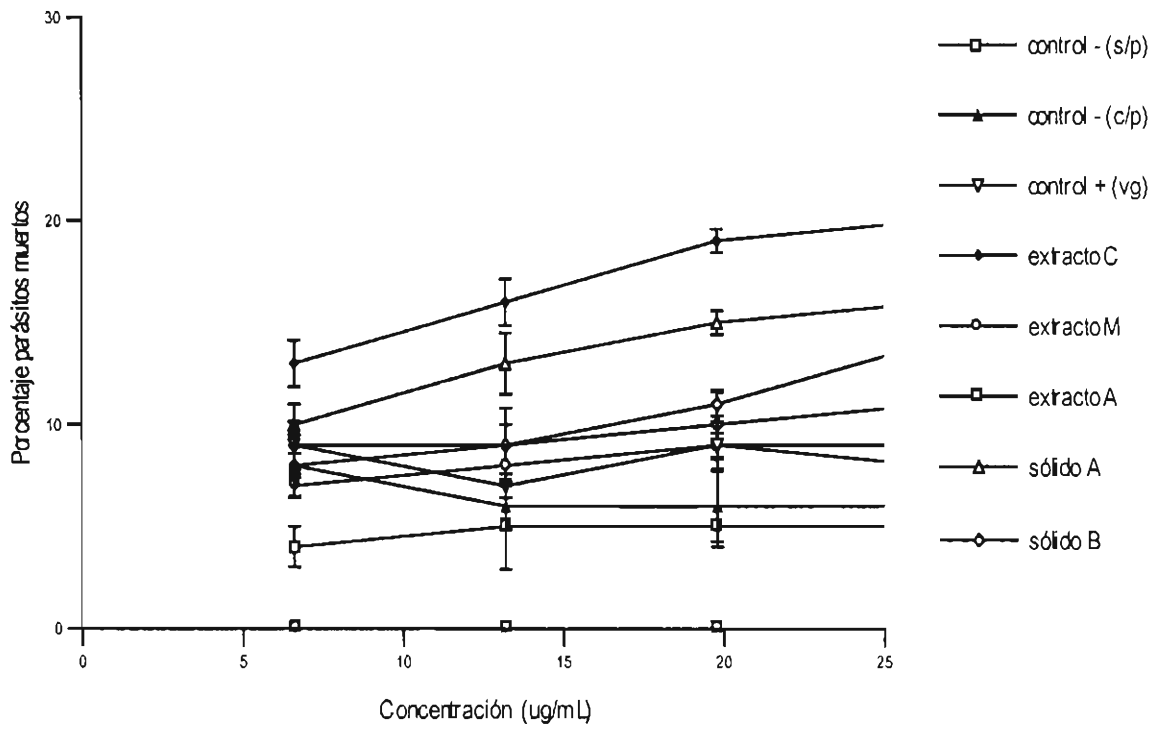


Figura 36. Curva concentración-efecto contra amastigotes de *Trypanosoma cruzi* con los extractos, sólido A y sólido B obtenidos de *Senna villosa*.

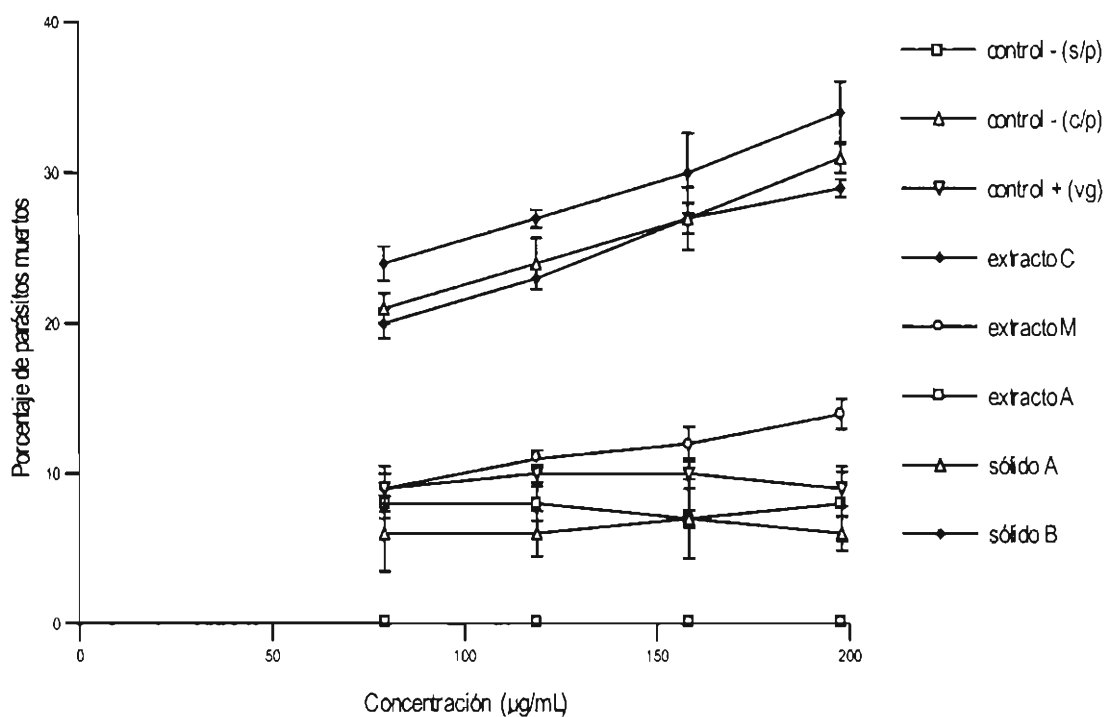


Figura 37. Curva concentración-letal contra amastigotes de *Trypanosoma cruzi* con los extractos, sólido A y sólido B obtenidos de *Senna villosa*.

Es importante señalar que tanto el extracto crudo como la fracción 5, presentan un patrón similar de inhibición del crecimiento del parásito en las fases ya referidas de su ciclo biológico.

En nuestro estudio con violeta de genciana encontramos inhibición prácticamente nula al ser del 10%, ya que puede corresponder al detritus normal por muerte celular (Mekonnen Y y cols., 1999; Schinella GR y cols., 2002).

Sin embargo, es el extracto clorofórmico de las hojas de *S. villosa*, a las concentraciones propuestas, que al parecer actúa como un parasitostático, ya que solo se observa eliminación del parásito en concentraciones altas (198.0 µg/mL), por lo que podría ser que afecte la replicación del parásito, con lo que se puede inferir que interfiere con el ciclo eucariota.

La familia Trypanosomatidae se caracteriza por tener un complejo ciclo de vida y cada etapa comprende aspectos biológicos y bioquímicos diferentes, lo que a la vez establece marcadas diferencias cualitativas y cuantitativas en su DNA, por lo cual podría proveer de mecanismos para el desarrollo del parásito (Nozaqui T 1991). Asimismo, el metabolismo de *T. cruzi* juega un papel muy importante en este proceso de diferenciación, donde el epimastigote responde a señales de estrés nutricional para metacliclar a la forma infectiva, bajo condiciones aeróbicas produciendo lactato, piruvato, acetato y succinato. Por otro lado, los tripomastigotes necesitan para su desarrollo grandes cantidades de glucosa

utilizando la vía metabólica de Krebs, de manera que cuando estas vías metabólicas se alteran, se detiene o disminuye el proceso de diferenciación, lo cual podría ser que resulten afectadas al estar en contacto con la solución del sólido blanco B obtenido de *S. villosa* (Sánchez-Moreno M y cols., 1995).

Se conocen cuatro teorías que podrían justificar en que nivel actuaría el extracto clorofórmico de las hojas de *Senna villosa* contra los estadios de *Trypanosoma cruzi* y son las siguientes:

1.- En el nivel de las enzimas quinasas, las cuales fosforilan proteínas, siendo esto importante para el proceso de regulación del ciclo celular.

2.- En nivel del complejo ciclinas-quinasas (CDK-ciclina), los cuales dirigen a la célula de una fase a otra del ciclo celular.

Ambas teorías son importantes en el momento crítico que ocurre al final de la fase G1, en el punto restrictivo (R), cuando la célula decide si cierra o no el ciclo (Zaragoza O 1997).

Para que la célula pase a través de ese punto y entre en la fase S, es preciso que un conmutador molecular pase del estado apagado "off" al estado encendido "on". Esto ocurre cuando suben los niveles de ciclinas D y E, las cuales se combinan con unas quinasas dependientes de ciclinas y las activan. Estas enzimas capturan a los grupos fosfatos de las moléculas de ATP y las transfieren a una proteína pRB, (freno del reloj del ciclo celular). Si pRB no está fosforilada, bloquea el ciclo celular poniéndolo en posición "off" y secuestrando a la vez otras proteínas, los denominados factores de transcripción, sobre los cuales podría estar actuando el sólido obtenido de las hojas de *Senna villosa*: Esto se corrobora,

ya que cuando el complejo ciclina-quinasa añade suficientes fosfatos a pRB, el freno deja de actuar y libera los factores de transcripción, que quedan libres para actuar sobre los genes. Los factores liberados estimulan la producción de varias proteínas requeridas en la continuación del ciclo celular (Weinberg, 1996; Roberts, 1993).

3.- Otra teoría podría ser que se afecte la polimerasa  $\alpha$  que es la enzima causante de la elongación para sintetizar el DNA utilizando un cebador, cuando la célula entra a la fase G0 o fase de reposo, la actividad de esta enzima desaparece.

Lo anterior hace suponer que la célula entra a una fase de arresto celular, en la cual se ve detenida la multiplicación, encontrándose en la fase G1 o G0 (Karp, G 1996).

4.- La última teoría es que podría ser que el sólido obtenido del extracto clorofórmico actúa muy poco en el tiempo de duración de las curvas de crecimiento, sin embargo puede dañar el DNA de los parásitos, no pudiendo repararlo y así ocasiona el fenómeno de apoptosis, conocida como muerte celular programada, la cual juega un papel muy importante en la embriogénesis, desarrollo y homeostasis de la célula adulta, causando varios estados de enfermedad y patología. Una variación de esta hipótesis ocurre con el aumento de la dosis como sucedió en la curva dosis-efecto donde se observa que la destrucción del parásito ocurrió a altas dosis, quizá por la mayor cantidad del sólido puro (Peter M 1993; Bortner CD 2002).

Las interacciones celulares entre sí son una gran influencia para la gran variedad de eventos que ocurren en la mitogénesis y la diferenciación. Avances recientes

han descubierto la presencia de integrinas, caderinas, selectinas y otras moléculas proteicas de adhesión, las cuales regulan la cascada de señales de traducción por medio de las cuales se inicia la formación organizada de estructuras que permiten el eficiente flujo de información en las diversas vías de señalización (Juliano RL, 2002).

Con base en nuestros resultados, se puede concluir que las preparaciones de *S. villosa* son buenas inhibidoras del crecimiento *in vitro* de epimastigotes y tripomastigotes. En cuanto a la fase de amastigotes, la actividad inhibitoria reproducida en la línea celular Vero, fue mínima y al mismo tiempo se corroboró que las sustancias obtenidas de las hojas de *S. villosa*, no fueron tóxicas para parásitos y células. Por lo que, al haberse demostrado la actividad tripanocida *in vitro* del sólido blanco obtenido, se debe continuar con el aislamiento e identificación de la mezcla de compuestos de dicho sólido, los cuales pueden ser considerados, fuertes candidatos de nuevas drogas antiprotozoarias y estar disponibles como una nueva alternativa para la terapia contra la enfermedad de Chagas.



## CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- *Senna villosa* posee actividad tripanostática y tripanocida sobre epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.
- La actividad tripanostática de *Senna villosa* se encontró en el extracto clorofórmico a una concentración de 39.6 µg/mL
- El extracto clorofórmico es una mezcla de compuestos.
- La DL<sub>50</sub> es de 158.4.0 µm/mL
- La actividad del extracto clorofórmico de *Senna villosa* sobre amastigotes de *Trypanosoma cruzi* fue mínima, por lo que se recomienda realizar experimentos *in vivo* para medir su efecto sobre nidos de amastigotes.

## REFERENCIAS.-

Abate T, Rosenberg M, Aldao RR, Slezynger TC. (1993). Cloning and partial characterization of a 28 kDa tigenic protein of *Tryposoma cruzi*. Biol Res 26:121-30.

Abe F, Yamauchi T, Nagao T, Kinjo J, Okabe H, Higo H, Akahane H. (2002). Ursolic acid as a trypanocidal constituent in rosemary. Biol Pharm Bull. Sep; 25(11):1485-7.

Abe F, Nagafuji S, Yamauchi T, Okabe H, Maki J, Higo H, Akahane H., Aguilar A, Jimenez-Estrada M, Reyes-Chilpa R. (2002). 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. Nov; 25(9):1188-91.

Adewunmi CO, Agbedahunsi JM, Adebajo AC, Aladesanmi AJ, Murphy N, Wando J. (2001). Ethno-veterinary medicine: screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties. J Ethnopharmacol. Sep; 77(1):19-24.

Aguilar J. Estudio farmacognóstico preliminar de algunas plantas de Yucatán con uso en medicina tradicional en el tratamiento de trastornos ginecológicos. Tesis 1990. Facultad de Química de la UADY.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M. (2002). Biología Molecular de la Célula. 3ª ed., Omega, Barcelona, España. Cap. 17, 925-976.

Ali H, Koning GM, Khalid SA, Wright AD, Kaminsky R. (2002). Evaluation of selected Sudanese medicinal plants for their in vitro activity against hemoflagellates, selected bacteria, HIV-1-RT and tyrosine kinase inhibitory, and for cytotoxicity. J Ethnopharmacol. Dec; 83(3):219-28.

Andrade ZA, (1991). Pathogenesis of Chagas' disease. Res Immunol 142: 126-129.

Antuñano F. (1997). Quimioterapia de las infecciones producidas por *Trypanosoma cruzi*. Salud Pub. De Méx. 39:463-469.

Ávila JL, Polegre MA, Robins RK. (1987). Biological action of pyrazolopyrimidine derivatives against *Trypanosoma cruzi*. Studies in vitro and in vivo. Comp. Biochem. Physiol. 86C, 49-54.

Baum SG, Wittner M, Madler JP, Horowitz SB, Schiff PB, Tanowitz HB. (1981). Taxol a microtubule stabilizing agent – blocks the replication of *Trypaosoma cruzi*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4571-4575.

Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, Sacks DL. (2001). The role of Inteleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania mayor* in the skin after healing and the therapeutic potential of Anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. J Exp Med 194: 1497-506.

Barrera-Pérez M., Rodríguez-Félix ME., Guzmán-Marín E., Zavala-Velázquez J. (1990) Enfermedad de Chagas en el estado de Yucatán, México. Revisión de casos clínicos en fase aguda de 1970-1989. Rev. Biomed. 1(4):185-195.

Barrera-Pérez M., Guzmán-Marín E., Rodríguez-Félix ME., Zavala-Velázquez J. (1991) Estudio piloto para detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en un grupo de donadores de sangre del estado de Yucatán. Rev. Biomed. 2(1):15-19.

Bastos JK, Albuquerque S, Silva MLA. (1999). Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*. Planta Médica. 541-544.

Berger I, Barrientos AC, Cáceres A, Hernández M, Rastrelli L, Passreiter CM, Kubelka W.. 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections: II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. J Ethnopharmacol. Sep; 62(2):107-15.

Berger I, Passreiter CM, Cáceres A, Kubelka W. 2001. Antiprotozoal activity of *Neurolaena lobata*. Phytother Res. Jun; 15(4):327-30.

Bestetti RB, Muccillo G. (1997). Clinical course of Chagas' heart disease: a comparison with dilated cardiomyopathy. Int J Cardiol 60:187-93.

Brener Z. 1971. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo; 12(3):171-178.

Brener Z. 1985. General review on *Trypanosoma cruzi* classification and taxonomy. Rev Soc Bras Med Trop; 18(suppl):1-8.

Bregio SD, Belmonte SA, Guerreiro E, Giordano OS, Pietrobon EO, Sosa MA. (2000). The sesquiterpene lactone dehydroleucodine (DhL) affects the growth of cultured epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. J Parasitol., 86(2):407-412.

Bortner CD., Cidlowski JA. 2002. Cellular mechanism for the repression of apoptosis. Annu Rev Pharmacol Toxicol; 42:259-280.

Cáceres A, López B, González S, Berger I, Tada I, Maki J. (1998). 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.* Oct; 62(3):195-202.

Castilla JJ, Mesa-Valle CM, Sánchez Moreno M, Mascaró C, Osuna. 1996. A. In vitro activity and biochemical effectiveness of new organometallic complexes of osmium (III) against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi*. *Arzneimittel-Forsch/Drug Res* 46(II), 990-996.

Castells J, Camps F. (1998). Tabla para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos, Alhambra, Madrid, p M 5 y M 10.

Cavin J, Krassner S, Rodríguez E. (1987). Plant-derived alkaloids active against *Trypanosoma cruzi*. *J. Ethnopharmacol*; 19 :89-94.

Chabala JC., Waits VB., Ikeler T., Patchett AA., Payne L., Peterson LH., Reamer RA. (1991). 1-(Substituted) benzyl-5-aminoimidazole-4-carboxamides are potent orally active inhibitors of *Trypanosoma cruzi* in mice. *Experientia.* 47 :51-53.

Creswell JC, Runquist O, Cambell MM. (1980). Análisis espectral de compuestos orgánicos, Editorial Diana, México D.F. p. 304.

Croft SL., Walker JJ., Gutteridge WE. (1988). Screening of drugs for rapid activity against *Trypanosoma cruzi* tripomastigotes *in vitro*. Trop. Med. Parasitol. 39 :145-148.

Cunha WR., Martins C., da Silva D., Miller AE., Peoporini N., Albuquerque S. (2003). *In vitro* trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. Planta Med ; 69 :470-472.

Darias J., Roviroso J., San Martín A., Díaz AR., Dorta E., Cueto M. (2001). Furoplocamioids A-C, novel polyhalogenated furanoid monoterpenes from *Plocamium cartilagineum*. Am Chemical Soc and Am Soc of Pharm, 64 :1383-1387.

De Castro SL., Meirelles MNL., Oliveira MM. (1987). *Trypanosoma cruzi*: adrenergic modulation of camp role in proliferation and differentiation of amastigotes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 64:368-375.

De Castro SL., Soeiro MNC., Meirelles MNL. (1992). *Trypanosoma cruzi*: Effect of phenothiazines on the parasite and on its interaction with host cells. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 87:209-215.

De Castro SL. (1993). The challenge of Chagas' disease chemotherapy: An update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*; 53:83-98.

De Castro SL, Soeiro MNC, Higashi KO, Meirelles MNL. (1993). Differential effect of amphotericin B on the three evolutive stages of *Trypanosoma cruzi* and on the host cell-parasite enteraction. *Brazilian J Med Biol Res*, 26:1219-1229.

Do Campo R. (2001). Recent developments in the chemotherapy of Chagas' disease. *Curr Pharm Des* 7: 1157-64.

Edrada RA., Wray V, WitteL., van Ofwegen L., ProkschP. (2000). Bioactive terpenes from the soft coral *Heteroxeniaq sp.* From Mindoro, Philippines. *Z. Naturforsch*, 55:82-86.

Escalante D. Detección de la actividad antimicrobiana de extractos de 10 leguminosas utilizadas en la medicina tradicional Maya. Tesis 1996, Facultad de Química de la UADY.

Fajardo Vázquez O. 1998. Beterminación de la bioactividad del extracto diclorometánico de hojas de *Senna villosa* contra *Tripanosoma cruzi*. Tesis Facultad de Química, UADY.



Ferreira F, Santos R, Grandi T. 1997. Screening plant extracts against *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes in culture. Mem Fiocruz, Caxambu; 510.

Fournet A., Barrios AA., Muñoz V. (1994). Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. J Ethnopharmacol; 41(1-2):19-37.

Fournet A., Rojas de Arias A., Charles B. 1996. Chemical constituents of essential oils of Muña, Bolivian plants traditionally used as pesticides, and their insecticidal properties against Chagas' disease vectors. Jour of Ethnopharmacol; 52 :145-149.

Fournet A., Manjon AM., Muñoz V., Angelo A., Breneton J., Hocquemiller R., Cortes D., Cave A. (1988). Active trypanocidal alkaloids, bisbenzylisoquinolones active *in vitro* against *Trypanosoma cruzi* the agent responsible for trypanosomiasis in South America. J. Ethnopharmacol. 24 :337-343.

Freiburghaus F, Kaminsky R, Nkunya M. 1996. Evaluation of African medicinal plants for their *in vitro* trypanocidal activity. Jour Ethnopharmacol; 55:1-11.

Freiburghaus F, Ofwal EN, Kaminsky R, Nkunya M, Brun R. (1996). *In vitro* antitrypanosomal activity of African plants used in traditional medicine in Uganda to treat sleeping sickness. Trop Med Int Health; 1(6):765-771.

Galanti N, Dvorak JA, Grenet J, McDaniel JP. (1994). Hydroxyurea-induced synchrony of DNA replication in the Kinetoplastida. *Experimental cell research*; 214, 225-230.

Galel SA, Kirchhoff LV. (1996). Risk factors for *Trypanosoma cruzi* infection in California blood donors. *Transfusion*; 36: 227-231.

Gallerano RH, Marr JJ, Sosa RR. (1990). Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 43, 159-166.

Gelb MH, Hol WG. (2002). Parasitology. Drugs to combat tropical protozoan parasites. *Science* 297: 343-4.

Girones N, Fresno M. (2003). Etiology of Chagas' disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistente or both?. *Trends Parasitol* 19: 19-22.

Gloss G., Barrera M., Monteón-Padilla V., Reyes P. (1990). Tripanosomiasis Americana y cardiopatía chagásica crónica en el Instituto Nacional de cardiología "Ignacio Chávez". *Arch. Inst. Cardiol. Méxd.*60:261-266.

Goad LJ., Berens RL., Marr J., Beach DH., Holz Jr., GG. (1989). The activity of ketoconazole and other azoles against *Trypanosoma cruzi*: Biochemistry and chemotherapeutic action *in vitro*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 32:179-190.

Gorla NB, Ledesma OS, Barbieri G, Larripa IB. 1988. Assesment of cytogenetic damage in chagasic children treated with benznidazole. *Mutation Res*; 206:212-220.

Grael CF., Vichnewski W., Souza GE., Lopes JL., Albuquerque S., Cunha WR. (2000). A study of the trypanocidal and analgesic properties from *Lychnophora granmongolense* (Duarte) Semir and Leitao Filho. *Phytother Res.* May ; 14(3) :203-206.

Guolart M, Zani C, Tonholo J. (1997). Trypanocidal activity and redox potential of heterocyclic and 2 hidroxy-naphthoquinones. *Bioorga and Med Chem Lett*; 15:2043-2048.

Gupta MM, Verma KR, (1991) Lipid constituents of *Cissus quadrangularis*, *Phytochemistry*, 30, 875-878.

Guzmán-Marín E., Barrera-Pérez M., Rodríguez-Féliz ME., Garcia-Rejón J. (1994). La temperatura como factor de diferenciación de *Trypanosoma cruzi* en el *Triatoma dimidiata*. *Rev. Biomed.* 5(1):33-37.

Hagar J., Rahimtoolas. (1991). Chagas' Heart Disease in the United States. *N Engl J Med*; 325(11):763-768.

Hammarton T., Mottram J., Doerig C. (2003). The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploitation. *Progress in Cell Cycle Res*; 5: 91-101.

Heinrich M., Gibbons S. (2001). Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *JPP*, 53:425-432.

Hesse M, Meier HM, Zeeh B, (1997). *Spectroscopy Methods in Organic Chemistry*, 5<sup>th</sup> Edition, Thieme; Stuttgart 1997 p. 216-224.

Hocquemiller T., Cortés D., Arango GJ., Myint SH., Cavé A., Angelo A., Muñoz V., Fournet A. (1991). *J. Nat. Prod.* 54:450-452.

Hoel P. *Estadística Elemental*. Edit. Continental, 4<sup>a</sup> edición. México, D.F. 1984:290-300.

Hoft DF, Eickhoff CS. (2002). Type I immunity provides optimal protection against both mucosal and systemic *Trypanosoma cruzi* challenges. *Infect Immun* 70: 6715-25.

Juliano RL. 2002. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins and immunoglobulin-superfamily members. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 42:283-322.

Kamuhabwa A., Nshimo C., de Witte P. (2000). Cytotoxicity of some medicinal plant extracts used in Tanzanian traditional medicine. *J of Ethnopharmacology*, 70:143-149.

Kang Y, Calvo PA, Daly TM, Long C. (1998). Comparison of humoral immune responses elicited by DNA and protein vaccines based on merozoite surface protein-1 from *Plasmodium yoelii*, a rodent malaria parasite. *J Immunol* 161: 4211-4219.

Karp G. *Biología celular y molecular*. Edit. McGraw-Hill Interamericana, 2ª edición México, D.F., 1996:580-588.

Kinghorn AD. (2001). Pharmacognosy in the 21<sup>st</sup> century. *JPP*, 53:135-148.

Kirchhoff LV. 1993. Chagas Disease. *American Trypanosomiasis. Infect Dis Clin North Am*; 7:487-502.

Kirchhoff LV. 1995. *Trypanosoma* species (American tripanosomiasis, chagas disease): biology of trypanosomes. Mandel GL, Benet JE, Dolin R. *Principles*

Kierszenbaum F. (1999). Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin Microbiol Rev* 12: 210-223.

Kinnamon KE, Poon BT, Hanson WH, Waits VB. (1998). Activity of anticancer compounds against *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Am J Trop Med Hyg* 58: 804-806.

Krakoff I.H., Brown N.C., Reichard P. 1968. Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea. *Cancer Research*; 28:1559-1565.

Koerich LB., Grisard EC., Steindel M. (2003). *In vitro* differentiation and infectivity of GFP mice. *J Parasitol*; 72:179-184.

Lammel EL, Muller LA, Isola LD, Gonzalez Cappa SM. (1985). Effect of vector on infectivity of *T. cruzi*. *Acta Tropica*; 42:149-155.

Lacuara JL, Barioglo SR, Oliva PP, Bernacchi AS, Culasso AF, Castro JA. 1991. Disruption of mitochondrial function as the basis of the trypanocidal effect of trifluoperazine on *T. cruzi*. *Experimentia*; 47:612-616.

Lauria-Pires L, De Castro CN, Emanuel A, Prata A. (1988). Ineficácia do allopurinol em pacientes na fase aguda da doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 21, 79.

Leal de Mierelles MN., Pereira MCS., Singer RH., Soeiro MNC., Garzoni LR., Silva DT., Barbosa HS., Araujo-Jorge TC., Masuda MO., Capella MAM., Gil Lopes A.,

Vermelho AB. (1999). *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocytes: New contributions regarding a better understanding of this interaction. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 94, Suppl. 1:149-152.

Levin J. Fundamentos de Estadística en la Investigación Social. Edit. Harla, México, D.F. 1979:164-166.

Letelier M.E., Rodríguez E., Wallace A., Lorca M., Repetto Y., Morello A., Aldunate J. (1990). Chemotherapy of Tropical Disease. Exper. Parasitol. 71:357-363.

Lozoya X. (1990). Un paraíso de plantas medicinales. Arqueología Mexicana, 14-59.

Machado ER., Costa-Cruz JM., Gomes SBP. (1998). Anti-trypanosoma cruzi antibodies in the inhabitants of urban and rural areas of Abadia Dos Dourados, States of Minas Gerais, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 40(5):325-326.

McCabe RE. (1984). Failure of ketoconazole to cure chronic murine Chagas' disease. J. Infec. Dis. 158:1408-1409.

Mafezoli J., Vieira PC., Fernandes JB., da Silva MF., de Albuquerque S. (2000). *In vitro* activity of *Rutaceae* species against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. J Ethnopharmacology; 73(1-2): 335-40.

Marcucci M, Dantas A, Ferreres F. 1997. Activity of phenolic compounds isolated from brazilian propolis against *T. cruzi*. Mem Fiocruz. Caxambu; 509.

Marín-Neto JA., de Almeida Filho OC., Pazin-Filho A., Maciel BC. (1999). Forma indeterminada da moléstia de Chagas. Proposta de novos critérios de caracterizacao e perspectivas de tratamento precoce da cardiomiopatia. <http://www.fac.org.ar/tcvc/llave/c318/marin.htm>

Mekonnen Y., Yardley V., Rock P., Croft S. (1999). *In vitro* antitrypanosomal activity of *Moringa stenopetala* leaves and roots. Phytother Res; 13(6): 538-9.

Mendoza-González J., Miranda-Lluck E., Velazco-Castrejón O., Tinoco-Reyna O., Maciel-Pérez MJ. (1995). Cardiopatía chagásica crónica. Presentación de 60 casos. Arch. Inst. Cardiol. Méx. 65:546-550.

Messeder JC., Tinoco LW., Figueroa-Villar JD., Souza EM., Santa Rita R., de Castro SL. (1995). Aromatic guanyl hydrazones: synthesis, structural studies and *in vitro* activity against *Trypanosoma cruzi*. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters; 24(5): 3079-3084.

Mishra M, Shukla NY, Kumar S. (2000). Euphane triterpenoid and lipid constituents from *Butea monosperma*, Phytochemistry, 54, 835-838.



Moncayo A. (1997). Progress towards the elimination of transmission of Chagas' disease in Latin America. *World Health Stat Q* 50: 195-198.

Mongelli E., Pampuro S., Coussio J., Salomón H., Ciccía G. 2000. Cytotoxic and DNA interaction activities of extracts from medicinal plants used in Argentina. *Jour. of Ethnophar.*; 71: 145-151.

Monteón-Padilla V., Hernández Beceril N., Ballinas-Verdugo M., Aranda-Frausto A., Reyes PA. (2001). Persistence of *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic cardiopathy patients. *Arch. Inst. Cardiol. Méx.* 32:39-43.

Morello A., Lipchenca I., Cassels BK., Speisky H., Aldunate J., Repetto Y. (1994). *Comp. Biochem. Physiol.* 107C:367-371.

Morris SA, Tanowitz H, Hatcher D, Bilezikian JP, Wittnwe M. 1988. Alterations in intracellular calcium following infection endothelial cells with *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*; 29:213-221.

Mortara RA., Procopio DO., Barros HC., Verbisck NV., Andreoli WK., Silva RBS., da Silva S. (1999). Features of host cell invasion by different infective forms of

*Trypanosoma cruzi*. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 94, Suppl. 1:135-137.

Muelas-Serrano S., Nogal J.J., Martínez-Díaz J.A., Escario A.R., Martínez-Fernández A., Gómez-Barrio A. 2000. *In vitro* screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. Journal of Ethnopharmacology; 71:101-107.

Nozaki T, Dvorak JA. (1991). *Trypanosoma cruzi*: Flow cytometric analysis of developmental stage differences in DNA.

Nothenberg MS., Takeda GKF., Najjar R. (1991). Adducts of nitroimidazole derivatives with Rhodium (II) carboxylates: Synthesis, characterization and evaluation of antichagasic activities. J. Inorg. Biochem. 42:217-229.

Ocampo A, Wachter N, Castellanos A, Talavera J. 1996. Análisis de varianza de un factor. Rev Med IMSS (Mex); 34(4):329-333.

Osuna A., Ruíz-Pérez LM., Gamarro F., Rodríguez-Santiago JI., Castanys S., Sharples D., Galy AM., Giovannageli G., Galy JP., Soyfer JC. (1988). New antiparasitic agents. III. Comparison between trypanocidal activities of some acridine derivatives against *Trypanosoma cruzi in vitro*. Chemotherapy; 34(2): 127-33.

Osuna A., Adroher FJ., Lupiáñez JA. (1990). Influence of electrolytes and non-electrolytes on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Differentiation and Development*, 30:89-95.

Pech G. Aislamiento e identificación de quinonas presentes en las hojas de *Senna villosa* Mill. Tesis, 1996, Facultad de Química de la UADY.

Peter M., Gartner A., Horecka J., Ammerer G., Herskowitz I. 1993. FAR1 links the signal transduction pathway to the cell cycle machinery in yeast. *Cell*, 73:747-760.

Petersen CA., Burleigh BA. (2003). Role for interleukin-1 $\beta$  in *Trypanosoma cruzi*-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Infection and Immunity*, Vol. 71, No. 8:4441-4447.

Primavera KSC., Umezawa ES., Peres BA., Camargo ME., Hoshino-Shimizu S. (1990). Chagas' disease: IgA, IgM and IgG antibodies to *T. cruzi* amastigote, trypomastigote and epimastigote antigens in acute and in different chronic forms of the disease. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. 32(3):172-180.

Pinto AV., Pinto CN., Pinto MC., Rita SR., Pezella CA., de Castro SL. (1997). Trypanocidal activity of synthetic heterocyclic derivatives of active quinones from *Tabebuia* sp. *Arzneimittelforschung*; 47(1): 74-9.

Pinto CN., Dantas AP., De Moura KC., Emery FS., Polequevitch PF., Pinto MC., de Castro SL., Pinto AV. (2000). Chemical reactivity studies with naphthoquinones from *Tabebuia* with antitrypanosomal efficacy. *Arzneimittelforschung*; 50(12): 1120-8.

Pizzolatti MG., Koga AH., Grisard EC., Steindel M. (2003). Trypanocidal activity of extracts from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. *Phytomedicine*; 10(5): 422-6.

Prata A. Chagas' disease. 1994. *Infect Dis Clin North Am*; 8:61-76.

Rose NR. (1998). The role of infection in the pathogenesis of autoimmune disease. *Semin Immunol* 10: 5-13.

Roberts JM. 1993. Turning DNA replication on and off. *Curr. Opin. Cell Biol* 5:201-206.

Rodrigues Coura J., de Castro SL. (2002). A critica review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 97: 3-24.

Rodríguez-Félix ME., Zavala-Velázquez J., Barrera-Pérez M., Guzmán-Marín E., Ramírez-Sierra MJ., Álvarez-Moguel R. (1995). Riesgo de transmisión de la enfermedad de Chagas por donantes de sangre. *Rev. Biomed.* 6:70-75.

Rossi M., Preto M. (1990). Microvascular changes as a cause of chronic cardiomyopathy in Chagas' heart disease. *American Heart Journal*. 120:233-236.

Rowland E., Moore-Lai D., Seed JR., Stephens CE., Boykin DW. (2003). Inhibition of *in vitro* intracellular growth of *Trypanosoma cruzi* by dicationic compounds. *J Parasitol*; 89(5): 1078-80.

Queiroz da Cruz M., Braescher MH., Vargens JR., Oliveira Lima A. (1991) Effect of actinomycin D on *Trypanosoma cruzi*. *Experientia* 47:89-92.

Rojas M.V. and Galanti N. 1991. *FEBS Lett*. 295:31-34.

Schmeda-Hirschmann G., Astudillo L., Bastida J., Codina C., Rojas De Arias A., Ferreira ME., Inchausti A., Yaluff G. 2001. Cryptofolione derivatives from *Cryptocarya alba*. *Journal Pharmacy and Pharmacology*, 53:563-567.

Schmidt T., Brun R., Willuhn G., Khalid SA. (2002). Anti-trypanosomal activity of Helenalin and some structurally related sesquiterpene lactones. *Planta Med*; 68: 750-1.

Schinella GR., Tournier HA., Prieto JM., Rios JL., Buschiazzi H., Zaidenberg A. (2002). Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth by medical plant extracts. *Fitoterapia*; 73(7-8): 569-75.

Schvartzapel AJ, Zhong Li, Docampo R, Rodríguez JB, Gros EG. 1997. Design, síntesis and biological evaluation of new growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi* (epimastigotes). J. Med. Chem.; 40: 2314-2322.

Sherr CJ. 1993. Mammalian G1 cyclins. Cell 73:1059-1065.

Solomon MJ. 1993. Activation of the various cyclin/cdc2 protein kinases. Curr. Opin. Cell Biol. 5:180-186.

Souza SC., Takahashi CS., Da Silva JS. (1991). Evaluation of the mutagenic potential of the antichagasic drug Rochagan in healthy and chagasic rodents. Mutation Res. 259:139-145.

Sepúlveda-Boza S, Cassels BK.. (1995). Plant metabolites active against *Trypanosoma cruzi* . Planta Médica; 62:98-105.

Taddei-Bringas GA., Santillana-Macedo MA., Romero-Cancio JA., Romero-Téllez MB. (1999). Aceptación y uso de herbolaria en medicina familiar. Salud Pub Mex; 41(3): 216-20.

Tarleton RL, Zhang L. (1999). Chagas' disease etiology: Autoimmunity or parasite persistence?. Parasitology Today 15: 94-99.

Tellez-Iñon MT, Ulloa RM, Torruela M, Torres HN. 1985. Calmodulin and Ca<sup>2+</sup>-dependent cAMP phosphodiesterase activity in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol; 17:143-153.

Tomoyoshi N. and Dvorak J.A. 1991. *Trypanosoma cruzi*: flow cytometric analysis of developmental stage differences in DNA. J. Protozool., 38(3):234-243.

Torres D., Ureña LD., Ortega-Barria E., Capson TL., Cubilla L. (2003). Five new cassane diterpenes from *Myrospermum frutescens* with activity against *Trypanosoma cruzi*. J. Nat. Prod.; 66: 928-932.

Tsopmo A. (2002). Natural Products from Cameroonian Medicinal Plants. Biorganic Chemistry 54, 975-978.

Uchiyama N., Kiuchi F., Ito M., Honda G., Takeda Y., Olimjon K., Ashurmetov OA. (2003). New icetexane and 20-norabietane diterpenes with trypanocidal activity from *Dracocephalum komarovi*. J. Nat. Prod.; 66: 128-131.

Urbina JA. (2002). Chemotherapy of Chagas' disease. Curr Pharm Des 8: 287-295.

Weinert TA., Hartwell LH. 1993. Cell cycle arrest of cdc mutants and specificity of the RAD9 checkpoint. *Genetics* 134:63-80.

Weimann C., Göransson U., Pongprayoon-Claeson U., Bohlin L., Rimpler H., Heinrich M. (2002). Spasmolytic effects of *Baccharis conferta* and some of its constituents. *J of Pharmacy and Pharmacology*; 54:99-104.

Weniger B., Robledo S., Arango GJ., Deharo E., Aragon R., Muñoz V., Callapa J., Lobstein A., Anton R. (2001). Antiprotozoal activities of Colombian plants. *J Ethnopharmacol*; 78(2-3): 193-200.

World Health Organization. 1995. Tropical Disease Research. Report Geneva. P.125.

World Health Organization. 1998. Chagas' disease. Interruption of transmission. *Wkly Epidemiol Rec* 73: 1-4.

Woolsey AM., Sunwoo L., Petersen CA., Brachmann SM., Cantley LC., Burleigh BA. (2003). Novel PI3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J of Cell Science* 116(17):3611-3622.

Zaragoza O., Róman M., Marina V. 1997. Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. *Inves. y Ciencia*; 39:451-462.



Zavala-Velázquez J., Barrera-Pérez M., Rodríguez-Félix ME., Guzmán-Marín E., Ruíz-Piña H. (1996). Infection by *Trypanosoma cruzi* in mammals in Yucatan, Mexico: A serological and parasitology study. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 38(4):289-292.

Zavala-Castro J., Gutiérrez-Flota H., Barrera-Pérez M., Bolio-Solís A., Zavala-Velázquez J. (1995). Cardiopatía chagásica crónica detectada en pacientes del Hospital General O'Horán, Mérida, Yucatán, México. Arch. Inst. Cardiol. Méx. 65:541-545.

## Activity of *Senna villosa* against *Trypanosoma cruzi*

E. Guzmán<sup>3</sup>, R. González<sup>2</sup>, S. Flores<sup>4</sup>, J. Zavala<sup>3</sup>, M. E. Rosado<sup>3</sup>, and S. Pérez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana, México, D. F.; <sup>2</sup>Laboratorio de Virología, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México; <sup>3</sup>Laboratorio de Biología Celular, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México; and <sup>4</sup>Facultad de Biología, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México

### Abstract

Methanol, chloroform and aqueous extracts from *Senna villosa* were tested *in vitro* against epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Methanol and chloroform extracts were found to possess significant activity against both forms of the parasite, while chloroform extract at doses of 1.65, 3.3, and 6.6 µg/mL demonstrated activity similar to gentian violet and allopurinol.

**Keywords:** *Senna villosa*, *Trypanosoma cruzi*

### Introduction

Chagas' disease is an important health problem in South and Central America, with an estimated 16-19 million infected persons (World Health Organization [WHO], 1995). This disease is caused by *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), a flagellate protozoa, a member of Trypanosomatidae family which is characterized by a complex life-cycle involving obligatory passage through vertebrate and invertebrate host in a series of different developmental stages (i.e., epimastigote, trypomastigote, and amastigote) (Nozaki and Dvorak, 1991; Sanchez-Moreno et al., 1995).

At present, benzimidazole (*N*-benzyl-2-nitro-1-imidazoleacetamide), nifurtimox [3-methyl-4/5-nitrofururylidene-amino-tetrahydro (1,4)-thiazino-1,1-dioxido], allopurinol, gentian violet and ketoconazol are used to treat Chagas' disease, but they produce many toxic effects. For this reason, the search for new chemotherapeutic agents is a justification for on-going screening of natural products active against *T. cruzi* and other Trypanosomatidae (de Castro, 1993; Sepúlveda-Boza and Cassels, 1995; Muelas-Serrano et al., 2000).

*Senna villosa*, Leguminosae, commonly known as "Saalché", in Southeastern Mexico, is used as an herbal

remedy for treatment of undefined skin infections, 40  
inflammatory processes and dysmenorrhea. Previously  
studies reported that dicholomethane extract of *Senna  
villosa* leaves possessed activity against *Staphylococcus  
aureus* and *Candida albicans* (Escalante, 1996). Based  
on these findings, we decided to test the activity of meth- 45  
anol, chloroform and aqueous extracts of *S. villosa* leaves  
against epimastigotes and trypomastigotes of *T. cruzi*.

### Materials and methods

#### Plant materia

Plants were collected in the town of Molas, Yucatán, 50  
Mexico, through July through September, 2001. Dr. Sal-  
vador Flores-Guido authenticated the plant material. A  
voucher specimen (10284) was deposited at the herbolar-  
ium of the Faculty of Biology, Universidad Autónoma  
de Yucatán (UADY) in Mérida Yucatan State, Mexico. 55  
The plant's leaves were shade-dried and powdered.

#### Extract preparation

Dried powdered leaves (55 g) were mixed separately with  
600 mL of chloroform, methanol, or water. Each mixture  
was refluxed for 4 h and filtered. Chloroform and meth- 60  
anol extracts were vacuum-dried in a rotating evaporator  
and then dried in a vacuum oven at room temperature  
for 12 h. The aqueous extract was lyophilized, while resi-  
dues were stored at room temperature.

#### Phytochemical screening

 65

A preliminary screening of aqueous, methanol, and  
chloroform extracts showed positive Shinoda and

Accepted: ■

Marini-Bettólo test (Dominguez, 1979) for flavonones. The extracts also tested positive in the Salkowski test for steroids and Liebermann-Buchard reaction for terpenes (Dominguez, 1979).

**Trypanocidal *in vitro* activity**

Activity was assayed on epimastigotes and trypomastigotes of *T. cruzi* strain Y isolated from human, cultured in liver infusion tryptose medium (LIT, Bacto) supplemented with 10% of heat-inactivated fetal calf serum and cultured at 28°C. Experiments were carried out using glass tubes contained  $5 \times 10^6$  protozoas/mL in a final volume of 3 mL, which was homogeneous at early log phase culture of epimastigotes and trypomastigotes (Fournet et al., 1994; Araujo et al., 1999; Muelas-Serrano et al., 2000). Extracts to be tested were dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.6, filtered through a millipore 0.22 µm filter and diluted to reach concentrations of 1.65, 3.3 and 6.6 µg/mL. Extracts were added to tubes for each experiment.

Gentian violet (17.5 mg/mL) was used as positive control. Negative control with parasites without extract was used in each round of the experiment. Parasites were counted daily after contact with extracts using the

Neubauer chamber, for 10 days. Experiments were performed in triplicate and the results were compared with those of controls grown without drug (Osuna et al., 1990; Rojas de Arias et al., 1995; Castilla et al., 1996).

**Statistical analysis**

Results are presented as means ± standard deviation (SD). Statistical significance was determined by one-way analysis of variance followed by DHS of Tukey test, with level of significance set at  $p < 0.05$  (Levin, 1979; Hoel, 1984).

**Results and discussion**

It was found that the methanol, chloroform and aqueous extracts from *Senna villosa* (leaves) have inhibitory activity against the growth of epimastigotes and on trypomastigotes of *T. cruzi* at 3.3 µg/mL. However, it was observed that methanol extract has higher inhibition growth than aqueous and chloroform extracts against both forms of the organisms. For this reason other two concentrations of methanol extract were tested (1.65 and 6.6 µg/mL) on both forms of the parasite (Figures 1 and 2).

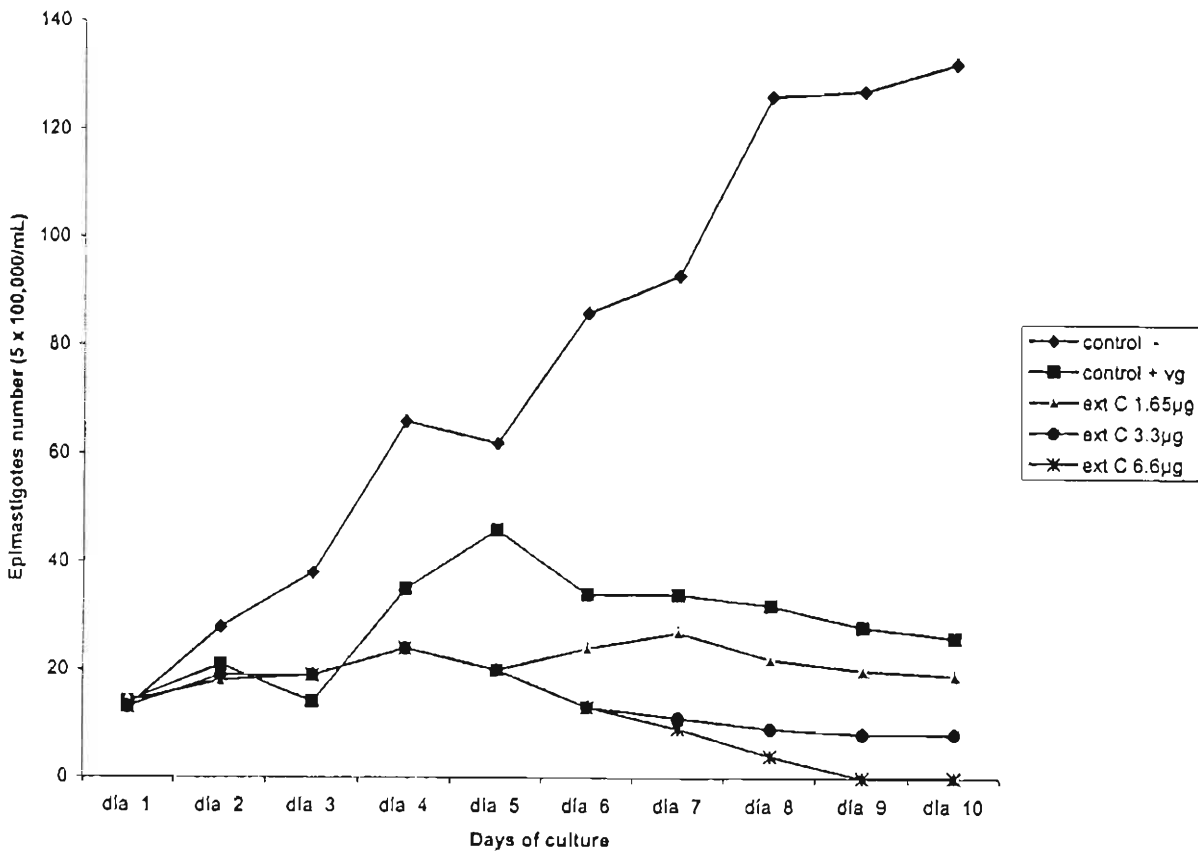


Figure 1 Effect of chloroform extract against epimastigotes of Y *T. cruzi* at doses 1.65, 3.3 and 6.6 µg/mL. Values are the mean ± SD with  $p \leq 0.05$  of three different experiments performed in triplicate.

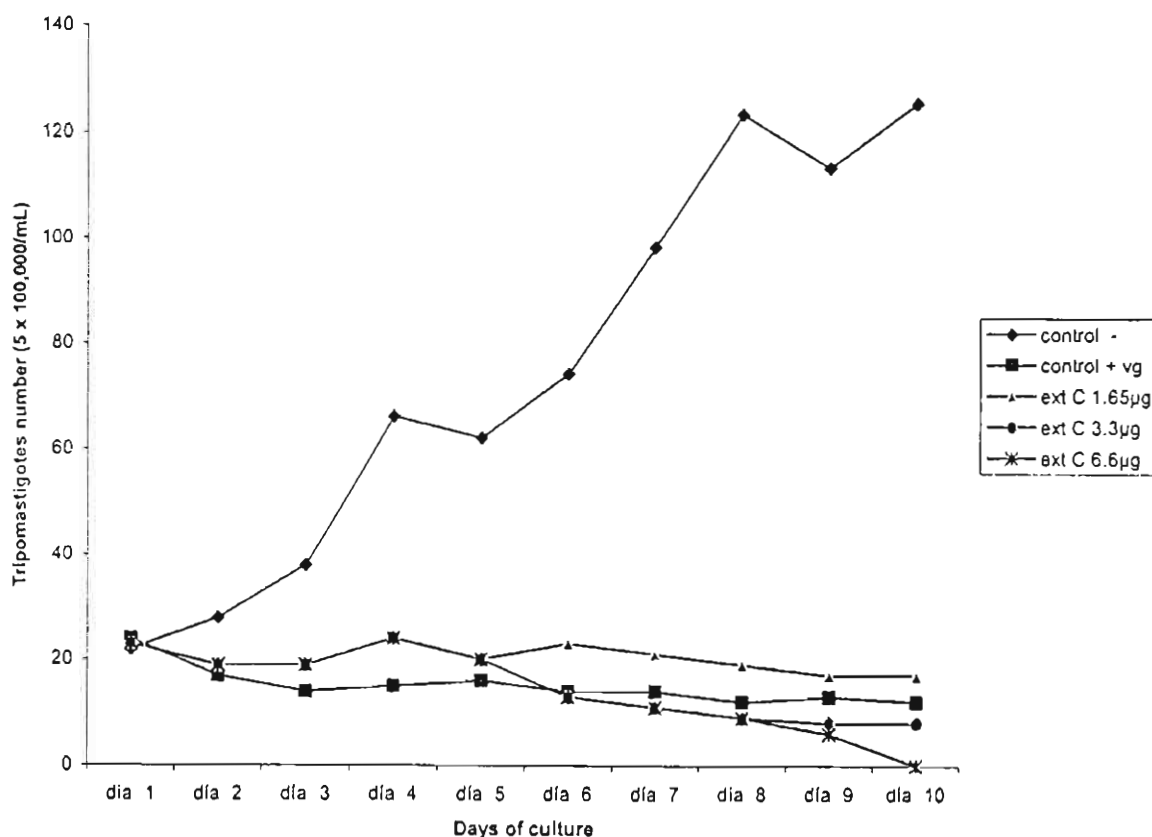


Figure 2. Effect of chloroform extract against tripomastigotes of *Y T. cruzi* at doses 1.65, 3.3 and 6.6 µg/mL. Values are the mean  $\pm$  SD with  $p \leq 0.05$  of three different experiments performed in triplicate.

There was significant difference between 1.65 and 6.6 µg/mL; however, we observed inhibition of growth with all concentrations.

Activity found of *S. villosa* against *T. cruzi* strongly suggested parasitostatic activity. Our results with chloroform extract indicated an ordering of susceptibility in the parasite similar to that obtained with gentian violet (Boyd, 1996; Borris, 1996).

Among compounds found with activity against epimastigotes of *Trypanosoma* species *in vitro* (Rivas et al., 1999; Bastos et al., 1999; Schmidt et al., 2000) are alkaloids, terpenes, lactones, and lignans. Phytochemical screening of *Senna villosa* showed that this plant possesses flavonones, steroids, and terpenes; the latter constituents might explain their activity.

Results of this study demonstrated that chloroform extract from *S. villosa* has antiprotozoal activity against *T. cruzi*. Studies are in progress to characterize other active constituents of this medicinal plant. The present study shows that the phytopharmacological investigations are a way to find new active compounds and new possibilities in therapy against Chagas' disease or other protozoan diseases.

## Acknowledgement

We thank María Eugenia Rosado for her assistance with the parasite cultures. We also thank Milton Rubio for his assistance with statistical analysis. 135

## References

- Araujo CAC, Alegrio LV, Gomes DCF, Lima MEF, Gomes-Cardoso L, Leon LL (1999): Studies on the effectiveness of Diarylheptanoid derivatives against *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 94(6): 791-794. 140
- Bastos JK, Albuquerque S, Silva MLA (1999): Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*. *Planta Medica* 65: 541-544. 145
- Borris RP (1996): Natural product research: perspectives from a major pharmaceutical company. *J Ethnopharmacol* 51: 29-38.
- Boyd MR (1996): The position of intellectual property rights in drug discovery and development from natural products. *J Ethnopharmacol* 51: 17-27. 150

- Castilla JJ, Mesa-Valle CM, Sánchez-Moreno M., Arnedo T., Rosales MJ., Mascaró C., Craciunescu D., Osuna A. (1996): *In vitro* activity and biochemical effectiveness of new organometallic complexes of osmium (III) against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi*. *Arzneim-Forsch/Drug Res* 46 (11), 990–996.
- De Araujo-Jorge TC (1989): The biology of *Trypanosoma cruzi* – macrophage interaction *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 84: 441–462.
- De Castro SL (1993): The challenge of Chagas' disease chemotherapy: An update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 53: 83–98.
- Fournet A, Barrios AA, Muñoz V (1994): Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 41: 19–37.
- Freiburghaus F, Kaminsky R, Nkunya MHH, Brun R (1996): Evaluation of African medicinal plants for their *in vitro* trypanocidal activity. *J Ethnopharmacol* 55: 1–11.
- Hoel P (1984): *Estadística Elemental*. Editorial Continental, 4a Ed. México D.F., pp. 290–300.
- Levin J (1979): *Fundamentos de Estadística en la Investigación Social*. Editorial Harla, México D.F., pp. 164–166.
- Muelas-Serrano S, Nogał JJ, Martínez-Díaz RA, Escario JA, Martínez-Fernández AR, Gómez-Barrio A (2000): *In vitro* screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. *J Ethnopharmacol* 71: 101–107.
- Osuna A, Adroher FJ, Lupiáñez JA (1990): Influence of electrolytes and non-electrolytes on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Diff Dev* 30: 89–95.
- Rojas de Arias A, Ferro E, Inchausti A, Ascurra M, Acosta N, Rodríguez E, Fournet A (1995): Mutagenicity, insecticidal and trypanocidal activity of some Paraguayan Asteraceae. *J Ethnopharmacol* 45: 35–41.
- Sánchez-Moreno M, Fernández-Becerra MC, Castilla-Calvente JJ, Osuna A (1995): Metabolic studies by <sup>1</sup>H NMR of different forms of *Trypanosoma cruzi* as obtained by *in vitro* culture. *FEMS Microbiol. Lett* 133: 119–125.
- Nozaki T, Dvorak JA (1991): *Trypanosoma cruzi*: Flow cytometric analysis of developmental stage differences in DNA. *J Protozoal* 38: 234–243.
- Rivas P, Cassels BK, Morello A, Repetto Y (1999): Effects of some β-carboline alkaloids on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp Biochem Physiol Part C* 122: 27–31.
- Schmidt TJ, Brun R, Willuhn G, Khalid SA (2002): Anti-trypanocidal activity of helenalin and some structurally related sesquiterpene lactones. *Plant Med* 68: 750–751.
- Sepúlveda-Boza S, Cassels BK (1996): Plant metabolites active against *Trypanosoma cruzi*. *Plant Med* 62: 98–105.
- Von Brand T (1980): The metabolism of trypanosomes with special reference to *Trypanosoma cruzi*. *Am J Digest* 319–340.