



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**Estudio de los mecanismos de acción *in vitro* de
Mammea A/BA+A/BB de *Calophyllum brasiliense*
sobre *Trypanosoma cruzi***

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias Biomédicas

P R E S E N T A

Biól. Karla Daniela Rodríguez Hernández

Director de Tesis:

Dra. Bertha Josefina Espinoza Gutiérrez

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Comité tutorial:

Dr. Ricardo Reyes Chilpa (Instituto de Química, UNAM)

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes (Facultad de Química, UNAM)



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos Académicos e Institucionales

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Programa de posgrado Doctorado en Ciencias Biomédicas y al Instituto de Investigaciones Biomédicas por proporcionarme una plantilla académica de excelencia y la infraestructura necesaria para llenar mi vida de conocimiento y grandes experiencias en sus aulas; es un orgullo pertenecer la máxima casa de estudios, UNAM.

A mi tutora la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez por permitir que aprendiera más sobre *T. cruzi*, brindarme su asesoría, experiencia, paciencia durante la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Ricardo Reyes Chilpa por permitir que siguiera descubriendo en mundo de la Fitoquímica, compartir su conocimiento, asesoría, confianza, amistad y apoyo para iniciar y concluir esta tesis.

Al Dr. Marco Antonio Carbon cuyas sugerencias y comentarios en cada evaluación tutorial ayudaron a mejorar y enriquecer este trabajo.

Al M. en C. Ignacio Martínez por su apoyo técnico en el cultivo de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*.

Al Dr. Jorge Iván Castillo Arellano, por su ayuda en la colecta de material vegetal y fotografías de *C. brasiliense*.

A la Unidad de Microscopía del IIBm y al Dr. Miguel Tapia Rodríguez, por su valiosa asesoría técnica para la toma fotografías en el microscopio óptico.

Al LABNALCIT-UNAM y al M. en C. Carlos Castellanos Barba por la capacitación y asesoría en el manejo del citómetro de flujo.

A la Dra. Beatriz Quiroz García, M. en C. Elizabeth Huerta, Quím. María de los Ángeles Peña González, M. en C. Héctor Ríos Olivares, Q.F.B. María del Rocío Patiño Maya, M. en C. Carmen Márquez Alonso, Quím. Eréndira García Ríos, M. en C. Lucero Mayra Ríos Ruiz por el desarrollo de experimentos de

Resonancia Magnética Nuclear y cromatogramas de HPLC en el Instituto de Química, UNAM.

A los miembros del jurado de examen cuyas sugerencias y comentarios ayudaron a mejorar y enriquecer este trabajo:

Dra. Ana María Cevallos Gaos (presidente)

Dra. Bertha Josefina Espinoza Gutiérrez (secretario)

Dr. Ruy Enrique Pérez Montfort (Vocal)

Dr. Guillermo Delgado Lamas (Vocal)

Dr. Javier Rolando Ambrosio Hernández (Vocal)

Este trabajo se realizó con el financiamiento y el apoyo del programa institucional Nuevas Alternativas para Enfermedades Infecciosas “NUATEI” del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Agradezco al programa de apoyo a los estudios de posgrado PAEP-DGAPA-UNAM por su apoyo para la asistencia e inscripción a congresos.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número CVU 663037 otorgada por cinco años (Enero 2015- Enero 2020) para la realización de mis estudios de posgrado.

También se agradece la beca otorgada durante los meses Febrero 2020-Junio 2020 en la modalidad “Obtención de grado” por el proyecto IG200418 PAPIIT-DGAPA, UNAM del Instituto de Química y cuyo titular es el Dr. Ricardo Reyes Chilpa.

Agradecimientos a Título Personal

A mi mamá, quien me brindó su apoyo, confianza, y cariño incondicional y se convirtió en mi mayor ejemplo de fuerza y trabajo duro para concluir uno de los anhelos más grandes de mi vida, mi carrera profesional y un doctorado; que representan la herencia más grande que pudiera recibir y por la cual le agradeceré toda mi vida.

A mi hermana, por vigilar siempre mi desarrollo, aconsejarme y enseñarme desde pequeña que no hay obstáculos porque la perseverancia, disciplina y responsabilidad son esenciales para cumplir nuestras metas.

A mi sobrina Yuliana, quien con su alegría, travesura y preguntas sobre la vida me recuerda todos los días cuanto me gusta ser una curiosa científica.

A mi abuela Maura Silva, por su cariño y oraciones durante toda mi vida.

ÍNDICE

I.	ABREVIATURAS.....	8
II.	FIGURAS Y TABLAS.....	9
III.	RESUMEN.....	11
IV.	ABSTRACT.....	12
V.	INTRODUCCIÓN.....	13
	V.1. Enfermedad de Chagas	13
	V.1.2. Transmisión.....	14
	V.1.3. Enfermedad de Chagas en México.....	15
	V.1.4. Patología de la enfermedad.....	16
	V.2. Agente Causal: <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
	V.2.1. Estadios morfológicos.....	20
	V.2.2. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	22
	V.2.3. Genética y cepas Mexicanas de <i>T. cruzi</i>	24
	V.3. Tratamiento de la Enfermedad de Chagas	25
	V.4. Productos naturales contra Enfermedad de Chagas	27
	V.4.1. El género <i>Calophyllum</i> (Calophyllaceae).....	28
	V.4.2. Fitoquímica de <i>Calophyllum brasiliense</i>	30
	V.4.3. Cumarinas tipo mammea.....	31
	V.4.4. Actividad biológica de cumarinas contra <i>T. cruzi</i>	32
VI.	JUSTIFICACIÓN.....	34
VII.	HIPOTESIS.....	35
VIII.	OBJETIVOS.....	35
IX.	ESQUEMA GENERAL DE METODOLOGÍA.....	36
X.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	37

X.1. Estudio Fitoquímico	37
X.1.1. Material vegetal.....	37
X.1.2. Extracción y aislamiento de compuestos.....	37
X.1.3. Identificación de compuestos.....	37
X.2. Ensayos de actividad Biológica	38
X.2.1. Cultivo de epimastigotes y tripomastigotes de <i>T. cruzi</i>	38
X.2.2. Preparación de compuestos.....	38
X.2.3. Ensayo de viabilidad celular de <i>T. cruzi</i>	39
X.2.4. Determinación de externalización de Fosfatidilserina (FS).....	39
X.2.5. Detección de estrés oxidativo intracelular.....	40
X.2.6. Ensayo de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	41
X.2.7. Análisis de ciclo celular.....	41
X.2.8. Detección de actividad tipo caspasa (metacaspasas).....	41
X.2.9. Ensayo de fragmentación del ADN en gel de agarosa.....	42
X.2.10. Ensayo de detección de autofagia.....	42
X.2.11. Análisis estadístico y reproducibilidad de los resultados.....	43
XI. RESULTADOS	44
XI.1. Estudio fitoquímico	44
XI.1.1. Extracción y aislamiento de compuestos.....	45
XI.1.2. Purificación e identificación de compuestos.....	43
XI.2. Ensayos de actividad biológica	46
XI.2.1. Mamea A/BA afecta la viabilidad de <i>T. cruzi</i>	46

XI.2.2. Mammea A/BA induce exposición de fosfatidilserina y daño a la membrana celular en <i>T. cruzi</i>	48
XI.2.3. Mammea A/BA incrementa las especies reactivas de oxígeno.....	50
XI.2.4. Mammea A/BA induce la despolarización del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	51
XI.2.5. Mammea A/BA aumenta la actividad tipo caspasa en <i>T. cruzi</i>	52
XI.2.6. Mammea A/BA altera el ciclo celular de <i>T. cruzi</i>	54
XI.2.7. Mammea A/BA produce fragmentación de ADN.....	55
XI.2.5. Mammea A/BA induce la formación de vacuolas acídicas.....	56
XII. DISCUSIÓN	57
XIII. CONCLUSIÓN	63
XIV. PERSPECTIVAS	64
XV. REFERENCIAS	65
XVI. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	73

I. ABREVIATURAS

DTU- *Discrete Typing Units*; unidades de tipificación discretas

ROS- Reactive Oxygen Species

QTP- Quimiotipo, fenotipo químico o expresión química de un genotipo

LC₅₀-Concentración letal media

2xLC₅₀- Dos veces la concentración letal media

IC₅₀- Concentración Inhibitoria media

BZ- Benznidazol

NFX-Nifurtimox

CC-FN- Cromatografía en Columna en Fase Normal

Rf- Frente de Referencia químico

RMN¹H- Resonancia Magnética Nuclear de Protón o de Hidrógeno

HPLC-UV- High-Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet detector

RT-Retention time (Tiempo de retención)

DMSO- Dimetilsulfoxido

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle Medium

LIT- Liver Infusion Tryptose Medium

CA- Calceina (Viabilidad, marca células vivas)

HE- Homodímero de Etidio (Viabilidad, marca células muertas)

AV- Annexina V (marca células en apoptosis)

FS- Fosfatidilserina

PI- Yoduro de propidio (marca células necróticas)

DCFDA- 2',7'-dichlorodihIdrofluorescein diacetato

$\Delta\Psi_m$ - Potencial de membrana mitocondrial

CCCP- carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona

Rho 123- Rhodamina 123

FITC-VAD-FMK- fluorescein isothiocyanate (FITC)-pan-caspase inhibitor Val-Ala-Asp (VAD)-fluoromethyl ketone (FMK)

AO- Acridine Orange

II. FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Mapa de regiones endémicas, vectores, reservorios silvestres y domésticos de la enfermedad de Chagas en América.....	13
Figura 2. Número estimado actual de inmigrantes con infección por <i>T. cruzi</i> en países no endémicos.....	14
Figura 3. Fases clínicas de la Enfermedad de Chagas causada por <i>T. cruzi</i>	17
Figura 4. Estructura interna del estadio tripomastigote de <i>T. cruzi</i>	19
Figura 5. Morfología de los principales estadios de <i>T. cruzi</i>	21
Figura 6. Representación esquemática del ciclo de vida e infección de <i>T. cruzi</i>	23
Figura 7. Mecanismo de acción del Nifurtimox y Benznidazol.....	25
Figura 8. Tipos de metabolitos secundarios de plantas y su ruta biosintética.....	28
Figura 9. Fotografías del árbol <i>Calophyllum brasiliense</i> tomadas en el municipio de Tatahuicapan de Juárez, Veracruz.....	29
Figura 10. Estructura de las cumarinas tipo mammea de <i>C. brasiliense</i>	31
Tabla 1. Actividad tripanocida y citotóxica de cumarinas de <i>C. brasiliense</i>	33
Figura 11. Espectro de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹ H) de Mammea A/BA pureza 93.6%, aislada de hojas de <i>C. brasiliense</i>	44
Figura 12. Espectro de HPLC de Mammea A/BA pureza 93.6% (RT=27.38 min), aislada de las hojas de <i>C. brasiliense</i>	45
Figura 13. Efecto de Mammea A/BA y Benznidazol en la viabilidad de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> utilizando la tinción calceína (CA+) y Homodímero de etidio (HE+).....	46
Figura 14. Efecto de Mammea A/BA sobre la viabilidad de <i>T. cruzi</i> . Los parásitos se incubaron con diferentes tratamientos durante 12 h y se tiñeron con CA+/EH+.....	47
Figura 15. Efecto de Mammea A/BA sobre la exposición a fosfatidilserina y el daño a la membrana.....	48
Figura 16. Producción de ROS en <i>T. cruzi</i> después de la exposición con Mammea A/BA	49
Figura 17. Disminución del potencial de membrana mitocondrial de <i>T. cruzi</i>	50
Figura 18. Actividad de las proteasas similares a caspasa (metacaspasas) en epimastigotes y tripomastigotes tratados con Mammea A/BA.....	52

Figura 19. Análisis del ciclo celular en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> tratados con Mammea A/BA durante 12 h.....	53
Figura 20. Escalera de ADN genómico en electroforesis en gel de agarosa de epimastigotes y tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> tratados con Mammea A/BA (12 h).....	54
Figura 21. Detección de vacuolas ácidas en <i>T. cruzi</i> después del tratamiento con Mammea A/BA.....	55
Figura 22. Mecanismo de acción propuesto de Mammea A/BA de <i>C. brasiliense</i> en parásito protozoario <i>T. cruzi</i>	61

III. RESUMEN

La enfermedad de Chagas causada por el protozoario *Trypanosoma cruzi*, se considera un grave problema de salud pública en todo el mundo debido a la falta de una vacuna eficaz y un tratamiento efectivo. En América Latina, la OMS informa una prevalencia de 6 a 8 millones de personas infectadas hasta 2016. Solo dos compuestos; Benznidazol y Nifurtimox, se usan para tratar esta infección. Sin embargo, producen múltiples efectos secundarios y su efectividad es controversial, por lo que existe una gran necesidad de encontrar medicamentos más efectivos contra este parásito. En este trabajo, se evaluó el efecto de Mammaea A/BA + A/BB (90%, 10% respectivamente), aislada de las hojas del árbol tropical *Calophyllum brasiliense*, sobre la cepa Querétaro de *T. cruzi* (DTU1). Se evaluaron los cambios en la actividad de esterasas intracelulares, integridad de la membrana, volumen celular, la exposición a fosfatidilserina, el potencial de membrana mitocondrial, la actividad de las caspasas y el ciclo celular. Nuestros resultados demuestran que Mammaea A/BA mostró una LC_{50} de 85.8 y 36.9 μ M para epimastigotes y tripomastigotes respectivamente reduciendo la actividad de esterasas intracelulares y produciendo un importante daño en la membrana plasmática. Este compuesto también indujo la exposición a fosfatidilserina y aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que produjeron una disminución del potencial de membrana mitocondrial. La actividad de caspasas también estuvo presente en ambas formas de parásitos produciendo daño a la integridad del ADN. Además, Mammaea A/BA produjo la detención del ciclo celular en la fase G1 y la presencia de vacuolas autofágicas en el parásito. Lo anterior, concluye que este compuesto podría ser un recurso prometedor como nueva molécula para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, ya que, en reportes anteriores de nuestro grupo de investigación, este compuesto presentó baja toxicidad en las células Vero y un mayor índice de selectividad que Benznidazol para la fase infecciosa del parásito, por lo que como perspectiva, el estudio de este compuesto en un modelo murino infectado con este parásito sería necesario para demostrar su efectividad.

IV. ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is considered a serious public health problem worldwide due to the lack of effective vaccine and effective treatment. In Latin America, the WHO reports a prevalence of 6 to 8 million people infected in 2016. Only two compounds; Benznidazole and Nifurtimox, are used to treat this infection. However, they produce multiple side effects and their efficacy is controversial, so there is a great need to find more active drugs against this parasite. In this work, the effect of Mammea A/BA+A/BB (90%, 10% respectively), isolated from the leaves of the tropical tree *Calophyllum brasiliense*, on *T. cruzi* Querétaro strain (DTU1) was evaluated. The changes in intracellular esterase activity, membrane integrity, cell volume, phosphatidylserine exposure, mitochondrial membrane potential, caspases-like activity and the cell cycle were evaluated. Our results demonstrate that Mammea A/BA showed an LC₅₀ of 85.8 and 36.9 μ M for epimastigotes and trypomastigotes, respectively. It affected intracellular esterase activity produced important plasma membrane damage and induced phosphatidylserine exposure. An increased reactive oxygen species (ROS) production and decreased mitochondrial membrane potential were detected. The caspase-like activity was present in both parasite forms producing damage of DNA integrity. This compound also induced arrest in the G1 phase of the cell cycle and the presence of autophagic vacuoles in the parasite. This shows that the compound could be a promising resource as a new molecule for the treatment of Chagas disease, since, in previous reports, it had low toxicity for mammalian cells and a higher index of selectivity for the infective phase of the parasite; so, the study of this compound on a murine model infected with *T. cruzi* is necessary.

V. INTRODUCCIÓN

V.1. Enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, pertenece a un grupo de enfermedades tropicales desatendidas NTDs (por sus siglas en inglés, Neglected Tropical Diseases), que afectan principalmente a poblaciones rurales de escasos recursos en los países en vías de desarrollo y cuyo control o eliminación no ha sido considerado prioridad (Cheuka et al., 2017; WHO, 2019). Esta zoonosis se produce por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*; y debe su nombre a Carlos Ribeiro Justiniano Chagas; médico brasileño que describió la enfermedad en 1909. A nivel mundial, se calculan 6 a 7 millones de personas infectadas, 40,000 nuevos casos de infección y 10,000 muertes al año; así como 25 millones de personas en riesgo de adquirir este padecimiento, principalmente en América Latina, donde esta enfermedad es endémica, y se distribuyen los vectores y reservorios silvestres y domésticos (Fig.1) (WHO, 2019).

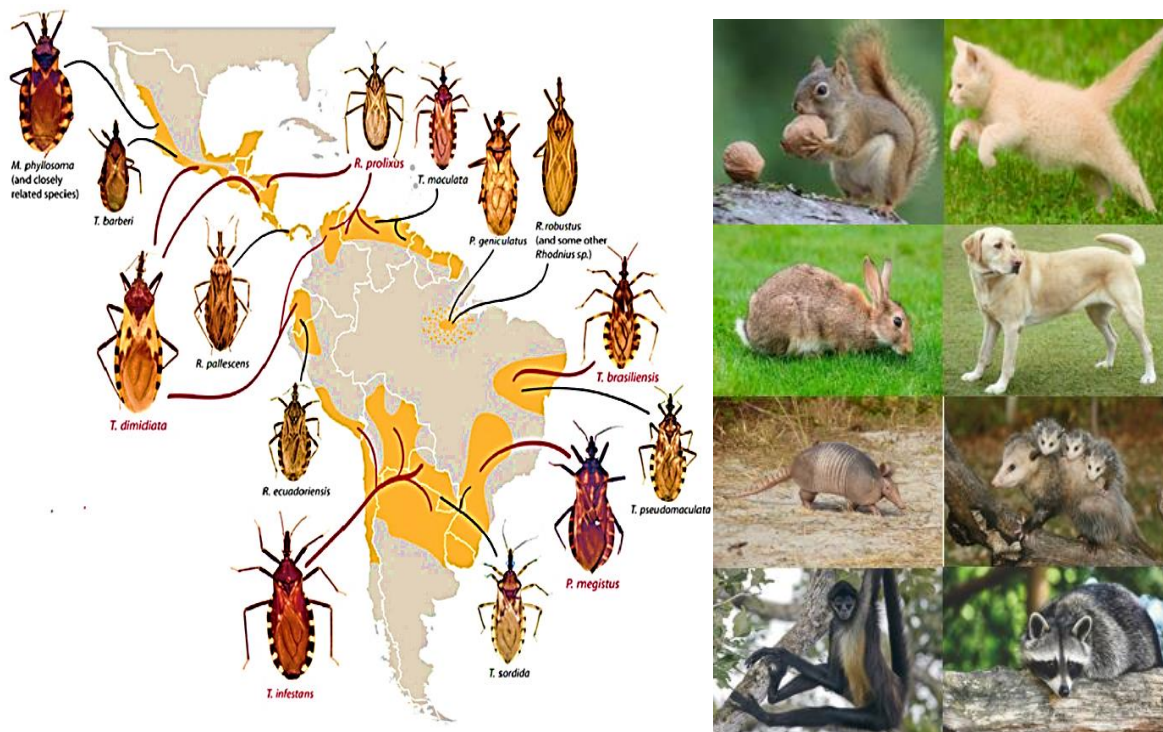


Figura 1. Mapa de regiones endémicas, vectores, reservorios silvestres y domésticos de la enfermedad de Chagas en América. El mapa muestra las 14 especies de vectores y las cinco especies más importantes indicadas en rojo: *Triatoma*, *Rhodnius*, *Panstrongylus* y *Meccus* (Tomado de Guhl, 2017).

Aunque esta enfermedad es endémica de América Latina; en los últimos años se han reportado pacientes infectados en otras áreas del mundo como Estados Unidos de América, Canadá, países europeos como España y algunos del Pacífico Occidental, debido a la migración de la población de América Latina al resto del mundo y a los diferentes mecanismos de transmisión del parásito (Fig. 2) (WHO, 2019). De acuerdo con la WHO, la carga económica mundial de la enfermedad de Chagas es de más de 7.2 mil millones de dólares por año, superando los costos de otras enfermedades de impacto en la salud, como cáncer (\$6.7 mil millones para el cáncer uterino, \$ 4,7 mil millones para el cáncer de cuello uterino y \$ 5.3 mil millones para la administración oral cáncer) o infecciones por rotavirus (\$ 2 mil millones).

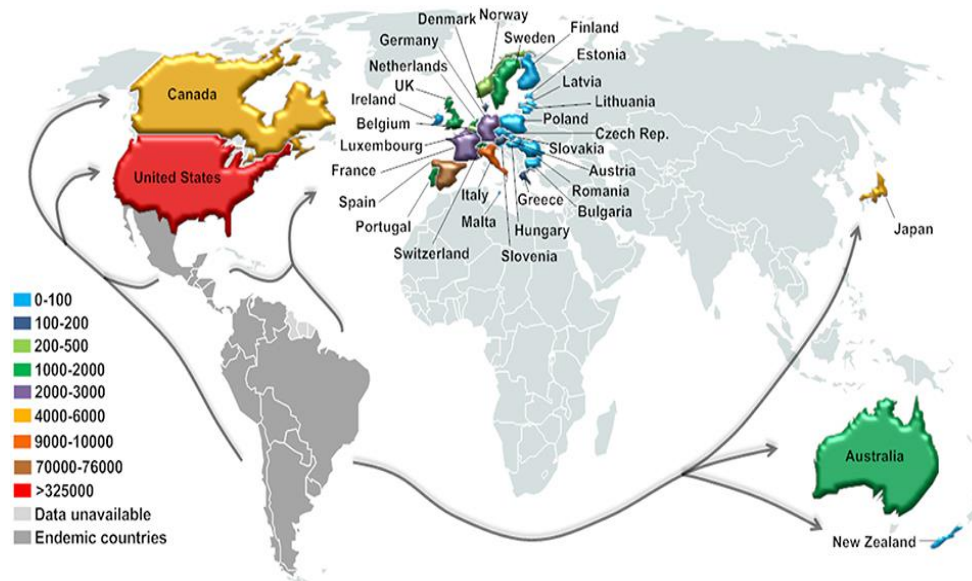


Figura 2. Número estimado actual de inmigrantes con infección por *T. cruzi* en países no endémicos. Estimación basada en datos de los Estados Unidos (2007) y Canadá (2006), Europa (2008–2011), Japón (2007), Australia (2011) y Nueva Zelanda (2006) (Tomado de Lidani et al., 2019).

V.1.2. Transmisión

La enfermedad de Chagas se transmite entre animales domésticos (perros y gatos) y salvajes (primates, roedores y marsupiales) así como entre humanos, principalmente por vía vectorial representando aproximadamente el 70% de las infecciones. En segundo lugar, se encuentra la transmisión congénita, que es responsable del 26% de los casos. Un pequeño número de personas (<1% de cada una de las siguientes categorías), se infectan por transfusión o trasplante de órganos de donantes infectados con este

parásito; accidentes de laboratorio y consumo de líquidos y alimentos contaminados con heces de vectores infectados o carne de animales infectados mal cocidos (Bonney et al., 2019).

III.1.3. Enfermedad de Chagas en México

La enfermedad de Chagas sigue siendo una de las enfermedades parasitarias más relevantes en América Latina, pero su epidemiología en México aún es poco conocida. Desde hace algunos años la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud de México han estimado cerca de 1.1 millones de personas infectadas con *T. cruzi*; una incidencia nacional de 0.78% por cada 100,000 habitantes hasta 2017 y cerca de 30 millones de personas en riesgo de contraer la infección. A partir del año 2000, se ha observado un incremento en la notificación de casos. Desde el período 2000 al 2017, se han registrado cerca de 9,981 casos agudos y crónicos; donde los estados con mayor tasa de incidencia por cada 100,000 habitantes han sido Veracruz y Yucatán (4.0), Oaxaca, Chiapas y Jalisco (2.4), Morelos (2.1), seguido de Estado de México, Hidalgo, Guerrero (0.96), Querétaro, Quintana Roo (0.8) y Nayarit (0.7) (Rojo-Medina et al., 2018; INDRE, 2019).

La tasa de mortalidad hasta 2017 fue de 0.02 para hombres y 0.01 para mujeres por cada 100 mil habitantes, lo que significa que, al comparar por sexo; este padecimiento afecta principalmente al grupo masculino, registrando 2.1 casos masculinos por un caso femenino. La mortalidad predomina en hombres, donde aproximadamente 30% presentan manifestaciones crónicas y 70% puede tener afecciones leves y los grupos de edad más afectados han sido de 45 a 49 años, seguido de 25 a 44 años. Esta mortalidad, se ha registrado mayoritariamente en los estados de Oaxaca, Guerrero y Veracruz (Rojo-Medina et al., 2018; INDRE, 2019).

Para el diagnóstico serológico, México utiliza diferentes pruebas de acuerdo a la fase clínica de la infección en el paciente. En la fase aguda los estudios se centran en la búsqueda y reconocimiento de *T. cruzi* en sangre (abordaje parasitológico), ya que en esta etapa la parasitemia es muy alta y va disminuyendo hasta hacerse inaparente conforme avanza la infección. En la fase crónica (asintomática o sintomática) las parasitemias son transitorias y por ello el diagnóstico se realiza mediante la búsqueda de

anticuerpos circulantes contra el parásito mediante Hemaglutinación indirecta (HAI), Ensayo inmunoenzimático (ELISA) o Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) (Secretaría de Salud, 2019).

La transmisión vectorial es la más frecuente en México donde se han reportado ocho géneros y 31 especies de triatominos. Las especies intradomiciliarias más comunes son *Triatoma barberi*, asociada con miocardiopatías y megas (dilataciones) de órganos del tracto digestivo, y *Triatoma dimidiata*, distribuida desde los países andinos y de Centroamérica hasta México, asociada con cardiopatías. Otras, especies identificadas y sus porcentajes de infección relacionados con la transmisión al humano son: *Triatoma longipennis* (34 %), *Triatoma pallidipennis* (23 %) y *Triatoma dimidiata* (29 %) (Rojo-Medina et al., 2018).

Respecto a la transmisión congénita, un trabajo publicado por Arnal y colaboradores, realizó un meta análisis basado en búsqueda bibliográfica y se reportó una prevalencia de 3,193 casos de recién nacidos infectados congénitamente al año (Arnal et al., 2019) . La infección por transfusión sanguínea también fue evaluada, ya que representa el segundo mecanismo de transmisión más importante después de la vectorial. En este estudio, la prevalencia nacional en donantes de sangre fue 0.55%. Con lo que se puede concluir que México se coloca como uno de los países latinoamericanos con mayor número de casos de Enfermedad de Chagas, destacando la urgencia nacional en el desarrollo de nuevas y mejores pruebas de diagnóstico, control vectorial y la búsqueda de nuevos tratamientos contra esta infección, para garantizar que no siga siendo una barrera importante para el desarrollo económico y social de las poblaciones más vulnerables de México (Dumonteil & Herrera, 2017).

V.1.4. Patología de la Enfermedad de Chagas

El curso clínico de la enfermedad de Chagas se caracteriza por dos fases: aguda y crónica (asintomática o sintomática) (Fig. 3). La fase aguda se caracteriza por una parasitemia de alto grado, en pocos casos es sintomática y a menudo se confunde con enfermedades virales a menos que exista un signo obvio de infección, como inflamación en el sitio de la picadura del insecto (chagoma) o edema periorbitario unilateral que se desarrolla después de la infección conjuntival (signo de Romana). Dentro de los síntomas

encontramos fiebre prolongada, dolor de cabeza, mialgia, linfadenitis, y hepatomegalia. Aproximadamente el 1% de las personas desarrollan linfadenopatía, hepatoesplenomegalia, miocarditis, derrame pericárdico e insuficiencia cardíaca o meningoencefalitis que generalmente cesan dentro de los 60 días, incluso sin el uso de medicamentos etiológicos. Durante esta fase, los parásitos son detectables en sangre durante 2 a 4 meses ya que después de este periodo la parasitemia disminuye y las manifestaciones clínicas desaparecen espontáneamente en el 90% de los casos, cuando la enfermedad entra a la fase crónica asintomática o indeterminada (Bonney et al., 2019).

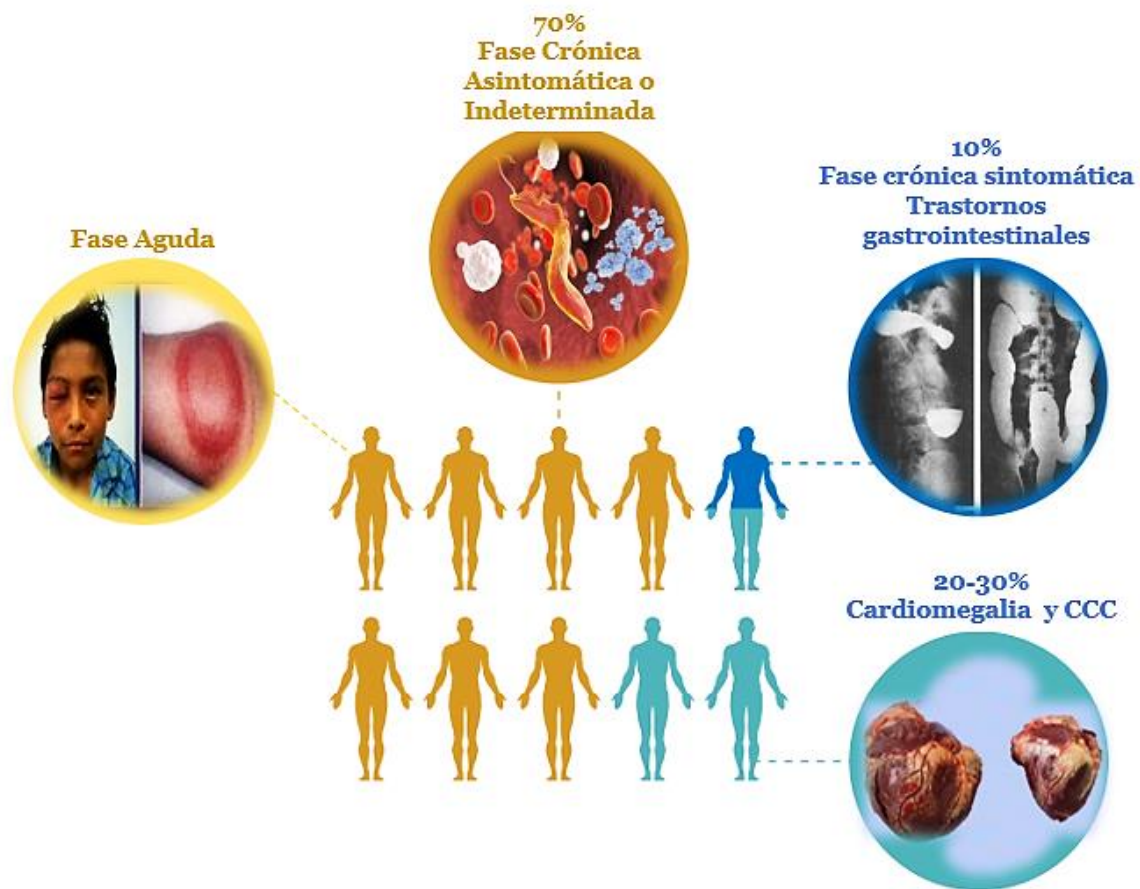


Figura 3. Fases clínicas de la Enfermedad de Chagas causada por *T. cruzi*. Pocas personas mueren durante una infección aguda por arritmias cardíacas fatales, cerca del 70% viven vida normal sin desarrollar secuelas adversas y aproximadamente el 10% desarrolla megaesófago o megacolon, y 20-30% desarrolla cardiomiopatía chagásica crónica(CCC) (Modificado de Bonney et al., 2019).

La fase crónica asintomática o indeterminada es una infección de bajo nivel que dura desde un año a décadas sin disfunción orgánica y sin ningún síntoma clínico, pero con serología positiva. En esta fase, los parásitos pueden también ser detectados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la presencia de anticuerpos específicos contra *T. cruzi*. Históricamente, no ha sido posible predecir con precisión qué individuos de fase indeterminada progresarán a un estado de enfermedad crónica; sin embargo, se encontró una asociación entre los niveles del biomarcador de daño miocárdico microARN-208a circulante en plasma del huésped para predecir el riesgo de progresión a etapa crónica (Linhares-Lacerda et al., 2018).

Aproximadamente el 30% de las personas progresan a la fase crónica sintomática. En estos individuos, la cardiomiopatía chagásica crónica (CCC) es la manifestación clínica más importante de la enfermedad debido a la frecuencia con que se desarrolla (20-30% de las personas infectadas) y a su gravedad, morbilidad y mortalidad. Es una enfermedad compleja que incluye un amplio espectro de manifestaciones, desde inflamación del miocardio hasta disfunción sistólica del ventrículo izquierdo debido al daño tisular por fibrosis que altera el movimiento de la pared segmentaria produciendo miocardiopatía dilatada, arritmias, eventos tromboembólicos e importante insuficiencia cardíaca que puede producir la muerte (Pérez-Molina and Molina, 2018).

Además de la afectación cardíaca, la enfermedad de Chagas también puede afectar el tracto gastrointestinal y el sistema nervioso. Los síntomas gastrointestinales en los pacientes crónicos de Chagas se deben a la denervación del sistema nervioso entérico que regula las funciones motoras del tracto digestivo. Aunque las manifestaciones gastrointestinales más comunes son megaesófago y megacolon, los parásitos pueden afectar cualquier parte del tracto gastrointestinal, desde las glándulas salivales hasta el recto, esta condición disminuye la calidad de vida del paciente ya que producen estreñimiento constante y dificultad para deglutir (disfagia). La enfermedad de Chagas gastrointestinal (~10%) se observa con mayor frecuencia en individuos infectados en América del Sur, como Ecuador y el centro de Brasil. Se cree que la distribución geográfica de esta forma de la enfermedad es el resultado de una variación subespecífica entre las poblaciones regionales de *T. cruzi* (Lidani et al., 2019).

V.2. Agente Causal: *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es un protozoo flagelado perteneciente al Orden Kinetoplastida, Familia Trypanosomatidae. Los organismos agrupados en este orden se caracterizan por la presencia de ADN extranuclear almacenado en un orgánulo exclusivo llamado cinetoplasto, localizado dentro de una única mitocondria (Fig. 4).

La clasificación taxonómica del parásito es la siguiente (Rassi *et al.*, 2012):

Dominio: Eucarya

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum:
Sarcomastigophora

Clase:
Zoomastigophorea

Orden: Kinetoplastida

Familia:
Kinetoplastidae

Género: *Trypanosoma*

Especie: *cruzi*

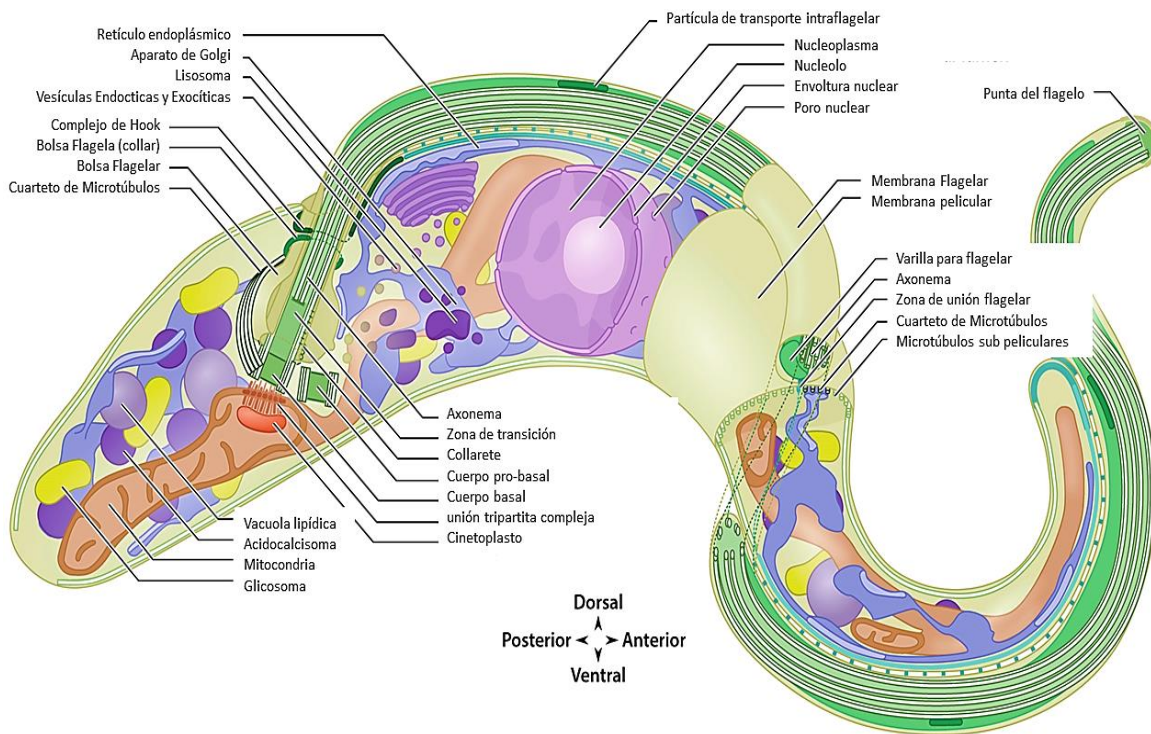


Figura 4. Estructura interna del estadio tripomastigote de *T. cruzi*. Dibujada de acuerdo los orgánulos observados en Microscopía electrónica. Modificado de Wheeler et al., 2019.

V.2.1. Estadios Morfológicos

Este parásito presenta cuatro diferentes estadios morfológicos durante su ciclo de vida: epimastigote, tripomastigote metacíclico, tripomastigote sanguíneo y amastigote (Souza, 2009, Teixeira et al., 2012):

Epimastigote: Tiene un tamaño de 20-40 μm de largo, Es fusiforme, con un flagelo que emerge de la parte media del parásito y es más pequeña que la del estadio tripomastigote. El cinetoplasto se encuentra anterior al núcleo, que se localiza en posición central. Este estadio se encuentra en el tracto digestivo del vector, se multiplica por fisión binaria longitudinal y no posee capacidad infectiva. Esta forma es la más ampliamente utilizada en los experimentos de laboratorio, debido a la facilidad de obtener un gran número de células con poca infraestructura, ya que *in vitro* proliferan logarítmicamente después de 72-90 horas en cultivos axénicos.

Tripomastigote metacíclico: Tiene un tamaño de 16-42 μm y 1-3 μm de diámetro. Es alargado, tiene núcleo central y un gran cinetoplasto en la región posterior al núcleo, posee un cuerpo basal y una bolsa flagelar posterior de donde surge un flagelo que le confiere movimiento. Este estadio no presenta capacidad de reproducción y es la forma que penetra e infecta al hospedero mamífero, al ser depositada en las heces del triatomino. Morfológicamente es muy semejante al tripomastigote sanguíneo, y en cultivo *in vitro* se diferencia a partir de cultivos de epimastigotes en fase estacionaria, sometidos al proceso de metaciclogénesis.

Tripomastigote sanguíneo: Tiene un tamaño de 20-25 μm y 2 μm de diámetro. Es flagelado, alargado, cinetoplasto posterior al núcleo; presenta un flagelo que emerge en forma libre en el extremo anterior del parásito. Este estadio se encuentra en tejidos y torrente sanguíneo del huésped vertebrado infectado. No tiene capacidad replicativa, pero si capacidad para invadir células en el huésped mamífero. *In vitro* pueden obtenerse a partir de células de mamífero infectadas con tripomastigotes sanguíneos que dentro de las células se replican como amastigotes intracelulares, los cuales después de varios ciclos de replicación se transforman a tripomastigotes, lisan las células y se liberan en el medio de cultivo.

Amastigote: Es la forma intracelular encontrada en los mamíferos. Mide de 2-4 μm . Posee forma redondeada, carece de flagelo y por lo tanto de movimiento; tiene un gran núcleo cerca del cual se encuentra el cinetoplasto. Tiene capacidad infectiva y de replicación por fisión binaria simple. *In vitro* puede obtenerse tras la infección de células de mamífero infectadas con tripomastigotes sanguíneos o metacíclicos que dentro de estas se diferencian a amastigotes en un proceso conocido como amastigogénesis; se replican y se diferencian a tripomastigotes sanguíneos que infectan nuevas células (Souza, 2009)

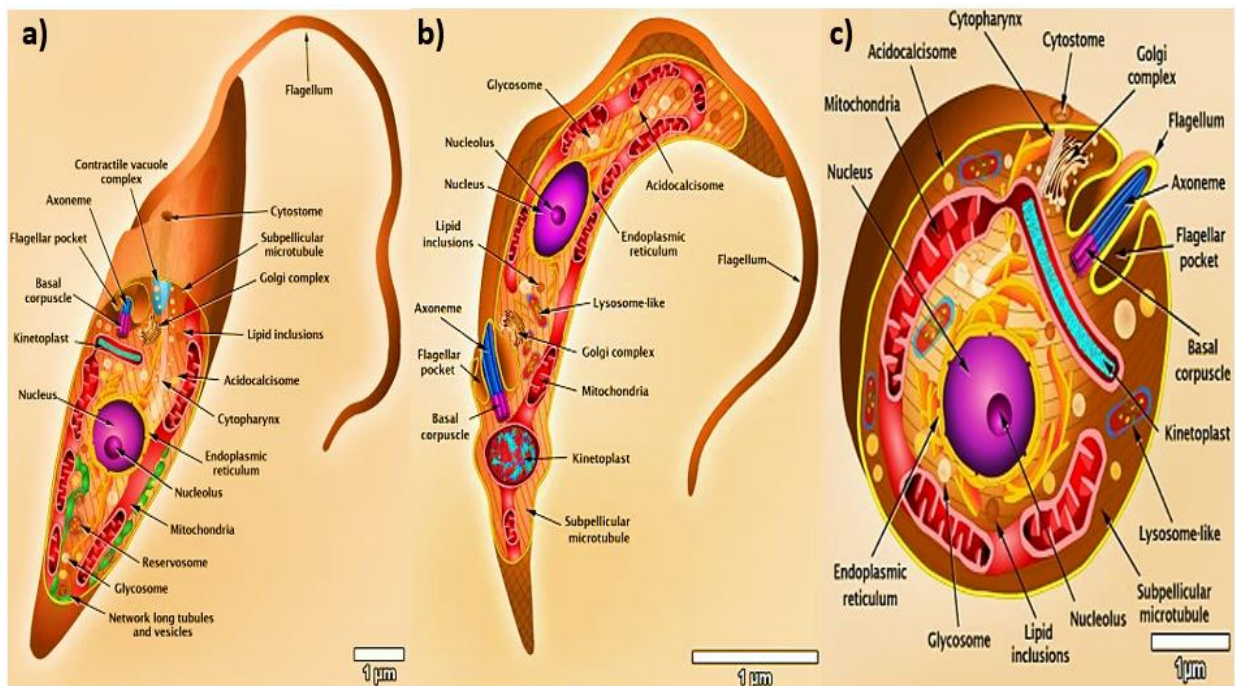


Figura 5. Morfología de los principales estadios de *T. cruzi*. a) epimastigote, b) tripomastigote, c) amastigote. Cada estadio se diferencia en cuanto a su forma, posición del flagelo y bolsa flagelar, núcleo y cinetoplasto, Barra= $1\mu\text{m}$ (Imagen modificada de Teixeira et al., 2012).

V.2.2. Ciclo de vida de *T. cruzi*

El ciclo de vida de *T. cruzi* es difásico, ya que se desarrolla en organismos diferentes como el vector invertebrado y un mamífero, que es el hospedero definitivo. El ciclo comienza cuando el insecto triatómino no infectado se alimenta de sangre de un mamífero infectado con *T. cruzi*, ingiriendo el estadio tripomastigote sanguíneo. Una vez en el tracto digestivo del vector, los parásitos pasan al intestino medio y se transforman en epimastigotes; se duplican por fisión binaria en el intestino posterior y cuando llegan al recto, realizan el proceso de metaciclogénesis, transformándose en tripomastigotes metacíclicos (estadio infectivo) que salen con las heces del insecto cuando este vuelve a alimentarse. Los parásitos en este estadio entran al torrente sanguíneo del huésped mamífero cuando este se frota o rasca la región de la picadura del insecto, empujando las heces hacia la lesión. Dentro del hospedero, los parásitos pueden invadir cualquier tipo de célula nucleada (principalmente macrófagos, fibroblastos y células epiteliales). En el interior de estas, los tripomastigotes se internalizan en las células, pierden su flagelo y se transforman en amastigotes, multiplicándose por fisión binaria y cuando el número de estos es muy elevado, se transforman en tripomastigotes sanguíneos, lisan a la célula y salen libres al torrente sanguíneo para afectar tejidos al invadir más células, en las que se transformarán nuevamente en amastigotes replicativos, o cerrarán el ciclo de vida al ser ingeridos nuevamente por un insecto vector (Fig. 6) (Pérez-Molina & Molina, 2018).

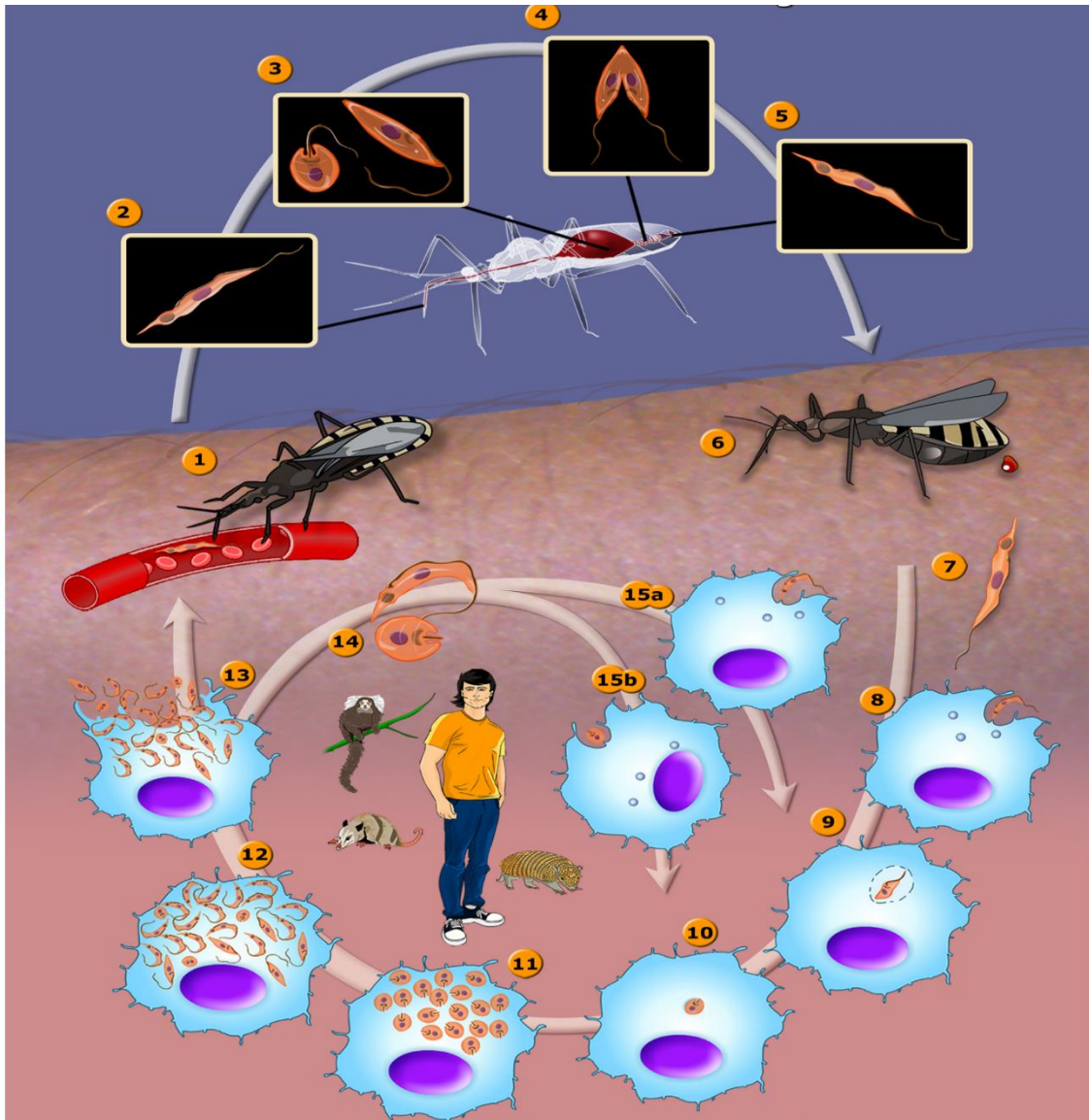


Figura 6. Representación esquemática del ciclo de vida e infección de *T. cruzi*. (1) El insecto pica a un huésped mamífero e ingiere tripomastigotes sanguíneos (2). En el insecto los tripomastigotes se transforman en epimastigotes (3). Los epimastigotes se multiplican en el intestino medio (4) y se transforman en tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior (5) que son liberados en las heces del insecto cerca de un sitio de picadura después de alimentarse (6, 7). Los tripomastigotes metacíclicos viajan por el torrente sanguíneo, hasta internalizarse en células nucleadas por medio de una vacuola parasitófora (7, 8). El tripomastigote se transforma en amastigote (9). El amastigote se libera de la vacuola (10) y se multiplica en el citoplasma (11). Los amastigotes se transforman en tripomastigotes (12) que son liberados de la célula (13) como tripomastigotes y amastigotes (14). Los tripomastigotes sanguíneos cierran el ciclo (1) o como amastigotes (15a) y tripomastigotes (15b) infectan a los macrófagos. En la parte central de la figura, se muestran reservorios de animales involucrados en el mantenimiento del parásito en el entorno doméstico y peri doméstico. (Tomado de Teixeira et al., 2012).

V.2.3. Genética y cepas Mexicanas de *T. cruzi*

Estudios previos han mostrado que *T. cruzi* presenta heterogeneidad genética importante, la cual se refleja en una gran diversidad de características biológicas (Espinoza et al., 2010). Debido a esto, la población de cepas de aislados de esta especie, ha sido agrupada en seis unidades de tipificación discretas o DTUs (por sus siglas en inglés, *Discrete Typing Units*): TcI, TcII, TcIII, TcVI, TcV y TcVI (Zingales et al., 2012).

En México, la mayoría de las cepas de *T. cruzi* analizadas genéticamente pertenecen al grupo genético I (TcI). Sin embargo, estudios recientes han reportado la presencia de cepas de linajes genéticos TcII-TcVI en nuestro país, lo cual demuestra que existe una mayor diversidad genética de lo que se tenía contemplada para *T. cruzi* (Bosseno et al., 2002; Brenière et al., 2016). En la epidemiología del parásito, esto resulta relevante, ya que la diversidad genética podría ser responsable de las diferentes formas clínicas de la infección y la presencia de cepas resistentes al tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio con dos cepas mexicanas, llamadas Ninoa y Querétaro, pertenecientes al grupo genético I (TcI), han demostrado que a pesar de pertenecer al mismo linaje, estas cepas presentan características biológicas diferentes en cuanto a la tasa de crecimiento, metacicloogénesis, infectividad en modelo *in vitro* y características bioquímicas contrastantes en cuanto a la cantidad de proteínas de superficie que interactúan con la célula hospedera; por ejemplo, Querétaro presenta 86 proteínas y Ninoa 68 (López-Olmos et al., 1998). Estas han presentado diferencias en cuanto a la virulencia en modelo murino, siendo la cepa Querétaro 50% más infectiva que la cepa Ninoa, ya que invade más rápidamente a la célula hospedero (Espinoza et al., 2010; Vizcaíno-Castillo et al., 2014) y han mostrado diferencias en cuanto a su respuesta a fármacos como beznidazol, nifurtimox y productos naturales (Martínez et al., 2013; Rodríguez-Hernández et al., 2019).

V.3. Tratamiento de la Enfermedad de Chagas

El tratamiento de esta infección se basa en el uso de dos fármacos: El nitrofurano Nifurtimox y el nitroimidazol Benznidazol, que son efectivos en un 40-60% en casos agudos y congénitos. Sin embargo, debido a la presencia del grupo nitro en ambas moléculas, dan lugar a varios problemas de toxicidad, carcinogenicidad, hepatotoxicidad, mutagenicidad y supresión de la médula por lo que ambos fármacos producen numerosos efectos adversos (fig. 7). Además, su eficacia de curación depende de la fase y duración de la enfermedad, edad del paciente, genotipo y susceptibilidad de *T. cruzi* ya que algunas cepas han desarrollado resistencia a ambos medicamentos (Lidani et al., 2019; Sales et al., 2017).

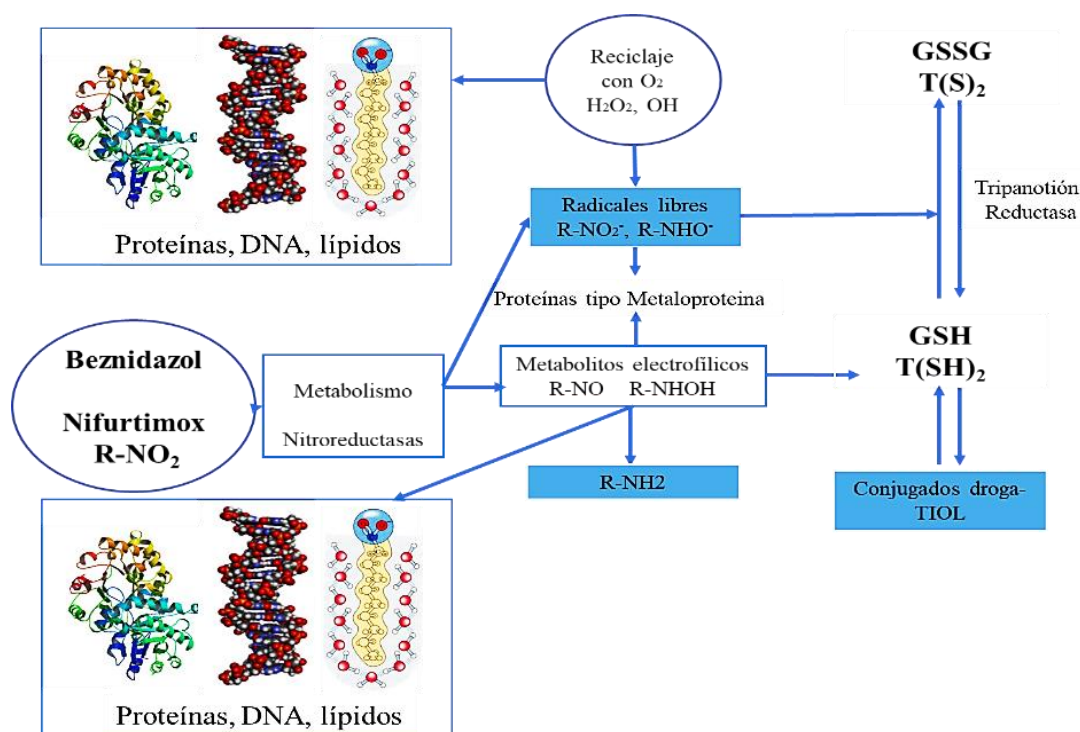


Figura 7. Mecanismo de acción del Nifurtimox y Benznidazol. El grupo nitro de ambos fármacos se reduce a radicales libres o metabolitos electrofílicos por la acción de nitrorreductasas. El radical nitroanión del nifurtimox puede unirse directamente al tripanotión ($T(SH)_2$) y glutatión (GSH) del parásito, evitando la neutralización de los metabolitos de ambos fármacos en el mismo o bien puede entrar a un ciclo redox con el oxígeno presente y formar H_2O_2 por acción de la enzima SOD. El peróxido de hidrógeno y el radical superóxido pueden a su vez formar el radical hidroxilo, el cual va a unirse a las macromoléculas del parásito (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, $T(SH)_2$ y GSH libre). Los metabolitos electrofílicos formados a partir de benznidazol también pueden afectar a estas macromoléculas (Imagen modificada de Werner y Zulantay, 2011).

El Nifurtimox fue el primer fármaco utilizado y se administra por vía oral en tres o cuatro dosis orales de 10 a 15 mg/Kg/día durante 60 a 90 días. La tasa de curación en la fase aguda varía de 86% en niños menores de 14 años a 7–8% en adultos. La frecuencia de los efectos adversos es muy alta y entre ellos se encuentran anorexia, pérdida de peso, trastornos neurológicos (irritabilidad, insomnio, desorientación, cambios de humor, parestesias y neuropatía periférica), manifestaciones digestivas como náuseas y vómitos y, ocasionalmente, fiebre y erupción cutánea. Lo que promueve la suspensión del tratamiento en 75% de los casos (Pérez-Molina and Molina, 2018).

El Benznidazol generalmente se prefiere al Nifurtimox debido a su mejor perfil de tolerabilidad, mayor penetración en el tejido y mayor eficacia. Se administra por vía oral en dos o tres dosis de 5-7.5 mg/Kg/día, generalmente durante de 60-120 días. Se recomiendan dosis más altas de hasta 15 mg / kg en casos de meningoencefalitis. Según algunos informes, 30 días de tratamiento pueden ser útiles para adultos con infección crónica. Este compuesto tiene una actividad considerable durante las fases aguda y temprana de la infección por *T. cruzi*: la curación serológica se logra en hasta el 100% de los pacientes con enfermedad congénita tratados durante el primer año de vida y en el 76% de los pacientes con enfermedad aguda, 60–93% en niños, pero las tasas de curación son mucho más bajas en adultos con enfermedad crónica tardía 2-40%. Dentro de los efectos adversos se incluyen hipersensibilidad (erupción cutánea), intolerancia digestiva como anorexia, astenia, dolor de cabeza y trastornos del sueño. La neuropatía y depresión, así como afectaciones en médula ósea se consideran raras. El tratamiento se suspende en 9 a 29% de los casos, aunque estas reacciones son reversibles y graves en menos del 1% de los casos. En pocos casos los síntomas secundarios pueden tratarse con antihistamínicos, corticosteroides o ambos, sin embargo, en un gran número de pacientes el tratamiento se interrumpe cuando la toxicidad es muy grave (Sales et al., 2017).

V.4. Productos naturales contra Enfermedad de Chagas

La inversión en el descubrimiento de fármacos para enfermedades desatendidas como la Enfermedad de Chagas no ha sido atractiva para las compañías farmacéuticas debido a que estas no pueden recuperar el alto costo del desarrollo y la producción de medicamentos ya que este tipo de enfermedades afectan a la población más pobre del mundo, por lo que aún existe gran necesidad de búsqueda de nuevas terapias efectivas y seguras. En los últimos años se ha propuesto a los productos naturales como candidatos prometedores, en gran parte inexplorados, para la identificación de nuevos medicamentos (Cheuka et al., 2017).

Estos compuestos son metabolitos producidos por plantas y otros organismos para proporcionar un beneficio evolutivo (defensa) y pueden originarse de varias rutas biosintéticas, como la ruta metileritrol fosfato, la ruta del mevalonato y la ruta del ácido shikímico (Fig. 8) dando como resultado una amplia variedad de estructuras complejas con potente actividad biológica en varios tipos de células y características benéficas en parámetros farmacocinéticos.

Como resultado, estas moléculas representan cerca del 49% de los medicamentos dirigidos contra una amplia gama de enfermedades desde 1981 a 2014, como productos naturales o derivados estructurales de los mismos (Newman and Cragg, 2016). Dentro de las propiedades químicas de este tipo de moléculas se ha revelado que la mitad de ellos cumplen con la Regla de 5 de Lipinski que indica que para que un principio activo pueda ser administrado vía oral no debe violar más de una de las siguientes consideraciones: No más de 5 donadores de puentes de hidrógeno (NH, OH), no más de diez aceptores de puentes de hidrógeno (N, O, F), peso molecular inferior a 500 unidades de masa atómica y no debe poseer un coeficiente de reparto octanol-agua ($\log P$) inferior a 5. Por lo tanto, se absorben más fácilmente que las drogas sintéticas y podrían tener mejor actividad y menor toxicidad (Cheuka et al., 2017).

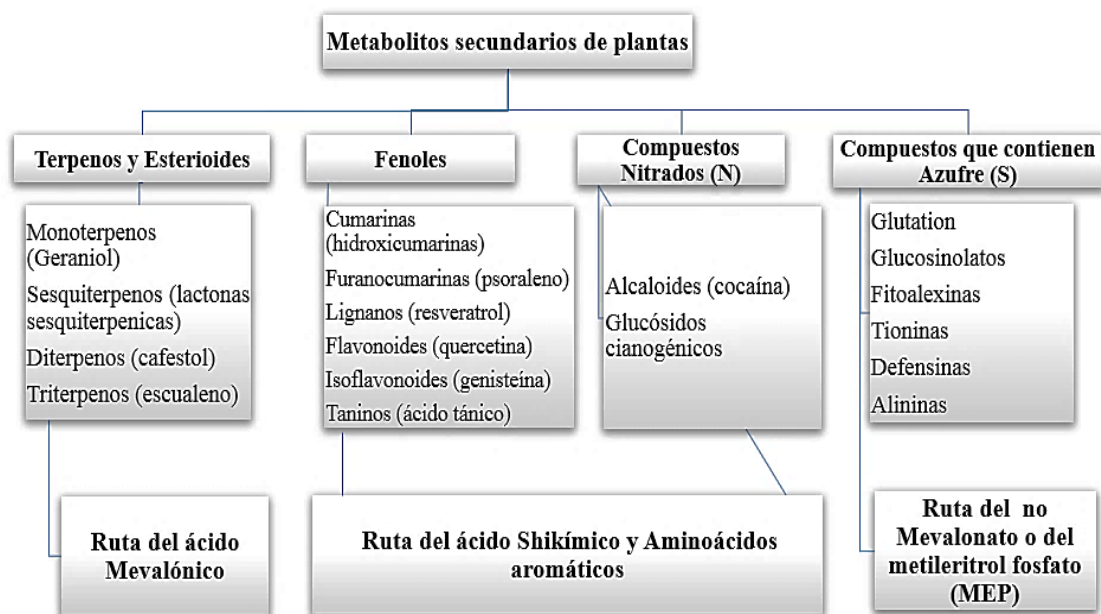


Figura 8. Tipos de metabolitos secundarios de plantas y su ruta biosintética.

V.4.1 El género *Calophyllum* (Calophyllaceae)

Etimológicamente, *Calophyllum* significa “hoja bonita” y *brasiliense* “de Brasil”, por su origen geográfico (García-Zebadúa et al, 2014) (Fig. 9). Es un árbol conocido comúnmente como “Bari” ó “Santa María”, “Guaya” (Chiapas, Oaxaca y Tabasco), “Palo María” (Nayarit) “Guanadi” (Brasil) (CONABIO, 2019) y se ha utilizado en la medicina tradicional para tratar enfermedades como: bronquitis, problemas hepáticos o gástricos, dolor, inflamación, úlceras crónicas, hipertensión, reumatismo, herpes, diabetes, lombrices o diarrea (García-Zebadúa et al, 2014).

Es un árbol tropical caducifolio que mide 20-50 metros, es dioico y crece en bosques tropicales húmedos (25°C) distribuidos desde Brasil hasta México, en este último es el único representante de su género (CONABIO, 2019), se caracteriza por poseer copa redondeada, extendida y densa, con hojas decusadas, simples, opuestas de 6 x 2.5 a 14 x 5.5 cm, elípticas u oblongas, con margen entero y venas secundarias; sus flores son masculinas y hermafroditas, acomodadas en panículas axilares de 2.6 a 5 cm, éstas son numerosas, muy pequeñas, de color blanco y actinomórficas; sus frutos son de tipo drupa o baya de 1.8-3 cm de largo; semillas ovoides o esféricas de 1.7-2.2 cm de largo y color blanco amarillentas, sin endospermo, su tronco es cilíndrico y recto con madera de textura fina, cuyas fibras poseen potencial para elaborar papel (CONABIO, 2019).

Debido a la calidad de su madera, *C. brasiliense* se ha cultivado en varios países de América Latina con fines comerciales. Además, de que este árbol tiene la capacidad de crecer en suelos pobres, rocosos, húmedos e inundados por lo que se ha considerado una buena opción para la reforestación y la recuperación del suelo (Castillo-Arellano et al., 2019).



Figura 9. Fotografías del árbol *Calophyllum brasiliense* tomadas en el municipio de Tatahuicapan de Juárez, Veracruz. a) árbol, b) corteza, c) hojas y frutos d) inflorescencia (Fotografías tomadas por Jorge Iván Castillo Arellano y Karla D. Rodríguez).

V.4.2 Fitoquímica de *Calophyllum brasiliense*

En general los principales compuestos de *C. brasiliense* han sido aislados de los extractos de sus hojas y se han clasificado en 7 grupos diferentes: esteroides, triterpenos, flavonoides, cromononas, benzopiranos, xantonas y cumarinas. De estas últimas existen tres tipos: las dipiranocumarinas tetracíclicas, tricíclicas y las cumarinas tipo mammea (Castillo-Arellano et al., 2019; García-Zebadúa et al., 2014; Su et al., 2008). Muchos de estos compuestos han mostrado tener importantes propiedades farmacológicas como: efecto gastro protector, antiespasmódico, analgésico, antibacteriano (Venugopala et al., 2013), actividad antitumoral y citotóxica (Reyes-Chilpa et al., 2004; Ruiz-Marcial et al., 2007) y antiprotozoaria contra *T. cruzi* y *Leishmania* (Brenzan et al., 2008, 2007; M A Brenzan et al., 2012; Honda et al., 2010; Rea et al., 2013; Reyes-Chilpa et al., 2008).

En México, se han descrito dos quimiotipos (QTP) de *C. brasiliense*. El término quimiotipo se ha definido como un "fenotipo químico" o la "expresión química de un genotipo" (Zavaleta-Mancera et al., 2011). Las muestras del Herbario Nacional de México indican que *C. brasiliense*-QTP1 es escaso, mientras que *C. brasiliense* -QTP2 es bastante más abundante (García-Zebadúa et al., 2014). El primer quimiotipo (QTP1) sintetiza en las hojas cumarinas tipo mammea como compuestos mayoritarios, que son citotóxicas *in vitro* contra líneas celulares tumorales humanas (Reyes-Chilpa et al., 2004), *Leishmania* sp. y *Trypanosoma cruzi* (Brenzan et al., 2007b; Reyes-Chilpa et al., 2008). Las xantonas de la corteza del tallo tienen actividad quimioprotectora contra el cáncer (Gómez-Verjan et al., 2017) y la fracción diclorometano de la corteza tiene actividad anti-*Helicobacter pylori in vitro e in vivo* (Souza et al., 2009).

El segundo quimiotipo (QTP2) de *C. brasiliense* sintetiza en las hojas las cromononas como compuestos mayoritarios, principalmente ácido apetalico y ácido shikímico, y como componentes minoritarios de las dipiranocumarinas tetracíclicas, como los calanólidos A, B, C y soulatrólido. El ácido apetalico ha mostrado una buena actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* (Gómez-Cansino et al., 2015) y contra las líneas celulares tumorales humanas KB y HeLa humanas. Las dipiranocumarinas tetracíclicas exhiben propiedades antivirales contra el VIH-1 y son los productos naturales anti-VIH más importantes desde la perspectiva farmacológica (García-Zebadúa et al., 2014).

V.4.3. Cumarinas tipo mammea

Son un grupo de metabolitos secundarios con un esqueleto 2H-1-benzopirano-2-ona denominado cumarina. Estos compuestos fenólicos derivan del ácido 2-hidroxi-cinámico por ciclización de la cadena lateral del ácido o-cumarico. Se encuentran en gran abundancia en las plantas y junto con las xantonas han atraído considerable interés por su actividad antitumoral, antiviral, anti-inflamatoria, antioxidante y antiprotozoaria (Venugopala et al., 2013).

El nombre “mammea” se debe a que inicialmente fueron aisladas de hojas, flores y frutos de árboles del género *Mammea*, pero también se han encontrado en *C. brasiliense*. De acuerdo a la clasificación propuesta por Crombie et al., 1987, el nombre de cada compuesto “mammea” es seguido por una letra que designa el tipo de sustituyente localizado en el carbono 4. Así, las diferentes letras utilizadas son las siguientes:

A: Fenilo **B:** Propilo **C:** Pentilo **D:** 1-metilpropilo **E:** 1-acetoxipropilo

Una diagonal separa a la letra anterior, según sea el caso, de una segunda, la cual indica si el sustituyente acilo está presente, así como la posición de este con respecto al sustituyente prenilo:

A: 6-acilo ó **B:** 8-acilo

Una tercera letra define el tipo de sustituyente acilo (Fig. 10):

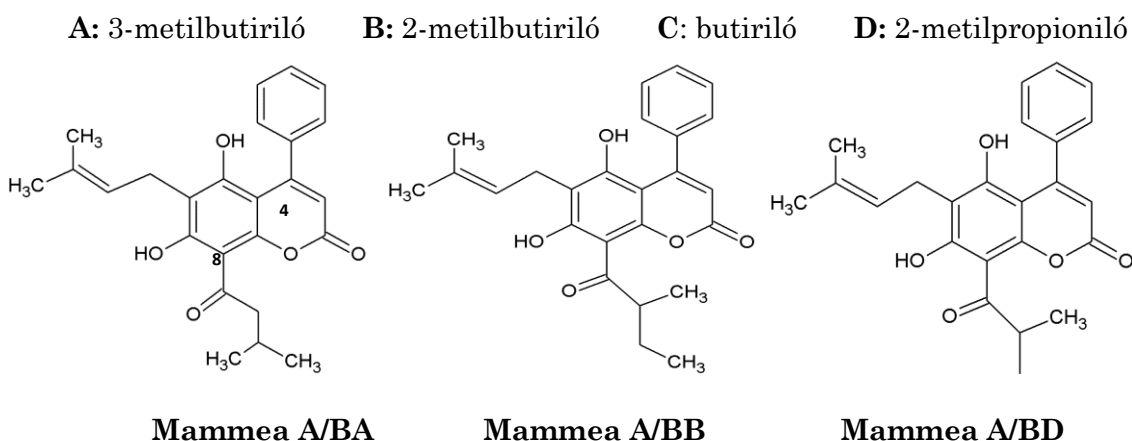


Figura 10. Estructura de las cumarinas tipo mammea de *C. brasiliense*.

V.4.4. Actividad biológica de cumarinas contra *T. cruzi*

En 2002, Abe y colaboradores realizaron un tamizaje de 43 extractos de 39 plantas pertenecientes a 20 familias, probando su actividad *in vitro* contra epimastigotes de la cepa H6 de *T. cruzi*, originaria de Guatemala (TcI). De estos extractos, 18 mostraron buena actividad a una concentración de 1 y 2 mg/mL después de 2-48 horas de incubación. Los extractos de los árboles *C. brasiliense*, *Mammea americana* y *Garcinia intermedia* mostraron la mayor actividad (Clusiaceae) es este estudio (Abe et al., 2002).

Este mismo grupo de investigación, aisló algunos de los compuestos presentes en dos de las plantas que en el trabajo anterior habían mostrado alta actividad tripanocida. Los compuestos aislados fueron Gutiferona A, (8-desoxigartanina), amentoflavona, garcinixantona B y podocarpusflavona A, presentes en el extracto de CH₂Cl₂-MeOH de *G. intermedia* (Clusiaceae); y de los cuales la gutiferona A fue el principal compuesto tripanocida (MC₁₀₀=Epimastigotes: 60 µg/mL y Tripomastigotes: 50 µg/mL). Del extracto de *C. brasiliense* se aislaron jacareubina, 6-deoxijacareubina, 1, 3, 5, 6-tetrahidroxi-2-(3-metil-2-butenil)-xantona, que mostraron alta actividad *in vitro* contra epimastigotes y tripomastigotes de la cepa H6 de *T. cruzi* (TcI) (Abe et al., 2004).

En 2004, investigaciones de Reyes-Chilpa y colaboradores demostraron que, a partir del extracto hexánico de las hojas de *C. brasiliense* se podían obtener con un gran rendimiento, compuestos conocidos como “cumarinas tipo mammea”, siendo las más abundantes la mammea A/BA y A/BB, que representaron aproximadamente el 1.5% del peso seco de hojas (Reyes-Chilpa et al., 2004). Continuando con dicha investigación, se examinó la actividad de diferentes cumarinas tipo mammea aisladas de *C. brasiliense*, sobre los estadios epimastigote y tripomastigote de la cepa H6 de *T. cruzi*. En este trabajo, las cumarinas que presentaron mayor actividad sobre tripomastigotes fueron la mammea A/BA, A/BB, A/BD y B/BA, en un rango de 25-90 µg/mL (Tabla1). Estos compuestos mostraron altos índices de selectividad (SI) sobre los parásitos y resultaron tener baja citotoxicidad para linfocitos humanos normales *in vitro* en un intervalo de 126.45- 223.78 µg/mL. Además, en un informe preliminar de Ruiz-Marcial et al., 2007 se indicó que, una mezcla de mammea A/BA y A/BB administrada vía intraperitoneal fue inocua para ratones en un intervalo de dosis de 2-3500 mg/Kg y administrada en dosis repetidas de 20 mg/Kg cada tres días durante un mes, proponiendo a estos

compuestos como una fuente prometedora de fármacos tripanocidas (Gomez-Verjan et al., 2015; Reyes-Chilpa et al., 2008).

Tabla 1. Actividad tripanocida y citotóxica de cumarinas de *C. brasiliense*

Compuesto	MC ₁₀₀ (µg/mL)	MC ₁₀₀ (µg/mL)	LC ₁₀₀ (µg/mL)	IS (LC ₁₀₀ /MC ₁₀₀)	IS (LC ₁₀₀ /MC ₁₀₀)
	Epimastigote	Tripomastigote	Linfocitos	Epimastigote	Tripomastigote
Mammea A/BA	15	30	126.45	8.43	4.21
Mammea A/BB	25	25	ND	ND	ND
Mammea A/BD	30	90	ND	ND	ND
Mammea B/BA	15	25	223.78	14.91	8.95

*MC₁₀₀=Concentración que inhibió la movilidad de los parásitos en un 100%. LC₁₀₀=Concentración que afecta la viabilidad de linfocitos. ND: No determinada. IS: índice de selectividad. Tomado de Reyes-Chilpa *et al.*, 2008.

En 2007 y 2008, Brenzan y colaboradores probaron la actividad de la cumarina (-) Mammea A/BB para inhibir el crecimiento de *Leishmania amazonensis* y *L. braziliensis* (Brenzan *et al.*, 2007, Brenzan *et al.*, 2008). Esta investigación demostró que este compuesto fue activo a una concentración letal (IC₅₀) de 3 µg/mL en promastigotes y 0.88 µg/mL en amastigotes, además presentó baja citotoxicidad contra macrófagos humanos *in vitro* a 25.8 µg/mL, por lo que resultó ser más selectivo para los protozoarios. En este mismo trabajo, la forma promastigote tratada durante 72 horas con 3 µg/mL de compuesto se analizó mediante microscopía electrónica de transmisión y manifestó considerables cambios ultraestructurales como: hinchazón mitocondrial, membranas concéntricas en la matriz mitocondrial e intensa actividad exocítica en la región de la bolsa flagelar, aparición de células binucleadas y vacuolización citoplasmática múltiple, proponiendo diferentes mecanismos de acción para estos compuestos sobre tripanosomátidos (Brenzan *et al.*, 2008, 2007; M.A. Brenzan *et al.*, 2012).

VI. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas es una de las enfermedades desatendidas que afecta a poblaciones pobres de países en desarrollo, y debido al costo que representa el desarrollo de nuevos fármacos ha quedado excluida de los mercados farmacéuticos. El tratamiento para este padecimiento se ha basado en el uso de Nifurtimox y Benznidazol, los cuales presentan una tasa de cura muy baja en pacientes crónicos y múltiples efectos secundarios; además, los parásitos han desarrollado resistencia a ambos medicamentos. Ninguno de estos fármacos es producido en México y su disponibilidad a nivel mundial es escasa; por esta razón se ha planteado que la investigación de productos naturales puede proporcionar elementos útiles para la producción de nuevos fármacos con mayor actividad, menor toxicidad o servir como modelo para realizar derivados semisintéticos más potentes y específicos contra las diferentes formas del parásito. Investigaciones anteriores han demostrado que las “cumarinas tipo mammea” de las hojas de *C. brasiliense*, pueden obtenerse con un buen rendimiento y presentan potente actividad tripanocida y leishmanicida. Recientemente, nuestro grupo de investigación purificó y evaluó la actividad tripanocida *in vitro* de las cumarinas tipo Mammea A/BA, ABB y A/BD de *C. brasiliense*, sobre la fase epimastigote y tripomastigote de tres cepas mexicanas de *T. cruzi* con características biológicas y genéticas diferentes. Nuestros resultados indican que estos compuestos poseen mayor actividad que el Benznidazol, afectando la movilidad, crecimiento, morfología, ultraestructura y capacidad infectiva de los parásitos provocando estrés y muerte por diferentes mecanismos aun no caracterizados (Rodríguez-Hernández et al., 2019). Por lo que, es necesario continuar el estudio de estos compuestos *in vitro* para indagar sus mecanismos de acción; pues estos estudios permitirán determinar si estos compuestos podrían ser una opción para el tratamiento de la enfermedad de Chagas o servir como modelo para realizar derivados semisintéticos más potentes, específicos, con menor toxicidad y mayor selectividad.

VII. Hipótesis:

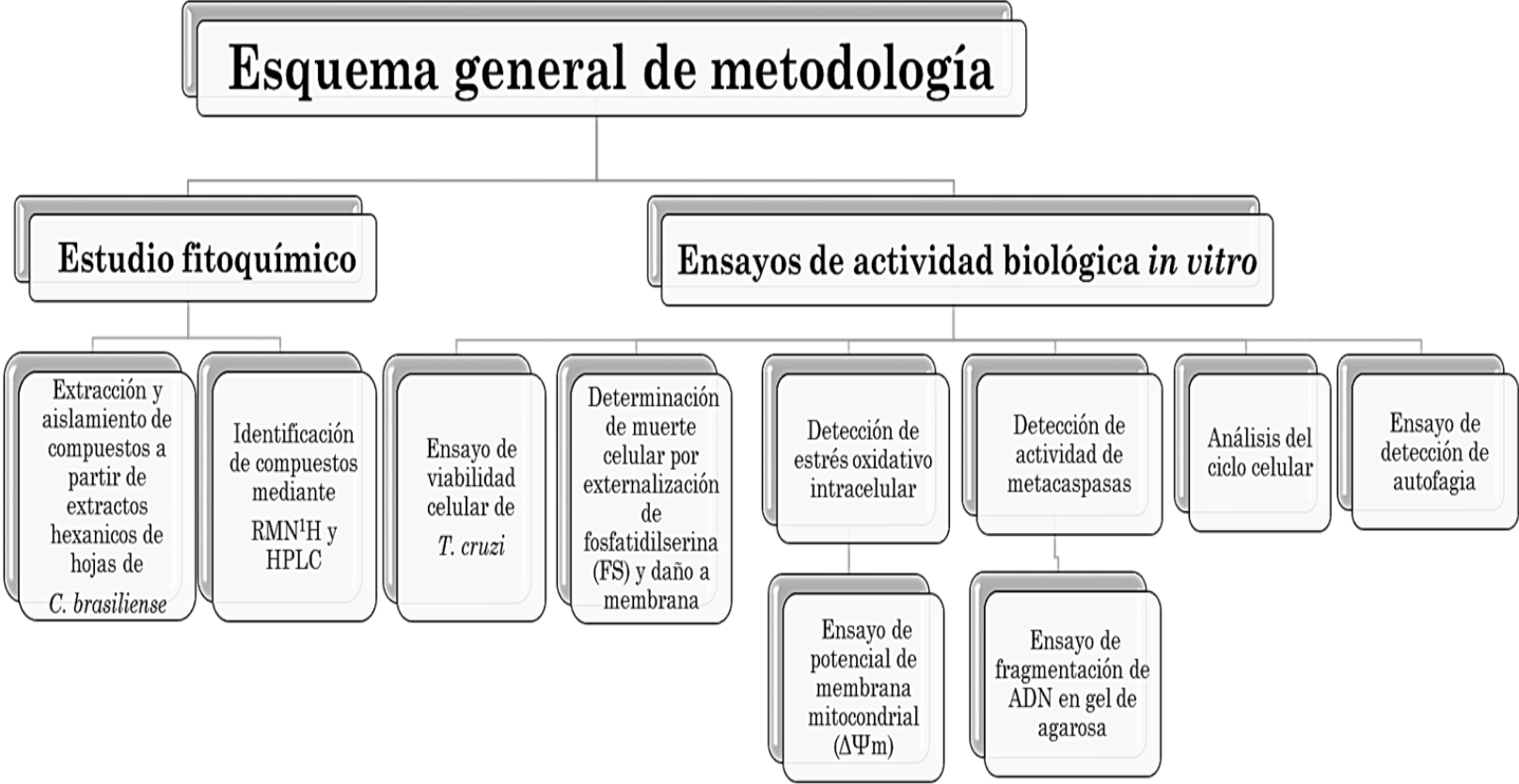
Las cumarinas tipo Mamea A/BA+A/BB inducirán diferentes mecanismos de muerte celular en epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* bajo condiciones *in vitro*.

VIII. Objetivo general:

Caracterizar los mecanismos celulares responsables de la actividad tripanocida de la Mamea A/BA+A/BB aisladas de *C. brasiliense* en un modelo *in vitro* de *T. cruzi*.

Objetivos particulares:

- Extraer, purificar e identificar cumarinas tipo Mamea a partir de extractos de hojas de *C. brasiliense*.
- Determinar el tipo de muerte celular inducida por las cumarinas tipo Mamea en un modelo *in vitro* de *T. cruzi*.



X. MATERIALES Y MÉTODOS

X.1. Estudio fitoquímico

X.1.1. Material vegetal

Las hojas de *C. brasiliense* se colectaron en terrenos de selva tropical húmeda en la localidad de Tatahuicapan de Juárez, Estado de Veracruz, México; 18° 18' 23.4'' Norte; 94° 96'13'' Oeste, durante enero de 2014. Las muestras de herbario ya identificadas se depositaron en el Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social con el número de folio 16131.

X.1.2. Extracción y aislamiento de compuestos

Las hojas de *C. brasiliense* (550 g) secas a temperatura ambiente se extrajeron con hexano a temperatura ambiente hasta agotamiento y se concentraron "al vacío" en un rotavapor. Posteriormente, el extracto se pre-absorbió en celita, para separar sus constituyentes por cromatografía en columna fase normal (CC-FN) sobre gel de sílice-60 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) eluyendo con una fase móvil de n-hexano-acetato de etilo (90:10). Las fracciones en forma de cristales fueron observadas por cromatofolios de CCF-FN, con luz ultravioleta a 254 nm y 366 nm, antes de realizar un revelado permanente con sulfato de cério o sulfato cérico 1M en H₂SO₄, 2N. La presencia de cumarinas tipo Mamea se determinó utilizando un estándar de Mamea A/BA puro y determinando el R_f (frente de referencia).

X.1.3. Identificación de compuestos

Las fracciones cristalizadas obtenidas por métodos cromatográficos se identificaron mediante datos de resonancia magnética nuclear de protón (RMN¹H) usando un espectrómetro Varian XL 300 (300 MHz, CDCl₃ / TMS, δ ppm). Los espectros se procesaron con el software MestReNova, versión 6.02-5475, 2009 y se compararon con publicaciones anteriores (Crombie et al., 1987; Reyes-Chilpa et al., 2004; Reutrakul et al., 2003).

La pureza de los compuestos se determinó por HPLC (sistema Alliance HPLC con un detector UV de matriz de diodos). Las muestras (5 mg) se disolvieron con 1 ml de MeOH, se filtraron y se inyectaron (10 μ L) en una columna Eclipse XDB-C8 ODS (150 \times 4,6 mm; tamaño de partícula de 5 μ m). La elución fue en modo gradiente escalonado, con CH₃CN / H₂O en proporción 5: 95–55: 45 v/v (0–10 min), 55:45–80:20 v/v (10–20min), 80:20–100 v/v (20–30 min) y 100 (30–40 min) en una cantidad de 1 ml/min. Los compuestos eluidos se monitorearon a 335 nm.

X.2. Ensayos de actividad biológica *in vitro*

X.2.1. Cultivo de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*

Para este estudio se utilizó la fase epimastigote y tripomastigote de la cepa TBAR / MX / 0000 / Querétaro (TcI, cepa virulenta) de *T. cruzi*. Los epimastigotes se cultivaron en medio LIT, suplementado con SFB al 10% y 25 μ l / ml de hemina y se mantuvieron a 28 ° C durante 3-4 días en cultivo durante la fase logarítmica de crecimiento (Espinoza et al., 2010; Martínez et al., 2013).

La fase tripomastigote se obtuvo a partir de cultivo de células Vero (células epiteliales de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*) cultivadas en DMEM, pH 7.6, más SFB al 10%, 2 mg / ml de glutamina en una atmósfera de CO₂ al 5% a 37 ° C. Después de la formación de monocapa, las células se infectaron con tripomastigotes obtenidos de sangre infectada de ratones Balb/c. Después de cinco días, los parásitos se recogieron del sobrenadante de cultivo por centrifugación a 12,800xg durante 30 minutos. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se suspendió a las concentraciones apropiadas para los experimentos (Pérez-Morales et al., 2017).

X.2.2. Preparación de compuestos

La solución de trabajo de Mammea A / BA, se preparó asépticamente en DMSO y se diluyó para obtener una concentración que no excedía el 1% de DMSO en los experimentos. Los epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* se incubaron con los compuestos a concentraciones que oscilaban entre 15.4-246 μ M durante 12 h. El Benznidazol (BZ) fue utilizado a 384.6 μ M como control positivo, ya que, en otros informes, esta fue la

concentración más alta para inhibir el crecimiento y la movilidad de las cepas mexicanas de *T. cruzi* (Martínez et al., 2013).

X.2.3. Ensayo de viabilidad celular de *T. cruzi*

La viabilidad de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* se determinó usando el LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Este kit discrimina rápidamente las células vivas de las muertas mediante la tinción simultánea con calceína AM (verde fluorescente) para indicar actividad de esterasa intracelular y homodímero de etidio (rojo fluorescente) para indicar la pérdida de integridad de la membrana plasmática. Los parásitos (2×10^6 / ml) se incubaron a 28 ° C (epimastigotes) o 37 ° C (tripomastigotes) en placas de 24 pozos y se trataron con diferentes concentraciones de Mamea A/BA (15.40 a 246 μ M). Después de 12 h de incubación, los parásitos se centrifugaron a 3,421xg durante 10 minutos para eliminar el medio; el pellet con los parásitos se resuspendió en 997 μ l de PBS, 2 μ l de una solución de calceína-AM (CA) 50 μ M y 1 μ l de una solución de homodímero de etidio (HE) 2 mM. Luego, las muestras se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente y se analizaron inmediatamente en un citómetro de flujo (BD FACSCalibur) con un filtro de 530/30 nm (FL1-H) para calceína (CA) (fluorescencia verde / células vivas) y 670 nm / Long-pass filter (FL3-H) para HE (fluorescencia roja / células muertas), en cada experimento se adquirieron 20,000 eventos por tratamiento. Los datos se analizaron utilizando el software FlowJo 7.3.2 y se expresaron como el porcentaje de células para cada fenotipo de población. La compensación se realizó utilizando parásitos vivos cultivados en medio LIT y teñidos solo con CA+ y parásitos muertos por calor (55 ° C durante 10 min) teñidos con HE+ (Pérez-Morales et al., 2017; Sepúlveda-Robles et al., 2019).

X.2.4. Determinación de externalización de fosfatidilserina

Para determinar si los parásitos tratados con Mamea A/BA murieron por necrosis o apoptosis, se utilizó Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Este producto detecta la externalización de la fosfatidilserina en células apoptóticas utilizando anexina V (AV) conjugada con el colorante verde-fluorescente FITC y células muertas son distinguidas mediante el colorante rojo fluorescente yoduro de propidio (PI)

que tiñe las células necróticas. Para esto, los parásitos se cultivaron con Mamea A/BA. El antibiótico antimicina A (187,5 μM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) fue utilizado como control positivo (Lazarin-Bidóia et al., 2013, 2016). Después de 12 h, los parásitos se centrifugaron, se lavaron como se describió en el párrafo anterior y el pellet se resuspendió en 493.5 μl de buffer de unión anexina-V (HEPES 50 mM, NaCl 700 mM, CaCl_2 12.5 mM, pH 7.4), 5 μl de anexina V (AV-FITC) y 1.5 μl de una solución de yoduro de propidio (PI) 1,5 mM. Las muestras se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente y se analizaron inmediatamente en un citómetro de flujo (igual que el mencionado anteriormente) con un filtro de 530/30 nm (FL1-H) para anexina V-FITC (fluorescencia verde/célula apoptótica) y un filtro < 575 nm (FL3-H) para PI (fluorescencia roja/células necróticas).

X.2.5. Detección de estrés oxidativo intracelular

La inducción del estrés oxidativo intracelular se evaluó utilizando la sonda fluorescente 2'-7' diacetato de diclorofluorescina (DCFDA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Este compuesto permea a la célula y se desacetila por esterasas intracelulares a un compuesto no fluorescente, que luego es oxidado por especies reactivas como $\text{OH}\cdot$ (radical hidroxilo), H_2O_2 (peróxido de hidrógeno), NO (óxido nítrico), $\text{O}_2\cdot^-$ (anión) y peroxinitrito (ONOO \cdot) dentro de la célula. Para esto, epimastigotes de *T. cruzi* en fase logarítmica, o tripomastigotes, se incubaron con Mamea A / BA durante 3 h. Los parásitos tratados se cosecharon, se centrifugaron, se lavaron y se resuspendieron en PBS como se mencionó anteriormente y se tiñeron durante 45 minutos en oscuridad con DCFDA 10 μM a 28 o 37 $^\circ\text{C}$ respectivamente. Los parásitos tratados con 160 μM de H_2O_2 se usaron como control positivo. La medida de la intensidad de fluorescencia se analizó en un citómetro de flujo a un λ_{ex} de 488 nm y un λ_{em} de 530 nm. Los resultados se expresaron como la relación GmT / GmC, donde GmT y GmC corresponden a la media geométrica de los histogramas obtenidos para las células tratadas (GmT) y no tratadas (GmC), respectivamente (Lazarin-Bidóia et al., 2016).

X.2.6. Ensayo de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Después de la exposición a Mamea A / BA durante 6 h, los parásitos (2×10^6 / ml) se lavaron con PBS y se resuspendieron en 0.5 ml de PBS con $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ de Rho 123 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) incubando por 20 min. Este colorante se acumula en la matriz mitocondrial bajo la influencia de $\Delta\Psi_m$, donde forma reversiblemente monómeros (verde) con espectros de absorción y emisión característicos. Se usó como control positivo al desacoplante mitocondrial carbonilcianuro-*m*-clorofenilhidrazona (CCCP) a $100 \mu\text{M}$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Después del tiempo de incubación, la intensidad de fluorescencia se analizó en un citómetro de flujo para Rho 123 (FL1-H) y se determinó el índice de variación (IV) mediante la ecuación $(\text{TM} - \text{CM}) / \text{CM}$, donde TM es la mediana de fluorescencia para los parásitos tratados y CM es la mediana de fluorescencia para los parásitos control (no tratados). Los valores IV negativos corresponden a la despolarización de la membrana mitocondrial (Lazarin-Bidóia et al., 2016).

X.2.7. Análisis del ciclo celular

Los epimastigotes se incubaron en medio LIT con o sin Mamea A / BA a 36.9 a $147.6 \mu\text{M}$ durante 12 h. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se fijaron en etanol / PBS frío al 70% (v / v) y se incubaron a 4°C durante 1:30 h. Las células fijadas se tiñeron con $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ de yoduro de propidio (P3566, Invitrogen, Eugene, OR, EUA) y $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ de ARNasa i se incubaron a 37°C durante 1 h. La adquisición y el análisis de los datos se realizó utilizando un citómetro de flujo BD FACSCalibur, en cada experimento se adquirieron 20,000 eventos por tratamiento y se determinaron los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular de acuerdo a la literatura (Ferreira et al., 2011; Lazarin-Bidóia et al., 2016).

X.2.8. Detección de actividad de metacaspasas

La actividad de la metacaspasa se estimó con el Kit CaspACE-fluorescein isothiocyanate (FITC)-VAD-FMK *In Situ* Marker (Promega, Madison, WI, EUA) De acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, epimastigotes y tripomastigotes se incubaron con Mamea A/BA (36.9 a $147.6 \mu\text{M}$), y medio LIT o DMEM (control negativo) o Antimicina A $250 \mu\text{M}$ (control positivo) durante 12 horas a 28 o 37°C respectivamente.

Después de la incubación, las células se tiñeron con CaspACE-FITC-VAD-FMK (25 μ M) durante 1 hora a 37 °C y 1.5 μ l de una solución de yoduro de propidio (PI) 1.5 mM, luego se lavaron con PBS y se fijaron con formalina al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente e inmediatamente se analizaron mediante un citómetro de flujo con un filtro de 530/30nm (FL1-H) para FITC (fluorescencia verde/metacaspasa y células apoptóticas) y un filtro <575nm (FL3-H) para PI (fluorescencia roja / células necróticas) (El-Fadili et al., 2010; Garcia et al., 2017).

X.2.9. Ensayo de fragmentación de ADN en gel de agarosa

Epimastigotes y tripomastigotes 25×10^6 se incubaron con LC₅₀ de Mamea A / BA y DMSO durante 12 h, H₂O₂ 320 μ M (2 h) se utilizó como control positivo. Los parásitos se lavaron 2 veces con PBS y se resuspendieron en buffer de lisis (NaCl 1 M, EDTA 0,5 M, pH 8, SDS al 5%), 5 μ l de proteinasa K (20 mg / ml), 5 μ l de ARNasa (20 mg / ml) y se incubaron toda la noche a 37 ° C. El ADN celular total se aisló mediante el procedimiento habitual de fenol / cloroformo / alcohol isoamílico (25: 24: 1) y se centrifugó a 13,000xg durante 20 min. El sobrenadante que contenía ADN fragmentado se precipitó con acetato de sodio 3 M e isopropanol al 100% durante toda la noche a -20 °C. A continuación, el ADN se centrifugó a 13,000xg durante 10 minutos y sedimento se lavó con 1 ml de etanol al 70%. Luego, se solubilizó en agua Milli-Q y se cuantificó por espectrofotometría a 260/280 nm. El ADN total se mezcló con tampón de carga para ADN 1X y se cargó en un gel de agarosa al 2% preparado con amortiguador TAE 1X. Los geles se corrieron durante 1 hora a 100 V y se tiñeron con bromuro de etidio (Kessler et al., 2013; Sandes et al., 2014).

X.2.10. Ensayo de detección de autofagia

Se usó naranja de acridina (AO) (Invitrogen, Eugene, OR, EUA) este colorante lisotrópico se acumula en orgánulos ácidos de manera dependiente del pH. A pH neutros, AO es una molécula verde fluorescente hidrófoba. Dentro de las vesículas ácidas, AO se protona y queda atrapada dentro del orgánulo formando agregados que emiten fluorescencia roja, como describió previamente (Kessler et al., 2013). Se incubaron al menos 2×10^6 células con Mamea A/BA durante 12 h, se colectaron por centrifugación y se lavaron con PBS. Los parásitos se resuspendieron en una solución de AO 35 μ M en PBS y se incubaron durante

30 minutos a 28 ° C. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces en PBS y se analizaron por citometría de flujo con un filtro FL3-H (Band pass filter/670 nm) para fluorescencia roja.

X.2.11. Análisis estadísticos y reproducibilidad de los resultados

El análisis estadístico se realizó con el software Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA, EE. UU.). Todos los experimentos fueron realizados de forma independiente por triplicado, y los datos que se muestran en los gráficos se expresan como el promedio \pm desviación estándar (SD). Los datos se analizaron mediante análisis de varianza de dos vías (ANOVA). Se identificaron diferencias significativas entre las medias utilizando las pruebas de comparación múltiple de Bonferroni o Dunnett. Los valores de $p < 0.0001$ y $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

XI. RESULTADOS

XI.1. Estudio Fitoquímico

XI.1.1. Extracción y aislamiento de compuestos

Se realizó un extracto a partir de 550 g de hojas secas de *C. brasiliense* extraídas con hexano; el extracto se purificó por cromatografía en columna y se obtuvieron 70 fracciones, de las cuales (17-34), formaron cristales en forma de agujas finas y blancas. El punto de fusión determinado para los cristales fue de: 103-105°C, respectivamente. El punto de fusión reportado para la Mammea A/BA es de 125-126 °C, lo cual sugirió que se trataba de una mezcla de compuestos.

XI.1.2. Purificación e identificación de compuestos

El espectro de RMN de protón indicó que estas fracciones agrupadas desde los números 19-26 contenían una mezcla de cumarinas, Mammea A/BA, Mammea A/BB y Mammea A/BD (Fig. 11). Al realizar el análisis de los espectros de RMN se observaron tres singuletes (δ) a 14.60, 14.55 y 14.50 para el hidroxilo C-7 de cada una de las 3 cumarinas (Reutrakul et al., 2003) la integración proporcional de estas señales nos permitió estimar la composición porcentual de cada compuesto en la mezcla, la cual fue de Mammea A / BA (86%), Mammea A / BB (10%) y Mammea A/BD (1%) (Fig. 11). Finalmente, la pureza de esta fracción se validó por análisis de HPLC indicando una pureza final de Mammea A/BA (93.6%) + Mammea A/BB (3.1 %) + Mammea A/BD (1.6 %) de pureza (Fig. 12). Para las pruebas de actividad biológica, este compuesto será referido como "Mammea A/BA" ya que es el compuesto mayoritario. Los tiempos de retención en HPLC-UV y los datos espectroscópicos de RMN¹H se mencionan a continuación:

Mammea A / BA: HPLC (RT = 27.32 min), RMN¹H: δ_H 7.56 múltiple, 3H (Aromático); 7.42 múltiple, 2H (Aromático); 5.99 simple, 1H (H-3); 5.94 simple, 1H (OH-5). CH-Isoprenilo en C-6: 5.10 múltiple, J = 6,0 Hz, 1H. CH₂-Isoprenilo en 3.30 doble, J = 6.0 Hz, 2H; 2 CH₃-Isoprenilo en 1.65 y 1.70, ambos señal simple para 3H; OH-7 en 14.60 simple, 1H. R (acilo)= 3-metil-butiril: 3.19 doble, J = 9 Hz, 2H (CH₂); 2.32 múltiple, 1H (CH); 1.06 doble, J = 6.6 Hz, 6H, (2 CH₃).

Mammea A / BB: HPLC (RT = 25.03 min), RMN¹H: δ_H 7.56 múltiple, 3H (Aromático); 7.42 múltiple, 2H (Aromático); 5.99 simple, 1H (H-3); 5.94 simple, 1H (OH-5). CH-Isoprenilo en C-6: 5.10 múltiple, J = 6.0 Hz, 1H. CH₂-Isoprenilo en 3.30 doble, J = 6.0 Hz, 2H; 2 CH₃-Isoprenilo en 1.65 y 1.70, ambos señal simple para 3H; OH-7 en 14.55 simple,

1H. R (ácido)= 2-metil-butiril: 1.93 múltiple, 1H; 1.50, 1H (CH₂); 3.95 múltiple, 1H (CH); 1.02 triplete, j=7.5 Hz, 3H (CH₃); 1.29 doble, J = 6.6 Hz, 3H, (CH₃).

Mammea A / BD: HPLC (RT = 17.35 min), RMN¹H: δ_H 7,56 múltiple, 3H (Aromático); 7,42 múltiple, 2H (Aromático); 5.99 simple, 1H (H-3); 5.94 simple, 1H (OH-5). CH-Isoprenilo en C-6: 5.10 múltiple, J = 6.0 Hz, 1H. CH₂-Isoprenilo en 3.30 doble, J = 6.0 Hz, 2H; 2CH₃-Isoprenilo en 1.65 y 1.70 ambos señal simple para 3H; OH-7 en 14,50 simple, 1H. R (acilo)= 2-metil-propil: (CH) 4.11 múltiple, 1H; 1.30 doble, J = 3 Hz, 6H, (2 CH₃).

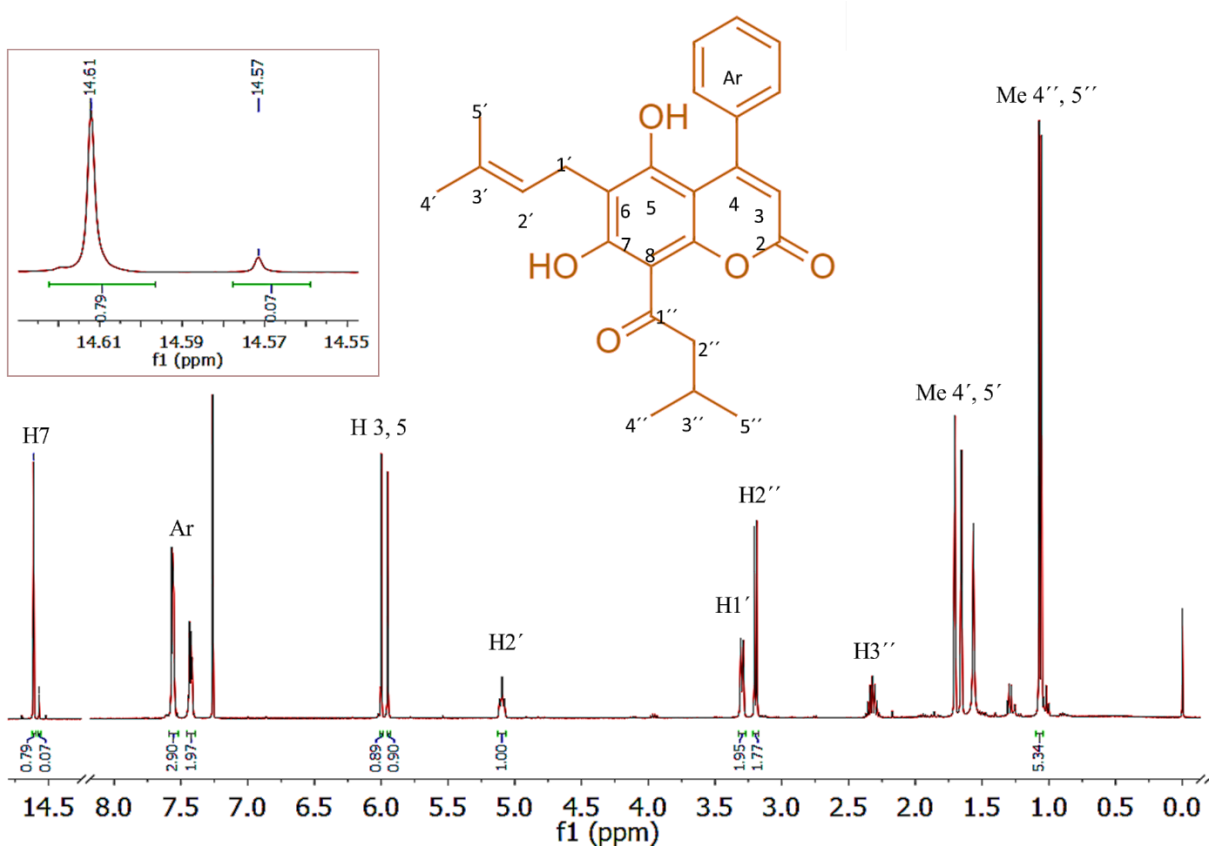


Figura 11. Espectro de resonancia magnética nuclear de protón (RMN¹H) de Mammea A/BA pureza 93.6%, aislada de hojas de *Calophyllum brasiliense*. Condiciones: (300 MHz) en CDCl₃ / TMS. La proporción de cumarina fue determinada por la integración de la señal OH-7 mostrada en el recuadro.

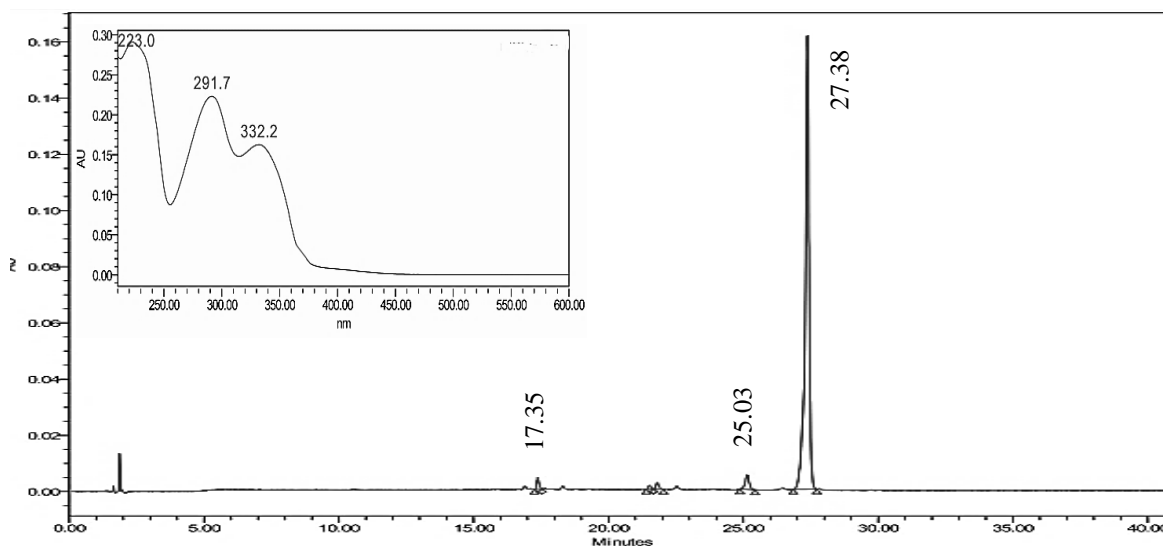


Figura 12. Espectro de HPLC de Mammea A/BA pureza 93.6% (RT=27.38 min), aislada de las hojas de *Calophyllum brasiliense*. Espectro UV (recuadro). Condiciones cromatográficas: Columna Eclipse XDB-C8, Fase móvil: Acetonitrilo-agua 5:95-55:45 v/v (0-10 min), 55:45-80:20 v/v (10-20 min), 80:20-100% v/v de acetonitrilo (20-30 min) y 100% de acetonitrilo (30-40 min). Taza de flujo 1 mL= min, detección a 355 nm.

XI.2. Ensayos de actividad biológica *in vitro*

XI.2.1. Mammea A/BA afecta la viabilidad de *T. cruzi*

Estudios anteriores han demostrado que Mammea A/BA afecta la movilidad, la replicación y la morfología de epimastigotes y tripomastigotes del parásito (Rodríguez-Hernández et al., 2019). En este trabajo, se evaluó la inhibición de la actividad de esterasa intracelulares para confirmar que Mammea A/BA afecta la viabilidad de los parásitos. Para esto, epimastigotes o tripomastigotes se incubaron con varias concentraciones de compuestos (15.4 a 246 μM), y se evaluó la actividad de esterasas intracelular para determinar células viables (CA+) y el daño de la membrana (EH+) para determinar parásitos muertos (Fig. 13). Mammea A/BA causó una disminución significativa en la viabilidad de ambas formas del parásito de una manera concentración-dependiente con una concentración letal media LC_{50} =36.9 μM para tripomastigotes y LC_{50} =85.8 μM para epimastigotes después de 12 h de incubación con los compuestos. El porcentaje de células muertas fue estadísticamente significativo cuando los parásitos se trataron con 30.8 μM en la fase tripomastigote (Fig. 14 b) y 61.5 μM en epimastigotes (Fig. 14 a) comparando con el control de vehículo DMSO.

En contraste, BZ probado a 384.6 μM indujo el 62.8% de muerte en la fase tripomastigote, mientras que no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad de los epimastigotes (solo 3.33% de mortalidad) (Fig.14 b).

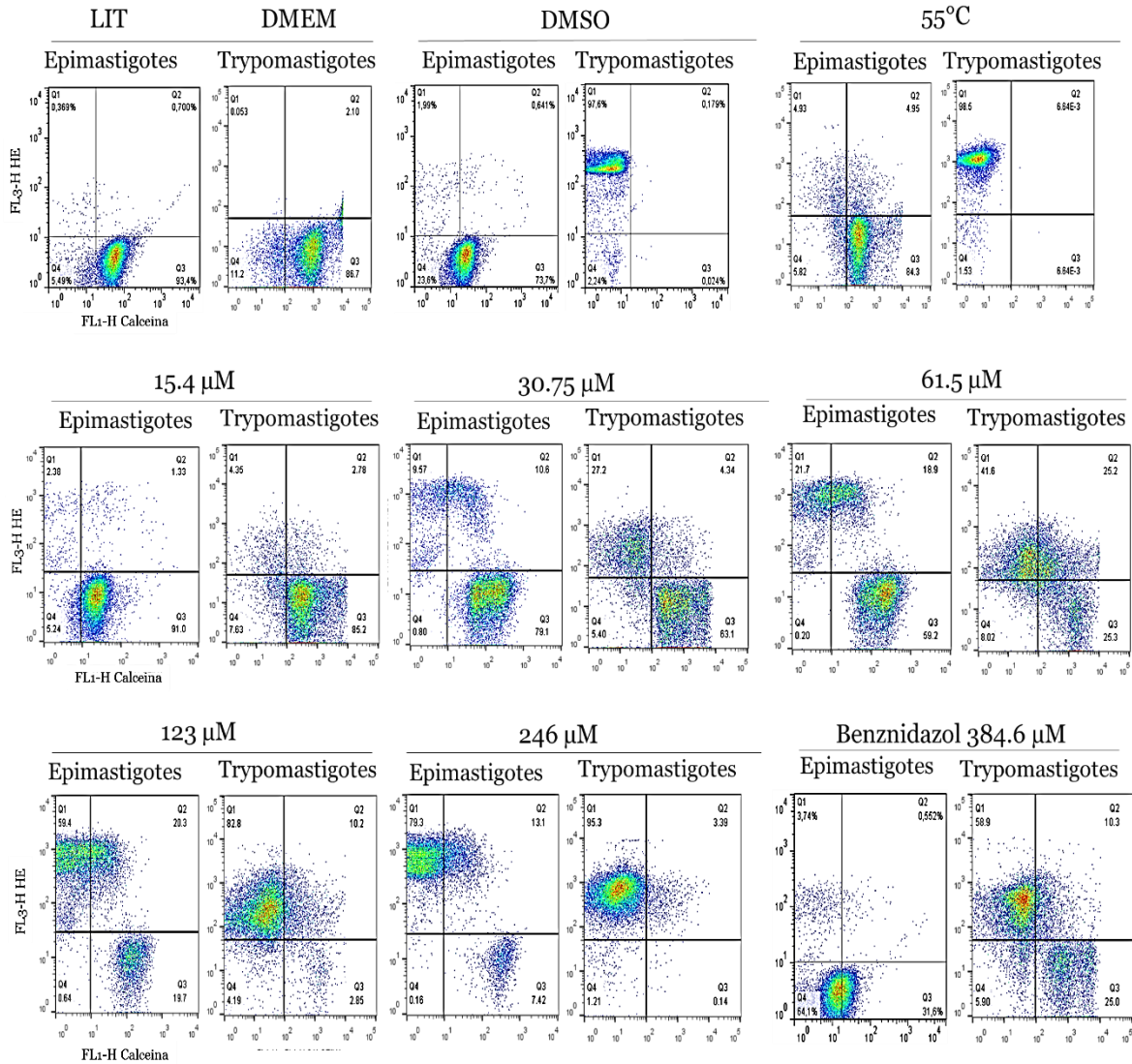


Figura 13. Efecto de Mamea A/BA y Benznidazol en la viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi* utilizando la tinción calceína (CA+) y Homodímero de etidio (HE+). Dot plots representativos de parásitos control sin teñir, cultivados en medio LIT (vivos). Parásitos incubados a 55°C (muertos). Parásitos cultivados con Benznidazol (384.6 μM). Parásitos incubados con concentraciones crecientes de cumarina (15.4 a 246 μM). Las células en el cuadrante inferior derecho son positivas para CA+. Las células en el cuadrante superior izquierdo son positivas para HE. Eventos en el cuadrante superior derecho son positivas para ambos marcadores y representan a células con actividad metabólica y membrana dañada. El cuadrante inferior izquierdo corresponde a las células negativas para los dos colorantes. Los gráficos son representativos de tres experimentos independientes por duplicado con resultados similares.

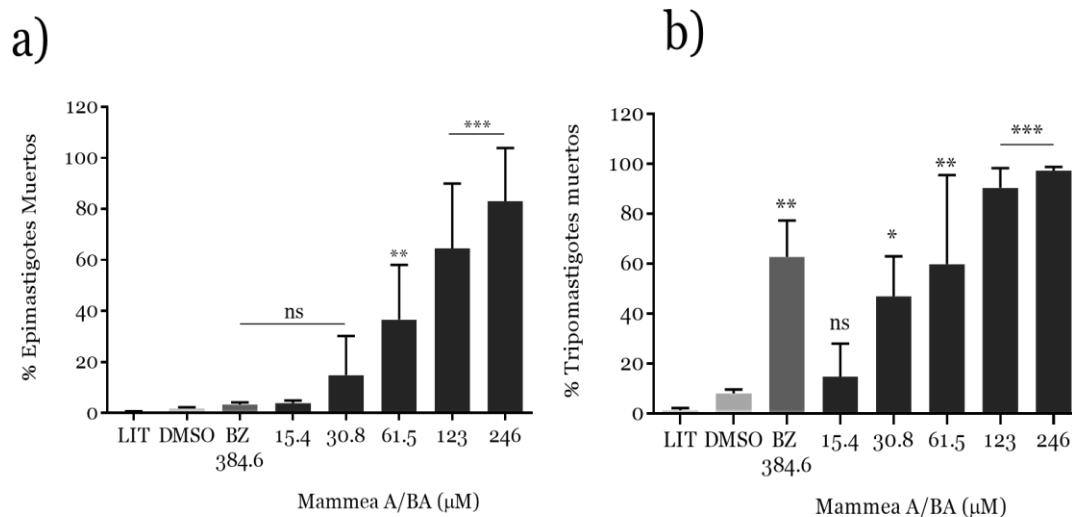


Figura 14. Efecto de Mammea A/BA sobre la viabilidad de *T. cruzi*. Los parásitos se incubaron con diferentes tratamientos durante 12 h y se tiñeron con CA+/EH+. (a) Epimastigotes muertos, (b) Tripomastigotes muertos. Los resultados se representan como promedio \pm SD de células positivas a EH en cada tratamiento en tres experimentos independientes, realizados por duplicado. Se aplicó ANOVA de dos vías y una prueba de comparación múltiple de Bonferroni. *Diferencia significativa respecto a DMSO. ns = no significativo, * $p < 0.1$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

XI.2.2. Mammea A/BA induce exposición de fosfatidilserina y daño a la membrana celular en *T. cruzi*.

Experimentos previos de nuestro grupo utilizando microscopía electrónica han demostrado que Mammea A/BA induce la contracción celular y la disminución del volumen celular, entre otros efectos, que sugerían apoptosis en *T. cruzi* (Rodríguez-Hernández et al., 2019). Para determinar si este mecanismo de muerte celular es desencadenado por este compuesto, evaluamos la externalización de fosfatidilserina; un marcador apoptótico presente en la cara interna de la membrana plasmática y que se externaliza cuando se presenta apoptosis. Los parásitos se trataron con Mammea A/BA durante 12 h y se tiñeron con anexina V conjugada con FITC y PI. El control positivo, antimicina A, aumentó la exposición de fosfatidilserina en un 70% en tripomastigotes y 90% en epimastigotes (Fig. 15 a).

Los resultados mostraron un aumento concentración-dependiente de la fluorescencia de anexina V+ y PI+ en parásitos incubados con Mammea A/BA, con diferencia significativa con el control DMSO. En epimastigotes se presentó apoptosis temprana con

la LC₅₀ y hubo un incremento de daño a la membrana plasmática (apoptosis tardía y necrosis) con 2xLC₅₀ (Fig. 15 b). En contraste, en tripomastigotes la apoptosis temprana fue más evidente en todas las concentraciones (Fig. 15 c) y la apoptosis tardía y necrosis no aumentaron como en el caso de epimastigotes (Fig. 15 b).

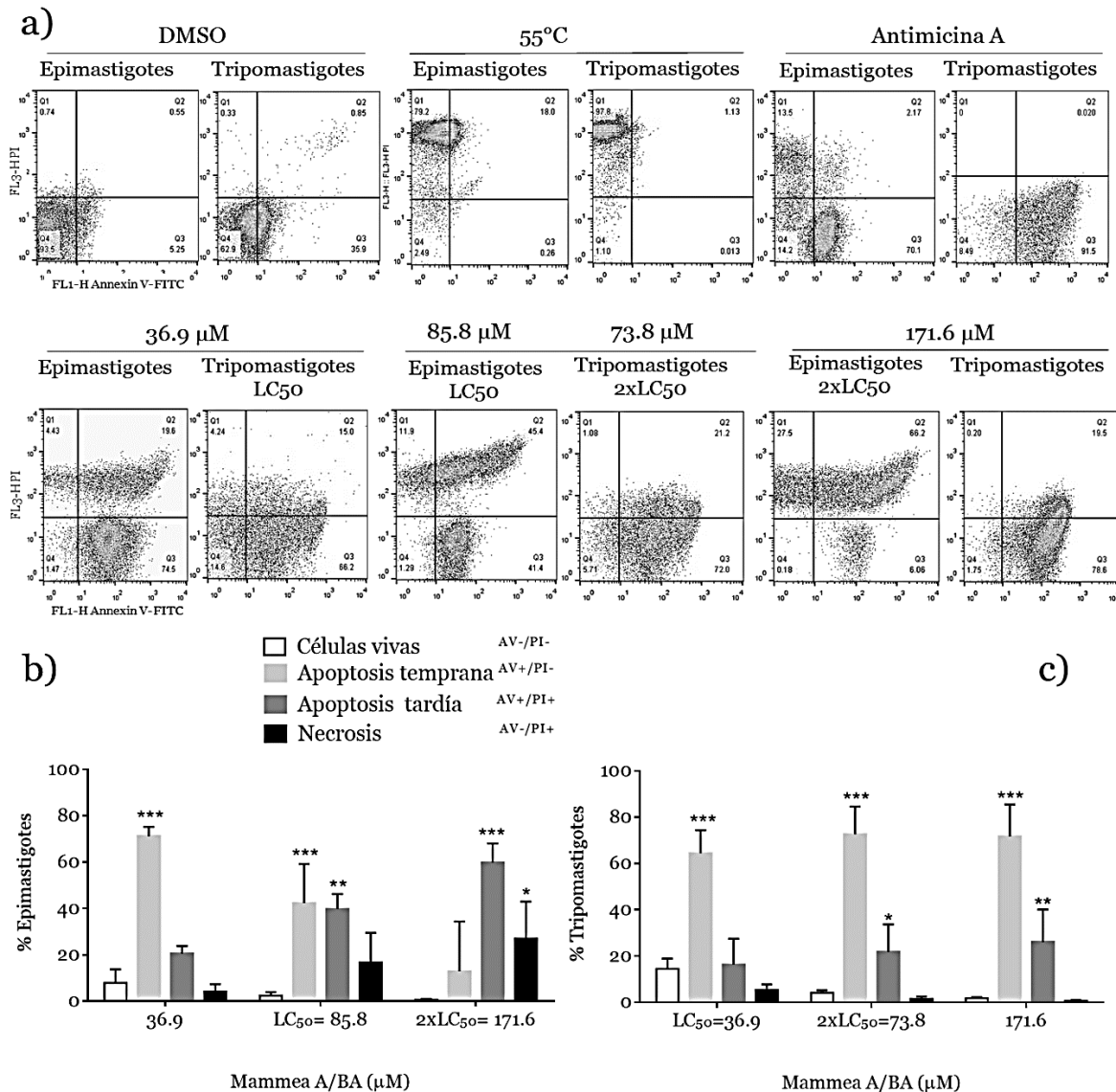


Figura 15. Efecto de Mammea A/BA sobre la exposición a fosfatidilserina y el daño a la membrana. Los parásitos se incubaron con diferentes tratamientos durante 12 h y se tiñeron con anexina V (AV+) y yoduro de propidio (PI+). a) Dot plots de tripomastigote y epimastigotes. El cuadrante superior izquierdo representa células positivas para PI (necróticas), el cuadrante inferior derecho son células positivas para AV (apoptosis temprana). Eventos del cuadrante superior derecho son células positivas a ambos marcadores (apoptosis tardía o células necróticas), el cuadrante inferior izquierdo corresponde a las células negativas (vivas). b, c) Las gráficas representan promedio y SD de tres experimentos independientes. Se aplicó un ANOVA de dos vías y la prueba de comparaciones múltiple de Bonferroni. Los asteriscos representan diferencia significativa entre cada tratamiento respecto a células vivas. * $p < 0.1$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

XI.2.3. Mamea A/BA aumenta las especies reactivas de oxígeno.

Decidimos investigar el posible daño oxidativo causado por Mamea A/BA en los parásitos. La producción de ROS total se investigó utilizando la sonda fluorescente DCFDA, que detecta principalmente el estrés celular al reaccionar con peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos. La figura 16 muestra que Mamea A/BA aumentó significativamente la producción total de ROS en epimastigotes, pero no en tripomastigotes. Los parásitos tratados con LC_{50} y $2xLC_{50}$ mostraron un aumento en la producción de ROS de 63.7% y 44.8%, respectivamente en comparación con DMSO (Fig. 16 a). Por otro lado, LC_{50} en tripomastigotes mostró un ligero aumento del 17.93% (Fig. 16 b). El control positivo (H_2O_2) aumentó la producción total de ROS a 100% en epimastigotes y 27.98% tripomastigotes.

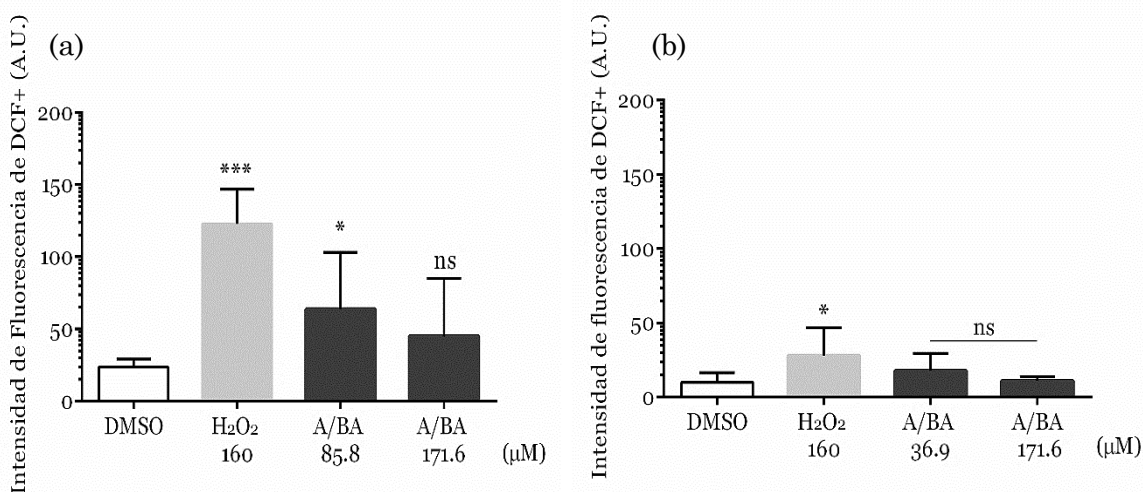


Figura 16. Producción de ROS en *T. cruzi* después de la exposición con Mamea A/BA. Los epimastigotes (a) y tripomastigotes (b) se trataron con diferentes concentraciones del compuesto durante 3 h y se tiñeron con DCFDA. Los gráficos son representativos de la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al grupo control DMSO. Una prueba de ANOVA y una prueba de comparaciones múltiples de Dunnett VS DMSO fue realizada, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ns: no significativo.

XI.2.4. Mameea A/BA induce la despolarización del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Con base en estudios previos que informaron el efecto de las cumarinas tipo Mameea en las mitocondrias de parásitos protozoarios (Brenzan et al., 2012), evaluamos el potencial de membrana mitocondrial de los parásitos tratados con Mameea A/BA utilizando Rh123. Este colorante, se acumula en las mitocondrias de las células sanas con alto potencial, y deja de acumularse en las células con menor potencial permaneciendo como un monómero en el citoplasma. El colorante monomérico fluoresce en verde, por lo que la pérdida de este indica la despolarización del potencial de membrana mitocondrial. Mameea A/BA causó una disminución concentración-dependiente en el potencial de membrana mitocondrial en ambas formas del parásito después de 6 h de tratamiento en comparación con los parásitos incubados solo con DMSO (Fig. 17). La pérdida de $\Delta\Psi_m$ fue mayor en epimastigotes que en tripomastigotes. Epimastigotes mostraron valores IV de -0.67 y -0.83 en LC_{50} y $2xLC_{50}$ de Mameea A / BA, respectivamente (Fig. 17 a), mientras que los tripomastigotes mostraron valores IV de -0.48 y -0.55 en LC_{50} y $2xLC_{50}$ (Fig. 17 b).

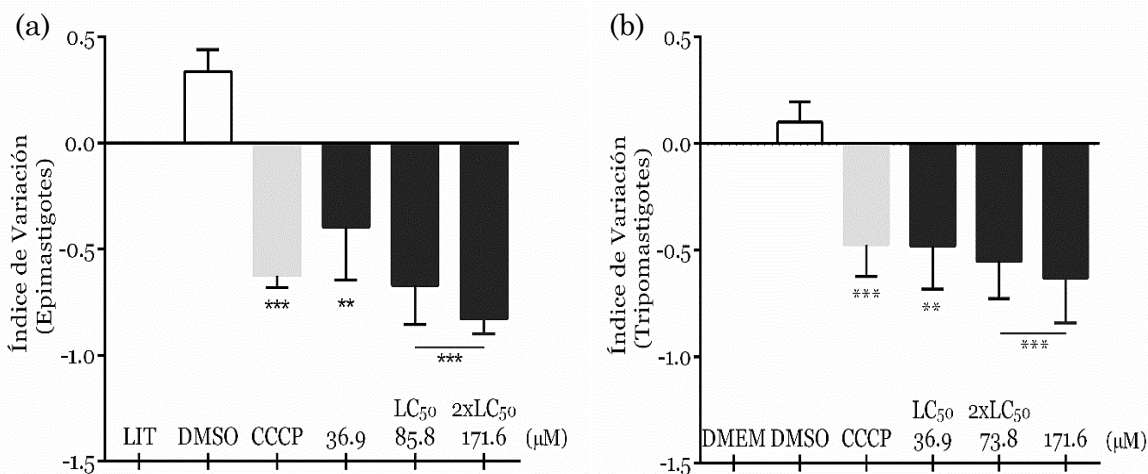


Figura 17. Disminución del potencial de membrana mitocondrial de *T. cruzi*. Los epimastigotes (a) y tripomastigotes (b) se trataron con diferentes concentraciones de Mameea A/BA durante 6 h y se tiñeron con Rh123. Las gráficas son representativas del promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al grupo de control DMSO. ANOVA y prueba de comparaciones múltiples de Dunnett fue realizada comparando con el grupo control DMSO, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

XI.2.5. Mamea A/BA aumenta la actividad tipo caspasa en *T. cruzi*

Para determinar si el mecanismo de muerte celular desencadenado por Mamea A/BA involucra apoptosis, evaluamos la participación de cisteín proteasas (caspasas), que son enzimas clave en la vía apoptótica, especialmente la caspasa-3 para la activación de las nucleasas que dirigen a los cortes de ADN y la formación del fenotipo apoptótico en la célula.

En este trabajo se examinó la presencia estas proteasas utilizando el inhibidor fluorescente FITC-VAD-FMK. Para esto, los parásitos se incubaron con Mamea A / BA y el inhibidor. La intensidad de fluorescencia se midió en parásitos tratados y control (Fig. 18 a). Los resultados obtenidos muestran que el inhibidor ZVAD-Fmk-FITC se unió en mayor porcentaje cuando los parásitos se trataron con la cumarina, dando como resultado células dobles positivas que se correlacionan a las células (Annexina V+/PI+, apoptosis tardía) observadas en experimentos anteriores. En epimastigotes, hubo mayor fluorescencia (FITC+/PI+) indicando un aumento en la actividad de las proteasas después del tratamiento con LC₅₀ y 2xLC₅₀ de Mamea A/BA después de 12 h en comparación con las células tratadas con DMSO (Fig. 18 b). Esta fluorescencia fue mayor con 2xLC₅₀. En el caso de los tripomastigotes, la actividad de la caspasa también fue significativamente mayor con respecto a los controles, pero fue menor que la actividad observada en epimastigotes, aún con la concentración más alta (171.6 µM) (Fig. 18 c).

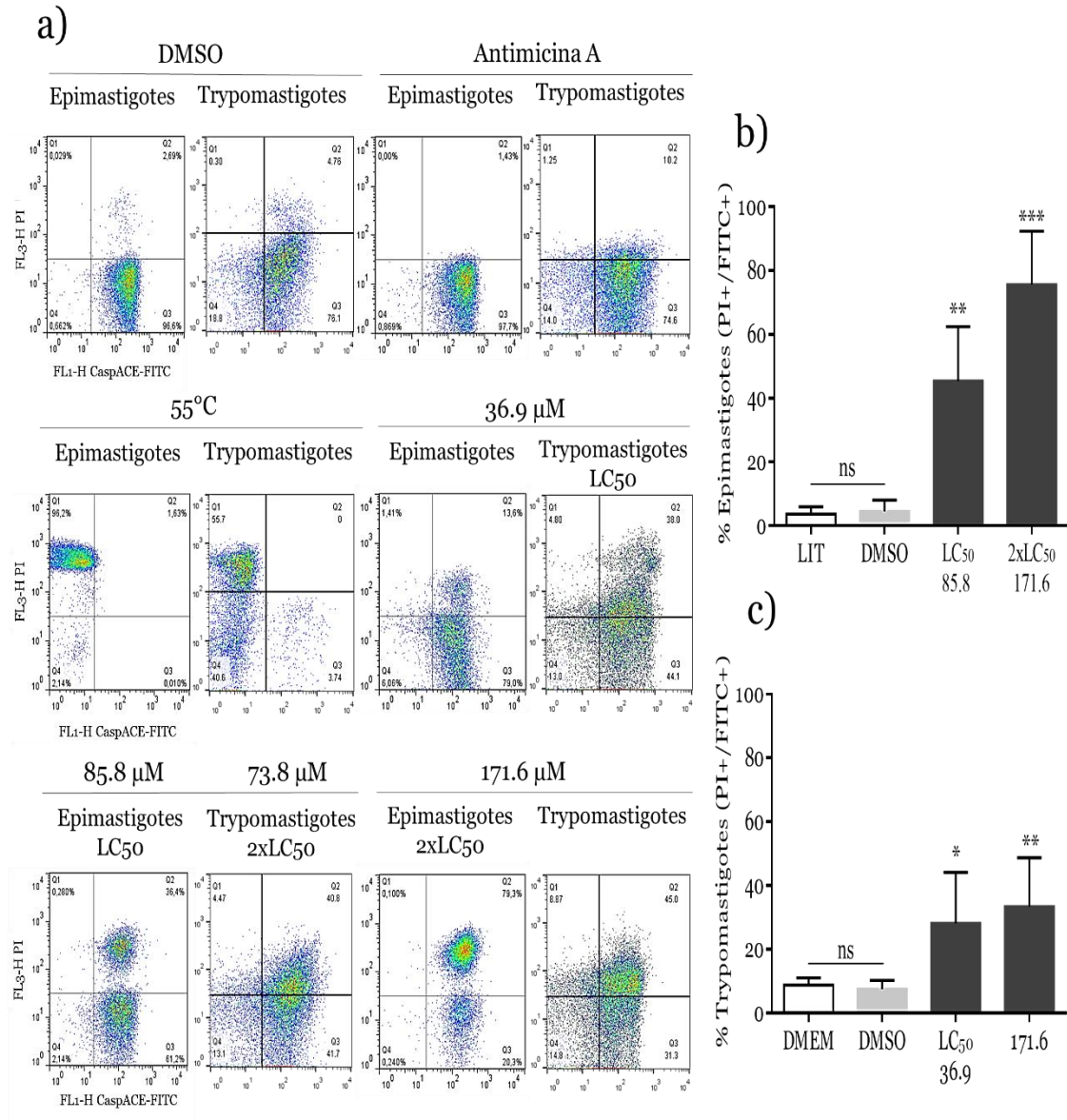


Figura 18. Actividad de las proteasas similares a caspasa (metacaspasas) en epimastigotes y trypomastigotes tratados con Mamea A/BA. La actividad se probó pre incubando los parásitos con Mamea A/BA durante 12 h y se añadió un inhibidor específico de caspasas acoplado a FITC. a) Dot plots de citometría de flujo de trypomastigotes y epimastigotes. Las células en el cuadrante superior izquierdo fueron positivas para yoduro de propidio (PI+, células necróticas). Las células en el cuadrante inferior derecho fueron positivas para caspasa (FITC+, apoptosis + caspasas activas). Los eventos en el cuadrante superior derecho fueron doblemente positivos para ambos marcadores (FITC + / PI +, apoptosis tardía con actividad de caspasa), mientras que el cuadrante inferior izquierdo corresponde a células negativas para ambos colorantes (FITC-/PI-, células vivas). b, c) Las gráficas muestran la actividad expresada como el promedio \pm DE de tres experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. *Diferencia significativa en comparación con DMSO (control negativo). La antimicina A (250 μ M) se utilizó como control positivo.

XI.2.6. Mamea A/BA altera el ciclo celular de *T. cruzi*

Utilizamos citometría de flujo para analizar el ciclo celular de epimastigotes (fase replicativa) tratados con Mamea A/BA después de 12 horas. Las diferentes fases celulares se estimaron midiendo la cantidad de ADN por célula teñido con yoduro de propidio. Nuestros resultados demostraron que Mamea A/BA causó un aumento significativo en la población de células sub-G₀ (ADN fragmentado/células apoptóticas) con una concentración de 2xLC₅₀. El aumento en el pico G₀/G₁ (contenido típico de ADN) con LC₅₀ y 2xLC₅₀ indicando un posible arresto celular. También observamos una disminución importante en la fase de síntesis (fase S) y de división y duplicación celular (Fase G₂/M) en parásitos tratados con este compuesto en comparación con el grupo de control DMSO (Fig. 19).

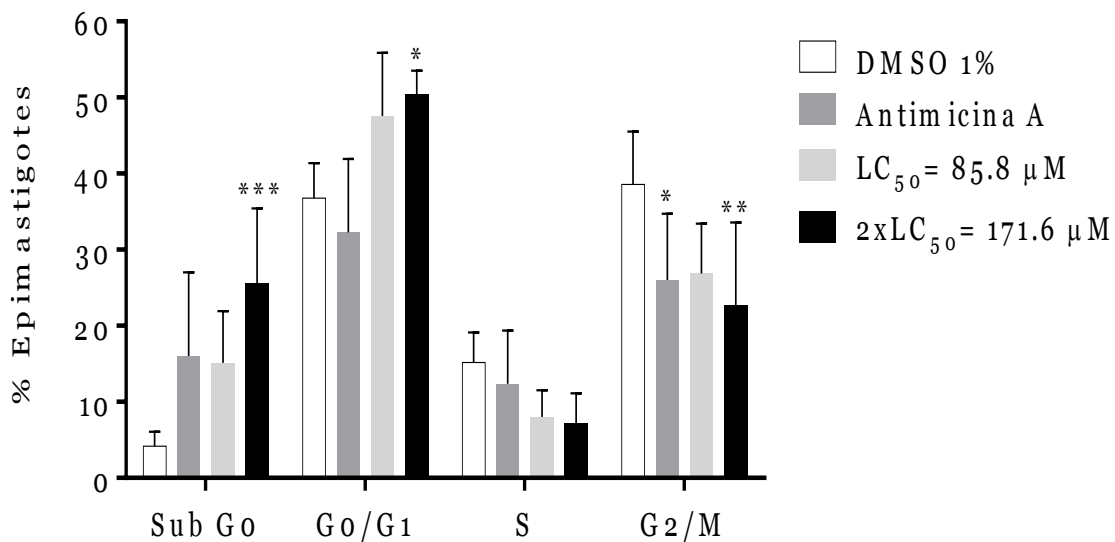


Figura 19. Análisis del ciclo celular en epimastigotes de *T. cruzi* tratados con Mamea A/BA durante 12 h. Los datos se expresan como promedio \pm DE del porcentaje de células fluorescentes a yoduro de propidio en tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas en relación con el control DMSO. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

XI.2.7. Mamea A/BA produce fragmentación del ADN

El tratamiento de epimastigotes y tripomastigotes con diferentes concentraciones de Mamea A/BA mostró degradación de ADN representado como un patrón en escalera en gel de agarosa principalmente en tripomastigotes a una concentración de 171.6 μM (Fig. 20). Esto se comparó con las células control incubadas con medio LIT o DMEM y el vehículo DMSO donde no se observó degradación o corte de material genético.

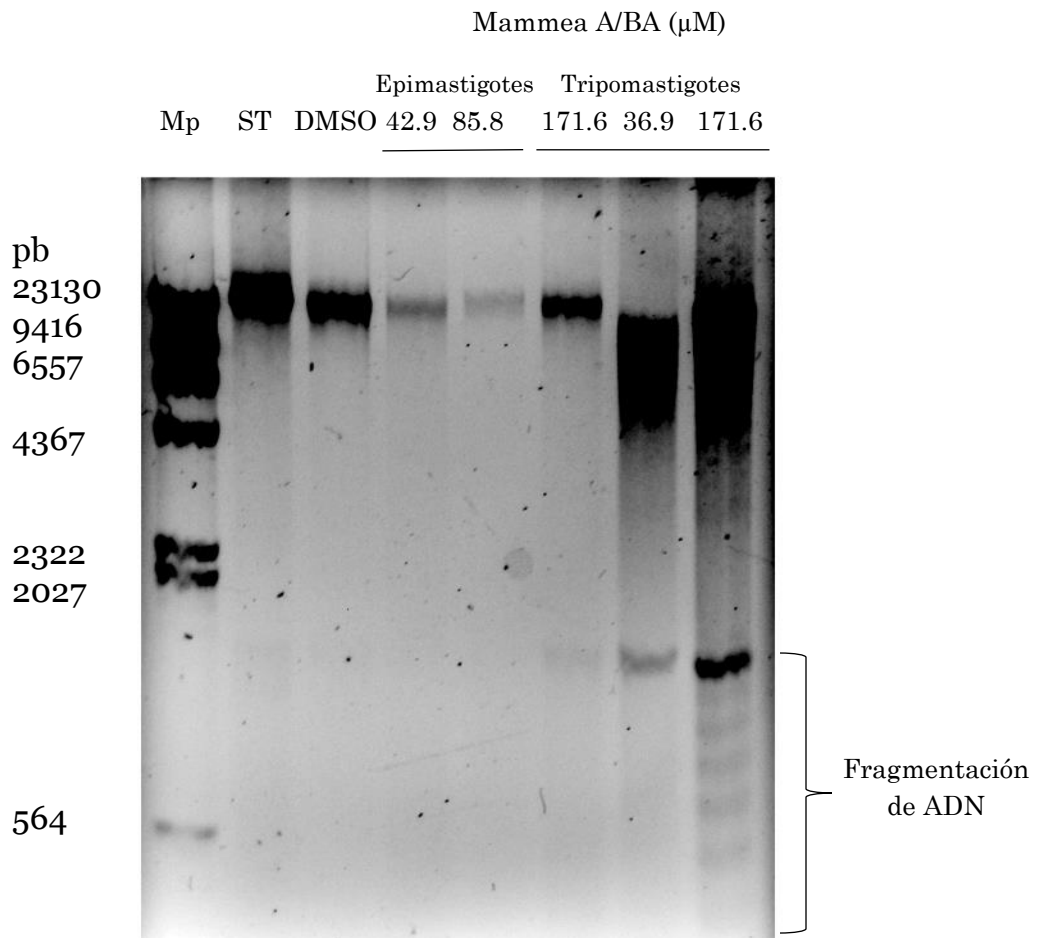


Figura 20. Escalera de ADN genómico en electroforesis en gel de agarosa de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* tratados con Mamea A/BA (12 h). Se extrajo ADN de epimastigotes y tripomastigotes después de cada tratamiento, se precipitó y se cargó en geles de agarosa al 2% y el gel se tiñó con bromuro de etidio. Mp: Marcador de peso, pb: pares de bases, ST: parásitos sin tratamiento, DMSO: vehículo 1%.

XI. 2.8. Mameea A/BA induce la formación de vacuolas ácidas (autofágicas)

Se realizó un ensayo de autofagia para confirmar si hay un aumento de las vacuolas ácidas en respuesta al tratamiento con Mameea A/BA. La citometría de flujo se realizó con el colorante acidotrófico naranja de acridina, que se acumula en los compartimentos ácidos como los autofagosomas de las células (Kessler et al., 2013). El compuesto Ketoconazol se usó como control positivo ya que mostró aumento de vacuolas ácidas en reportes previos (Kessler et al., 2013). El análisis de los parásitos tratados con Mameea A/BA a una concentración de LC_{50} y $2xLC_{50}$ durante 12 h; mostró un aumento en la intensidad de fluorescencia después de la exposición de una forma concentración-dependiente e incluso mayor que Ketoconazol (Fig. 21). Este aumento en la fluorescencia fue mucho mayor en epimastigotes (Fig.21 a) que en tripomastigotes (Fig. 21 b) indicando mayor presencia de vacuolas en el primer estadio.

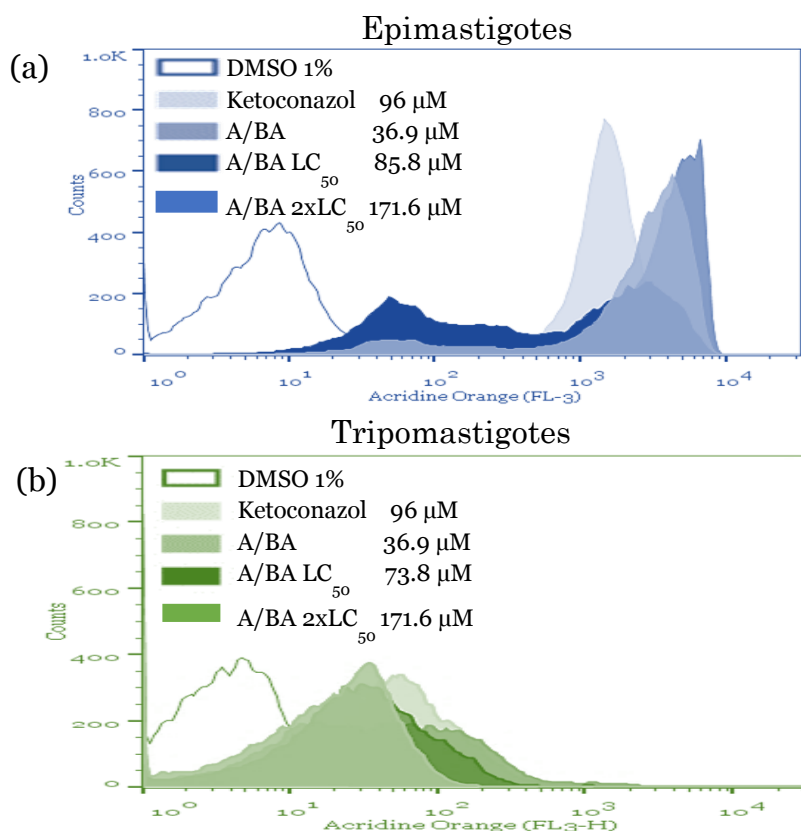


Figura 21. Detección de vacuolas ácidas en *T. cruzi* después del tratamiento con Mameea A/BA. Los epimastigotes (a) y tripomastigotes (b) se trataron con diferentes concentraciones de Mameea A / BA durante 12 h y se tiñeron con naranja de acridina, el aumento gradual de la fluorescencia se determinó por citometría de flujo y se representa como histogramas. La curva blanca corresponde al control DMSO%. Se usó Ketoconazol como control positivo. Los histogramas son representativos de al menos tres experimentos independientes.

XII. DISCUSIÓN

En un trabajo previo llevado a cabo por nuestro grupo de investigación, se demostró que Mammea A/BA y una mezcla constituida por Mammea A/BA+A/BB+A/BD aisladas del árbol tropical *C. brasiliense* reducen la movilidad y replicación de *T. cruzi*; estos compuestos mostraron alta selectividad contra el parásito, reduciendo la infectividad de tripomastigotes en células de mamífero y produciendo alteraciones ultraestructurales y morfofisiológicas que podrían estar asociadas con diferentes mecanismos de muerte celular programada. En este trabajo se planteó a estos compuestos como nuevos candidatos a fármacos contra la enfermedad de Chagas (Reyes-Chilpa et al., 2008; Rodríguez-Hernández et al., 2019); sin embargo, sus mecanismos de acción sobre *T. cruzi* no se habían descrito.

Por lo anterior, en el presente trabajo se realizó la extracción de Mammea A/BA de un extracto hexánico de hojas de *C. brasiliense* para continuar con el estudio de estos compuestos sobre *T. cruzi*. Trabajos anteriores realizados por Reyes-Chilpa y colaboradores en 2004, mencionaron que estos compuestos tienen un alto rendimiento en comparación con otros compuestos como xantonas y triterpenos que representan cerca del 0.5% de peso seco. Lo obtenido en este trabajo coincide con el reporte anterior y fue mayor que lo reportado por Brenzan y colaboradores en 2008, ya que de los 550g de hojas para elaborar el extracto se obtuvo un total de 1.1841g de precipitados cristalinos de color blanco constituidos por una mezcla de Mammea A/BA+A/BB+A/BD (86:10:1%) y Mammea A/BA (93.6%).

Posterior a la obtención de Mammea A/BA, su efecto se probó con epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*. Primero confirmamos mediante citometría de flujo que Mammea A/BA reduce la viabilidad de los epimastigotes y tripomastigotes, especialmente en tripomastigotes donde la LC_{50} fue más baja haciendo más selectivo a estos compuestos si comparamos con la CC_{50} para células de mamífero obtenida en trabajos previos ($CC_{50}=135.69 \mu M$) (Rodríguez-Hernández et al., 2019). Además, en este trabajo la cumarina inicialmente disminuyó la actividad de esterasas intracelulares; enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis de ésteres carboxílicos, amidas, ésteres de fosfato y anhídridos de ácido, por lo tanto, son fundamentales en el metabolismo y la

viabilidad celular. Estos compuestos también afectaron la permeabilidad e integridad de la membrana plasmática a agentes intercalantes como el yoduro de propidio produciendo un fenómeno necrótico.

Mammea A/BA también indujo la externalización de fosfatidilserina principalmente en tripomastigotes y produjo alteraciones en la membrana plasmática de epimastigotes, lo induciendo una etapa tardía de apoptosis y necrosis en este último estadio. Un reporte anterior, demostró que este compuesto induce daño ultraestructural en el parásito, mostrando contracción celular, hinchazón y redondeo (Rodríguez-Hernández et al., 2019), este fenotipo de daño ahora se confirmó con una técnica bioquímica donde se demuestra que, además, los epimastigotes son más susceptibles a la cumarina ya que se presenta apoptosis tardía y necrosis más rápidamente que en los tripomastigotes, los cuales mantienen un estado de apoptosis temprano por más tiempo. Esto puede deberse a las diferencias fisiológicas entre las diferentes formas del parásito, su resistencia al estrés celular y a diferentes compuestos como se ha reportado anteriormente (Martínez et al., 2013; Paes et al., 2011).

En los tripanosomátidos, el proceso apoptótico se ha asociado con cascadas de señalización que involucran a las mitocondrias (vía intrínseca) (El-Fadili et al., 2010; Garcia et al., 2017; Lazarin-Bidóia et al., 2016, 2013; Menna-Barreto y de Castro, 2015). Para investigar los fenómenos que completan el conocimiento sobre las vías y mecanismo de muerte celular inducidos por Mammea A/BA, analizamos la producción de ROS y el cambio de potencial mitocondrial en los parásitos tratados con este compuesto. Observamos un aumento en la producción de ROS. Este fenómeno fue más alto en epimastigotes que en tripomastigotes, probablemente debido a la conocida condición de que los tripomastigotes tienen niveles más altos de tripanotión en el sistema tiol redox, lo que promueve una mejor defensa antioxidante de este estadio (Gonçalves et al., 2011; Machado-Silva et al., 2016; Piacenza et al., 2013).

Informes anteriores han demostrado que los ROS son moléculas que inducen la oxidación de proteínas y lípidos que interfieren con la integridad y la función mitocondrial (Menna-Barreto and de Castro, 2015). Por esa razón, evaluamos el potencial mitocondrial mediante la fluorescencia de Rh123 después del tratamiento con Mammea A/BA. Encontramos una disminución dependiente de la concentración del

potencial de membrana mitocondrial en ambas formas del parásito, nuevamente más evidentemente en epimastigotes que en tripomastigotes. Existe evidencia de que Mamea A/BA induce altera la funcionalidad mitocondrial debido aumentando la concentración de Ca^{2+} intracelular (Gómez-Verjan et al., 2019). Esto podría tener como consecuencia la permeabilidad de protones a través de la membrana mitocondrial interna, disminuir la producción de ATP y favorecer la liberación de citocromo c de las mitocondrias al citosol para activar a las proteasas similares a caspasas en el parásito (metacaspasas) que dirigen al fenotipo de muerte apoptótico en este parásito y como lo han hecho estos compuestos en otros tipos celulares (M A Brenzan et al., 2012; Rea et al., 2013).

Existe evidencia de que las proteasas similares a caspasas (metacaspasas) juegan un papel importante en la vía apoptótica de los parásitos tripanosomátidos después de la inducción de diferentes estímulos (Menna-Barreto, 2019; Meslin et al., 2011). Por ello, se analizó la presencia de actividad de proteasas similares a caspasas en los parásitos tratados con Mamea A/BA. Encontramos que el inhibidor FITC-VAD-FMK mostró más fluorescencia en parásitos tratados con Mamea A/BA en comparación con el control, donde la fluorescencia era mucho más débil. Sin embargo, la fluorescencia o actividad de caspasas fue mayor en la fase epimastigote que en la fase tripomastigote aún en la concentración más alta. Se ha demostrado que este inhibidor se une a la cisteína proteasa c (CPC) tipo catepsina B y parece hacer que los parásitos sobrevivan mejor en presencia de estrés oxidativo y sin fragmentación de ADN, lo que proporciona una fuerte evidencia de que parte de la ejecución de la apoptosis en tripanosomátidos implica la resistencia al daño oxidativo (menor en epimastigotes) y puede funcionar a través de la participación de enzimas proteolíticas como CPC y otras metacaspasas (El-Fadili et al., 2010).

En este contexto, Mamea A/BA podría inducir eventos de activación de enzimas proteolíticas similares a caspasas y la activación de proteasas y endonucleasas (tipo Endo G) que pueden participar en la descomposición y/ó ruptura del ADN (Menna-Barreto, 2019). Lo anterior, se corroboró cuando se analizó el ciclo celular de los parásitos tratados y se observó un aumento en la fase sub-G0 (fragmentos de ADN), posible arresto en la fase G_1 y reducción de la fase S y G_2/M en epimastigotes; además

de la presencia de un patrón de bandas en escalera de aproximadamente 200pb en gel de agarosa, característico de las células apoptóticas (Menna-Barreto y de Castro, 2015; Menna-Barreto, 2019).

En tripanosomátidos, las condiciones de estrés oxidativo, nutricional o la exposición a fármacos, inducen con frecuencia un fenotipo autofágico con la presencia de vacuolas de doble membrana, cuerpos multivesiculares o un aumento en el número de vacuolas ácidas o reservosomas (Pérez-Morales et al., 2017). Este proceso también es esencial durante su ciclo de vida ya que favorece su diferenciación, homeostasis de fosfolípidos y funcionalidad mitocondrial (Menna-Barreto, 2019).

Se ha propuesto que las cumarinas tipo Mammea inducen una alta vacuolización citoplasmática en estos protozoarios (Brenzan et al., 2012; Rodríguez-Hernández et al., 2019) por tal razón, analizamos este parámetro en células teñidas con naranja de acridina (AO) después de la incubación de los parásitos con Mammea A/BA, para identificar la producción de vesículas ácidas (AO+) correlacionado con un fenómeno de autofagia (Kessler et al., 2013). Los datos mostraron que Mammea A/BA produce un aumento concentración-dependiente de compartimentos ácidos en parásitos tratados con la LC₅₀; este aumento nuevamente fue mayor en la fase epimastigote que en tripomastigotes; esto puede deberse a que muchas de las proteínas implicadas en el fenómeno autofagico son más expresadas en la fase epimastigote que en la fase tripomastigote ya que son esenciales durante el proceso de metaciclogenesis (Menna-Barreto, 2019; Vanrell et al., 2017). Por otro lado, algunos productos naturales como β -lapachona inducen en *T. cruzi*, apoptosis y necrosis ambos precedidos de la autofagia, como resultado de la despolarización de la membrana mitocondrial medida por la entrada de calcio que conduce a la producción de ROS, peroxidación lipídica y oxidación de proteínas; lo cual favorece la fusión de las membranas de los compartimentos celulares (p.ej. reservosomas y lisosomas) necesarios para reciclar material citoplásmico producto de oxidación y severas alteración metabólicas como un intento de la célula por sobrevivir (Dos Anjos et al., 2016). Se ha demostrado que derivados de cumarinas y la misma Mammea A/BA producen apoptosis dependiente de caspasas mediante la inhibición o participación de la autofagia como mecanismo citoprotector o supervivencia en otras células eucariotas (Wang et al., 2018); esto mediante su interacción con

moléculas de las rutas de señalización Akt/mTOR y PI3K (Gómez-Verjan et al., 2019; Wang et al., 2018); por lo que sería interesante evaluar la participación de estas moléculas en nuestro modelo.

En base a los resultados de este trabajo y de los estudios publicados, nosotros proponemos que el mecanismo de acción de Mamea A/BA en *T. cruzi* incluye un modelo de muerte celular por autofagia, apoptosis y necrosis. Esto comienza por la inducción de estrés oxidativo (ROS) en ambos estadios del parásito, pero principalmente epimastigotes debido a su baja defensa antioxidante. El estrés oxidante afecta varios componentes celulares, como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos afectando la composición de las membranas induciendo la formación de vacuolas ácidas para el reciclaje de estas moléculas dañadas, el exceso de vacuolas en el citoplasma conduce a altos niveles de degradación (autofagia) y lisis celular tiempo dependiente (necrosis). Al mismo tiempo, el compuesto induce daño a la membrana mitocondrial que puede ser debido a la entrada de iones Ca^{2+} perjudicando el transporte de electrones y produciendo despolarización del potencial mitocondrial disminuyendo la producción de ATP y favoreciendo la liberación de moléculas como citocromo c y otras que permiten la activación de proteasas como las metacaspasas y nucleasas que dañan el ADN reduciendo la traducción y transcripción de genes mitocondriales y nucleares, lo cual detiene el ciclo y la división celular que finalmente resulta muerte celular de los parásitos por apoptosis y finalmente necrosis (Fig. 22).

Dado el negativo impacto económico y social causado por la enfermedad de Chagas, la falta de vacunas, la eficacia limitada de Benznidazol y Nifurtimox en el tratamiento de la enfermedad en fase crónica y la existencia de cepas de *T. cruzi* naturalmente resistentes a ambos fármacos, la búsqueda de nuevos medicamentos se ha convertido en un objetivo cada vez más necesario. En los últimos años el interés en la búsqueda de nuevas moléculas a partir de plantas medicinales para desarrollar nuevo compuestos terapéuticos ha aumentado (Cheuka et al., 2017).

La información toxicológica previa de Mamea A / BA y A / BB (2: 1) en administración intraperitoneal y oral en ratones no ha mostrado mortalidad ni signos visibles de toxicidad de hasta 3500 mg / kg (Gomez-Verjan et al., 2015; Reyes-Chilpa et al., 2008; Ruiz-marcial et al., 2007). Por lo que, nuestros resultados respaldan el inicio de estudios

preclínicos de estos compuestos en modelos murinos infectados con *T. cruzi* para poder proponerlos como nuevas moléculas para el tratamiento de esta importante y fatal infección.

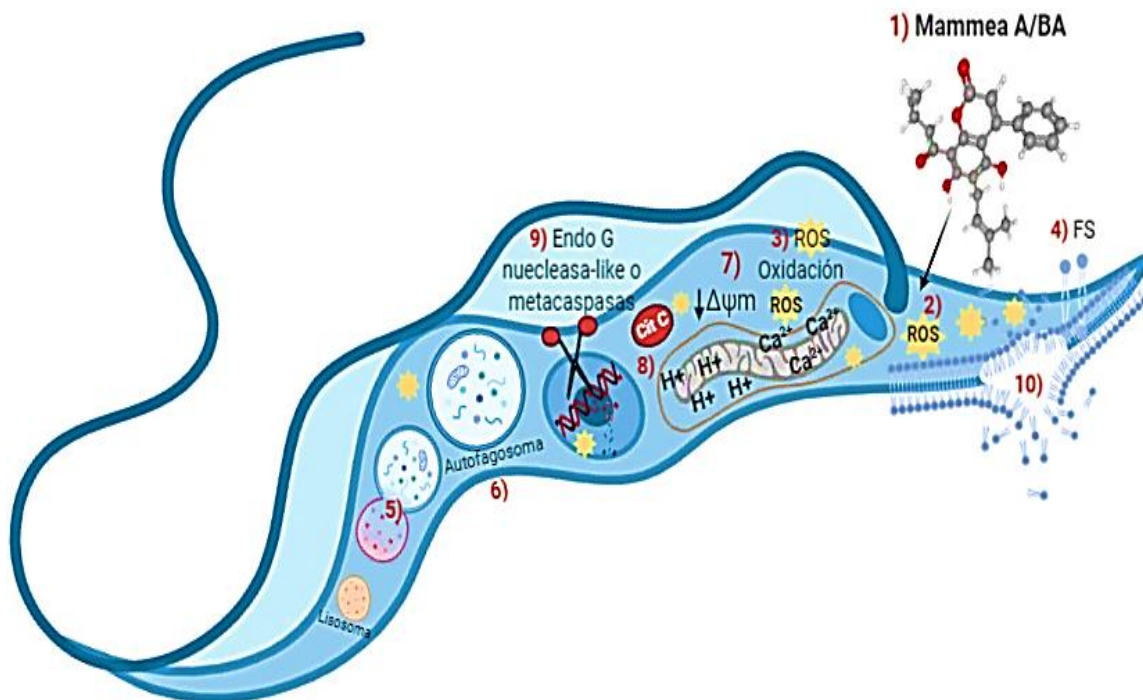


Figura 22. Mecanismo de acción propuesto de Mammea A/BA de *C. brasiliense* en parásito protozoario *T. cruzi*. Mammea A/BA entra al citoplasma del parásito por difusión simple debido a su hidrofobicidad y tamaño (1); la molécula induce estrés oxidativo (ROS) en ambos estadios del parásito, pero principalmente epimastigotes debido a su baja defensa antioxidante (2); los ROS oxidan varios componentes celulares (3) como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos afectando la composición de las membranas produciendo exposición de fosfatidilserina (FS) y apoptosis temprana (4). El daño lipídico puede facilitar la función de orgánulos como lisosomas e inducir la formación de vacuolas ácidas para el reciclaje de moléculas dañadas (5). El exceso de vacuolas en el citoplasma conduce a altos niveles de degradación o autofagia (6). Al mismo tiempo, el compuesto y el estrés afecta la composición de la membrana mitocondrial induciendo daño, permitiendo la entrada de iones como Ca^{2+} perjudicando el transporte de electrones y produciendo despolarización del potencial mitocondrial $\Delta\Psi_m$ (7). Esto disminuye la producción de ATP y favorece la liberación de moléculas como citocromo c (8) y otras que permiten la activación de proteasas tipo caspasas (metacaspasas) y nucleasas que dañan el ADN (9) reduciendo la traducción y transcripción de genes mitocondriales y nucleares, lo cual detiene el ciclo y la división celular que finalmente resulta en la muerte de los parásitos por apoptosis y necrosis (10).

XIII. CONCLUSIÓN

El presente estudio demostró que el efecto tripanocida de Mammea A/BA en el protozooario *T. cruzi* es una consecuencia de la inducción de muerte celular tipo apoptosis, necrosis y autofagia causada por un aumento en los niveles de ROS dentro de las células. Es probable que este aumento sea responsable de la disminución del potencial de membrana mitocondrial, el agotamiento de los niveles de ATP y cambios citoplasmáticos importantes como la formación de vacuolas ácidas para la degradación del material citoplasmático oxidado y dañado, seguido de la activación de las caspasas, fragmentación de ADN y alteración de la división celular. Estos cambios apoyan reportes anteriores donde se observó la contracción celular ahora relacionada con la externalización de fosfatidilserina y daño en la membrana celular produciendo también necrosis. Este trabajo proporciona algunos indicios de cómo funcionan estos compuestos naturales en tripanosomátidos y proporciona información de la posible vía de muerte celular lo cual puede facilitar el diseño de mejores compuestos quimioterapéuticos contra la enfermedad de Chagas a partir de productos naturales o sintéticos que podrían usar como base estructural a Mammea A/BA.

XIV. PERSPECTIVAS

- ❖ Estudiar la expresión diferencial de proteínas en parásitos expuestos con cumarinas mediante técnicas proteómicas, para entender mejor las alteraciones morfofisiológicas y el mecanismo de muerte celular.
- ❖ Estudiar si existe lipoperoxidación y carbonilación de proteínas como consecuencia del estrés oxidativo producido por Mamea A/BA.
- ❖ Evaluar la actividad tripanocida de estos compuestos en un modelo murino de infección con *T. cruzi* determinando su impacto sobre la parasitemia y patología producida por este parásito.
- ❖ Realizar estudios *in silico* y biológicos para probar si Mamea A/BA interactúa con moléculas importantes en la inducción de apoptosis y autofagia como mTOR o aquellas implicadas en la sobrevivencia del parásito como triosafosfato isomerasa de *T. cruzi* (TcTIM), tripanotión reductasa (TryR) requerida para el equilibrio redox del parásito y anhidrasa carbónica (CA) los cuales han sido sugeridos como importantes blancos de tripanosomátidos y existe evidencia experimental de que derivados cumarínicos tienen buena capacidad inhibitoria.

XV. REFERENCIAS

- Abe, F., Nagafuji, S., Okabe, H., Akahane, H., Estrada-Muñiz, E., Huerta-Reyes, M., Reyes-Chilpa, R., 2004. Trypanocidal constituents in plants 3. Leaves of *Garcinia intermedia* and heartwood of *Calophyllum brasiliense*. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 141–3.
- Abe, F., Nagafuji, S., Yamauchi, T., Okabe, H., Maki, J., Higo, H., Akahane, H., Aguilar, A., Jiménez-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.* 25, 1188–91.
- Arnal, A., Waleckx, E., Rico-Chávez, O., Herrera, C., Dumonteil, E., 2019. Estimating the current burden of Chagas disease in Mexico: A systematic review and meta-analysis of epidemiological surveys from 2006 to 2017. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, e0006859.
- Bonney, K.M., Luthringer, D.J., Kim, S.A., Garg, N.J., Engman, D.M., 2019. Pathology and Pathogenesis of Chagas heart disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 14, 421–447.
- Bosseno, M., Barnabé, C., Gastélum, E.M., Kasten, F.L., Ramsey, J., Espinoza, B., Brenière, S.F., 2002. Predominance of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Mexico. *J Clin Microbiol.* 2002;40(2):627–632.
- Brenière, S.F., Waleckx, E., Barnabé, C., 2016. Over six thousand *Trypanosoma cruzi* strains classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004792.
- Brenzan, M.A., Cristina, I., Ferreira, P., Valdrinez, M., Lonardon, C., Honda, P.A., Filho, E.R., Nakamura, C.V., Prado, B., Filho, D., 2008. Activity of extracts and coumarins from the leaves of *Calophyllum brasiliense* on *Leishmania braziliensis*. *Pharm Biol.*, 46:6, 380-386.
- Brenzan, M.A., Nakamura, C.V., Prado Dias Filho, B., Ueda-Nakamura, T., Young, M.C.M., Aparício Garcia Cortez, D., 2007. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. *Parasitol. Res.* 101, 715–22.
- Brenzan, M.A., Santos, A.O., Nakamura, C.V., Filho, B.P.D., Ueda-Nakamura, T., Young, M.C.M., Córrea, A.G., Júnior, J.A., Morgado-Díaz, J.A., Cortez, D.A.G., 2012. Effects of (–) Mamea A/BB isolated from *Calophyllum brasiliense* leaves

- and derivatives on mitochondrial membrane of *Leishmania amazonensis*. *Phytomedicine* 19, 223–230.
- Castillo-Arellano, J.I., Osuna-Fernández, H.R., Mumbru-Massip, M., Gómez Cancino, R., Reyes-Chilpa, R., 2019. The biosynthesis of pharmacologically active compounds in *Calophyllum brasiliense* seedlings is influenced by calcium and potassium under hydroponic conditions. *Bot. Sci.* 97, 89–99.
- Cheuka, P.M., Mayoka, G., Mutai, P., Chibale, K., 2017. The role of natural products in drug discovery and development against neglected tropical diseases. *Molecules*. 31;22(1).
- Chuang, J.-Y., Huang, Y.-F., Lu, H.-F., Ho, H.-C., Yang, J.-S., Li, T.-M., Chang, N.-W., Chung, J.-G., 2007. Coumarin induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through a mitochondria and caspase-3 dependent mechanism and NF-kappaB down-regulation. *In Vivo*; 21(6),1003-9.
- CONABIO, 2019. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. *Calophyllum brasiliense* Cambess (online): http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/24-guttilm.pdf
- Crombie, L., Jones, R.C.F., Palmer, C.J., 1987. Synthesis of the Mammea coumarins. Part 1. The coumarins of the Mammea A, B, and C series. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1987, 317-331.
- Dos Anjos, D.O., Sobral Alves, E.S., Gonçalves, V.T., Fontes, S.S., Nogueira, M.L., Suarez-Fontes, A.M., Neves da Costa, J.B., Rios-Santos, F., Vannier-Santos, M.A., 2016. Effects of a novel β -lapachone derivative on *Trypanosoma cruzi*: Parasite death involving apoptosis, autophagy and necrosis. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 6, 207–219.
- Dumonteil, E., Herrera, C., 2017. Ten years of Chagas disease research: Looking back to achievements, looking ahead to challenges. *PLoS Negl Trop Dis.*20;11(4): e0005422.
- El-Fadili, A.K., Zangger, H., Desponds, C., Gonzalez, I.J., Zalila, H., Schaff, C., Ives, A., Masina, S., Mottram, J.C., Fasel, N., 2010. Cathepsin B-like and cell death in the unicellular human pathogen *Leishmania*. *Cell Death Dis.*1(9): e71.
- Epidemiología 2018. Anuario de Epidemiología 1984-2018. <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html> (accessed 11.19.19).

- Espinoza, B., Rico, T., Sosa, S., Oaxaca, E., Vizcaino-Castillo, A., Caballero, M.L., Martínez, I., 2010. Mexican *Trypanosoma cruzi* strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010:1-10.
- Ferreira, C., Soares, D.C., Barreto-Junior, C.B., Nascimento, M.T., Freire-de-Lima, L., Delorenzi, J.C., Lima, M.E.F., Atella, G.C., Folly, E., Carvalho, T.M.U., Saraiva, E.M., Pinto-da-Silva, L.H., 2011. Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*. *Phytochemistry* 72, 2155–2164.
- García-Zebadúa J.C., Reyes-Chilpa R., Huerta-Reyes M., Castillo-Arellano J., Santillán-Hernández S., et. al. 2014. El árbol tropical *Calophyllum brasiliense*: una revisión botánica, química y farmacológica. *Vitae.* 21, 1-21.
- Garcia, F.P., Henrique da Silva Rodrigues, J., Din, Z.U., Rodrigues-Filho, E., Ueda-Nakamura, T., Auzély-Velty, R., Nakamura, C.V., 2017. A3K2A3-induced apoptotic cell death of *Leishmania amazonensis* occurs through caspase and ATP-dependent mitochondrial dysfunction. *Apoptosis* 22, 57–71.
- Gómez-Cansino, R., Espitia-Pinzon, C.I., Campos-Lara, M.G., Guzman-Gutierrez, S.L., Segura-Salinas, E., Echeverria-Valencia, G., Torras-Claveria, L., Cuevas-Figueroa, X.M., Reyes-Chilpa, R., 2015. Antimycobacterial and HIV-1 reverse transcriptase activity of Julianaceae and Clusiaceae plant species from Mexico. *Altern. Med.* 183036, 8 pages.
- Gomez-Verjan, J.C., Estrella-Parra, E.A., Gonzalez-Sanchez, I., Rivero-Segura, N.A., Vazquez-Martinez, R., Magos-Guerrero, G., Mendoza-Villanueva, D., Cerbón-Cervantes, M.A., Reyes-Chilpa, R., 2015. Toxicogenomic analysis of pharmacological active coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense*. *Genomics data* 6, 258–9.
- Gómez-Verjan, J.C., Rodríguez-Hernández, K.D., Reyes-Chilpa, R., 2017. Bioactive Coumarins and xanthenes from *Calophyllum* genus and analysis of their druglikeness and toxicological properties, *Stud Nat Prod Chem.* 53:277-302.
- Gómez-Verjan, J., Rivero-Segura, N., Estrella-Parra, E., Rincón-Heredia, R., Madariaga-Mazón, A., Flores-Soto, E., González-Meljem, M., Cerbón, M., Reyes-Chilpa, R., 2019. Network Pharmacology Uncovers Anticancer Activity of Mamea-Type Coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Planta Med.* 85, 14–23.
- Gonçalves, R.L.S., Menna Barreto, R.F.S., Polycarpo, C.R., Gadelha, F.R., Castro, S.L., Oliveira, M.F., 2011. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 43, 651–661.

- Guhl, F., 2017. Geographical distribution of Chagas disease in: American Trypanosomiasis Chagas Disease: One hundred years of research: second edition. Elsevier Inc., pp. 89–112.
- Honda, P.A., Ferreira, I.C.P., Cortez, D.A.G., Amado, C.A.B., Silveira, T.G. V, Brenzan, M.A., Lonardoni, M.V.C., 2010. Efficacy of components from leaves of *Calophyllum brasiliense* against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Phytomedicine* 17, 333–338.
- INDRE; Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos; Secretaria de Salud., 2019. Lineamientos para la vigilancia por laboratorio de la enfermedad de chagas (tripanosomiasis americana): https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/483705/Lineamientos_Chagas_4_T.pdf
- Kessler, R.L., Soares, M.J., Probst, C.M., Krieger, M.A., 2013. *Trypanosoma cruzi* response to sterol biosynthesis inhibitors: morphophysiological alterations leading to cell death. *PLoS One* 8, e55497.
- Lazarin-Bidóia, D., Desoti, V.C., Martins, S.C., Ribeiro, F.M., Ud Din, Z., Rodrigues-Filho, E., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C.V., de Oliveira Silva, S., 2016. Dibenzylideneacetones are potent trypanocidal compounds that affect the *Trypanosoma cruzi* redox system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 890–903.
- Lazarin-Bidóia, D., Desoti, V.C., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Nakamura, C. V, Silva, S.O., 2013. Further evidence of the trypanocidal action of eupomatenoid-5: confirmation of involvement of reactive oxygen species and mitochondria owing to a reduction in trypanothione reductase activity. *Free Radic. Biol. Med.* 60, 17–28.
- Lidani, K.C.F., Andrade, F.A., Bavia, L., Damasceno, F.S., Beltrame, M.H., Messias-Reason, I.J., Sandri, T.L., 2019. Chagas Disease: From discovery to a worldwide Health Problem. *Front. Public Health.* 7: 166.
- Linhares-Lacerda, L., Granato, A., Gomes-Neto, J.F., Conde, L., Freire-de-Lima, L., de Freitas, E.O., Freire-de-Lima, C.G., Barroso, S.P.C., Guerra, R.J. de A., Pedrosa, R.C., Savino, W., Morrot, A., 2018. Circulating plasma MicroRNA-208a as potential biomarker of chronic indeterminate phase of Chagas disease. *Front Microbiol.* 6, 9-269.
- López-Olmos, V., Pérez-Nasser, N., Piñero, D., Ortega, E., Hernandez, R., Espinoza, B., 1998. Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 69, 239–54.

- Machado-Silva, A., Cerqueira, P.G., Grazielle-Silva, V., Gadelha, F.R., Peloso, E. de F., Teixeira, S.M.R., Machado, C.R., 2016. How *Trypanosoma cruzi* deals with oxidative stress: Antioxidant defence and DNA repair pathways. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 767:8-22.
- Martínez, I., Noguera, B., Martínez-Hernández, F., Espinoza, B., 2013. Microsatellite and mini-exon analysis of Mexican human DTU I *Trypanosoma cruzi* strains and their susceptibility to nifurtimox and benznidazole. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 13,181–7.
- Maya, J.D., Cassels, B.K., Iturriaga-Vásquez, P., Ferreira, J., Faúndez, M., Galanti, N., Ferreira, A., Morello, A., 2007. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 146 (4):601-20.
- Menna-Barreto, R.F.S., 2019. Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill. *Cell Death Dis.* 10-93.
- Menna-Barreto, R.F.S., de Castro, S.L., 2015. Between armour and weapons — Cell death mechanisms in trypanosomatid parasites, in: cell death - autophagy, apoptosis and necrosis (en línea). <https://www.intechopen.com/books/cell-death-autophagy-apoptosis-and-necrosis/between-armour-and-weapons-cell-death-mechanisms-in-trypanosomatid-parasites> (Consultado el 11 de noviembre 2018).
- Meslin, B., Zalila, H., Fasel, N., Picot, S., Bienvenu, A.-L., 2011. Are protozoan metacaspases potential parasite killers?. *Parasit. Vectors* 4, 26.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., 2016. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* 79, 629–661.
- Paes, M.C., Cosentino-Gomes, D., de Souza, C.F., Nogueira, N.P. de A., Meyer-Fernandes, J.R., 2011. The role of heme and reactive oxygen species in proliferation and survival of *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol. Res.* 174614.
- Pérez-Molina, J.A., Molina, I., 2018. Seminar Chagas disease. *Lancet*; 391, 82–94.
- Pérez-Morales, D., Hernández, K.D.R., Martínez, I., Agredano-Moreno, L.T., Jiménez-García, L.F., Espinoza, B., 2017. Ultrastructural and physiological changes induced by different stress conditions on the human parasite *Trypanosoma cruzi*. *Cell Stress Chaperones* 22, 15–27.
- Piacenza, L., Peluffo, G., Alvarez, M.N., Martínez, A., Radi, R., 2013. *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas Disease. *Antioxid. Redox*

Signal. 19, 723–734.

- Proto, W.R., Coombs, G.H., Mottram, J.C., 2013. Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental?. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 58–66.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. 2012. American tripanosomiasis (Chagas disease). *Infectious Disease Clinics of North America.* 26:275-291
- Ramsey, J.M., Townsend Peterson, A., Carmona-Castro, O., Moo-Llanes, D.A., Nakazawa, Y., Butrick, M., Tun-Ku, E., de la Cruz-Félix, K., Ibarra-Cerdeña, C.N., 2015. Atlas of Mexican Triatominae (Reduviidae: Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 339–352.
- Rea, A., Tempone, A.G., Pinto, E.G., Mesquita, J.T., Rodrigues, E., Silva, L.G.M., Sartorelli, P., Lago, J.H.G., 2013. Soulmamarin Isolated from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) induces plasma membrane permeabilization of *Trypanosoma cruzi* and mitochondrial dysfunction. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2556.
- Reutrakul, V., Leewanich, P., Tuchinda, P., Pohmakotr, M., Jaipetch, T., Sophasan, S., Santisuk, T., 2003. Cytotoxic coumarins from *Mammea harmandii*. *Planta Med.* 69, 1048–51.
- Reyes-Chilpa, R., Estrada-Muñiz, E., Ramírez Apan, T., Amekraz, B., Aumelas, A., Jankowski, C.K., Vázquez-Torres, M., 2004. Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. *Life Sci.* 75, 1635–1647.
- Reyes-Chilpa, R., Estrada-Muñiz, E., Vega-Avila, E., Abe, F., Kinjo, J., Hernández-Ortega, S., 2008. Trypanocidal constituents in plants: 7. Mammea-type coumarins. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103, 431–6.
- Rodríguez-Hernández, K.D., Martínez, I., Agredano-Moreno, L.T., Jiménez-García, L.F., Reyes-Chilpa, R., Espinoza, B., 2019. Coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense* produce ultrastructural alterations and affect in vitro infectivity of *Trypanosoma cruzi*. *Phytomedicine.* 61:152827.
- Rojo-Medina, J., Ruiz-Matus, C., Salazar-Schettino, P.M., González-Roldán J.F., 2018. Enfermedad de Chagas en México. *Gac. Med. Mex.* 2018;154:605-612.
- Ruiz-Marcial, C., Chilpa, R., Estrada, E., Reyes-Esparza, J., Fariña, G.G., Rodríguez-Fragoso, L., 2007. Antiproliferative, cytotoxic and antitumour activity of coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense*. *J. Pharm. Pharmacol.* 59, 719–725.
- Sales, P.A., Molina, I., Murta, S.M.F., Sánchez-Montalvá, A., Salvador, F., Corrêa-

- Oliveira, R., Carneiro, C.M., 2017. Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. *Am. J. Trop. Med.*
- Sandes, J., Fontes, A., Regis-da-Silva, C., de Castro, M., Lima-Junior, C., Silva, F., Vasconcellos, M.L.A.A., Figueiredo, R., 2014. *Trypanosoma cruzi* cell death induced by the morita-baylis-hillman adduct 3-hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanenitrile). *PLoS One* 9, e93936.
- Secretaría de Salud; Programas de Enfermedades Transmitidas por Vectores, 2019. Manual de procedimientos para la enfermedad de chagas en Mexico: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/447946/Manual_de_Procedimientos_para_la_Enfermedad_de_Chagas_en_Mexico.pdf
- Sepúlveda-Robles, O., Espinoza-Gutiérrez, B., Gomez-Verjan, J.C., Guzmán-Gutiérrez, S.L., De Ita, M., Silva-Miranda, M., Espitia-Pinzón, C.I., Fernández-Ramírez, F., Herrera-Salazar, A., Mata-Rocha, M., Ortega-Hernández, A., Reyes-Chilpa, R., 2019. Trypanocidal and toxicological assessment *in vitro* and *in silico* of three sesquiterpene lactones from *Asteraceae* plant species. *Food Chem. Toxicol.* 125, 55–61.
- Souza, W., 2009. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 89–100.
- Souza, M., Beserra, A.M.S., Martins, D.C., Real, V.V., Santos, R.A.N. dos, Rao, V.S., Silva, R.M. da, Martins, D., 2009. *In vitro* and *in vivo* anti-*Helicobacter pylori* activity of *Calophyllum brasiliense* Camb. *J. Ethnopharmacol.* 123, 452–458.
- Su, X.H., Zhang, M.L., Li, L.G., Huo, C.H., Gu, Y.C., Shi, Q.W., 2008. Chemical constituents of the plants of the genus *Calophyllum*. *Chem. Biodivers.* 5(12):2579–608.
- Teixeira, D.E., Benchimol, M., Crepaldi, P.H., de Souza, W., 2012. Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas Disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1749.
- Vanrell, M.C., Losinno, A.D., Cueto, J.A., Balcazar, D., Fraccaroli, L.V., Carrillo, C., Romano, P.S., 2017. The regulation of autophagy differentially affects *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0006049.
- Venugopala, K.N., Rashmi, V., Odhav, B., 2013. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. *Biomed Res Int.* 2013:963248.
- Vizcaíno-Castillo, A., Jiménez-Marín, A., Espinoza, B., 2014. Exacerbated skeletal

muscle inflammation and calcification in the acute phase of infection by Mexican *Trypanosoma cruzi* DTUI strain. *Biomed Res. Int.* 2014, 450389.

Wang, Q., Guo, Y., Jiang, S., Dong, M., Kuerban, K., Li, J., Feng, M., Chen, Y., Ye, L., 2018. A hybrid of coumarin and phenylsulfonylfuroxan induces caspase-dependent apoptosis and cytoprotective autophagy in lung adenocarcinoma cells. *Phytomedicine* 39, 160–167.

Werner Apt, B., Inés Zulantay, A., 2011. Estado actual en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Rev. Med. Chil.* 139, 247–257. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872011000200016>

Wheeler, R.J., Gull, K., Sunter, J.D., 2019. Coordination of the cell cycle in Trypanosomes. *Annu. Rev. Microbiol.* 73, 133–154.

WHO | World Health Organization:
https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/ (consultado el 13 de noviembre de 2019).

Zavaleta-Mancera, H., Reyes-Chilpa, R., García-Zebadua, J., 2011. Leaf structure of two Chemotypes of *Calophyllum brasiliense* from Mexico . *Microsc. Microanal.* 17, 340–341.

Zingales, B., Miles, M.A., Campbell, D.A., Tibayrenc, M., Macedo, A.M., Teixeira, M.M.G., Schijman, A.G., Llewellyn, M.S., Lages-silva, E., Machado, C.R., Andrade, S.G., Sturm, N.R., 2012. Infection , genetics and evolution the revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature : Rationale , epidemiological relevance and research applications. *Infect. Genet. Evol.* 12, 240–253.

XVI. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

2020. Mammea type coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense* induced apoptotic cell death of *Trypanosoma cruzi* through mitochondrial dysfunction, ROS production and cell cycle alterations. Karla Daniela Rodríguez-Hernández, Ignacio Martínez; Ricardo Reyes-Chilpa; Bertha Espinoza. *Bioorganic Chemistry*, Vol. 100, 103894. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103894>

2019. Coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense* produce ultrastructural alterations and affect *in vitro* infectivity of *Trypanosoma cruzi*. Karla Daniela Rodríguez-Hernández, Ignacio Martínez, Luis Felipe Jiménez-García, Ricardo Reyes-Chilpa, Bertha Espinoza. *Phytomedicine*, Vol. 61, 152827. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152827>

2018. Computational methods to discover compounds for the treatment of Chagas Disease. Eduardo M. Cortés-Ruiz, Oscar Palomino-Hernández, Karla Daniela Rodríguez-Hernández, Bertha Espinoza, José L. Medina-Franco. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. Vol. 113, 119-142. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2018.03.005>

2017. Bioactive coumarins and xanthenes from *Calophyllum* genus and analysis of their pharmacological properties. Gómez-Verján, JC; Rodríguez-Hernández, K. D; Reyes-Chilpa, R. *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol.53, 277-307. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63930-1.00008-9>

2017. Ultrastructural changes and physiological stress induced by different conditions on the human parasite *Trypanosoma cruzi*. Deyanira Perez-Morales, Karla Daniela Rodríguez-Hernandez, Ignacio Martinez, Lourdes Teresa Agredano-Moreno, Luis Felipe Jimenez-Garcia, Bertha Espinoza. *Cell Stress and Chaperones*. Vol. 22(1), 15-27. <https://doi.org/10.1007/s12192-016-0736-y>



Mammea type coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense* induced apoptotic cell death of *Trypanosoma cruzi* through mitochondrial dysfunction, ROS production and cell cycle alterations

Karla Daniela Rodríguez-Hernández^a, Ignacio Martínez^a, Ricardo Reyes-Chilpa^{b,*}, Bertha Espinoza^{a,*}

^a Laboratorio de Estudios sobre Tripanosomiasis, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510 México, D.F., Mexico

^b Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510 México, D.F., Mexico



ARTICLE INFO

Keywords:

Calophyllum brasiliense
Trypanosoma cruzi
Mammea type coumarins
Apoptosis
Trypanocidal activity

ABSTRACT

Chagas Disease is a neglected tropical disease caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* which affects 6–8 million people, mostly in Latin America. The medical treatment is based on two nitroimidazole compounds, which have limited effectiveness in the chronic phase of the disease and produce several adverse effects; consequently, there is an urgent need to develop new, safe, and effective drugs. Previous reports had shown that natural coumarins, especially mammea A/BA isolated from the tropical tree *Calophyllum brasiliense*, is a promissory molecule for developing new drugs, due to its potent activity, higher than benznidazole, selectivity, and its low toxicity in mice. However, its mode of action is still unknown. In the present work, we evaluated the mechanism of action of the coumarin mammea A/BA (93.6%), isolated from the tropical tree *C. brasiliense* on Querétaro strain (Tc1) of *T. cruzi*. This compound was tested in vitro on epimastigotes and trypomastigotes of *T. cruzi* for intracellular esterase activity, plasma membrane integrity, phosphatidylserine exposure, ROS production, mitochondrial membrane potential, caspase-like activity, DNA integrity, cell cycle and autophagy. Mammea A/BA showed a 50% lethal concentration (LC₅₀) of 85.8 and 36.9 μM for epimastigotes and trypomastigotes respectively. It affected intracellular esterase activity, produced important plasma membrane damage and induced phosphatidylserine exposure. An increase in reactive oxygen species (ROS) and decrease in mitochondrial membrane potential were detected. Caspase-like activity was present in both parasite forms producing DNA integrity damage. This compound also induced a cell cycle arrest in the G1 phase and the presence of autophagy vacuoles. The above data suggest that mammea A/BA induce cell death of *T. cruzi* by autophagy and apoptosis-like phenomena and support our suggestion that mammea A/BA could be a promising molecule for the development of new drugs to treat Chagas Disease.

1. Introduction

Chagas Disease (CD) is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, which is transmitted to humans by insect vectors (family Hemiptera; subfamily Triatominae), through blood transfusion, congenital transmission, organ transplantation, and ingestion of contaminated food with vectors faeces. The World Health Organization recognized it as one of 17 neglected diseases in the world, affecting 7–8 million people in Latin America, where it is endemic with severe health, economic and social consequences. Furthermore, due to the immigration of infected

people, the CD has emerged in non-endemic countries [1].

CD occurs in two clinical phases: the acute phase characterized by high parasitemia and a chronic phase that can be symptomatic or asymptomatic which includes dilated cardiomyopathy and/or digestive alterations (megaesophagus, megacolon) and alterations of the peripheral nervous system that can lead to death. The current chemotherapy is based on benznidazole and nifurtimox, two nitro-compounds that are efficient in acute infections, but show limited effectiveness in the chronic phase of the disease and produce severe collateral effects, mainly hepatic and renal damage [2]. Therefore, the

* Corresponding authors at: Instituto de Química, Departamento de Productos Naturales, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. 04510 México D.F., Mexico (R. Reyes-Chilpa). Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. 04510, México, D.F., Mexico (B. Espinoza).

E-mail addresses: chilpa@unam.mx (R. Reyes-Chilpa), besgu@iibiomedicas.unam.mx (B. Espinoza).

<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103894>

Received 6 February 2020; Received in revised form 25 March 2020; Accepted 27 April 2020

Available online 01 May 2020

0045-2068/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

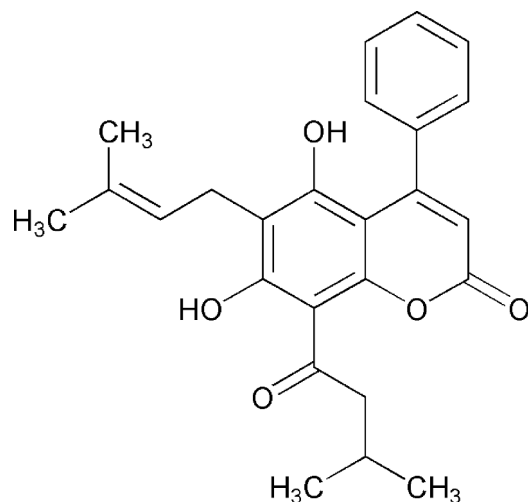


Fig. 1. Chemical structure of mammea A/BA isolated from the leaves of tropical tree *Calophyllum brasiliense*.

development of novel and effective drugs is crucial and included different strategies, among them, the study of natural compounds with important trypanocidal activity [3].

Among the trypanocidal natural compounds are the mammea type coumarins. The compounds have been isolated from the leaves of the tropical tree *Calophyllum brasiliense* Cambess (Calophyllaceae). This species thrives in tropical rain forests from Mexico to Brazil. The phenolic compounds have a 2H-1-benzopyran-2-one skeleton, and have shown activity against the trypanosomatids *Leishmania amazonensis*, *L. brasiliensis* [4–6] and *T. cruzi* [7].

In a previous report, we showed that these coumarins especially mammea A/BA (Fig. 1) produces several alterations on motility, growth recovery on several strains of *T. cruzi*. Mammea A/BA also induced important ultrastructure alterations on the plasma membrane, rounding and deformation of the parasite body, mitochondrial swelling, loss of nucleus and nucleolus integrity and intense cytoplasmic vacuolization that leads to the death of parasites [8]. Important was the fact that this compound showed significant inhibition of parasite infectivity in *in vitro* assays and reduction of intracellular amastigotes compared to Beznidazole. Furthermore, mammea A/BA presented low cytotoxicity on mammalian cells and high selectivity to the parasite [6,7]. It was also innocuous in mice administered intraperitoneally in a range of 10 up to 5000 mg/kg [9], suggesting that these compounds could lead to the development of new trypanocidal drugs. However, their mechanisms of action are still unknown.

The aim of the present study was to better characterize the biochemical alterations that are induced by mammea A/BA against epimastigotes and trypomastigotes forms of a virulent Mexican strain of *T. cruzi* (Queretaro, TcI) [10] and to elucidate its mechanism of action in order to design more efficient drugs.

2. Materials and methods

2.1. Parasites

Epimastigotes of *T. cruzi* Queretaro strain (TBAR/MX/ 0000/ Queretaro) Tc-I, virulent strain, were cultured in liver infusion tryptose medium (LIT), supplemented with 10% FBS and 25 µL/mL of hemin and maintained at 28 °C for 3–4 days to obtain the log phase of growth. Trypomastigotes forms were obtained from cultures of Vero cells (Kidney epithelial cells from African green monkey *Cercopithecus aethiops*) cultivated in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), pH 7.6, plus 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mg/mL-glutamine in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. After monolayer formation, the cells were

infected with trypomastigotes obtained of infected blood from Balb/c mice. After five days, the parasites were collected from the culture supernatant by centrifugation at 12,800 xg for 30 min. The supernatant was discarded, and the parasites were suspended at appropriate concentrations for the experiments [10,11].

2.2. Isolation, purification, and identification of compounds

C. brasiliense leaves were collected in a tropical rain forest at the locality of Tatahuicapan de Juárez, State of Veracruz, México. Voucher specimens were deposited at the Herbarium of the Instituto Mexicano del Seguro Social (Mexico City) with number 16131. The mammea A/BA extraction and its isolation were performed from hexane extract by column chromatography. Identification of the compound was performed by proton NMR and its purity (93.6%) determined by HPLC, as previously described [8]. Minor constituents were mammea A/BB (3.1%) and A/BD (1.6%).

2.3. Cell viability assay

The viability of *T. cruzi* epimastigotes and trypomastigote forms of the virulent Querétaro strain was determined using LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). The parasites (2×10^6 /mL) were incubated at 28 °C (epimastigotes) or 37 °C (trypomastigotes) in 24 well plates and treated with different mammea A/BA concentrations (15.40 to 246 µM). After 12 h incubation, the parasites were centrifuged at 855g for 10 min to remove the supernatant medium; the pellet with the parasites was next re-suspended in 997 µL of cold phosphate-buffered saline (PBS), 2 µL of a solution of calcein-AM (CA) 50 µM and 1 µL of ethidium homodimer (EH) 2 mM. Then, samples were incubated for 45 min at room temperature and immediately analyzed in a flow cytometer (BD FACSCalibur flow cytometer) with a 530/30 nm filter (FL1-H) for CA (green fluorescence/ living cells) and a 670 nm/long-pass filter (FL3-H) for EH (red fluorescence/dead cells), 20,000 events per treatment were acquired. The data were analyzed using FlowJo 7.3.2 software and expressed as the percentage of cells for each population phenotype. The compensation was performed using live parasites grown in LIT medium and stained only with CA and heat dead parasites (55 °C for 15 min) stained with EH [11,12].

2.4. Phosphatidylserine exposure determination

To determine if the parasites treated with mammea A/BA died by necrosis or apoptosis the Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) was used. For this, parasites were cultured with mammea A/BA. Antimycin A at 187.5 µM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as a positive control [13,14]. After 12 h, parasites were centrifuged, washed as described above and resuspended in 493.5 µL of binding buffer annexin-V (50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12.5 mM CaCl₂, pH 7.4), 5 µL annexin V (AV-FITC) and 1.5 µL of a solution of propidium iodide (PI) 1.5 mM. Samples were incubated for 20 min at room temperature and immediately analyzed by a flow cytometer (same as mentioned above) with a 530/30 nm filter (FL1-H) for Annexin V-FITC (green fluorescence/apoptotic cell) and a filter < 575 nm (FL3-H) for PI (red fluorescence/necrotic cells).

2.5. Determination of intracellular oxidative stress

The induction of intracellular oxidative stress was assessed using the oxidant-sensitive fluorescent probe DCFDA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). *T. cruzi* epimastigotes growing in logarithmic phase, or trypomastigotes, were incubated with mammea A/BA during 2 h. Treated-parasites were harvested, centrifuged, washed and resuspended in cold PBS as mention above and stained for 45 min in the dark with 10 µM DCFDA at 28 or 37 °C respectively. Parasites treated with

160 μM H_2O_2 were used as a positive control [11]. The fluorescence was determined by oxidation of DCFDA to the fluorescent product 2,7-dichlorofluorescein (DCF) in a FACScalibur flow cytometer at λ_{ex} of 488 nm and λ_{em} of 530 nm. Results were expressed as the ratio Gm_t/Gm_c , where Gm_t and Gm_c correspond to the fluorescence DCF + geometric mean of histograms obtained for treated and untreated (control) cells, respectively [14,15].

2.6. Mitochondrial potential assay ($\Delta\Psi_m$)

After exposure to mammea A/BA during 6 h, the parasites (2×10^6 /mL) were washed with PBS and resuspended in 0.5 mL PBS with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Rho 123 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and incubated for 20 min. This dye accumulates in the mitochondrial matrix under the influence of $\Delta\Psi_m$, where it reversibly forms monomers (green) with characteristic absorption and emission spectra. CCCP (100 μM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as a positive control of mitochondrial depolarization. Then, alterations in the fluorescence intensities for Rho 123 (FL1-H) were quantified by the variation index (IV) that was obtained using the equation $(\text{TM} - \text{CM})/\text{CM}$, where TM is the median of fluorescence for treated parasites and CM is the median of fluorescence for control parasites (non-treated). Negative IV values correspond to the depolarization of mitochondrial membrane [14].

2.7. Cell cycle analysis

Epimastigotes were incubated in LIT medium with or without mammea A/BA at 36.9 to 147.6 μM for 12 h. Cells were washed with cold PBS and fixed in 70% (v/v) ice-cold ethanol/PBS at 4 °C for at least 1:30 h. Fixed cells were stained with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ propidium iodide (P3566, Invitrogen, Eugene, OR, USA) and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNase at 37 °C for 1 h. The data acquisition and analysis were performed using a FACScalibur flow cytometer as mentioned above and the percentages of cells in each cell cycle phase were determined [14,16].

2.8. Detection of caspase-like activity

The caspase-like activity was estimated with CaspACE–fluorescein isothiocyanate (FITC)-VAD-FMK in Situ Marker (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions [17,18]. Briefly, in cells this inhibitor irreversibly binds to activated caspases showing fluorescence. Epimastigotes and trypomastigotes were incubated with mammea A/BA (36.9 to 147.6 μM), medium alone (negative control) or 250 μM Antimycin A (positive control) for 12 h at 28 or 37 °C respectively. After incubation, cells were stained with CaspACE–FITC–VAD–FMK (25 μM) for 1 h at 37 °C, then were washed with cold PBS and fixed with 10% buffered formalin for 30 min at room temperature and immediately analyzed by a flow cytometer (same as mentioned above) with a 530/30 nm filter (FL1-H) for FITC (green fluorescence/caspase-like activity and apoptotic cell) and a filter < 575 nm (FL3-H) for PI (red fluorescence/necrotic cells).

2.9. Determination of DNA fragmentation

Epimastigotes and trypomastigotes 25×10^6 , were incubated with LC_{50} of mammea A /BA, DMSO for 12 h and H_2O_2 320 μM for 2 h as a positive control. The parasites were washed 2 times with PBS and resuspended in lysis buffer (1 M NaCl, 0.5 M EDTA pH8, 5% SDS), 5 μl of Proteinase K (20 mg/ml), 5 μl of RNase (20 mg/ml) and incubated overnight at 37 °C. Total cellular DNA was isolated by the usual phenol/chloroform/ isoamyl alcohol procedure (25: 24: 1) and centrifuged at 13,000 xg for 20 min. The supernatant containing fragmented DNA was precipitated with 3 M sodium acetate and 100% isopropanol overnight at -20 °C. Next, DNA was centrifuged at 13,000g for 10 min and the pellet was washed with 1 mL of 70% ethanol. Then, it was solubilized in Milli-Q water and quantified spectrophotometrically at 260/280 nm.

Total DNA (5 μg) was mixed with DNA loading buffer and loaded on 1% agarose gels prepared with 1X TAE buffer. The gels were run for 1 h at 100 V and stained with ethidium bromide [19,20].

2.10. Autophagy assay

Acridine orange (AO) (Invitrogen, Eugene, OR, USA) was used as a fluorescent marker of acidic vacuoles, as previously described [20]. At least 2×10^6 cells were incubated with mammea A/BA for 12 h, collected by centrifugation and washed with PBS. The parasites were resuspended in AO 35 μM in PBS and incubated for 30 min at 28 °C. After incubation, cells were washed three times in PBS and quantified by flow cytometry with a filter FL3-H (670 nm band pass filter) for red fluorescence.

2.11. Statistical analysis

The statistical analyses were performed using Prism 6 software (GraphPad, San Diego, CA, USA). All the experiments represent the mean of three independent assays tested in duplicate and the data shown in the graphs are expressed as the mean \pm standard deviation (SD). The data were analyzed using two-way analyses of variance (ANOVAs). Significant differences among means were identified using Dunnett's multiple comparisons tests. Values of $p < 0.001$ and $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Mammea A/BA affects the viability of *T. cruzi*

Previous studies have shown that mammea A/BA affects motility, replication and ultrastructure of the two stages of the parasite [8]. Now intracellular esterase activity inhibition and cell membrane damage were used to confirm that mammea A/BA affects viability. Epimastigotes or trypomastigotes were incubated with the compound at different concentrations (15.4 to 246 μM), and the intracellular esterase activity in viable cells (CA +) and membrane damage (EH +) were evaluated to determine live and dead parasites (Fig. 2a). The compound caused a significant decrease in the viability of both forms of the parasite in a concentration-dependent manner with a LC_{50} of 36.9 μM for trypomastigotes and 85.8 μM for epimastigotes after 12 h of incubation. The percentage of dead cells was statically significant compared to DMSO control when parasites were treated with 30.8 μM in trypomastigotes (Fig. 2b) and 61.5 μM in epimastigotes (Fig. 2c). Benznidazole (BZ) tested at 384.6 μM induced 62.8% of cell death on trypomastigotes stage, while it had no effect on the of epimastigotes viability (only 3.33% of mortality) (Fig. 2b, c).

3.2. Mammea A/BA induces phosphatidylserine exposure and cell membrane damage in *T. cruzi*

Previous experiments of our group using electron microscopy had shown that mammea A/BA induce cell shrinkage and decreased cell volume, among other effects, that suggested apoptosis [8]. In order to determine whether the mechanism of cell death triggered by this compound involves apoptosis or necrosis, we evaluated the externalization of phosphatidylserine, an apoptotic marker that is present in the outer leaflet of the plasma membrane. The epimastigotes and trypomastigotes were treated with mammea A/BA for 12 h and stained with FITC-conjugated annexin-V and PI. The positive control, antimycin A, increased phosphatidylserine exposure by 70%, and 90% in trypomastigotes and epimastigotes, respectively (Fig. 3a). The results showed a concentration-dependent increased in the annexin V+ and PI+ fluorescence at LC_{50} and $2 \times \text{LC}_{50}$ in epimastigotes forms, with significant difference respect to the negative control DMSO, indicating late apoptosis and necrosis (Fig. 3b). In contrast, phosphatidylserine exposure

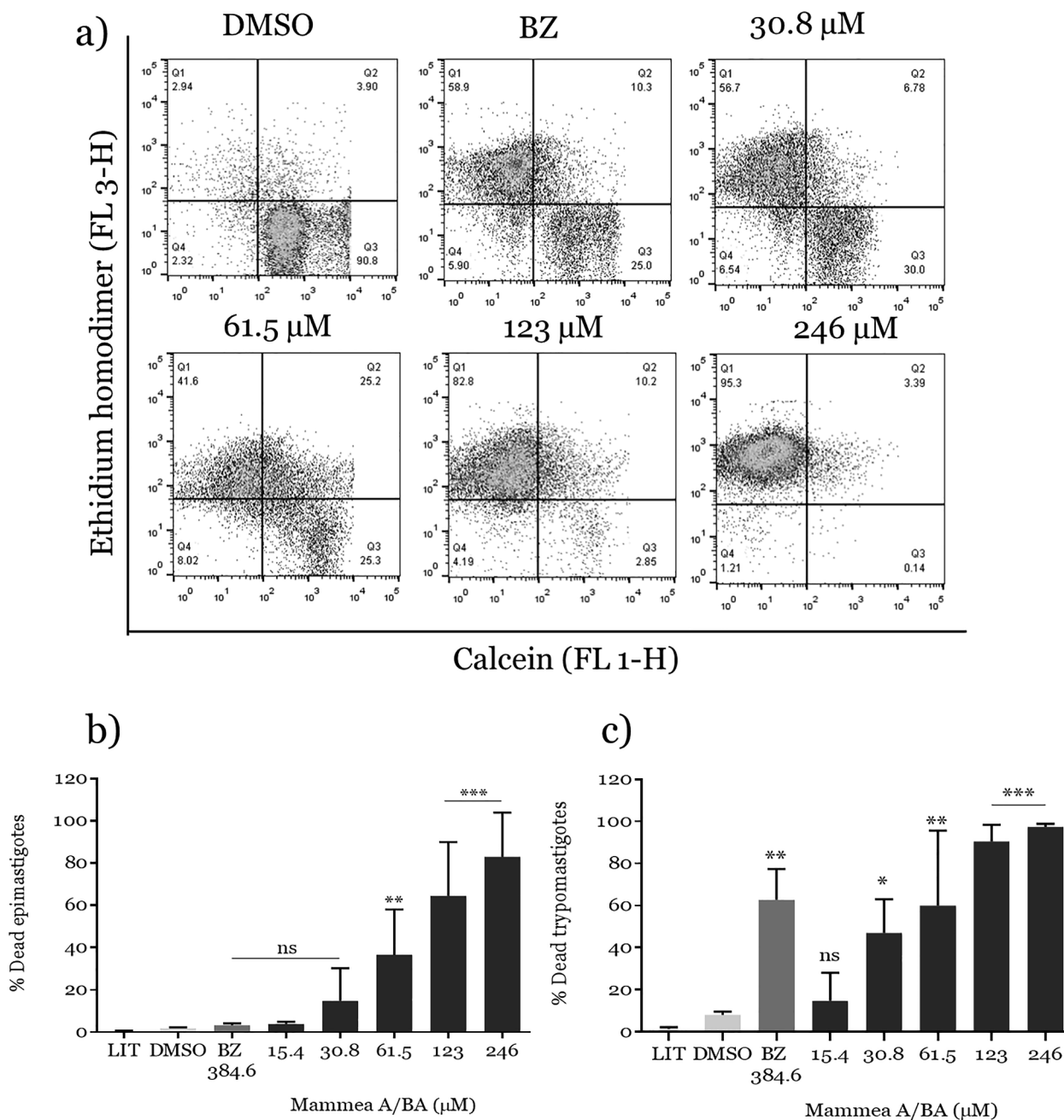


Fig. 2. Effect of mammea A/BA on the viability of *T. cruzi*. Viability was evaluated by live/death assay. (a) Flow cytometry dot plots of control and mammea A/BA treated trypomastigotes. Dead cells were considering with the phenotype (EH⁺, upper left quadrant) that represents total membrane damage and (CA⁺/EH⁺, double labelled) that represent plasma membrane initial permeability damage; live cells were positive to calcein (CA⁺, lower right quadrant), lower left quadrant corresponds to the cells negative for both dyes (CA⁻/EH⁻, dead/non necrotic cells). Percentage of death epimastigotes (b) and trypomastigotes (c). The parasites were incubated with different treatments for 12 h and stained with both fluorescent stain CA⁺/EH⁺. The results are represented as mean \pm SD of positive cells to EH in each treatment in three independent experiments, performed in duplicate. Two-way analysis of variance and Bonferroni's multiple comparisons test were applied. Asterisks represent significant differences compared with the control DMSO. ns = not significant, *p < 0.1, **p < 0.05, ***p < 0.001.

(early apoptosis) was more pronounced in trypomastigotes (Fig. 3c) than in epimastigotes (Fig. 3b) with all tested concentrations.

3.3. Mammea A/BA increases the reactive oxygen species.

We decided to investigate possible oxidative damage caused by mammea A/BA in the parasites. The production of total ROS was investigated using the fluorescent probe DCFDA, which primarily detects cellular stress reacting with hydrogen peroxide and hydroxyl radicals. Mammea A/BA increased significantly total ROS production in epimastigotes but not in trypomastigotes. The parasites treated with the

LC₅₀ and 2xLC₅₀ showed an increase in ROS production of 63.7% and 44.8%, respectively as compared with DMSO (Fig. 4a). On the other hand, LC₅₀ in trypomastigotes showed a slight increase of 17.93% (Fig. 4b). The positive control (H₂O₂) increased total ROS production to 100% in epimastigotes and 27.98% in trypomastigotes.

3.4. Mammea A/BA induces depolarization of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$)

Based on previous studies that reported the effect of mammea type coumarins on protozoan parasites mitochondria [5], we evaluated the

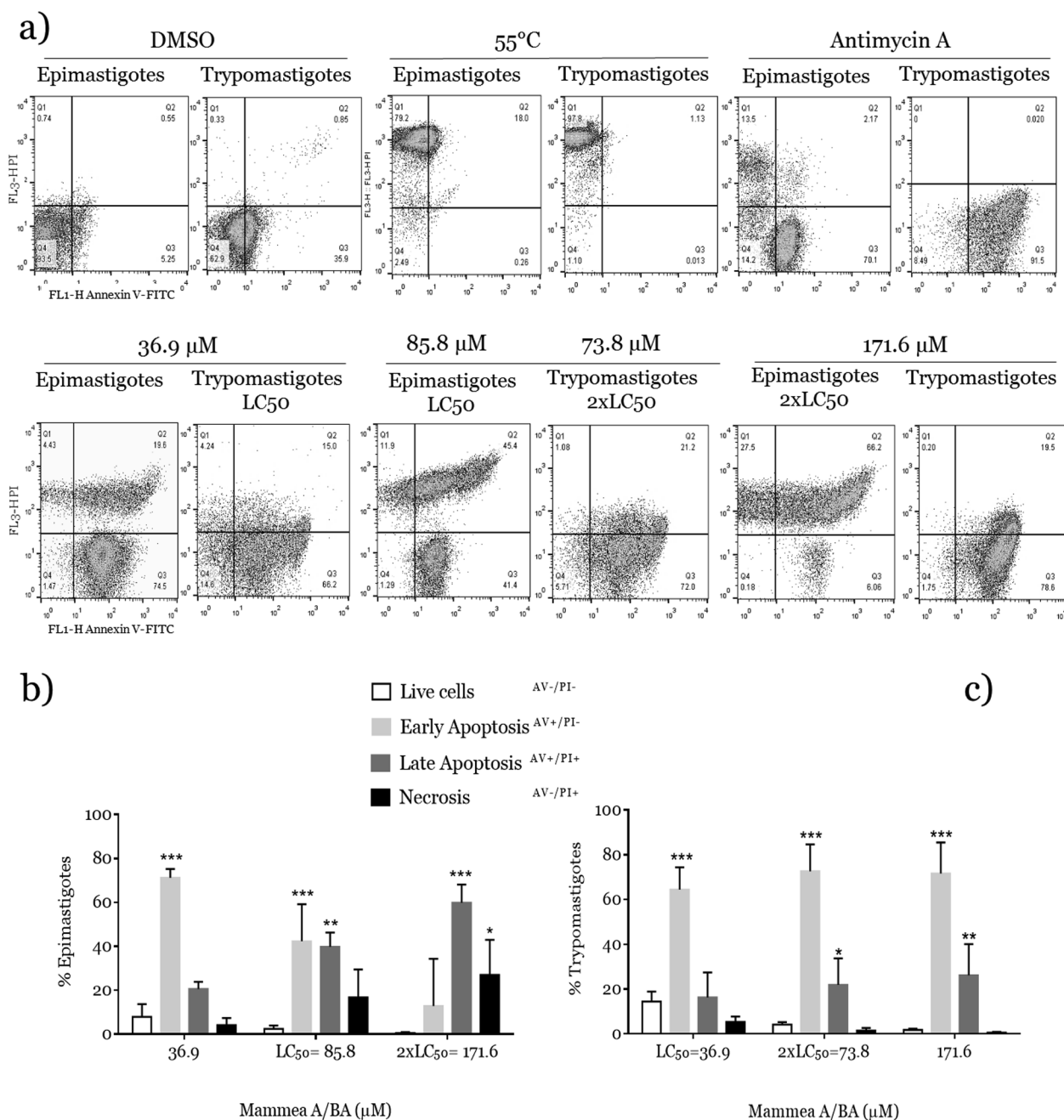


Fig. 3. Effects of mamea A/BA on phosphatidylserine exposure and membrane damage. The parasites were incubated with different treatments during 12 h and stained with Annexin V (AV) and propidium iodide (PI) and analyzed by flow cytometry. (a) Flow cytometry dot plots of trypomastigote and epimastigotes forms. Cells in the upper left quadrant were positive for PI (necrotic cells). Cells in the lower right quadrant were positive only for AV (early apoptosis). Events in the upper right quadrant were double-positive for both markers (late apoptosis or necrotic cells), whereas the lower left quadrant corresponds to the cells negative for both dyes (live or cells that have not undergone apoptosis or necrosis). (b, c) The graphs are representative of mean and SD of three independent experiments. Two-way analysis of variance and Dunnett's multiple comparisons test were applied. Asterisks represent significant differences between each treatment. * $p < 0.1$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

mitochondria membrane potential in parasites treated with mamea A/BA using the cationic dye Rh123. This is accumulated in the mitochondria of healthy cells with high potential, but it is not stored in cells with lower potential and remains as a monomer in the cytoplasm. The monomeric dye fluoresces in green, indicating the depolarization of mitochondrial membrane potential. Mamea A/BA caused a concentration-dependent decrease in mitochondrial membrane potential in both parasite stages after 6 h of treatment compared with the parasite incubated only with DMSO (Fig. 4c, d). The loss of $\Delta\Psi_m$ was more pronounced in epimastigotes than tryptomastigotes. In the first case

showing IV values of -0.67 and -0.83 at LC_{50} and $2xLC_{50}$ of mamea A/BA, respectively (Fig. 4c). The tryptomastigotes showed IV values of -0.48 and -0.55 at LC_{50} and $2xLC_{50}$ (Fig. 4d). The control of mitochondrial depolarization, CCCP ($100 \mu M$) showed IV values of -0.62 and -0.47 in epimastigotes and tryptomastigotes, respectively.

3.5. Mamea A/BA increase the caspase-like activity

To determine if the mechanism of cell death triggered by mamea A/BA involves apoptosis, we evaluated the cysteine aspartate proteases

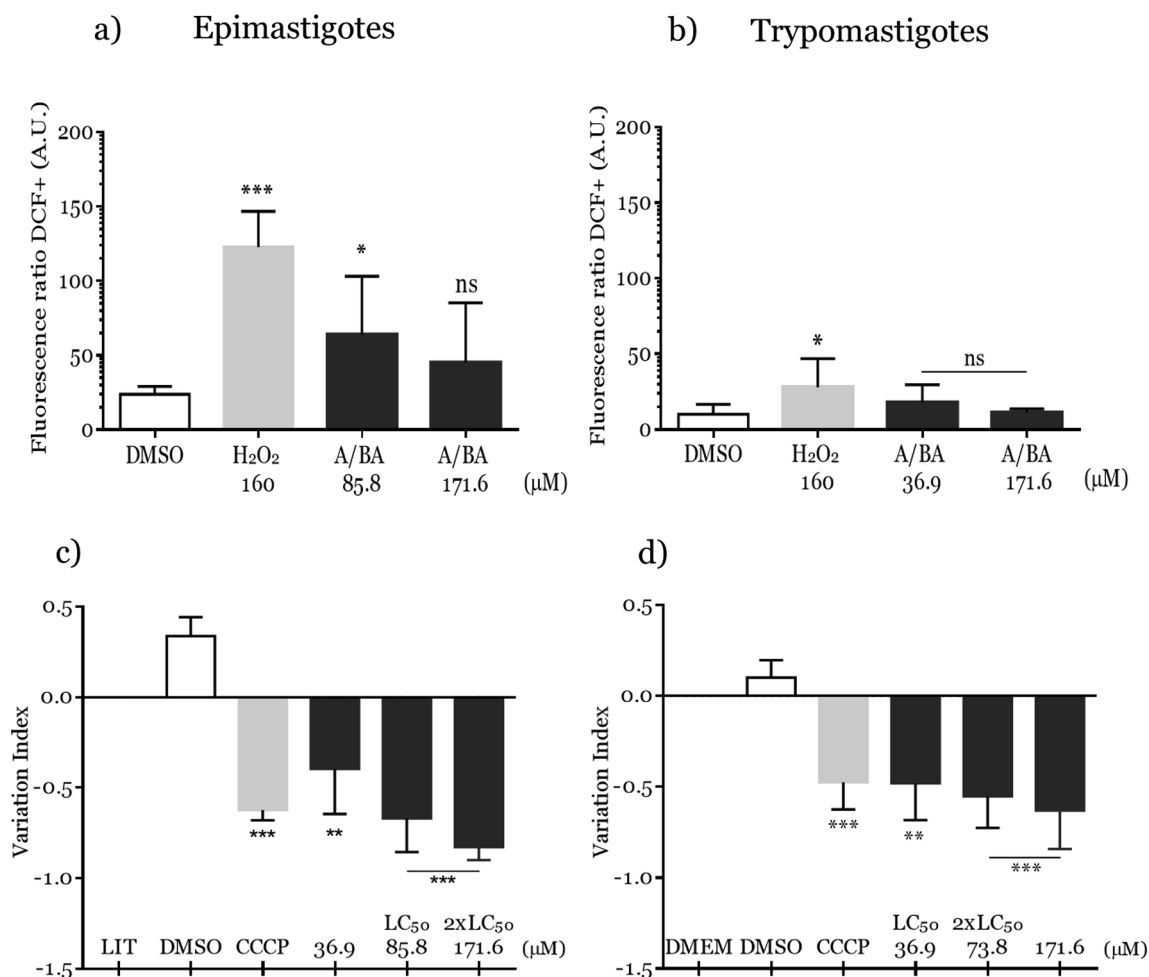


Fig. 4. ROS production and mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi*. Epimastigotes and trypomastigotes were treated with different mammea A/BA concentrations for 2 or 6 h and stained with DCFDA (upper panels) or Rh123 (lower panels), respectively. The graphs are representative of the mean and SD of three independent experiments. Asterisks indicate significant differences relative to the control group DMSO. Anova, Dunnett's multiple comparisons test, ***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05, ns: not significant.

participation (caspases-like), which are key enzymes in the apoptotic pathways, especially the abundant caspase-like proteases for apoptotic nuclease activation. The presence of caspase-like activity in the parasites was examined using FITC-VAD-FMK a fluorometric caspase inhibitor. To confirm the existence of these active proteases in *T. cruzi*, the parasites were incubated with mammea A/BA and the inhibitor. The fluorescence intensity was measured in treated and control parasites (Fig. 5a). In epimastigotes, a significant increase in fluorescence (FITC + /PI +) indicated an increase in proteases activity after treatment with LC₅₀ and 2xLC₅₀ of mammea A/BA after 12 h as compared with non-treated cells (Fig. 5b). This activity was two-fold higher with the latter concentration. In the case of trypomastigotes, caspase-like activity was also significantly higher with respect to non-treated controls but was lower than the activity observed with the epimastigotes (Fig. 5c).

3.6. Mammea A/BA produce cell cycle alterations and DNA fragmentation

We used flow cytometry to analyze epimastigotes cell cycle treated with mammea A/BA after 12 h. The different cell phases were estimated by measuring the amount of DNA per cell stained with propidium iodide (Fig. 6). Our results demonstrated that mammea A/BA caused a significant increase in the sub-G₀ cell population (fragmented DNA/apoptotic cells) with 2xLC₅₀ concentration. The increase in the G₀/G₁ (typical DNA content) was observed with LC₅₀ and 2xLC₅₀. We also observed an important decrease in the S (synthesis) and G₂/M phase

(DNA duplication) in parasites treated with this compound as compared with the control group DMSO (Fig. 6a). Consistent with these findings, the treatment of epimastigotes and trypomastigotes with different concentrations of mammea A/BA showed a ladder pattern of DNA in agarose gel principally in trypomastigote forms and DNA degradation in epimastigotes (Fig. 6b). These were compared to the control cells incubated with LIT or DMEM medium or the vehicle dimethyl sulfoxide (DMSO) where the banding was not observed.

3.7. Autophagy vacuoles detection

Autophagy assay was conducted to confirm if there is an increase of acidic vacuoles in response to the mammea A/BA treatment. Flow cytometry was performed with the acidotropic dye AO, which accumulates in *T. cruzi* acidic cells compartments [20]. Flow cytometry analysis of parasites treated with mammea A/BA at LC₅₀ concentration for 12 h and Ketoconazole as positive control, showed an increase in fluorescence intensity in the red-light range after exposure (Fig. 7). This increase in the formation of acidic vacuoles was more evident in epimastigotes than trypomastigote forms (Fig. 7a, b).

4. Discussion

Given the negative economic and social impact caused by Chagas disease, the lack of vaccines, the limited efficacy of benznidazole and

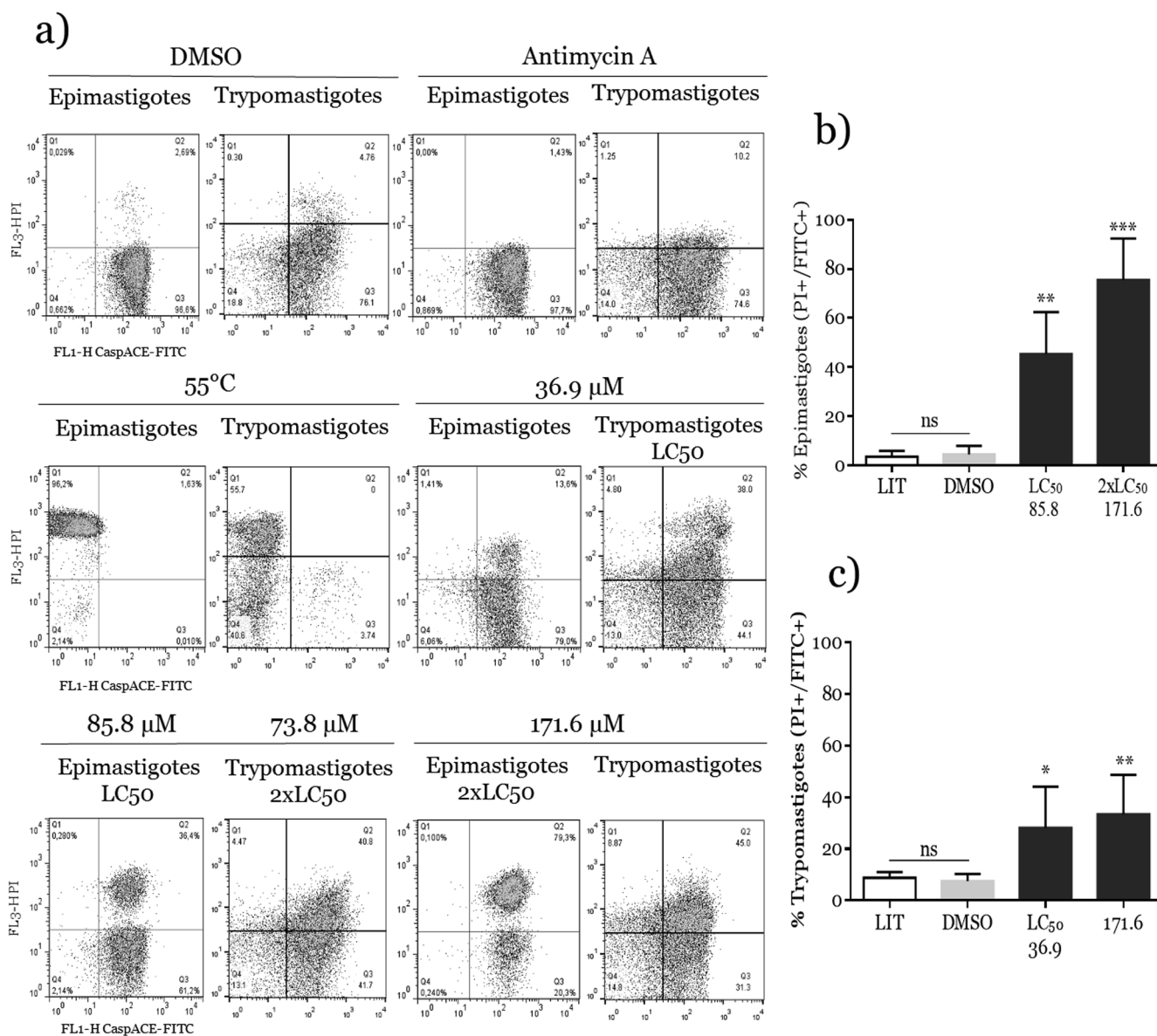


Fig. 5. Activity of caspase-like proteases in epimastigotes and trypomastigotes treated with mammea A/BA for 12 h. The activity was tested incubating the parasites with a fluorescent pan-caspase inhibitor FITC-VAD-FMK. (a) Flow cytometry dot plots of trypomastigote and epimastigote forms. Cells in the upper left quadrant were positive for propidium iodide (PI+, necrotic cells). Cells in the lower right quadrant were positive for caspase-like (FITC+, apoptosis). Events in the upper right quadrant were double-positive for both markers (FITC+/PI+, late apoptosis with caspase-like activity), whereas the lower left quadrant corresponds to negative cells for both dyes (FITC-/PI-, live). (b, c) Graphs shows the activity expressed as mean \pm SD from three independent experiments. * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$ *** $p \leq 0.001$, significant difference compared with DMSO, as a negative control. Antimycin A (250 μ M) was used as a positive control.

nifurtimox in the treatment of the disease chronic phase and the existence of naturally resistant *T. cruzi* strains, the search for new drugs has become increasingly necessary. That is why it has surged a worldwide emphasis on the use of medicinal plants in order to develop new effective therapeutic molecules [3].

Previous work carried out by our group showed that mammea A/BA isolated from the tropical tree *C. brasiliense* reduces motility, replication, and have high selectivity against the parasite, reducing trypomastigotes infectivity on mammal Vero cells and producing ultrastructural and morphophysiological alterations that are associated with programmed cell death. We have proposed mammea A/BA as a new drug candidate against CD [7,8]; however, the mechanisms of action on *T. cruzi* remain unknown.

In this work, we first confirmed by flow cytometry that mammea A/BA reduces the viability of both stages epimastigotes and trypomastigotes, especially the later where LC₅₀ was lower. Initially, the coumarin

affects esterase metabolism and then the plasma membrane integrity. Mammea A/BA also induced phosphatidyl-serine exposure principally in trypomastigote forms and membrane alterations in epimastigotes, indicating the induction of a late stage of apoptosis and necrosis. Previous reports have evaluated the parasite ultrastructure damage treated with this compound and other natural products, showing cell shrinkage, swelling and overall rounding [5,8,21], which are now confirmed in this study where epimastigotes were most susceptible to the coumarin, achieving late apoptosis state more rapidly than trypomastigotes which maintain an early apoptosis state. This may be due to the physiological differences between stages, and their resistance to cellular stress and drugs as has been reported previously [22,23].

In trypanosomatids, the apoptotic process has been associated with signaling cascades that involve the mitochondria (intrinsic pathway) [14,18,24]. To investigate other phenomena that complete the pathway of the cell death mechanisms induced by this compound, we analyzed

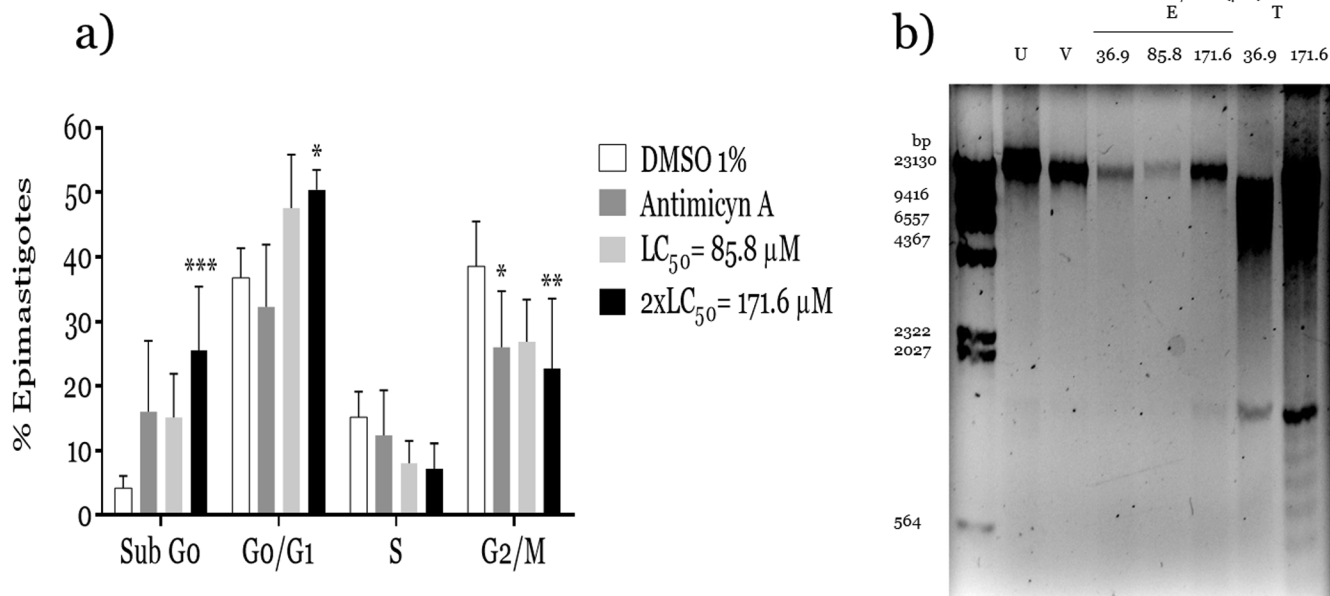


Fig. 6. Cell cycle analysis and DNA fragmentation in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* treated with mammea A/BA for 12 h. (a) Data are expressed as mean \pm SD of the PI fluorescent cells percentage from three independent experiments. Asterisks indicate significant differences in relation to control DMSO (* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001). (b) Genomic DNA ladder in agarose gel electrophoresis. Epimastigotes (E) and trypomastigotes (T) DNA was extracted after each treatment, precipitated and loaded on 2% agarose gels. bp: base pairs, U: Untreated parasites, V: vehicle DMSO 1%.

the ROS production and the change of mitochondrial potential. We observed an increase in ROS production. This phenomenon was higher in epimastigotes than trypomastigotes, probable to the well-known condition of that trypomastigotes have higher trypanothione levels in the thiol redox system, which promotes a better antioxidant defense [25–27]. Previous reports have shown that ROS are molecules that induce protein and lipid oxidation interfering with the mitochondrial integrity and function [24]. For that reason, we evaluated the Rh123 fluorescence intensity after mammea A/BA treatment. We found a concentration-dependent decrease of the mitochondrial membrane potential in both forms of the parasite. This could increase proton permeability across the inner mitochondrial membrane, decreasing ATP production, and favoured the release of cytochrome *c* from mitochondria into cytosol and activating caspase-like proteases in the parasite

which has been shown in previous reports where coumarins were used [5,24,28–30].

In this context, there is evidence that caspase-like proteases (metacaspases) play important roles in the apoptotic pathway of unicellular kinetoplastid parasites after induction of different stimuli [18,24,29,30]. The possibility of the presence of caspase-like proteases activity in *T. cruzi* treated with Mammea A/BA was analyzed. We found that FITC-VAD-FMK inhibitor showed more fluorescence in parasites treated with Mammea A/BA as compared to control, where fluorescence was much weaker. It is important to mention that has been demonstrated that this inhibitor bound to cathepsin B-like cysteine proteinase *c* (CPC) and appeared to make parasites survive better in presence of oxidative stress and without DNA fragmentation, providing strong evidence that at least part of the execution of apoptosis in

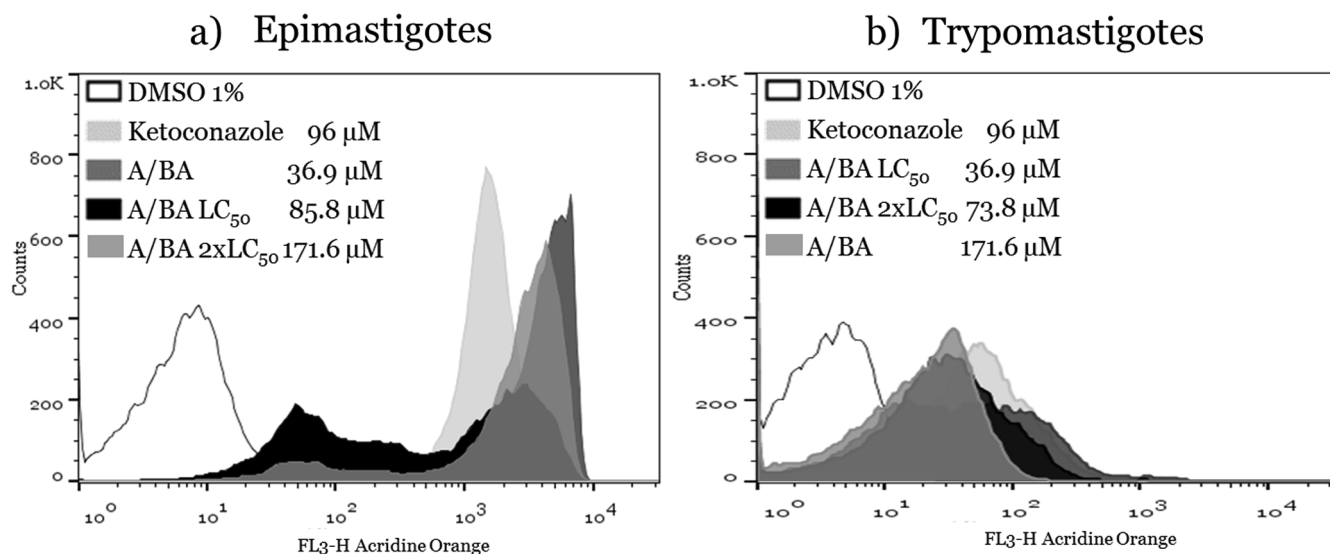


Fig. 7. Acidic vacuoles in *Trypanosoma cruzi* treated with mammea A/BA. Epimastigotes and trypomastigotes were treated with different concentrations of mammea A/BA for 12 h and stained with AO, the gradual increase in red wavelength fluorescence (FL3-H) is represents as histograms. The white curve corresponds to the control DMSO%. Ketoconazole was used as a positive control. Histograms are representative of at least three independent experiments.

trypanosomatids may function via the involvement proteolytic enzymes like CPC and other metacaspases [17]. We though Mamea A/BA could start downstream events of multiple caspase-like proteases and proteolytic enzymes activation and DNA breakdown or degradation by endonucleases activity, which could suggest apoptotic and necrotic cells. The DNA fragmentation may be under the control of multiple proteases and endonuclease G-like [30]. We also obtained an increase in the parasite population in the sub-G0 /G1 (fragments of DNA) phase, an important cell cycle arrest in G1 as well as the phase S reduction in epimastigotes, which are more compatible with a process apoptotic-like [31].

It has been proposed that mamea type coumarins induce high cytoplasmic vacuolization [5,8] and caspase-dependent apoptosis as well as cytoprotective autophagy on eukaryotic cells [32]. We analyzed this parameter in AO stained cells after mamea A/BA incubation, to identify the production of acidic vesicular organelles (AVOs) due to an autophagy phenomenon. The evaluation showed that mamea A/BA produce an important increase of acidic compartments indicated by the rise red fluorescence intensity with the LC₅₀ treated parasites [20].

We believe that the action mechanism of mamea A/BA on *T. cruzi* start inducing important oxidative stress affecting several cellular constituents, such as proteins, lipids and nucleic acids which could induce acid vacuoles formation for recycling of this damage molecules. Previous reports have shown that coumarins induce autophagy as a cytoprotective mechanism to resist and survive an undesirable growth environment [32]. After that, the compound induces mitochondrial membrane damage producing an important decrease in mitochondrial potential that leads to a decrease in ATP production and a reduction in the translation and transcription of mitochondrial genes, which ultimately results in cell arrest and cell death by apoptosis and finally necrosis.

5. Conclusion

The present study found that the trypanocidal effect of mamea A/BA appears to be a consequence of the induction of apoptosis-like cell death that is caused by an increase in ROS levels inside cells. This increase is likely responsible for the collapse of mitochondrial membrane potential, depletion of ATP levels and important cytoplasmic changes. One of them, the formation of acidic vacuoles that could degrade oxidant cytoplasmic material, following caspase-like activation. These apoptosis-like changes support our previous reports, where cell shrinkage was observed and now can be related to phosphatidylserine externalization, induction of DNA fragmentation and changes in the cellular cycle. Knowing the possible cell death pathway may facilitate the design of better chemotherapeutic compounds against Chagas disease.

Acknowledgement

Karla Daniela Rodríguez-Hernández is grateful with the PhD program in Ciencias Biomédicas of Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and CONACyT for providing the scholarship number 663037. We also would like thank LABNALCIT, IIB-UNAM and M. Sc. Carlos Castellanos Barba for assistance in Flow Cytometry.

Funding sources

This research was supported by grant IG200418 from PAPPIT-DGAPA, UNAM; and the Institutional Program NUATEI of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Declaration of Competing Interest

We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103894>.

References

- [1] WHO|Chagas disease (American trypanosomiasis), WHO, 2019. (accessed 22 April 2019).
- [2] K.C.F. Lidani, F.A. Andrade, L. Bavia, F.S. Damasceno, M.H. Beltrame, I.J. Messias-Reason, T.L. Sandri, Chagas disease: from discovery to a worldwide health problem, *Front. Public Heal.* 7 (2019), <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>.
- [3] P.M. Cheuka, G. Mayoka, P. Mutai, K. Chibale, The role of natural products in drug discovery and development against neglected tropical diseases, *Molecules* 22 (2017), <https://doi.org/10.3390/molecules22010058>.
- [4] M.A. Brenzan, C.V. Nakamura, M.C.M. Young, Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*, *Parasitol. Res.* (2007) 715–722, <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0542-7>.
- [5] M.A. Brenzan, A.O. Santos, C.V. Nakamura, B.P.D. Filho, T. Ueda-Nakamura, M.C.M. Young, A.G. Côrrea, J.A. Júnior, J.A. Morgado-Díaz, D.A.G. Cortez, Effects of (–) mamea A/BB isolated from *Calophyllum brasiliense* leaves and derivatives on mitochondrial membrane of *Leishmania amazonensis*, *Phytomedicine* 19 (2012) 223–230, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.10.008>.
- [6] P.A. Honda, I.C.P. Ferreira, D.A.G. Cortez, C.A.B. Amado, T.G.V. Silveira, M.A. Brenzan, M.V.C. Lonardoni, Efficacy of components from leaves of *Calophyllum brasiliense* against *Leishmania amazonensis*, *Phytomedicine* 17 (2010) 333–338, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.08.011>.
- [7] R. Reyes-Chilpa, E. Estrada-Muñiz, E. Vega-Avila, F. Abe, J. Kinjo, S. Hernández-Ortega, Trypanocidal constituents in plants: 7. Mamea-type coumarins, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103 (2008) 431–436, <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000500004>.
- [8] K.D. Rodríguez-Hernández, I. Martínez, L.T. Agredano-Moreno, L.F. Jiménez-García, R. Reyes-Chilpa, B. Espinoza, Coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense* produce ultrastructural alterations and affect *in vitro* infectivity of *Trypanosoma cruzi*, *Phytomedicine* 152827 (2019), <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2019.152827>.
- [9] J.C. Gomez-Verjan, E. Estrella-Parra, E.R. Vazquez-Martinez, I. Gonzalez-Sanchez, G. Guerrero-Magos, D. Mendoza-Villanueva, L. Isus, A. Alfaro, M. Cerebón-Cervantes, P. Aloy, R. Reyes-Chilpa, Risk assessment of Soulatrolide and Mamea (A/BA + A/BB) coumarins from *Calophyllum brasiliense* by a toxicogenomic and toxicological approach, *Food Chem. Toxicol.* 91 (2016) 117–129, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.03.010>.
- [10] B. Espinoza, T. Rico, S. Sosa, E. Oaxaca, A. Vizcaino-Castillo, M.L. Caballero, I. Martínez, Mexican *Trypanosoma cruzi* I strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model, *J. Biomed. Biotechnol.* 2010 (2010) 890672, <https://doi.org/10.1155/2010/890672>.
- [11] D. Pérez-Morales, K.D.R. Hernández, I. Martínez, L.T. Agredano-Moreno, L.F. Jiménez-García, B. Espinoza, Ultrastructural and physiological changes induced by different stress conditions on the human parasite *Trypanosoma cruzi*, *Cell Stress Chaperones* 22 (2017) 15–27, <https://doi.org/10.1007/s12192-016-0736-y>.
- [12] O. Sepúlveda-Robles, B. Espinoza-Gutiérrez, J.C. Gomez-Verjan, S.L. Guzmán-Gutiérrez, M. De Ita, M. Silva-Miranda, C.I. Espitia-Pinzón, F. Fernández-Ramírez, A. Herrera-Salazar, M. Mata-Rocha, A. Ortega-Hernández, R. Reyes-Chilpa, Trypanocidal and toxicological assessment *in vitro* and *in silico* of three sesquiterpene lactones from Asteraceae plant species, *Food Chem. Toxicol.* 125 (2019) 55–61, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.12.023>.
- [13] D. Lazarin-Bidóia, V.C. Desoti, T. Ueda-Nakamura, B.P. Dias Filho, C.V. Nakamura, S.O. Silva, Further evidence of the trypanocidal action of eupatenoid-5: confirmation of involvement of reactive oxygen species and mitochondria owing to a reduction in trypanothione reductase activity, *Free Radic. Biol. Med.* 60 (2013) 17–28, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.008>.
- [14] D. Lazarin-Bidóia, V.C. Desoti, S.C. Martins, F.M. Ribeiro, Z. Ud Din, E. Rodrigues-Filho, T. Ueda-Nakamura, C.V. Nakamura, S. de Oliveira Silva, Dibenzylideneacetones are potent trypanocidal compounds that affect the *Trypanosoma cruzi* redox system, *Antimicrob. Agents Chemother.* 60 (2016) 890–903, <https://doi.org/10.1128/AAC.01360-15>.
- [15] V.P. Sülsen, V. Puente, D. Papademetrio, A. Batlle, V.S. Martino, F.M. Frank, M.E. Lombardo, Mode of action of the sesquiterpene lactones Psilostachyin and Psilostachyin C on *Trypanosoma cruzi*, *PLoS One* 11 (2016) e0150526, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150526>.
- [16] C. Ferreira, D.C. Soares, C.B. Barreto-Junior, M.T. Nascimento, L. Freire-de-Lima, J.C. Delorenzi, M.E.F. Lima, G.C. Atella, E. Folly, T.M.U. Carvalho, E.M. Saraiva, L.H. Pinto-da-Silva, Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*, *Phytochemistry* 72 (2011) 2155–2164, <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2011.08.006>.
- [17] A.K. El-Fadili, H. Zangger, C. Desponds, I.J. Gonzalez, H. Zalila, C. Schaff, A. Ives, S. Masina, J.C. Mottram, N. Fasel, Cathepsin B-like and cell death in the unicellular human pathogen *Leishmania*, *Cell Death Dis.* 1 (2010), <https://doi.org/10.1038/cddis.2010.51>.
- [18] F.P. Garcia, J. Henrique da Silva Rodrigues, Z.U. Din, E. Rodrigues-Filho, T. Ueda-Nakamura, R. Auzély-Velty, C.V. Nakamura, A3K2A3-induced apoptotic cell death of *Leishmania amazonensis* occurs through caspase- and ATP-dependent

- mitochondrial dysfunction, *Apoptosis* 22 (2017) 57–71, <https://doi.org/10.1007/s10495-016-1308-4>.
- [19] J.M. Sandes, A. Fontes, C.G. Regis-da-Silva, M.C.A.B. de Castro, C.G. Lima-Junior, F.P.L. Silva, M.L.A.A. Vasconcellos, R.C.B.Q. Figueiredo, *Trypanosoma cruzi* cell death induced by the Morita-Baylis-Hillman Adduct 3-Hydroxy-2-Methylene-3-(4-Nitrophenylpropanenitrile), *PLoS One* 9 (2014) e93936, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093936>.
- [20] R.L. Kessler, M.J. Soares, C.M. Probst, M.A. Krieger, *Trypanosoma cruzi* response to sterol biosynthesis inhibitors: morphophysiological alterations leading to cell death, *PLoS One* 8 (2013) e55497, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055497>.
- [21] T.R. Morais, T.A. Costa-Silva, D.D. Ferreira, B.J. Novais, A.C.T. Torrecilhas, A.G. Tempone, J.H.G. Lago, Antitrypanosomal activity and effect in plasma membrane permeability of (–)-bornyl p-coumarate isolated from *Piper cernuum* (Piperaceae), *Bioorg. Chem.* 89 (2019), <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103001>.
- [22] M.C. Paes, D. Cosentino-Gomes, C.F. de Souza, N.P. de A. Nogueira, J.R. Meyer-Fernandes, The Role of heme and reactive oxygen species in proliferation and survival of *Trypanosoma cruzi*, *J. Parasitol. Res.* 2011 (2011) 174614, <https://doi.org/10.1155/2011/174614>.
- [23] I. Martínez, B. Noguera, F. Martínez-Hernández, B. Espinoza, Microsatellite and mini-exon analysis of Mexican human DTU I *Trypanosoma cruzi* strains and their susceptibility to nifurtimox and benznidazole, *Vector Borne Zoonotic Dis.* 13 (2013) 181–187, <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1072>.
- [24] R.F.S. Menna-Barreto, S.L. de Castro, Between armour and weapons — Cell death mechanisms in trypanosomatid parasites, *Cell Death – Autophagy Apoptosis Necrosis* (2015), <https://doi.org/10.5772/61196>.
- [25] R.L.S. Gonçalves, R.F.S. Menna Barreto, C.R. Polycarpo, F.R. Gadelha, S.L. Castro, M.F. Oliveira, A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*, *J. Bioenerg. Biomembr.* 43 (2011) 651–661, <https://doi.org/10.1007/s10863-011-9398-8>.
- [26] L. Piacenza, G. Peluffo, M.N. Alvarez, A. Martínez, R. Radi, *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas Disease, *Antioxid. Redox Signal.* 19 (2013) 723–734, <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4618>.
- [27] A. Machado-Silva, P.G. Cerqueira, V. Grazielle-Silva, F.R. Gadelha, E. de F. Peloso, S.M.R. Teixeira, C.R. Machado, How *Trypanosoma cruzi* deals with oxidative stress: antioxidant defence and DNA repair pathways, *Mutat. Res. – Rev. Mutat. Res.* 767 (2016) 8–22, <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.12.003>.
- [28] A. Rea, A.G. Tempone, E.G. Pinto, J.T. Mesquita, E. Rodrigues, L.G.M. Silva, P. Sartorelli, J.H.G. Lago, Soulamarin Isolated from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) induces plasma membrane permeabilization of *Trypanosoma cruzi* and mitochondrial dysfunction, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (2013) e2556, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002556>.
- [29] B. Meslin, H. Zalila, N. Fasel, S. Picot, A.-L. Bienvenu, Are protozoan metacaspases potential parasite killers? *Parasit. Vectors* 4 (2011) 26, <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-26>.
- [30] R.F.S. Menna-Barreto, Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over) kill, *Cell Death Dis.* 10 (2019) 93, <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1370-2>.
- [31] J.-Y. Chuang, Y.-F. Huang, H.-F. Lu, H.-C. Ho, J.-S. Yang, T.-M. Li, N.-W. Chang, J.-G. Chung, Coumarin induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervical cancer HeLa cells through a mitochondria- and caspase-3 dependent mechanism and NF-kappaB down-regulation, *Vivo* 21 (2007) 1003–1009 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18210747>.
- [32] Q. Wang, Y. Guo, S. Jiang, M. Dong, K. Kuerban, J. Li, M. Feng, Y. Chen, L. Ye, A hybrid of coumarin and phenylsulfonylfuroxan induces caspase-dependent apoptosis and cytoprotective autophagy in lung adenocarcinoma cells, *Phytomedicine* 39 (2018) 160–167, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.12.029>.