

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA DE EXTRACTOS  
METANÓLICOS DE PLANTAS CON USO MEDICINAL SOBRE LA  
CEPA REGIONAL DE *Trypanosoma cruzi***

**POR**

**KARLA CARMELITA PÉREZ TREVIÑO**

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

**JUNIO, 2017**

A MIS PADRES,  
CARMEN TREVIÑO VAZQUEZ Y  
JOSE PEREZ SANCHEZ.

## AGRADECIMIENTOS.

Mi más sincero agradecimiento con afecto a los integrantes del comité de tesis, a la Dra. Licet Villarreal Treviño, Dra. Porfiria Barrón González y Dra. Maria Guadalupe Maldonado Blanco, gracias por compartir su conocimiento y sus inestimables consejos, realmente son un gran ejemplo a seguir.

Un agradecimiento muy en especial a mi Directora de Tesis, Dra. Zinnia Judith Molina Garza y al Dr. Lucio Galaviz Silva, cada uno, gracias por brindarme su apoyo en todo momento y considerarme siempre, sepan ustedes que más que mis asesores, son mis amigos y agradezco a dios y a la vida por haberlos conocido, a través de los años me han visto crecer y madurar y han estado conmigo en todos aspectos, muchísimas gracias por su confianza y amistad, han sido una parte muy importante de mi desarrollo como profesionista e investigadora.

Al igual, mi agradecimiento a CONACYT por otorgar la beca para la realización y finalización de la investigación de tesis de maestría.

Al Dr. José Luis Rosales Encinas y a la Bióloga Lidia Baylón Pacheco, ambos muchísimas gracias por compartir sus cepas y enseñarme tan pacientemente a cultivarlas, fueron una parte fundamental en este proyecto.

Al Dr. Marcelo Comini, la Dra. Andrea Medeiros, a la Dra Mariana Bonilla, al ahora Dr Diego, a Cass y a Flo, tal vez no lean esto, pero gracias por enseñarme que hay un amplio mundo allá afuera y que los límites son efímeros, espero verlos pronto, queridos!

A mis muy queridos padres, que han llorado conmigo, reído, gritado y vivido mis alegrías, no me bastará la vida para expresar la gratitud que siento por ustedes, apenas opacado por el amor que les tengo, porque con ustedes soy todo y sin ustedes, nada soy. Mi más grande agradecimiento y devoción para mi padre José Alfredo Pérez Sánchez y mi madre María del Carmen Treviño Vázquez, que siempre han estado allí para apoyarme en buenas y malas y peores; a mi hermano David Alfredo Pérez Treviño, por ser siempre un ejemplo de

superación y darme el aliento necesario para seguir cuando las ganas flaquean; a mi cuñada Sandra Guadalupe Muñoz Meza que es este breve tiempo ha demostrado ser un gran apoyo, y al pedacito de cielo que es mi sobrinito Ezequiel Alfredo Pérez Muñoz, que por ver su sonrisa somos capaces de todo; los quiero muchísimo, y este logro es de todos ustedes, porque ante todo somos un equipo, un equipo que comerá mucho pan con chocolate para celebrar.

A mis cuatachos chachos que por fin me verán doitora, gracias por estar conmigo y alegrarme el corazón; ya son más de 10 años de conocernos y sigues siendo mi copilota, un especial agradecimiento a mi mejor amiga Anabel Media Hernández, gracias por apoyarme siempre, y al squad que siempre me coacharon cuando se necesitó, gracias Andrea, Caro y Frías, también esto les pertenece. A mi beffito Gera, que te tocó raspar polvitos blancos conmigo y arreglar los suicidios de mi lap con tesis incluida, muchas gracias, en poco tiempo te has vuelto un amigo bien chipocludo. A los chiquitines guapos del posgrado, que juntos hemos crecido y tratamos de ser adultos, gracias Adriana, Jorge, Minerva, Omar, Priscila, Ricardo y Salomé, su compañía amenizo este proyecto.

A PatoMol, que siempre me han ayudado y han estado conmigo en las buenas en las malas y en las garnachas, gracias a Alonso, Ariel, Gaby, Karen, Mario, Misha y Susan, un placer trabajar con ustedes.

Un especial agradecimiento a los animalitos de laboratorio, su sacrificio no será en vano; y a la señorita aeromoza que no me dejó morir en el vuelo de Buenos Aires, gracias, ojalá la hiciéramos propio la caridad y la buena voluntad que usted me mostró, me dio una muy buena lección de vida.

Gracias a todas esas personas que me brindaron una palabra de aliento ocasional que sin saberlo me impulsaron a terminar este trabajo, y gracias a Dios por iluminar mi camino y más cuando la adversidad pisoteaba mi espíritu, mi Fe permitió levantarme y tomar fuerzas con valor para superar con sabiduría las dificultades del camino.

Hasta que el sueño sea real, seguir soñando...

## ÍNDICE.

ÍNDICE DE IMÁGENES .....	3
INDICE DE TABLAS .....	4
RESUMEN.....	5
ABSTRACT .....	6
INTRODUCCIÓN .....	7
ANTECEDENTES.....	9
Epidemiología. ....	11
Transmisión.....	11
Patología.....	14
Diagnóstico .....	15
Técnicas de diagnóstico .....	15
7.2.3 Tratamiento .....	16
Prevalencia en México .....	19
Extractos de plantas contra parásitos .....	21
Identificación de compuestos activos.....	23
JUSTIFICACIÓN .....	24
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
MATERIAL Y MÉTODO .....	26
Descripción general del área de estudio.....	26
Colectas.....	27
Material vegetal.....	27
Extractos.....	27
Descripción y uso medicinal de las plantas.....	27
Obtención del extracto .....	30
Identificación de compuestos.....	32
Cromatografía por capa fina.....	32
Ionización por nanoelectroaspersión.....	32
Citometría de flujo. ....	32
Viabilidad celular por el método deBromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). ....	33

ANALISIS ESTADÍSTICO.....34  
RESULTADOS.....35  
DISCUSION .....43  
CONCLUSION.....46

## ÍNDICE DE IMÁGENES

Fig. 1. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	10
Fig. 2 Zacate limón	27
Fig. 3 Palo de Brasil	28
Fig. 4. Marrubio	28
Fig. 5 Pirul	29
Fig. 6. Obtención del extracto mediante reflujo en sistema Soxhlet	35
Fig. 7 .Cromatógrafo por ionización por nano electroaspersión.	38
Fig. 8. Espectro de absorción. Karla 11b. 148. 2.79.Ácido gálico	39
Fig. 9. Espectro de absorción. Karla 7.486. 7.99. Ácido caféico.	40
Fig. 10. Grafico de porcentaje de células necróticas de <i>T. cruzi</i> a diferentes concentraciones de los compuestos activos.	
41	
Fig. 11. Gráfico de la viabilidad celular de <i>T. cruzi</i> a diferentes concentraciones de ácido gálico y tabla de $CI_{50}$ .	41

## INDICE DE TABLAS

Cuadro 1. Evaluación in vitro de la actividad tripanosomicida de los extractos metanólicos de plantas y su toxicidad en modelo de *Artemia salina*.

36

Cuadro 2. Desafíos de las fracciones de *Hematoxylum brasiletto* contra *T. cruzi*. 37

Cuadro 3. Compuestos identificados en la fracción Fr 22 (con mayor actividad tripanosomicida) 38

Cuadro 4. Análisis de citotoxicidad del ácido gálico sobre una línea de macrófagos murinos. 42

## RESUMEN

La enfermedad de Chagas es un padecimiento endémico del Sur de América que en los últimos años se ha extendido a diversas regiones del mundo. Su principal patogenia se desarrolla en el músculo, tejido gastrointestinal o de corazón, siendo este último el que más se manifiesta, llega a desencadenar la muerte del paciente. Los extractos de plantas han tomado un auge importante como auxiliares en el tratamiento del microorganismo, así como lo es el extracto del palo de Brasil. En el presente estudio se evaluó su capacidad tripanosomicida en dos cepas diferentes, a su vez se identificaron los compuestos asociados con esta actividad mediante la técnica de ionización por nano electroaspersión y se evaluó la toxicidad de los mismos en una línea celular de macrófagos murinos. Se identificaron dos compuestos principales en la fracción con actividad tripanosomicida, el ácido gálico y el ácido caféico, el primero presentó una mayor capacidad antiparasitaria en solitario, con una  $CI_{50}$  de  $23\mu M$  en la cepa de referencia y de  $0.08\mu M$  en la cepa regional, además presentó una citotoxicidad del 0.9% a concentraciones de  $100\mu M$ . Si bien la  $CI_{50}$  presentada por el compuesto es mayor a la utilizada en los medicamentos actuales, al menos en la cepa de referencia, y la baja concentración requerida para inhibir la cepa regional de Nuevo León, aunado a la baja toxicidad respecto al nifurtimox, nos abre nuevas investigaciones al respecto, como son el determinar su sinergismo con otros compuestos y sus posibles mecanismos de acción.

## ABSTRACT

Chagas disease is an endemic disease of South America that in recent years has spread to various regions of the world. Its main pathogenesis develops in muscle, gastrointestinal or heart tissue; the latter being the most common, leads to trigger the patient's death. Plants extracts have taken an important development in the treatment of microorganisms, as well as the extract of the wood of Brazil. In the present study, their trypanosomicidal capacity was evaluated on two different strains. In turn, the compounds associated with this activity were identified by nanospray ionization and their toxicity were evaluated in a murine macrophages cell line. Two main compounds were identified in the fraction with trypanosomicidal activity, gallic acid and caffeic acid, the last one with a high antiparasitic capacity, an IC<sub>50</sub> of 23 μM in the reference strain and of 0.08 μM in the regional strain, in addition, showed a 0.9% cytotoxicity at concentrations of 100 μM. Although the IC<sub>50</sub> presented by the compound is greater than the used in current drugs, at least for the reference strain, and the low concentration required to inhibit the Nuevo León regional strain, joined with the low toxicity to nifurtimox, this extract opens new research options, such as determining its synergism with other compounds and their possible action mechanisms.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una afección parasitaria, sistémica, crónica, transmitida por vectores y causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*, con una firme vinculación con aspectos socio-económico-culturales deficitarios, considerándose una enfermedad desatendida. Es una patología endémica en 21 países de las Américas, aunque las migraciones de personas infectadas pueden llevarla a países no endémicos de América y el Mundo, se calcula que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas (PAHO, 2017).

La enfermedad de Chagas tiene dos fases claramente diferenciadas. Inicialmente, la fase aguda, que dura unos dos meses después de contraerse la infección. Durante esta fase los parásitos circulan por el torrente sanguíneo. En la mayoría de los casos no hay síntomas o estos son leves, presentándose fiebre, cefalea, adenopatías, palidez, dolores musculares, disnea, hinchazón y dolor abdominal o torácico. En menos del 50% de los casos de picadura por triatomíneos, se desarrolla una lesión cutánea o una hinchazón amoratada de un párpado (Quiroz, 1990). Durante la fase crónica, los parásitos permanecen ocultos principalmente en el músculo cardíaco y digestivo. Hasta un 30% de los pacientes sufren trastornos cardíacos y hasta un 10% presentan alteraciones digestivas (típicamente, agrandamiento del esófago o del colon), neurológicas o mixtas. Con el paso de los años, la infección causa muerte súbita o insuficiencia cardíaca por la destrucción progresiva del músculo cardíaco en la tercera parte de los casos (Quiroz *et al.*, 1990). La enfermedad congénita provoca abortos o partos prematuros, muerte fetal y bajo peso al nacer. El cuadro clínico en el recién nacido infectado se caracteriza por hepatomegalia, esplenomegalia, ictericia, anemia y alteraciones en el sistema nervioso central, con altas tasas de mortalidad. La hepatoesplenomegalia es el cuadro clínico más frecuente (Russomando *et al.*, 1998; Yadon & Schmunis., 2009).

Actualmente solo existen dos medicamentos para tratar la enfermedad, benznidazol y nifurtimox. Ambos medicamentos son eficaces para frenar la enfermedad si se administran en la etapa aguda, pero su eficacia disminuye si se administra tiempo después del inicio de la infección. El tratamiento con estos medicamentos también está indicado en caso de reactivación de la infección (por ejemplo, por inmunodepresión), en niños que padecen infección congénita y en los pacientes al principio de la fase crónica.

La duración del tratamiento es de dos meses y son sumamente tóxicos, con reacciones adversas que se presentan hasta en un 40% de los pacientes tratados. El benznidazol y el nifurtimox están contraindicados en las embarazadas y en las personas con insuficiencia renal o hepática. El nifurtimox también está contraindicado en personas con antecedentes de enfermedades neurológicas o trastornos psiquiátricos. Además, es necesario administrar un tratamiento de apoyo para las manifestaciones cardiacas o digestivas y no tienen efecto cuando la enfermedad alcanza la etapa crónica (Nogueda-Torres *et al.*, 2001).

## ANTECEDENTES

Etiología.

La enfermedad de Chagas, también llamada tripanosomiasis americana, es una enfermedad potencialmente mortal causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi*(WHO, 2017); Es un parásito flagelado perteneciente a la familia de los tripanosomatídeos, incluida en el orden de los cinetoplástidos de la clase Zoomastigina, que comprende parásitos digénicos de invertebrados y vertebrados como los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*. Poseen un ciclo de vida heteroxeno con tres fases morfológicas comprendidas en dos huéspedes, el vector invertebrado y el huésped mamífero. Los estadios básicos se definen por su forma, la posición del cinetoplasto respecto al núcleo y la región por dónde emerge el flagelo, siendo epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes; éste último puede ser metacíclico o sanguíneo (Becerril-Flores, 2014). El epimastigote es la forma extracelular y replicativa presente en el intestino de los triatomíneos. El tripomastigote es la forma extracelular, no replicativa e infectiva, que se encuentra en la sangre de los mamíferos, en el intestino posterior de los vectores y en sus deyecciones. Los amastigotes son las formas intracelulares replicativas que se encuentran en las células de mamífero (Apt *et al.*, 2008). El ciclo comienza cuando el vector invertebrado ingiere tripomastigotes, sanguíneos, de la sangre de un hospedador infectado (1). Los tripomastigotes se transforman en epimastigotes en el intestino medio del vector (2), posteriormente pasando a ser tripomastigotes metacíclicos en el intestino caudal (3); donde son defecados por el vector. Estos últimos penetran a través de una picadura o membrana mucosa de un hospedador mamífero, después invaden múltiples tipos de células nucleadas (4). Dentro del citoplasma de estas pasan a una forma intracelular conocida como amastigote (5). Durante un periodo de 4 a 5 días estos se replican y se transforman a tripomastigotes; estos destruyen la célula y avanzan a torrente sanguíneo, desde donde pueden infectar células nuevamente (6) o ser adquiridas por el vector para continuar el ciclo (7) (Bern, 2015)(Figura 1).

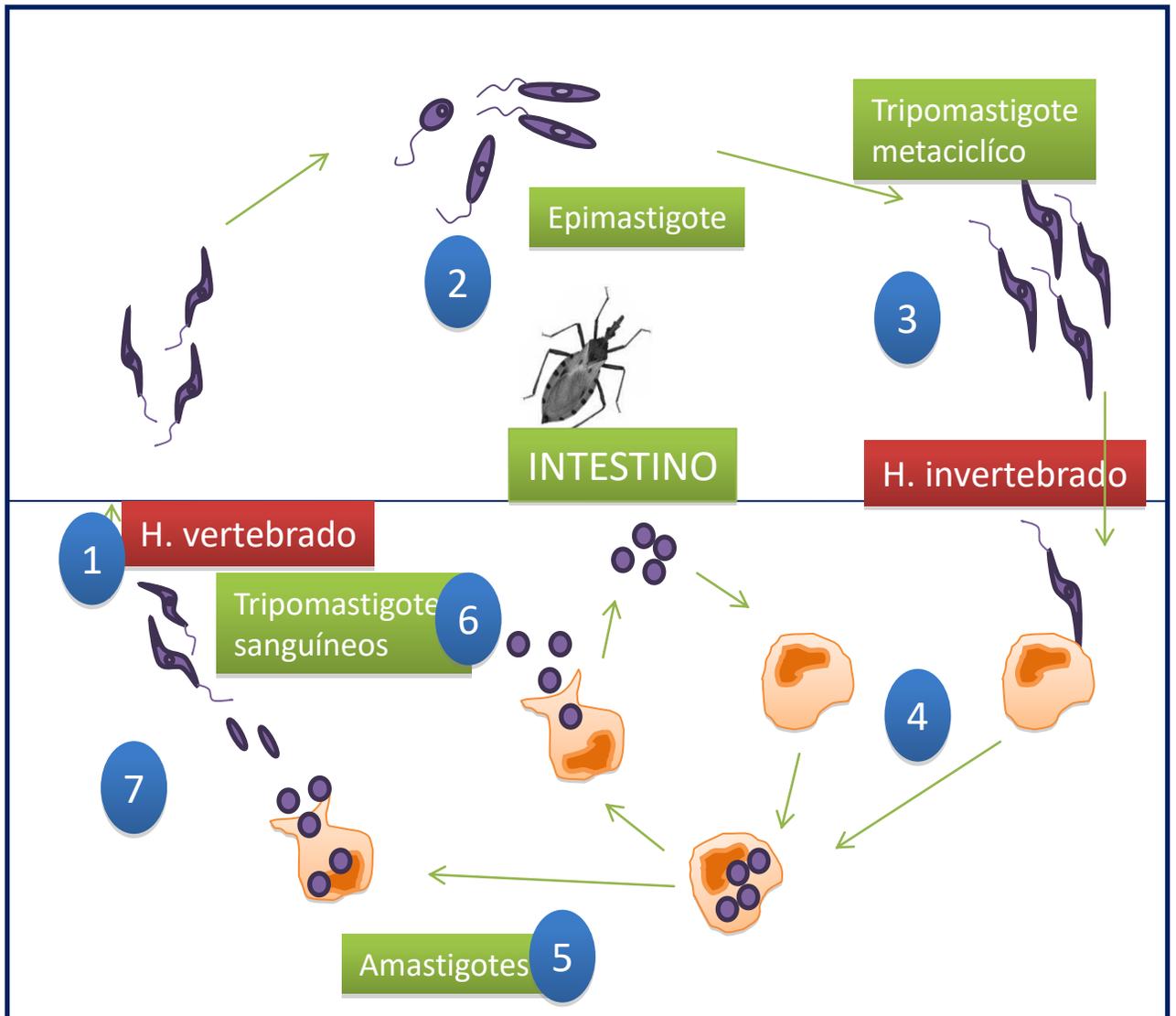


Fig. 1. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*.

**Epidemiología.**

Se encuentra en el continente americano desde hace más de 9.000 años, se calcula que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas por *Trypanosoma cruzi*, el parásito causante de la enfermedad de Chagas. La enfermedad de Chagas se encuentra sobre todo en zonas endémicas de 21 países de América Latina, pero en las últimas décadas se ha observado con mayor frecuencia en los Estados Unidos de América, Canadá, muchos países europeos y algunos del Pacífico Occidental. Esto obedece sobre todo a la movilidad de la población entre América Latina y el resto del mundo (Coura, 2007; WHO, 2017). En México es la enfermedad parasitaria más importante, basado en la prevalencia y la carga de morbilidad; sin embargo, el país sólo tiene un programa de vigilancia nacional que se aplica pobremente (Hotez *et al.*, 2012; Manne *et al.*, 2013); Ramsey *et al.*, 2015). Para 2010, Novelo-Garza *et al.*, registraron una prevalencia nacional fue de 0.406 %, con una seropositividad que osciló entre 0.013 y 3.118 %; al revisar 71 bancos de sangre, donde solamente 26 realizaban tamizaje para *T. cruzi*; se estima que 1.1 a 3 millones de mexicanos están infectados (Sánchez-González *et al.*, 2016).

**Transmisión.**

La principal vía de transmisión en América Latina de la tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es vectorial, por insectos de la familia Reduviidae (Hemiptera), subfamilia Triatominae, comúnmente denominados chinches picudas, besucones, o por una variedad de palabras indígenas como pic (Maya), msin o bidi (Zapoteco); mediante el contacto con las heces u orina infectadas estos insectos que se alimentan de sangre. Por lo general, estos viven en las grietas y huecos de las paredes y los tejados de las casas mal construidas en las zonas rurales y suburbanas. Normalmente permanecen ocultos durante el día y por la noche entran en actividad alimentándose de sangre humana. En general, pican en una zona expuesta de la piel, como la cara, y defecan cerca de la picadura, los parásitos penetran en el organismo cuando la persona picada se frota instintivamente y empuja las heces o la orina hacia la picadura, los ojos, la boca o alguna lesión cutánea abierta (Ramsey *et al.*, 2003; WHO, 2017).

En México la enfermedades transmitida por insectos en el 96% de los casos (Hernández *et al.*, 2010). En nuestro país, se han reportado 32 transmisores de *Trypanosoma cruzi*, 19 pertenecen al género *Triatoma* y seis del género *Meccus*, dos especies al género *Panstrongylus* y una especie de cada uno de los siguientes géneros: *Belminus*, *Dipetalogaster*, *Eratyrus*, *Paratriatoma* y *Rhodnius* (Salazar-Schettino *et al.*, 2010). Los vectores triatomíneos se han urbanizado en la mayoría de las regiones, demostrando una alta tolerancia a los hábitats modificados por el hombre y ampliando los rangos históricos, exponiendo a más del 88% de la población mexicana y dejando pocas áreas en México sin el potencial de transmisión de *T. cruzi* (Ramsey *et al.*, 2015).

Sin embargo la enfermedad de Chagas también puede ser adquirida por consumo de alimentos contaminados por *T. cruzi*; por ejemplo, por contacto con heces u orina de triatominos o marsupiales; mediante transfusión de sangre infectada; por la transmisión de la madre infectada a su hijo durante el embarazo o el parto; por trasplante de órganos provenientes de una persona infectada; y accidentes de laboratorio (WHO, 2017)

La transmisión por transfusiones de sangre es el segundo modo de transmisión más frecuente debido a que permite que se expanda la infección de las áreas endémicas hacia otros países debido a la migración (Rueda *et al.*, 2014). Sin embargo, sólo fue con el advenimiento del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que los programas de control en transfusiones de sangre se implementaron en la mayoría de los países latinoamericanos, revelando información sobre otras enfermedades infecciosas generalizadas como la enfermedad de Chagas (Angheben *et al.*, 2015). En los países endémicos, se han establecido programas de cribado y detección del parásito en Bancos de Sangre, esto ha reducido dramáticamente el riesgo de transmitir la infección (Schmunis & Cruz, 2005). México, desafortunadamente es uno de los países con el nivel más bajo de monitoreo en banco de sangre, sin embargo en las últimas décadas se han incrementado los esfuerzos, de un 36.5% de donantes cribados en 2005, se paso a un 92% en 2012, lo que permite un mayor control sobre la transmisión de enfermedades por transfusiones sanguíneas (Rolo-Medina, 2014).

La transmisión vertical, es decir de una madre infectada a su bebe, ha sido reportada en diversos países de Latinoamérica y España (Fumadó *et al.*, 2014, Campos-Valdez *et al.*, 2016). La prevalencia de la infección por Chagas en mujeres en edad fértil difiere según los países y depende de muchos factores, por ejemplo, en Bolivia varía de 20% a 60% y en Argentina, Brasil, Chile, Perú y Paraguay se va de 0% a 40% (Cucunuba *et al.*, 2012). En 1998, Guzmán-Bracho *et al.* reportaron el primer caso de transmisión vertical en México; desde entonces la prevalencia de la infección en mujeres embarazadas se ha estimado en varios estados; en Chiapas se reporta un 5%, en Veracruz un 3.5%, el 0.6% en Yucatán y para Guanajuato el 0.4% de las gestantes presentan la infección (Olivera Mar *et al.*, 2006; Sosa- Estani *et al.*, 2008; Gamboa - León *et al.*, 2011). En 2012, Jiménez-Cardoso *et al.*, investigaron las tasas de infección congénita por *T. cruzi* en mujeres embarazadas de Oaxaca, Jalisco y la Ciudad de México mediante ELISAs en las madres, y la frecuencia de transmisión congénita de *T. cruzi* por PCR con la sangre del cordón umbilical de los neonatos, realizando un seguimiento a la presencia de anticuerpos en niños cuando llegaron a los dos años de edad. Encontraron que la prevalencia de la infección en mujeres embarazadas fue del 7.32% (106/1448) en general; con un 4.4 % (35/794) en Oaxaca, 12.02% (67/557) en Jalisco y el 4.12% (4/97) en la Ciudad de México. En Oaxaca, la infección por *T. cruzi* fue detectada por PCR en el 20%(7/35) de los bebés nacidos de madres serorreactivas y un 11.9% (8/67) se detectó en Jalisco. No se identificaron infecciones en los recién nacidos de la Ciudad de México. De estos solo once estuvieron de acuerdo en el seguimiento serológico a los niños. Por lo tanto, la tasa general de transmisión materno-fetal fue 4.08 % (4/98); en Oaxaca se reportó el 9.1%(3/33) y en Jalisco un 1.5% (1/ 65); a los niños con serología positiva se les dio tratamiento específico de Chagas.

Campos-Valdés *et al.*, en 2016 reportaron la incidencia de la transmisión congénita en Chiapas, la prevalencia materna total fue 23/1 125 (2.04%); 9/600 (1.5%) en Tapachula y 14/525 (2.6%) en Palenque, mientras que la frecuencia de transmisión materno-fetal en Tapachula fue de 2/9 (22.2%) y en Palenque de 1/14 (7.14%); todos los niños positivos eran asintomáticos. Las infecciones crónicas en las madres en México suelen ser asintomáticos, probablemente debido al tipo de linaje de *T. cruzi* (IIa) que se encuentra

en el país y que se ha aislado de personas infectadas, diferente al de Sudamérica que presenta síntomas severos (Rassi *et al.*, 2004)

La transmisión por transfusión de órganos y mediante accidentes de laboratorio resultan menos frecuentes; así como la transmisión vía oral, que ocurre principalmente en países endémicos y de la cual no hay reportes para México (OMS, 2017).

## **Patología**

La enfermedad de Chagas evoluciona en dos fases, una aguda y otra crónica, cada una de ellas con características clínicas y criterios diagnósticos y terapéuticos diferentes.

La fase aguda es breve, generalmente asintomática, o tener una clínica muy inespecífica, por lo que en la mayoría de casos, esta etapa suele pasar desapercibida y de no ser tratada presenta una mortalidad comprendida entre el 2 y el 8 % (Rassi *et al.*, 2010; Botero & Restrepo, 2012). Se puede presentar un chagoma en el sitio de inoculación, por lo regular aparece como un nódulo inflamatorio, generalmente poco doloroso y de aspecto forunculoideo erisipelatoide; en zonas endémicas se puede observar el signo de Romaña, que se presenta en la región periférica al ojo y se observa como un edema bpalpebral unilateral, indoloro, asociado a inyección conjuntival. Posteriormente, aparece un cuadro de fiebre, dolor de cabeza, anorexia, malestar general, adenopatías generalizadas y hepatoesplenomegalia. También se ha documentado miocarditis meningoencefalitis aguda, manifestaciones poco frecuentes pero que comprometen la vida del paciente (Moreno- Medina *et al.*, 2007). Posteriormente, la enfermedad permanece en estado latente, sin sintomatología, por años, hasta evolucionar a la etapa crónica, que en el 25-35% de las personas infectadas, se caracteriza por no presentar parasitemia, los parásitos se alojan y reproducen en nidos de amastigotes de órganos y sistema nervioso periférico, de los cuales un 30 % desarrolla desórdenes cardíacos y un 10 %, trastornos nerviosos y digestivos como el megacolon o megaesófago (Storino *et al.*, 2010). La cardiopatía chagásica puede evolucionar de diferentes maneras, progresiva, en la que aparece dilatación de todas las cavidades y miocarditis debido a la multiplicación de los parásitos en las fibras musculares e insuficiencia cardíaca; o bien, con hipertrofia ventricular y necrosis apical,

que suele ocasionar muerte repentina. Las manifestaciones digestivas suelen ocurrir por la destrucción de las células ganglionares del plexomientérico, que causa alteraciones en la peristalsis, hipertrofia, luego atrofia y finalmente distensión del musculo liso de las vísceras; esto provoca principalmente megaesófago, con síntomas como disfagia, dolor, regurgitación e hipersalivación y megacolon, causa de estreñimiento y en ocasiones de la palpación de una masa abdominal (Rassi *et al.*, 2010; Imai *et al.*, 2014)

### **Diagnóstico**

El diagnóstico generalmente se basa en evidencias clínicas, epidemiológicas y de laboratorio. La Norma Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2002, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector, dictamina que el diagnóstico debe basarse en el cuadro clínico, asociado a las fases aguda y crónica del padecimiento; así como antecedentes de residencia en áreas endémicas de la enfermedad, transfusional, madre chagásica y/o trasplante de órganos.

En las etapas agudas de la enfermedad se diagnostican los tripomastigotes del *T.cruzi* en la sangre periférica, y a medida que avanza la infección, la presencia del parásito en circulación disminuye de modo que se requieren de varias tomas para observarlo. En etapas crónicas la parasitemia es fortuita y de baja intensidad, por lo tanto el diagnóstico se realiza mediante la búsqueda de anticuerpos anti-*T.cruzi*. La Organización Mundial de la Salud reconoce la utilidad clínica de las pruebas serológicas existentes y las recomienda para el diagnóstico primario. Las pruebas de ELISA de alta sensibilidad y especificidad son apropiadas, sin embargo se debe tener un control interno para asegurar la integridad del ensayo. Para el diagnóstico de rutina, se aconseja el uso de una asociación de pruebas con interpretación en paralelo, como el utilizar una prueba inmunoenzimática que utiliza antígeno total con otra basada en antígenos recombinantes o péptidos sintéticos; con este diseño el diagnóstico alcanza del 98-99.5% de sensibilidad (WHO, 2017).

### **Técnicas de diagnóstico**

Ponce *et al.* (2005) compararon el funcionamiento de la prueba rápida inmunocromatográfica de Chagas Stat-Pak con un ensayo de ELISA en el serodiagnóstico de la enfermedad de Chagas en América Central. De 3,400 muestras de donadores de sangre, 156 (4.6%) fueron positivos con ambos ensayos. Tres sueros de 2,084 muestras de laboratorios de referencia fueron negativos con la prueba rápida, pero positivos con el ELISA (99.8%). El acuerdo del 100% entre las pruebas fue observado con 339 sueros adicionales de pacientes con cardiopatías y 175 sueros de donantes potenciales de sangre en casos quirúrgicos de emergencia que ocurren los fines de semana o en la noche. Chagas Stak-Pak mostró el 99.6% y 99.9% de sensibilidad y especificidad, respectivamente, cuando se ensayó en 5,998 muestras de suero. Esto es una alternativa sensible y específica a la ELISA, como requeridos en casos médicos de urgencia y chequeo de sangre en América Central.

Ferreira *et al.* (2001) tuvieron como objetivo mejorar estudios serológicos acerca de la enfermedad de Chagas, desarrollaron y evaluaron una nueva prueba, el TcF-ELISA, usando un antígeno recombinante construido artificialmente, que contiene las secuencias tándem de diferentes péptidos específicos de *T. cruzi*. La sensibilidad del TcF-ELISA fue determinada con 101 muestras de suero de pacientes chagásicos bien definidos por criterios clínicos y epidemiológicos. La especificidad fue determinada con 39 muestras de suero de leishmaniasis o pacientes kala-azar y 150 muestras de suero de donantes de sangre no chagásicos de San Paulo, Brasil. El TcF-ELISA mostró la sensibilidad del 100% y el 98.94 % de especificidad. Comparado con ELISA convencional (con antígenos semi-purificados de epimastigote de *T. cruzi*), el TcF-ELISA mostró ventajas; por ejemplo, esto se distingue mejor entre el suero reactivo y no reactivo y proporciona la mejor precisión y una baja presencia de reacciones cruzadas con leishmaniasis. Estos estudios demuestran la alta reproducibilidad entre diferentes TcF-ELISA y su aplicabilidad para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas.

### **7.2.3 Tratamiento**

Los fármacos disponibles para el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas son Nifurtimox fabricados por Bayer HealthCare como Lampit®; y Benznidazol fabricado por Roche como Rochagan® o Radanil®; disponibles desde 1967 Y 1972, respectivamente (Jannin & Villa, 2007). En los países de América Latina se considera al benznidazol como el fármaco más indicado, sin embargo es un medicamento no disponible en farmacia y debe tramitarse su obtención a través de medicación extranjera (Murcia *et al.*, 2013). Se utiliza el nifurtimox a una dosis de 8-10mg/Kg/día en adultos y 12-15 mg/Kg/día en niños, dosis dividida en 3 veces al día, durante 60 días; el Benznidazol a 5-7 mg/Kg/día en adultos y a 5-10 mg/Kg/día en niños, cada 12 horas, por 60 de días (Sanabria- Calvo, 2015).

En pacientes en fase aguda o Chagas congénito ambos medicamentos reducen el curso de la enfermedad y duración de la parasitemia, en fase aguda se estima que hay una probabilidad de cura del 80 al 90% de los casos (Streiger *et al.*, 2004). Hasta la década de 1990, se creía que sólo en la fase aguda el tratamiento era eficaz, sin embargo en un ensayo controlado utilizando benznidazol en niños en fase crónica, la infección mostró tasas de curación de aproximadamente el 60% en pruebas serológicas 3 a 4 años después del tratamiento, estos estudios sugieren que a más temprana edad el tratamiento tiene mejores resultados en conversión de positivo a negativo en pruebas serológicas (Bern, 2015).

Una de las limitaciones del tratamiento de la enfermedad de Chagas es la alta tasa de efectos adversos asociada a estos fármacos, las reacciones adversas son una causa frecuente de suspensión del tratamiento, pudiendo presentarse hasta en el 40% de los pacientes tratados con benznidazol y el 61% de los tratados con nifurtimox (Carrillero *et al.*, 2011; Murcia *et al.*, 2012).

Los principales efectos adversos del benznidazol son dermatológicos, usualmente erupciones cutáneas leves que responden bien al uso de antihistamínicos. También se puede presentar dermatitis severa o exfoliativa asociada con fiebre y linfadenopatía, en esto casos el tratamiento debe interrumpirse de inmediato; de igual manera si se presenta una neuropatía periférica. Está es casi siempre reversible pero puede durar meses. Raras veces puede ocurrir supresión de la médula ósea, se recomienda suspender el tratamiento (Pinazo *et al.*, 2010; Chatelain, 2015; Bern, 2015).

El Nifurtimox, un nitrofurano, inhibidor de la síntesis de ácido pirúvico y altera el metabolismo de los carbohidratos de *T. cruzi*; también presenta varios efectos alternos cómo lo son problemas gastrointestinales: anorexia, pérdida de peso, náuseas y vómitos; estos ocurren hasta en un 70% de los pacientes. Los efectos tóxicos neurológicos incluyen irritabilidad, insomnio, desorientación y temblores; raramente se presentan problemas más serios cómo parestesias, polineuropatía y neuritis periférica (Jackson *et al.*, 2010).

Una farmacocinética reciente mostró que el benznidazol se eliminaba significativamente más rápido en grupos de pacientes jóvenes respecto a los de mayor edad, manteniendo su eficacia a pesar de que los niveles de fármaco en la sangre eran menores; planteando la posibilidad de que el bajo contenido de benznidazol en adolescentes disminuye los efectos adversos (Altcheh, *et al.*, 2014)

Debido a la efectividad dispar y efectos adversos de los fármacos de primera línea, la comunidad científica se ha dado a la tarea de buscar nuevas opciones de tratamiento, tales como un compuesto nuevo con el cual se ha experimentado llamado paullone, que consiste en moléculas híbridas de calcona, que actúa sobre el parásito inhibiendo las ciclinas dependientes de quinasas, es más selectivo, lo que permite aminorar los efectos adversos (Ryczak *et al.*, 2013). También se ha evaluado la actividad tripanosomicida de los NBPMs (por las siglas en inglés de nitrobenzyl phosphoramide mustards), los cuales fueron desarrollados como agentes quimioterapéuticos y que consisten en un grupo anitrobenzil unido a la fosforamida citotóxica de la mostaza. Estos agentes cuentan con una buena selectividad, pues actúan sobre la enzima nitrorreductasa tipo 1, que está ausente en la mayoría de los organismos eucariotas (Buchanan-Kilbey *et al.*, 2013). Un estudio demostró que las 5,7-diaril- 2,3-dihidro-1,4-diazepinas (diarildiazepinas), moléculas sintetizadas por ciclo condensación a partir de flavonas sustituidas con etilendiamina, poseen actividad contra *T. cruzi*; incluso una de las diarildiazepinas mostró una reducción de la proliferación de epimastigotes (una etapa de los insectos de la familia Trypanosomatidae) significativamente mayor que el benznidazol (Menezes *et*

*al.*, 2015). Derivados del indazol han sido estudiados como tratamiento al mal de Chagas; su mecanismo de acción consiste en una reducción electroquímica, a partir de la cual se forman radicales nitro- anión. Se han realizado ensayos clínicos con azoles antifúngicos como el posaconazol y ravuconazol, los cuales revelaron la inferioridad de estos medicamentos en comparación con el benznidazol; a su vez, se están llevando a cabo estudios con compuestos de origen natural para analizar sus posibles propiedades tripanosomicidas. Se han postulado a las moléculas de los terpenoides como opciones terapéuticas con menos efectos adversos y más efectividad contra la tripanosomiasis; estos compuestos son fundamentales en algunas especies de plantas como mecanismo de defensa contra herbívoros y microorganismos potencialmente patógenos (Díaz *et al.*, 2012; Ramírez *et al.*, 2012; Borges *et al.*, 2012).

Otra de las alternativas evaluadas actualmente, son las combinaciones del tratamiento tradicional con antifúngicos, en particular aquellas entre azoles -como posaconazol y ravuconazol- con el benznidazol. Un ejemplo de esto es el ensayo clínico STOP CHAGAS, que evalúa el tratamiento con posaconazol (400 mg (dos veces al día), por 60 días), benznidazol (200 mg b.i.d. por 60 días) y una combinación de posaconazol (400 mg b.i.d., por 60 días) con benznidazol (200 mg b.i.d. por 60 días) y su efecto en la presencia de *T. cruzi* en la sangre de pacientes con enfermedad crónica sin compromiso cardíaco. Aún se esperan los resultados de este estudio (Urbina *et al.*, 2015).

### **Prevalencia en México**

En 1978 se realizó en el estado de Oaxaca el primer estudio en México para determinar anticuerpos contra *T. cruzi* (Ac anti-*T. cruzi*) en donadores de sangre, y se obtuvo una seroprevalencia de 4.4% (Goldsmith *et al.*, 1978). En 1989 se reportó el primer caso de transmisión por transfusión sanguínea (Salazar-Schettino *et al.*, 1989).

Se han realizado diversos estudios seroepidemiológicos en distintas regiones del país, entre ellos el trabajo llevado a cabo en 1991 con una muestra de 3,419 donadores de sangre, procedentes de 12 municipios rurales y de ocho hospitales urbanos en el

estado de Jalisco, que reveló una seroprevalencia de 1.28% (Trujillo-Contreras *et al.*, 1993). En el banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología, localizado en el Distrito Federal, se informó en 1992 y 1999 una seroprevalencia de 0.28% y 0.3% respectivamente (Ramos-Echeverría *et al.*, 1993; Monteón-Padilla *et al.*, 1999). En el banco de sangre de Cuernavaca, en el estado de Morelos, en 1998; se documentó el más alto porcentaje informado para un área urbana hasta la fecha con una seroprevalencia de 17%, y un estudio en donadores de sangre de 18 estados del país reveló una seroprevalencia general de 1.5% (Rangel *et al.*, 1998; Guzmán-Bracho *et al.*, 1998). Debe considerarse que todos los productos sanguíneos de un donador seropositivo a *T. cruzi* son infectantes. Monteón-Padilla *et al.* (1999) detectaron ADN del parásito en las fracciones de células rojas y plaquetas de las unidades de sangre de donadores seropositivos a *T. cruzi*. Según la Encuesta Nacional Serológica (Velasco-Castrejón *et al.*, 1992) hay personas seropositivas a *T. cruzi* y triatomos transmisores en todo el país, excepto en la Ciudad de México, pero los análisis de donadores de sangre en Médica Sur, por ejemplo, indican una seropositividad al 0.32% de 8,356 donadores (Baptista *et al.*, 2004).

Anteriormente se creía que la enfermedad de Chagas no existía en Norteamérica y el norte de México, debido a la escasez de reportes (Hotez *et al.*, 2012). La enfermedad se ha hecho frecuente en áreas no endémicas, donde se transmite por vía sanguínea. Estudios recientes han encontrado una seropositividades de hasta 2.8%, como en el estudio realizado en donantes de sangre del Hospital de Cardiología del Instituto Mexicano del Seguro Social en Monterrey, Nuevo León, mediante técnicas de inmunoensayo enzimático y hemaglutinación indirecta, donde se analizaron 1,000 muestras de sangre de hemodonadores sanos. De los cuales el 2.59% (21/809) eran habitantes de Nuevo León, mientras que el 3.07% (2/65) y 3.96% (5/126) eran de Coahuila y Tamaulipas, respectivamente (Galaviz *et al.*, 2009). Molina Garza *et al.* en 2014 registró una seropositividad del 1.93% para Nuevo León, donde el 22.85% de los pacientes registro anomalías cardiacas. Debido a la continua migración de individuos de zonas rurales a los centros urbanos en busca de mejores condiciones de vida, éstos últimos incorporan poblaciones serológicamente positivas, la mayoría de

ellos asintomáticos que ignoran su padecimiento, lo que incrementa el riesgo de transmisión de la infección por la vía connatal y transfusional, constituyendo las principales causas de contagio en grandes ciudades.

### **Extractos de plantas contra parásitos**

Cáceres *et al.* (1998) prepararon extractos a partir de 13 plantas nativas de Guatemala utilizadas para el tratamiento de las infecciones por protozoos. Se evaluó *in vitro* su efecto sobre epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*. Cinco de las plantas analizadas mostraron actividad en contra de *T. cruzi in vitro* y / o *in vivo* a una concentración de 2 mg/mL.

Luize *et al.* (2005) describieron el análisis de extractos a partir de 19 especies de plantas usadas en la medicina tradicional brasileña para el tratamiento de diversas enfermedades. Los extractos se ensayaron frente a amastigote axénicos, promastigotes de *Leishmania amazonensis* y epimastigotes de *T. cruzi in vitro* a una concentración de 100 mg/mL. *Baccharis trimera* (Less), *Cymbopogon citratus* (Staps), *Matricaria chamomilla* (L.), *Mikania glomerata* (Sprengel), *Ocimum gratissimum* (L.), *Piper reginelli* (Miq.), *Prunus domestica* (L.), *Psidium guajava* (L.), *Sambucus canadensis* (L.), *Stryphnodendron adstringens* (Mart.), *Tanacetum parthenium* (L.) y *Tanacetum vulgare*(L.) tuvieron efectos significativos contra los parásitos, con porcentajes de inhibición del crecimiento de entre el 49.5 y el 99%. Los extractos a su vez no mostraron efecto citotóxico sobre eritrocitos de oveja.

Cardoso y Soares, en 2010 estudiaron al citral que es el principal constituyente del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, lo añadieron a cultivos de *T. cruzi* en medio TAU3AAG para observar el efecto sobre el proceso de diferenciación de epimastigotes a tripomastigotes (metacicloogénesis). Los resultados mostraron que el citral (20 µg/mL) no afectó la viabilidad de los epimastigotes o no inhibió el proceso de diferenciación. Las concentraciones superiores a 60 µg/mL, causaron la muerte celular al 100%, tanto de epimastigotes y formas tripomastigotes. Se observó además, que en la fase de epimastigotes que se incubaron a 30 µg/mL de citral eran viables y capaces de adherirse

al sustrato, pero se presentó un 50 % de inhibición en la metacicloogénesis a una concentración de alrededor de 31µg/mL. Por otra parte, los tripomastigotes metacíclicos obtenidos *in vitro* fueron susceptibles a citral el cual inhibió un 50% de las células con un CI<sub>50</sub> de 24.5 mg/mL en 24 h por lo tanto, el citral parece ser un buen candidato para ser estudiado como un posible fármaco.

Se evaluó la actividad anti-*Giardia* de extractos fenólico ricos en aceites esenciales obtenidos de *Thymbra capitata* (L.), *Origanum virens* (L.), *Thymus zygis* subsp. *sylvestris* (Loefl.) quimiotipo timol y *Lippia graveolens* (Kunth) plantas aromáticas. Los efectos se evaluaron en el crecimiento del parásito, la adherencia, la viabilidad de las células, y la morfología. Los aceites esenciales probados inhibieron el crecimiento de *Giardia lamblia* (Kunstler). El aceite esencial de *T. capitata* fue el más activo seguido por *O. virens*, *T. zygis* subsp. *sylvestris* y *L. graveolens* aceites. Los aceites esenciales probados en CI<sub>50</sub> (71 a 257) g/mL inhibieron la adhesión parásito (p <0,001) desde la primera hora de incubación y fueron capaces de inhibir a casi el 50% de la población de parásitos en una manera dependiente del tiempo. Las principales alteraciones ultraestructurales promovidas por los aceites esenciales fueron deformaciones en la apariencia típica del trofozoíto, como deformaciones en la superficie dorsal y ventral irregular, presencia de vesículas en membrana, precipitados electrodensos en citoplasma y núcleo y la internalización de los flagelos y el disco ventral. Los datos sugirieron que los aceites esenciales pudieron inducir la muerte celular probablemente por los procesos asociados a la pérdida de la osmorregulación causada por las alteraciones en la membrana plasmática. Los experimentos revelaron que los aceites esenciales no presentaron efectos citotóxicos en las células de mamíferos. En conclusión, los aceites esenciales de *T. capitata*, *O. virens*, *T. zygis* subsp. *Sylvestris* quimiotipo timol, y *L. graveolens* presentaron actividad anti-*giardial in vitro* y parece que tienen potencial para el tratamiento de la enfermedad parasitaria causada por el protozoo *G.lamblia* (Manchado *et al*, 2010).

Pérez *et al.* (2012) enfocaron sus investigaciones en los aceites esenciales, que se han utilizado con éxito en el tratamiento de enfermedades causadas por protozoos. Analizaron aceites esenciales obtenidos a partir de 42 especies de plantas que

demonstraron actividad contra los protozoos; se estudiaron 16 especies de la familia Lamiaceae, mostrando efectos anti protozoarios. Otras familias de plantas demostraron efectos terapéuticos como Verbenaceae, Asteraceae y Piperaceae con Annonaceae. El timol fue el componente principal en ocho especies, seguido de Eugenol y Terpinen-4-ol, que se encontraron en cuatro especies, y Carvacrol y Alcanfor, que se identificaron en tres y dos especies, respectivamente.

En 2017, Avalos *et al.*, determinaron el efecto “*in vitro*” del extracto hidroalcohólico de las hojas de matico, *Piper aduncum*, sobre los tripomastigotas de *Trypanosoma cruz* iC1 obtenidos por metaciclologénesis a partir de epimastigotas. Se observó inmovilidad en las tres concentraciones empleadas (0.5 mg/mL, 0.96 mg/mL y 1.90 mg/mL) en proporción directa con la concentración: a mayor concentración mayor inmovilidad.

El uso de extractos naturales parece ser un área de oportunidad para el tratamiento de la enfermedad con efectos secundarios cada vez menores.

### **Identificación de compuestos activos.**

El desarrollo de la técnica de ionización por nano-electroaspersión (nanp-ESI) ha ampliado considerablemente el uso de la ionización en el laboratorio analítico de espectrometría de masas. Uno de las características notables de la nano-ESI es el tamaño extremadamente bajo de muestra necesaria para el análisis; unos pocos microlitros de solución de analito ( $10^{-5}$ - $10^{-8}$  M) son suficientes para la determinación del peso molecular y sus referencias estructurales por MS / MS. No solo el tamaño de muestra es una ventaja, sino también el flujo mínimo que soporta, el bajo caudal del solvente afecta también la formación de los iones, siendo posible analizar más fácilmente por esta técnica que por ionización normal. Es posible detectar oligosacáridos, glucósidos así como las glicoproteínas, así como el análisis de complejos no covalentes pulverizados directamente en soluciones acuosas (Karas *et al.*, 2000).

## **JUSTIFICACIÓN**

Debido a las complicaciones del tratamiento con nifurtimox y benznidazol, este estudio se centra en investigar nuevas alternativas contra el parásito, como es el uso de metabolitos secundarios de extractos de plantas de uso medicinal, que no presenten efectos secundarios en las personas seropositivas, así como determinar las fracciones activas.

## **HIPÓTESIS**

Los extractos de plantas de uso medicinal tienen un efecto tripanosomicida en los protozoarios a nivel experimental.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la actividad tripanosomicida de extractos de plantas de uso medicinal sobre la(s) cepa(s) de Nuevo León en laboratorio.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Evaluar la actividad tripanosomicida de extractos de plantas medicinales para seleccionar las de mejor dosis inhibitoria.
- Determinar dosis letales 50, LD<sub>50</sub> de extractos sobre el parásito.
- Identificar los metabolitos con actividad antripanosomicida mediante cromatografía por ionización por nanoaspersión.
- Evaluar la dosis letal 50 de los compuestos identificados mediante citometría de flujo.

## MATERIAL Y MÉTODO

### Descripción general del área de estudio

El estado de Nuevo León está en el noreste de la República Mexicana y tiene una superficie de 64,220 km<sup>2</sup>, el 3.3% del total del país. Está limitado al norte y al este por Tamaulipas; al sur y al oeste por San Luis Potosí y Zacatecas respectivamente; y al norte por Coahuila, Tamaulipas y el estado norteamericano de Texas. Las coordenadas geográficas de sus extremos son: al norte 27° 49' y al sur 23° 11' de latitud norte. Al este 98° 26' y al oeste 101° 14' de longitud oeste. Cuenta con 4, 653,458 habitantes, el 4.1 % del total del país (INEGI, 2013).

El 68% del estado presenta clima seco y semiseco, el 20% cálido subhúmedo se encuentra en la región perteneciente a la Llanura Costera del Golfo Norte, el 7% es templado subhúmedo y se localiza en las partes altas de las sierras y el restante 5%, presenta clima muy seco hacia la Sierra Madre Occidental. La temperatura media anual es alrededor de 20°C, la temperatura máxima promedio es de 32°C y se presenta en los meses de mayo a agosto, la temperatura mínima promedio es de 5°C y se presenta en el mes de enero. La precipitación media estatal es de 650 mm anuales, las lluvias se presentan en verano en los meses de agosto y septiembre (INEGI, 2017).

La superficie estatal forma parte de las provincias: Sierra Madre Oriental, Grandes Llanuras de Norteamérica y Llanura Costera del Golfo Norte. En la ciudad de Monterrey, está el cerro de la Silla con 1,800 msnm y hacia el sur hay una serie de sierras conformadas por rocas de origen sedimentario dónde se encuentra el cerro El Morro con 3,710 msnm, que es la mayor altitud del estado.

Al norte hay extensos lomeríos, interrumpidos por algunas sierras aisladas, que forman valles entre serranías, localmente se les denomina potreros como San José de la Popa. Asimismo, hay una gran llanura conocida como población Anáhuac, la altura más baja es de 100 metros y se localiza al este en el límite con el estado de Tamaulipas.

## Colectas

### Material vegetal

Para el desarrollo de esta investigación se utilizará la parte aérea de las plantas bajo estudio. La colecta del material vegetal se realizará dentro del estado de Nuevo León para aquellas plantas que su distribución abarca hasta esta entidad federativa. En el caso de plantas que no sea posible coleccionar dentro del estado se especificará la zona donde serán coleccionadas. Posterior a la colecta del material vegetal, se preparará una muestra para herbario, tomando en cuenta que la muestra posea flor, hoja y tallo y en caso de ser necesario el fruto, la cual será llevada a identificar por parte del Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

## Extractos

### Descripción y uso medicinal de las plantas

#### *Cymbopogon citratus* (Zacate limón)

Familia: Gramineae

Descripción botánica y hábitat: Son hierbas comúnmente conocidas como zacates, llegan a medir hasta 2 m de altura, que forman grandes matas. Las hojas son muy aromáticas y alargadas como listones, ásperas, de color verde claro que brotan desde el suelo formando matas densas. Las flores están agrupadas en espigas y se ven dobladas al igual que las hojas. Es originaria del sur de India y Ceylán y está presente en climas cálido, semicálido y templado desde el nivel del mar hasta los 2200 msnm. Frecuentemente cultivada en huertos familiares, está asociada a bosques tropicales



caducifolio, su caducifolio, y perennifolio, matorral xerófilo, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña, bosques de encino y de pino (Fig. 2).

Usos: El más extendido es para aliviar el dolor de estómago; además de desórdenes del aparato digestivo, como vómito, mala digestión,

Fig. 2. Zacatelimón

diarrea y como des inflamatorio estomacal. Para el tratamiento de estos casos, se emplean las hojas en cocimiento administradas por vía oral (Medicina tradicional mexicana UNAM, 2014).

### ***Haematoxylum brasiletto* (Palo de Brazil)**

Descripción botánica y hábitat: Es un árbol de 7 a 15m de altura. Las ramas con espinas duras de 1 a 3cm de largo. Tiene su corteza café claro a rojiza y el centro del tallo es café muy oscuro a rojo intenso. Las hojas, dispuesta como moños (opuestas) están divididas en seis hojuelas. Tiene racimos de flores amarillas, muy vistosas, ligeramente desiguales en tamaño. Los frutos son legumbres aplanadas más largas que anchas y no abren al madurar; sus semillas son alargadas. Originaria del norte de Granada, España, que habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado. Es una planta silvestre y está asociada a bosques tropicales caducifolios y subcaducifolio,



matorral xerófilo, así como a bosques espinoso, mesófilo de montaña, de encino y de pino (Fig. 3).

Fig. 3. Palo de Brazil

Usos: En padecimiento del sistema cardiovascular; para la presión arterial, que cursa con ritmo cardíaco acelerado y mareos o desmayos. Para regular la presión arterial, para purificar la sangre y el corazón (posiblemente males

cardíacos). Para los riñones, males renales y mal de orín.

Malestares digestivos como derrames de bilis, dolor de estómago, mal de los dientes, úlcera gástricas y cuando hay dolor de bazo (Medicina tradicional mexicana UNAM, 2014).



### ***Marrubium vulgare* (Marrubio)**

Familia: Labiatae

Descripción botánica y hábitat: la malva del sapo es una planta que dura más de 1 año, y mide de 30 a 90 cm de altura, está generalmente cubierta con un bello espeso y

Fig.4. Marrubio

blanquecino, tiene tallos cuadrados. Habita en clima cálido, semicálido, semiseco y templado (Fig. 5).

Usos: se emplea comúnmente para tratar la bilis, otros padecimientos de tipo digestivo son la disentería, el empacho y el dolor de estómago. Se dice que actúa como purgante, anti gastrálgica, y para expulsar parásitos intestinales (Medicina tradicional mexicana UNAM, 2014).

### ***Schinus molle* (Pirul)**

Descripción botánica y hábitat: Árbol de 15m de altura, siempre verde con ramas colgantes, aromático resinoso, con tronco grueso. Las hojas divididas en hojitas como plumitas, las flores pequeñas, color crema, frutos globosos y de color rojo rosa. Planta originaria de Perú, que está presente en climas cálido, semicálido, semiseco y templado desde los 900 hasta los 3900msnm. Planta silvestre que crece a orilla de caminos, adaptada a distintos hábitats en matorral xerófilo, pastizal, zona de transición entre bosque mesófilo de montaña y bosque de encino, bosque de pino, mixto de pino-encino y bosque de juníferos (Fig. 6).

Usos: En el baño de temazcal (baño de vapor). Baños de las parturientas. Por otro lado, se le usa cuando se padece cólico, dolor de estómago, estreñimiento y en casos de bilis. En dolor de muelas o dientes, dientes picados y para endurecer las encías se aplica la savia. Como antirreumático y casos de artritis, e inflamación de las articulaciones. Para



cicatrizan heridas, contra algunos malestares o enfermedades respiratorias, como la tos, tuberculosis, asma y enfriamiento. Para enfermedades venéreas como la blenorragia o gonorrea. Para tratar los ojos irritados por conjuntivitis y evitar las cataratas. Se aconseja su uso para várices, resfrío de paridas, esterilidad femenina, enfermedades genitourinarias, aljorra, hongos, fiebre, bilis, paludismo y tejidos

Fig.5. Pirul.

desplazados (Medicina tradicional mexicana UNAM, 2014).

## **Obtención del extracto**

### **Preparación del material vegetal para la extracción**

Posterior a la colecta y la identificación del material vegetal, se procederá a secar las plantas utilizando el calor producido por focos de halógeno de 90 watts, tratando de obtener una temperatura de 30°C. Al estar las plantas secas, se mantendrá una supervisión de las mismas, identificando aquellas que estén infectadas con hongos, las cuales serán desechadas. Posteriormente se realizará el molido de las partes aéreas de la planta, tallos y hojas, con ayuda de un molino manual. El material vegetal molido se depositará en un cartucho de celulosa (Cartucho Whatman 33 X 80 mm), el cual se sellará con un tapón de fibra de vidrio para la extracción Soxhlet, donde se depositarán de 50 a 60 gramos de planta por cartucho. El cartucho con el material vegetal se introducirá en el extractor Soxhlet para dar inicio a la extracción, en la cual se utilizará como solvente de extracción 600 mL de metanol, previamente destilado.

El extracto obtenido, se filtrará por medio de una filtración rápida utilizando un papel filtro pre-doblado Whatman grado 2V de 150 mm, después se evaporará el solvente haciendo uso de un Rotavapor Buchi R-205, logrando finalmente un extracto semisólido o sólido libre de solvente. Los extractos obtenidos se etiquetarán y se evaluarán los rendimientos de cada planta, previo a realizar la prueba biológica de los extractos crudos.

### **Preparación del Medio LIT para cultivo de T cruzi**

Se prepararán 1000 mL de medio LIT (medio infusión de hígado y triptosa), enriquecido con 25mg de hemina y 100mL de suero bovino en 1000mL de agua bidestilada. Los parásitos se crecerán hasta la fase exponencial, a una concentración de un millón de parásitos/mL, contados en la cámara de Neubauer, para iniciar el experimento.

### **Ensayo in vitro de la actividad de la plantas anti-T. cruzi.**

Se realizará una solución stock de cada extracto metanólico de 15 mg, disueltos en dimetilsulfoxido 1% (DMSO) e incubados por 24 h. Los bioensayos se realizarán por duplicado en una placa de ELISA de 96 pozos con 200 µL de la suspensión del medio con parásitos/extracto a diferentes concentraciones (150 µg/mL, 75 µg/mL, 37.5 µg/mL, 18.75 µg/mL, 9.37 µg/mL, 4.68 µg/mL). Como control positivo se utilizará nifurtimox (Sigma Aldrich, Cat. 45-N3415) a 10 mg/mL y medio de cultivo con parásitos para el control de la viabilidad. Como blanco se utilizará medio de cultivo sin parásito.

La viabilidad de las células se evaluará por el método colorimétrico (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide (MTT, Sigma Aldrich, Cat. 45-M2128) en el cual se agregarán 10 µL en cada pozo (0.5 mg/mL), se incubarán a 27°C por 96 h. La extracción del formazan se realizará con duodecil sulfato de sodio al 10% (SDS)-0.01 N HCl. La microplaca se incubará por 6 horas a temperatura ambiente.

El número de epimastigotes vivos se determinará por el valor de la absorbancia (DO) en un lector de placas Biochrome (ASYS-UVM 340 HD, Cambridge, UK) a 570 nm. De la solución stock extracto/parásito, con sus diluciones, se separarán 50 µl para observar la actividad tripanosomicida de los extractos, con la ayuda de una cámara de Neubauer. Los resultados se expresarán como la concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>), que corresponde a la concentración a la cual ocurre el 50 % de muerte celular. La citotoxicidad se categorizará en los siguientes tres niveles:

- Citotóxico, para los extractos con CI<sub>50</sub> menores de 50 µg/mL;
- Medianamente citotóxicos, para extractos con CI<sub>50</sub> entre 51 y 100 µg/mL, y
- Levemente citotóxicos, para aquéllos con CI<sub>50</sub> por encima de 100 µg/mL, de acuerdo al criterio de Muelas-Serrano *et al.* (2000); Sülsen *et al.* (2006).

#### **8.2.3.4. Ensayo de toxicidad en *Artemia salina*.**

El ensayo consistió en exponer grupos de larvas a las 48 h después de eclosionar, a las mismas concentraciones de extracto que se utilizaron contra *T. cruzi* (1 000 µg/mL, 750 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL y 100 µg/mL) durante 24 h a temperatura ambiente y bajo régimen continuo de luz. Primero, se prepararon placas de 96 pozos, se añadió a cada uno 200 µL de agua de mar suplementada con extracto de levadura y con diluciones del extracto correspondiente. Posteriormente, se transfirieron 10 larvas a cada

pozo. Al finalizar las 24 h de exposición, se contabilizó el número de organismos muertos y se realizó una prueba PROBIT. Las larvas se consideraron muertas si no exhibían movimiento durante varios segundos de observación al microscopio estereoscópico. El experimento se consideró válido si el porcentaje de mortalidad en los controles no excedió de 10 % (Fernández-Calienes Valdez *et al.*, 2009).

### **Identificación de compuestos.**

#### **Cromatografía por capa fina.**

Para separar los compuestos presentes en los extractos se realizó cromatografía de capa fina, se utilizaron placas de sílica gel en soporte (TLC Sílica gel 60 Sigma Aldrich). La observación de la separación de los compuestos se realizó bajo la luz visible y ultravioleta (365 nm), en este último caso con el empleo de una lámpara portátil. Se realizó una separación mediante una fase móvil (v/v) de cloroformo: metanol (8:2) absolutos, tras evaluar las fracciones se conservó la que presentó una actividad tripanosomicida mayor. (Murillo *et al.*, 2006; Volonté & Quiroga, 2013; Mijares *et al.*, 2014).

#### **Ionización por nanoelectroaspersión.**

La identificación se llevó a cabo con un espectrómetro de masas Modelo Q-tof Premier con interface nanoelectrospray (Waters) acoplado a un sistema de nanocromatografía bidimensional modelo nano Acquity; se utilizó una columna cromatografía atlantis 150mm x 0,75 micras, 1.7 micras de tamaño de partícula. La corrida se realizó con una elución: agua/Acetonitrilo 40/60 en 10 min, tiempo total de corrida de 15 minutos. Los datos se analizaron con el programa Waters *MassLynx*<sup>TM</sup> Software. Una vez identificados los compuestos se evaluarán contra una cepa de *T. cruzi* de referencia y contra la cepa de *T. cruzi* regional.

#### **Citometría de flujo.**

Una vez determinados los compuestos con actividad tripanosomicida, se realizaron los retos contra *Trypanosoma cruzi* CL Brener GFP, cepa de referencia. Se evaluó la actividad anti-proliferaría mediante recuento por citometría de flujo con el equipo CyAn<sup>TM</sup> ADP Analyzer (DakoCytomation) a flujo constante (Preset: 20500, que

corresponde a 800 -1200 eventos por segundo) y tiempo constante (1 minuto por muestra). Al momento de adquirir las muestras, éstas se diluyeron al tercio (100  $\mu$ L: 200  $\mu$ L) en buffer PBS 1X -glucosa 1% p/v y se agregaron 2  $\mu$ L de yoduro de propidio 200  $\mu$ g/mL, un agente intercalante de ácidos nucleídos no permeable que se utiliza como marcador de integridad de membrana y por lo tanto de viabilidad celular. Se excitan a 488nm. Los eventos se discriminaron de acuerdo al patrón de dispersión frontal de luz (“forward-scatter”) que se visualizaron en un gráfico de puntos “forward-scatter” en función de la granulosidad de la muestra (“side-scatter”) ambos en escala logarítmica, mientras que la fluorescencia de GFP y de yoduro de propidio se detectaron a  $\lambda_{em}$ = 530/40 en escala lineal y a  $\lambda_{em}$ = 613/20 en escala logarítmica, respectivamente. Los datos fueron procesados con el programa Summit v4.3 (Dako Colorado, Inc) y el análisis de los mismos se realizó en batch con el software FlowJo 7.6.5 (TreeStar, Inc.) (Charquero-Bermejo, 2014).

### **6.3 Citotoxicidad con macrófagos.**

La toxicidad del compuesto sobre los macrófagos fue evaluada mediante un ensayo colorimétrico, viabilidad por sal de tetrazolium. La absorbancia de las sales de formazan producto del metabolismo del tetrazolium fue medida a 450nm/630nm con el lector de placas EL 800 (Biotek). La línea celular de macrófagos de ratón J774 se cultivó en un humidificadora 5% de CO<sub>2</sub>/ 95% presión atmosférica a 37°C en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10% (v / v), penicilina 10 U / mL y estreptomycin 10  $\mu$ g / mL (Benítez *et al.*, 2016)

#### **Viabilidad celular por el método de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT).**

La prueba se realizó en una solución de  $1 \times 10^6$  párasito/mL, se cultivaron en medio LIT y se colocaron en una microplaca con un volumen final de 200  $\mu$ L. Se incubaron a 27°C por 96 h. Posteriormente, se evaluó la viabilidad celular mediante la formación de cristales de formazán, por medio del método de la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Cho *et al.*, 2016).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La concentración de los extractos de plantas que inhiba el crecimiento de los cultivos se realizó a través de análisis de regresión dosis-respuesta para obtener los valores de la  $CL_{50}$  (Concentración inhibidora requerida para el 50%) representados por el programa Prism 6 (GraphPack Software, Inc., San Diego, CA). La actividad tripanosomicida se expresó como porcentaje de lisis de formas epimastigotas de *T.cruzi* ( $\pm$ SD). Los ensayos se llevaron a cabo al menos en tres repeticiones por cada extracto con cinco dosis distintas tres eventos independientes, a fin de seleccionar la mejor  $DI_{50}$ .

## RESULTADOS

El extracto completo *H. brasiletto* fue el que tuvo mayor rendimiento con 21.3%; en orden decreciente se encontró a *S. molle* (17.8 %), *M. vulgare* (16.3 %), y finalmente, *C. citratus* (14.8 %) Fig. 6



**Fig. 6.** Obtención del extracto mediante reflujo en sistema Soxhlet.

El extracto de *H. brasiletto* presentó la mayor actividad inhibitoria contra *T. cruzi* a una concentración de 1 mg/mL (90 %) con una CI<sub>50</sub> de 0.543 mg/mL. Este fue seguido por el extracto de *M. vulgare*, el cual también presentó buena actividad tripanosomicida (CI<sub>50</sub>= 0.647) con baja toxicidad en *A. salina*. Aunque el extracto de *C. citratus* fue el menos tóxico en el modelo de *Artemia*, éste no presentó una buena actividad tripanosomicida; los extractos restantes tampoco mostraron una toxicidad notable anti *T. cruzi* (Cuadro 1). Con los controles positivos, la CI<sub>50</sub> del nifurtimox (10µg/mL) presentó una inhibición del 80 % de los parásitos. En los controles negativos no se encontró efecto sobre los epimastigotes de *T. cruzi*.

Cuadro 1  
Evaluación *in vitro* de la actividad tripanosomicida de los extractos metanólicos de plantas y su toxicidad en modelo de *Artemia salina*.

Especie de planta	Parte estudiada	<i>Trypanosoma cruzi</i>		<i>Artemia salina</i>
		% inhibición	CI <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub>
<i>Haematoxylum brasiletto</i>	Corteza	90	0.543 (0.446-0.635)	2.412(1.731-4.659)
<i>Cymbopogon citratus</i>	Aérea	2	1.21 (1.05-1.40)	3.148(2.129-6.300)
<i>Marrubium vulgare</i>	Aérea	84	0.647 (0.521-0.776)	2.115(1.554-3.974)
<i>Schinus molle</i>	Hojas	68	0.827 (0.712-0.957)	2.279(1.648-4.368)
Nifurtimox (Control)	NA	80	NA	NA

% de inhibición = porcentaje de inhibición a 1 mg/mL

CI<sub>50</sub> = Concentración inhibitoria (mg/mL) que causa la muerte celular del 50 % de los protozoarios a intervalo de confianza del 95 %.

NA = No Aplica

La fracción Fr22 de *H. brasiletto* presentó una  $CI_{50}$  de 0.238 mg/mL (IC = 0.174-0.301), la cual fue incluso más eficiente que el extracto completo (Cuadro 2). Por lo cual esta fracción fue la única seleccionada para determinar el ensayo de citotoxicidad en linfocitos humanos para determinar la selectividad de la misma. Esta fracción Fr22, a dosis de 0.6 mg/mL (la más concentrada) presentó un porcentaje de viabilidad de linfocitos del 81 %. Mientras que el efecto inhibitorio medio de la fracción Fr22 contra los epimastigotes, se presentó a los 0.24 mg/mL, la cual fue marcadamente menor respecto al efecto citotóxico.

Cuadro 2  
Desafíos de las fracciones de *Hematoxylum brasiletto* contra *T. cruzi*.

Región <sup>1</sup>	Concentración inhibitoria <sup>2</sup>	Dosis en mg/mL	IC al 95 %
Fr21	$CI_{80}$	0.627	0.530-0.784
	$CI_{50}$	0.372	0.306-0.454
Fr22	$CI_{80}$	0.493	0.415-0.614
	$CI_{50}$	0.238	0.174-0.301

<sup>1</sup>Fr21 = Fracción a tiempo de retención de 0.25, Fr22 = Fracción a tiempo de retención de 0.8.

<sup>2</sup> $CI_{50}$  = Concentración mínima para inhibir el 50 % de los parásitos.

$CI_{80}$  = Concentración mínima para inhibir el 80 % de los parásitos.

IC = Intervalo de confianza

Posterior a la separación y selección de la fracción con mayor actividad tripanosomicida se procedió a identificar los compuestos presentes mediante la técnica de ionización por nano electroaspersión (figs. 7, 8 y 9). Se encontraron 3 compuestos principalmente, el ácido gálico, ácido caféico y ácido ferúlico (Cuadro 3.).

Cuadro 3.

Compuestos identificados en la fracción Fr 22 (con mayor actividad tripanosomicida)

		Precursor <i>m/z</i>	Tiempo de retención.
<b>Ácidos benzoicos y derivados</b>	Ácido gálico	154, 178, 309	2.79min
<b>Ácidos hidroxicinámico y derivados</b>	Ácido caféico	178, 179	7.99min



Fig. 7 .Cromatógrafo por ionización por nano electroaspersión.

Fig. 8. Espectro de absorción. Karla 11b. 148. 2.79.Ácido Gálico

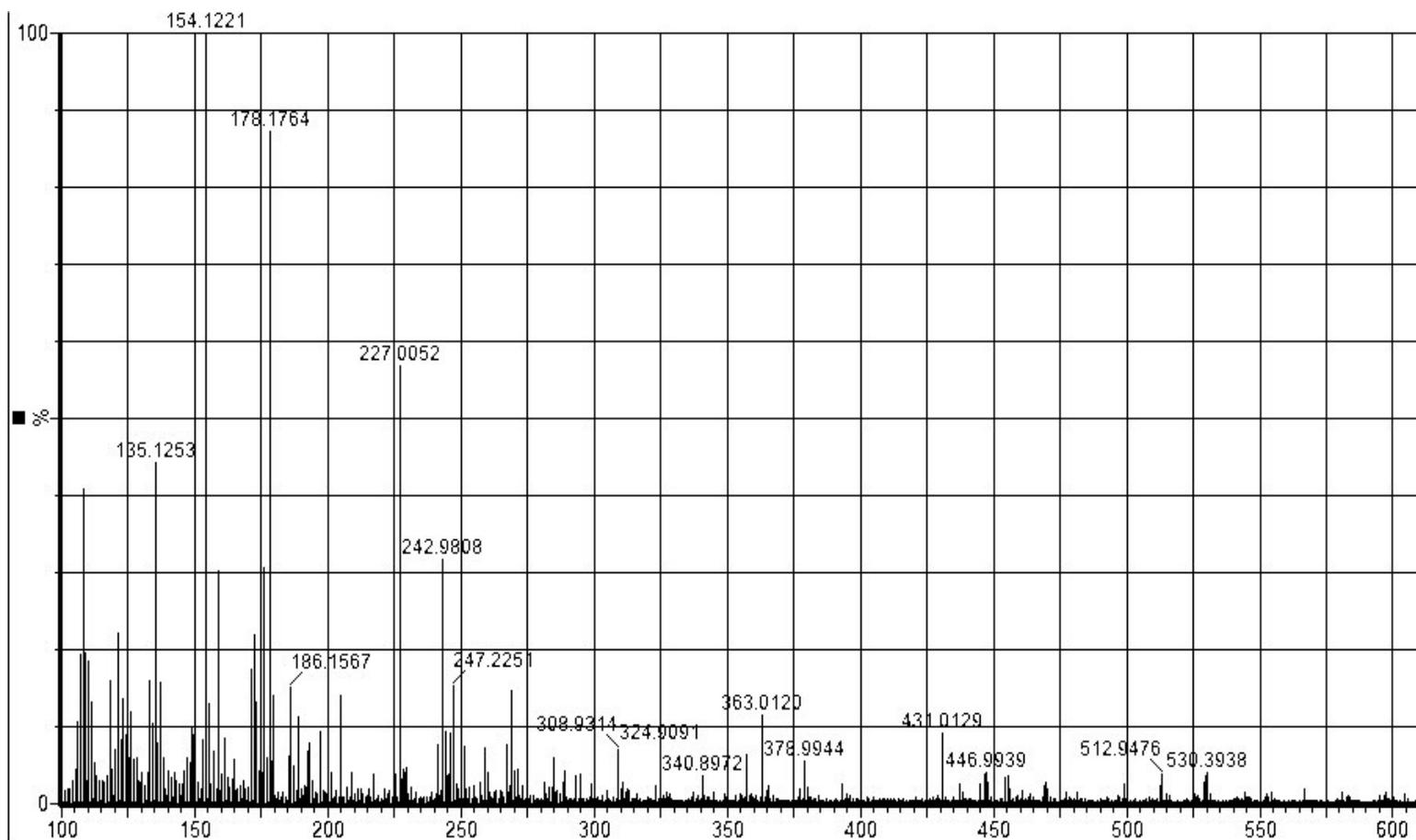
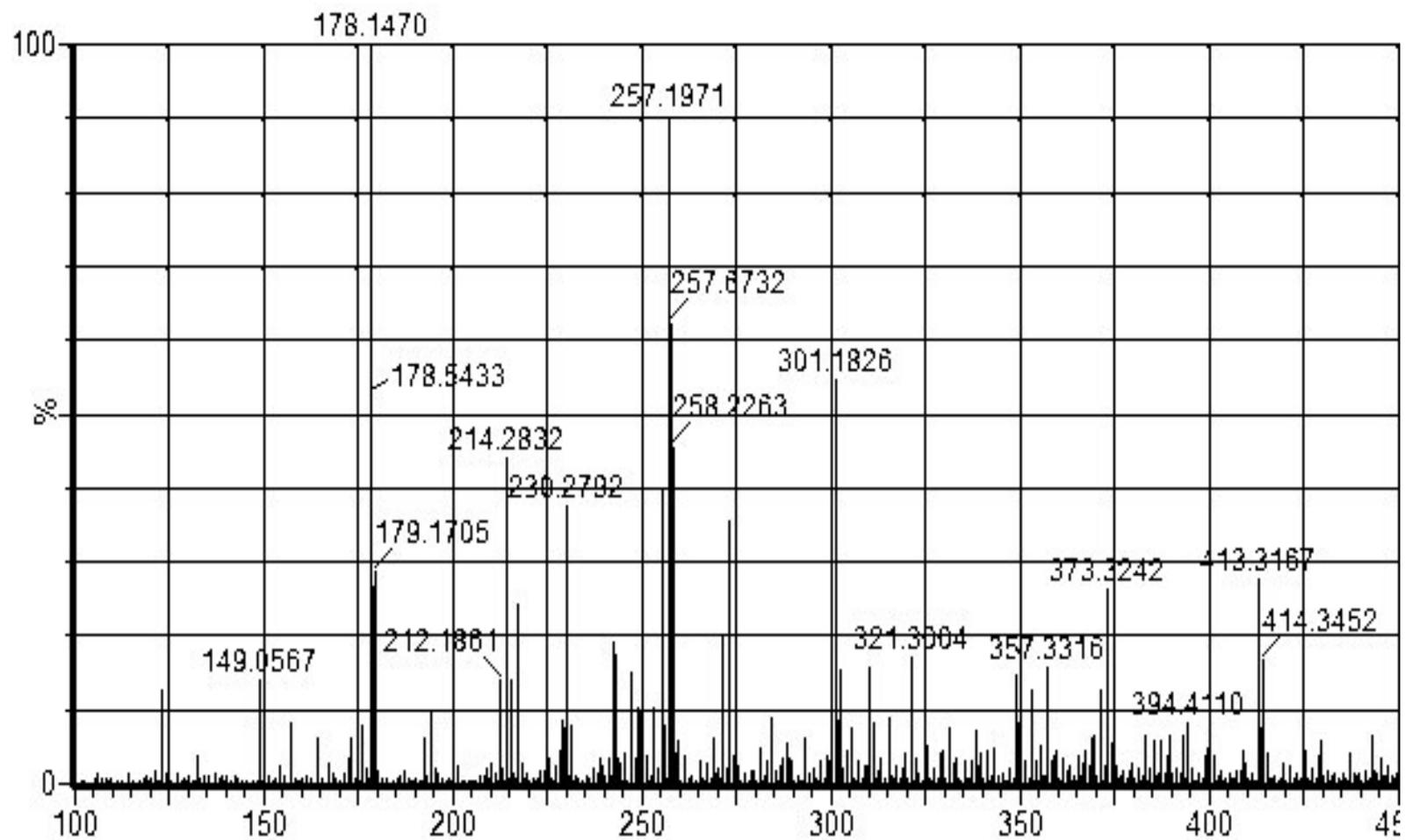
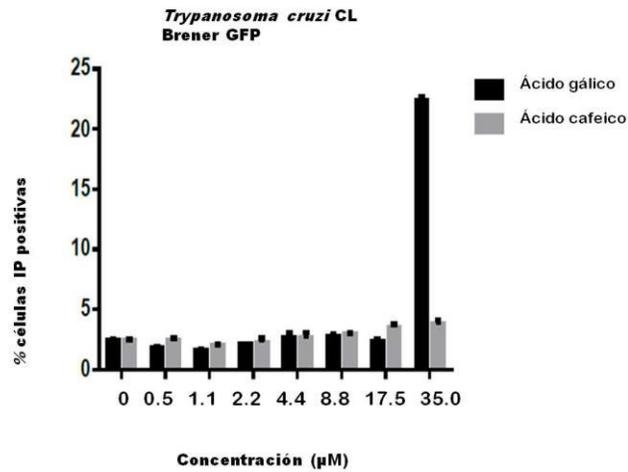


Fig. 9. Espectro de absorción. Karla 7.486. 7.99. Ácido cafeico.



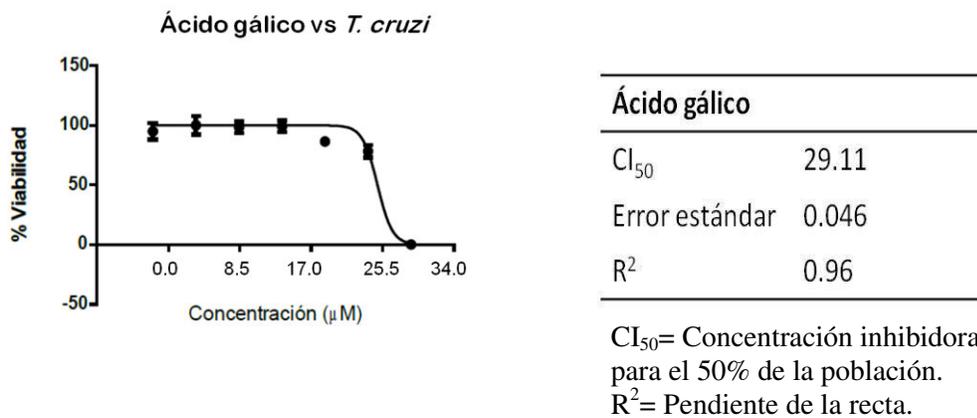
La actividad tripanosomicida del ácido gálico y ácido cafeico fue evaluada según el porcentaje de células IP positivas (Fig. 10).

Fig. 10. Grafico de porcentaje de células necróticas de *T. cruzi* a diferentes concentraciones de los compuestos activos.



El porcentaje de células IP para el ácido cafeico no representó una actividad importante, por lo que se procedió a evaluar la  $CI_{50}$  del ácido gálico (Fig. 11).

Fig. 11. Gráfico de la viabilidad celular de *T. cruzi* a diferentes concentraciones de ácido gálico y tabla de  $CI_{50}$ .



Se realizó el análisis de citotoxicidad del ácido gálico para descartar efectos dañinos en células humanas (Cuadro 4)

Cuadro 4.

Análisis de citotoxicidad del ácido gálico sobre una línea de macrófagos murinos.

<b>Ácido gálico.</b>		
<b>Conc ( <math>\mu</math>M)</b>	<b>% citotoxicidad</b>	<b>SD</b>
<b>100</b>	0.9	0,8
<b>20</b>	0.0	0,9
<b>5</b>	-0.3	1,2
<b>0.5</b>	-1.3	0,6

SD= Desviación estándar.

El compuesto no presentó toxicidad a concentraciones hasta 4 veces mayores a la  $CI_{50}$  contra *T. cruzi*. La actividad tripanosomicida sobre una cepa regional del estado de Nuevo León fue evaluada contra los compuestos para ver si existía alguna variación mediante la técnica del MTT. La  $CI_{50}$  fue de 0.014 (0.08 $\mu$ M) y 0.055 (0.3 $\mu$ M) mg/mL para el ácido gálico y ácido caféico, respectivamente.

## DISCUSION

Los extractos de plantas con antecedentes de uso medicinal han sido un referente constante en el tratamiento de la enfermedad de Chagas debido a los efectos adversos del benznidazol y el nifurtimox, hasta el momento los únicos medicamentos aprobados por la OMS (Cuhna *et al.*, 2003; Paveto *et al.*, 2004; Abdel-Sattar, *et al.*, 2010). Desde que se observó que existe una correlación positiva entre la actividad tripanosomicida contra epimastigotes *in vitro* y la actividad contra tripomastigotes *in vivo*, el uso de epimastigotes para estimar la actividad tripanosomicida se ha difundido rápidamente (Abe *et al.*, 2002).

El extracto de *S. molle* ha sido utilizado ampliamente como repelente de insectos, incluyendo para *Triatoma infestans*, vector de la enfermedad de Chagas, identificándose hasta 65 compuestos con actividad repelente, como son el limoneno, eucaliptol y terpenos; sin embargo, su uso antiparasitario se ha restringido solo al extracto completo (Ferrero *et al.*, 2006; González & Chopa, 2006; Abdel-Sattar *et al.*, 2010; Molina-Garza *et al.*, 2014). Del extracto de *M. vulgare* se han identificado cinco compuestos de una fracción polar con actividad anti-inflamatoria no esteroidea: el ácido cafeoil-L-málico, verbascosido, forsitosida, arenariosido y ballotetrosido; de los cuales sólo los dos primeros compuestos se han reportado con actividad antibiótica importante (Sahpaz *et al.*, 2002). Otros 29 compuestos identificados con actividad biológica en el aceite esencial de *C. citratus* incluyen principalmente al mirceno, citronelal, R-limoneno, citral y  $\beta$ -citronelol, que presentan una buena actividad individual contra *T. bruceibrucei* (Kpoviessi *et al.*, 2014). Sin embargo, no han sido probados contra *T. cruzi*, lo cual abre nuevas expectativas para futuros estudios y determinar si el efecto será igual de efectivo. Anteriormente el extracto de palo de Brasil ha sido evaluado en diferentes microorganismos; en 2005 Heredia *et al* probaron su eficacia contra la inhibición del crecimiento, la adherencia, así como de la producción de verotoxinas de *E. coli* en un modelo de células HeLa Así mismo se probó su capacidad antibiótica contra diversas cepas bacterianas, como: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*, además de una eucariota, *Candida albicans*; con resultados prometedores para el uso del extracto contra microorganismos,

así mismo se realizó la primera caracterización del extracto, identificando ocho compuestos principales: hematoxilina, brazileina, ácido caféico, metil galato, ácido gálico florogluciol, ácido 4-hidroxicianimico y el 5-metiloxipsoraleno (Rivero-Cruz, 2008). Sin embargo es hasta 2014, cuando Molina-Garza *et al.* realizaron una evaluación del extracto completo de *H. brasiletto* contra una cepa de *T. cruzi*, se encontró un efecto inhibitor a una  $CI_{50}$  de  $7.92\mu\text{g/mL}$ , sin identificar el compuesto activo. Retomando el efecto inhibitor del extracto de palo de Brasil en *T. cruzi*, en el presente estudio se probó nuevamente el extracto, además se realizó la identificación del compuesto con dicha actividad, se reportó que el ácido gálico a dosis de  $23\mu\text{M}$  podía inhibir el crecimiento del parásito.

La identificación de los compuestos presentes en la fracción Fr22, que fue la que mostró mayor actividad tripanosomicida, se realizó mediante ionización por nano electroaspersión, una técnica útil en la identificación de compuestos pues permite analizar los espectros de masas de la misma. En base a los mismos y comparando los tiempos de retención de los compuestos pudimos encontrar la presencia de ácido gálico y ácido cafeico (Cuyckens & Claeys, 2004; Vallverdu´-Queralt *et al.*, 2010; Lambert *et al.*, 2015)

Los ácidos fenólicos poseen una actividad antioxidante ampliamente conocida, además poseen actividad antibiótica, causan en general una inhibición en el crecimiento de diversas especies de bacterias que incluyen tanto aerobias como anaerobias, Gram-positivas y Gram-negativas (Reguant *et al.*, 2000). Estos compuestos han sido probados contra una cepa de *T. cruzi* así como de *T. brucei* y *Leishmania donovani*; en general el ácido caféico no tuvo actividad inhibitoria contra *T. cruzi* a una concentración  $>30\mu\text{g/mL}$ , sin embargo el ácido gálico presentó una actividad sobre el crecimiento del parásito a una concentración de  $67\mu\text{g/mL}$ , si bien no representa el mejor compuesto contra el protozoario de los probados, deja entrever su efecto (Tasdemir *et al.*, 2006). La  $CI_{50}$  registrada en este estudio para la cepa de referencia fue de  $23\mu\text{M}$ , equivalente a  $3900\mu\text{g/mL}$ , concentración que supera en mucho la reportada por Tasdemir *et al.*, en 2006; mientras que la  $CI_{50}$  para la cepa regional fue de  $0.08\mu\text{M}$ ,  $14\mu\text{g/mL}$ , menor a la registrada por el autor. Sin embargo en dicho estudio no se especifica la naturaleza de la cepa en la que fue probado el compuesto, ya que en nuestro estudio el compuesto fue

probado con una cepa de referencia altamente virulenta, la CL Brener, es posible que debido a la alta variabilidad de las cepas de *T. cruzi* hayamos tenido esta resistencia, así como la susceptibilidad a la cepa regional. Si bien la  $CI_{50}$  obtenida en esta investigación parece desalentadora en la cepa de referencia, cabe recalcar que la citotoxicidad para la línea celular de macrófagos murinos resultó ser muy baja, puesto que el porcentaje de células muertas a la concentración máxima probada de  $100\mu\text{M}$  fue del 0.9, mientras que la  $CI_{50}$  del nifurtimox se encuentra en los  $180\mu\text{M}$ , lo que nos hace suponer que es posible administrar este compuesto sin riesgo a la salud, pero a su vez abre nuevas oportunidades de investigación y desarrollo de estrategias para su administración y mecanismos de acción, así como la posibilidad de realizar mezclas entre los dos compuestos reportados, para analizar si existe un sinergismo entre ellos.

## CONCLUSION.

Se evaluaron cuatro plantas con alto potencial tripanosomicida, siendo las de marcada actividad *H. brasiletto* y *M. vulgare*, que han reportado actividad antibiótica antes, el extracto de *S. molle* también ha sido considerado con una buena actividad bactericida, sin embargo en este estudio fue menor a la esperada, el mismo caso de *C. citratus* una planta con muchos reportes de actividad, no obstante en este trabajo presento inclusive un efecto de proliferación sobre los parásitos.

Se identificaron los compuestos presentes en la fracción del extracto metanólico completo de palo de Brasil con mayor actividad tripanosomicida, el ácido gálico y el ácido caféico, ambos ácidos fenólicos derivados de taninos tienen además de actividad antioxidante, antiinflamatoria y antibacteriana, actividad anti-*T.cruzi*, siendo el ácido gálico el que presento una mayor actividad.

Se evaluó la acción del ácido gálico contra cepas de *T. cruzi* de diferente región, contra una cepa de referencia con marcada virulencia proveniente de Argentina se determino una  $CI_{50}$  de  $23\mu M$ , contrario a los  $0.08\mu M$  necesarios para el 50% de inhibición en la cepa regional neolonesa, podemos concluir que existe una respuesta muy diversa de las cepas del parasito a los tratamientos, por lo que es probable que se deban realizar estrategias sectoriales para el combate de la enfermedad.

## 7 BIBLIOGRAFÍA.

- Abdel-Sattar, E., Maes, L., & Salama, M. M. (2010). *In vitro* activities of plant extracts from Saudi Arabia against malaria, leishmaniasis, sleeping sickness and Chagas disease. *Phytotherapy Research*, 24, 1322-1328.
- 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 and Pharmaceutical Bulletin*, 25, 1188-1191.
- Alteheh, J., Moscatelli G., Mastrantonio G., Moroni, S., Giglio, N., Marson, M.E., Ballering, G., Bisio M., Koren, G. & García-Bournissen, F. (2014). Population Pharmacokinetic Study of Benznidazole in Pediatric Chagas Disease Suggests Efficacy despite Lower Plasma Concentrations than in Adults. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(5),
- Angheben, A., Boix, L., Buonfrate, D., Gobbi, F., Bisoffi, Z., Pupella, S., Gandini G., & Aprili, G. (2015). Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood Transfusion*, 13 (4), 540.
- Apt, W., Heitmann, I., Jercic, M.I., Jofré, L., Muñoz, P., Noemí, I., San Martín, A. M., Sanpunar, J., Torres, M. & Zulantay I. (2008). Guías clínicas de la Enfermedad de Chagas. Parte I. Introducción y epidemiología. *Rev Chil Infect* ; 25: 189-93.
- Avalos, L., Delgado, G., González, J., Luján, C., & Escalante, H. (2017). Efecto in vitro del extracto hidroalcohólico de *Piper aduncum* sobre la supervivencia de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*. *Revista Rebiol*, 36(1), 59-64.
- Baptista, H., Santamaria, C., Cedillo, F. & Bordes, A.J. (2004). Detección de anticuerpos séricos contra el *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre. *Médica Sur*, México 11: 169-174.

- Becerril Flores, M.A. & Valle De La Cruz, A. (2003). Descripción de la enfermedad de Chagas en el Valle de Iguala Guerrero, México. *Gaceta Médica de México* 6: 539-544.
- Benítez, D., Medeiros, A., Fiestas, L., Panozzo-Zenere, E. A., Maiwald, F., Prousis, K. C., Roussaki, M., Calogerpoulou, T., Detsi, A., Jaeger, T., Sarlauskas, J., Peterlin Masic, L., Kunick, C., Labadie, G.R., Flhé, L, Comini, M.A. (2016). Identification of novel chemical scaffolds inhibiting trypanothione synthetase from pathogenic trypanosomatids. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(4), e0004617.
- Bern, C. (2015). Chagas' disease. *New England Journal of Medicine*, 373(5), 456-466.
- Borges, A.R., Aires, J.R., Higino, T.M., de Medeiros, M. de G., Citó, A.M. & Lopes, J.A., Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. *Exp Parasitol*. 2012;132(2):123-8.
- Botero, D., & Restrepo, M. (2012). Técnicas de laboratorio en parasitología médica. *Parasitosis humanas. 5ta ed. Medellín, Colombia: Corporación para investigaciones biológicas*, 694-695.
- Buchanan-Kilbey, G., Djumpha, J., Papadopoulou, M.V., Bloomer, W., Hu, L., Wilkinson, S. R. & Ashworth, R. (2013) Evaluating the developmental toxicity of trypanocidal nitroaromatic compounds on zebrafish. *Acta Trop*. 2013;128(3):701-5.
- Cáceres, A., López, B., González, S., Berger, I., Tada, I. & Maki, J. (1998). Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *J Ethnopharmacol*. 6:195-202
- Campos-Valdez, G., Canseco-Ávila, L. M., González-Noriega, F., Alfaro-Zebadua, O., Nava-Medecigo, I. Y., & Jiménez-Cardoso, E. (2016). Maternal-fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*, a health problem slightly studied in Mexico: case Chiapas. *Salud Pública Mex*, 58(3), 378-384.
- Cardoso, J., & Soares, M. J. (2010). In vitro effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 105(8), 1026-1032.

- Carrilero, B., Murcia, L., Martínez-Lage, L., & Segovia, M. (2011). Side effects of benznidazole treatment in a cohort of patients with Chagas disease in non-endemic country. *Rev Esp Quimioter.* 24, 123-26.
- Charquero-Bermejo, D. (2014). Evaluación de la actividad bioquímica y biológica anti-tripanosoma de una quimioteca. (Tesina de grado). Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Chatelain, E. (2015). Chagas disease drug discovery: toward a new era. *J Biomol Screen.* 20(1), 22-35.
- Cho, Y. H., Lee, J. W., Woo, H. D., Lee, S., Kim, Y. J., Lee, Y., Shin, S., Joung, H., & Chung, H. W. (2016). Protective effect of onion extract on bleomycin-induced cytotoxicity and genotoxicity in human lymphocytes. *nt J Environ Res Public Health.* 13, 227.
- Coura, J. R. (2007). Chagas disease: what is known and what is needed-A background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102, 113-122.
- Cucunubá, Z. M., Flórez, A. C., Cárdenas, Á., Pavía, P., Montilla, M., Aldana, R., Villamizar, K., Ríos, L. C., Nicholls, R. S. & Puerta, C. J. (2012). Prevalence and risk factors for Chagas disease in pregnant women in Casanare, Colombia. *Am J Trop Med Hyg,* 87(5), 837-842.
- Cunha, W. R., Martins, C., Ferreira, D. D., Crotti, A. E., Lopes, N. P., & Albuquerque, S. (2003). *In vitro* trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. *Planta Med,* 69, 470-471.
- Cuyckens, F., & Claeys, M. (2004). Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom,* 39(1), 1-15.
- Díaz-Chiguer, D.L., Márquez-Navarro, A., Noguera- Torres, B., de la Luz León-Ávila, G., Pérez-Villanueva, J., Hernández-Campos, A., Castillo, R., Ambrosio, J. R., Nieto- Meneses, R., Yépez-Mulia, L. & Hernández-Luis, F.(2012). *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of some benzimidazole derivatives against two strains of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 122(1):108-12
- Fernández-Calienes Valdés, A., Mendiola Martínez, J., Monzote Fidalgo, L., García Parra, M., Sariego Ramos, I., Acuña Rodríguez, D., Ramón Scull L., & Gutiérrez

- Gaitén, Y. (2009). Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 61, 254-258.
- Ferreira A W., Belem, Z.R., Lemos, E.A., Reed, S.G. & Campos-Neto, A. (2001). Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of Chagas' Disease employing a *Trypanosoma cruzi* recombinant antigen that consists of four different peptide. *J. Clin. Microbio.* 39(12): 4390–4395.
- Ferrero, A. A., González, J. W., & Chopa, C. S. (2006). Biological activity of *Schinus molle* on *Triatoma infestans*. *Fitoterapia*, 77, 381-383.
- Fumadó, V., Juncosa, T., Posada, E., Fisa, R., Gállego, M., & Gascón, J. (2014). Chagas pediátrico en zona no endémica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 32(5), 293-296.
- Galaviz, L., Arredondo, J.M. & Vielma, H. (1991). Triatominos domiciliarios en el ejido San Juan de Vaquerías, N. L. México. *Salud Fronteriza/BorderHealth* 7: 20-28
- Gamboa-León, R., Gonzalez-Ramirez, C., Padilla-Raygoza, N., Sosa-Estani, S., Caamal-Kantun, A., Buekens, P. & Dumonteil, E. (2011). Do commercial serologic tests for *Trypanosoma cruzi* infection detect Mexican strains in women and newborns? *J. Parasitol.* 97, 338–343.
- Goldsmith, R.S., Zárate, C.R. & Kagan, I.G. (1978). El potencial de transmisión en la enfermedad de Chagas por transfusión sanguínea: Hallazgos serológicos entre donadores en el estado de Oaxaca. *Salud Pública Mex.* 22: 439-44.
- Guzmán Bracho, C., García García, L., Floriani Verdugo, J., Guerrero Martínez, S., Torres Cosme, M., Ramírez Melgar, C. & Velasco Castrejón, O. (1998). Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión de sangre en México. *Rev Panam Salud Pública.* 2:94–99.
- Heredia, N., Escobar, M., Rodríguez-Padilla, C., & García, S. (2005). Extracts of *Haematoxylon brasiletto* inhibit growth, verotoxin production, and adhesion of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 to HeLa cells. *J food prot*, 68(7), 1346-1351.
- Hotez, P.J., Bottazzi, M.E., Dumonteil, E., Valenzuela, J.G., Kamhawi, S., Ortega, J., Ponce de Leon Rosales, M., Betancourt Cravioto, M. & Tapia-Conyer, R. (2012).

- Texas and Mexico: Sharing a Legacy of Poverty and Neglected Tropical Diseases. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(3): e1497
- Imai, K., Maeda, T., Sayama, Y., Mikita, K., Fujikura, Y., Misawa, K., Nagumo, M., Iwata, O., Ono, T., Kurane, I., Miyahira, Y., Kawana, A. & Miura S. (2014). Mother-to-child transmission of congenital Chagas disease, Japan. *Emerg Infect Dis*, 20(1), 146.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2017). *Conociendo Nuevo León*. Quinta edición. Recuperado de [http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos//prod\\_serv/contenido/s/espanol/bvinegi/productos/estudios/conociendo/702825213114.pdf](http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/productos//prod_serv/contenido/s/espanol/bvinegi/productos/estudios/conociendo/702825213114.pdf)
- Jackson, Y., Alirol, E., Getaz, L., Wolff, H., Combescure, C., & Chappuis, F. (2010). Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic chagas disease. *Clin Infect Dis*, 51(10), e69-e75.
- Jannin, J., & Villa, L. (2007). An overview of Chagas disease treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 102, 95-98.
- Jiménez Cardoso, E., Campos Valdéz, G., Cortes Campos, A., De la Luz Sanchez, R., Rivera Mendoza, C., Plascencia Hernández, A., Hernández Ramírez, M., Ruiz Habana, J., Bonilla González, E., Damian Matzumura, P. & Carlier, Y. (2012). Maternal fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*: A problem of public health little studied in Mexico. *Exp Parasitol* 131 (2012) 425–432 g
- Karas, M., Bahr, U., & Dülcks, T. (2000). Nano-electrospray ionization mass spectrometry: addressing analytical problems beyond routine. *Fresenius J Anal Chem*, 366(6), 669-676.
- Kpoviessi, S., Bero, J., Agbani, P., Gbaguidi, F., Kpadonou-Kpoviessi, B., Sinsin, B., Accrombessi G., Frédérick M., Moudachirou M., & Quetin-Leclercq, J. (2014). Chemical composition, cytotoxicity and *in vitro* antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. *J Ethnopharmacol*, 151, 652-659.
- Lambert, M., Meudec, E., Verbaere, A., Mazerolles, G., Wirth, J., Masson, G., Cheynier, V. & Sommerer, N. (2015). A high-throughput UHPLC-QqQ-MS method for polyphenol profiling in rosé wines. *Molecules*, 20(5), 7890-7914.

- Luize, P.S., Tiunan, T.S., Morello, L.G., Maza, P.K., Ueda-Nakamura, T., Dias-Filho, B.P., Garcia-Cortez, D.A., Palazzo-de-Mello, J.C. & Vataru-Nakamura, C. (2005). Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Braz J Pharm Sci.* 41(1), 85-94
- Manchado, M., Dinis, A.M., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Custódio, J.B.A. & Do-Céu-Sousa, M. (2010). Anti-*Giardia* activity of phenolic-rich essential oils: effects of *Thymbra capitata*, *Origanum virens*, *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*, and *Lippia graveolens* on trophozoites growth, viability, adherence, and ultrastructure. *J Parasitol Res.* 106(5), 1205-1215.
- Manne, J. M., Snively, C. S., Ramsey, J. M., Salgado, M. O., Bärnighausen, T., & Reich, M. R. (2013). Barriers to treatment access for Chagas disease in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(10), e2488.
- Menezes, J.C., Beatriz, L., de Abreu, P.M., da Silva, K., Martins, C. & Taylor, J.G. (2015). Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of diaryldiazepines. *Molecules*.20:43-51.
- Mijares-Bullaín, M., Torres-Rodríguez, E., & Hermosilla-Espinosa, R. (2014). Tamizaje fitoquímico de los extractos de *Faramaea occidentalis* (L.) A. Rich. (nabaco). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19, 421-432
- Molina-Garza, Z. J., Bazaldúa-Rodríguez, A. F., Quintanilla-Licea, R., & Galaviz-Silva, L. (2014). Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of 10 medicinal plants used in northeast Mexico. *Acta Trop*, 136, 14-18.
- Monteón-Padilla, V.M., Hernández-Becerril, N., Guzmán-Bracho, C., Rosales-Encina, J.L. & Reyes-López, P.A. (1999). American Trypanosomiasis (Chagas' disease) and blood banking in Mexico city: seroprevalence and its potential transfusional transmission risk. *Arch Med Res.* 30: 393-398.
- Moreno-Medina, E., Valerio-Campos, I., & Goyenaga-Castro, P. (2007). Miocarditis y miocardiopatía dilatada por *Trypanosoma cruzi*: Reporte de un caso. *Parasitol latinoam*, 62(3-4), 148-153.
- Muelas-Serrano, S., Nogal-Ruiz, J., & Gómez-Barrio, A. 2000. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res*, 86, 999-1002

- Murcia, L., Carrilero, B., Saura, D., Iborra, M. A., & Segovia, M. (2013). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 31, 26-34.
- Murcia, L., Carrilero, B., Viñas, P. A., & Segovia, M. (2012) Nifurtimox chemotherapy: collateral effects in treated *Trypanosoma cruzi* infected patients. *Rev Esp Quimioter*, 25, 1-3.
- Murillo, R., Castro, V., Chavarría, M., & Poveda, L. (2006). Lignanós de *Zanthoxylum acuminatum*. *Revista de Ciencia y Tecnología*, 24, 227-232.
- Noguera-Torres, B., Rodríguez-Paez, L., Baeza-Ramírez, I. & Wong-Ramírez, C. (2001).
- Novelo-Garza, B. A., Benítez-Arvizu, G., Peña-Benítez, A., Galván-Cervantes, J. & Morales-Rojas, A. (2010) Detección de *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*, 48 (2): 139-144
- Olivera Mar, A., Guillén, O. F., Cruz, V. S., Hernández, B. N., Pérez, G. E., Córdoba, C. G., Reyes, P. A. & Monteón, V. M. (2006). Serological and Parasitological screening of *Trypanosoma cruzi* infection in mothers and newborns living in two Chagasic areas of México. *Arch Med Res*. 37, 774–777.
- on *Trypanosoma cruzi*. *Rev Latinoam Microbiolo*. 43(1), 1-6.
- PAHO. (2017). Panamerican Health Organization, ultima version revisada 16 de junio 2017.
- [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=es)
- Paveto, C., Güida, M. C., Esteva, M. I., Martino, V., Coussio, J., Flawiá, M. M., & Torres, H. N. (2004). Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of green tea (*Camellia sinensis*) catechins. *Antimicrob Agents Chemothe* 48, 69-74.
- Pérez, S., Ramos-López, M. A., Sánchez-Miranda, E., Fresán-Orozco, M. C. & Pérez-Ramos, J. (2012). Antiprotozoa activity of some essential oils. *J. Med. Plants Res*. 6(15), 2901-2908.
- Pinazo, M. J., Muñoz, J., Posada, E., López-Chejade, P., Gállego, M., Ayala, E., Del Cacho, E., Soy, D. & Gascon, J. (2010). Tolerance of benzimidazole in treatment of Chagas' disease in adults. *Antimicro agents and chemother*, 54(11), 4896-4899.

- Ponce, C., Ponce, E., Vinelli, E., Montoya, A., De Aguilar, V., Gonzalez, A., Zingales, B., Rangel- Aldao, R., Levin, M. J., Esfandiari, J., Umezawa, E. S., Luquetti, A. O. & Da Silveira, JF. 2005. Validation of a rapid and reliable test for diagnosis of Chagas' disease by detection of *Trypanosoma cruzi*-specific antibodies in blood of donors and patients in Central America. *J Clin Microbiol.* 43(10): 5065-5068
- Quiroz Romero, H. 1990. Parasitología. 1ª edición, 4ª reimpresión. Editorial LIMUSA S.A. de C.V. España. pp. 76-80.
- Ramírez, I., Marín, C., Chahboun, R., Messouri, I., Olmo, F., Rosales, M. J., Gutierrez, R., Alvarez, E. & Sánchez M. (2012). *In vitro* and *in vivo* studies of the trypanocidal activity of four terpenoid derivatives against *Am J Trop Med Hyg*, 87(3), 481-488.
- Ramos-Echeverría, A., Monteón-Padilla, V.M. & Reyes-López, P.A. (1993). Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre. *Salud Publica Mex*, 35(1):56-64.
- Ramsey, J. M., Peterson, A. T., Carmona-Castro, O., Moo-Llanes, D. A., Nakazawa, Y., Butrick, M., Tun-Ku, E., De la Cruz-Félix, K. & Ibarra-Cerdeña, C. N. (2015). Atlas of Mexican Triatominae (Reduviidae: Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 110(3), 339-352
- Ramsey, J.M., Ordoñez, R., Tello-López, A., Pohls, J.L., Sanchez V. & Peterson A.T. (2003). Actualidades sobre la epidemiología de la Enfermedad de Chagas en México. In: Iniciativa para la Vigilancia y el Control de la Enfermedad de Chagas en la República Mexicana. Ramsey J.M., Tello-López A., Pohls J.L. (eds) Instituto Nacional de Salud Pública. 85–103.
- Rangel, H., Gatica, R. & Ramos, C. (1998). Detection of antibodies against *Trypanosoma cruzi* in donors from a blood bank in Cuernavaca, Morelos, Mexico. *Arch Med Res* 29: 79-82.
- Rassi, A., Amato Neto, V., Rassi, G. G., Amato, V. S., Rassi Júnior, A., Luquetti, A. O., & Rassi, S. G. (2004). A retrospective search for maternal transmission of Chagas infection from patients in the chronic phase. *Rev Soc Bras Med Trop*, 37(6), 485-489.

- Rassi, A., Rezende, J. M., Luquetti, A. O., & Rassi Jr, A. (2010). Clinical phases and forms of Chagas disease. *American trypanosomiasis (Chagas disease). One hundred years of research. 1st edition. Burlington (MA): Elsevier Inc*, 709-41.
- Reguant, C., Bordons, A., Arola, L., & Rozes, N. (2000). Influence of phenolic compounds on the physiology of *Oenococcus oeni* from wine. *J Appl Microbiol*, 88(6), 1065-1071.
- Rivero-Cruz, J. F. (2008). Antimicrobial compounds isolated from *Haematoxylon brasiletto*. *J Ethnopharmacol*, 119, 99-103.
- Rojos, M. J. (2013). Blood Safety in the XXI century. Transfusion transmitted infectious diseases. International and Mexican view. *Gac med Mex*, 150(1), 78-83.
- Rueda, K., Trujillo, J. E., Carranza, J. C., & Vallejo, G. A. (2014). Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*: una nueva situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos. *Biomédica*, 34(4), 631-41.
- Russomando, G., De Tomassone, M. M., De Guillen, I., Acosta, N., Vera, N., Almiron, M., Candia, N., Calcena, M.F. & Figueredo, A. (1998). Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*, 59(3), 487-491.
- Ryczak, J., Papini, M. A., Lader, A., Nasereddin, A., Kopelyanskiy, D., Preu, L., Charles, L., & Kunick, C. (2013). 2-Arylpauullones are selective antitrypanosomal agents. *Eur J Med Chem*, 64, 396-400.
- Salazar Schettino, P. M., Rojas Wastavino, G. E., Cabrera Bravo, M., Bucio Torres, M. I., Martínez Ibarra, J. A., Monroy Escobar, M. C., Rodas-Retana, A., Guevara-Gómez, Y., Vences-Blanco, M.O. Ruiz-Henández, A. L. & Torres Gutiérrez, E. (2010). Revisión de 13 especies de la familia Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) vectores de la enfermedad de Chagas, en México. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 1(1), 57-81.
- Salazar-Schettino, P. M., Barrera, M. & Bucio, M.I. (1989). Transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión sanguínea. Primer caso humano en México. *Revista Mexicana de Patología Clínica*. 36: 57-59.
- Sanabria- Calvo, M. (2015). Tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas. *Rev medica de costa rica y centroamerica*, 71(616), 539-544.

- Sánchez-González, G., Figueroa-Lara, A., Elizondo-Cano, M., Wilson, L., Novelo-Garza, B., Valiente-Banuet, L., & Ramsey, J. M. (2016). Cost-Effectiveness of Blood Donation Screening for *Trypanosoma cruzi* in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(3), e0004528.
- Schmunis, G. A., & Cruz, J. R. (2005). Safety of the blood supply in Latin America. *Clin Microbiol Rev*, 18(1), 12-29.
- Sosa-Estani, S., Gamboa-León, M. R., del Cid-Lemus, J., Althabe, F., Alger, J., Almendares, O., Cafferata, M.L., Chippaux, J.P, Dumonteil, E., Gibbons, L., Padilla-Raygoza, N., Schneider, D., Belizán, J. M. & Buekens, P. (2008). Use of a rapid test on umbilical cord blood to screen for *Trypanosoma cruzi* infection in pregnant women in Argentina, Bolivia, Honduras, and Mexico. *Am J Trop Med Hyg*, 79(5), 755-759.
- Storino, R., Auger, S., San Martino, M., Urrutia, M. I., & Jörg, M. (2010). Aspectos biológicos, psicológicos y sociales de la discriminación del paciente chagásico en Argentina. *Rev de Salud Pública*, 4(3), 258-269.
- Streiger, M. L., Barco, M. L. D., Fabbro, D. L., Arias, E. D., & Amicone, N. A. (2004). Longitudinal study and specific chemotherapy in children with chronic Chagas' disease, residing in a low endemicity area of Argentina. *Rev Soc Bras Med Trop*, 37(5), 365-375.
- Sülsen, V., Güida, C., Coussio, J., Paveto, C., Muschietti, L. & Martino V. (2006). *In vitro* evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine. *Parasitol Res*, 98: 370-374.
- Tasdemir, D., Kaiser, M., Brun, R., Yardley, V., Schmidt, T. J., Tosun, F., & Rüedi, P. (2006). Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(4), 1352-1364.
- Trujillo-Contreras, F., Lozano-Kasten, F., Soto-Gutiérrez, M. M. & Hernández-Gutiérrez, R. (1993). Prevalencia de infección a *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre en el estado de Jalisco. *Rev Soc Bras Med Trop* 26:89-92.
- Trypanocidal Activity of 4 Isopropyl Salicylaldehyde and 4-Isopropyl Salicylic Acid

- UNAM, 2017. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Último acceso 12 de junio 2017 <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>.
- Urbina, J. A. (2015). Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic Chagas disease: advances, challenges and perspectives. *J Eukaryot Microbiol*, 62(1), 149-156.
- Vallverdú-Queralt, A., Jauregui, O., Medina-Remón, A., Andrés-Lacueva, C., & Lamuela-Raventós, R. M. (2010). Improved characterization of tomato polyphenols using liquid chromatography/electrospray ionization linear ion trap quadrupole Orbitrap mass spectrometry and liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 24(20), 2986-2992.
- Velasco-Castrejón, O., Valdespino, J. L., Tapia, C. R., Salvatierra, B., Guzmán, B.C. & Magos, C. (1992). Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. *Salud Pública Mex*. 34: 186-96.
- Volonté, M. G. & Quiroga P. (2013). *Análisis farmacéutico, Universidad Nacional de La Plata*. Buenos Aires: Edulp.
- World Health Organization (WHO). 2017. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact sheet N°340. Updated. March 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>
- Yadon, Z. E. & Schmunis, G. A. (2009). Congenital Chagas Disease: Estimating the Potential Risk in the United States. *Am J Trop Med Hyg*. 81(6), 927–933