



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efectos de cumarinas tipo mammea aisladas del
árbol *Calophyllum brasiliense* sobre cepas
mexicanas de *Trypanosoma cruzi***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

PRESENTA:

KARLA DANIELA RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

TUTOR:

Dr. Ricardo Reyes Chilpa



México, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIA

A mi mamá, por brindarme todo su cariño, confianza, apoyo incondicional y convertirse en la mayor inspiración, para concluir uno de los anhelos más grandes de mi vida; mi carrera profesional; que representa la herencia más grande que pudiera recibir y por la cual le agradeceré eternamente.

A mi hermana, por vigilar siempre mi desarrollo, aconsejarme, ser mi ejemplo y enseñarme desde pequeña que la disciplina y responsabilidad son necesarias para salir adelante y cumplir nuestros objetivos.

Ustedes son mi motivo para salir adelante

Las quiero mucho

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser mi “*alma mater*” y cobijarme en sus aulas llenando mi vida de conocimientos, satisfacciones y grandes aventuras; es un orgullo pertenecer a la UNAM y a la Facultad de Ciencias.

A mis asesores por todas sus enseñanzas durante mi trabajo en sus laboratorios, por compartir su conocimiento, experiencia y brindarme su confianza en todo momento para comenzar a recorrer el maravilloso camino de la investigación, GRACIAS:

Al Dr. Ricardo Reyes Chilpa por aceptarme en su laboratorio sin conocerme, permitir que descubriera lo mucho que me apasiona la Fitoquímica, presentarme a *Calophyllum brasiliense* y brindarme su asesoría, confianza, amistad, alegría y enorme apoyo para iniciar y concluir esta tesis.

Y a la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez por asesorarme y darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, brindarme su paciencia, apoyo, confianza y por permitir que conociera a *Trypanosoma cruzi*, que desde segundo semestre de licenciatura me apasionó enormemente.

Agradezco también al M. en C. Ignacio Martínez por su invaluable asesoría y apoyo técnico durante el manejo de cultivos celulares utilizados en las pruebas de actividad biológica.

A la Dra. Lourdes Teresa Agredano Moreno y al Dr. Luis Felipe Jiménez García del Departamento de Biología Celular de La Facultad de Ciencias, por su labor en la preparación de muestras y adquisición de fotografías de Microscopía Electrónica de Transmisión.

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

A la Dra. Deyanira Pérez Morales y al Dr. Ignacio González Sánchez por compartir su conocimiento y ayudarme con su experiencia en los imprevistos metodológicos durante la realización y conclusión de esta tesis.

Al M. en C. Jorge Iván Castillo Arellano, calophylologo de corazón quien me proporciono fotografías de *C. brasiliense*.

A mí jurado asignado por sus valiosas sugerencias y comentarios que ayudaron a mejorar este trabajo.

A mis amigos, sin un orden en particular: Mitzi García, Iván Reséndiz, Luis David Ginez, Xochilt González, Alberto Ramos, Esteban Santacruz, Sebastián Vadillo, Carmen Tagle, Ana Reyes, Marissa Neri y Araceli López, por compartir sus conocimientos, aconsejarme, convertirse en mis ejemplos de disciplina y responsabilidad, motivarme a creer en mí y brindarme su enorme alegría y amistad.

A todos mis compañeros de laboratorio, por todos esos días de desestrés, por compartir sus anécdotas, alegría, amistad, experiencia y por todo su apoyo académico, comentarios y consejos al realizar y mejorar esta tesis GRACIAS:

Compañeros del laboratorio 2-5 del Instituto de Química: Juan Carlos, Rocio, Edgar, Yoselina, Nacho, Itzel, Laura, Sandra, Ximena, Griselda, Iliana y Aura.

Y compañeros del laboratorio de Inmunología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas: Genesis, Mariana, Ale, Paulina, Esteban, Luis, Lucio y Ana.

A mis profesores de la Facultad de Ciencias, quienes con su admirable labor docente me mostraron lo apasionante que es la Biología; favoreciendo mi desarrollo como estudiante y despertando mi entusiasmo a buscar el conocimiento, Gracias: Dr. Alejandro Marché Cova, Biól. Margarita Reyes Santos, Dr. Sol Cristians Nisawa, Dra. María Sol Robledo y Monterrubio, Lic. Norma Yanet Sánchez Torres, M. en C. Itzel Ramírez López, Dra. María Lourdes Barbosa Saldaña, Dra. Rosalba Esquivel Cote y Dr. Lev Orlando Jardón.

Finalmente, agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA-UNAM), Proyecto IG200513 “Compuestos antivirales (VIH-1) de árboles tropicales (*Clusiaceae*) de México: Estudio químico y toxicogenómico”, por la beca recibida.

Al proyecto IN206512 DGAPA-UNAM y a la fundación Miguel Alemán por el apoyo brindado al laboratorio de la Dra. Bertha Espinoza.

Al programa de cátedras CONACYT para jóvenes investigadores, proyecto 1076 y al programa “Nuevas alternativas terapéuticas para enfermedades infecciosas” (NUAETI) del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

ÍNDICE

I. RESUMEN	7
II. INTRODUCCIÓN	8
II.1. La Enfermedad de Chagas	8
II.1.2. Enfermedad de Chagas en México	9
II.1.3. Transmisión	10
II.1.4. Fases de la enfermedad	10
II.2. Agente Causal: <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
II.2.1. Taxonomía	12
II.2.2. Morfología	12
II.2.3. Genética	14
II.2.4. Cepas mexicanas de <i>T. cruzi</i>	14
II.2.5. Ciclo de vida	15
II.3. Tratamiento de la Enfermedad de Chagas	16
II.3.1. Mecanismo de acción de nifurtimox y benznidazol	16
II.4. Antecedentes de <i>Calophyllum brasiliense</i>	18
II.4.1. El genero <i>Calophyllum</i> (Calophyllaceae)	18
II.4.2. <i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess	18
II.4.3. Fitoquímica	19
II.4.4. Cumarinas tipo mammea	20
II.4.5. Actividad biológica contra tripanosomátidos	21
III. JUSTIFICACIÓN	23
IV. HIPOTESIS	24
V. OBJETIVOS	24
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	25
VI.1. Estudio fitoquímico: Cromatografía e identificación de compuestos	25
VI.2. Cultivo de epimastigotes y tripomastigotes de <i>T. cruzi</i>	26
VI.3. Ensayos de actividad biológica	26
VI.4. Técnicas microscópicas	29
VI.5. Análisis estadístico	30

VII. RESULTADOS	31
VII.1. Estudio Fitoquímico	31
VII.2. Ensayos de actividad biológica	35
7.2.1. Efecto de cumarinas sobre epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	35
7.2.2. Efecto de cumarinas sobre tripomastigotes de <i>T. cruzi</i>	39
7.2.3. Recuperación del crecimiento de parásitos tratados con cumarinas.....	42
7.2.4. Efecto de cumarinas sobre la morfología de los parásitos.....	45
7.2.5. Ultraestructura de epimastigotes tratados con cumarinas.....	54
VIII. DISCUSIÓN	61
IX. CONCLUSIONES	68
X. PERSPECTIVAS	69
XI. BIBLIOGRAFIA	70

I. RESUMEN

La enfermedad de Chagas, causada por el parásito protozooario *Trypanosoma cruzi*, afecta a aproximadamente 7-8 millones de personas, principalmente de América Latina. En México se ha reportado una prevalencia de 69,000 casos de infección anuales y debido a la migración y vías de transmisión no-vectorial esta enfermedad se está presentando en áreas del mundo donde no era endémica, por lo que representa un importante problema de salud pública. Actualmente no existe ninguna vacuna preventiva y el tratamiento de esta infección se limita a benznidazol y nifurtimox, los cuales presentan múltiples efectos adversos y eficacia variable contra diferentes cepas del parásito, por tal razón, existe gran interés en la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas. Los productos naturales han mostrado ser una fuente prometedora de compuestos con mayor actividad tripanocida y menor toxicidad para el huésped. En el presente trabajo se evaluó el efecto *in vitro* de una mezcla constituida por tres cumarinas tipo mammea A/BA+A/BB+A/BD (6:3:1), aislada de las hojas del árbol *Calophyllum brasiliense* sobre epimastigotes y tripomastigotes de tres cepas mexicanas de *T. cruzi*. Nuestros resultados sugieren que las cumarinas afectan la movilidad, crecimiento, morfología y ultraestructura de los parásitos a concentraciones entre 5-14.3 µg/mL, por lo que podrían ser una opción terapéutica prometedora ya que tienen mayor actividad que el benznidazol utilizado a una concentración de 100 µg/mL y presentan baja toxicidad en mamíferos.

II. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las enfermedades parasitarias o parasitosis están ampliamente distribuidas en todo el mundo y constituyen uno de los grandes problemas de salud pública de los países en desarrollo. A este grupo de padecimientos pertenecen las enfermedades tropicales desatendidas NTD's (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 es considerado prioridad (Hotez, 2011; WHO, 2014).

Una de estas enfermedades es la Enfermedad de Chagas, una zoonosis endémica de América Latina, presente en nuestro país y otros lugares del mundo como Europa y Estados Unidos de América (EE.UU.) (Gascón *et al.*, 2010). Debido a que existe una falta de productos farmacéuticos eficaces, seguros y asequibles para su control y a que presenta altas tasas de mortalidad y morbilidad, resulta importante la investigación de este padecimiento (Trouiller *et al.*, 2002).

II.1. La Enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, es una zoonosis potencialmente mortal causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*. Esta patología debe su nombre a Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, médico brasileño que descubrió y describió la enfermedad en 1909.

A nivel mundial, se calculan 7-8 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, ya que en estas regiones se distribuyen los vectores y reservorios silvestres (Figura 1) (WHO, 2014).

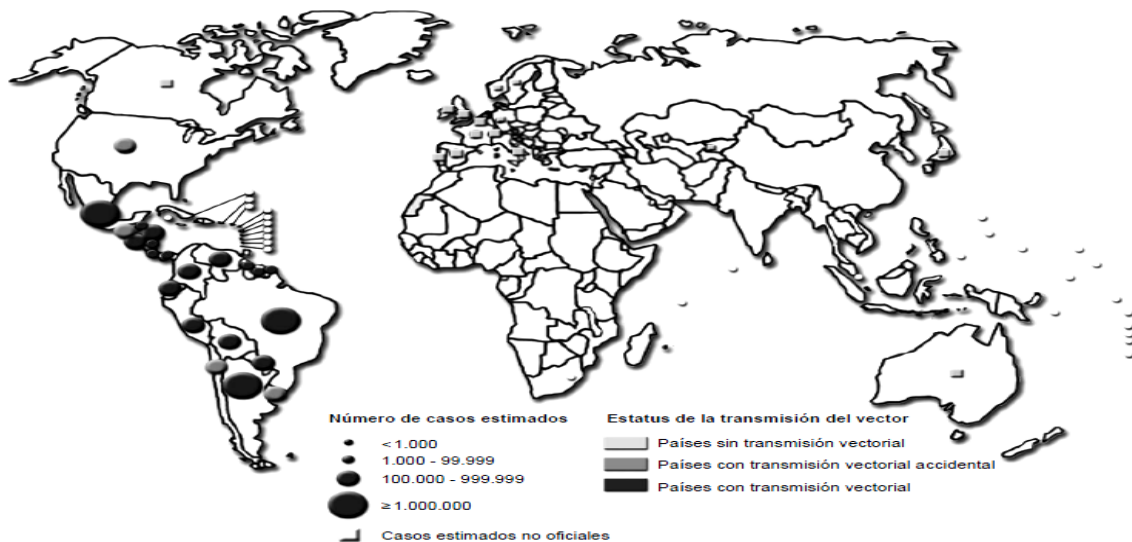


Figura 1. Distribución mundial de los casos de enfermedad de Chagas y el estatus de la transmisión vectorial (Tomado de WHO. First WHO Report on Neglected Tropical Diseases 2010).

Aunque esta enfermedad se restringe a 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 (Figura 1) (WHO, 2014).

II.1.2. Enfermedad de Chagas en México

En México no existen programas formales para el control y tratamiento de la enfermedad de Chagas, ya que no hay control de vectores, consensos sobre los métodos de diagnóstico de la fase crónica o aguda de la enfermedad y la terapia tripanocida esta poco disponible para los pacientes crónicos. Por tanto, el número de personas infectadas por diferentes vías de transmisión (vectorial, congénita, transfusional y oral) en los diferentes estados de la República es desconocido.

En México, más del 96% de la transmisión de esta enfermedad se cree que se produce por vía vectorial (Ramsey *et al.*, 2003a), ya que México alberga cerca de 39 especies de triatóminos, 9 de las cuales se han reportado infectadas por *T. cruzi*, indicándolas como posibles vectores de la enfermedad de Chagas (Cruz-Reyes y Pickering-López, 2006).

En 2013 Carabarin-Lima y colaboradores, realizaron una estimación del número de infecciones en México, basándose en la seroprevalencia de anticuerpos contra *T. cruzi* y la distribución espacial de los casos clínicos de enfermedad de Chagas, publicada por Cruz-Reyes y Pickering-López en 2006, indicando una seroprevalencia de *T. cruzi* del 1.6%, correspondiente de 1-2 millones de personas infectadas en México (Ramsey, 2007; Carabarin-Lima *et al.*, 2013), aproximadamente 70,000 nuevos casos de infección anuales (Guzmán-Bracho *et al.*, 1998; Guzmán-Bracho *et al.*, 2001) y una mortalidad de 5-6 % (25,000 casos) de la carga total en México (Ramsey, 2007; Ramsey *et al.*, 2003b).

De acuerdo con la estimación antes citada, Jalisco, Oaxaca y Chiapas tienen el mayor número de casos de infección, seguidos de Veracruz, Guerrero, Querétaro, Ciudad de México, Puebla, Morelos, Hidalgo, Sinaloa y Nayarit (Figura 2), lo cual está relacionado con la ubicación geográfica de estos estados y su amplia diversidad de climas que favorecen la distribución de los organismos vectores de *T. cruzi* (Carabarin-Lima *et al.*, 2013).

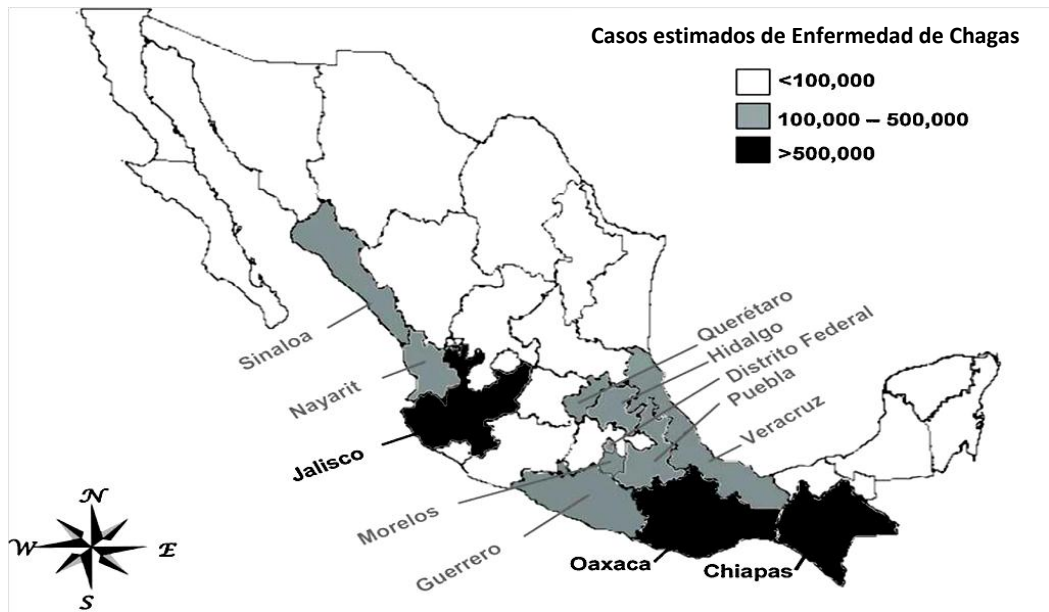


Figura 2. Número de individuos infectados con *Trypanosoma cruzi* en México de acuerdo a la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* publicada por Cruz-Reyes y Pickering-López en 2006 (Tomado de Carabarin-Lima *et al.*, 2013).

II.1.3. Transmisión

El parásito *T. cruzi* puede transmitirse al ser humano y a numerosas especies de animales mamíferos domésticos (perros, gatos, cobayos, ratas y ratones, entre otros) y silvestres (armadillos, murciélagos, marsupiales, entre otros) principalmente por las heces infectadas de insectos hematófagos del género *Triatoma* (Pérez-Morales, 2013), conocidos como chinches, chinches ociconas y otros nombres, según la zona geográfica (Guzmán-Marín *et al.*, 1999).

Otras formas de transmisión del parásitos son: La ingesta de alimentos contaminados con heces de triatóminos infectados; transfusiones de sangre infectada; transmisión de la madre infectada a su hijo durante el embarazo, parto o lactancia, trasplante de órganos provenientes de una persona infectada o por accidentes de laboratorio (WHO, 2014).

II.1.4. Fases de la enfermedad

La enfermedad de Chagas tiene dos fases diferenciadas: aguda y crónica.

Fase aguda: Suele ser subclínica (no hay síntomas aparentes). Se caracteriza por alta parasitemia e invasión tisular, tiene una duración de 6-12 semanas. Cuando los síntomas ocurren, son los siguientes: inflamación en el lugar de la inoculación (chagoma), edema palpebral unilateral (Signo de Romaña), en el caso particular de la transmisión vectorial, otros síntomas incluyen fiebre, dolor de cabeza, dolor articular y muscular, anorexia, vómitos, diarrea, somnolencia,

apatía, linfadenopatía (hinchazón de los ganglios linfáticos), hepatoesplenomegalia (agrandamiento del hígado y bazo) y convulsiones. Esta fase suele desaparecer espontáneamente en 2-4 meses, sin embargo, algunos casos agudos (2-6%) pueden conducir a la muerte, que se debe principalmente a la miocarditis y meningoencefalitis (inflamación del cerebro) (Rassi *et al.*, 2010).

Fase crónica: En esta fase se observan dos formas principales de la enfermedad, una forma indeterminada o asintomática y una forma sintomática. Un alto porcentaje de individuos permanece en la forma indeterminada de 10 a 30 años, o incluso de por vida. Estos individuos suelen permanecer asintomáticos, sin signos clínicos o físicos de la enfermedad, pero con anticuerpos circulantes contra *T. cruzi*. Entre el 30-40% de los individuos infectados, años después desarrolla síntomas clínicos (Carabarin-Lima *et al.*, 2013; Rassi *et al.*, 2010).

A su vez, la forma sintomática a su vez puede manifestarse de dos maneras: a) cardíaca crónica y b) digestiva crónica: Los signos de la infección crónica por lo general pueden ocurrir 25 a 30 años después de la adquisición de la infección aguda. Entre los pacientes con manifestaciones clínicas, la miocardiopatía chagásica crónica (CCC) es la manifestación clínica más frecuente y grave. Los primeros signos de la CCC son por lo general las anomalías del sistema de conducción (bloqueo de rama derecha o bloqueo fascicular anterior izquierdo), taquicardias y bradicardias, tromboembolismo y miocardiopatía. Aproximadamente un tercio de estos pacientes mueren repentinamente debido a la destrucción del músculo cardíaco (Carabarin-Lima *et al.*, 2013).

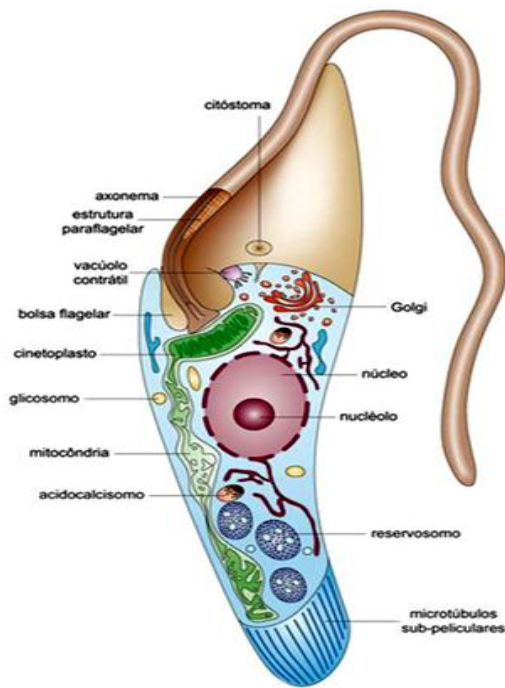
Los pacientes chagásicos que no presentan un trastorno del corazón pueden desarrollar la fase digestiva crónica, presentando alteraciones en el sistema nervioso central y lesiones del sistema nervioso entérico, tales como megacolon, megaesófago, megaestómago, megaduodeno, megayeyuno y trastornos motores gastrointestinales, tránsito intestinal alterado y trastornos motores de colón y vesícula biliar, provocando dificultad para comer y pérdida de peso (Figura 5) (Rassi *et al.*, 2010; Carabarin-Lima *et al.*, 2013).

II.2. Agente Causal: *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es un protozoario flagelado perteneciente al Orden Kinetoplastida, Familia Trypanosomatidae. Los organismos agrupados en este orden se caracterizan por la presencia de ADN extranuclear almacenado en un organelo exclusivo llamado cinetoplasto, localizado dentro de una única mitocondria (Figura 3). Este organelo se constituye de ADN circular que codifica ARNr y proteínas mitocondriales tales como citocromo b y ATPasa, importantes en la sobrevivencia de los tripanosomátidos, por esta razón el complejo cinetoplasto-mitocondria es un interesante blanco para la búsqueda de nuevas drogas contra estos organismos (Calcarea *et al.*, 2013; De Souza, 2002a).

II.2.1. Taxonomía

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



Dominio: Eucarya

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophorea

Orden: Kinetoplastida

Familia: Kinetoplastidae

Género: *Trypanosoma*

Especie: *cruzi*

Figura 3. Estructura interna del estadio epimastigote de *T. cruzi*. Se muestran las principales estructuras celulares como el cinetoplasto y la mitocondria.

II.2.2. Morfología

Este parásito presenta diferentes estadios morfológicos durante su ciclo de vida, tanto en el hospedero mamífero como en el invertebrado, reconociéndose cuatro formas principales: tripomastigote metacíclico, tripomastigote sanguíneo, epimastigote y amastigote (De Souza, 2009, Vargas-Parada, 2010):

1. *Tripomastigote metacíclico:* Tiene un tamaño de 20-25 μm y 2 μm de diámetro. Es alargado, tiene núcleo central y un gran cinetoplasto en la región posterior al núcleo, posee un blefaroplasto posterior de donde surge un flagelo que contornea una membrana ondulante, la cual le confiere movimiento (Figura 4). Este estadio no presenta capacidad de reproducción y es la forma que penetra e infecta al hospedero mamífero, al ser depositada en las heces de la chinche. 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 (Contreras *et al.*, 1994; De Souza, 2002b; De Souza *et al.*, 2010).
2. *Tripomastigote sanguíneo:* Es flagelado, alargado, cinetoplasto posterior al núcleo; presenta membrana ondulante y 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 (Figura 4). *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 (Navarro *et al.*, 2003; Pérez-Morales, 2013).

3. *Epimastigote*: Tiene un tamaño de 20-40 μm de largo, Es fusiforme, con un flagelo y una membrana ondulante 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 (De Souza, 2002a) (Figura 4). 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 (Perez-Morales, 2013; De Souza, 2002a; De Souza, 2009).
4. *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 (Figura 4). *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, los amastigotes se replican y se diferencian a tripomastigotes sanguíneos que infectan nuevas células (De Souza, 2002a).

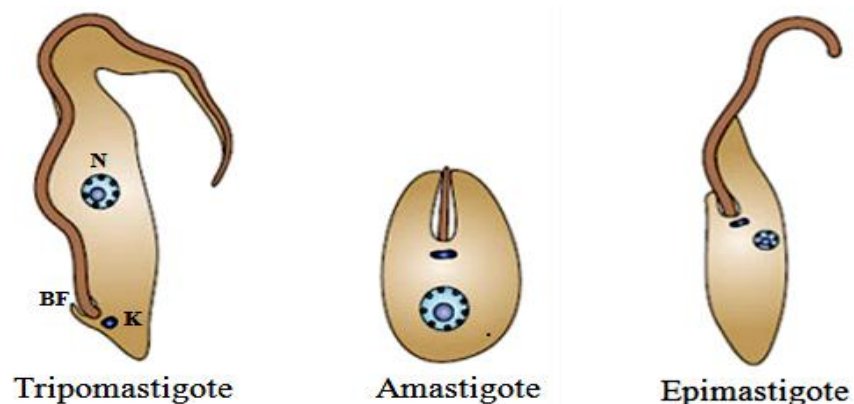


Figura 4. Morfología de los principales estadios de *Trypanosoma cruzi*. Cada estadio se diferencia en cuanto a su forma, posición del flagelo y bolsa flagelar (BF), núcleo (N) y cinetoplasto (K) (Modificado de Vargas-Parada, 2005).

II.2.3. Genética

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 DTU's (por sus siglas en inglés, *Discrete Typing Units*): TcI, TcII, TcIII, TcVI, TcV y TcVI (Zingales *et al.*, 2009).

II.2.4. Cepas mexicanas de *T. cruzi*

En México, la mayoría de las cepas de *T. cruzi* analizadas genéticamente pertenecen al grupo genético I (TcI) (López-Olmos *et al.*, 1989, Bosseno *et al.*, 2000, 2002). 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* (Risso *et al.*, 2011). 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, metaciclogénesis, infectividad en modelo *in vitro* y características bioquímicas contrastantes en cuanto a la cantidad de proteínas de superficie que interactúan con la célula hospedera, Querétaro presenta 86 proteínas y Ninoa 68 (López-Olmos *et al.*, 1998; Martínez, 2007). También 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; López-Álvarez, 2013).

Otra cepa mexicana estudiada en nuestro laboratorio ha sido Ver6, para la cual se realizó la determinación preliminar del DTU a partir de la amplificación de los genes 24s rRNA y P7-P8. La presencia de ambos amplificadores indicó que esta cepa mexicana pertenece al grupo genético DTU II o VI (Datos de laboratorio no publicados, Bosseno *et al.*, 2002), por lo que el estudio de sus características biológicas resulta interesante, puesto que existe una escasez de datos de las cepas no tipo I en México y conocerlas permitiría entender el comportamiento de cepas DTU II-VI y diferenciarlas de las cepas DTU I más frecuentes en México.

II.2.5. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. cruzi* es indirecto y heterógeno, ya que se desarrolla en organismos diferentes como el vector invertebrado y un mamífero, que es el hospedero definitivo (Rassi *et al.*, 2010).

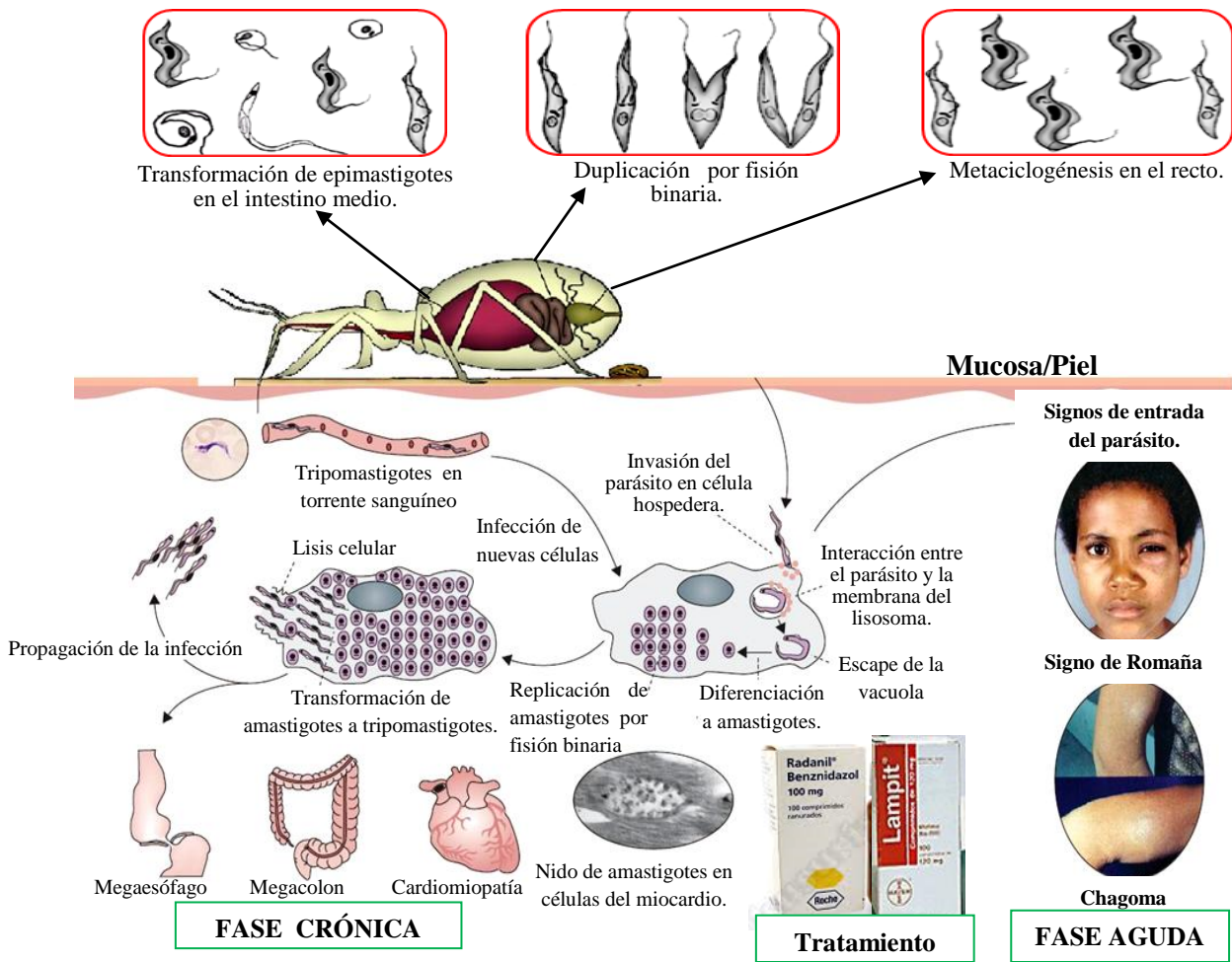


Figura 5. Representación esquemática del mecanismo de transmisión vectorial de *T. cruzi*, manifestaciones clínicas y tratamiento de la enfermedad de Chagas (Modificado de Rassi *et al.*, 2010 y Diaz-Garrido, 2013).

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 una vez que llegan al recto realizan el proceso de metaciclologénesis, transformándose en tripomastigotes metacíclicos (estadio infeccioso) 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 (fagocítica o no-fagocítica). En el interior de estas los tripomastigotes 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 invadir otras células, en las que se transformarán nuevamente en amastigotes replicativos, o cerrarán el ciclo de vida al ser ingeridos nuevamente por un insecto vector (Figura 5) (Rassi *et al.*, 2010).

II. 3. Tratamiento de la enfermedad de Chagas

En la actualidad, el tratamiento se basa en el uso de dos fármacos con actividad tripanocida: El nitrofurano nifurtimox, que administrado a dosis oral de 10 a 15 mg/Kg/día durante 90–120 días, después de 3.5 horas adquiere valores plasmáticos máximos de 12.5-30 μM . Y el nitroimidazol benznidazol, que en dosis de 5-7.5 mg/Kg/día durante 60 días, alcanza valores plasmáticos de 8.5-10.8 μM después de 3-4 horas (Cerecetto, 2011; Pinazo *et al.*, 2013; Rodríguez-Morales, 2005) (Figura 6). Ambos fármacos tienen actividad significativa, causando la cura parasitológica en hasta el 60% de los pacientes en la fase aguda de la enfermedad y en sólo un 10-20% para la infección crónica (Izumi *et al.*, 2011). Ninguno es producido en México, sólo se consiguen por solicitud expresa de la Secretaría de Salud al gobierno de Brasil y su disponibilidad es escasa y controlada.

El tratamiento con ambos fármacos presenta numerosos efectos adversos, debido a que presentan un margen terapéutico muy estrecho, es decir, la dosis terapéutica es muy cercana a la dosis tóxica (Castro *et al.*, 2006, Maya *et al.*, 2007), además, su efectividad varía de acuerdo al área endémica y a la susceptibilidad de las diferentes cepas de *T. cruzi* (Murta *et al.*, 1998, Maya *et al.*, 2007). Los efectos colaterales observados por el uso de nifurtimox son: inapetencia, náuseas y vómito que conllevan a la pérdida de peso, anorexia, irritabilidad, trastornos en el sueño, digestivos y/o neurológicos. En el tratamiento con benznidazol se han reportado hipersensibilidad, dermatitis, dolor articular y muscular, supresión de médula ósea que disminuye la producción de glóbulos blancos, polineuritis, náuseas, linfadenopatía etc. Los efectos colaterales son reversibles cuando la dosis se reduce o el tratamiento es suspendido, lo cual ocurre en la mayoría de los casos (Salazar-Schettino *et al.*, 2011).

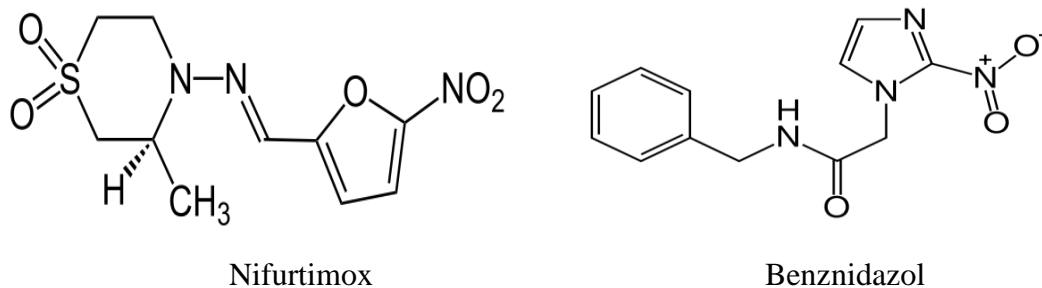


Figura 6. Estructura química de los fármacos empleados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

II.3.1. Mecanismo de acción de nifurtimox y benznidazol

El benznidazol es un 2-nitroimidazol (N-benzil-2-nitroimidazol acetamida) que se ha comercializado con los nombres de radanil o rochagan (Roche). Se ha propuesto que sus mecanismos de acción sobre *T. cruzi* involucran uniones covalentes y otras interacciones de intermediarios nitroreductores producidos al metabolizar el fármaco, con componentes como ADN, lípidos o proteínas (Figura 7) (Díaz de Toranzo *et al.*, 1988, Martínez, 2010).

El nifurtimox es un 5-nitrofurano (3-metil-4-(5'-nitrofurfurilideneamina) tetrahydro-4H-1,1-dioxido), se comercializa como lampit (Bayer) y su modo de acción principal se basa en la generación del radical nitro anión ($R\text{-NO}_2^-$) (Docampo y Moreno, 1984).

El grupo nitro de ambos fármacos se reduce a un grupo amino por la acción de nitrorreductasas, a partir de la formación de diversos intermediarios de radicales libres y metabolitos electrofílicos. Este proceso comienza con una reacción catalizada por la NADPH -citocromo P-450 reductasa, que actúa sobre el grupo nitro de moléculas de tipo $R\text{-NO}_2$, produciendo un radical nitro anión ($R\text{-NO}_2^-$) (Moreno *et al.*, 1982). Este radical sufre reciclaje redox con oxígeno molecular, lo que reduce parcialmente y regenera a la droga. El anión superóxido (O_2^-) se somete a dismutación en una reacción catalizada por la superóxido dismutasa (SOD) produciendo O_2 y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (Temperton *et al.*, 1998). El anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrogeno, en presencia de Fe^{3+} , forman el radical libre hidroxilo (reacción de Haber-Weiss). Este radical se une a los lípidos, proteínas y ADN, dañándolos (Díaz de Toranzo *et al.*, 1988). La concentración de nifurtimox que inhibe el crecimiento de epimastigotes en cultivo es de 10-20 μM y es similar a la concentración requerida para la máxima producción de anión superóxido y peróxido de hidrogeno, lo que no sólo daña al parásito, si no también a las células de mamífero (Figura 7) (Díaz de Toranzo *et al.*, 1988; Maya *et al.*, 2007; Stoppani, 1999).

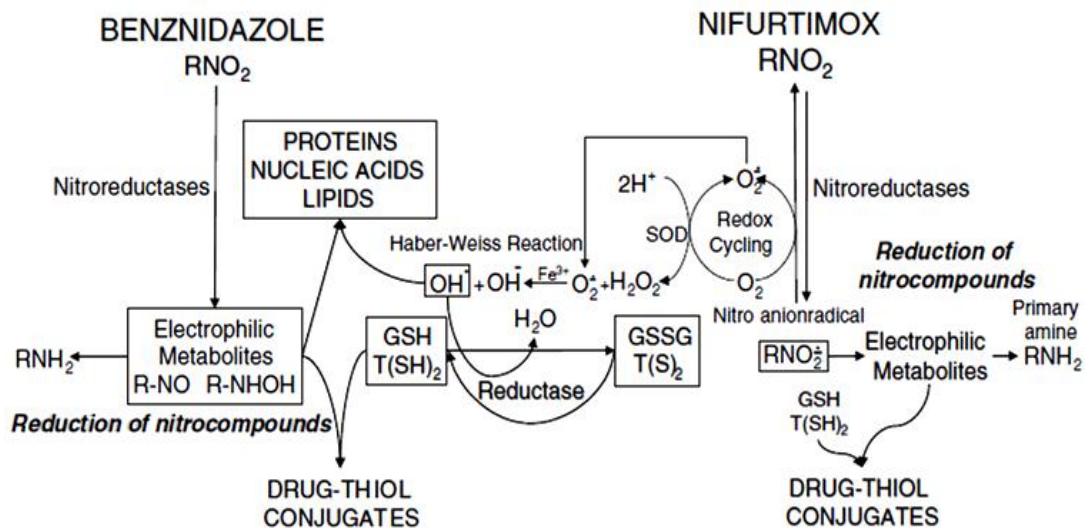


Figura 7. Mecanismo de acción del nifurtimox y benznidazol. El grupo nitro de ambos fármacos es reducido a radicales libres o metabolitos electrofílicos por la acción de nitrorreductasas. El radical nitroanión del nifurtimox puede unirse directamente al tripanotión ($T(SH)_2$) y glutatión (GSH) del parásito, 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 (Tomado de Maya *et al.*, 2007).

II.4. Antecedentes de *Calophyllum brasiliense*

II.4.1. El género *Calophyllum* (*Calophyllaceae*)

El género *Calophyllum* pertenece a una familia de plantas conocida como *Calophyllaceae*, antiguamente conocida como *Clusiaceae* o *Guttiferae*, de acuerdo a la clasificación del sistema APGIII (por sus siglas en inglés, *Angiosperm Phylogeny Group*) (Figura 8) (Bremer *et al.*, 2009).

El género está compuesto por 180-200 especies de árboles que habitan en las selvas tropicales húmedas, principalmente en la región Indo-pacífica, ocho especies se encuentran en el continente americano, siendo *Calophyllum brasiliense* Cambess la de mayor distribución en las selvas tropicales lluviosas desde México hasta Brasil (Filho *et al.*, 2009; Stevens, 1980).

Reino: Plantae
Phylum: Tracheophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Hypericales
Familia: Calophyllaceae
(Clusiaceae)
Subfamilia: Calophylloideae
Tribu: Calophylleae
Género: *Calophyllum*
Especie: *Calophyllum brasiliense* (Cambess, 1825)

Basada en Flores *et al.*, 2008 y Bremer *et al.*, 2009

Figura 8. Clasificación Taxonómica de *Calophyllum brasiliense*

II.4.2. *Calophyllum brasiliense* Cambess.

Etimológicamente, *Calophyllum* significa “hoja bonita” y *brasiliense* “de Brasil”, por su origen geográfico (Ferreira 1975, citado en García-Zebadúa, 2013). Es una planta, conocida comúnmente como “Barí” ó ”Santa María”, “Guaya” (Chiapas y Tabasco), “Palo María” (Nayarit) “Guanadi” (Brasil) (CONABIO, 2014) 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 (Filho *et al.*, 2009, Mesía-Vela *et al.*, 2001, citado en García-Zebadúa, 2013).

Es un árbol tropical caducifolio que mide 20-30 metros, es dioico y es el único representante de su género en México (CONABIO, 2014), 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 actinomorfas; sus frutos son de tipo drupa o baya de 1.8-3 cm de largo; semillas ovoides o

esféricas de 1.7-22 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 (Figura 9) (CONABIO, 2014).



Figura 9. Fotografías del árbol *Calophyllum brasiliense* tomadas en el municipio de Tatahicapán de Juárez, Veracruz. a) árbol, b) corteza, c) hojas e inflorescencia, d) fruto.

II.4.3. Fitoquímica

Los principales compuestos de *C. brasiliense* han sido aislados de los extractos de sus hojas y se han clasificado en 6 grupos diferentes: esteroides, triterpenos, flavonoides, cromanonas, benzopiranos, xantonas y cumarinas. De estas últimas existen tres tipos: las dipiranocumarinas tetracíclicas, tricíclicas y las cumarinas tipo mammea (Huerta-Reyes, 2004; Correa, 1978, Fonseca, 2008).

Muchos de estos compuestos han mostrado tener importantes propiedades farmacológicas como: efecto gastroprotector, antiespasmódico, analgésico, antibacteriano (Da Silva *et al.*, 2001; Venugopala *et al.*, 2013), actividad antitumoral y citotóxica (Reyes-Chilpa *et al.*, 2004, Ruíz-Marcial *et al.*, 2007) y antiprotozoaria contra *T. cruzi* y *Leishmania* (Reyes-Chilpa *et al.*, 2008; Brenzan *et al.*, 2007, 2008a, 2008b, 2012; Honda *et al.*, 2010; Shioji-Tiuman *et al.*, 2012).

II.4.4. Cumarinas tipo mammea

Son un grupo de metabolitos secundarios, constituidos por un esqueleto 2H-1-benzopirano-2-ona denominado cumarina. Estos compuestos fenólicos derivan del ácido 2-hidróxi-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 (Xiao-Hui *et al.*, 2008; 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.*, 1966, 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 (Estrada-Muñiz, 2001) (Figura 10):

A: 3-metilbutiril **B:** 2-metilbutiril **C:** butiril **D:** 2-metilpropionil

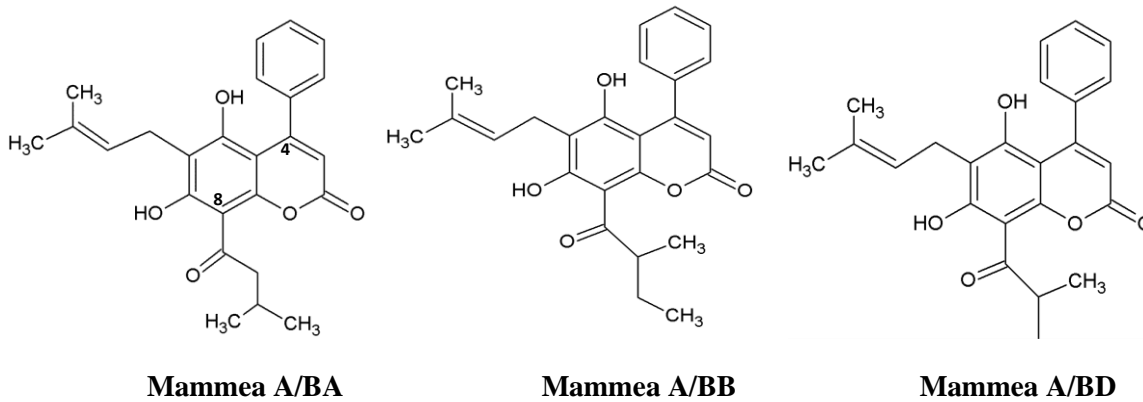


Figura 10. Estructura de las cumarinas tipo mammea utilizadas en el presente trabajo.

II.4.5. Actividad biológica contra tripanosomátidos

En 2002, Abe y colaboradores realizaron un cernimiento 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. De estos extractos, 18 mostraron buena actividad a una concentración de 1 y 2 mg/mL después de 2-48 horas de incubación, una alta actividad fue determinada en extractos de los árboles *C. brasiliense*, *Mammea americana* y *Garcinia intermedia* (Clusiaceae).

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* (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 B/BA, A/BA, A/BD Y B/BA, en un rango de 25-90 µg/mL (Tabla1). Estos compuestos mostraron altos índices de selectividad (IS) 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.*, 2005; 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 (Reyes-Chilpa *et al.*, 2008, Ruiz-Marcial *et al.*, 2005).

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

Compuesto	MC ₁₀₀ (µg/mL) Epimastigote	MC ₁₀₀ (µg/mL) Tripomastigote	LC ₁₀₀ (µg/mL) Linfocitos	IS (LC ₁₀₀ /MC ₁₀₀) Epimastigote	IS (LC ₁₀₀ /MC ₁₀₀) 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.*, 2008a). 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.*, 2007, 2008b; Brenzan *et al.*, 2012).

III. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas es una de las enfermedades olvidadas que afecta a poblaciones pobres de países en desarrollo y que 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 fases 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. Para el primer caso se desconoce el mecanismo de acción de estos compuestos sobre el parásito, pero la actividad sobre *Leishmania* sugiere que estos compuestos provocan cambios ultraestructurales en los parásitos. Por esta razón, en este trabajo nos pareció interesante determinar si las cumarinas tipo mammea tienen efecto sobre diferentes cepas mexicanas de *T. cruzi* y determinar si el efecto de los mismos es diferente entre cada cepa, ya que en nuestro laboratorio se ha reportado que pese a pertenecer a un sólo grupo genético, las cepas mexicanas de *T. cruzi* pueden presentar características biológicas diferentes y la susceptibilidad a fármacos puede ser una de estas diferencias.

IV. HIPÓTESIS

Si las cumarinas tipo mammea A/BA, A/BB y A/BD tiene actividad tripanocida contra cepas mexicanas de *T. cruzi*, entonces se afectará la movilidad, morfología y crecimiento de los parásitos.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar si las cumarinas tipo mammea de *C. brasiliense* tienen actividad tripanocida en cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi*.

Objetivos particulares

- Extraer, purificar e identificar una mezcla de cumarinas tipo mammea a partir de extractos de hojas de *C. brasiliense*.
- Realizar ensayos de actividad biológica de los compuestos aislados para determinar si tienen efecto sobre la movilidad, morfología y crecimiento epimastigotes de *T. cruzi*.
- Determinar la dosis media de una mezcla de cumarinas y mammea A/BA, requerida para inhibir la movilidad de tripomastigotes de la cepa Querétaro y observar el efecto de estos compuestos en la morfología de los parásitos.
- Analizar si el efecto de las cumarinas es diferencial para las cepas mexicanas de *T. cruzi* Ninoa, Querétaro (Genotipo I) y Ver6 (Genotipo II/VI).
- Caracterizar la ultraestructura de parásitos expuestos con las cumarinas tipo mammea.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1. Estudio fitoquímico

6.1.1. Material biológico

Se trabajó con extractos semipurificados proporcionados por el Dr. Ricardo Reyes Chilpa del Instituto de Química, UNAM. Estos extractos fueron obtenidos en un trabajo previo realizado con muestras de hojas de *C. brasiliense*, colectadas en el Ejido Benigno Mendoza, Mpio. Tatahuicapan de Juárez, Veracruz y cuyos ejemplares de herbario se encuentran depositados en la Universidad Veracruzana de Jalapa, Veracruz (Reyes-Chilpa *et al.*, 2008).

6.1.2. Cromatografía e instrumentación

Cada extracto se disolvió con acetato de etilo para realizar un análisis de sus componentes por cromatografía de capa fina (c.c.f.) a una concentración de 20 mg/mL, utilizando como adsorbente gel de sílice de 0.25mm de espesor (GF-254, Merck) y una fase móvil 8:2 de hexano-acetato de etilo (Hx/AcOEt). Los cromatofolios se observaron con luz ultravioleta a 254 nm y 366 nm, antes de realizar un revelado permanente con Sulfato cérico 1M en H₂SO₄ 2N. La presencia de cumarinas tipo mammea se determinó utilizando un estándar de mammea A/BA puro y determinando el R_f (frente de referencia) de los compuestos observados en c.c.f mediante la siguiente fórmula:

$$R_f = \frac{\text{Distancia (cm) recorrida por el compuesto}}{\text{Distancia (cm) recorrida por la fase móvil}}$$

Una vez observada la composición de cada extracto por c.c.f. los extractos seleccionados (#6 y #7) se reunieron (4.3 g) y se pre-absorbieron en celita, procediendo a separar sus constituyentes por cromatografía en columna (CC) con gel de sílice (86 g) previamente empacada con hexano. La columna se eluyó con una fase móvil de hexano, acetato de etilo y diferentes mezclas de ambos disolventes. Las fracciones obtenidas por cada fase móvil, se conservaron en frascos de 5mL y se analizaron por c.c.f. como antes se indicó.

6.1.3. Identificación de compuestos

De las fracciones que formaron precipitados cristalinos la pureza e identificación de los mismos se determinó de acuerdo a sus datos espectroscópicos de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RNMH¹), la cual se realizó en el espectrómetro Varian XL 300 (300 MHz). Estos espectros se procesaron con el software MestReNova, Versión 6.0.2-5475, 2009, Mestrelab Research. S.L. (<http://mestrelab.com>) y se interpretaron siguiendo el método de Nathan y Díaz, 1970. Posterior a este análisis se determinó el “punto de fusión” de los compuestos analizados.

6.1.4. Compuestos utilizados

Para los ensayos de actividad biológica se utilizó una mezcla de cumarinas que precipitó de la fracción 20 eluida con Hx/AcOEt (95:5), la cual de acuerdo a su espectro de RNMH¹, se determinó que está constituida por mammea A/ABA, A/BB y A/BD (6:3:1).

VI.2. Cultivos celulares

6.2.1. Cultivo de epimastigotes:

Para este trabajo se utilizaron epimastigotes de *T. cruzi* de las cepas mexicanas MHOM/MX/1994/Ninoa (cepa avirulenta) y TBAR/MX/0000/Querétaro (cepa virulenta), pertenecientes al grupo genético I, así como MDID/MX/1991/Ver6 (Genotipo II/VI, virulencia no determinada). Los parásitos fueron cultivados en un número inicial de 3×10^6 parásitos por mililitro de medio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado con 25 µg/mL de hemina y suero fetal bovino al 10% previamente inactivado con calor. Se incubaron durante 3-4 días a 28°C en cajas de cultivo, para obtenerlos en fase logarítmica de crecimiento (Espinoza *et al.*, 2010).

6.2.2. Cultivo y obtención de tripomastigotes

Los tripomastigotes de la cepa Querétaro, se obtuvieron a partir de células Vero (Células epiteliales de riñón de mono verde Africano) previamente infectadas con tripomastigotes de esta cepa, una vez que se estableció el ciclo de infección, dentro de las células, los parásitos se transforman en amastigotes, lisan a las mismas y emergen como tripomastigotes, los cuales quedan suspendidos en el sobrenadante del cultivo celular en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*).

Para la obtención de los parásitos, el sobrenadante de las cajas de cultivo se colectó por decantación en un tubo cónico estéril de 50 ml; se sometió a un primer ciclo de centrifugación de 10,000 rpm (12,880 x g) en una centrifuga Jouan durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, el medio se retiró por decantación y el pellet formado se lavó con 500 µl de PBS estéril, este volumen se transfirió a un microtubo de 1.5 ml y nuevamente se centrifugó a 12,800 x g por 30 minutos en una centrifuga Eppendorff 5410 a temperatura ambiente. Finalmente, el sobrenadante se retiró y el pellet final se resuspendió en 200 µl de PBS, se realizó una dilución 1:50 (2 µl de pellet y 198 µl de PBS) y el número final de parásitos se contó en cámara de Neubauer.

VI.3. Ensayos de actividad biológica

Las condiciones usadas para estudiar el efecto de los compuestos sobre epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* se resumen en las tablas 2 y 3, respectivamente, donde se indica el

estadio utilizado, la cepa, el tratamiento y la duración del mismo, así como el parámetro evaluado (movilidad, crecimiento ó morfología).

6.3.1. Preparación de soluciones stock de fármacos

Diez miligramos de mezcla de cumarinas tipo mammea A/BA+A/BB+A/BD (6:3:1) (fracción 20), mammea A/BA, benznidazol (BZ) y/ó nifurtimox (NFX), se disolvieron en microtubos estériles de 1.5 mL con 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) para obtener soluciones stock a diferentes concentraciones (100, 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.12 µg/mL).

6.3.2. Actividad sobre la fase epimastigote

En una placa de 24 pozos (Costar, 3524), se cultivaron 1×10^6 epimastigotes/mL y se añadieron 10µl de cada solución stock (punto 6.3.1). Esto se realizó por duplicado y se incubó la placa a 28°C durante un periodo largo de 12, 24, 48 horas y un periodo corto de 3 horas (Tabla 2). La concentración final de DMSO en medio LIT con parásitos fue siempre del 1%, pues esta concentración no afecta la supervivencia de los parásitos (Abe. *et. al.* 2008). Los grupos control fueron el fármaco benznidazol (100 µg/mL), DMSO (1%) y medio LIT con parásitos.

Tabla 2. Tratamientos para cultivo celular de epimastigotes de *T. cruzi*

Cepa	Tratamiento	Duración	Parámetro evaluado
Ninoa	Fracción 20	12,24 y 48 horas 3 horas	Movilidad* / Número de parásitos Movilidad* / Crecimiento ⁺ /Morfología
Querétaro	Fracción 20	3 horas	Movilidad* / Crecimiento ⁺ /Morfología
	Mammea A/BA	3 horas	Movilidad*
Ver6	Fracción 20	3 horas	Movilidad* / Crecimiento ⁺ /Morfología

***CIM₅₀**: Concentración inhibitoria media de movilidad, +**CIC₅₀**: Concentración inhibitoria media de crecimiento.

6.3.3. Actividad sobre la fase tripomastigote

En el caso de la fase tripomastigote se realizaron dos tipos de ensayos, inicialmente se probó la actividad de una mezcla de cumarinas tipo mammea (fracción 20) y posteriormente se probó la actividad de la cumarina mammea A/BA a diferentes concentraciones (100, 50, 25,12.5, 6.25 y 3.12 µg/mL). Para esto, una cantidad de 0.39×10^6 parásitos/mL se cultivaron en 150µl de DMEM en una placa de 96 pozos (Costar, 3595) y se añadieron 1.5 µl de cada solución stock de cumarinas (punto 6.3.1) esto se realizó por duplicado y se incubo a 37°C con una atmosfera de 5% de CO₂ durante 3 horas (Tabla 3). La concentración final de DMSO en medio DMEM con parásitos fue siempre del 1% (Abe *et al.*, 2008, Martínez *et al.*, 2013), los grupos control positivo fueron benznidazol y nifurtimox (100µg/mL), y los controles negativos fueron DMSO (1%) y medio DMEM con parásitos.

Tabla 3. Condiciones utilizadas con cultivos de tripomastigotes de *T. cruzi*

Cepa	Tratamiento	Duración	Parámetro evaluado
Querétaro	Fracción 20	3 horas	Movilidad*/Morfología
	Mammea A/BA	3 horas	Movilidad*/Morfología

*CIM₅₀: Concentración inhibitoria media de movilidad

6.3.4. Evaluación de la movilidad de los parásitos

Los parásitos móviles e inmóviles, en el estadio epimastigote y tripomastigote, se contaron en preparaciones en fresco con un hemocitómetro después de concluir las horas de incubación especificadas para cada uno de los estadios del parásito (puntos 6.3.2 y 6.3.3). La CIM₅₀ fue determinada por el método de regresión lineal simple para la fase epimastigote y con la fórmula de Villarreal *et al.*, 2004 para la fase tripomastigote:

$$\text{Log (IC50)} = \log(x_1) + [(y_1 - y_0)/2]/(y_1 - y_2) [\log(x_2) - \log(x_1)]$$

Donde y_0 es la mitad del valor de movilidad del grupo control negativo (DMSO ó DMEM), y_1 es el primer valor de movilidad por arriba de y_0 , y_2 es el primer valor de movilidad por debajo de y_0 , x_1 y x_2 , se refiere a la concentración de fármaco requerido para obtener el valor y_1 y y_2 respectivamente.

6.3.5. Ensayos de crecimiento de la fase epimastigote

Después de las 3 horas de exposición con las diferentes concentraciones de cumarinas y fármacos control, los parásitos se lavaron dos veces con buffer de fosfatos (PBS, *Phosphate Buffered Saline*) y se sembraron en medio LIT fresco en una placa de 96 pozos (Costar, 3595) a una cantidad de 0.5×10^6 parásitos/mL, realizándose el conteo del número de parásitos después de 4 y 8 días para determinar la recuperación de la capacidad de duplicación en cada tratamiento.

6.3.6. Susceptibilidad a los agentes quimioterapéuticos de la fase epimastigote

Se determinó calculando porcentajes de crecimiento e inhibición de crecimiento, respecto a los cultivos controles no tratados (DMSO y parásitos en medio LIT). Los cálculos se realizaron de acuerdo a lo reportado por Martínez-Díaz *et al.*, 2001:

✓ **Porcentaje de crecimiento (%C):**
$$\frac{\# \text{final de parásitos contados a los 4 u 8 días}}{\# \text{Inicial de parásitos}}$$

✓ **Porcentaje de Inhibición de crecimiento (P.I):**
$$100 - \left(\frac{\% \text{ C grupo experimental}}{\% \text{ C de grupo control}} \right) \times 100$$

VI.4. Técnicas microscópicas

6.4.1. Observación de la morfología y captura de imágenes en el microscopio óptico

El movimiento y morfología de los epimastigotes expuestos a cada tratamiento se observó en fresco bajo la luz de un microscopio invertido *Olympus IX71* invertido. Las fotografías fueron tomadas con una cámara digital, usando el objetivo 40x (filtro Ph2) y el programa *Q capture Pro*. Las preparaciones permanentes se obtuvieron al colocar una gota de 10 μ l de los diferentes tratamientos, sobre pozos de portaobjetos *Teflon Printed Slide* de 21 pozos (*Electron microscopy sciences*, 63429-04), dejando secar la gota a temperatura ambiente. Los parásitos adheridos se fijaron con metanol y se tiñeron con el colorante Giemsa (Sigma-Aldrich, WG32-1L) por 18 minutos, transcurrido este tiempo el portaobjetos se enjuaga sumergiéndolo durante 7 minutos en agua bidestilada, se dejó secar al aire libre y se montó con la resina *Organo/Limonene Mount* (Santa Cruz Biotechnology, sc-45087). Las fotografías fueron tomadas con una cámara digital Nikon Coolpix 4300 acoplada a un microscopio Nikon Optiphot 2, usando el objetivo 100x con luz de campo claro.

6.4.2. Captura de imágenes en microscopio electrónico de transmisión

El procesamiento de las muestras para la toma de micrografías de microscopía electrónica de transmisión (MET) se realizó por la Dra. Lourdes Teresa Agredano Moreno en el laboratorio de Microscopia Electrónica del Edificio Tlahuizcalpan de la Facultad de Ciencias, UNAM a cargo de Dr. Luis Felipe Jiménez. Para ello, una muestra de 38×10^6 /mL de epimastigotes cepa Querétaro se trataron durante un período de 3 horas con la concentración inhibitoria media de movilidad, calculada para una mezcla de cumarinas ($CIM_{50}=5.45 \mu\text{g/mL}$) y el compuesto puro mammea A/BA ($CIM_{50}=4 \mu\text{g/mL}$). Los grupos control fueron DMSO al 1% y medio LIT. Una vez transcurrido el tiempo de exposición de los parásitos a los diferentes tratamientos, estos se lavaron dos veces con PBS, centrifugándolos a 2000 rpm durante 10 min a 4°C, después de estos lavados, el pellet se concentró en un tubo eppendorf de 1.6ml y se fijó con paraformaldehído 4%-glutaraldehído 2.5% en PBS durante 24 horas. Después de este tiempo, los parásitos se volvieron a lavar con PBS y se post-fijaron con tetraóxido de osmio al 1% durante 2 horas. Las muestras se lavaron con PBS y se procedió a la deshidratación en etanoles graduales al 30, 50, 70, 80, 90, y 96% durante 10 minutos cada uno y tres cambios en etanol absoluto de 5 minutos cada uno. Las muestras se colocaron en óxido de propileno haciendo 3 cambios de 5 minutos y posteriormente se colocaron en una mezcla de óxido de propileno-resina epóxica en una proporción 1:1 durante 18 horas a temperatura ambiente y finalmente se procedió a su inclusión en tubos eppenforf y a la polimerización de las mismas en una estufa a 60°C durante 48 horas.

Se realizaron cortes ultrafinos de 40-60 nanómetros de grosor, los cuales se montaron sobre rejillas de cobre cubiertas con formvar y finalmente se procedió al contraste de los cortes con acetato de uranilo al 5% y citrato de plomo al 0.5% durante 30 y 10 minutos, respectivamente.

Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión (JEOL 1010, JEOL, Peabody, MA) operando 80 KV, con cámara acoplada para la toma de fotografías.

VI.5. Análisis estadísticos

Las gráficas y los análisis estadísticos se realizaron con el programa “GraphPad Prism *version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA*” (disponible en www.graphpad.com). Todos los experimentos se realizaron por lo menos tres veces de manera independiente por duplicado. Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar (DS). Estos datos fueron analizados con análisis unidireccional de varianza (ANOVA, $p < 0.05$), y la diferencia entre los grupos se determinó con una prueba de comparación múltiple (Tukey's multiple comparisons test), cuyo nivel de significancia se fijó en $p < 0.001$.

VII. RESULTADOS

VII.1. Estudio Fitoquímico

7.1.1. Cromatografía

Se analizaron con cromatografía de capa fina (c.c.f.) 10 extractos hexánicos semipurificados de hojas de *C. brasiliense* (Quimiotipo 1, QTP1), para identificar la presencia de cumarinas tipo mammea. La presencia de estos compuestos, se determinó utilizando un estándar de Mammea A/BA (A/BA) y un extracto de hojas de *C. brasiliense* (Qtp 1) (Figura 11).

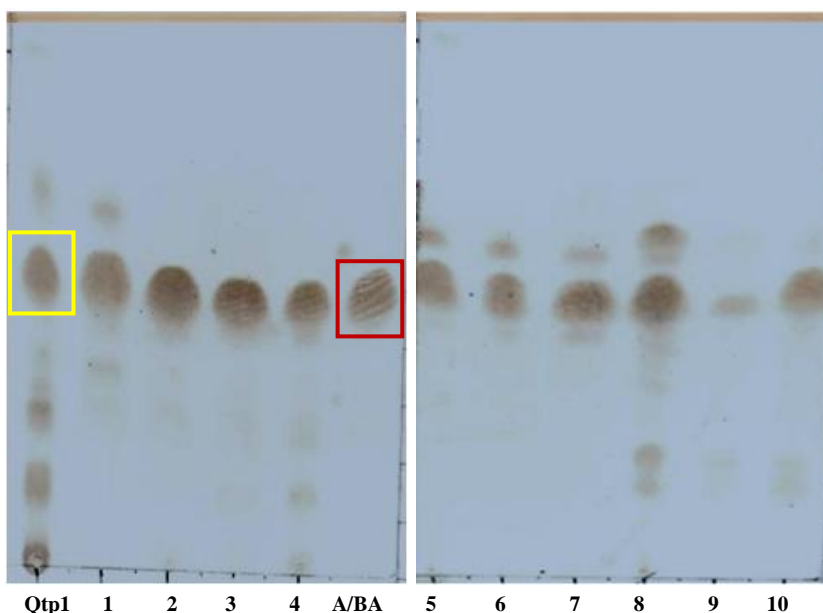


Figura 11. Cromatografía en capa fina de los 10 extractos analizados. Las manchas representan cumarinas tipo mammea en todos los extractos, comparados con muestras de extracto hexánico del quimiotipo 1 de *C. brasiliense* (amarillo), así como mammea A/BA (rojo). Cromatofolio revelado con sulfato cérico, fase móvil 8:2 (Hx/AcOEt), $R_f = 0.52$.

Una vez comprobada la presencia de cumarinas tipo mammea en los 10 extractos se seleccionaron los extractos 6 y 7 para purificarlas por cromatografía en columna (Silica Gel) eluyendo con una fase móvil 95:5 Hx/AcOEt. Se obtuvieron 33 fracciones, de las cuales sólo tres (19, 20, 21), formaron cristales en forma de agujas finas incoloras. El punto de fusión determinado para los cristales fue de: 103, 105 y 103.5 °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.

Al analizar dichos cristales por c.c.f. se observaron como una sola mancha con el mismo frente de referencia ($R_f=0.50$), lo que sugirió que las tres fracciones tenían la misma composición (Figura 12).

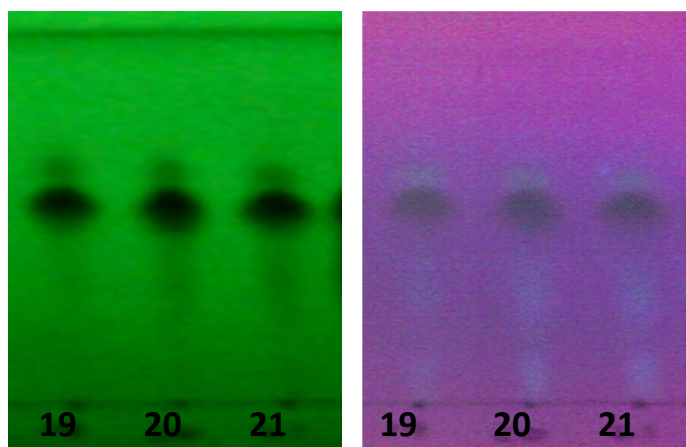


Figura 12. Cromatografía en capa fina de cristales de las fracciones 19, 20 y 21 obtenidas por cromatografía en columna. Fase móvil hexano/acetato de etilo 8:2. Las manchas negras se deben a las cumarinas tipo mammea. Cromatofolio observado bajo luz UV a 254nm (derecha) y 366nm (izquierda), Rf=0.50.

7.1.2. Identificación de compuestos

Debido a que la cantidad de cristales de la fracción 20 (85 mg), era mucho mayor al de las fracciones 19 (2.4 mg) y 21 (34.8 mg), una muestra de esta fracción (10 mg) se analizó por Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN ^1H) (Figura 13).

El análisis espectroscópico permitió determinar que los cristales de la fracción 20 se componían de una mezcla inseparable de cumarinas tipo mammea en diferente proporción: Mammea A/BA (61.33%) , Mammea A/BB (29.33%) y Mammea A/BD (9.33%), cuya presencia se ha reportado en especies como *Mammea americana* (Crombie *et. al.* 1966, 1967,1972, 1985), *C. brasiliense* (Estrada-Muñiz, 2001) y *M. harmandii* (Reutrakul *et. al.* 2003), por lo que los datos espectroscópicos se compararon con los reportados en la literatura correspondiente (Tabla 4).

La proporción en que cada cumarina (6:3:1) se encontraba presente en los cristales de la fracción 20 se realizó con base en la integración de la señal del OH-7 de cada cumarina en el espectro de RMNH 1 . La suma de las 3 integraciones representó 99.99% siendo el compuesto mayoritario la cumarina mammea A/BA, seguida por la mammea A/BB y mammea A/BD.

Tabla 4. Datos de RMN ¹H de la mezcla: mammaea A/BA, A/BB y A/BD (300 MHz, CDCl₃)

Protón	Mammea A/BA (δ)	Mammea A/BB (δ)	Mammea A/BD (δ)
H-3	5.99 s, 1H	5.99 s, 1H	5.99 s, 1H
Aromáticos (5)	7.56 m, 3H 7.42 m, 2H	7.56 m, 3H 7.42 m, 2H	7.56 m, 3H 7.42 m, 2H
OH-7	14.60 s, 1H	14.55 s, 1H	14.50 s, 1H
OH-5	5.94 s, 1H	5.94 s, 1H	5.94 s, 1H
CH ₂ - Isoprenilo	3.30 d, 2H, J=6 Hz	3.30 d, 2H, J=6 Hz	3.30 d, 2H, J=6 Hz
CH- Isoprenilo	5.10 t, 1H, J= 6 Hz	5.10 t, 1H, J= 6 Hz	5.10 t, 1H, J= 6 Hz
CH ₃ - Isoprenilo	1.70 s, 3H	1.70 s, 3H	1.70 s, 3H
CH ₃ - Isoprenilo	1.65 s, 3H	1.65 s, 3H	1.65 s, 3H
R= Acilo	3-metil-butiril	2-metil-butiril	2-metil-propil
CH ₂	3.19 d, 2H, J=9 Hz	1.93 m, 1H, 1.50 m, 1H	
CH	2.32 m, 1H	3.95 m, 1H	4.11 m, 1H
CH ₃	1.06 d, J = 6.6 Hz, 3H	1.02 t, 3H, J=7.5 Hz	1.30 d, 3H, J=3Hz
CH ₃	1.06 d, J = 6.6 HZ, 3H	1.29 d, 3H, J= 6.6Hz	1.30 d, 3H, J=3Hz

(δ) Desplazamiento en partes por millón (ppm), Multiplicidad: (s) simple, (d) doble, (t) triple, (m) múltiple; Constante de acoplamiento (J) y número de hidrógenos (H).

1644.H-12
 INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM/ E. Huerta
 Dr. R. Reyes/ Karla D. R.
 Clave: K2
 Disolvente: CDCl₃
 Hidrogeno-1
 Varian Unity 300 MHz (D)
 18-06-12
 No. de registro: 1644

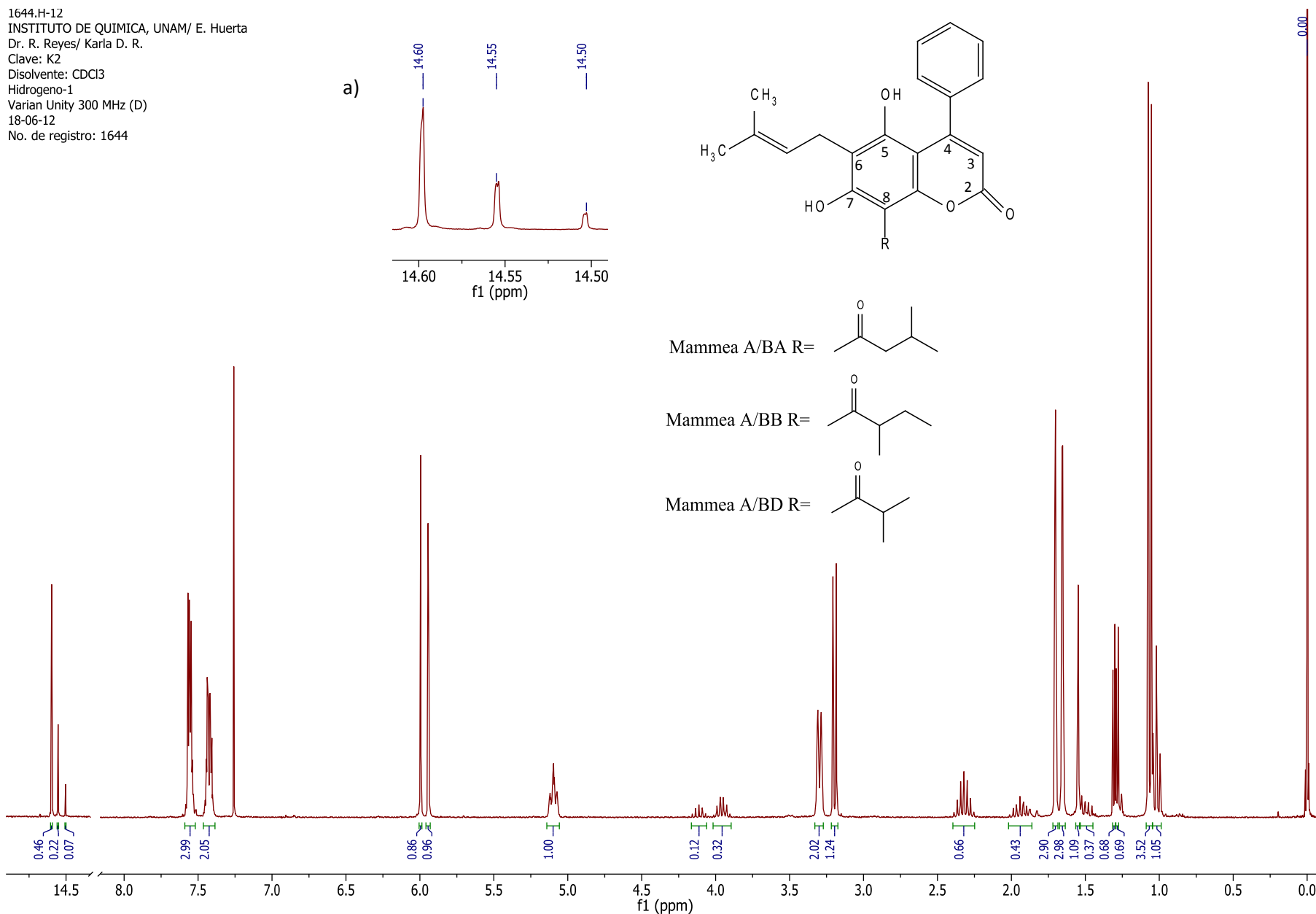


Figura13]. Espectro de RMN¹H (300MHz, CDCl₃). Fracción 20: Mezcla mammea A/BA+ A/BB+ A/BD, a) Desplazamiento del OH-7 de cada cumarina.

VII.2. Ensayos de actividad biológica

En este trabajo se evaluó el efecto de la fracción 20 constituida por una mezcla de cumarinas sobre la fase epimastigote y tripomastigote de tres cepas mexicanas de *T. cruzi*. El primer parámetro a evaluar, fue el efecto de esta fracción sobre la movilidad de los epimastigotes a un tiempo largo de incubación (12-48 horas). Posteriormente se evaluó el efecto sobre la movilidad, morfología y recuperación de crecimiento de los mismos a un tiempo corto de incubación (3 horas), seguido del efecto tanto de esta mezcla de cumarinas como del compuesto mammea A/BA sobre la fase tripomastigote, así como el análisis ultraestructural de los parásitos tratados con ambos compuestos.

7.2.1. Efecto de cumarinas tipo mammea sobre epimastigotes de *T. cruzi*.

Con el fin de determinar el efecto sobre la movilidad (Figura 14) y número de epimastigotes (Figura 15), parásitos de la cepa Ninoa fueron incubados con diferentes concentraciones de la fracción 20 (100-1.56 $\mu\text{g/mL}$), el fármaco nifurtimox (Nfx) (0.06 $\mu\text{g/mL}$ =0.21 μM) y el vehículo DMSO y medio LIT, durante diferentes tiempos de incubación, 12 horas (barras grises), 24 horas (barras blancas) y 48 horas (barras negras) el número de parásitos móviles e inmóviles se determinó por conteo en un hemocitómetro para calcular el porcentaje de movilidad en cada tratamiento evaluado.

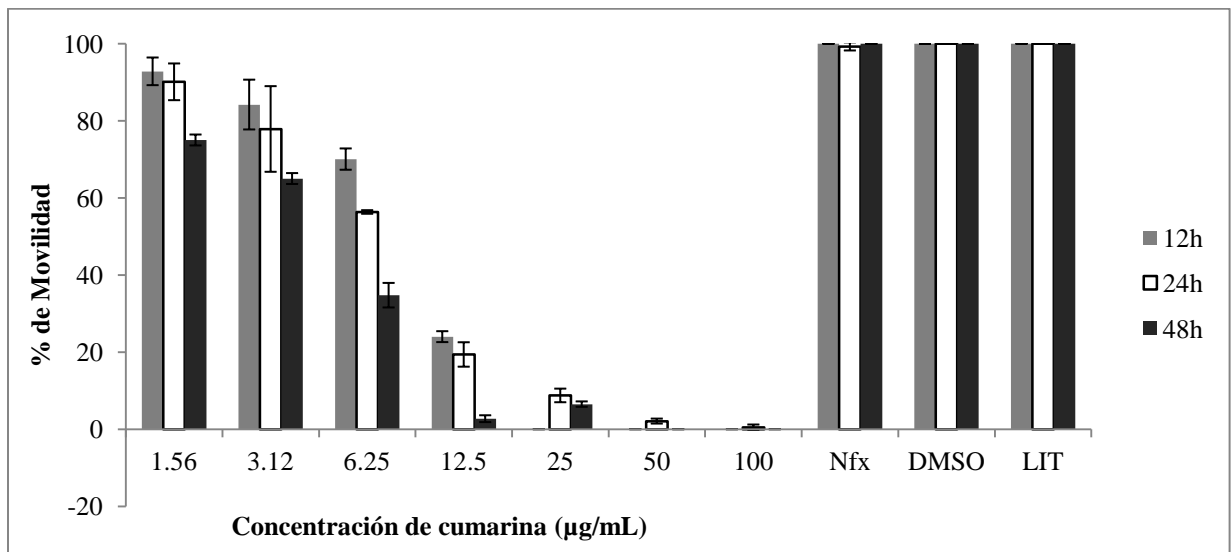


Figura 14: Efecto de una mezcla de cumarinas tipo mammea sobre la movilidad de epimastigotes de *T. cruzi* cepa Ninoa. Se observa disminución de la movilidad con respecto a la dosis de cumarina y tiempo de incubación. El fármaco Nfx no afectó de manera evidente la movilidad con respecto a los grupos control DMSO y LIT.

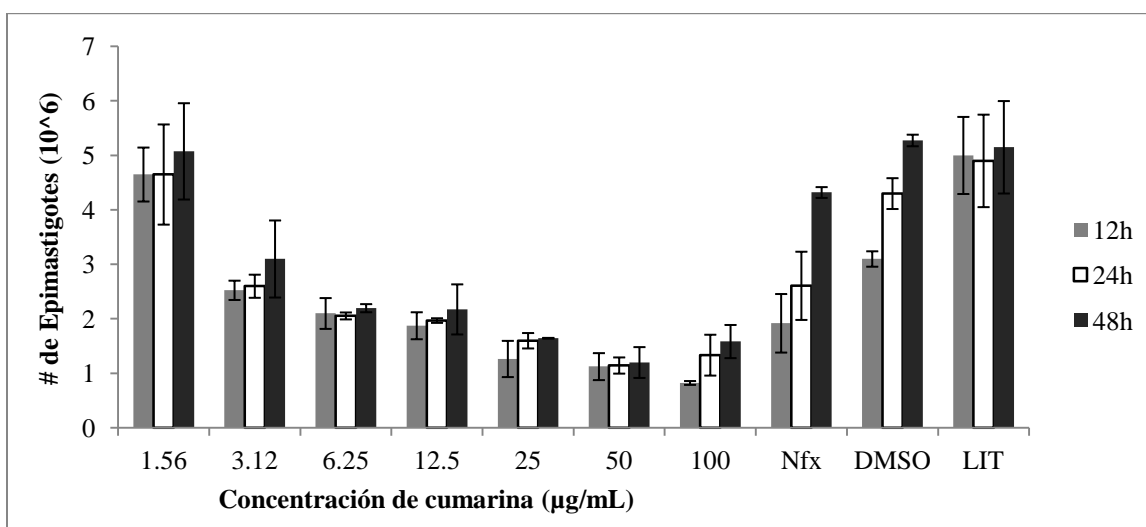


Figura 15: Efecto de la mezcla de cumarinas sobre el número de epimastigotes de *T. cruzi*. El número total de parásitos, se calculó con respecto al número de epimastigotes contados en preparaciones en fresco con ayuda de un hemocitometro y se comparó con los grupos control Nfx, DMSO y LIT.

En la Tabla 5 se muestra el porcentaje de parásitos móviles y el número total de parásitos por tratamiento, calculado con respecto al número total de parásitos contados en preparaciones en fresco, el farmaco nifurtimox se utilizó a una concentración de 0.06 µg/mL ya que es la concentración que inhibe en un 50% el crecimiento de los parásitos (Martínez *et al.*, 2013), vehículo DMSO 1% y Medio LIT.

Tabla 5: Porcentaje de movilidad y número de epimastigotes por tratamiento y tiempo de incubación.

Tratamiento µg/mL	12 horas		24 horas		48 horas	
	% M	# E	% M	# E	% M	# E
1.5625	92.8±3.5	2.65±0.49	90±4.7	4.65±0.91	75±1.4	5.07±0.88
3.125	84.1±6.4	2.52±0.17	77.85±11.10	2.6±0.21	65±1.4	3.1±0.70
6.25	70.0±2.7	2.1±0.28	56.33±0.4	2.05±0.06	34.75±3.18	2.19±0.07
12.5	24±1.4	1.88±0.24	19.38±3.16	1.97±0.04	8.75 ±1.7	2.18±0.45
25	6.5±0.7	1.27±0.33	2.725±0.88	1.6±0.14	0±0	1.65±0.0
50	2.105±0.64	1.13±0.24	0±0	1.33±0.14	0±0	1.58±0.30
100	0.5±0.7	0.83±0.03	0±0	1.15±0.37	0±0	1.2±0.28
Nifurtimox	100±0	1.92±0.53	99.26±1.0	2.60±0.62	100±0	4.32±0.09
DMSO 1%	100±0	3.1±0.14	100±0	4.9±0.28	100±0	5.28±0.10
LIT	100±0	2.8±0.35	100±0	4.3±0.84	100±0	5.15±0.84

%M= Porcentaje de Movilidad, %E= # de epimastigotes. Los datos se expresan como el promedio ± DS, de tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Con estos experimentos, se determinó que: el compuesto nifurtimox no afectó la movilidad y el número de parásitos de la cepa Ninoa, comparando con los grupos control y con las diferentes concentraciones de cumarina, por lo que para experimentos posteriores se decidió utilizar como control positivo el fármaco benznidazol; también observamos que las concentraciones de 50 y 100 µg/mL de cumarinas eran muy altas, ya que al realizar el conteo de preparaciones en fresco fue muy difícil distinguir parásitos completos, determinándose un 100% de parásitos inmóviles, muertos (lisados) a las 12, 24 y 48 horas.

Fue a partir de la concentración de 25µg/mL donde los parásitos presentaban inmovilidad, forma redondeada y ausencia de flagelo, por lo que decidimos evaluar ¿Cómo la fracción 20 a concentraciones menores de 25 µg/mL afectaba la movilidad, morfología y crecimiento de los epimastigotes en un tiempo menor de 12 horas?.

7.2.1.1. Efecto sobre la movilidad de epimastigotes de tres cepas mexicanas de *T. cruzi*.

Se realizaron ensayos de exposición con diferentes concentraciones de la fracción 20 (25µg/ml-3.125µg/mL), incubando a los epimastigotes un tiempo menor a 12 horas. En estos ensayos se observó inmovilidad desde las 3 horas de incubación, por lo que se decidió realizar el cálculo de la concentración inhibitoria media de movilidad o CIM₅₀ a este tiempo de incubación para tres cepas mexicanas de *T. cruzi*.

Tabla 6. Porcentaje de movilidad de epimastigotes de cada cepa de *T. cruzi* expuestos a diferentes tratamientos.

Cepa	Fracción 20 (µg/mL)				Benznidazol 100 µg/mL
	3.12	6.25	12.50	25.00	
Ninoa	83.90 ± 11.94	14.07 ± 1.45	3.46 ± 4.00	3.11 ± 3.59	76.69 ± 12.19
Querétaro	92.85 ± 3.50	26.18 ± 10.16	10.97 ± 2.27	3.48 ± 1.14	77.59 ± 0.96
Ver6	94.51 ± 2.92	80.19 ± 13.38	15.08 ± 3.45	7.50 ± 1.03	74.83 ± 6.11

Los datos se representan como el promedio ± DS de por lo menos tres experimentos independientes realizados por duplicado.

La CIM₅₀ se determinó tras un conteo de preparaciones en fresco de parásitos expuestos con diferentes concentraciones de compuesto, para obtener el porcentaje de parásitos móviles e inmóviles de cada cepa, contra la concentración correspondiente de fármaco (Tabla 7). Con base en estos porcentajes se construyeron curvas dosis-respuesta (Figura 16), el cálculo final de CIM₅₀ se realizó con el método de regresión lineal simple de las curvas construidas.

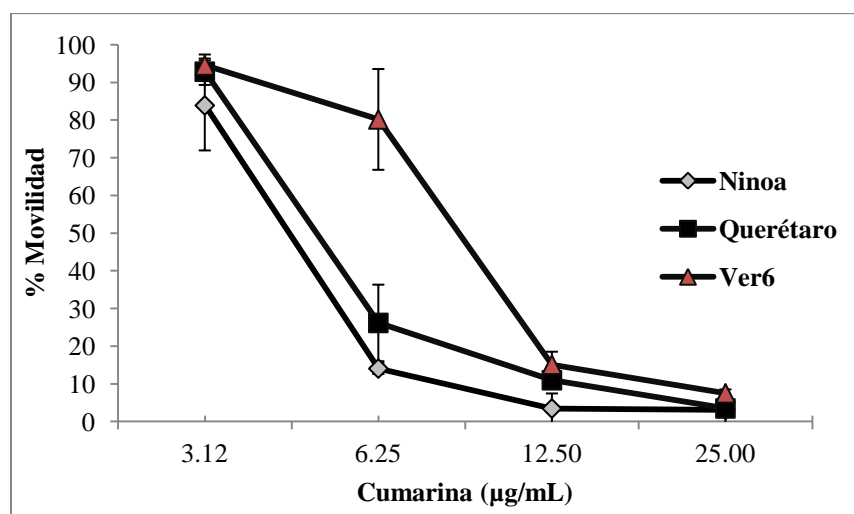


Figura 16. Efecto de cumarinas tipo mamea sobre la movilidad de epimastigotes de tres cepas mexicanas de *T. cruzi*. Las gráficas representan el porcentaje de movilidad promedio \pm DS de al menos tres experimentos independientes realizados por duplicado.

En estos experimentos se observó que en todas las cepas se presentó afectación de la movilidad de manera diferente. La cepa Ninoa fue ligeramente más afectada que Querétaro y Ver 6, ya que como se observa en la Tabla 6, la movilidad de los epimastigotes de la cepa Ninoa fue de 83.90%, siendo más baja en comparación con las cepas Querétaro y Ver6 que presentaron porcentajes de movilidad de 92.84% y 94.51%, respectivamente, las tres tratadas con concentraciones bajas del compuesto (3.12µg/mL).

CIM ₅₀ (µg/mL)	Cepa		
	Ninoa	Querétaro	Ver6
	4.33 \pm 1.575	5.45 \pm 0.090	8.99 \pm 0.647

Tabla 7: Concentración de la fracción 20 determinada para inhibir el 50% de movilidad de tres cepas mexicanas de *T. cruzi* en fase epimastigote. Se representa el promedio \pm DS de las CIM₅₀ calculadas en por lo menos tres experimentos independientes realizados por duplicado para cada cepa.

Al comparar la CIM₅₀ de cada cepa no se mostró diferencia significativa entre Ninoa y Querétaro, pero si hubo diferencias significativas cuando ambas cepas se compararon con Ver6 (Figura. 17). Los grupos control negativo fueron medio LIT con parásitos y DMSO al 1%, los parásitos en ambos tratamientos presentaron de un 96-100% de movilidad y morfología de huso normal, indicando que el vehículo DMSO no afecta a los parásitos.

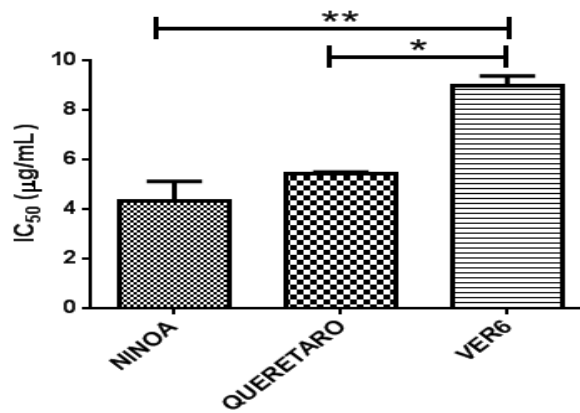


Figura 17. Grafica comparativa de la concentración inhibitoria media de movilidad para cada cepa de *T. cruzi*. Se observa que cada cepa responde de manera diferencial a las cumarinas. El resultado se expresa como el promedio de la CIM₅₀ calculada en por lo menos tres experimentos independientes por duplicado. (Tukey's multiple comparisons test) * p<0.001.

El control positivo fue el fármaco benznidazol (100 µg/mL=384.24 µM), que inhibió la movilidad de la cepa Ninoia, Querétaro y Ver 6, en un 76.69% ,77.59% y 74.83%, respectivamente (Tabla 6). Los estudios *in vitro* con benznidazol, han demostrado que la concentración tripanocida oscila entre 3-6 µg/mL (Pinazo *et. al.* 2013). Sin embargo, esta concentración no inhibió la movilidad de los parásitos de las cepas mexicanas utilizadas en este trabajo. Estudios realizados por Martínez *et al.*, 2013 han demostrado que una concentración de 100 µg/mL de este fármaco inhibe el 80% del crecimiento de parásitos de las cepas Ninoia y Querétaro, por esta razón este control positivo se utilizó también para realizar ensayos de recuperación de crecimiento con cada cepa.

Cabe mencionar que en todas las cepas la afectación de la movilidad estuvo relacionada con la presencia de alteraciones morfológicas, pues los parásitos fueron considerados muertos/inmóviles cuando presentaron una forma esferoide y estática, que fue incapaz de reanudar su crecimiento cuando se transfirieron a un medio libre de fármacos (Ver experimentos de recuperación de crecimiento y morfología).

7.2.2 Efecto de cumarinas tipo mammea sobre tripomastigotes de *T. cruzi*

En el caso de la fase tripomastigote, primero se determinó la CIM₅₀ con la fracción 20 (mezcla de cumarinas) y posteriormente con la cumarina mammea A/BA, compuesto mayoritario en esta mezcla para determinar si este compuesto afectaba la movilidad de igual forma que la mezcla.

Para esto tripomastigotes de la cepa Querétaro se cultivaron con diferentes concentraciones de cada fármaco (25-3.12 µg/mL) durante 3 horas. Los controles negativos fueron parásitos cultivados con DMSO 1% y medio DMEM, y los grupos control positivo fueron benznidazol (BZ) y nifurtimox (NFX) ambos utilizados a una concentración de 100µg/mL.

La movilidad se evaluó por el conteo de los parásitos en preparaciones en fresco y la CIM₅₀ fue determinada con el método Villarreal *et al.*, 2004 considerando los porcentajes de movilidad calculados en los diferentes tratamientos (Tabla 8).

Tratamiento µg/mL	Mammea A/BA+A/BB+A/BD	Mammea A/BA
25	1.92±1.22	3.48±5.4
12.5	37.73±7.10	27.76±15.8
6.25	57.65±10.97	40.32±8.9
3.12	66.80±4.79	73.63±6.6
NFX	6.22±3.83	6.22±3.83
BZ	10.23±7.03	10.23±7.03
DMSO	98.83±2.04	95.93±4.3
DMEM	99.17±1.60	95.42±4.6

Tabla 8. Porcentajes de movilidad de tripomastigotes de *T. cruzi*, cepa Querétaro expuestos con la fracción 20 y mammea A/BA. Los datos se representan como el porcentaje promedio de movilidad ± DS de por lo menos tres experimentos independientes realizados por duplicado.

Con estos experimentos se pudo observar que la movilidad de la fase tripomastigote de *T. cruzi* fue inhibida tanto con la mezcla de cumarinas (Figura 18) como con el compuesto mammea A/BA (Figura 19), comparando con los grupos control DMSO y DMEM que presentaron un 95.9-98.8% y 95.4-99.17% de movilidad respectivamente, y con los grupos control positivo NFX y BZ, cuya movilidad fue de un 6.33% y 10.23% respectivamente. Ambos fármacos utilizados a 100 µg/mL, por lo que la fracción 20 y la cumarina A/BA fueron más efectivas ya que inhibieron en un 50% la movilidad de los tripomastigotes en concentraciones mucho menores (7.14 µg/mL y 4 µg/mL, respectivamente) (Figuras 20 y 21).

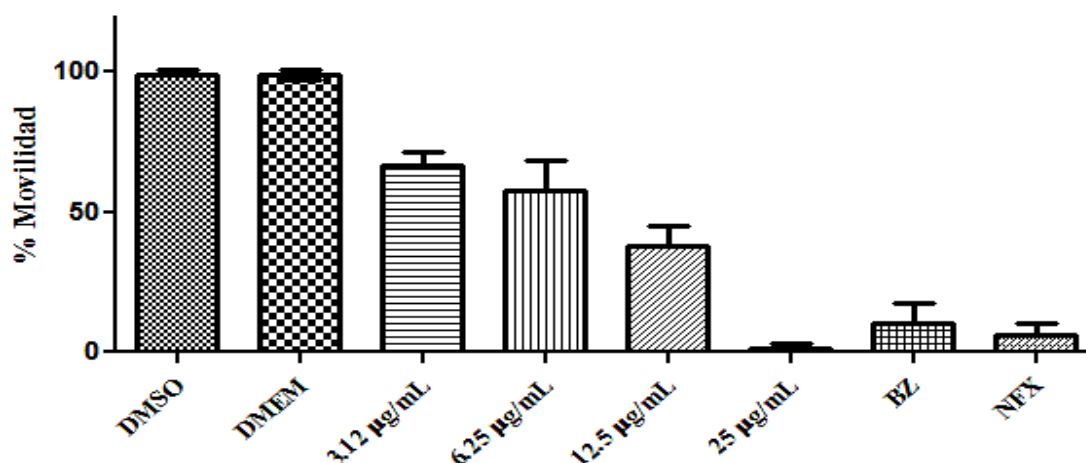


Figura 18: Actividad de cumarinas tipo mammea sobre tripomastigotes de la cepa Querétaro. Los resultados se expresan como el porcentaje de movilidad promedio ± DS de al menos tres experimentos independientes. BZ=Benznidazol, NFX= Nifurtimox.

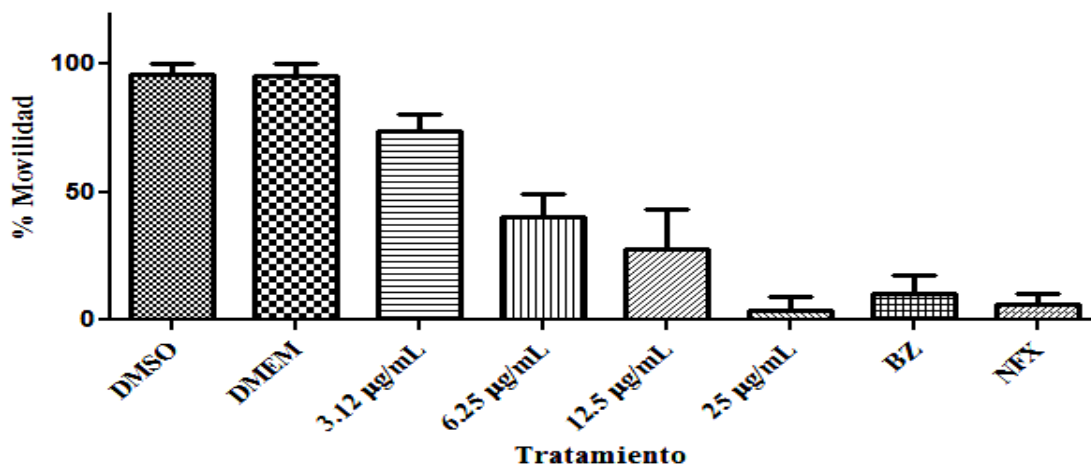


Figura 19: Actividad de la cumarina mammea A/BA contra tripomastigotes de la cepa Querétaro. Los resultados se expresan como el promedio de los porcentajes de movilidad \pm DS de al menos tres experimentos independientes. BZ=Benznidazol, NFX= Nifurtimox.

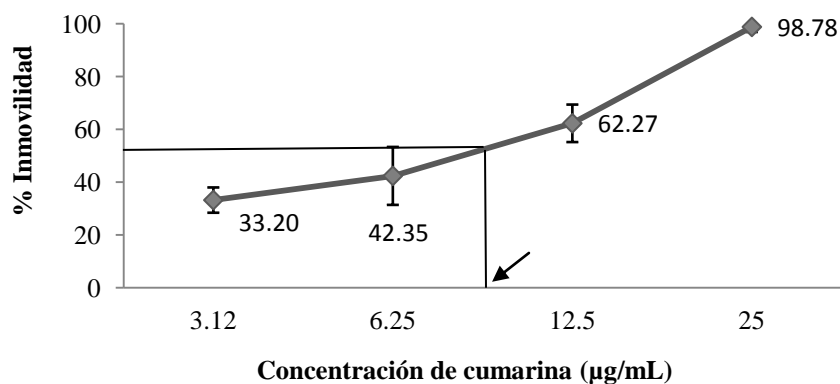


Figura 20: Curva dosis-respuesta de cumarinas tipo mammea sobre la movilidad de tripomastigotes. La flecha indica la CIM₅₀ calculada (7.14 µg/mL). Los resultados se expresan como el porcentaje de inmovilidad promedio \pm DS.

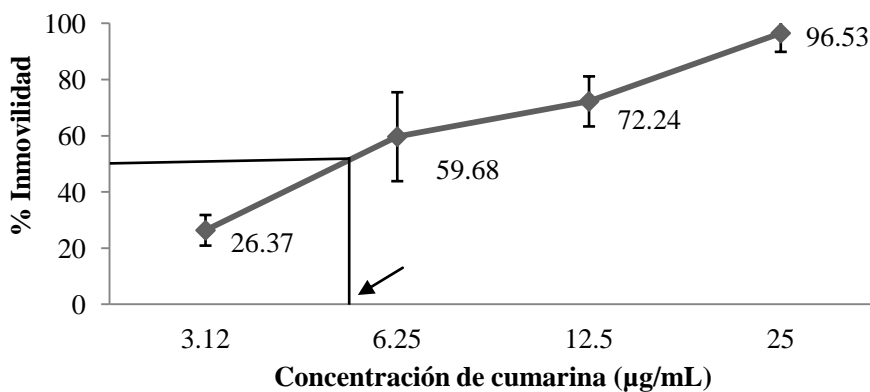


Figura 21. Curva dosis-respuesta de la cumarina mammea A/BA sobre la inmovilidad de tripomastigotes, la flecha indica la CIM₅₀ calculada (4µg/mL). Los resultados se expresan como el promedio de los porcentajes de inmovilidad \pm DS de al menos tres experimentos independientes.

7.2.3. Recuperación del crecimiento de parásitos tratados con cumarinas.

Para determinar si el efecto sobre la movilidad de los parásitos, era irreversible afectando su cinética de crecimiento, decidimos evaluar el porcentaje de recuperación de los epimastigotes después de ser expuestos con diferentes tratamientos. Se utilizó el estadio de epimastigote debido a que estos tienen capacidad de replicación.

La evaluación de este parámetro se realizó inicialmente con epimastigotes de la cepa Ninoa, tras haber sometido durante tres horas a los parásitos con diferentes concentraciones de la fracción 20 (3.12-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), el fármaco de referencia benznidazol (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como control positivo, el vehículo DMSO 1% y medio LIT como controles negativos; transcurrido este tiempo los parásitos de cada tratamiento se lavaron con PBS y un número igual de parásitos ($0.5 \times 10^6/\text{mL}$) se resembró en medio LIT fresco. La afectación de la cinética de crecimiento de los parásitos se determinó contando su número cada dos días durante 8 días.

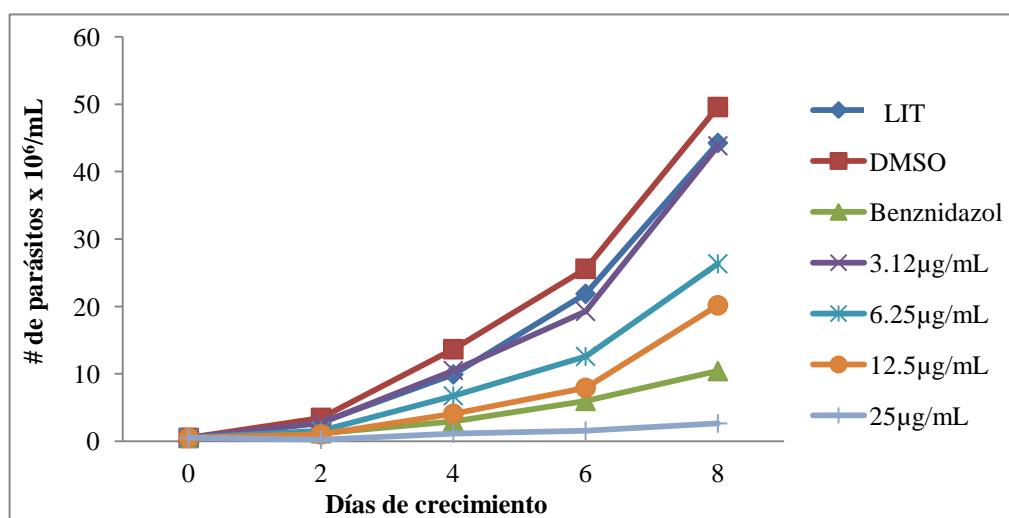


Figura 22. Cinética de crecimiento de epimastigotes de la cepa Ninoa, después de su exposición con diferentes tratamientos.

Como lo muestra la figura 22, la fracción 20 afectó negativamente la capacidad de recuperación de crecimiento del parásito. Este efecto fue dependiente de la concentración, pues la cantidad de parásitos contados fue menor a las concentraciones más altas de esta fracción. El benznidazol (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mostró menor efectividad que la fracción 20 a una concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El número de parásitos en los grupos control LIT y DMSO a partir de los 4, 6 y 8 días post-tratamiento osciló entre 12.5, 24 y 47 millones de parásitos/mL. En el grupo benznidazol, encontramos cerca de 4, 6 y 8 millones de parásitos/mL, y en la fracción 20 a una concentración de 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, encontramos cerca de 7, 13 y 26 millones de epimastigotes/mL y cerca de 2, 8 y 10 millones/mL a una concentración de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 22).

Con lo anterior determinamos que tanto la mezcla de cumarinas, como el benznidazol, si afectaron la cinética de duplicación o recuperación del crecimiento de los epimastigotes, reduciendo el número de estos con respecto a los grupos control no tratados con ningún fármaco (Medio LIT y DMSO). Pero además, la mezcla de cumarinas, resultó ser más activa que el benznidazol ya que esta última, utilizada a una concentración cuatro veces menor que este fármaco (25 µg/mL) redujo aún más el número de epimastigotes a los diferentes días post-tratamiento (Figura 22).

En base a lo anterior, decidimos evaluar también la recuperación del crecimiento de epimastigotes de las cepas Querétaro y Ver6, después de ser tratados con las mismas concentraciones de la fracción 20 y benznidazol. Para estos ensayos contamos únicamente el número de parásitos después de los 4 días post-exposición, considerando que este es el tiempo en el que los epimastigotes suelen llegar a la fase logarítmica de crecimiento, por lo que la densidad de parásitos en los grupos control y tratados a este tiempo sería suficiente para calcular el porcentaje de inhibición de crecimiento (P.I) en cada tratamiento evaluado (Tabla 9).

Tabla 9. Efecto de la fracción 20 sobre el crecimiento de epimastigotes de tres cepas de *T. cruzi*.

Cepa		LIT	DMSO	3.12 µg/mL	6.25 µg/mL	12.5 µg/mL	25 µg/mL	BZ 100 µg/mL
Ninoa	P. I	23.4	2.03	21.93	53.4	68.3	92.47	92.04
Querétaro	P. I	20.84	3.67	20.20	32.12	44.61	78.07	80.2
Ver 6	P. I	19.42	1.2	28.7	40.58	47.36	59.94	70.38

P.I: Porcentaje de inhibición de crecimiento calculado en cada condición

En todos los ensayos realizados, el número de parásitos determinado en los cultivos tratados con DMSO fue considerado el 100% del crecimiento y como se puede apreciar en la figura 23, el porcentaje de crecimiento (%C) obtenido para cada una de las cepas de *T. cruzi*, demuestra que la afectación del mismo se realizó de manera dosis-dependiente, es decir mientras mayor fue la concentración de cumarinas, menor fue el porcentaje de duplicación o recuperación de crecimiento de los parásitos tratados, con respecto a los grupos control (LIT y DMSO).

Se muestra también que en todos los casos existe diferencia significativa con respecto al porcentaje de inhibición de crecimiento de los epimastigotes tratados con el fármaco benznidazol (100µg/mL), ya que este mostró un porcentaje de crecimiento 7.96%, 19.8% y 29.62%, para las cepas Ninoa, Querétaro y Ver6, respectivamente, observándose una afectación diferencial sobre el crecimiento de cada una de las cepas, al ser tratadas con este fármaco, siendo la cepa Ninoa, la que presentó mayor afectación pues el porcentaje de inhibición (P.I) fue mayor en comparación con Querétaro y Ver 6 (Tabla 9).

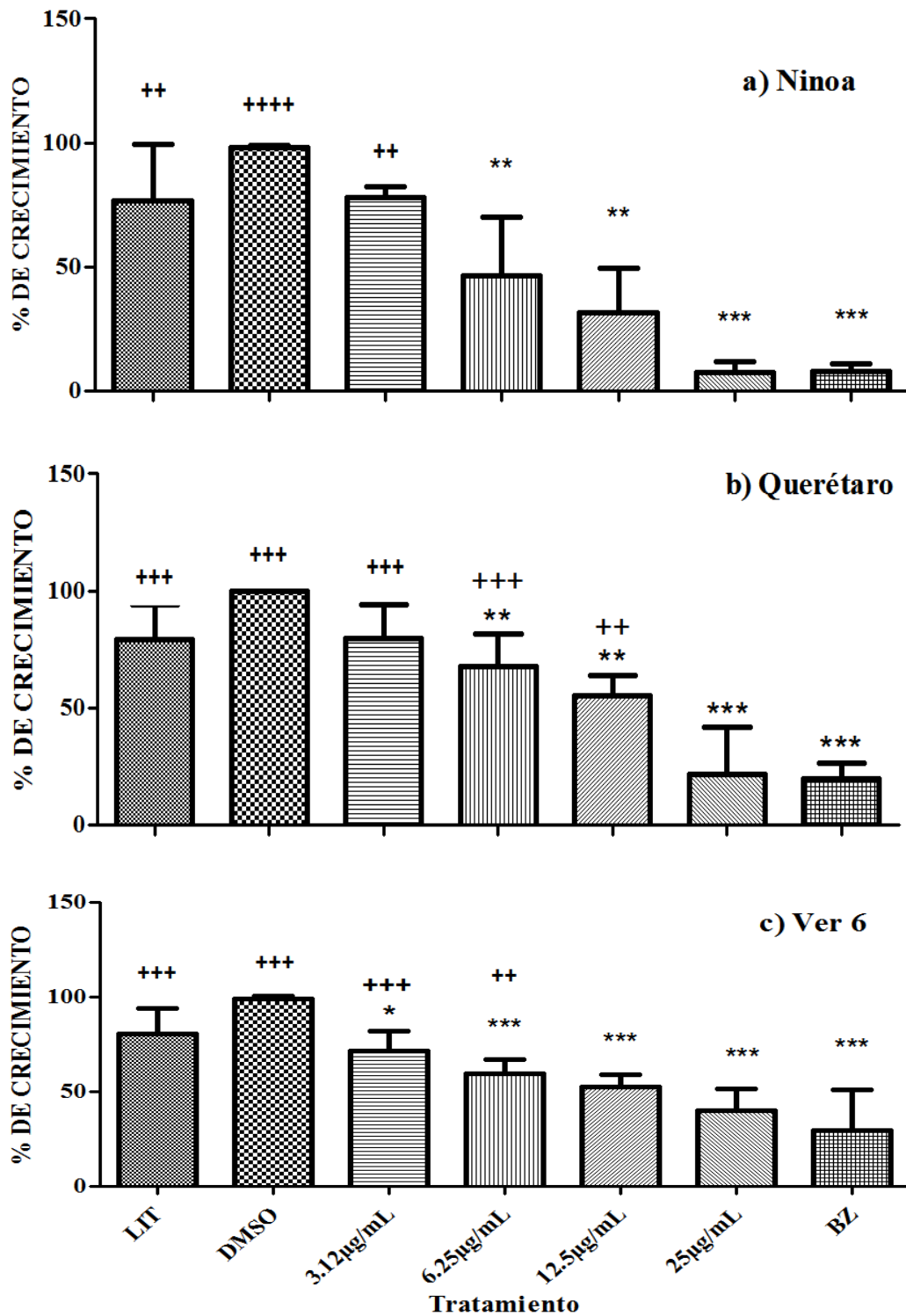


Figura 23. Porcentaje de recuperación de crecimiento de epimastigotes de tres cepas mexicanas de *T. cruzi*. Después de ser tratados durante 3 horas con diferentes concentraciones de mammea A/BA+A/BB+A/BD, benznidazol (BZ=100µg/mL), vehículo DMSO y medio LIT. Los datos representan el promedio \pm DS de al menos tres experimentos independientes. Se aplicó, una prueba estadística ANOVA de una vía y Post prueba de Tukey, donde * $P < 0.0001$, DMSO y + $P < 0.0001$, Benznidazol.

Un comportamiento similar se presentó al calcular la concentración inhibitoria media de crecimiento (CIC₅₀) de mezcla de cumarinas para cada cepa (Tabla 10), la cual se determinó por el método de regresión lineal simple de las curvas dosis-respuesta, hecha con los porcentajes de crecimiento (%C) calculados en cada una de las concentraciones utilizadas de la fracción 20 con cada cepa.

Tabla 10: Concentración de la fracción 20 determinada para inhibir el 50% del crecimiento de tres cepas mexicanas de *T. cruzi* en fase epimastigote.

Cepa	Ninoa	Querétaro	Ver6
CIC ₅₀ (µg/mL)	6.92 ± 2.274 *	12.5 ± 1.340	14.3 ± 1.970 **

Se representa el promedio ± DS de las CIC₅₀ calculadas en por lo menos tres experimentos independientes realizados por duplicado para cada cepa. La diferencia significativa se calculó realizando una prueba de comparación múltiple (Tukey's multiple comparisons test) (Ninoa vs Querétaro, *p<0.0001) y (Ninoa vs Ver6, **p<0.0001).

Como lo muestra la Tabla 10, el crecimiento de los epimastigotes de cada cepa, mostró diferencias. La cepa Ninoa fue más susceptible a las cumarinas, debido a que la CIC₅₀ calculada fue mucho menor que para la cepa Querétaro. Por otro lado, la cepa Ver 6 fue más resistente que Ninoa y Querétaro, pues se necesitó mayor cantidad de compuesto para afectar su crecimiento.

7.2.4 Efecto de cumarinas tipo mammea sobre la morfología de los parásitos

7.2.4.1. Morfología de epimastigotes

La afectación de la movilidad en el estadio epimastigote de las tres cepas de *T. cruzi* tratadas con una mezcla de cumarinas durante 3 horas, estuvo relacionada con la presencia de alteraciones morfológicas, las cuales fueron observadas en preparaciones en fresco con un microscopio invertido.

Como se aprecia en la Figura 24, los parásitos presentaron una forma esferoide, estática, sin flagelo y con numerosas vacuolas en el citoplasma, además en algunos casos se observó la presencia de parásitos con cuerpo contorsionado y anormal después de ser incubados con las diferentes concentraciones de fármaco (Figuras 25, c y d), estas afectaciones contrastaron fuertemente con los parásitos control tratados con DMSO e incubados con medio LIT, los cuales presentaron la forma de huso característica de *T. cruzi* con un flagelo terminal bien definido (Figura 24, a y b).

En cada cepa la afectación de la morfología fue diferente. Nuevamente, la cepa Ninoa fue la más afectada, ya que desde la concentración más baja (3.12 µg/mL) los parásitos presentaban reducción del tamaño celular, forma redondeada y vacuolización (Figura 25, a). En contraste, los parásitos de las cepas Querétaro y Ver6 comenzaron a contraerse y redondearse a partir de la

concentración de 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente (Figura 25, b y c); aunque algunos parásitos aún presentaban el flagelo a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, esta concentración produjo el 100% de parásitos redondeados e inmóviles, pues estos estaban estáticos al momento de las observaciones en fresco con un hemocitómetro (Figura 25, d). La exposición de los parásitos con benznidazol, también provocó la presencia de parásitos con forma globosa, vacuolización citoplásmica y ausencia de flagelo, pues dicha estructura no fue visible en el cuerpo de la mayoría de los parásitos, los cuales además formaron cúmulos celulares al observar directamente el cultivo (Figura 24, c).

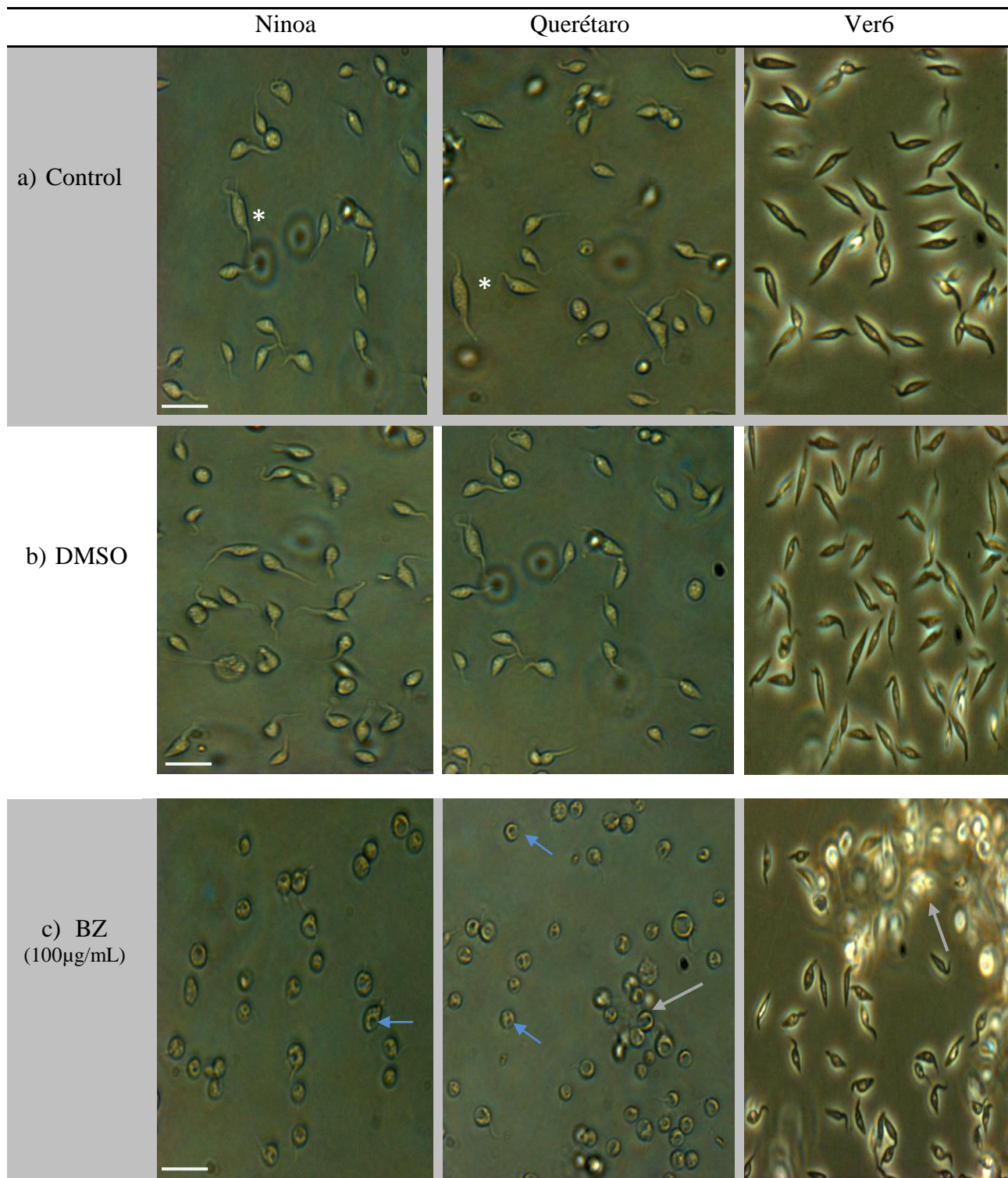


Figura 24. Morfología de epimastigotes de tres cepas mexicanas de *T. cruzi* observada con microscopio invertido (40x). (A, B) Se muestran algunos parásitos en división (*), con flagelo terminal y la forma alargada de huso característica de este estadio del parásito. C) Se muestran parásitos tratados con benznidazol durante 3 horas, algunos presentaron forma globosa, vacuolización citoplásmica (flecha azul), ausencia de flagelo y formación de cúmulos celulares (flecha gris). La barra indica 20 µm.

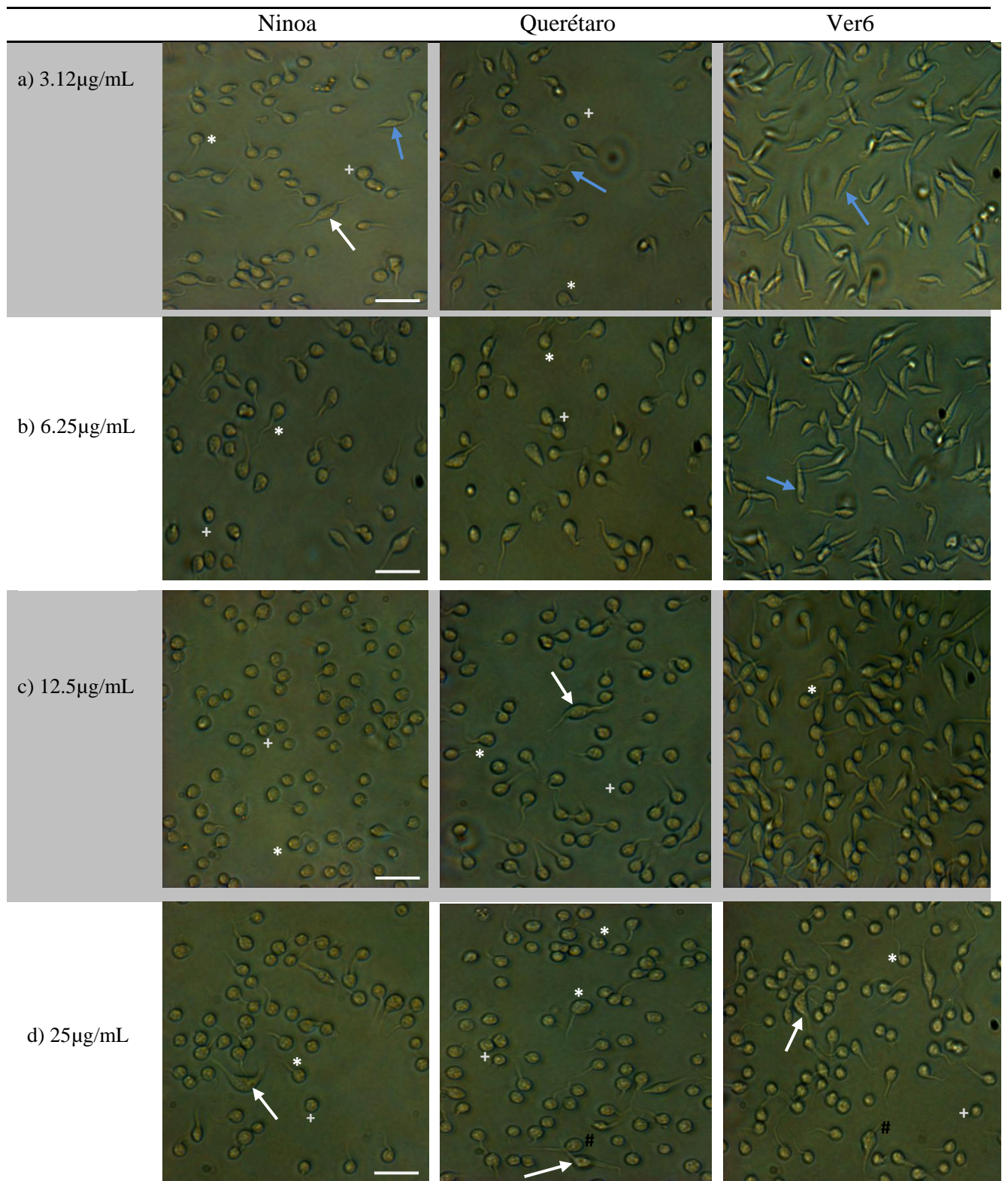


Figura 25. Cambios en la morfología de epimastigotes de tres cepas de *T.cruzi* después de su exposición con diferentes concentraciones de la fracción 20 durante 3 horas (40x). Se muestran parásitos con morfología normal (Flecha azul), forma globosa (hinchazón) (*), vacuolización citoplásmica, ausencia de flagelo (+) y la presencia de parásitos con cuerpo torcido y anormal (flecha blanca). Las fotografías mostradas son representativas de un mínimo de 3 experimentos independientes. Barra= 20 µm.

En las Figuras 26 y 27, se muestran microfotografías de parásitos teñidos con el colorante Giemsa y observados con un microscopio óptico. Los parásitos fueron cultivados durante 3 horas con diferentes tratamientos. Como puede observarse, en condiciones normales (medio LIT) los parásitos se aprecian con su morfología típica de huso y con el núcleo y cinetoplasto en posiciones normales (Figura 26, a). Esta morfología fue idéntica en los parásitos tratados con el vehículo DMSO 1%, por lo que este disolvente orgánico no parece afectar a los parásitos (Figura 26, b).

Tras el tratamiento con benznidazol a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se puede apreciar un cambio evidente en la morfología de los parásitos, pues la mayoría de ellos presentaron un cuerpo contraído y redondeado, sin un flagelo evidente, algunos otros presentaron un cuerpo torcido y anormal, en ambos casos el núcleo y el cinetoplasto se encontraron en una posición distinta a la observada en condiciones normales, y la densidad del cinetoplasto se ve aumentada (Figura 26, c).

Por otro lado, en los parásitos sometidos a las diferentes concentraciones de la fracción 20 durante 3 horas, se pueden apreciar también cambios morfológicos importantes y diferenciales para cada una de las cepas de *T. cruzi*. Por ejemplo, en la Figura 27, a; se muestran parásitos tratados con una concentración de 3.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cumarinas, y como puede observarse a esta concentración, en las cepas Ninoa y Querétaro comienzan a aparecer parásitos con un cuerpo contraído y redondeado sin flagelo evidente (Figura 27, a, Ninoa). Algo similar ocurre en los parásitos de la cepa Querétaro, los cuales se observaron con un ensanchamiento en la parte contraria al flagelo, siendo este ligeramente visible (Figura 27 a, Querétaro). No obstante, en la cepa Ver6, a esta concentración, no se observaron cambios morfológicos evidentes (Figura 27, a, Ver6) con respecto a los parásitos control (Figura 27, a y b, Ver6).

Cabe destacar que conforme la concentración de cumarinas aumenta, los parásitos con cambios morfológicos notables también; siendo más evidentes a las concentraciones mayores de 12.5 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pues como se puede apreciar en los parásitos tratados con estas concentraciones, la forma típica de epimastigote desaparece, pues estos reducen su tamaño y ensanchan su cuerpo, adquiriendo una forma globosa, en la que el flagelo no es completamente visible y el núcleo y cinetoplasto se encuentran en una posición y densidad anormal (Figura 27, c). Otros parásitos se notan con una forma alargada pero con un aspecto deforme con cuerpo torcido o contorsionado, similar a lo observado con benznidazol (Figura 27, d).

Tanto en las cepas Ninoa y Querétaro, desde una concentración de 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se presentaron parásitos con forma atípica, pero cuando los epimastigotes de ambas cepas se incubaron con 12.5 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la gran mayoría de los parásitos adquirió una forma redondeada con núcleo y cinetoplasto no bien definidos, estos cambios también fueron observados en parásitos de la cepa Ver6, pero no se presentó la deformación de la totalidad de los parásitos como en las cepas anteriores, pues en algunos casos aún se encontraron parásitos con morfología normal (Figura 27, Ver 6), sin embargo en los parásitos que adquirieron una forma redondeada, se presentó la formación de cúmulos de parásitos (Figura 27, c, Ver6), similar a lo observado en epimastigotes tratados con benznidazol y observados en preparaciones en fresco (Figura 26, c, Ver6).

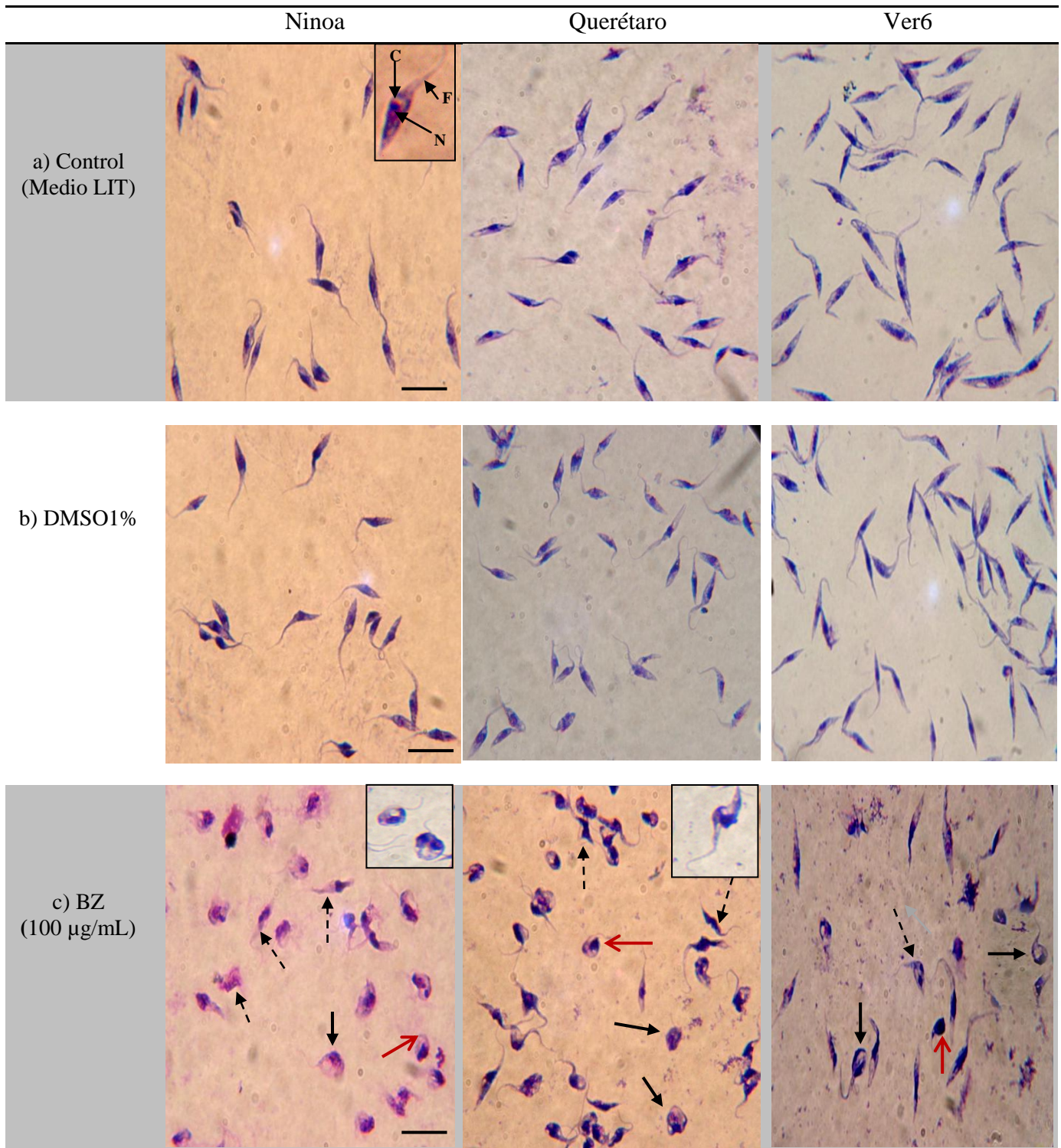


Figura 26. Morfología de epimastigotes de tres cepas mexicanas de *T. cruzi* observada con microscopio óptico (100x). (A y B) Muestra parásitos control con una morfología típica (recuadro), donde se señalan con una flecha el núcleo (N), el cinetoplasto (C) y el flagelo (F). (C) Muestra epimastigotes de las tres cepas tratadas con benznidazol (BZ), donde se señala con una flecha negra a los parásitos que encogieron y ensancharon su cuerpo, adquiriendo una apariencia redondeada y con una flecha discontinua aquellos parásitos con cuerpo torcido y anormal (recuadros), en ambas formas el cinetoplasto se observa más denso (flecha roja). Las fotografías son representativas de un mínimo de 3 experimentos independientes. Barra= 20 µm

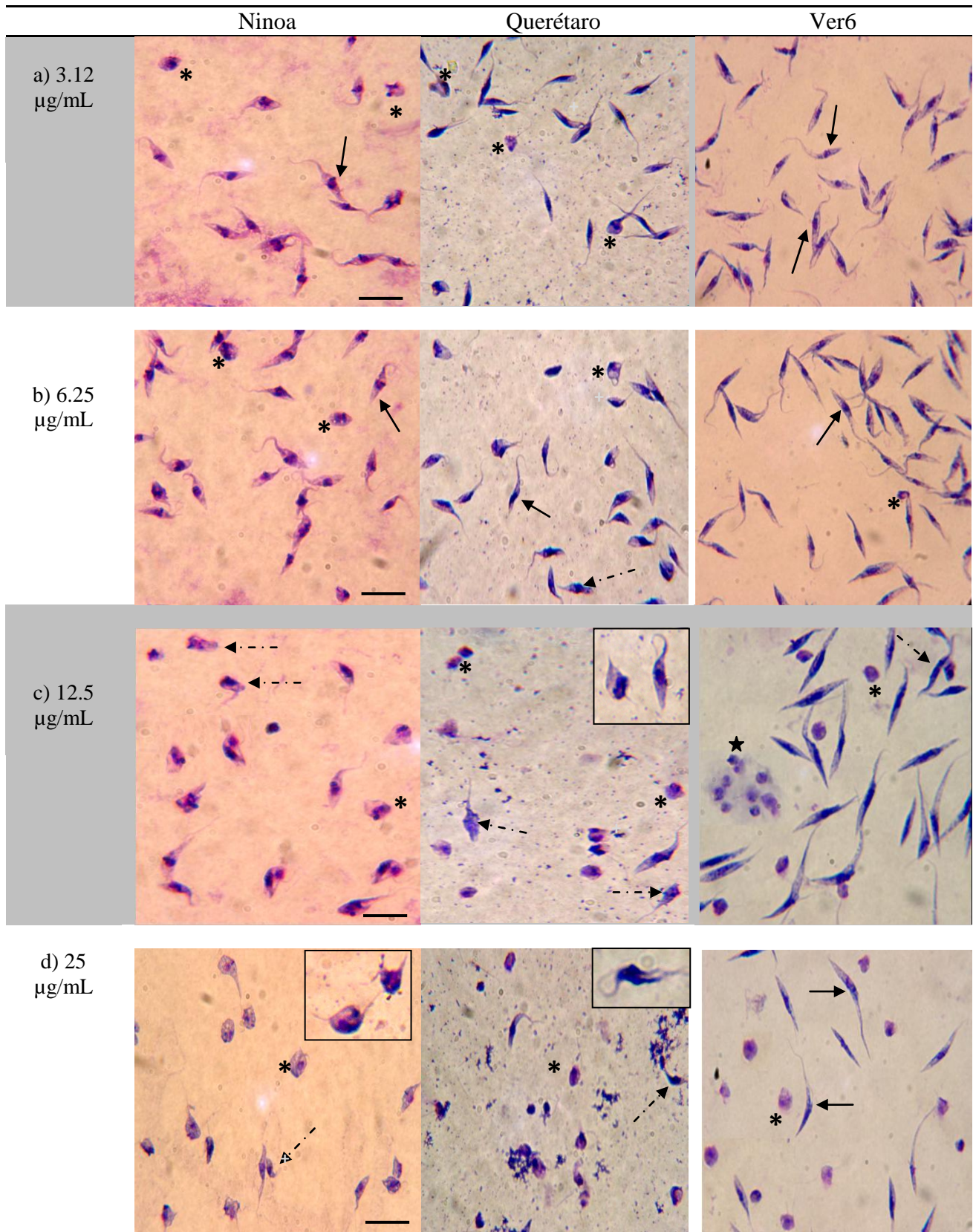


Figura 27. Morfología de epimastigotes de tres cepas mexicanas de *T. cruzi* tratados con diferentes concentraciones de la Fracción 20 y observada con Microscopio óptico (100x). Se muestran algunos parásitos con una morfología típica cuyo núcleo, cinetoplasto y flagelo están bien definidos (flecha negra). Y epimastigotes con forma redondeada (*), reducción de tamaño (recuadro, c), alargados con cuerpo contorsionado (flecha discontinua) (recuadro, d) y cúmulos de parásitos redondeados (estrella). Las fotografías son representativas de un mínimo de 3 experimentos independientes. Barra= 20 μm

7.2.4.2. *Morfología de tripomastigotes*

El efecto de la mezcla de cumarinas tipo mammea y del compuesto mammea A/BA, se evaluó de la misma manera que para los epimastigotes, es decir, mediante la observación de preparaciones frescas y permanentes bajo la luz de un microscopio.

Las micrografías de los parásitos expuestos con una mezcla de cumarinas (fracción 20) son mostradas en la Figura 28 y los parásitos expuestos a diferentes concentraciones de mammea A/BA se muestran en la Figura 29. Como puede observarse, en condiciones control (DMEM y DMSO) los parásitos presentaron su morfología típica de tripomastigote, siendo alargados y delgados, con un cinetoplasto localizado en la parte posterior a un núcleo central y un flagelo libre que inicia en la parte posterior del parásito, y emerge libre en el extremo anterior, formando una membrana ondulante que recorre toda la longitud de la célula. Al igual que en el estadio de epimastigote, los tripomastigotes tratados con los fármacos de referencia y con las cumarinas tipo mammea, revelaron notables cambios morfológicos.

Por ejemplo, en los parásitos tratados con benznidazol (BZ) y nifurtimox (NFX), ambos a una concentración de 100 µg/mL, se distinguieron parásitos con una reducción del tamaño celular en comparación con los parásitos control, presencia de parásitos redondeados sin flagelo evidente, intensa vacuolización citoplásmica, distinguida como una gran cantidad de puntos huecos dentro del cuerpo del parásito (Figura 28, recuadro, BZ) y formación de agregados celulares (Figura 28, flecha discontinua en NFX y BZ,).

Por otro lado, en los parásitos tratados con las diferentes concentraciones, tanto de la fracción 20 como de mammea A/BA, se pudieron distinguir tripomastigotes que mostraron cambios en el tamaño y forma de las células, mostrando un encogimiento celular y redondeo sin núcleo y cinetoplasto bien definidos, hinchazón y vacuolización citoplásmica múltiple, similar a lo encontrado en parásitos tratados con benznidazol, flagelo reducido o ausente y presencia de formas globosas con daños en la membrana plasmática debido a la liberación de contenido celular (Figuras 28 y 29).

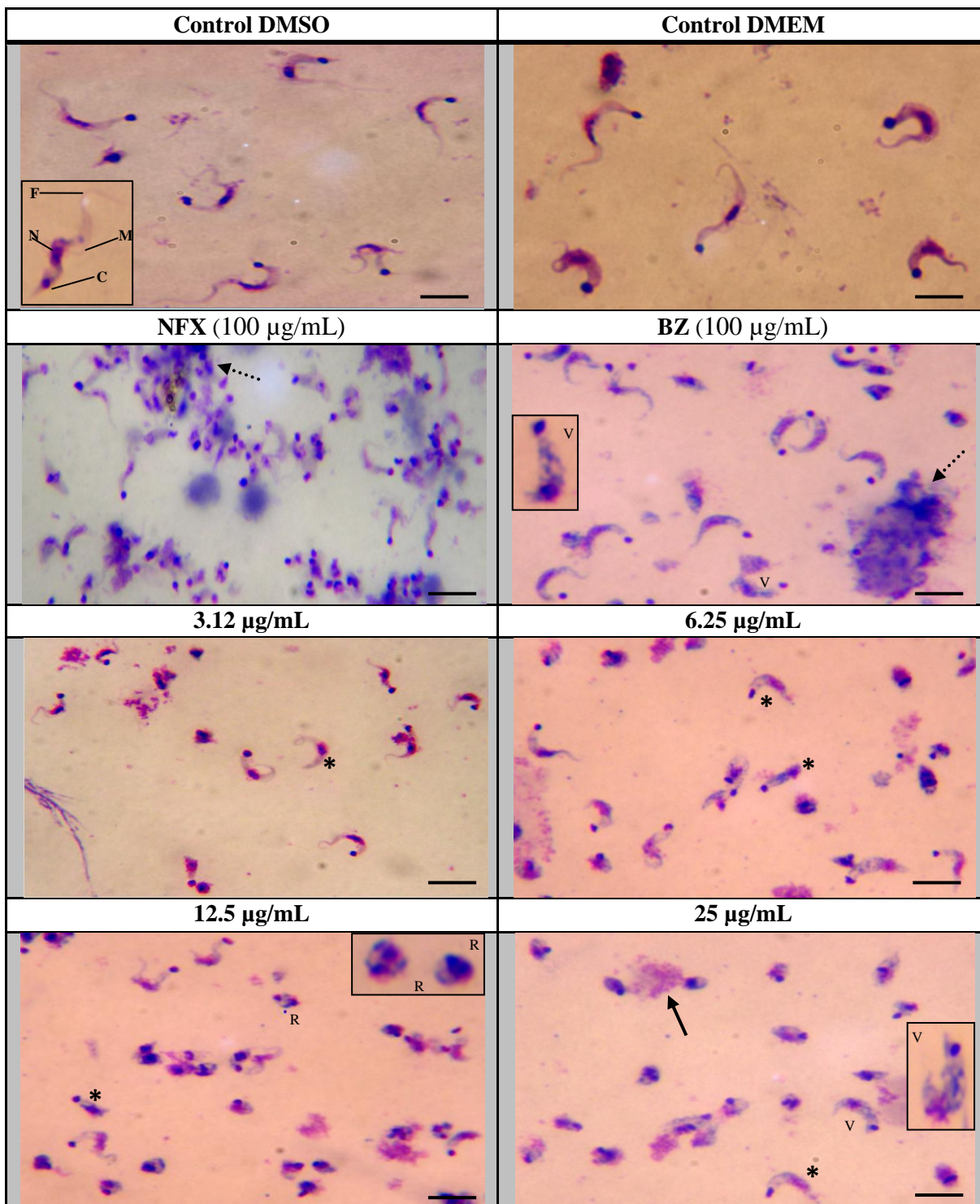


Figura 28. Morfología de tripomastigotes de *T. cruzi* expuestos durante 3 horas a diferentes concentraciones de la Fracción 20 y observada con Microscopio óptico (100x). En la condición control (DMSO y DMEM) se muestran tripomastigotes con una morfología típica alargada, donde se señalan el núcleo (N), cinetoplasto (C), flagelo (F) y membrana ondulante (M). En cada microfotografía se anota el tratamiento utilizado y se muestran alteraciones morfológicas como disminución de tamaño, recondeo (R), vacuolización (V), pérdida de contenido celular (flecha negra), flagelo reducido o ausente (*) y formación de agregados celulares (flecha discontinua). Las fotografías son representativas de un mínimo de 3 experimentos independientes. Barra=10µm.

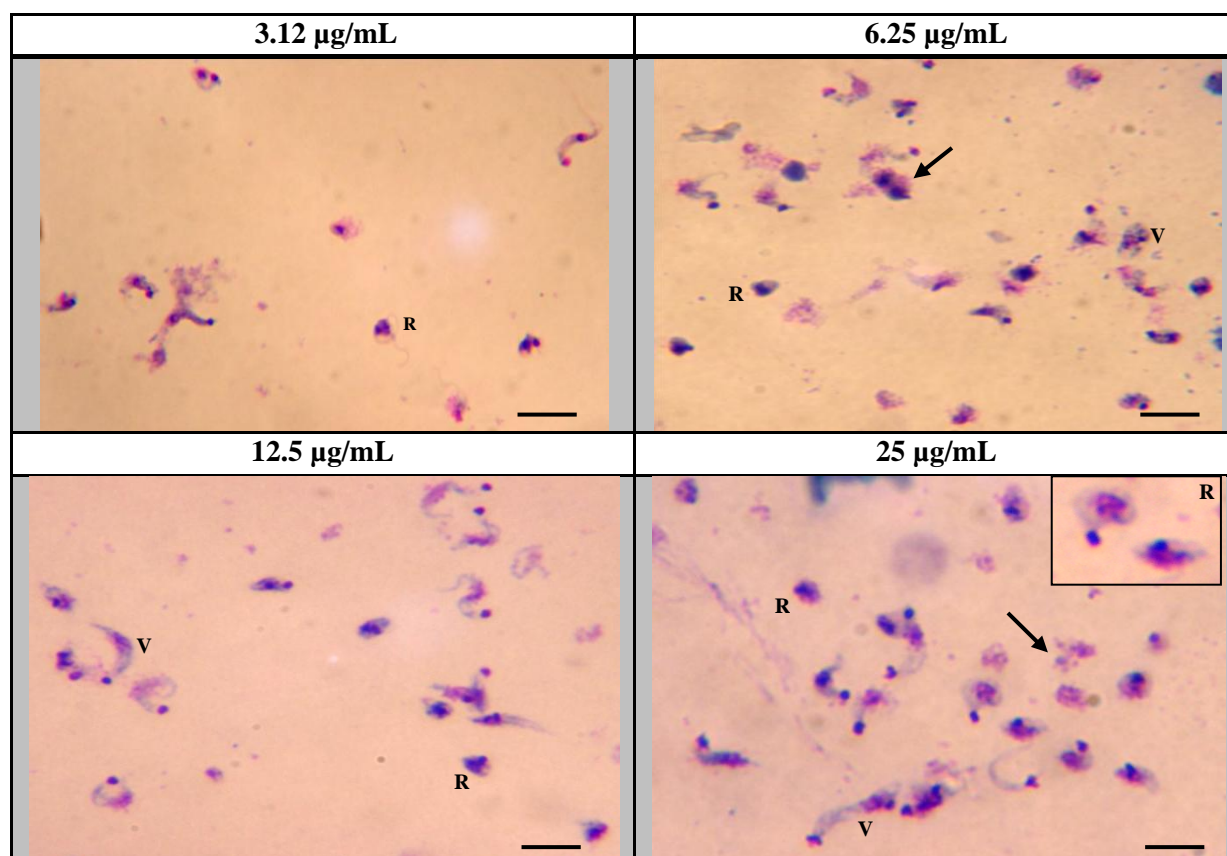


Figura 29. Morfología de tripomastigotes de *T. cruzi* observados con Microscopio óptico después de ser expuestos durante 3 horas a diferentes concentraciones de mammea A/BA y (100x). En cada microfotografía se anota el tratamiento utilizado y se muestran alteraciones morfológicas como recondeo (R), vacuolización (V) y pérdida de contenido celular (flecha negra). Las fotografías son representativas de un mínimo de 3 experimentos independientes. Barra=10 μm

7.2.5. Ultraestructura de epimastigotes tratados con cumarinas tipo mammea

Con base en los resultados del efecto de las cumarinas tipo mammea A/BA+A/BB+A/BD (6:3:1) sobre la morfología de epimastigotes y tripomastigotes y al efecto de la Mammea A/BA sobre la morfología de tripomastigotes de la cepa Querétaro, se decidió realizar un análisis ultraestructural de los epimastigotes tratados con estos compuestos utilizando microscopía electrónica de transmisión (MET) para identificar los cambios ocurridos en el interior de los parásitos.

En la Figura 30 a y b, se muestran micrografías electrónicas de epimastigotes control incubados en presencia de DMSO al 1%. En estos parásitos se observa una membrana celular íntegra, morfología típica alargada de este estadio del parásito con un flagelo terminal emergiendo de la bolsa flagelar localizada en la parte anterior del parásito, el cinetoplasto se aprecia dentro de la mitocondria con una densidad y estructura típica, el núcleo se encontró claramente delimitado por una membrana nuclear continua y con un nucléolo central y esférico con cromatina compacta,

también se observó la presencia de reservosomas, organelos esféricos delimitados por una única membrana y característicos de la fase epimastigote.

En el caso de los parásitos tratados con la fracción 20 a una concentración de 5.45µg/mL, que fue la concentración que inhibió en un 50% la movilidad de los parásitos de la cepa Querétaro en fase epimastigote; se distinguieron distintos tipos de alteraciones subcelulares en comparación con los parásitos control. Estas alteraciones fueron: evidente ensanchamiento del cuerpo (redondeo) (Figura 30, C, D), fragmentación nuclear con condensación anormal de la cromatina (cariorrésis) (Figura 30, C y F), pérdida de la integridad del nucléolo (Figura 30, H-I), presencia de numerosas vacuolas de doble membrana con contenido citoplasmático en su interior (Figura 30, D-G) y ligera deformación de la membrana mitocondrial que delimita al cinetoplasto (Figura 30, G y H).

Para el caso de los parásitos expuestos con la cumarina mammea A/BA, se decidió analizar la ultraestructura de los epimastigotes tratados con 4µg/mL, que fue la concentración que inhibió en un 50% la movilidad de los parásitos de la cepa Querétaro en fase tripomastigote después de las 3 horas de incubación, este compuesto a esta concentración no solo afectó la morfología y movilidad de los tripomastigotes (Figura 29), si no también provocó afectaciones en la ultraestructura celular de los epimastigotes, entre ellas: ensanchamiento del cuerpo (redondeo) (Figura 31, E), pérdida de la cromatina compacta (cariolisis) (Figura 31, C), condensación anormal de cromatina y deformación del núcleo (Figura 31, D, E y F), vacuolas de doble membrana con contenido citoplasmático en su interior (Figura 31, C, D, E y F) y ligera deformación de la membrana mitocondrial que delimita al cinetoplasto (Figura 31, F, C y G).

Debido a que habíamos determinado que la incubación de los parásitos con la fracción 20 durante 12 horas, afectaba de manera evidente la movilidad de los parásitos, provocando lisis total en algunos casos, nos preguntamos si el efecto ultraestructural inducido al incubar con 5.45 µg/mL de mezcla de cumarinas y 4 µg/mL de mammea A/BA durante un periodo largo de 12 horas era diferente a lo observado en los epimastigotes tratados con estas mismas condiciones pero incubados únicamente 3 horas.

Como lo esperábamos, la afectación ultraestructural de los parásitos incubados tanto con la mezcla de cumarinas tipo mammea como con la mammea A/BA durante 12 horas, fue mucho más pronunciada que lo observado a las 3 horas. Ya que en aquellos parásitos incubados con la mezcla durante 12 horas, se pudieron distinguir: deformación del cuerpo del parásito y pérdida de densidad citoplásmica más evidente que lo observado a las 3 horas (Figura 32, B-E), adelgazamiento (Figura 32, B, C, D) y deformación de la membrana plasmática formando pequeñas vesículas o ampollas exocitadas por la célula (Figura 32, C y E), pérdida de la continuidad de la membrana nuclear lo que llevó a la condensación anormal de cromatina (Figura 32, B-E), y a la desorganización del nucléolo (Figura 32, E), vacuolas de gran tamaño en el citoplasma (Figura 32, B, C y E), hinchazón mitocondrial y formación de vacuolas en el interior de este organelo, lo cual no se presentó en parásitos expuestos durante 3 horas (Figura 32, complejo K-m en C y E) y formación de autofagosomas (Figura 32, C y D).

Finalmente, cuando los parásitos se incubaron con 4 $\mu\text{g/mL}$ de la mammea A/BA durante 12 horas, las alteraciones más evidentes fueron las siguientes: evidente deformación del cuerpo del parásito y pérdida de densidad citoplásmica (Figura 33, B-H), adelgazamiento (Figura 33, flecha negra en C, D,G) y deformación de la membrana plasmática formando pequeñas vesículas o ampollas exocitadas por la célula (Figura 33, asterisco en D y H) así como ligero engrosamiento de la membrana en algunas regiones (Figura 33 B, D y E); condensación anormal de cromatina y pérdida de la continuidad de la membrana nuclear (Figura 33, C, D, E, F, H) retracción del núcleo y desorganización del nucléolo (Picnosis) (Figura 33, Flecha discontinua en G), vacuolas de gran tamaño en el citoplasma (V). Y al igual que en el los parásitos tratados con la mezcla se observó hinchazón mitocondrial con vacuolas en el interior de este organelo (Figura 33, complejo K-m en C y E) y la formación de autofagosomas (Figura 33, A). Estos últimos cambios fueron más distinguibles en los parásitos tratados con A/BA que con la mezcla de cumarinas.

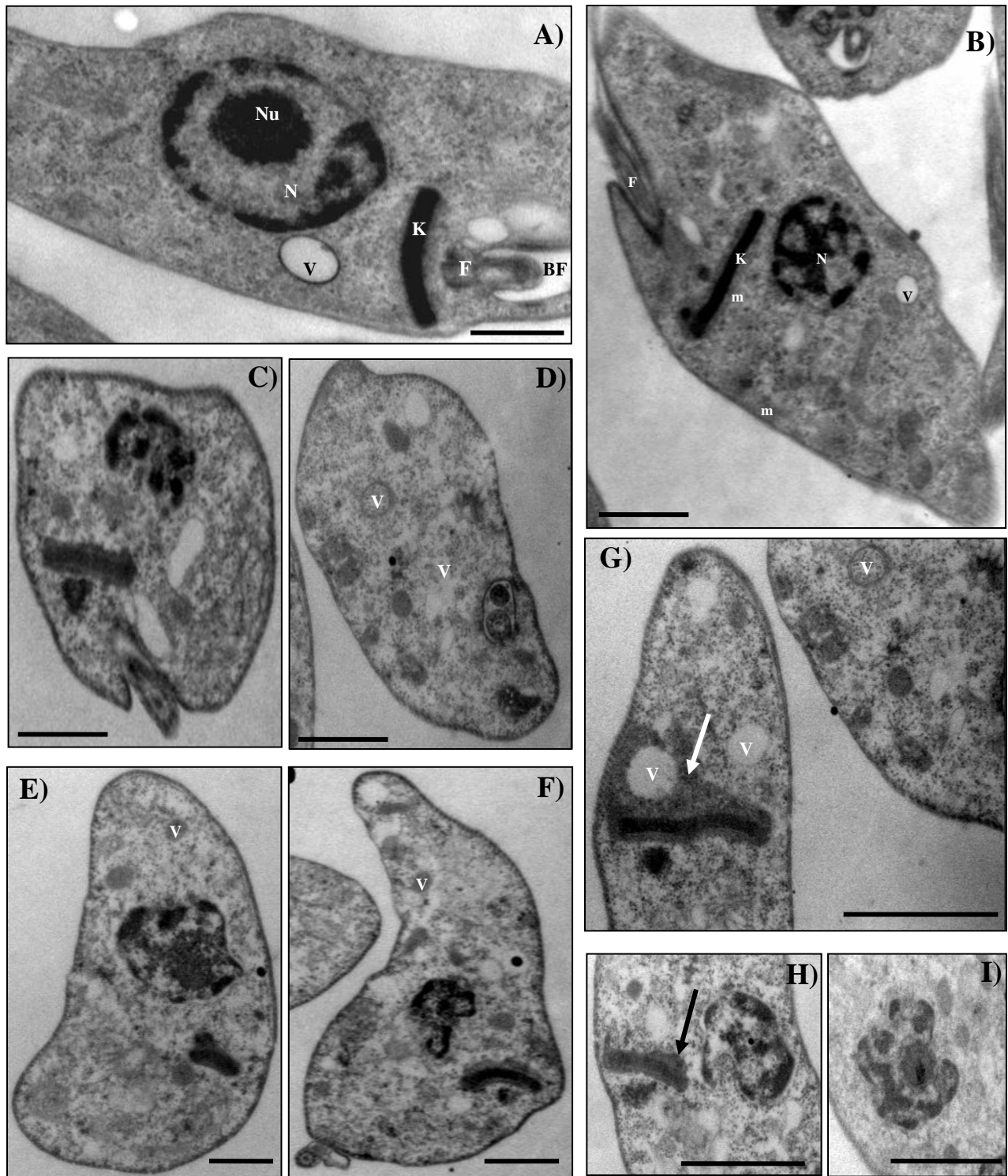


Figura 30. Micrografías electrónicas de epimastigotes de *T. cruzi* tratados con 5.45µg/mL de una mezcla de cumarinas tipo mammea (A/BA+ABB+A/DB) durante 3horas. (A y B) Parásitos en condiciones control DMSO 1%, exhibiendo una morfología normal, con presencia de reservosomas (R), arreglo y condensación típicos de la cromatina en el núcleo (N) y nucléolo (Nu), densidad citoplásmica normal, así como complejo cinetoplasto-mitocondria con una morfología típica (K-m). Parásitos tratados con cumarinas donde se observa ensanchamiento del cuerpo (redondeo) (C), condensación anormal de la cromatina en el núcleo (cariorrexis) (C, E, F) y pérdida de la integridad del nucléolo (H, I), numerosas vacuolas de doble membrana con contenido citoplásmico en su interior (V) (D, G) y ligera deformación de la membrana mitocondrial que delimita al cinetoplasto (flecha en G y H). Barra 1µm.

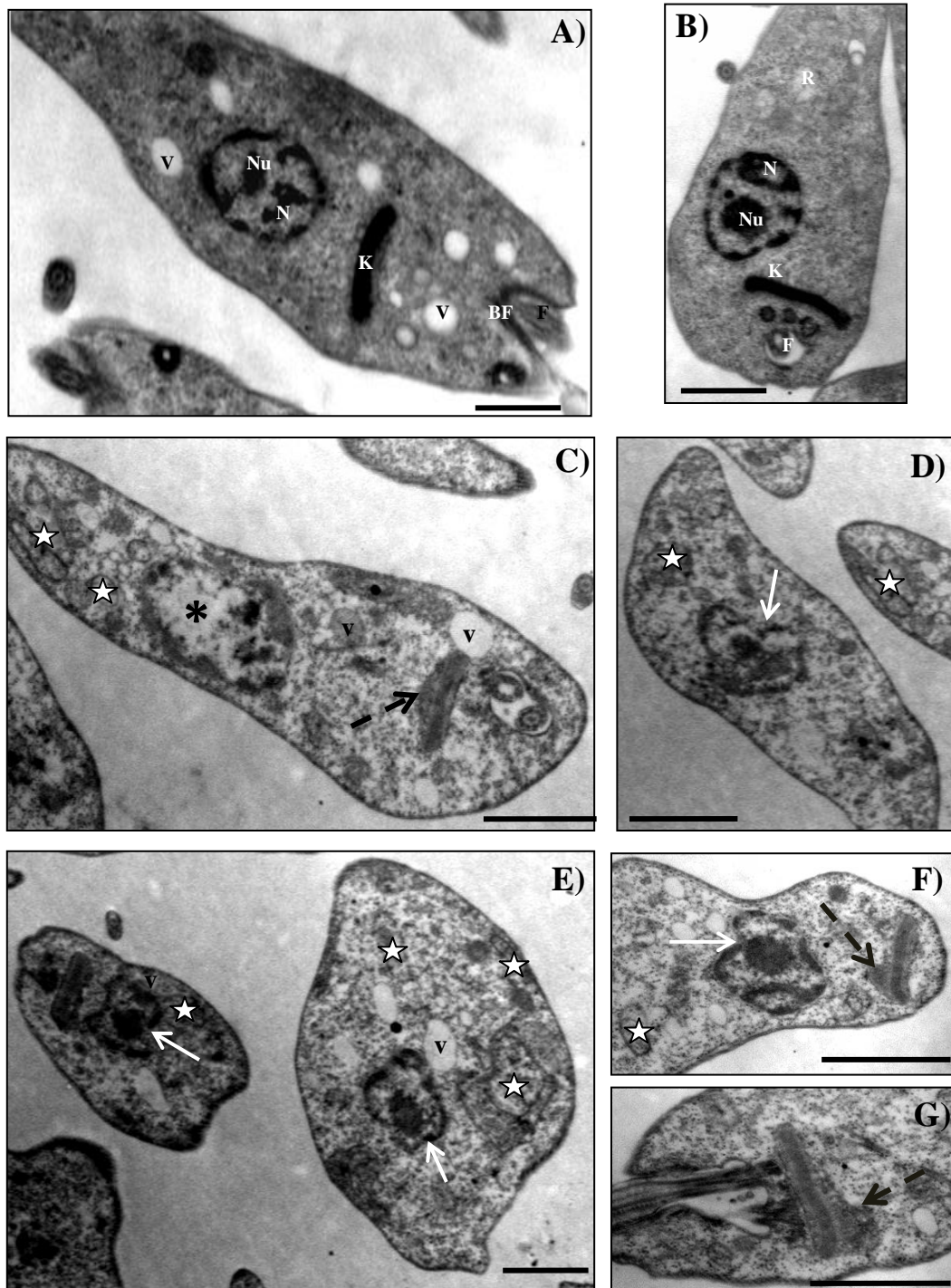


Figura 31. Micrografías electrónicas de epimastigotes de *T. cruzi* tratados con 4µg/mL de Mamea A/BA durante 3horas. (A y B) Parásitos control DMSO 1% con densidad citoplásmica y morfología normal, reservosomas (R), núcleo (N), nucléolo (Nu) y cinetoplasto con morfología típica (K). Parásitos tratados con cumarina donde se observa: ensanchamiento del cuerpo (redondeo) (E), pérdida de la cromatina compacta (asterisco en C), condensación anormal de cromatina y deformación del núcleo (flecha blanca en D, E y F), vacuolas con contenido citoplasmático en su interior (V), autofagosomas (estrella en C, D, E y F), ligera deformación de la membrana mitocondrial que delimita al cinetoplasto (flecha discontinua en F, C y G). Barra 1µm.

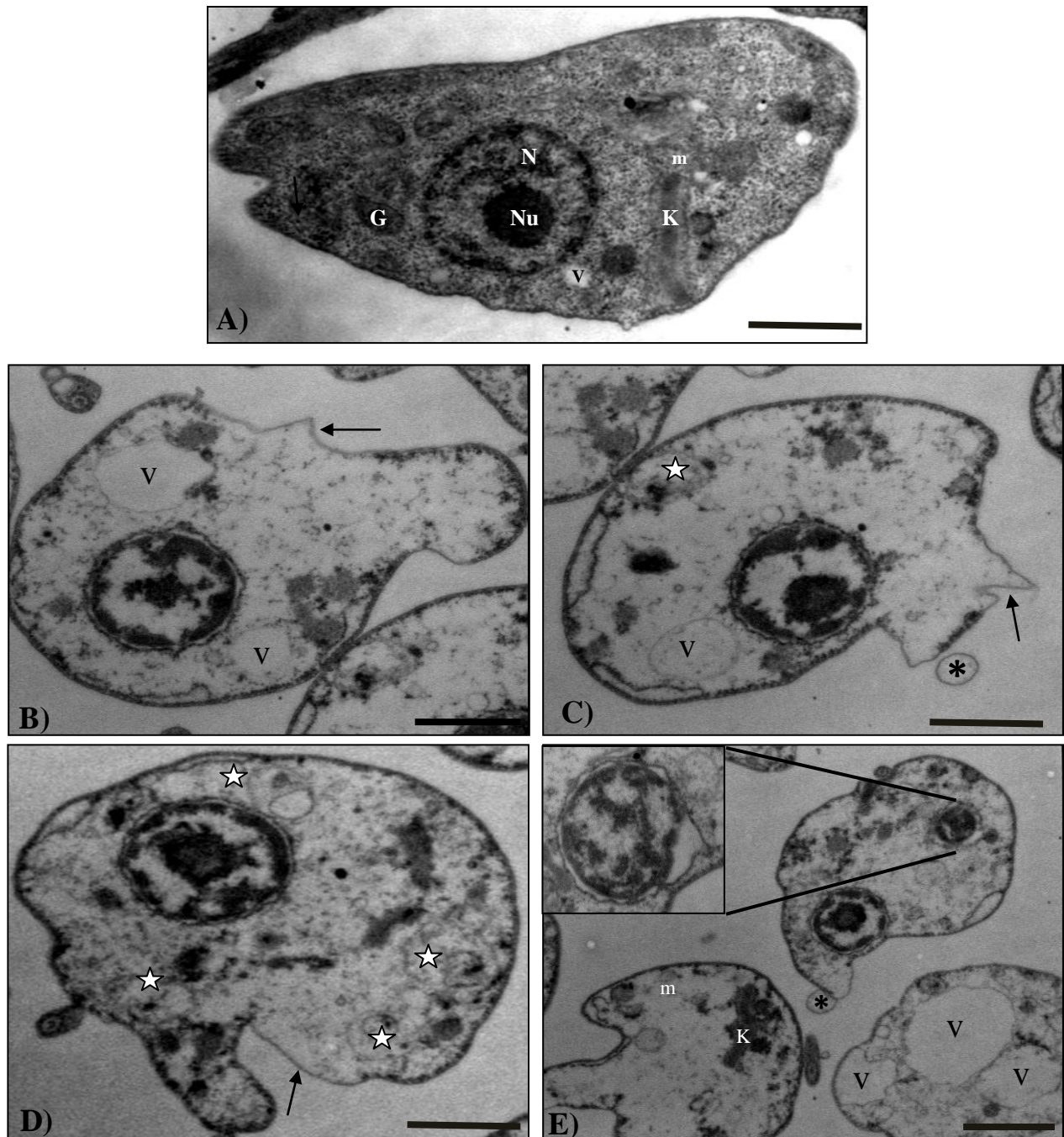


Figura 32. Micrografías electrónicas de epimastigotes de *T. cruzi* tratados con 5.45µg/mL de mezcla de cumarinas tipo mammea A/BA+A/BB+A/BD, durante 12 horas. (A) Parásitos control en medio LIT, con densidad citoplásmica y morfología normal, Glicosomas (G) y reservosomas (R), núcleo (N), nucléolo (Nu), complejo cinetoplasto-mitocondria con morfología típica (K-m). Parásitos tratados con cumarinas donde se observa: Evidente deformación del cuerpo del parásito y pérdida de densidad citoplásmica (B-E), adelgazamiento (flecha negra en B,C, D) y deformación de la membrana plasmática formando pequeñas vesículas o ampollas excitadas por la célula (asterisco en C y E), condensación anormal de cromatina (B-E), pérdida de la continuidad de la membrana nuclear y desorganización del nucléolo (recuadro en E), vacuolas de gran tamaño en el citoplasma (V en B, C, y E), hinchazón mitocondrial (complejo K-m en E) y autofagosomas (Estrella en C y D). Barra 1µm.

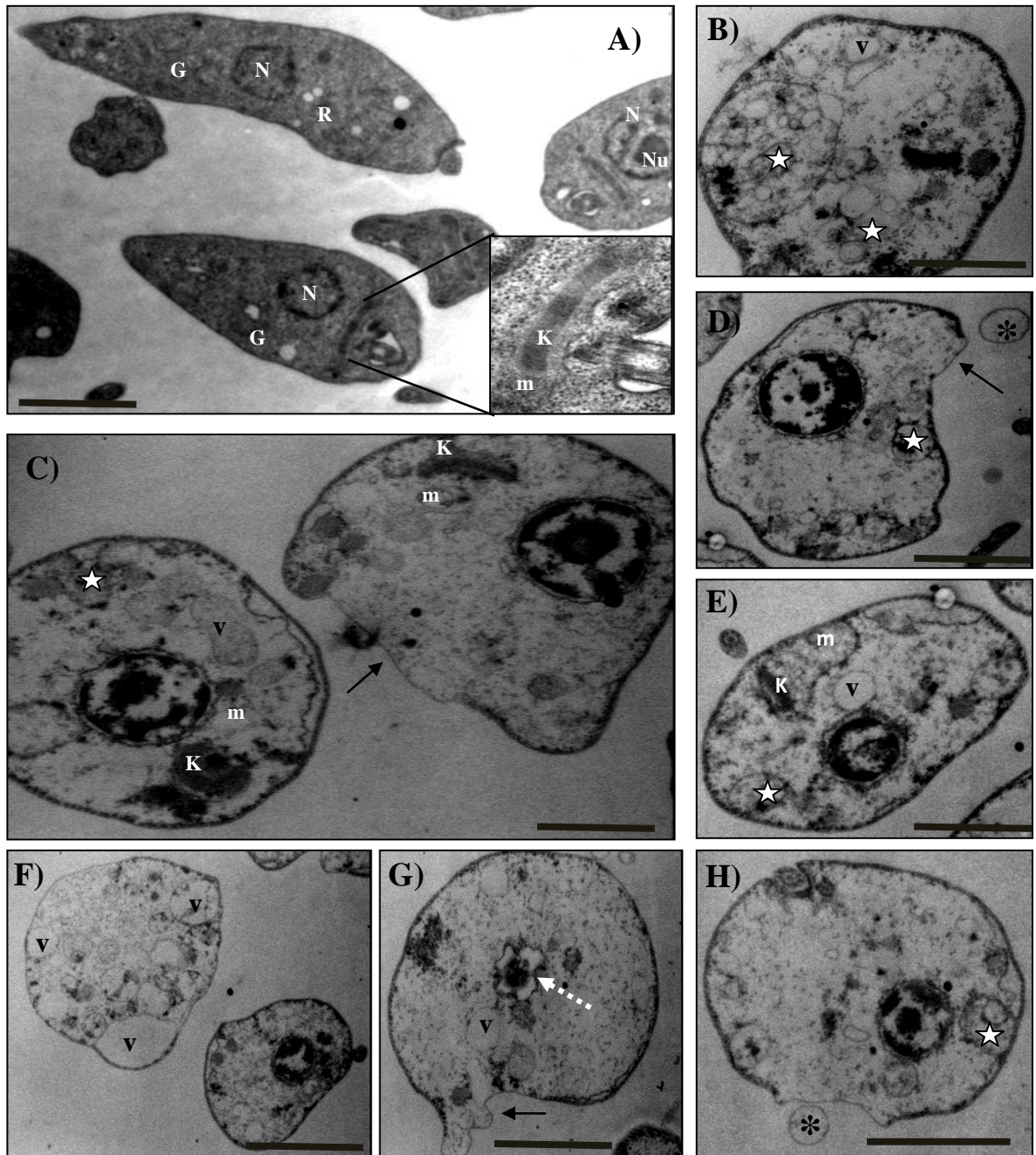


Figura 33. Micrografías electrónicas de epimastigotes de *T. cruzi* tratados con 4 μ g/mL de Mammea A/BA durante 12 horas. (A) Parásitos control en medio LIT, con densidad citoplásmica y morfología normal, Glicosomas (G) y reservomas (R), núcleo (N), nucléolo (Nu), complejo cinetoplasto-mitocondria con morfología típica (K-m). Parásitos tratados con cumarina donde se observa: Evidente deformación del cuerpo del parásito y pérdida de densidad citoplásmica (B-H), adelgazamiento (flecha negra en C, D,G) y deformación de la membrana plasmática formando pequeñas vesículas o ampollas exocitadas por la célula (asterisco en D y H), condensación anormal de cromatina y pérdida de la continuidad de la membrana nuclear (C,D,E,F,H) retracción del núcleo y desorganización del nucléolo (Picnosis) (Flecha discontinua en G), vacuolas de gran tamaño en el citoplasma (V), hinchazón mitocondrial (complejo K-m en C y E) y autofagosomas (estrella). Barra 1 μ m

VIII. DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas es un padecimiento que afecta a millones de personas, principalmente en América Latina, sin embargo, debido a la existencia de vías de transmisión no vectorial del agente causal, esta enfermedad se presenta también en países no endémicos, produciendo altas tasas de morbilidad y mortalidad. La terapia disponible para esta patología se limita al uso de benznidazol y nifurtimox, dos fármacos poco eficaces en la fase crónica de la enfermedad y con numerosos efectos adversos que ocasionan el abandono del tratamiento por parte del paciente. La disponibilidad de estos compuestos a nivel mundial y en nuestro país es escasa, por lo que existe una gran necesidad de encontrar fármacos con baja toxicidad para las células del huésped y mayor actividad contra las diferentes fases y cepas del parásito.

En el mundo se reconoce una gran diversidad genética, bioquímica y biológica de las diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*, lo cual es relevante en la epidemiología, pues está relacionada con las diferentes formas clínicas de la infección y la presencia de cepas resistentes al tratamiento de esta enfermedad (Risso *et al.*, 2011). Existen seis linajes genéticos de *T. cruzi*, en México predomina el tipo TcI, aunque se han reportado cepas pertenecientes a otros linajes.

En el presente estudio se trabajó con tres cepas mexicanas: Ninoa, Querétaro y Ver6. Las dos primeras pertenecen al linaje TcI, el cual predomina en nuestro país (Espinoza *et al.*, 2010). Aunque estas cepas pertenecen al mismo grupo genético, presentan características biológicas que las diferencian entre sí, incluyendo la susceptibilidad a fármacos. Para el caso de Ver 6, estudios preliminares la han propuesto como perteneciente al grupo genético TcII o TcVI (Bosseno *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2013). En países sudamericanos, el genotipo TcII juega un papel muy importante en la infección en humanos (Risso *et al.*, 2011). Hasta el momento, la mayoría de los estudios enfocados en la búsqueda de compuestos sintéticos y/o productos naturales contra *T. cruzi* se han realizado con cepas sudamericanas.

En los últimos años el uso de productos naturales como fuente de nuevos agentes quimioterapéuticos ha resultado ser un campo de investigación muy prometedor (Izumi *et al.*, 2011). Un ejemplo de estos compuestos son las “cumarinas tipo mammea”, compuestos fenólicos presentes en especies de Clusiaceae *sensu lato*, las cuales han suscitado gran interés farmacológico por su potente actividad tripanocida y leishmanicida, baja toxicidad *in vitro* e *in vivo* y alto rendimiento al extraerlas (Reyes Chilpa *et al.*, 2008, 2004, Ruiz-Marcial *et al.*, 2005). Es por ello, que en el presente trabajo se realizó la extracción, purificación e identificación de una mezcla constituida por tres cumarinas, mammea A/BA+A/BB+A/BD en una proporción (6:3:1), a partir de extractos de las hojas del árbol *Calophyllum brasiliense* (Calophyllaceae), esta mezcla se evaluó *in vitro* sobre epimastigotes de tres cepas mexicanas y tripomastigotes de la cepa Querétaro de *T. cruzi*, con el objetivo de determinar si tenían efecto sobre la movilidad, morfología, crecimiento y ultraestructura de este parásito, analizar si este efecto era diferencial en distintas cepas e iniciar el estudio del mecanismo de la actividad tripanocida de estos compuestos.

La movilidad es un parámetro que en *T. cruzi* ha sido ampliamente utilizado para demostrar la efectividad de numerosos compuestos contra los estadios de epimastigote (forma replicativa, no infectiva) y tripomastigote (forma infectiva, no replicativa) (Brener, 1962; Jacobs *et al.* 2003, Reyes-Chilpa *et al.* 2008, Luize *et al.* 2006). Sin embargo, este parámetro sólo puede dar una imagen incompleta del efecto tripanocida, pues algunos compuestos afectan sólo la movilidad pero el crecimiento y la viabilidad del parásito no se ven afectados o bien se puede afectar el crecimiento pero no la movilidad, lo que permite al parásito sobrevivir (Arantes *et al.*, 2011, Zaverucha *et al.*, 2003).

En trabajos recientes, la afectación de la movilidad se ha correlacionado con la muerte de los parásitos, al estar acompañado de cambios morfológicos importantes como deformación, redondeo y vacuolización citoplásmica (Ameisen *et al.* 1995, Kosec *et al.* 2006, Fernández-Presas, 2001), así como la afectación de la capacidad replicativa cuando los parásitos con estas características se transfieren a un medio libre de drogas (Kessler *et al.*, 2013, Martínez *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la mezcla de cumarinas produjo en epimastigotes la afectación evidente de la movilidad, cuando los parásitos se expusieron durante tiempos cortos (3 horas) y durante tiempos largos (12-24 y 48 horas), provocando lisis celular en los mismos. Esta mezcla también disminuyó el número de parásitos y la recuperación del crecimiento post-exposición de los mismos de una forma dosis dependiente, comparando con los grupos control. Este hecho, mostró la eficacia de esta fracción, al afectar ambos parámetros, en contraste con nifurtimox y benznidazol (100 µg/mL), que no afectaron la movilidad, pero sí disminuyeron el número de parásitos y la recuperación de su crecimiento. Esto señala que los parámetros de movilidad y crecimiento se comportan de manera diferente, ya que se puede afectar el crecimiento de los parásitos pero al no afectar la movilidad, estos siguen viables y pueden sobrevivir e incluso desarrollar resistencia (Arantes *et al.*, 2011, Zaverucha *et al.*, 2003).

Al comparar la concentración inhibitoria media de movilidad (CIM₅₀), no se observó diferencia significativa en cada una de las cepas estudiadas. Sin embargo al determinar la concentración inhibitoria de crecimiento (CIC₅₀) y realizar el análisis estadístico, Ninoa y Querétaro, presentaron ligera diferencia en su CIC₅₀ calculada, lo que confirmó que a pesar de que ambas cepas pertenecen al mismo linaje genético (Espinoza *et al.* 2010), presentan características biológicas diferenciales y su respuesta a la exposición con fármacos puede ser una de estas. Cuando ambas cepas se compararon con Ver6 (TcII/VI), se presentó diferencia muy significativa, posiblemente porque esta cepa es producto de un proceso de hibridación entre varios linajes genéticos (Zingales *et al.* 2012), de modo que posee características completamente diferentes y aún no bien caracterizadas.

Lo anterior puede sugerir una correlación entre una susceptibilidad de las cepas TcI y cierta resistencia de las cepas TcII/VI a fármacos, que es apoyado por investigaciones previas, donde se ha hipotetizado que las diferencias biológicas como la tasa de crecimiento, la cantidad de

proteínas, la procedencia de diferentes hospederos y región geográfica de las diferentes cepas están relacionadas con la inefectividad y la susceptibilidad a fármacos como: nifurtimox, benznidazol, intraconazol o etanidazol (Andrade *et al.*, 1985; Andrade *et al.*, 1992; Filardi y Brener, 1987; Murta *et al.*, 1998; Toledo *et al.*, 1990; Toledo *et al.*, 2003). Las cepas del linaje TcI son altamente susceptibles, mientras que las cepas del linaje TcII se han mostrado resistentes, pues la naturaleza híbrida de este último grupo alberga una combinación de genes y mecanismos mutacionales que amplían la variabilidad de las cepas pertenecientes al mismo (Risso, 2011).

Respecto a la fase tripomastigote, la movilidad de este estado fue inhibida tanto con la mezcla de cumarinas, como con el compuesto mammea A/BA, ambos tratamientos al igual que en el fase epimastigote provocaron notables cambios morfológicos como reducción de tamaño, redondeo y deformación. Estos cambios fueron similares a los observados en parásitos tratados con benznidazol y nifurtimox, sin embargo, en el caso, de las cumarinas, estas produjeron afectaciones a concentraciones mucho menores (3.12-25 µg/mL) que las utilizadas para ambos fármacos (100 µg/mL).

En la fase epimastigote la afectación de la movilidad también estuvo relacionada con la presencia de alteraciones morfológicas, pues los parásitos fueron considerados muertos/inmóviles cuando presentaron una forma esferoide, estática, sin flagelo, con vacuolas en el citoplasma y/o contorsiones en el cuerpo, perdiendo su forma típica. En cada cepa, la afectación en la morfología con la mezcla de cumarinas ocurrió de forma dosis dependiente y con diferencias notables entre ellas y expuestas también con benznidazol. La cepa Ninoa fue la más afectada, en contraste con Querétaro y Ver6, ya que los parásitos de esta cepa ensancharon su cuerpo, adquiriendo una forma globosa incluso a concentraciones bajas de las cumarinas y en el caso de Ver6, estos cambios se observaron a concentraciones altas y no se presentó la deformación de la totalidad de los mismos.

De manera interesante, al comparar la respuesta a las cumarinas entre los dos principales estadios de *T. cruzi*, el estadio epimastigote fue más sensible a estos compuestos, ya que su movilidad y morfología se vio mayormente afectada que en los tripomastigotes. En este sentido, existen investigaciones que demuestran que la forma biológica de los parásitos de una misma cepa presentan distinta susceptibilidad al tratamiento con benznidazol y nifurtimox, evidenciándose mayor sensibilidad de la fase epimastigote respecto a la fase tripomastigote y siendo el amastigote el estadio más resistente al tratamiento con ambos compuestos (De Castro *et al.* 1987, 1990) por lo que se ha propuesto que esto se debe a un incremento en las enzimas de desintoxicación y contenido de tioles intracelulares de los diferentes estadios del parásito (Muñoz-Calderón *et al.* 2012).

En el presente trabajo, la mezcla de cumarinas y la mammea A/BA, produjeron en epimastigotes y tripomastigotes afectaciones en su movilidad y consecuencias en su morfología, las cuales fueron evidentes a tiempos cortos de exposición y promovieron una casi nula recuperación del crecimiento post-exposición de los epimastigotes. La afectación de la

morfología externa de los parásitos produjo en los mismos alteraciones importantes a nivel ultraestructural, que sugirió la ocurrencia de diferentes mecanismos de muerte celular, dichas modificaciones fueron dependientes del tiempo de exposición, encontrándose mayores afectaciones en el interior de los parásitos expuestos durante tiempos largos.

Los efectos que sufrieron los parásitos expuestos con ambos compuestos fueron principalmente el ensanchamiento y redondeo de su cuerpo, dicho cambio puede atribuirse a la modificación de componentes de la membrana plasmática de los parásitos producida por estos compuestos, ya que en experimentos con *Leishmania* y cepas sudamericanas de *T. cruzi* expuestos con agentes que afectan el citoesqueleto como el taxol, análogos de lisofosfolípidos e inhibidores de la biosíntesis de esterol, los parásitos también han presentado encogimiento, deformación, redondeo, así como adelgazamiento y formación de “arrugas” y prolongaciones en la membrana plasmática, debido a que estos compuestos perjudican la biosíntesis de fosfolípidos y esteroles que son los principales componentes de la membrana de los tripanosomátidos (Marquez y Souto-Padron, 2010; Menna-Barreto *et. al.* 2009; Kessler *et. al.* 2013). Por otro lado, en parásitos sometidos con diferentes drogas se ha reportado la formación de alteraciones en la membrana celular denominadas vesículas o ampollas (Menna-Barreto, 2009), similares a los cuerpos apoptóticos encontrados en células de mamífero cuando experimentan muerte por apoptosis (Kroemer *et. al.* 2009; Jiménez *et. al.* 2008).

Otro cambio importante observado en los parásitos tratados con cumarinas fue la formación de pequeñas vesículas exocitadas por la célula, esto se ha observado en promastigotes de *L. amazonensis* tratados con inhibidores de la síntesis de ergosterol (Rodrigues *et al.*, 2001), azasterol (Lorente *et al.*, 2004) y (-) mammea A/BB de *C. brasiliense* (Brenzan *et. al.* 2007). En estos trabajos, la intensa actividad exocítica se relaciona con la secreción de lípidos anormales, que se acumulan como una consecuencia de la acción de estos fármacos (Rodrigues *et al.*, 2002) y la eliminación de proteínas producidas de una manera exacerbada como un intento por parte de las células para sobrevivir (Tiuman *et al.*, 2005).

Otras alteraciones se presentaron en organelos como el núcleo y la mitocondria. En el caso del núcleo, se distinguió condensación anormal de la cromatina, así como pérdida de la continuidad de la membrana nuclear e integridad del nucleolo. Este fenómeno ha sido observado en cepas de *T. cruzi* expuestas con compuestos sintéticos como diamidinas aromáticas (Werbovets *et al.*, 2006), naftofuranoquinonas, naftoimidazoles (Menna-Barreto *et. al.* 2007, 2009) e inhibidores de la biosíntesis de esterol (Lazardi *et al.*, 1991), así como productos naturales como las naftoquinonas (Lapachol y β -lapachol) aisladas de árboles del género *Tabebuia* (Docampo *et. al.* 1977; 1978; Boveris *et. al.* 1978). Dichas alteraciones se han correlacionado con la estructura de cada uno de estos compuestos que les permite interactuar con el ADN del parásito, provocando la dispersión y pérdida de la compactación de la cromatina en el núcleo (cariorrexis), debido a la fragmentación de esta macromolécula, así como la retracción del mismo (picnosis) y desestabilidad de la envoltura nuclear comprometiendo la división celular y provocando

diferentes mecanismos de muerte en los parásitos como necrosis y apoptosis (Lazardi *et al.*,1990; Vivas *et al.*, 1996).

En trabajos recientes se ha evaluado la capacidad de las cumarinas mammea A/BA+A/BB para causar daño en el material genético (genotoxicidad) en otros modelos experimentales, como células de leucemia humana, mostrando que estos compuestos poseen potencial genotóxico, produciendo apoptosis; sin embargo, este efecto no es producido por una interacción directa con el ADN (Gomez-Verjan *et al.*, 2014). Otros estudios realizados en *T. cruzi* han mostrado que diferentes drogas aisladas de plantas como neolignanós (eupomatenóide-5 y 7), aislados de *Piper regnelii* (Lazarin-Bidóia *et al.*, 2013; Pelizzaro-Rocha *et al.*, 2011; García *et al.*, 2013) y xantonas de *Kielmeyera coriácea* (Caleare *et al.*,2013), inducen un desequilibrio oxidativo en los tres estadios de *T. cruzi*, provocando la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) e induciendo peroxidación lipídica y fragmentación del ADN, lo cual resulta en la muerte del parásito por diversas vías, incluyendo apoptosis, necrosis y autofagia. Lo anterior plantea que sería interesante determinar si las cumarinas utilizadas en este trabajo producen la formación de ROS, ya que esto explicaría algunos de los efectos observados en la morfología de los parásitos y el daño nuclear, ya que se estarían produciendo modificaciones en los componentes de las membranas celulares y daño en el material genético de los parásitos.

Con relación a la mitocondria, se ha demostrado que el efecto más frecuente de diferentes agentes quimioterapéuticos sobre tripanosomátidos es la inflamación de este organelo, la intensidad de este fenómeno varía de acuerdo al tipo y concentración de fármaco, así como el tiempo de incubación (De Souza *et al.* 2009; Vannier-Santos *et al.* 2009). En este trabajo, el daño producido en la mitocondria por las cumarinas, indicó que este se realiza de una forma tiempo-dependiente, ya que en los epimastigotes expuestos durante 3 horas, se pudo distinguir ligera deformación de la membrana mitocondrial que delimita al cinetoplasto, sin embargo, en los parásitos tratados durante 12 horas, se presentaron alteraciones muy importantes en este organelo como hinchazón y presencia de vacuolas y membranas concéntricas dentro de la misma. Cambios similares se han reportado en *T. cruzi* y *Leishmania* expuestos a inhibidores de la biosíntesis de esterol como el ketoconazol, terbinafina (Vannier-Santos *et al.*, 1995) y azasterol (Rodrigues *et al.*, 2002; Lorente *et al.*, 2004), así como en parásitos tratados con neolignanós (Lazarin-Bidóia *et al.*,2013) y promastigotes de *L. amasonensis* tratados con (-) mammea A/BB de *C. brasiliense* a una dosis de 3-5 µg/mL (Brenzan *et al.*, 2007; 2012), la cual fue similar a las dosis utilizadas en nuestro modelo experimental.

En estos trabajos se ha demostrado que existe una afectación muy importante en la membrana interna y externa mitocondrial, produciendo cambios en el potencial de membrana. Este fenómeno parece ser causado por una disminución en esteróles endógenos, que son esenciales para el mantenimiento de la organización estructural celular normal de la membrana mitocondrial en tripanosomátidos (Rodrigues *et al.*, 2001, 2007). Lo que indica que la mitocondria de los tripanosomátidos es un objetivo importante en la búsqueda de compuestos tripanocidas y leishmanicidas, ya que cambios significativos en la morfología mitocondrial preceden a la

afectación de procesos importantes realizados en este organelo como la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa, dirigiendo a la pérdida de la viabilidad celular de estos protozoos (Rodrigues y Souza 2008). Dado que investigaciones previas sugieren que la mammea A/BA, A/BB, B/BA y A/AA actúan como desacopladores en la fosforilación oxidativa (Crombie *et al.*, 1972), las alteraciones morfológicas encontradas en nuestro modelo podrían indicar que se están afectando procesos celulares realizados por la mitocondria, lo cual podría explicar no sólo el daño ultraestructural en este organelo si no también la pérdida de movilidad y la falta de recuperación del crecimiento de los parásitos, como resultado de la afectación en la producción de ATP y el ciclo celular.

Por otro lado, la muerte celular programada, es un proceso de gran importancia en la homeostasis de los organismos multicelulares, jugando un papel fundamental en la morfogénesis, fisiología y la defensa del huésped contra los patógenos (Guimaraes y Linden, 2004). Estos procesos han sido bien caracterizados en la mayoría de los eucariotas, incluyendo la apoptosis, necrosis y autofagia. En parásitos protozoarios, estos mecanismos han cobrado interés en la búsqueda de nuevos fármacos que afecten moléculas, organelos y vías metabólicas específicos (Menna-Barreto *et al.* 2009).

Uno de estos mecanismos es la autofagia, este proceso se caracteriza por la formación de vacuolas de doble membrana denominadas autofagosomas que se fusionan con lisosomas de la propia célula, dando lugar a un autofagolisosoma, en donde ocurre la digestión de los residuos celulares por enzimas proteolíticas. En *T. cruzi* este proceso se ha reportado en parásitos tratados con naftoimidazoles, ketoconazol, lovastatina, inhibidores de protein cinasas (Menna-Barreto, 2005, 2007; Kessler *et al.* 2013; Braga *et al.*, 2006) y derivados de plantas como las proantocianinas, geranilgeraniol o GG-OH, naftoquinonas, neolignanos y amidas como piperovatina y piperlonguminina (Kubata *et al.*, 2005; Menna-Barreto *et al.*, 2008; Boveris *et al.* 1978; Lazarin-Bidoia *et al.* 2013; Veiga-Santos *et al.* 2010). En nuestro trabajo, este fenómeno también estuvo presente, ya que se observó una reducción importante de la densidad citoplasmática en los parásitos expuestos a un tiempo largo de incubación, como consecuencia de la presencia de vacuolas de gran tamaño con contenido citoplasmático en su interior y la presencia de vacuolas de doble membrana, “autofagosomas”. Esto indica que estos compuestos parecen inducir un desbalance metabólico en los parásitos, por lo que debería confirmarse con marcadores específicos si este proceso está presente.

En conjunto, los resultados de este trabajo sugieren que la actividad tripanocida de las cumarinas tipo mammea de *C. brasiliense* se basa en la inducción de alteraciones morfológicas, fisiológicas y ultraestructurales que producen en los parásitos diferentes mecanismos de muerte celular tales como necrosis, apoptosis y autofagia; siendo estos dos últimos los más predominantes por las alteraciones observadas, por lo que confirmar la presencia de estos procesos e indagar en el mecanismo de acción de los mismos sobre *T. cruzi* resulta interesante para entender por que el parásito y los distintos linajes son afectados por estos fármacos.

La información toxicológica de estos compuestos sugiere también que pueden ser prometedores para continuar estudios *in vivo* en modelos murinos, ya que *in vitro*, la mammea A/BA y (-) mammea A/BB, han mostrado baja citotoxicidad en linfocitos humanos normales y macrófagos, presentando concentraciones letales de 126,45 µg/ml y 25.8 µg/ml, respectivamente (Reyes-Chilpa *et al.* 2008; Brenzan *et. al.* 2007), lo cual hace a estos compuestos más selectivos contra los parásitos. Además, estudios en modelos animales han mostrado que una mezcla de mammea A/BA y A/BB administrada por vía intraperitoneal fue inocua en dosis de 2-3500 mg / kg (Ruiz-Marcial, 2005) y administrada en dosis repetidas de 20 mg/kg cada tercer día durante un mes no presentó mortalidad, ni presencia de signos visibles de toxicidad cuando se realizaron observaciones histológicas de hígado, riñón, bazo y timo de los ratones tratados con estos compuestos y comparados con los grupos control (Ruiz-Marcial, 2005).

Lo anterior confirma que las especies del genero *Calophyllum*, son una fuente importante en la búsqueda de nuevos y selectivos agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades tropicales causadas por protozoos como la Enfermedad de Chagas y que las cumarinas tipo mammea de *C. brasiliense*, podrían ser una fuente prometedora de fármacos tripanocidas.

IX. CONCLUSIONES

- La exposición de parásitos de cepas mexicanas de *T. cruzi* con cumarinas aisladas del árbol *C. brasiliense* provocó diversas alteraciones morfológicas y fisiológicas, afectando la movilidad, crecimiento y ultraestructura de los mismos, sugiriendo la ocurrencia de diferentes mecanismos de muerte celular.
- El efecto de la mezcla de cumarinas fue diferencial en cada una de las cepas estudiadas, observándose mayor susceptibilidad en la cepa Ninoa en comparación con Querétaro y siendo Ver6 la cepa con menor afectación. Lo que indica que existe una alta heterogeneidad de susceptibilidad a fármacos incluso en cepas que pertenecen al mismo linaje genético.
- La afectación conjunta de parámetros como la movilidad y crecimiento se ha relacionado con la pérdida de viabilidad de los parásitos, por tal razón es necesario evaluarlos para determinar el efecto real de drogas con potencial tripanocida, pues en algunos casos puede afectarse la movilidad pero no el crecimiento, lo que permite la sobrevivencia de los mismos.
- En epimastigotes, el nifurtimox y benznidazol no afectaron la movilidad, sin embargo este último sí disminuyó la recuperación de su crecimiento. No obstante, la mezcla de cumarinas fue más efectiva, ya que ambos parámetros se afectaron utilizando menores dosis.
- En los parásitos, alteraciones ultraestructurales como la presencia de autofagosomas sugieren la ocurrencia de muerte por autofagia. Sin embargo, las afectaciones en el núcleo, la mitocondria y los daños en la membrana plasmática podrían indicar también apoptosis y/o necrosis, por lo que la presencia de estos procesos debe confirmarse.
- La afectación ultraestructural con cumarinas se produjo de una forma tiempo dependiente, siendo la mitocondria el organelo donde se distinguió mayor afectación en los parásitos sometidos durante tiempos largos en comparación con los parásitos expuestos durante tiempos cortos, donde la estructura de este organelo se afectó ligeramente.
- La respuesta de los diferentes estadios del parásito fue variable cuando se expusieron con cumarinas, observándose mayor afectación morfológica en epimastigotes, en comparación con tripomastigotes.
- Se presentó diferencia en la afectación de la mitocondria de epimastigotes tratados con una mezcla de cumarinas y la mammea A/BA, siendo ligeramente más evidente el daño con este último tratamiento. Sin embargo, ambos compuestos produjeron afectaciones en la movilidad y morfología de epimastigotes y tripomastigotes, por lo que su eficacia como agentes tripanocidas es evidente y parece prometedora para continuar estudios *in vitro* e *in vivo* en modelo murino.

X. PERSPECTIVAS

- Determinar mediante marcadores específicos, el tipo y mecanismo de muerte celular que los parásitos experimentan en contacto con las cumarinas tipo mammea.
- Determinar si la exposición con cumarinas afecta el potencial de membrana mitocondrial, produce especies reactivas de oxígeno, fragmentación de ADN o lipoperoxidación para justificar las alteraciones ultraestructurales encontradas en este trabajo.
- Determinar si existe una expresión diferencial de proteínas entre parásitos tratados y no tratados con cumarinas, para entender el mecanismo por el cual ocurren afectaciones morfológicas y fisiológicas.
- Evaluar la actividad tripanocida de las cumarinas tipo mammea en un modelo murino de infección con *T. cruzi* determinando su impacto sobre la parasitemia y patología producida por este parásito.

XI. BIBLIOGRAFIA

- **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*. *Biological Pharmaceutical Bulletin*. 25:1188-1191.
- **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 *Callophyllum brasiliense*. *Biological Pharmaceutical Bulletin*. 27: 141-143.
- **Ameisen JC**, Idziorek TH, Billaut-Mulot O, Loyens M, Tissier JP, Potentier A, Ouaiissi MA. 1995. Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell death and differentiation*. 2:283–300.
- **Andrade SG**, Magalhaes J, Pontes A. 1985. Evaluation of chemotherapy with benzimidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bulletin of the World Health Organization*. 63:721-726.
- **Andrade SG**, Rassi A, Magalhaes JB, Ferriolli Filho F, Luquetti AO. 1992. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 86: 624-626.
- **Arantes JM**, Francisco AF, De Abreu VPM, Silva M. 2011. *Trypanosoma cruzi*: Desferrioxamine decreases mortality and parasitemia in infected mice through a trypanostatic effect. *Experimental Parasitology*. 128: 401–408.
- **Boveris A**, Docampo R, Turrens JF, Stoppani AOM. 1978. Effect of B-lapachone on superoxide anion and hydrogen peroxide production in *Trypanosoma cruzi*. *The Biochemical Journal*. 175: 431–439.
- **Bosseno MF**, Espinoza B, Sánchez B, Brenière SF. 2000. Mexican *Trypanosoma cruzi* Stocks: Analysis of Minicircle kDNA Homologies by cross-hybridization. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*. 95: 473-476.
- **Bosseno MF**, Barnabé C, Magallón GE, Lozano K, Ramsey J, Espinoza B, Frédérique BS. 2002. Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. *Journal of clinical microbiology*. 40: 627-632.
- **Braga MV y De Souza W**. 2006. Effects of protein kinase and phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors on growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiology Letters*. 256: 209–216.
- **Bremer B**, Bremer K, Chase MW, Fay MF, Reveal JF, Soltis D, Soltis P, Stevens PF. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 161:105-121.

- **Brener Z.** 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Revista del Instituto de Medicina Tropical Sao Paulo. 4: 386-396.
- **Brenzan MA,** Nakamura CV, Dias-Filho BP, Ueda-Nakamura T, Young MCM, Cortez, DAG. 2007. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. Parasitology Research. 101: 715–722.
- **Brenzan MA,** Ferreira ICP, Lonardoni MVC, Honda PA, Rodriguez-Filho E, Nakamura CV, Dias-Filho BP, Ueda-Nakamura T, Cortez DAG. 2008a. Activity of extracts and coumarins from leaves of *Calophyllum brasiliense* Camb. On *Leishmania braziliensis*. Pharmaceutical Biology. 6: 380-386.
- **Brenzan MA,** Nakamura CV, Dias-Filho BP, Ueda-Nakamura T, Young MCM, Côrrea AG, Alvim-Júnior J, Santos AO, Cortez DAG. 2008b. Structure–activity relationship of (–) mammea A/BB derivatives against *Leishmania amazonensis*. Biomedicine Pharmacotherapy. 9: 651–658.
- **Brenzan MA,** Nakamura CV, Dias-Filho BP, Ueda-Nakamura T, Young MCM, Mitsui ML, Cortez DAG. 2009. Quantitative and qualitative analysis of (–) mammea A/BB coumarin in extracts of *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae) by HPLC. Journal Liquid Chromatography and Related Technologies. 2:283-295.
- **Brenzan MA,** Santos AO, Nakamura CV, Filho BP, Ueda-Nakamura T, Young MC, Côrrea AG, Júnior JA, Morgado-Díaz JA, Cortez DA. 2012. Effects of (-) mammea A/BB isolated from *Calophyllum brasiliense* leaves and derivatives on mitochondrial membrane of *Leishmania amazonensis*. Phytomedicine. 19:223-230.
- **Caleare AO,** Lazarin-Bidóia D, Cortez DA, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Silva Sde O, Nakamura CV. 2013. Trypanocidal activity of 1,3,7-trihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-xanthone isolated from *Kielmeyera coriacea*. Parasitology International. 62: 405-411.
- **Carabarin-Lima A,** González-Vázquez M. C., Rodríguez-Morales O. 2013. Chagas disease (American trypanosomiasis) in México: an update. Acta Tropica. 2: 126–135.
- **Castro JA,** Montalto de Mecca M, Bartel LC. 2006. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American Trypanosomiasis). Human Experimental Toxicology. 25:471-479.
- **Ceretto H,** González M. 2011. Antiparasitic prodrug nifurtimox: revisiting its activation mechanism. Future Microbiology. 6:847-850.
- **CONABIO-**Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. 2014. *Calophyllum brasiliense* Cambess (online). http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/24-gutti1m.pdf
- **Contreras VT,** Araque W, Delgado V. 1994. *Trypanosoma cruzi*: metacyclogenesis *in vitro*. Changes in the properties of metacyclic trypomastigotes maintained in the laboratory by different methods. Memorias Instituto Oswaldo Cruz. 89: 253-259.

- **Contreras A.** Ana R. De Lima R, María C. Navarro A. 2006. *Trypanosoma cruzi* morphogenesis: relevant factors for *in vitro* differentiation. *Acta Biológica Venezuela*. 2:49-60.
- **Correa MP.** 1978. *Calophyllum brasiliense*. In: Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. 3:388-390.
- **Crombie L.** Games DE. 1966. Isolation and structure of Mammea A/BA, A/AB and A/BB: a group of 4-aryl-coumarin extractives of *Mammea americana* L. *Tetrahedron Letters* 7:145–149.
- **Crombie L.** Games DE. 1967. Extractives of *Mammea americana* L. Part II. The 4-phenylcoumarins. Isolation and structure of Mammea A/AA, A/A cyclo D, A/BA, A/AB and A/BB. *Journal of the Chemical Society*. 7: 2553–2559.
- **Crombie L,** Games DE, Haskins NJ, Reed GF. 1972. Extractives of *Mammea americana* L. Part V. The insecticidal compounds. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions I*. 18: 2255–2260.
- **Crombie L.** Jones RCF, Palmer CJ. 1985. Synthesis of mammeins and surangin A. *Tetrahedron Letters*. 24: 2929–2932.
- **Cruz-Reyes A. y Pickering-Lopez JM.** 2006. Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years: a review. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*. 101:345–354.
- **Da Silva KI,** Dos Santos AR, Mattos PE, Yunes RA, Delle-Monache F, Cechinel-Filho V. 2001. Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense* leaves. *Thérapie*. 56: 431-434.
- **De Castro SI y De Meirelles M.** 1987. Effects of drugs on *Trypanosoma cruzi* and on its interaction with heart muscle cell “*in vitro*”. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 82: 209-218.
- **De Castro SI y De Meireles M.** 1990. Mechanism of action of a nitroimidazole-thiadiazole derivative upon *Trypanosoma cruzi* tissue culture amastigotes. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*. 85: 95-99.
- **De Souza W.** 2002a. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*. 8: 269-285.
- **De Souza W.** 2002b. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biology and Disease*. 1:1-3.
- **De Souza W.** 2009. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*. 104: 89-100.
- **De Souza W,** de Carvalho TM, Barrias ES. 2010. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. *International Journal of Cell Biology*. 29: 1–19.
- **Díaz-Garrido EP.** 2013. Caracterización De los péptidos <20KDa presentes en la hemolinfa de *Triatoma pallidipenis*. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.

- **Díaz de Toranzo EG**, Castro JA, Franke de Cazzulo BM, Cazzulo JJ. 1988. Interaction of benzimidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia* 44: 880–881.
- **Docampo R**. Lopes JN, Cruz FS, Souza W. 1977. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural and metabolic alterations of epimastigotes by beta-lapachone. *Experimental Parasitology*. 42: 142–149.
- **Docampo R**, De Souza W, Cruz FS, Roitman I, Cover B, Gutteridge WE. 1978. Ultrastructural alterations and peroxide formation induced by naphthoquinones in different stages of *Trypanosoma cruzi*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*. 3:189–198.
- **Docampo R y Stoppani AO**. 1979. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. *Archives Biochemistry Biophysics*. 1:317–321.
- **Docampo R y Moreno SJ**. 1984. Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. *Clinical Infectious Diseases*. 2: 223-238.
- **Dumonteil, E**. 1999. Update on Chagas' disease in México. *Salud Pública México*. 41: 322–327.
- **Espinoza B**, Rico T, Sosa S, Oaxaca E. Vizcaino-Castillo A, Caballero ML, Martínez I. 2010. Mexican *Trypanosoma cruzi* TCI strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010:1-10.
- **Espinoza B**, Solorzano-Domínguez N, Vizcaino-Castillo A, Martínez I, Elias-López AL, Rodríguez-Martínez JA. 2011. Gastrointestinal infection with Mexican TcI *Trypanosoma cruzi* strains: different degrees of colonization and diverse immune responses. *International Journal of Biological Sciences*. 7:1357-1370.
- **Estrada-Muñiz Elizabeth**. 2001. Cumarinas y xantonas de *Calophyllum brasiliense*: Evaluación de su actividad antiviral, citotóxica y antibacteriana; Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Biológicas. Instituto de Química, UNAM.
- **Fernández-Presas AM**, Tay Z, Becker F, Merchant MT, Robert G, Willms K. 2001. Ultrastructural damage of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes exposed to decomplexed immune sera. *Parasitol Research*. 87:619–625
- **Filardi LS y Brener Z**. 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas Disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 5: 755-759.
- **Filho VC**. Meyre-Silva C y Niero R. 2009. Review: Chemical and pharmacological aspects of the genus *Calophyllum*. *Chemistry & Biodiversity*. 6:313-327.
- **Flores, W**, Fuentes R, Galindo D, Gonzáles F, Hernández G, Hernandez K, Hidalgo I, Zamudio del Carpio D, Castañeda B, Ibañez L, Larrea H. 2008. Evaluación de los efectos antioxidante, antibacteriano y antifúngico de *Calophyllum Brasilense* Cambes (Lagarto Caspi). *Revista Horizonte Médico*. 8:7-16.

- **Fonseca MA.** 2008. Quimiotipos de *Calophyllum brasiliense*: Distribución geográfica en México y evaluación de la actividad hipoglucemiente del ácido apético. Tesis que para obtener el título de Bióloga. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
- **García FP,** Lazarin-Bidóia D, Ueda-Nakamura T, Silva Sde O, Nakamura CV. 2013. Eupomatenoid-5 Isolated from Leaves of *Piper regnellii* Induces Apoptosis in *Leishmania amazonensis*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013:1-11.
- **García-Zebadúa** Julio Cesar, 2012. Caracterización química y actividad antiviral (VIH-1) de *Calophyllum brasiliense* del estado de Chiapas, México. Tesis que para obtener el título de Doctor en ciencias biológicas, Instituto de biología, UNAM.
- **Gascón J,** Bern C, Pinazo M.J. 2010. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. Acta Tropica. 115:22-27.
- **Gomez-Verjan JC,** Estrella-Parra E, González-Sánchez I, Vázquez-Martínez ER, Vergara-Castañeda E, Cerbón MA, Reyes-Chilpa R. 2014. Molecular mechanisms involved in the cytotoxicity induced by coumarins from *Calophyllum brasiliense* in K562 leukaemia cells. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2014:1-7.
- **Guimaraes CA y Linden R.** 2004. Programmed cell death: apoptosis and alternative death styles. European Journal Biochemistry. 271:1638–1650.
- **Guzman-Bracho C,** García GL, Floriani VJ, Guerrero MS, Torres CM, Ramirez MC. 1998. Risk of transmission of *Trypanosoma cruzi* by blood transfusion in Mexico. Revista Panamericana de Salud Publica. 4:94–99.
- **Guzmán-Bracho C.** 2001. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. Trends Parasitology. 17: 372–376.
- **Guzmán-Marín ES,** Zavala-Castro JE, Acosta-Viana KY, Rosado-Barrera ME. 1999. Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. Revista Biomedica. 10: 177-184.
- **Honda PA,** Ferreira ICP, Cortez DAG, Amado CAB, Silveira TGV, Brenzan MA, Lonardon MVC. 2010. Efficacy of components from leaves of *Calophyllum brasiliense* against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Phytomedicine. 17: 333–338.
- **Hotez PJ.** 2011. The neglected tropical diseases and the neglected infections of poverty: overview of their common features, global disease burden and distribution, new control tools, and prospects for disease elimination. National Academies Press (US). 13: 978-1863.
- **Huerta-Reyes M,** Basualdo MC, Abe F, Jiménez-Estrada M, Soler C, Reyes-Chilpa R. 2004. Anti HIV-1 compounds of *Calophyllum brasiliense* leaves. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 27: 1471-1475.
- **Ibarra-Cerdana CN,** Sanchez-Cordero V, Townsend PA, Ramsey JM. 2009. Ecology of North American triatominae. Acta Tropica. 110:178–186.
- **INEGI-Instituto Nacional de Estadística Geografía e informática** (2010). Censo de población y Vivienda (online): <http://www.inegi.gob.mx>.

- **Izumi E**, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Veigajúnior VF, Nakamura CV. 2011. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. *Natural Products Report*. 28: 809-823.
- **Jacobs T**, Bruhn H, Gaworski I, Fleischer B. 2003. NK-lysin and its shortened analog NK-2 exhibit potent activities against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 47:607–613.
- **Jimenez V**, Paredes R, Sosa MA y Galanti N. 2008. Natural programmed cell death in *T. cruzi* epimastigotes maintained in axenic cultures. *Journal Cell Biochemistry*. 105:688-98.
- **Kessler RL**, Soares MJ, Probst CM, Krieger MA. 2013. *Trypanosoma cruzi* response to sterol biosynthesis inhibitors: morphophysiological alterations leading to cell death. *PLoS ONE*. 8: 1-16.
- **Kosec G**, Alvarez VE, Agüero F, Sánchez D, Dolinar M, Turk B, Turk V, Cazzulo JJ. 2006. Metacaspases of *Trypanosoma cruzi*: possible candidates for programmed cell death mediators. *Molecular Biochemical Parasitology*. 145:18–28.
- **Kroemer G**, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*. 16: 3–11.
- **Kubata BK**, Nagamune K, Murakami N. 2005. *Kola acuminata* proanthocyanidins: a class of anti-trypanosomal compounds effective against *Trypanosoma brucei*. *International Journal for Parasitology*. 35: 91-103.
- **Lazardi K**, Urbina JA, De Souza W. 1990. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 34: 2097–20105.
- **Lazardi K**, Urbina JA, De Souza W. 1991. Ultrastructural alterations induced by ICI 195,739, a bis-triazole derivative with strong antiproliferative action against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 35:736–740.
- **Lazarin-Bidóia D**, Desoti VC, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Nakamura CV, Silva SO. 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 Radical Biology and Medicine*. 60:17-28.
- **Lorente SO**, Rodrigguez JCF, Jiménez CJ, Joyce-Menekse M, Rodrigues C, Croft SL, Yardley V, Luca-Frandley K, Ruiz-Pérez LM, Urbina J, Souza W, Pacanowska DG, Gilbert IH. 2004. Novel azasterols as potential agents for treatment of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 48:2937–2950.
- **López Olmos V**, Pérez-Nasser V, Piñero D, Ortega E. 1998. Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*; 69: 239–254.
- **López Álvarez NP**. 2013. Movimiento de Ca^{2+} intracelular inducido en dos cepas mexicanas de *Trypanosoma cruzi* que presentan diferente capacidad para invadir a las células hospederas. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

- **Luize PS**, Ueda-Nakamura T, Dias-Filho BP, Cortez DAG, Morgado-Diaz JA, DeSouza W, Nakamura CV. 2006. Ultrastructural alterations induced by the neolignan dihydrobenzofuranic eupomatenoide-5 on epimastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. Parasitology Research. 100:31–37.
- Martínez-Díaz RA, Escario JA, Nogal-Ruiz JJ, Gómez-Barrio A. 2001. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. Memorias del Instituto Oswaldo Cruz. 96:53-59.
- **Martínez ER**. 2010. Identificación de proteínas carboniladas en estrés oxidante causado por peróxido de hidrógeno en *Trypanosoma cruzi*. Tesis que para obtener el título de Maestro en ciencias Bioquímicas. Facultad de química, UNAM.
- **Martínez ML**. 2007. Proteínas de superficie de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* que interaccionan con células del hospedero. Tesis que para obtener el título de maestro en ciencias bioquímicas, Facultad de química. UNAM.
- **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 Diseases. 13:181-187.
- **Marques A.C** y Souto-Padrón T. 2010. Contributions of ultrastructural studies to the cell biology of Trypanosomatids: targets for anti-parasitic drugs. The Open Parasitology Journal. 4:178-187.
- **Maya DJ**, Cassels BK, 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. Comparative Biochemistry and Physiology. 146: 601–620.
- **Menna-Barreto RFS**, Henriques-Pons A, Pinto AV, Morgado-Diaz JA, Soares MJ, De Castro SL. 2005. Effect of a beta-lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. Journal Antimicrobial Chemotherapy. 56:1034–1041.
- **Menna-Barreto RFS**, Correa JR, Pinto AV, Soares MJ, De Castro SL. 2007. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from beta-lapachone. Parasitology Research. 101:895–905.
- **Menna-Barreto RFS**, Salomão K, Dantas AP. 2009. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. Micron. 40: 157-168.
- **Mesía V.S**, Sánchez RI, Estrada-Muñiz E, Alavez-Solano D, Torres-Sosa C, Jiménez M, Estrada, Reyes-Chilpa R, Kauffman FC. 2001. Natural products isolated from Mexican medicinal plants: novel inhibitors of sulfotransferases, SULT1A1 and SULT2A1. Phytomedicine. 8:481-8.
- **Moreno SN**, Docampo R, Mason RP, León W, Stoppani AO. 1982. Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2: 585–591.

- **Muñoz-Calderón**, Santaniello A, Pereira A, Yannuzzi J, Díaz-Bello Z, Alarcón de Noya B. 2012. Susceptibilidad *in vitro* a nifurtimox y benznidazol de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de pacientes venezolanos con enfermedad de Chagas infectados por mecanismos de transmisión oral y vectorial. *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología*. 71: 14-22.
- **Murta SM**, Gazzinelli RT, Brener Z, Romanha AJ. 1998. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 93:203-214.
- **Nathan PJ** y **Díaz T**. 1970. Introducción a la resonancia magnética nuclear. Editorial Limusa. México D.F. 190 pp.
- **Navarro MC**, De Lima AR, Askue J, Contreras VT. 2003. Morphological comparison of axenic amastigogenesis of trypomastigotes and metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*. 98: 83-91.
- **Pelizzaro-Rocha KJ**, Veiga-Santos P, Lazarin-Bidóia D, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Ximenes VF, Silva SO, Nakamura CV. 2011. Trypanocidal action of eupomatenoid-5 is related to mitochondrion dysfunction and oxidative damage in *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infections*. 13:1018-1024.
- **Pérez-Morales D**. 2013. Estudio del efecto de diferentes tipos de estrés en el parásito *Trypanosoma cruzi*: Consecuencias en su morfología, ultraestructura, capacidad infectiva y expresión de la proteína SHSP16. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- **Petherick A**. 2010. Country by country. *Nature*. 465: 10–11.
- **PHO**-Tratamiento Etiológico de la Enfermedad de Chagas.1998.(online): <http://www.paho.org/Spanish/HCP/HCT/DCH/chagas.pdf>
- **Pinazo MJ**, Guerrero L, Posada E, Rodríguez E, Soy D, Gascon J. 2013. Benznidazole-related adverse drug reactions and their relationship to serum drug concentrations in patients with chronic chagas disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 57:390-395.
- **Ramsey JM**, Cruz-Celis A, Salgado L, Espinosa L, Ordonez R, Lopez R. 2003a. Efficacy of pyrethroid insecticides against domestic and peridomestic populations of *Triatoma pallidipennis* and *Triatoma barberi* (Reduviidae: triatominae) vectors of Chagas' disease in Mexico. *Journal of Medical Entomology*. 40: 912–920.
- **Ramsey JM**, Ordóñez R, Tello López A, Pohls JL, Sánchez-Cordero V, Peterson AT. 2003b. Chagas disease in Mexico: morbidity, mortality, risk areas and disease burden. *Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 45:198-200.
- **Ramsey JM**. 2007. Chagas disease transmission in Mexico: a case for translational research, while waiting to take disease burden seriously. *Salud Pública de México*. 49: 291-295.
- **Rassi A Jr**, Rassi A, Marin-Neto JA. 2010. *Chagas disease*. *Lancet* 375: 1388-1402.
- **Rassi A Jr**, Rassi A, Marcondes de Rezende J. 2012. American tripanosomiasis (Chagas disease). *Infectious Disease Clinics of North America*. 26:275-291.

- **Reyes-Chilpa R**, Estrada-Muñiz E, Ramírez AT, Amekraz B, Aumelas A, Jankowski CK, Vázquez-Torres M. 2004. Cytotoxic effects of mammea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. Life Sciences. 75: 1635-1647.
- **Reyes-Chilpa R**, Estrada-Muñiz E, Vega-Ávila E, Abe F, Kinjo J, Hernandez-Ortega S. 2008. Trypanocidal constituents in plants.7. Mammea type coumarins. Memorias del Instituto Oswaldo Cruz. 103:431–436.
- **Reyes-Chilpa R y Huerta-Reyes M.** 2009. Compuestos naturales de plantas de la familia clusiaceae: Inhibidores del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1. Interciencia. 34:385-392.
- **Reutrakul V**, Leewanich P, Tuchinda P, Pohmakotr M, Jaipetch T, Sophasan S, Santisuk T. 2003. Cytotoxic coumarins from *Mammea harmandii*. Planta Medica. 69:1048-1051.
- **Risso MG**, Sartor PA, Burgos JM, Briceño L, Rodríguez EM, Guhl F, Chavez OT, Espinoza B, Monteón VM, Russomando G, Schijman AG, Bottasso OA, Leguizamón MS. 2011. Immunological identification of *Trypanosoma cruzi* lineages in human infection along the endemic area. The American Journal Tropical Medicine and Hygiene 84:78–84.
- **Rodríguez JCF y Souza W.** 2008. Ultrastructural alterations in organelles of parasitic protozoa induced by different classes of metabolic inhibitors. Current Pharmaceutical Design 18:925–938.
- **Rodríguez CO**, Catisti R, Uyemura SA, Vercesi AE, Lira R, Rodríguez C, Urbina JA, Docampo R. 2001. The sterol composition of *Trypanosoma cruzi* changes after growth in different culture media and results in different. Journal of Eukaryotic Microbiology. 48:588-94.
- **Rodríguez JCF**, Attias M, Rodríguez C, Urbina JA, Souza W. 2002. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26 azasterol, a 24(25)-sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 46:487–499.
- **Rodríguez JCF**, Bernardes CF, Visbal G, Urbina JA, Vercesi AE, Souza W. 2007. Sterol methenyl transferase inhibitors alter the ultrastructure and function of the *Leishmania amazonensis* mitochondrion leading to potent growth inhibition. Protist. 158: 447–456.
- **Rodríguez-Morales AJ.** 2005. Nuevas perspectivas en el manejo terapéutico de la enfermedad de Chagas. Revista peruana de medicina experimental y salud pública. 22:123-133.
- **Ruiz-Marcial C.** 2005. Estudio farmacológico y toxicológico de cumarinas aisladas de *Calophyllum Brasiliense* sobre la tumorigénesis experimental. Tesis que para obtener el título de Mestro en Ciencias. Universidad Autónoma de Morelos, Cuernavaca, Morelos. 107 paginas.
- **Ruiz-Marcial CA**, Reyes-Chilpa R, Estrada E, Reyes-Esparza J, Garrido-Fariña G, Rodríguez-Fragoso L 2007. Antiproliferative, cytotoxic and antitumor activity of coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense*. Journal Pharmaceutical and Pharmacology. 59: 719-725.

- **Salazar-Schettino** PM, Bucio TM, Cabrera Bravo M, Ruiz-Hernández AL. 2011. Presentación de dos casos de enfermedad de Chagas aguda en México. *Gaceta médica de México*. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 147: 63-9.
- **Shioji-Tiuman** T, Brenzan MA, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Garcia Cortez DA, Nakamura C. 2012. Intramuscular and topical treatment of cutaneous leishmaniasis lesions in mice infected with *Leishmania amazonensis* using coumarin (-) mammea A/BB. *Phytomedicine*. 19: 1196-1199.
- **Stevens**, PF. 1980. A revision of the old world species of *Calophyllum* (Guttiferae). *Journal of the Arnold Arboretum*. 61: 117-171.
- **Stoppani** A. 1999. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. Problemática de la enfermedad de Chagas. Simposio Internacional. Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires, 19-20 abril 1999. ISSN 0325-951.
- **Temperton** NJ, Wilkinson SR, Meyer DJ, Kelly JM. 1998. Overexpression of superoxide dismutase in *Trypanosoma cruzi* results in increased sensitivity to the trypanocidal agents gentian violet and benznidazole. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 96:167–176.
- **Tiuman** TS, Ueda-Nakamura T, Cortez DAG, Dias Filho BP, Morgado-Díaz JÁ, Souza W, Nakamura CV. 2005. Antileishmanial activity of pharthenolide a sesquiterpene lactone isolated from tanacet. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 43:176-182.
- **Toledo** M, Pereira M y Brener Z. 1990. Effects of immunosuppression on the specific treatment of mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*. 85: 100-133.
- **Toledo** M, Bahia M, Carneiro C. 2003. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 47: 223-230.
- **Trouiller** P, Olliaro P, Torreele E, Orbinski J, Laing R, Ford N. 2002. Drug development for neglected diseases: A deficient market and a public-health policy failure. *The Lancet*. 359: 2188-2194.
- **Vannier-Santos** MA, Urbina JA, Martiny A, Neves A, De Souza W. 1995. Alterations induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in *Leishmania*. *Journal Eukaryotic Microbiology*. 42: 337–346.
- **Vannier-Santos** MA, De Castro SL. 2009. Electron microscopy in antiparasitic chemotherapy: a (close) view to a kill. *Current Drug Targets*. 10: 246-60.
- **Vargas-Parada** L. 2010. Kinetoplastids and Their Networks of Interlocked DNA. *Nature Education*. 3:62-63.
- **Veiga-Santos** P, Desoti VC, Miranda N, Ueda-Nakamura T, Dias-Filho BP, Silva SO, Cortez DA, de Mello JC, Nakamura CV. 2013. The natural compounds piperovatine and piperlonguminine induce autophagic cell death on *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*. 125: 349-56.
- **Veiga-Santos** P, Pelizzaro-Rocha KJ, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Silva SO, Sudatti DB, Bianco EM, Pereira RC, Nakamura CV. 2010. *In vitro* anti-

trypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*. Parasitology. 137:1661–1670.

- **Velasco-Castrejón O**, Valdespino JL, Tapia-Conyer R, Salvatierra B, Guzmán-Bracho C, Magos C. 1992. Seroepidemiology of Chagas disease in Mexico. Salud Pública México. 34: 186–196.
- **Villarreal D**, Barnabé C, Sereno D, Tibayrenc M. 2004. Lack of correlation between in vitro 17 susceptibility to benznidazole and phylogenetic diversity of *Trypanosoma cruzi*, the agent of 18 Chagas' disease. Experimental Parasitology. 108:24-31.
- **Vivas J**, Urbina JA, Souza W. 1996. Ultrastructural alterations in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* induced 24,25 sterol methyl transferase inhibitors and their combination with ketoconazole. International Journal of Antimicrobial Agents. 7:235–240.
- **Venugopala KN**, Rashmi V, Odhav B. 2013. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. BioMed Research International. 2013:1-14.
- **Wendel S y Brener Z**. 1992. Chagas Disease -American Trypanosomiasis: its impact on transfusion and clinical medicine. International Society of Blood Transfusion, Sao Paulo, Brazil. 1992:31-47
- **Werbovetz K**. 2006. Diamidines as antitrypanosomal, antileishmanial and antimalarial agents. Current Opinion in Investigational Drugs. 7: 147-157.
- **WHO-World Health Organization**. 2014. Mortality and global health estimates (online): http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/en/index.html
- **WHO-World Health Organization**. 2012. Global Report for Research on infectious diseases of poverty (online): http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241564489_eng.pdf
- **WHO-World Health Organization**. 2010. First WHO Report on Neglected Tropical Diseases, Working to overcome the Global Impact Neglected Tropical Diseases (online): http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en.
- **WHO-World Health Organization**. 2014. Chagas disease (American trypanosomiasis) (online): <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>
- **Xiao-Hui S**, Man-Li Z, Li-Geng L, Chang-Hong H, Yu-Cheng G, Qing-Wen S. 2008. Review: Chemical constituents of the plants of the genus *Calophyllum*. Chemistry and Biodiversity. 5: 2579-2608.
- **Zaverucha T**, Calabrese KS, Corte-Real S, Baetas WC. 2003. *Trypanosoma cruzi*: In vitro morphological alterations induced by actinomycin D. Pharmacology. 67:55–58.
- **Zingales B**, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infections Genetics and Evolution. 12: 240-253.