



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EVALUACIÓN DE SINERGISMO DE MEZCLAS DE
LUPENONA Y ÓXIDO DE CARIOFILENO CONTRA
PARÁSITOS PROTOZOARIOS**

Tesis que presenta

GLENDY MARILÚ POLANCO HERNÁNDEZ

En opción al título de

**DOCTOR EN CIENCIAS
(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)**

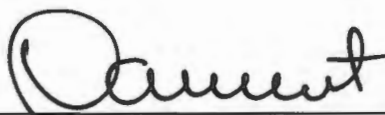
**Mérida, Yucatán, México
Febrero 2015**



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "EVALUACIÓN DE SINERGISMO DE MEZCLAS DE LUPENONA Y ÓXIDO DE CARIOFILENO CONTRA PARÁSITOS PROTOZOARIOS" fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y en el laboratorio de Biología Celular del Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", bajo la dirección de la Dra. Karla Y. Acosta Viana, dentro de la Opción Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado de Ciencias Biológicas de este centro.

Atentamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Manuel", is written over a horizontal line.

Dr. Manuel Martínez Estevez

Director de Docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México, a 13 de Febrero de 2015

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Glendy Marilú Polanco Hernández

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, el Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez y la Dra. Karla Y. Acosta Viana, por la formación profesional, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por la confianza que depositaron en mí y por su apoyo durante la realización de esta tesis.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán y a la Unidad de Biotecnología por el uso de sus instalaciones para la realización de este trabajo.

Al CIR. "Dr. Hildeyo Noguchi" por el uso de sus instalaciones para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT NO. 224260) por la beca otorgada para mis estudios de doctorado y por el programa de Becas Mixtas para Estancias en el extranjero (Bolivia, 2011 y Londres, 2013).

A las técnicas Fabiola Escalante Erosa, Karlina García Sosa y María Eugenia Rosado por su apoyo técnico y profesional durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Alberto Giménez y la Dra. Giulia Getti por su ayuda durante mi estancia en Bolivia y Londres.

A mi esposo y a mi hija por ser mis fortalezas para seguir siempre adelante y lograr esta meta.

A mis padres por su apoyo, cariño y confianza para poder alcanzar este logro.

A todos mis amigos, tanto del CICY, del Hideyo, como fuera de él, por su amistad y por sus consejos.

A todas las personas que de una u otra manera hicieron posible la realización de esta tesis.

DEDICATORIA

A mi familia....

AGRADECIMIENTOS**DEDICATORIA****ÍNDICE DE FIGURAS**

v

ÍNDICE DE CUADROS

vii

RESUMEN

1

ABSTRACT

3

CAPÍTULO I.

5

1.1 INTRODUCCIÓN

5

1.1.2 ENFERMEDAD DE CHAGAS

6

1.1.2.1 Epidemiología

6

1.1.2.2 Agente causal y su ciclo de vida

6

1.1.2.3 Manifestaciones clínicas

8

1.1.2.4 Tratamiento

8

1.1.3 LEISHMANIASIS

9

1.1.3.1 Epidemiología

9

1.1.3.2 Agente causal y su ciclo de vida

9

1.1.3.3 Manifestaciones clínicas

10

1.1.3.4 Tratamiento

11

1.1.4 MALARIA

12

1.1.4.1 Epidemiología

12

1.1.4.2 Agente causal y su ciclo de vida

12

1.1.4.3 Manifestaciones clínicas

14

1.1.4.4 Tratamiento

14

1.1.5 AMIBIASIS

15

1.1.5.1 Epidemiología

15

1.1.5.2 Agente causal y su ciclo de vida

15

1.1.5.3 Manifestaciones clínicas

16

1.1.5.4 Tratamiento

17

1.1.6 GIARDIASIS

17

1.1.6.1 Epidemiología

17

1.1.6.2 Agente causal y su ciclo de vida

17

1.1.6.3 Manifestaciones clínicas

19

1.1.6.4 Tratamiento

19

1.2 ANTECEDENTES

21

1.2.1 SINERGISMO

21

1.2.2 LUPENONA Y ÓXIDO DE CARIOFILENO

23

1.2.3 PROTEÓMICA

24

1.3 OBJETIVO GENERAL

33

1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

33

1.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

35

1.6 REFERENCIAS

36

CAPÍTULO II. EFECTO SINÉRGICO DE LUPENONA Y ÓXIDO DE CARIOFILENO CONTRA <i>Trypanosoma cruzi</i>	49
DESCRIPCIÓN DEL CAPÍTULO	49
SYNERGISTIC EFFECT OF LUPENONE AND CARYOPHYLLENE OXIDE AGAINST <i>Trypanosoma cruzi</i>	51
2.1 ABSTRACT	51
2.2 INTRODUCTION	52
2.3 MATERIALS AND METHODS	53
2.3.1 Lupenone and caryophyllene oxide	53
2.3.2 Parasites and their growth conditions	53
2.3.3 Evaluation of the <i>in vitro</i> trypanocidal activity	53
2.3.4 Evaluation of synergism	54
2.3.5 <i>In vivo</i> assay against amastigotes of <i>T. cruzi</i>	54
2.3.6 Histopathology study	55
2.3.7 Statistical analysis	55
2.4 RESULTS AND DISCUSSION	55
2.5 CONCLUSIONS	61
2.6 ACKNOWLEDGEMENTS	62
2.7 CONFLICT OF INTEREST	62
2.8 REFERENCES	63
CAPÍTULO III. ACTIVIDAD LEISHMANICIDA DE TERPENOIDES OBTENIDOS DE <i>Serjania yucatanensis</i>	67
DESCRIPCIÓN DEL CAPÍTULO	67
LEISHMANICIDAL ACTIVITY OF TERPENOIDS FROM <i>Serjania yucatanensis</i>	69
3.1 ABSTRACT	69
3.2 INTRODUCTION	70
3.3 MATERIALS AND METHODS	71
3.3.1 Caryophyllene oxide and lupenone	71
3.3.2 Culturing of <i>Leishmania</i> spp. and cell lines	71
3.3.3 Leishmanicidal assay	72
3.3.4 Evaluation of synergism	72
3.3.5 Cytotoxic activity against Vero cells	72
3.3.6 Infection of THP-1 cells with <i>Leishmania</i>	73

3.3.7 Statistical analysis	73
3.4 RESULTS AND DISCUSSION	73
3.5 ACKNOWLEDGEMENTS	78
3.6 REFERENCES	79
 CAPÍTULO IV. LA ACTIVIDAD ANTIPROTOZORIA DE LA MEZCLA DE TERPENOIDES ¿ES SELECTIVA PARA LA FAMILIA TRYPANOSOMATIDAE ?	 83
 DESCRIPCIÓN DEL CAPÍTULO	 83
 SHORT REPORT: THE ANTIPROTOZOAL ACTIVITY OF MIXTURE OF TERPENOIDES IS SELECTIVE FOR <i>TRYPANOSOMATIDAE</i> FAMILY?	 85
4.1 REFERENCES	90
 CAPÍTULO V. ANÁLISIS PROTEÓMICO DIFERENCIAL DE EPIMASTIGOTES DE <i>Trypanosoma cruzi</i> EN RESPUESTA A LA MEZCLA DE LUPENONA Y ÓXIDO DE CARIOFILENO	 93
5.1 INTRODUCCIÓN	93
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS	96
5.2.1 Estrategia general para proteómica diferencial	96
5.2.2 Exposición de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> con la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno	96
5.2.3 Preparación de los extractos de proteínas para los análisis 2D	97
5.2.4 Análisis de proteínas en 2D	97
5.2.5 Adquisición y análisis de imágenes	98
5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	99
5.4 REFERENCIAS	107
 CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES	 111
6.1 DISCUSIÓN GENERAL	111
6.2 CONCLUSIONES	117
6.3 PERSPECTIVAS	119
6.4 REFERENCIAS	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Estadios morfológicos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	7
Figura 1.2 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
Figura 1.3 Fármacos empleados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas	9
Figura 1.4 Ciclo de vida de <i>Leishmania spp.</i>	10
Figura 1.5 Fármacos empleados para el tratamiento de la leishmaniasis	12
Figura 1.6 Ciclo de vida de <i>Plasmodium</i>	13
Figura 1.7 Fármacos empleados para el tratamiento de la malaria	14
Figura 1.8 Ciclo de vida de <i>Entamoeba histolytica</i>	16
Figura 1.9 Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i>	18
Figura 1.10 Ejemplos de fármacos empleados para el tratamiento de la giardiasis	19
Figura 1.11 Estructura de la lupenona	23
Figura 1.12 Estructura del óxido de cariofileno	24
Figure 1.13 Electroforesis de doble dimensión de proteínas solubles de epimastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa CL Brener	28
Figure 1.14 Geles de doble dimensión de proteínas de <i>Trypanosoma cruzi</i> resistentes a benznidazol	29
Figure 1.15 Geles bidimensionales de proteínas de <i>Trypanosoma cruzi</i> tratados con naftoimidazoles	30
Figure 1.16 Estrategia general	35
Figure 2.1 Mice belonging to different groups	58
Figure 2.2 Survival rates of the five groups of <i>T. cruzi</i> -infected mice during the <i>in vivo</i> treatment.	58
Figure 2.3 <i>In vivo</i> antitrypanosomal activity of the different treatments, determined by the number of amastigotes nests observed in cardiac tissue from infected mice	60

Figure 2.4 <i>In vivo</i> antitrypanosomal activity of the different treatments, determined by the number of amastigotes nest observed in skeletal muscle of infected mice.	61
Figure 5.1 Esquema general de la metodología empleada para los análisis de proteómica	96
Figura 5.2 Geles 2D de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> tratados con la mezcla de terpenoides	100
Figura 5.3 Análisis de las proteínas mediante el programa PDQuest Advanced	101
Figura 5.4 Análisis comparativo mediante el programa PDQuest Advanced	102
Figura 5.5 Proteínas seleccionadas para identificación del perfil proteico de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> (control)	104
Figura 5.6 Proteínas seleccionadas para identificación del perfil proteico de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> tratados con la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno 1:4	104

ÍNDICE DE CUADROS

Table 2.1 <i>In vitro</i> trypanocidal activity (IC ₅₀ values in µg/mL) of mixtures of lupenone and caryophyllene oxide	56
Table 3.1 Leishmanicidal activity (IC ₅₀ values) of mixtures of lupenone and caryophyllene oxide	76
Table 3.2 Inhibition in the infection of THP-1 cells with <i>Leishmania tropica</i> and <i>Leishmania Mexicana</i> by mixtures of lupenone and caryophyllene oxide	77
Table 4.1 Antiprotozoal activity (IC ₅₀ values) of mixtures of lupenone and caryophyllene oxide	89
Tabla 5.1 Resumen del análisis del perfil proteico de <i>T. cruzi</i> expuestos a la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno 1:4 en comparándolo con el control	102
Tabla 5.2 Masa molecular y punto isoelectrico estimado de las proteínas seleccionadas para secuenciación	104

RESUMEN

Las enfermedades infecciosas y en particular las parasitarias como la leishmaniasis, la enfermedad de Chagas, la malaria y la amibiasis son consideradas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como algunas de las principales causas de muerte en el mundo. En la actualidad, los tratamientos empleados para tratar estas enfermedades parasitarias son insatisfactorios, por lo que se enfatiza la importancia en la búsqueda de nuevos y más eficientes fármacos. Dos de las estrategias que se siguen para el desarrollo de nuevos medicamentos son la terapia combinada y la proteómica; la primera se basa en la evaluación del efecto sinérgico de combinaciones de metabolitos bioactivos, en tanto que la segunda está dirigida hacia la búsqueda de nuevos blancos proteicos para el diseño de fármacos.

Recientemente se reportó la presencia de actividad tripanocida en el extracto de hojas de *Serjania yucatanensis*. La purificación biodirigida del extracto bioactivo de la planta resultó en la obtención de una mezcla de lupenona y óxido de cariofileno como la responsable de la actividad tripanocida y con capacidad de inhibir la salida de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* de células infectadas. Con base en lo anterior, en este trabajo se llevó a cabo la evaluación de la actividad antiprotozoaria de mezclas con diferentes proporciones de lupenona y óxido de cariofileno y se realizaron estudios de proteómica diferencial de doble dimensión para la identificación de potenciales proteínas blanco en *T. cruzi*.

La actividad antiprotozoaria detectada en la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno 1:4 permitió confirmar el efecto sinérgico de esta mezcla contra *T. cruzi*, *L. amazonensis* y *L. braziliensis*. También se encontró que, la mezcla de terpenoides en proporción 1:4, reduce el número de nidos de amastigotes de *T. cruzi* en tejido cardíaco y músculo esquelético e inhibe la infección de macrófagos con *Leishmania* spp.

Los estudios de proteómica diferencial realizados mediante el análisis de cambios en los patrones de expresión de proteínas en respuesta a la exposición de la mezcla de terpenoides, permitieron establecer que la mezcla de terpenoides 1:4 provoca cambios significativos en el patrón de expresión de proteínas de *T. cruzi*; observándose 291 proteínas en el testigo y 198 en el tratamiento; siendo la expresión

de algunas de estas proteínas totalmente abatidas, otras sobreexpresadas y algunas aumentan o disminuyen sus niveles de expresión.

ABSTRACT

The infectious disease and particularly the parasitic as leishmaniasis, chagas disease, malaria and amebiasis are considered by the WHO as the main causes of death worldwide. To date, the chemotherapeutic agents used for treating these diseases are unsatisfactory, and this fact emphasizes the importance of searching for new effective pharmaceuticals. Two strategies followed for the development of new drugs are the combined therapy and proteomics; the first is based on the evaluation of the synergistic effect of combinations of bioactive metabolites, while the second is directed toward finding new targets for drug design.

Recently, reported the presence of trypanocidal activity in the leaf extract of *Serjania yucatanensis*. The bioassay-guided purification of the bioactive crude extract resulted in the identification of a mixture of lupenone and caryophyllene oxide as that responsible for the trypanocidal activity; and able to inhibit the egress of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from infected cells. Based on the above, in this study was carried out the evaluation of the antiprotozoal activity of mixtures with different proportions of lupenona and caryophyllene oxide and were performed studies of differential proteomics for identify potential proteins target in *T. cruzi*.

The antiprotozoal activity was showed for the 1:4 mixture of lupenona and caryophyllene oxide confirming the synergistic effect of this mixture against *T. cruzi*, *L. amazonensis* and *L. braziliensis*. Also, the 1:4 mixture of terpenoids reduced the presence of amastigote nests in cardiac tissue and skeletal muscle and inhibit the macrophages infection with *Leishmania* spp.

The studies of differential proteomics made by analysis of changes in the pattern of expression of proteins in response to exposure of the mixture of terpenoids allowed to establish that the 1:4 mixture of terpenoids causes significant changes in the protein profile of *T. cruzi*; 291 spots were observed in the control y 291 spots in the treatment, being the expression of some proteins totally shot down, others were overexpressed and some other proteins increase or decrease their expression level.

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas y parasitarias están consideradas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como la segunda causa de muerte en el mundo después de las enfermedades cardiovasculares (WHO, 2008; Jemal *et al.*, 2003).

Las enfermedades parasitarias causadas por protozoarios como la leishmaniasis, la tripanosomiasis americana, la malaria y la amibiasis afectan a miles de millones de personas y causan aproximadamente 1.4 millones de muertes por año, por lo que son consideradas como las principales causas de enfermedad y de miseria. En la mayoría de los países tropicales han sido clasificadas por la OMS como enfermedades huérfanas o descuidadas (WHO, 2011). En México, al igual que en el resto del mundo, las infecciones por protozoos son consideradas como responsables de una gran tasa de morbilidad y mortalidad (Secretaría de Salud, 2014).

Los parásitos protozoarios son organismos unicelulares con diversos y complejos ciclos de vida que involucran distintos hospederos y requieren de adaptaciones bioquímicas rápidas para diferentes ambientes (Cuervo *et al.*, 2011). Sin embargo, y a pesar de su importancia como problema de salud, el desarrollo de medicamentos para combatir enfermedades causadas por parásitos protozoarios, como la tripanosomiasis, la leishmaniasis, la malaria, la amibiasis y la giardiasis, es limitado debido a que estas afectan, principalmente, a personas en regiones pobres del mundo. En la actualidad, la mayoría de los medicamentos utilizados para tratar estas parasitosis presentan limitaciones, como la resistencia a los medicamentos de primera generación (WHO, 2014; da Cunha *et al.*, 2010). Adicionalmente, muchos de los fármacos utilizados para el tratamiento de estas enfermedades son tóxicos y presentan efectos secundarios severos (Castro y Montalvo, 2006; Rodríguez-Coura y de Castro, 2002). Por esta razón, la OMS estableció como prioritaria la búsqueda de nuevos y más eficientes fármacos antiparasitarios (WHO, 2010).

1.1.2 ENFERMEDAD DE CHAGAS

1.1.2.1 EPIDEMIOLOGÍA

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es uno de los problemas de salud pública más importantes en el continente Americano; esta enfermedad se distribuye principalmente desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina y Chile; sin embargo, en las últimas décadas se ha detectado en Canadá y en países de Europa y del Pacífico, debido principalmente a la movilidad de la población entre América Latina y el resto del mundo (WHO, 2014).

Actualmente se estima que existen 25 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad de Chagas. Adicionalmente, se calcula que cerca de 7 a 8 millones de personas están infectadas con *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) y que de 6 a 8 millones tienen o tendrán alguna manifestación clínica (WHO, 2014). En México se calcula que existen más de 1.7 millones de personas infectadas (Ramsey *et al.*, 2014).

Aun cuando la transmisión del parásito se ha controlado en la mayor parte de América del Sur, la enfermedad continúa siendo endémica en diversas regiones de México; en todos los estados de la República Mexicana se han reportado casos con enfermedad de Chagas y en la Península de Yucatán se han detectado tasas de seroprevalencia de 15.6% en la población en general, y de un 0.70% en donantes de sangre (García-Montalvo, 2011; Cruz y Pickering, 2006).

1.1.2.2 AGENTE CAUSAL Y SU CICLO DE VIDA

La enfermedad de Chagas es causada por *Trypanosoma cruzi*, un protozoario hemoflagelado que presenta cuatro estadios morfológicos: epimastigote, tripomastigote metacíclico, tripomastigote sanguíneo y amastigote (Figura 1.1). El tripomastigote metacíclico es la forma no replicativa, infectiva para el mamífero o humano, presenta una forma alargada y mide aproximadamente de 20 a 25 μm de longitud; el tripomastigote sanguíneo es la forma infectiva para el insecto vector, que se encuentra en la sangre circulante de las personas o animales infectados, especialmente en los períodos agudos o iniciales de la infección. Por otro lado, el epimastigote es la forma replicativa, no infectiva para el humano o mamífero, y que se

encuentra en el vector invertebrado, es de aspecto fusiforme con 20 a 25 μm de longitud, se multiplica en el intestino medio de los triatominos para dar lugar a los tripomastigotes metacíclicos, y es la forma de los parásitos que se desarrolla en el medio de cultivo. El amastigote es la forma replicativa intracelular en los tejidos del hospedero mamífero, tiene la capacidad de infectar a otras células y presenta una forma redondeada que mide aproximadamente de 2 a 2.5 μm (Rodríguez *et al.*, 2008; Sierra *et al.*, 2005; Tay *et al.*, 2003; Barrera *et al.*, 2001).

El principal mecanismo de transmisión de *T. cruzi* es por medio de un insecto vector de la familia Reduviidae (WHO, 2014). Los insectos vectores se infectan al alimentarse de la sangre de un mamífero infectado que contiene tripomastigotes sanguíneos y éstos se transforman en epimastigotes en el intestino medio del triatomo. Los epimastigotes se reproducen por fisión binaria y posteriormente se transforman en tripomastigotes metacíclicos infectantes para el hombre o huésped vertebrado. El vector infectado se alimenta picando al hombre o huésped vertebrado al tiempo que defeca sobre la piel o mucosas del mamífero; cuando estas deyecciones se frotan sobre la piel, el sitio de la picadura u otro sitio lesionado se contamina y los parásitos penetran los tejidos. Una vez que los parásitos se encuentran dentro del mamífero, se introducen a las células en donde se transforman en amastigotes y se multiplican por fisión binaria hasta que lisan la célula y emergen a la circulación sanguínea convirtiéndose en tripomastigotes sanguíneos; estos últimos penetran a otras células y continúan con el ciclo, al transformarse nuevamente en amastigotes (Figura 1.2) (Rodríguez *et al.*, 2008; Tay *et al.*, 2003)

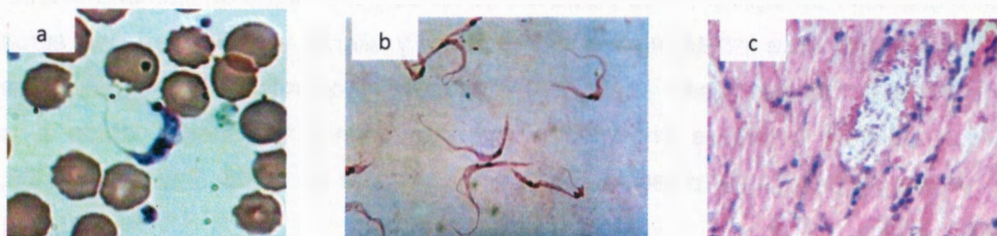


Figura 1.1. Estadios morfológicos de *Trypanosoma cruzi*: a) tripomastigote sanguíneo, b) epimastigote, c) amastigote

(tomado de: www.fcfrp.usp.br/dactb/Parasitologia/Arquivos/Genero_Trypanosoma.htm)

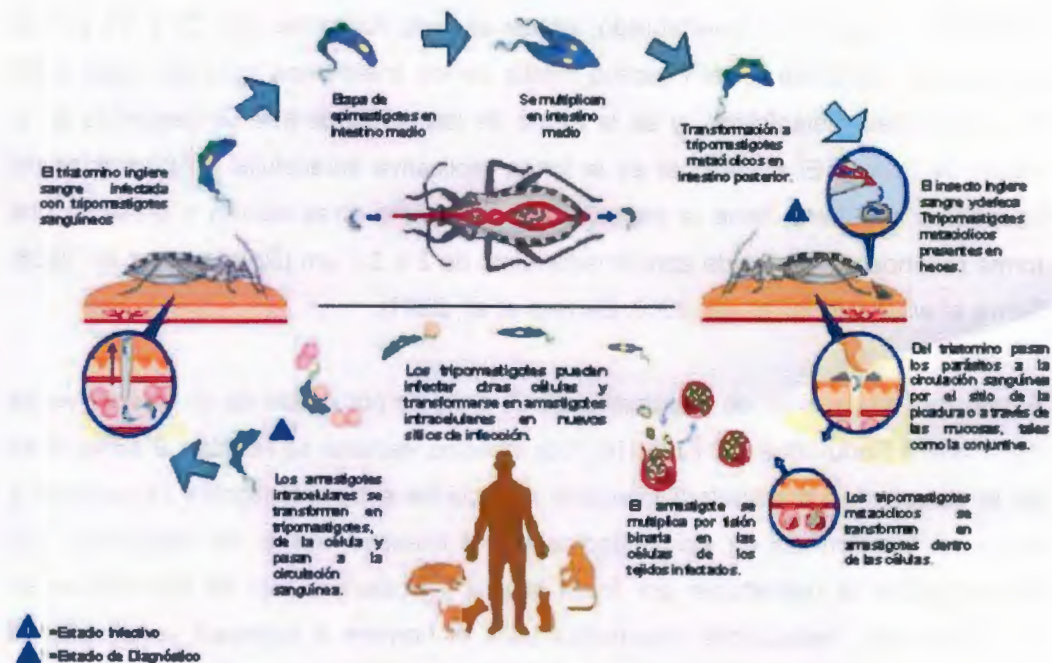


Figura 1.2. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* (tomado de: www.facmed.unam.mx/deptos/salud/periodico/chagas/cruzi.html).

1.1.2.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La tripanosomiasis americana es una parasitosis crónica que, en la mayoría de los casos, lleva a la muerte a largo plazo; comienza con una fase aguda caracterizada por un síndrome febril-infeccioso, presentándose en menos del 50% de las personas infectadas una reacción inflamatoria local conocida como chagoma de inoculación o un edema unilateral en alguno de los párpados conocido como signo de Romaña-Mazza; seguida por una fase indeterminada asintomática y silente y finaliza en una etapa crónica, en donde se puede llegar a presentar la miocardiopatía chagásica que provoca lesiones cardíacas irreversibles que conducen a la muerte debido a la destrucción progresiva del músculo cardíaco (Teixeira *et al.*, 2006; Tay *et al.*, 2003; Storino, 2002).

1.1.2.4 TRATAMIENTO

Actualmente existen dos productos aceptados para el control de la enfermedad de Chagas: nifurtimox y benznidazol (Figura 1.3); sin embargo, el tratamiento de las infecciones producidas por *T. cruzi* es considerado actualmente como uno de los más

insatisfactorios. La disponibilidad de los fármacos en algunas zonas consideradas como endémicas de la enfermedad es limitada y su eficacia, principalmente para la fase crónica, es muy baja. Adicionalmente, estos fármacos causan efectos secundarios severos como dermatitis, polineuritis, leucopenia e intolerancia gastrointestinal, y en estudios experimentales presentaron neurotoxicidad, daño testicular, toxicidad ovárica y efectos nocivos en colon, esófago y tejido mamario (da Cunha *et al.*, 2010; Castro y Montalvo, 2006; Vassia *et al.*, 2003; López-Antuñano, 1997).

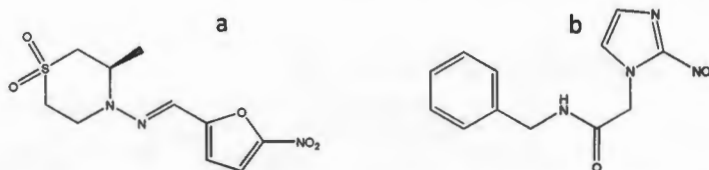


Figura 1.3. Fármacos empleados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas:
a) nifurtimox, b) benznidazol.

1.1.3 LEISHMANIASIS

1.1.3.1 EPIDEMIOLOGÍA

De acuerdo con datos de la OMS, la prevalencia mundial de la leishmaniasis es de aproximadamente 12 millones de casos, con una mortalidad anual entre 20,000 y 30,000 defunciones. Adicionalmente se estima que la enfermedad amenaza alrededor de 350 millones de hombres, mujeres y niños en todo el mundo y que cerca de 1 a 3 millones de casos nuevos ocurren cada año. La leishmaniasis se presenta en cuatro continentes y es considerada endémica en 88 países, de los cuales 72 son países en desarrollo (WHO, 2014; WHO, 2012). En México, en el 2011 se reportaron 490 casos de *Leishmania* (Sosa-Ávila *et al.*, 2014).

1.1.3.2 AGENTE CAUSAL Y SU CICLO DE VIDA

La leishmaniasis es causada por parásitos protozoarios del género *Leishmania*. Este parásito presenta dos estadios morfológicos: el promastigote, con forma alargada y que posee un flagelo que le permite el movimiento, y el amastigote que es la forma replicativa intracelular, caracterizado por tener una forma redondeada de

aproximadamente de 2 a 4 μm . Los parásitos se transmiten por la picadura de un insecto vector del género *Phlebotomus* (en el Viejo Mundo) o *Lutzomya* (en el Nuevo Mundo), el cual se infecta al picar al hospedero vertebrado, ingiriendo sangre y linfa que contiene amastigotes; el parásito pasa por el intestino del vector transformándose en promastigotes metacíclicos infectivos que son transmitidos por la picadura a otro huésped sano; en el interior del huésped los promastigotes son fagocitados por las células mononucleares y pierden su flagelo transformándose en amastigotes, los cuales se multiplican hasta provocar la lisis celular y la salida del parásito a células vecinas donde se repite el proceso (Figura 1.4) (Tay *et al.*, 2003).

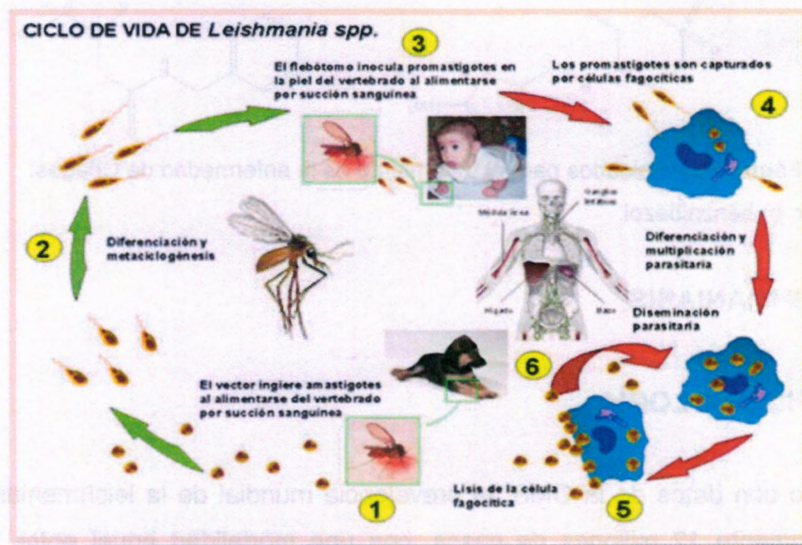


Figura 1.4. Ciclo de vida de *Leishmania* spp (tomado de: <http://www.madrimasd.org/gestion2006/img/noticias/leishmaniosis02-UAM.jpg>).

1.1.3.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La leishmaniasis puede clasificarse en cuatro principales formas:

Leishmaniasis visceral: forma más grave de la enfermedad, conocida también como kala-azar, caracterizada por episodios irregulares de fiebre, pérdida de peso, lesiones en hígado, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos, signos de anemia, oscurecimiento de la piel y distensión abdominal con hepatoesplenomegalia. Se estima que cada año se producen en el mundo entre 200,000 y 400,000 nuevos casos de leishmaniasis visceral, afectando principalmente a Bangladesh, Brasil, Etiopía, India y Sudán (WHO, 2014).

Leishmaniasis cutánea: la forma más común caracterizada por la presencia de úlceras en las zonas expuestas del cuerpo, dejando cicatrices permanentes y discapacidades graves. Aproximadamente un 95% de los casos de leishmaniasis cutánea se producen en las Américas, la cuenca del Mediterráneo, el Oriente Medio y el Asia Central y cerca de cada año se producen en el mundo entre 0.7 y 1.3 millones de casos nuevos (WHO, 2014).

Leishmaniasis cutánea-difusa: los nódulos no se ulceran pero se dispersan ampliamente por la piel y pueden dañar los tejidos profundos y producir lesiones crónicas.

Leishmaniasis mucocutánea: conocida como espundia, sus signos iniciales son eritema y ulceraciones en los orificios nasales, seguido de inflamación destructiva que puede extenderse hasta el septo nasal, perforándolo y desfigurando el rostro y bloqueando la faringe o la laringe. Aproximadamente un 90% de los casos se producen en Brasil, Bolivia y Perú (WHO, 2014; WHO, 2012; Tay *et al.*, 2003; Desjeux *et al.*, 2000).

La leishmaniasis cutánea y mucocutánea del Nuevo Mundo son causadas por miembros de las especies de *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. braziliensis*, mientras que la leishmaniasis cutánea en el Viejo Mundo es causada por *L. tropica*, *L. mayor* y *L. aethiopica*. La leishmaniasis visceral, es causada por *L. donovani* en Bangladesh, China y Sudán, por *L. infantum* en África y el sur de Europa, y por *L. chagasi* en América Latina (WHO, 2012).

1.1.3.4 TRATAMIENTO

Actualmente el principal tratamiento para la leishmaniasis se basa en el uso de antimoniales pentavalentes como el estibogluconato de sodio y el antimonio de meglumina; otros tratamientos alternativos incluyen la pentamidina, la anfotericina B y, más recientemente, la miltefosina (Figura 1.5). Sin embargo, estos fármacos, además de ser muy costosos y de requerir tratamientos prolongados, producen efectos secundarios adversos como mialgia, pancreatitis, insuficiencia renal, neuropatía, cardiotoxicidad y se ha reportado un creciente número de cepas de *Leishmania* spp. resistente a estas drogas, requiriendo el uso de fármacos más tóxicos. Por estas razones, se enfatiza la importancia del descubrimiento de nuevos y más efectivos

fármacos para tratar la leishmaniasis (WHO, 2012; da Cunha *et al.*, 2010; Sundar, 2001).

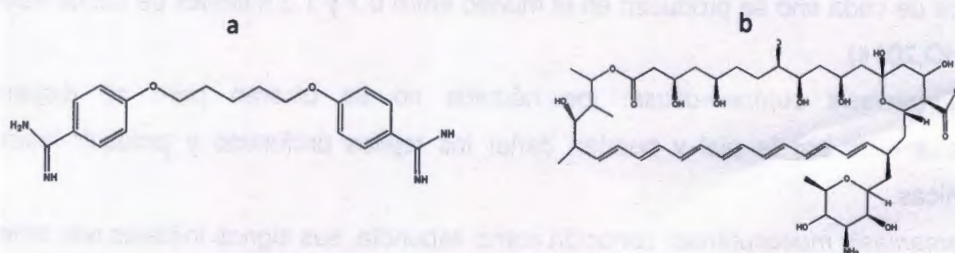


Figura 1.5. Fármacos empleados para el tratamiento de la leishmaniasis: a) pentamidina, b) anfotericina B.

1.1.4 MALARIA

1.1.4.1 EPIDEMIOLOGÍA

La malaria es una enfermedad de gran importancia en las zonas tropicales de África, Asia y América del Sur. En el 2012 se registraron aproximadamente 207 millones de casos de paludismo, el 81% de éstos en África. Ese mismo año se reportó que la malaria causó la muerte de 627,000 niños menores de 5 años y en la actualidad se estima que 3,300 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad (WHO, 2014; WHO, 2013). En México, en el 2009 se registraron 0.46% casos de malaria y se estima que 16.6% de su población se encuentra en riesgo de adquirir la enfermedad (Betanzos-Reyes, 2011).

1.1.4.2 AGENTE CAUSAL Y SU CICLO DE VIDA

La malaria es causada por parásitos protozoarios del género *Plasmodium*. En seres humanos la malaria puede ser ocasionada por cualquiera de las cuatro especies de *Plasmodium*: *P. malarie*, *P. ovale*, *P. vivax* y *P. falciparum*, siendo esta última la más grave y la que origina el mayor número de muertes. El ciclo de vida de *Plasmodium* involucra a dos hospederos, el humano y la hembra del mosquito *Anopheles*. La

infección se produce cuando la hembra del mosquito *Anopheles* inocula los esporozoitos en el humano mediante su picadura, estos esporozoitos infectan las células del hígado en donde maduran hasta convertirse en esquizontes, que posteriormente lisan los hepatocitos y se liberan los merozoitos que infectan los glóbulos rojos, dando comienzo así a los síntomas y signos clínicos de la infección.

Si el humano infectado es nuevamente picado por otra hembra del mosquito *Anopheles*, se continúa el ciclo en el mosquito hembra, en donde los gametocitos masculinos y femeninos son ingeridos por este vector, diferenciándose en su interior en gametos que al fusionarse se producen los cigotos. Los cigotos a su vez, se convierten en oocinetos móviles y alargados que invaden la pared del intestino del mosquito donde se desarrollan en ooquistes. Estos últimos crecen, se rompen y se liberan los esporozoitos que se transportan hasta las glándulas salivales del mosquito hembra *Anopheles*. La inoculación de los esporozoitos en un nuevo huésped humano continúa con el ciclo de vida del parásito (Figura 1.6) (CDC, 2012).

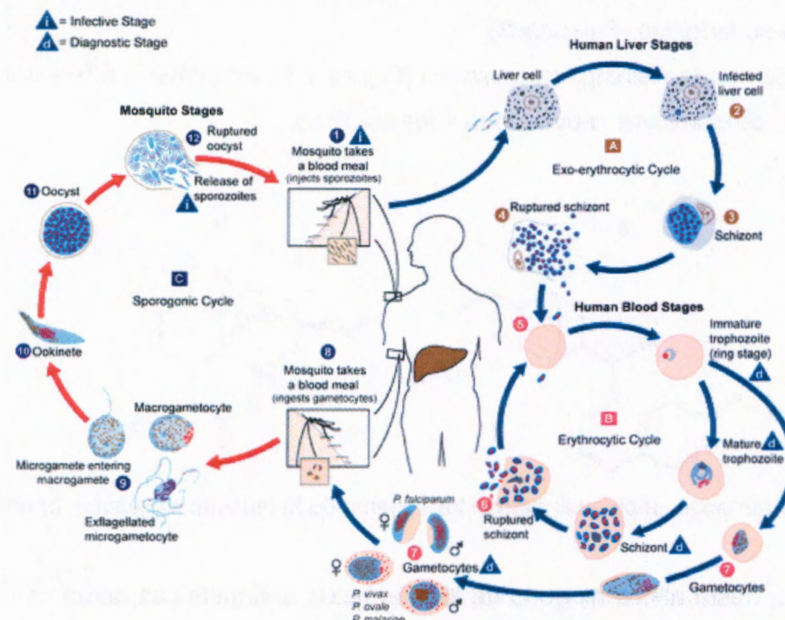


Figura 1.6. Ciclo de vida de *Plasmodium* (tomado de: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/>).

1.1.4.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La sintomatología de la malaria incluye fiebre, dolor de cabeza, escalofríos y vómitos que generalmente aparecen 15 días después de la picadura del insecto vector. Si la malaria no es tratada puede causar la muerte debido a que hay una interrupción del suministro de sangre a los órganos vitales. Los niños con malaria severa frecuentemente desarrollan anemia severa, malaria cerebral, síndrome de dificultad respiratoria aguda, falla renal y acidosis metabólica (WHO, 2014).

1.1.4.4 TRATAMIENTO

En la actualidad se cuenta con varios fármacos para el tratamiento de la malaria, entre las que se incluyen las siguientes:

- Derivados quinolínicos: cloroquina, quinina (Figura 1.7), quinidina, amodiaquina, mefloquina, halofantrina, lumefantrina y primaquina.
- Antifolatos: pirimetamina, sulfonamidas, dapsona, proguanil y la combinación pirimetamina-sulfadoxina (Fansidar®).
- Derivados de la artemisinina: artemisinina (Figura 1.7), arteméter y artesunato.
- Antibióticos: clindamicina, atovaquona y tetraciclinas.

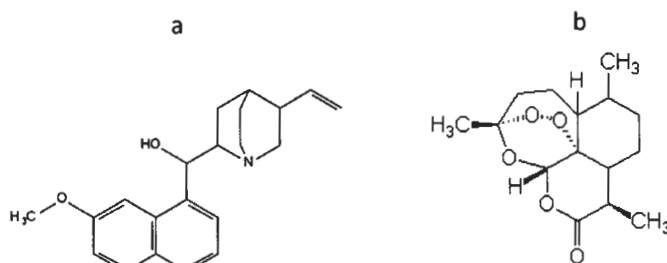


Figura 1.7. Fármacos empleados para el tratamiento de la malaria: a) quinina, b) artemisina.

Sin embargo, hasta ahora ninguno de los fármacos antimaláricos actúan sobre todos los estadios del ciclo vital del parásito para inhibirlo o matarlo; adicionalmente, se ha reportado un creciente número de cepas resistentes a algunos de estos fármacos, e.g. cepas de *P. vivax* y *P. falciparum* resistentes a la cloroquina, y cepas de *P. falciparum* resistentes a quinina y a la combinación de pirimetamina-sulfadoxina (WHO, 2014). En los últimos años se han detectado cepas del parásito resistentes a la artemisinina, y se cree que un factor importante en la aparición y propagación de la resistencia es el uso

de la artemisinina como monoterapia. Por esta razón, en la actualidad, se utilizan terapias combinadas con artemisina como tratamiento de primera elección para el control de la malaria causada por *Plasmodium falciparum* y la OMS recomienda que las monoterapias orales a base de artemisinina se retiren del mercado y se sustituyan por terapias combinadas (WHO, 2014; da Cunha *et al.*, 2010; Tracy y Webster, 2007; Jones y Ward, 2002; Chassaing, 2001).

1.1.5 AMIBIASIS

1.1.5.1 EPIDEMIOLOGÍA

La amibiasis es la cuarta causa de muerte en el mundo debida a infección por protozoarios después del paludismo, la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis, y la tercera causa de morbilidad después del paludismo y la tricomoniasis. Esta enfermedad ocurre en todo el mundo, siendo más común en países con condiciones sanitarias deficientes, particularmente en los trópicos. Se estima que causa más de 100,000 muertes al año y presenta una prevalencia del 50% en la población en general (WHO, 2011). En México, la amibiasis es un problema de salud pública debido a las altas incidencias que aún se presentan, con una seroprevalencia de hasta el 13.8% (Gómez *et al.*, 2007).

1.1.5.2 AGENTE CAUSAL Y SU CICLO DE VIDA

La amibiasis es una enfermedad intestinal causada por el parásito *Entamoeba histolytica*. Este agente es uno de los patógenos intestinales más frecuentes e infecta al ser humano a cualquier edad, siendo más frecuente en niños (Rodríguez-Magallán, 1999). Su ciclo de vida se inicia con la ingestión de quistes maduros mediante comida contaminada y agua, entre otros; los quistes son reblandecidos por la acción de los jugos gástricos y pancreáticos, lo que permite su exquistación en el intestino delgado y los trofozoítos son liberados migrando hasta el intestino grueso. Los trofozoítos se multiplican por fisión binaria y dan lugar a cuatro trofozoítos metaquísticos. Si el trofozoíto sigue avanzando por el colon inicia su proceso de enquistación con la formación de un prequiste, en el cual se inicia un proceso de división celular que da lugar a un quiste tetranuclear, el cual es expulsado con la materia fecal y puede infectar si es ingerido. En algunos casos, los trofozoítos, a través del torrente

sanguíneo, pueden invadir hígado, cerebro y pulmones (Figura 1.8) (CDC, 2010; Rodríguez-Magallán, 1999).

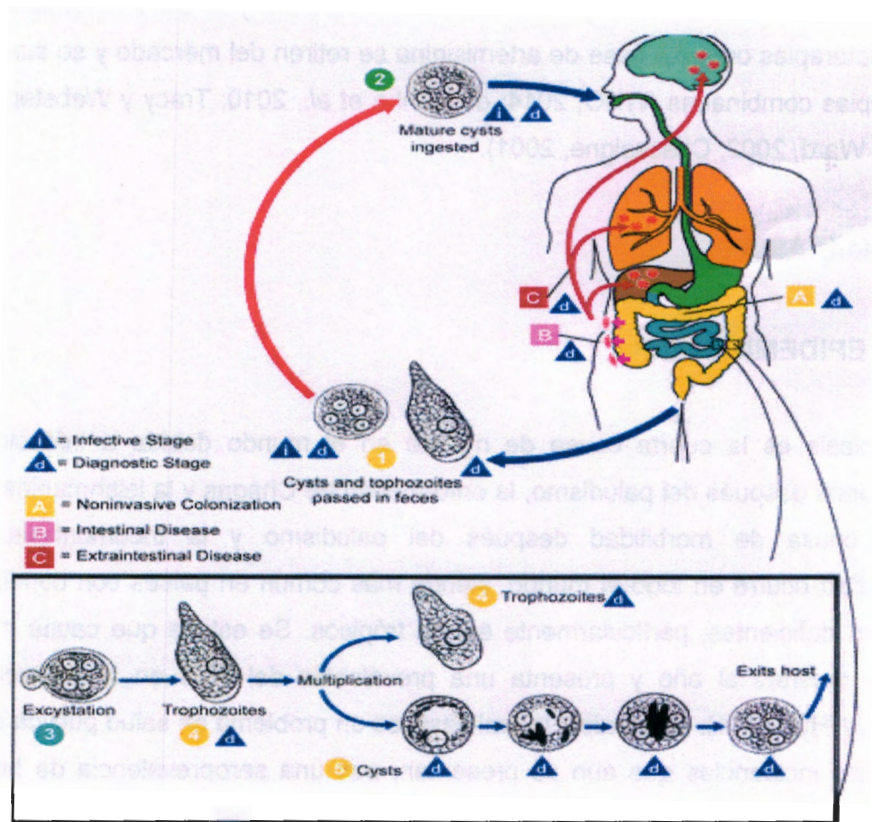


Figura 1.8. Ciclo de vida de *Entamoeba histolytica* (tomado de: <http://www.cdc.gov/parasites/amebiasis/biology.html>).

1.1.5.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La infección amebiana presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas: diarrea, dolor de estómago, calambres estomacales, colonización asintomática (hasta en 90% de los casos), amebiasis intestinal (que va desde la colitis amebiana hasta la peritonitis), y las amebiasis extraintestinales, entre las que se destacan las amebiasis cutánea y el absceso hepático (CDC, 2010; Gómez *et al.*, 2007).

1.1.5.4 TRATAMIENTO

El tratamiento para la amibiasis depende del diagnóstico clínico; cuando se trata de un portador asintomático se utilizan fármacos como el teclozán y etofamida, y cuando se trata de colitis amebiana y amibiasis extraintestinal se utiliza metronidazol, tinidazol o secnidazol. Sin embargo, recientemente, se ha reportado la aparición de cepas resistentes a *Entamoeba histolytica* (Bansal *et al.*, 2006).

1.1.6 GIARDIASIS

1.1.6.1 EPIDEMIOLOGÍA

La giardiasis es una enfermedad mundial; se estima que existen 200 millones de individuos infectados a nivel mundial, de los cuales 500,000 sufren de la enfermedad (Vázquez-Tsuji y Campos-Rivera, 2009). Se estima que la giardiasis afecta a casi el 2% de los adultos y de 6 a 8% de los niños de todo el mundo, y que cerca del 33% de las personas en países en vías de desarrollo han tenido esta parasitosis. En los Estados Unidos la infección por *Giardia* es la enfermedad parasitaria intestinal más común (CDC, 2012). En México se encuentran tasas de seroprevalencia e incidencias más altas en lactantes, preescolares y escolares (7.4 al 68.5%) (Uribarren-Berrueta, 2011).

1.1.6.2 AGENTE CAUSAL Y SU CICLO DE VIDA

La giardiasis es causada por *Giardia lamblia*, conocido también como *G. intestinalis* o *G. duodenalis*, protozooario de distribución global que se encuentra con mayor incidencia en zonas tropicales y subtropicales. Inicialmente este protozooario fue reconocido como comensal inocuo del tracto digestivo, pero en la actualidad se sabe que es el patógeno entérico más común en humanos y que su frecuencia varía de acuerdo a las condiciones sanitarias y climatológicas de cada región; por lo anterior, desde el 2004 la giardiasis fue designada por la OMS como una "enfermedad descuidada" (Uribarren-Berrueta, 2011; Cañete *et al.*, 2004).

G. lamblia habita en las primeras porciones del intestino delgado, donde el pH es ligeramente alcalino y es favorable para su desarrollo. Presenta dos formas

morfológicas: el trofozoíto, que mide aproximadamente 12-15 μm de longitud y cuenta con dos núcleos, cuatro pares de flagelos y una superficie ventral plana en la que se encuentra el disco suctor que le facilita la adhesión a la mucosa del intestino delgado, y el quiste, que es de forma ovalada, mide aproximadamente 10 μm y presenta una superficie lisa con pared doble, capaz de resistir las condiciones ambientales adversas. Los quistes constituyen la forma infectante y son adquiridos por vía oral mediante la ingesta de alimentos y bebidas contaminadas con el parásito o por vía fecal-oral; una vez ingeridos los quistes se produce el proceso de exquistación, debido a la influencia del cambio de pH entre el estómago y el duodeno aunado a la participación de enzimas digestivas; como resultado se originan dos trofozoítos que se multiplican por fisión binaria en la superficie de la mucosa del intestino delgado. Posteriormente se produce la enquistación conforme el parásito es arrastrado por el tránsito intestinal hacia el colon y los quistes son eliminados al exterior en la materia fecal para producir nuevas infecciones (Figura 1.9) (WHO, 2014; CDC, 2010; Cañete *et al.*, 2004; Tay *et al.*, 2003).

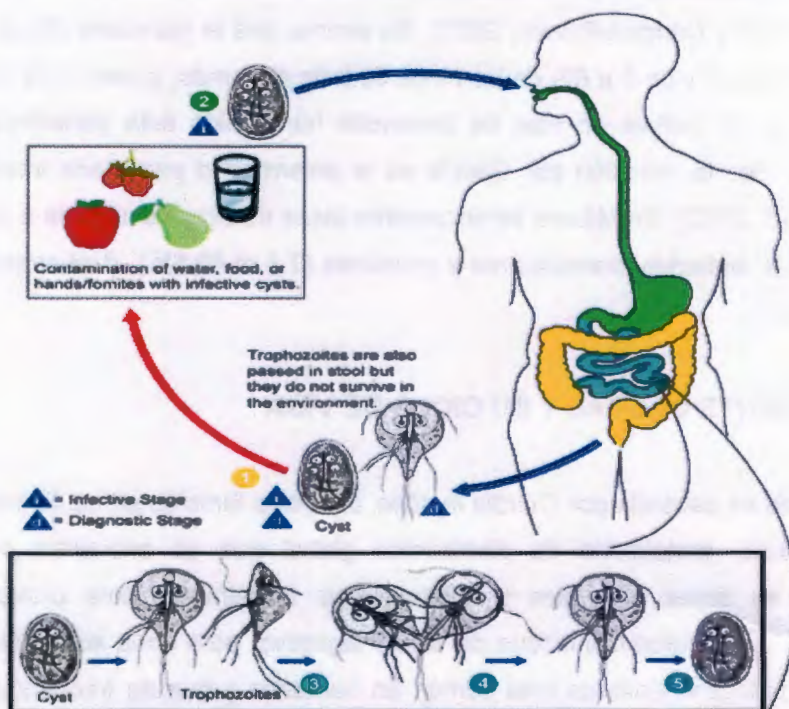


Figura 1.9. Ciclo de vida de *Giardia lamblia* (tomado de: <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/biology.html>).

1.1.6.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Las manifestaciones clínicas de la giardiasis pueden ser asintomáticas (situación más común en adultos que en niños) o sintomática produciendo diarrea crónica, calambres abdominales, hinchazón, fatiga y pérdida de peso (WHO, 2014; Slifko *et al.*, 2000).

1.1.6.4 TRATAMIENTO

Para el tratamiento de la giardiasis existen varios medicamentos; entre los más efectivos están el metronidazol, el tinidazol y la nitazoxanida (Figura 1.10). Otras alternativas incluyen al albendazol, la paromomicina, la quinacrina y la furazolidona; sin embargo, la eficacia del tratamiento depende del historial clínico, del estado nutricional del paciente y del sistema inmune. Sin embargo, todos estos fármacos causan efectos secundarios adversos y, adicionalmente, ya se ha reportado la aparición de cepas resistentes (CDC, 2010; da Cunha *et al.*, 2010; Wright *et al.*, 2003; Gardner y Hill, 2001).

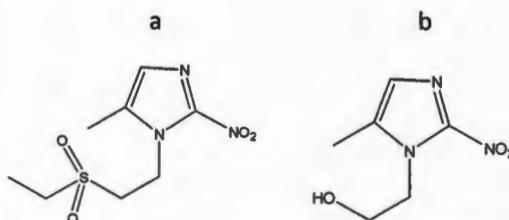


Figura 1.10. Ejemplos de fármacos empleados para el tratamiento de la giardiasis: a) tinidazol, b) metronidazol

Con base en lo anterior, y dado que los tratamientos empleados en la actualidad para tratar enfermedades causadas por protozoarios son insatisfactorios o existen cepas resistentes a estos medicamentos, es importante continuar con el descubrimiento y desarrollo de nuevos y más eficientes fármacos para el tratamiento de estas parasitosis (WHO, 2010; WHO, 2004). En la actualidad, dos de las estrategias que se siguen para el desarrollo de nuevos medicamentos son la terapia combinada y la proteómica; la primera se basa en la evaluación del efecto sinérgico de combinaciones de metabolitos bioactivos, en tanto que la segunda está dirigida hacia la búsqueda de nuevos blancos proteicos para el diseño de fármacos (Lacerda-Sodré *et al.*, 2009).

Como parte de un proyecto dirigido a la evaluación de actividad biológica en extractos crudos de plantas nativas de la Península de Yucatán, como una estrategia para la búsqueda de nuevos fármacos. Recientemente se reportó la actividad tripanocida del extracto de hojas de *Serjania yucatanensis*, una planta nativa de la península de Yucatán; la purificación biodirigida del extracto bioactivo de esta planta resultó en la obtención de una mezcla de lupenona y óxido de cariofileno con actividad tripanocida y con capacidad para inhibir la salida de *T. cruzi* de células infectadas, aunque se desconoce la manera en que se lleva a cabo esta inhibición (Polanco-Hernández *et al.*, 2012).

Dada la actividad presentada por la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno, en este trabajo se planteó como objetivo general llevar a cabo la evaluación de la actividad antiprotozoaria (tripanocida, leishmanicida, antimalárica, antiamebiana y anti-giardica) de mezclas con diferentes proporciones de lupenona y óxido de cariofileno y para el caso de *T. cruzi* determinar las proteínas blanco mediante estudios de proteómica diferencial.

1.2 ANTECEDENTES

1.2.1 SINERGISMO

Las enfermedades causadas por parásitos protozoarios representan un problema de salud pública; sin embargo, a pesar de esto, la eficacia para tratar estas parasitosis es muy limitada, por lo que la OMS, ha puesto de manifiesto la importancia del desarrollo de nuevos agentes antiparasitarios con mayor efectividad y menor toxicidad.

Una estrategia para el desarrollo de nuevos y más eficientes fármacos es la evaluación de sinergismos entre dos o más compuestos, como parte de un tratamiento de terapia combinada. Se entiende por sinergismo al aumento en un tipo de actividad biológica dada que puede ser atribuido a la presencia conjunta de dos o más metabolitos o fármacos. El sinergismo puede ser aditivo, cuando la suma de los efectos de los productos individuales es igual al efecto total; o de potenciación, cuando el efecto combinado de dos o más productos es mayor que el que se consigue con cada fármaco de manera individual. Esta área se ha convertido en una de las de mayor importancia en la fitomedicina de los últimos años dado que, a menudo, la actividad terapéutica en combinaciones de fármacos es mayor a la actividad de cada una cuando se administra por separado; adicionalmente, la terapia combinada puede mejorar la eficacia de un tratamiento, ampliar su espectro de acción, prevenir la aparición de cepas resistentes y reducir su toxicidad y duración del tratamiento (Herrmann y Wink, 2011; Wagner, 2011). Asimismo, se ha observado que un número importante de enfermedades poseen una etiología multicausal y una fisiopatología compleja, la cual puede ser tratada de manera más eficiente con combinaciones de fármacos. En la actualidad, la terapia combinatoria se practica para el tratamiento de enfermedades infecciosas (incluyendo al SIDA), así como la hipertensión, numerosos tipos de cáncer y enfermedades reumáticas (Wagner, 2011).

Se ha reportado que algunos polifenoles, como los curcuminoides, en combinación con paclitaxel inhiben la metástasis de cáncer de mama (Aggarwal *et al.*, 2005); asimismo la combinación de tamoxifen con ácido retinoico actúa sinérgicamente para inhibir el crecimiento de células cancerosas MCF-7 (Wang *et al.*, 2007). Otro ejemplo de sinergismo, es el Iberogast[®], que está constituido por nueve extractos de plantas y

se usa para el tratamiento de la dispepsia funcional y trastornos relacionados con la motilidad (Wagner y Allescher, 2006). Se ha reportado también que la actividad hemolítica de diferentes saponinas aumenta, mientras su citotoxicidad disminuye, al ser combinadas con timol (Herrmann y Wink, 2011).

Por otro lado, se han realizado también estudios de sinergismo contra protozoarios, reportándose que el metronidazol y el pamoato de pirantel actúan de forma sinérgica inhibiendo los trofozoítos de *Giardia lamblia* y reduciendo el número de parásitos adheridos a células epiteliales intestinales *in vitro* (Hausen *et al.*, 2011); asimismo, se ha observado que mezclas de albendazol con fenilcarbamatos muestran sinergismo contra *Giardia intestinalis* (Jiménez-Cardoso *et al.*, 2004). Adicionalmente, en el 2010 se reportó que mezclas de metronidazol con zinc inhiben sinérgicamente el crecimiento y la viabilidad de trofozoítos de *Entamoeba histolytica* (Nequiz *et al.*, 2000). También se ha reportado el efecto sinérgico entre amiodarona y posaconazol y entre aspirina y nifurtimox contra *T. cruzi* (Veiga-Santos *et al.*, 2012; López-Muñoz *et al.*, 2010), así como el efecto sinérgico de inhibidores de desaturasas de ácidos grasos contra *T. cruzi* (Alloatti *et al.*, 2013); y que la combinación de benznidazol con ketoconazol actúa sinérgicamente para inhibir al parásito en la fase aguda de la enfermedad de Chagas en ratones infectados con *T. cruzi* (Araújo *et al.*, 2000). Asimismo, se ha demostrado que la piperina y la fenilamida de manera conjunta inhiben el crecimiento de *L. amazonensis* (Ferreira *et al.*, 2011) y que la combinación de nitazoxanida con anfotericina B y miltefosina presenta un efecto sinérgico aditivo contra amastigotes de *L. infantum* (Mesquita *et al.*, 2014). Se ha reportado también que diferentes biguanidas interactúan sinérgicamente con la atovuona para inhibir a *Plasmodium falciparum* (Jones y Ward, 2002). Recientemente la terapia combinada ha sido especialmente recomendada para la leishmaniasis visceral (Sundar y Chakravarty, 2013) y en la actualidad, para el tratamiento de la malaria, la OMS recomienda terapias combinadas con artemisina (WHO, 2011).

Recientemente, la purificación biodirigida del extracto de hojas de *Serjania yucatanensis*, resultó en la obtención de una mezcla de lupenona y óxido de cariofileno con actividad contra tripomastigotes de *T. cruzi* (Polanco-Hernández *et al.*, 2012). Con base en lo anterior, en este estudio se pretende confirmar el sinergismo de lupenona y óxido de cariofileno contra diferentes protozoarios.

1.2.2 LUPENONA Y ÓXIDO DE CARIOFILENO

La lupenona ($C_{30}H_{48}O$) es un triterpeno con una masa molecular de 424.7 g/mol (Figura 1.11). Entre sus actividades biológicas se ha reportado que posee actividad anticancerígena en el modelo de melanoma de ratón (Hata *et al.*, 2002) y que inhibe a la proteína tirosina fosfatasa 1B, propuesta como un blanco atractivo para el desarrollo de nuevos medicamentos para la diabetes tipo 2 y la obesidad (Na *et al.*, 2009).

Se ha reportado que la lupenona no posee actividad antimalárica (Suksamrarn *et al.*, 2003) y que una mezcla de lupenona y betulina, obtenida de *Ampelozizyphus amazonicus* posee una actividad baja contra *T. cruzi* (62% de lisis de parásitos a 500 $\mu\text{g/mL}$) (Rosas *et al.*, 2007).

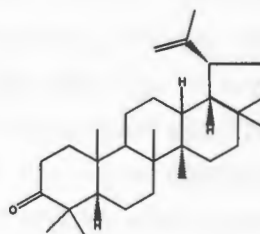


Figura 1.11. Estructura de la lupenona.

Por otra parte, el óxido de cariofileno ($C_{15}H_{24}O$) es un sesquiterpeno oxigenado, con una masa molecular de 220.3 g/mol (Figura 1.12), que forma parte de los aceites esenciales de muchas especies vegetales. Entre sus actividades biológicas se ha reportado que posee actividad antifúngica y de inhibición de la agregación plaquetaria (Lin *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 1999). Presenta actividad analgésica y antiinflamatoria (Chavan *et al.*, 2010) y es citotóxico contra líneas de células cancerosas (Jae-Jun *et al.*, 2011; Sibanda *et al.*, 2004). Asimismo, se ha reportado que el aceite esencial de *L. citriodora*, compuesto principalmente por geraniol, limoneno, 1,8-cineol, espatulenol y óxido de cariofileno, es activo contra *T. cruzi* y no es citotóxico contra células Vero y THP-1 (Escobar *et al.*, 2010), y que el óxido de cariofileno aislado del aceite esencial de *Croton draco* posee actividad inhibitoria moderada contra la cruzipaina de *T. cruzi* ($IC_{50} = 112 \mu\text{g/mL}$). Sin embargo, dado que la actividad del sesquiterpeno es menor a la del aceite esencial, se sugiere que la mayor actividad del aceite esencial puede deberse al efecto sinérgico de sus componentes (Setzer *et al.*, 2007).

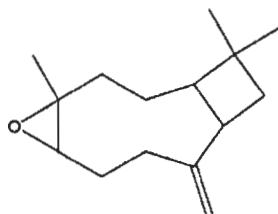


Figura 1.12. Estructura del óxido de cariofileno

Recientemente se reportó que el óxido de cariofileno es activo contra promastigotes y amastigotes de *L. amazonensis*, sugiriendo que puede deberse a una disrupción en el potencial electroquímico de la membrana mitocondrial del parásito (Monzote *et al.*, 2014). También se han estudiado los efectos del óxido de cariofileno en células cancerígenas, observándose que este metabolito induce el incremento de especies reactivas de oxígeno de la mitocondria asociada con la inducción de apoptosis, provocando pérdida del potencial de membrana mitocondrial y liberación del citocromo C; asimismo se ha observado que el óxido de cariofileno inhibe la cascada de señalización PI3K/AKT/mTOR/S6K1 (fosfatidilinositol 3 cinasa/proteína cinasa /diana de rapamicina en células de mamífero/S6 cinasa 1) las cuáles son las principales vías anti-apoptóticas que confieren supervivencia y resistencia de las células cancerosas contra diversos agentes terapéuticos y que inhiben proteínas del ciclo celular (e.g. ciclina D1) y proteínas asociadas a metástasis y angiogénesis (e.g. ciclooxigenasa 2 (COX-2) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Kyung-Ran *et al.*, 2011).

1.2.3 PROTEÓMICA

En la actualidad, otra estrategia que se sigue para el desarrollo de nuevos medicamentos es la proteómica, dirigida hacia la búsqueda de nuevos blancos para el diseño de fármacos.

La proteómica es el estudio y caracterización de todo el conjunto de proteínas de un genoma expresadas en un momento y bajo condiciones específicas. Las diferentes técnicas de proteómica en conjunto con la bioinformática permiten identificar, categorizar y clasificar las proteínas con respecto a su función y a las interacciones

que establecen entre ellas (Hu *et al.*, 2012) . El proteoma de una célula varía según el estado en el que se encuentre, *e.g.* situación de estrés, estado de desarrollo, bajo el efecto de fármacos o de una hormona, etc. (Cuervo *et al.*, 2010; De la Peña *et al.*, 2010), por lo que su investigación es de particular importancia para la salud, dadas sus potenciales aplicaciones biomédicas y farmacéuticas (Pando-Robles y Lanz-Mendoza, 2009). La identificación específica de las proteínas que intervienen en las diferentes etapas de una enfermedad ayuda a comprender las bases moleculares y la naturaleza de la misma o permite su utilización como biomarcadores de diagnóstico o pronóstico de la enfermedad, *e.g.* la apolipoproteína A1 y la CA-125 se han propuesto como biomarcadores de la fase temprana de cáncer de ovario (Zhang *et al.*, 2004). El entendimiento de los procesos moleculares de trastornos complejos como el cáncer o las enfermedades autoinmunitarias, contribuirá a instituir políticas de salud más efectivas que repercutan en el bienestar de la población.

Asimismo, la proteómica química, usando la cromatografía de afinidad combinada con la espectrometría de masas permite conocer la interacción de las proteínas con un fármaco, lo que representa una estrategia importante para la identificación de proteínas que son dianas terapéuticas de fármacos o metabolitos bioactivos. Este es un método eficaz para identificar los mecanismos moleculares de acción de fármacos o metabolitos bioactivos, para mejorar el diseño de medicamentos y para la vigilancia de los efectos de un fármaco en el tratamiento de un paciente (Hu *et al.*, 2012; Cooper y Carucci, 2004).

Una de las estrategias más utilizadas para el estudio de proteomas es la combinación de electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida con espectrometría de masas (Akemi-Kikuchi, 2007; Lacerda-Sodré *et al.*, 2005), que consiste en separar y cuantificar las proteínas de una muestra (célula, tejido o fluido) por electroforesis bidimensional (2D) en función de su punto isoelectrico y su masa molecular, para posteriormente identificar cada una de las proteínas mediante espectrometría de masas (EM) (Vivanco *et al.*, 2003).

La proteómica ha sido ampliamente aplicada para la identificación de marcadores para el diagnóstico de cáncer y para el análisis de cambios en las proteínas bajo la exposición a moléculas asociadas a la carcinogénesis (Hooven y Baird, 2008). Estudios de proteómica diferencial para cáncer han permitido identificar proteínas

expresadas en células MCF7 (línea celular de cáncer de mama) tratadas con diferentes fármacos (Hooven y Baird, 2008; Wang *et al.*, 2007), o metabolitos bioactivos como la curcumina; en este último caso se observó que las proteínas 3-fosfoglicerato deshidrogenasa, proteína del retículo endoplásmico ERP29 y el factor activador de plaquetas acetilhidrolasa contribuyen en la actividad presentada por la curcumina (Fang *et al.*, 2011). Asimismo, al evaluar el efecto sinérgico del ácido retinoico con tamoxifén, se encontró que múltiples grupos de proteínas están involucrados en la apoptosis inducida por la combinación de los dos productos; estos grupos incluyen proteínas que participan en la proliferación o diferenciación celular, factores post-transcripcionales, proteínas involucradas en la producción de energía, proteínas de los sistemas internos de degradación, entre otras (Wang *et al.*, 2007).

Estudios de proteómica llevados a cabo para distinguir cambios en la expresión de proteínas de células MCF-7 tratadas individualmente con benzopireno y dibenzopireno y tratadas con mezclas de estos hidrocarburos aromáticos policíclicos, mostraron alteraciones en la expresión de proteínas de choque térmico, actina, α -tubulina, calmodulina; sin embargo, aunque compartieron similitudes en los cambios de expresión de proteínas cada uno de los tratamientos presentó un único perfil proteico (Hooven y Baird, 2008).

Por otro lado, la aplicación de la proteómica en la familia *Trypanosomatidae*, que incluye a *T. cruzi* y *Leishmania* spp., es particularmente importante para el estudio global de la expresión génica, así como para identificar proteínas únicas presentes en un estadio en particular del ciclo de vida del parásito o de un organelo específico, para identificar nuevos marcadores, para la búsqueda de potenciales blancos farmacéuticos, para el desarrollo de vacunas y para el descubrimiento de nuevos mecanismos específicos relacionados con la biología del parásito (Cuervo *et al.*, 2010).

Ante la ausencia de vacunas eficaces contra la enfermedad de Chagas, el control de *T. cruzi* depende en gran medida del tratamiento farmacológico basado en medicamentos usados desde el final de la década de 1960, con una alta tasa de efectos colaterales y tóxicos y con eficacia variable durante la fase crónica de la enfermedad. El conocimiento sobre el genoma y el proteoma del agente causal de la enfermedad de Chagas es esencial para desarrollar herramientas precisas y eficaces a corto y largo plazo que permitan prevenir la transmisión (López-Ordoñez *et al.*, 2009). De esta forma, el descubrimiento de proteínas necesarias para la sobrevivencia y la patogenicidad del

parásito, mediante el análisis proteómico del *T. cruzi* representa una opción importante tanto para la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas, como para la identificación de nuevos biomarcadores importantes en el desarrollo de nuevos fármacos contra la enfermedad de Chagas (Lacerda-Sodré *et al.*, 2005).

Por otra parte, el ciclo de vida de *T. cruzi*, en el que están involucrados el insecto vector y el hospedero mamífero, comprende cuatro estadios morfológicos. En un primer estudio de proteómica en *T. cruzi*, donde se compararon las proteínas expresadas en los diferentes estadios evolutivos de *T. cruzi*, se reportó que gran parte de las proteínas identificadas presentaban expresión conservativa, mostrando que la mayor parte de las proteínas están presentes en todos los estadios del parásito (epimastigote, tripomastigote y amastigote), sugiriendo que las características distintivas de cada forma de *T. cruzi* son la consecuencia de la expresión diferencial de ciertas proteínas (Paba *et al.*, 2004). En el perfil proteómico de *T. cruzi* cepa Dm28c se encontró que tubulinas, proteínas de choque térmico y prostaglandina F2a sintasa, involucradas en el ensamblaje del citoesqueleto, defensa celular y reducción de fármacos tripanocidas, respectivamente; son tres de las proteínas más abundantes en este parásito (Parodi-Talice *et al.*, 2004).

En 2005 se reportó la secuencia del genoma de *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005) y en el proteoma de *T. cruzi* cepa CL Brener se identificaron 2784 proteínas, de las cuales 838 estuvieron presentes en los cuatro estadios del parásito, confirmándose que gran parte de las proteínas se expresan en todos los estadios de *T. cruzi*, pero que también hay proteínas que son exclusivas de una forma evolutiva, como las familias de las mucinas que son expresadas únicamente en el tripomastigote y/o como la ausencia de transportadores de glucosa en el amastigote (Atwood III *et al.*, 2005).

El análisis proteómico de fracciones subcelulares como los acidocalcisomas (implicados en la homeostasis de calcio y osmorregulación del parásito) y glicosomas (organelo de almacenaje) de epimastigotes de *T. cruzi*, resultó en la identificación de 396 proteínas, 34% no habían sido detectadas anteriormente (Ferella *et al.*, 2008).

En 2009 se llevó a cabo un estudio proteómico en epimastigotes de *T. cruzi* cepa Brener con el fin de iniciar la construcción de un mapa de proteínas solubles de este parásito.

En este reporte se encontró que la mayoría de las proteínas (más de 338) se encuentran en un rango de pH de 4-7, reportándose la presencia de proteínas blanco con potencial para el desarrollo de agentes quimioterapéuticos, *e.g.* la arginina quinasa (enzima implicada en el suministro de energía de *T. cruzi*, ausente en tejidos de mamíferos) y TCOYE, una prostaglandina F2 α -sintasa (Figura 1.13) que cataliza la síntesis de la prostaglandina F2 α y la reducción de algunas drogas tripanocidas, siendo responsable de la mayor parte de la actividad antioxidante en *T. cruzi* (Lacerda-Sodré *et al.*, 2009)

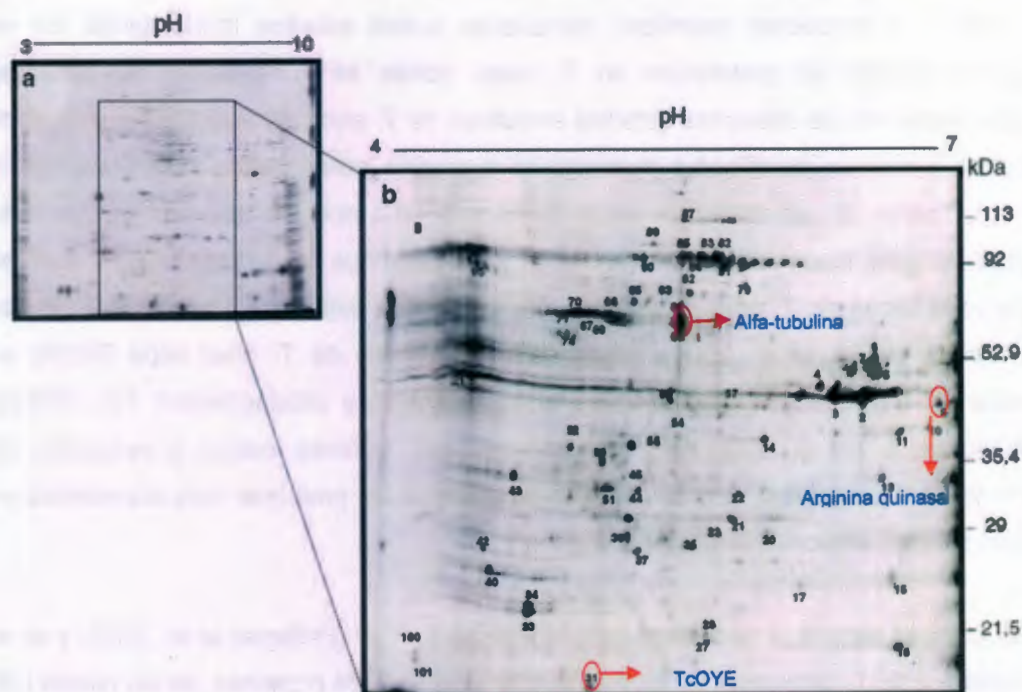


Figura 1.13 Electroforesis de doble dimensión de proteínas solubles de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* cepa CL Brener (Lacerda-Sodré *et al.*, 2009)

También se ha utilizado la estrategia de proteómica para estudiar las proteínas que se expresan diferencialmente en epimastigotes de una cepa mexicana (cepa Ninoa) de *T. cruzi* cuando los parásitos son sometidos a choque térmico. En este estudio se encontró que 19 proteínas son sobreexpresadas por estrés al calor, y entre las cuales se identificaron proteínas del metabolismo, de defensa celular, de síntesis de proteínas, de transporte y ciclo celular, y proteínas implicadas en la interacción con el entorno celular (Pérez-Morales *et al.*, 2012).

Hasta ahora son pocos los estudios de proteómica relacionados con la resistencia de fármacos en *T. cruzi* y con la búsqueda de proteínas como blancos terapéuticos. En

2008 se reportó el primer análisis proteómico de *T. cruzi* resistente a benznidazol, identificándose 36 proteínas en los parásitos resistentes a este fármaco; entre las proteínas sobreexpresadas se encontraron proteínas implicadas en la transcripción, la defensa celular y el metabolismo como la peptidasa, la peroxiredoxina y la tirosina aminotransferasa; también se encontró la glutamato deshidrogenasa y la hierro superóxido dismutasa, entre otras, que pueden conferirle resistencia a los parásitos (Figura 1.14). En los parásitos susceptibles se encontró que la prostaglandina F2 α sintasa está sobreexpresada, sugiriendo que podría estar involucrada en el metabolismo de benznidazol mediante la generación de radicales tóxicos que causan la muerte del parásito (Andrade *et al.*, 2008).

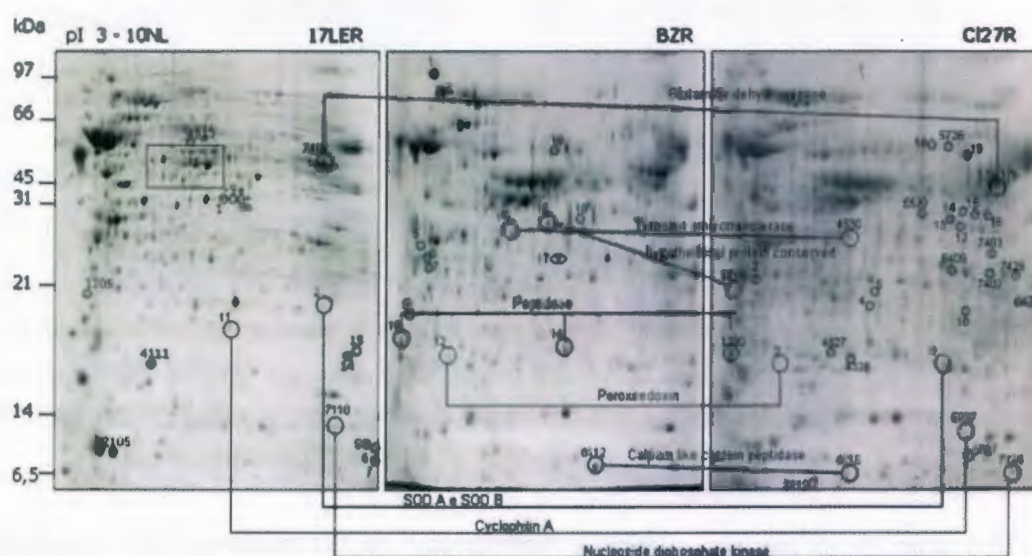


Figura 1.14. Geles de doble dimensión de proteínas de *T. cruzi* resistente a benznidazol. Los círculos representan las proteínas sobreexpresadas en muestras resistentes a benznidazol comparadas con las susceptibles a benznidazol. 17LER: derivado de la cepa cl2 por exposición a concentraciones incrementadas de benznidazol, BZR: derivado de cepa Y tratada con una sola dosis elevada de benznidazol *in vivo*, C127R: clona resistente a benznidazol (Andrade *et al.*, 2008)

También se ha reportado el análisis proteómico de epimastigotes de *T. cruzi* tratados con naftoimidazoles, con el fin de identificar proteínas involucradas en la actividad tripanocida mostrada por los diferentes fármacos. Como resultado de estos tratamientos se observaron alteraciones significativas en los niveles de expresión de proteínas implicadas en rutas bioquímicas cruciales para *T. cruzi*, y se estableció que la biosíntesis

de aminoácidos y el metabolismo de las proteínas son los principales blancos de los naftoimidazoles, afectando vías bioquímicas diferentes e independientes que provocan la muerte del parásito (Figura 1.15) (Menna-Barreto *et al.*, 2010).

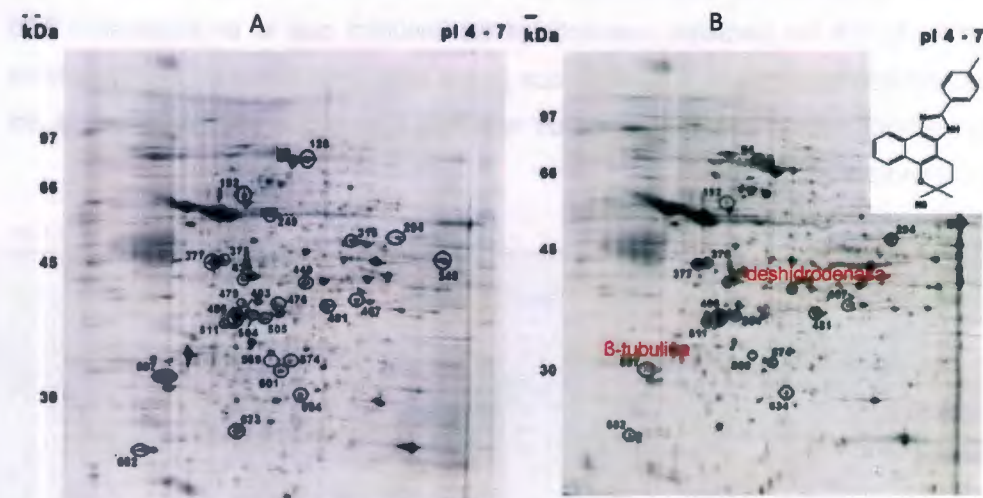


Figura 1.15 Geles bidimensionales de proteínas de *T. cruzi* tratados con naftoimidazoles. A) Testigo y B) Tratamiento con 20 µM de naftimidazol N3. Los círculos representan las proteínas moduladas después de tratamiento con el compuesto. La estructura de la derecha representa la estructura química del naftimidazol N3 (Menna-Barreto *et al.*, 2010).

Con base en lo anterior, y ante la ineffectividad de los medicamentos empleados actualmente para el tratamiento de enfermedades causadas por protozoarios, es importante realizar estudios de proteómica en *T. cruzi* para observar cambios en la expresión de proteínas del parásito al ser tratado con metabolitos bioactivos, con el fin de identificar potenciales blancos farmacéuticos y poder diseñar nuevos medicamentos y estrategias terapéuticas para cada fase de la enfermedad de Chagas.

Recientemente se observó que una fracción obtenida del extracto crudo de *Serjania yucatanensis*, que contenía una mezcla de lupenona y óxido de cariofileno posee actividad contra tripomastigotes de *T. cruzi* (Polanco-Hernández *et al.*, 2012). Con base en esto, y debido a que hasta ahora no se han reportado estudios de proteómica de doble dimensión de *T. cruzi* tratado con lupenona y óxido de cariofileno, en este trabajo se planteó realizar estudios de proteómica diferencial de 2D que permita la identificación de potenciales proteínas blanco en *T. cruzi*, mediante el análisis de

cambios en los patrones de expresión de proteínas en respuesta a la exposición de la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno en la proporción con mejor actividad tripanocida.

1.3 OBJETIVO GENERAL

- ❖ Evaluar el sinergismo de mezclas de lupenona y óxido de cariofileno obtenidos de *Serjania yucatanensis* contra diversos protozoarios e identificar en *Trypanosoma cruzi* las potenciales proteínas blanco por análisis de proteómica diferencial.

1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Determinar la actividad antiparasitaria *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp., *Plasmodium falciparum*, *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* de mezclas de lupenona y óxido de cariofileno en diferentes proporciones.
- ❖ Establecer la combinación óptima de lupenona y óxido de cariofileno que resulte en la mayor actividad tripanocida y/o antiparasitaria.
- ❖ Evaluar la actividad *in vivo* contra amastigotes de *T. cruzi* de la combinación óptima de lupenona y óxido de cariofileno.
- ❖ Evaluar el efecto de la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno en el proteoma de *T. cruzi* mediante cambios en los patrones de expresión de proteínas en respuesta a la exposición de la combinación óptima de éstos terpenoides.

1.5 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

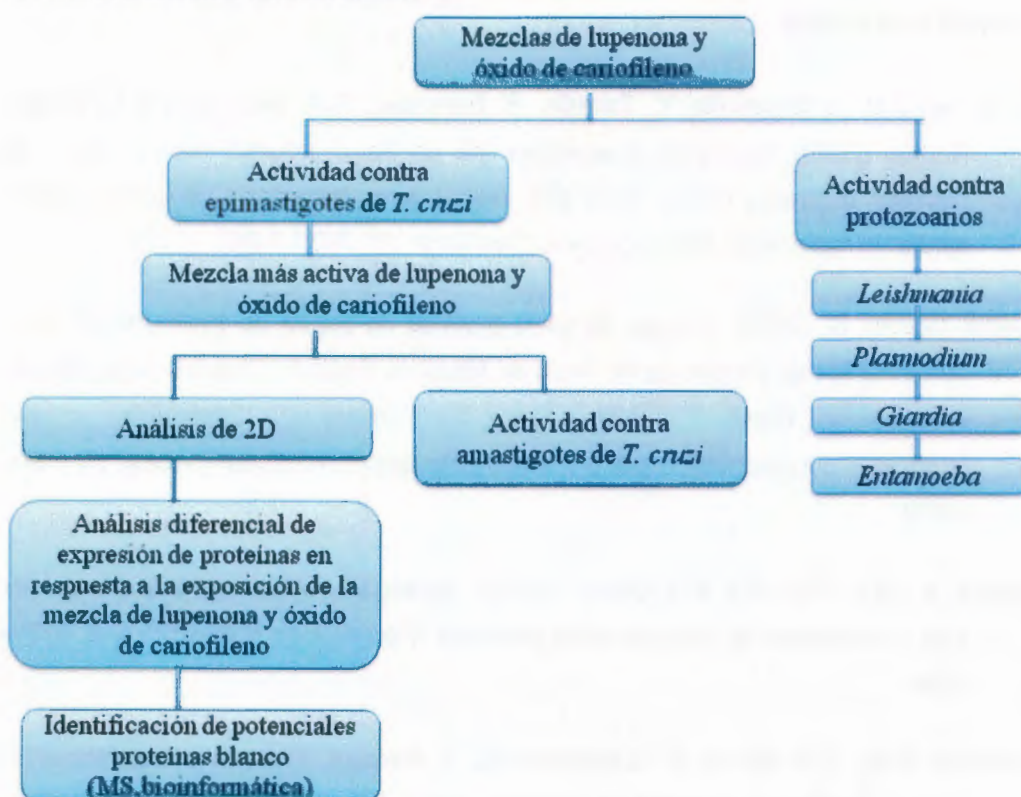


Figura 1.16. Estrategia general

1.6 REFERENCIAS

- Aggarwal, B.B., S. Shishodia, Y. Takada, S. Banerjee, R.A. Newman y C.E. Bueso-Ramos (2005). Curcumin suppresses the paclitaxel-induced nuclear factor- κ B pathway in breast cancer cells and inhibits lung metastasis of human breast cancer in nude mice. *Clinical Cancer Research*, 11, 7490-7498.
- Akemi-Kikuchi, S. (2007). Análise do perfil protéico de cepas de *trypanosoma cruzi* pertencentes ao zimodema III. Tesis de Maestría. Instituto Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Brasil. 129 p. [Online] Disponible en: <http://www.dominipublico.gov.br/download/texto/cp074222.pdf> [Acceso 29 mayo 2011].
- Alloatti, A., K.E. Tripodi y A.D. Uttaro (2013). Synergistic effect of inhibitors of fatty acid desaturases on *Trypanosoma* parasites. *Parasitology Research*, 112, 3289-3294.
- Andrade, H.M., S.M. Murta, A. Chapeaurouge, J. Perales, P. Nirdé y A.J. Romanha (2008). Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to benznidazole. *Journal of Proteome Research*, 7, 2357-2367.
- Araújo, M.S.S., O.A. Martins-Filho, M.E.S. Pereira y Z.A. Brener (2000). Combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 45, 819-824.
- Atwood III, J.A., B.D. Weatherly, T.A. Minning, B. Bundy, C. Cavola, F.R. Oppendoes, R. Orlando y R.L. Tarleton (2005). The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science*, 309, 473-476.
- Bansal, D., R. Sehgal, Y. Chawla, N. Malla y R.C. Mahajan (2006). Multidrug resistance in amoebiasis patients. *Indian Journal of Medical Research*, 124, 189-194.

- Barrera, M., M.E. Rodríguez, E. Guzmán, J. Zavala y E. Dumontiel (2001). Biological behaviour of three strains of *Trypanosoma cruzi* from Yucatán, México. *Revista Biomédica*, 12, 224-230.
- Betanzos-Reyes, A.F. (2011). La malaria en México. Progresos y desafíos hacia su eliminación. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 68, 159-168.
- Cañete, R., M.E. González, P. Almirall y I. Figueroa (2004). Infección por *Giardia* y Giardosis. *Revista Panamericana de Infectología*, 6, 41-48.
- Castro, J.A. y M. Montalvo (2006). Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human & Experimental Toxicology*, 25, 471-479.
- CDC (Center for Disease Control and Prevention), 2010. Parasites-Giardia. Biology. [Online] (Actualizado noviembre 2010) Disponible en : <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/biology.html> [Acceso 21 Agosto 2012].
- CDC (Center for Disease Control and Prevention), 2010. Parasites-Amebiasis. [Online] (Actualizado noviembre 2010) Disponible en : <http://www.cdc.gov/parasites/amebiasis/faqs.html> [Acceso 21 Agosto 2014].
- CDC (Center for Disease Control and Prevention), 2012. Malaria website [Online] (Actualizado noviembre 2012) Disponible en: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/> [Acceso 19 Agosto 2014].
- CDC (Center for Disease Control and Prevention), 2012. Parasites-Giardia. Epidemiology and risk factors. [Online] (Actualizado julio 2012) Disponible en : <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/epi.html> [Acceso 21 Agosto 2014].
- Chassaigne, J.A. (2001). Malaria y fármacos antimaláricos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 21, 85-88.
- Chavan, M.J., P.S. Wakte y D.B. Shinde (2010). Analgesic and anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine*, 17, 149-151.

- Cooper, R.A. y D.J. Carucci (2004). Proteomic Approaches to Studying Drug Targets and Resistance in *Plasmodium*. *Current Drug Targets – Infectious Disorders*, 4, 41-51.
- Cruz, R.A. y J.M. Pickering (2006). Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 101, 345-354.
- Cuervo, P., N. Fernandes y J.B. De Jesús (2011). A proteomics view of programmed cell death mechanisms during host-parasite interactions. *Journal of Proteomics*, 75, 246-256.
- Cuervo, P., G.B. Domont y J.B. De Jesús (2010). Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *Journal of Proteomics*, 73, 845-867.
- Da Cunha, E., T. Ramalho, D. Mancini, E. Fonseca y A. Oliveira (2010). New Approaches to the Development of Anti-Protozoan Drug Candidates: a Review of Patents. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21, 1787-1806.
- De la Peña, C., D.V. Badri, Z. Lei, B.S. Watson, M.M. Brandao, M.C. Silva-Filho, L.W. Sumner y J.M. Vivanco (2010). Root secretion of defense-related proteins is development-dependent and correlated with flowering time. *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 30654-30665.
- Desjeux, P., J.P. Meert, B. Piot, J. Alvar, F.J. Medrano, M. Portus, C. Munoz, F. Laguna, R. López-Velez, A. Salas, G. Sirera, R. Cisterna, C. Montalban, H. Quero y L. Gradoni (2000). Leishmania/ HIV co-infection in south-western Europe 1990-1998: Retrospective analysis of 965 cases. World Health Organization. [Online] (Actualizado Abril 2000) Disponible en: www.who.int/hiv/strategic/en/leish_00_42.pdf [Acceso 2 septiembre 2014].
- Sayed, N.M., P.J. Myler, D.C. Bartholomeu, D. Nilsson, G. Aggarwal, A.N. Tran, E. Ghedin, E.A. Worthey, A.L. Delcher, G. Blandin, *et al* (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, 309, 409-415

- Escobar, P., S.M. Leal, L.V. Herrera, J.R. Martinez y E. Stashenko (2010). Chemical composition and antiprotozoal activities of *Colombian Lippia* spp. essential oils and their major components. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105, 184-190.
- Fang, H.Y., S.B. Chen, D.J. Guo, S.Y. Pan y Z.L. Yu (2011). Proteomic identification of differentially expressed proteins in curcumin-treated MCF-7 cells. *Phytomedicine*, 18, 697-703.
- Ferella, M., D. Nilsson, H. Darban, C. Rodrigues, E.J. Bontempi y R. Docampo (2008). Proteomics in *Trypanosoma cruzi* localization of novel proteins to various organelles. *Proteomics*, 8, 2735-2749.
- Ferreira, C., D.C. Soares, C.B. Barreto-Junior, M.T. Nascimento, L. Freire de Lima, J.C. Delorenzi, M.E. Lima, G.C. Atella, E. Folly, T.M. Carvalho, E.M. Saraiva y L.H. Pinto da Silva (2011). Leishmanicidal effect of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*. *Phytochemistry*, 72, 2155-2164.
- García-Montalvo, B. (2011). *Trypanosoma cruzi* antibodies in blood donors in Yucatan state, Mexico. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 49, 367-372.
- Gardner, T.B. y D.R. Hill (2001). Treatment of giardiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 114-128.
- Gómez, J.C., J.A. Cortés, S.I. Cuervo y M.C. López (2007). Amebiasis intestinal. *Infectio*, 11, 36-45.
- Hata, K., K. Hori y S. Takahashi (2002). Differentiation and apoptosis inducing activities by pentacyclic triterpenes on a mouse melanoma cell line. *Journal of Natural Products*, 65, 645-648.
- Hausen, M.A., R.F.S. Menna-Barreto, D.C. Lira, L. Carvalho y H.S. Barbosa (2011). Synergic effect of metronidazole and pyrantel pamoate on *Giardia lamblia*. *Parasitology International*, 60, 54-58.
- Herrmann, F. y M. Wink (2011). Synergistic interactions of saponins and monoterpenes in Hela cells, Cos 7 cells and in erythrocytes. *Phytomedicine*, 18, 1191-1196.

- Hooven, L.A. y W.M. Baird (2008). Proteomic analysis of MCF-7 cells treated with benzo[a]pyrene, dibenzo[a,h]pyrene, coal tar extract, and diesel exhaust extract. *Toxicology*, 249, 1-10.
- Hu, L., J.P. Fawcett y J. Gu (2012). Protein target discovery of drug and its reactive intermediate metabolite by using proteomic strategy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2, 126-136.
- Jae-Jun, N., A. Mosaddik, J. Yong-Moon, K.C. Jang, D.S. Lee, K.S. Ahn y S.K. Cho (2011). Cytotoxic activity of β -caryophyllene oxide isolated from Jeju Guava (*Psidium cattleianum* Sabine) leaf. *Records of Natural Products*, 5, 242-246.
- Jemal, A., T. Murray, A. Samuels, A. Ghafoor, E. Ward y M.J. Thun (2003). Cancer statistics. *Cancer Journal of Clinicians*, 53, 5-26.
- Jiménez-Cardoso, E., A. Flores-Luna y J. Pérez-Urizar (2004). In vitro activity of two phenyl-carbamate derivatives, singly and in combination with albendazol against albendazol-resistant *Giardia intestinalis*. *Acta Tropica*, 92, 237-244.
- Jones, K. y S.A. Ward (2002). Biguanide-Atovaquone Synergy against *Plasmodium falciparum* in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 2700-2703.
- Kyung-Ran, P., N. Dongwoo, Y. Hyung-Mun, L. Seok-Geun, J. Hyeung-Jin, S. Gautam, C. Somi y S.A. Kwang (2011). β -Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. *Cancer Letters*, 312, 178-188.
- Lacerda-Sodré, C., A.D. Chapeaurouge, D.E. Kalume, L. de Mendonça-Lima, J. Perales y O. Fernandes (2009). Proteomic map of *Trypanosoma cruzi* CL Brener: the reference strain of the genome project. *Archives of Microbiology*, 191, 177-184.
- Lacerda-Sodré, C., E. Kalume, M.E. Ricci da Silva y O. Fernandes (2005). Proteoma [Online] (Actualizado Julio 2005) Disponible en: http://www.fiocruz.br/chagas_eng/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=81 [Acceso 2 junio 2011].

- Lin, W.Y., Y.H. Kuo, Y.L. Chang, C.M. Teng, E.C. Wang, y T. Ishikawa (2003). Anti-platelet aggregation and chemical constituents from the rhizome of *Gynura japonica*. *Planta Medica*, 69, 757-764.
- López-Antuñano, F.J. (1997). Quimioterapia de las infecciones producidas por *Trypanosoma cruzi*. *Salud Pública de México*, 39, 463-471.
- López-Muñoz, R., M. Faúndez, S. Klein, S. Escanilla, G. Torres, D. Lee-Liu, J. Ferreira, U. Kemmerling, M. Orellana, A. Morello, A. Ferreira y J. Maya (2010). *Trypanosoma cruzi*: *in vitro* effect of aspirin with nifurtimox and benznidazole. *Experimental Parasitology*, 124, 167-171.
- López-Ordóñez, T., F. Panzera, E. Tun-Ku, I. Ferrandis y J.M. Ramsey (2009). Contribuciones de la genética y la proteómica al estudio de la enfermedad de Chagas. *Salud Pública de México*, 51, 410-423.
- Mena-Barreto, R., D.G. Beghini, A.T.S. Ferreira, A. Pinto, S. De Castro y J. Perales (2010). A proteomic analysis of the mechanism of action of naphthoimidazoles in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes *in vitro*. *Journal of Proteomics*, 73, 2306-2315.
- Mesquita, J.T., A.G. Tempone y J.Q. Reimao (2014). Combination therapy with nitazoxanide and amphotericin B, Glucetime®, miltefosine and sitamaquine against *Leishmania (Leishmania) infantum* intracellular amastigotes. *Acta Tropica*, 130, 112-116.
- Monzote, L., M. García, J. Pastor, L. Gil, R. Scull, L. Maes, P. Cos y L. Gille (2014). Essential oil from *Chenopodium ambrosoides* and main components: Activity against *Leishmania*, their mitochondria and other microorganism. *Experimental Parasitology*, 136, 20-26.
- Na, M., B.Y. Kim, H. Osada y J.S. Ahn (2009). Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by lupeol and lupenone isolated from *Sorbus Commixta*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medical Chemistry*, 24, 1056-1059.
- Nequiz, M., A. Polo, J. Santos-Preciado y G. Vega-Robledo (2000). Antiamoebic activity of metronidazol-zinc association. *Archives of Medical Research*, 31, S19-S20.

- Paba, J., J.M. Santana, A.R. Teixeira, W. Fontes, M.V. Sousa y C.A.O. Ricart (2004). Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Proteomics*, 4, 1052-1059.
- Pando-Robles, R.V. y H. Lanz-Mendoza (2009). La importancia de la proteómica en la salud pública. *Salud Pública de México*, 51, 386-394.
- Parodi-Talice, A., R. Durán, N. Arrambide, V. Prieto, M.D. Piñeyro, O. Pritsch, A. Cayota, C. Cerveñasky y C. Robello (2004). Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. *International Journal for Parasitology*, 34, 881-886.
- Pérez-Morales, D., H. Lanz-Mendoza, G. Hurtado, R. Martínez-Espinosa y B. Espinoza (2012). Proteomic Analysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes subjected to heat shock. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. doi: 10.1155/2012/902803.
- Polanco-Hernández, G., F. Escalante-Erosa, K. García-Sosa, K. Acosta-Viana, M. Chan-Bacab, H. Sagua, J. Gonzalez, L. Osorio, R.E. Moo-Puc y L.M. Peña-Rodríguez (2012). *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of native plants from the Yucatan peninsula. *Parasitology Research*, 110, 31-35.
- Polanco-Hernández, G., F. Escalante-Erosa, K. García-Sosa, M. Chan-Bacab, H. Sagua, J. Gonzalez, L. Osorio y L.M. Peña-Rodríguez (2012). Metabolites from the leaf extract of *Serjania yucatanensis* with trypanocidal activity against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, 111, 451-455.
- Ramsey, J.M., R. Ordóñez, A. Tello-López, J.L. Pohls, V. Sánchez y A.T. Peterson (2003). Actualidades sobre la epidemiología de la enfermedad de Chagas en México. [Online] (Actualizado mayo 2014) Disponible en: [www.researchgate.net/publication/230709892 Actualidades sobre la epidemiologia de la enfermedad de Chagas en Mxico](http://www.researchgate.net/publication/230709892_Actualidades_sobre_la_epidemiologia_de_la_enfermedad_de_Chagas_en_Mxico) [Acceso 15 enero 2014].
- Rodríguez-Coura, J. y S.L. de Castro (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97, 3-24.

- Rodríguez-Magallán, A. (1999). Amibiasis intestinal. Revista del Hospital Juárez de México, 66, 34-41.
- Rodríguez, M.E., L. Briceño y M.A. Chiurillo (2008). Tripanosomiasis Americana: Aspectos teóricos. Curso latinoamericano sobre enfermedades infecciosas. Instituto de Biomedicina, UCV, Caracas, Venezuela. [Online] (Actualizado septiembre 2008).
Disponible en: http://www.biolac.unu.edu/PDF/BioM_Tripanosomiasis.pdf [Acceso 8 mayo 2010].
- Rosas, L.V., M.S.C., Cordeiro, F.R. Campos, S.K.R. Nascimento, A.H. Januário, S.C. Franca, A. Nomizo, M.P. Toldo, S. Albuquerque y O.S. Pereira (2007). *In vitro* evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 40, 663-670.
- Secretaría de Salud, 2014. Notificación semanal casos nuevos de enfermedades. Información epidemiológica de morbilidad. [Online] (Actualizado 2014) Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/inf_morbilidad/2014/morbi_sep_2014.pdf [Acceso 20 noviembre 2014]
- Setzer, W., S. Stokes, A. Bansal, W. Haber, C. Caffrey, E. Hansell y J. McKerrow (2007). Chemical composition and cruzain inhibitory activity of *Croton draco* bark essential oil from Monteverde, Costa Rica. Natural Product Communications, 2, 685-689.
- Sibanda, S., G. Chigwada, M. Poole, E.T. Gwebu, J.A. Noletto y J.M. Schmidt (2004). Composition and bioactivity of the leaf essential oil of *Heteropyxis dehniae* from Zimbabwe. Journal of Ethnopharmacology, 92, 107-111.
- Sierra, J.J., A. Olivera, P.V. Monteón, P. Reyes y M. Vallejo (2005) Panorama epidemiológico y clínico de la cardiopatía chagásica crónica en México. Revista de Saúde Pública, 39, 754-760.
- Slifko, T.R., H.V. Smith y J.B. Rose (2000). Emerging parasite zoonoses associated with water and food. International Journal of Parasitology, 30, 1379-1393.

- Sosa-Ávila, E.J., J. Caro-Lozano y I.R. Zúñiga-Carrasco (2014). Perfil epidemiológico de la leishmaniasis: una enfermedad olvidada en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 34, 31-36.
- Storino, R. (2002). Enfermedad de Chagas con parasitemia evidente. *Revista Argentina de Cardiología*, 70, 15-39.
- Suksamrarn, A., T. Tanachatchairatana y S. Kanokmedhakul (2003). Antiplasmodial triterpenes from twigs of *Gardenia saxatilis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 88, 275-277.
- Sundar, S. (2001). Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine & International Health*, 6, 849-854.
- Sundar, S. y J. Chakravarty (2013). Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 14, 53-63.
- Tay, J., R. Lara, O. Velasco, y M. Gutiérrez (2003). *Parasitología Médica*. Méndez, México. 876 p.
- Teixeira, A.R., N. Nitz, M.C. Guimaro, C. Gomes y C.A. Santos-Buch (2006). Chagas disease. *Postgraduate Medical Journal*, 82, 788-798.
- Tracy, J.M. y L.T. Webster (2007). Quimioterapia de infecciones causadas por protozoarios, en: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (ed). McGraw Hill, cap.40, pp. 1085-1088.
- Uribarren-Berrueta, T. (2011). Giardiasis o giardiosis [Online] (Actualizado enero 2011) Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/giardiasis.html> [Acceso 25 octubre 2011].
- Vassia, M., C. Patti, S. Burrote y J. Bustamante (2003). Análisis electrocardiográficos post-tratamiento con benznidazol en infección con dos cepas de *T. cruzi*. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. [Online] (Actualizado octubre 2003). Disponible en: <http://www.fac.org.ar/tcvc/llave/tl334.pdf> [Acceso 3 septiembre de 2014].

- Vázquez-Tsuji, O. y T. Campos-Rivera (2009). Giardiasis, la parasitosis más frecuente a nivel mundial. *Revista del Centro de Investigación*, 8, 75-90.
- Veiga-Santos, P., E. Barrias, J.F.C. Santos, T.L. Barros-Moreira, T.M. Ulisses da Carvalho, J. Urbina y W. de Souza (2012). Effects of amiodarone and posaconazole on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40, 61-71.
- Vivanco, F., J. López-Bescós y J. Egido (2003). Proteómica y enfermedad cardiovascular. *Revista Española de Cardiología*, 56, 289-302.
- Wagner, H. (2011). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia*, 82, 34-37.
- Wagner, H. y H.D. Allescher (2006). Multitarget therapy in functional dyspepsia. *Phytomedicine*, 13, 1-130.
- Wang, Y., Q.Y. He, H. Chen y J.F. Chiu (2007). Synergistic effects of retinoic acid and tamoxifen on human breast cancer cells: proteomic characterization. *Experimental Cell Research*, 313, 357-368.
- WHO (World Health Organization), 2004. The global burden disease:2004 update. [Online] (Actualizado 2008) Disponible en: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/GBD_report_2004update_full.pdf?ua=1 [Acceso 3 septiembre 2014].
- WHO (World Health Organization), 2010. Es posible derrotar las enfermedades tropicales desatendidas. [Online] (Actualizado 2010) Disponible en: http://www.who.int/dg/speeches/2010/ntd_20101014/es/ [Acceso 22 agosto 2014].
- WHO (World Health Organization), 2011. Initiative for Vaccine Research (IVR). [Online] (Actualizado 2011) Disponible en: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index3.html [Acceso 25 octubre 2011].
- WHO (World Health Organization), 2011. Initiative for Vaccine Research (IVR). Amoebiasis. [Online] (Actualizado 2011) Disponible en:

http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index1.html

[Acceso 13 octubre 2011].

WHO (World Health Organization), 2012. Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR). Leishmaniasis disease information. [Online] (Actualizado 2012) Disponible en: <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/info/en/index.html> [Acceso 10 Abril 2012].

WHO (World Health Organization), 2013. World Malaria Report. [Online] (Actualizado 2013) Disponible en: http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/report/en/ [Acceso 19 Agosto 2014].

WHO (World Health Organization), 2014. Descriptive note No.94 Malaria. [Online] (Actualizado marzo 2014) Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/> [Acceso 19 Agosto 2014].

WHO (World Health Organization), 2014. Descriptive note No.340. Chagas disease [Online] (Actualizado marzo 2014) Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> [Acceso 6 Agosto 2014].

WHO (World Health Organization), 2014. Descriptive note No.375. Leishmaniasis [Online] (Actualizado enero 2014) Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/> [Acceso 6 Agosto 2014].

WHO (World Health Organization), 2014. Giardiasis. [Online] (Actualizado marzo 2014) Disponible en: <http://www.who.int/ith/diseases/giardiasis/en/> [Acceso 21 Agosto 2014].

Wright, J.M., L.A. Dunn, P. Upcroft y J.A. Upcroft (2003). Efficacy of anti-giardial drugs. Expert Opinion on Drug Safety, 2, 529-541.

Yang, D., L. Michel, J.P. Chaumont y J. Millet-Clerc (1999). Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an *in vitro* experimental model of onychomycosis. Mycopathologia, 148, 79-82.

Zhang, Z., R.C. Bast, Y. Yu, J. Li, L.J. Sokoll y A.J. Rai (2004). Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Research*, 64, 5882-5890.

CAPÍTULO II

EFFECTO SINÉRGICO DE LUPENONA Y ÓXIDO DE CARIOFILENO CONTRA *Trypanosoma cruzi*

DESCRIPCIÓN DEL CAPÍTULO

La actividad tripanocida *in vitro* de la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno (1:4) confirmó un efecto sinérgico de potenciación contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* ($IC_{50} = 10.4 \mu\text{g/mL}$, $FIC = 0.46$). Además, la evaluación de la mezcla de terpenoides en cuanto a su capacidad para reducir el número de nidos de amastigotes en tejido cardíaco y músculo esquelético en ratones infectados mostró una reducción de más del 80 % a una dosis de 20.8 mg/kg/día.

SYNERGISTIC EFFECT OF LUPENONE AND CARYOPHYLLENE OXIDE AGAINST *Trypanosoma cruzi**

Glendy Polanco-Hernández,¹ Fabiola Escalante-Erosa,¹ Karlina García-Sosa,¹ María E. Rosado,² Eugenia Guzmán-Marín,² Karla Y. Acosta-Viana,² Alberto Giménez-Turba,³ Efraín Salamanca,³ and Luis M. Peña-Rodríguez¹

¹Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No.130, Colonia Chuburná de Hidalgo, 97200 Mérida, YUC, México.

²Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Mérida, YUC, México.

³Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, La paz, Bolivia.

2.1 ABSTRACT

The *in vitro* trypanocidal activity of a 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide confirmed a synergistic effect of the terpenoids against epimastigotes forms of *T. cruzi* ($IC_{50} = 10.4\mu\text{g/mL}$, $FIC = 0.46$). In addition, testing of the terpenoid mixture for its capacity to reduce the number of amastigote nests in cardiac tissue and skeletal muscle of infected mice showed a reduction of more than 80% at a dose level of $20.8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$.

Key words: lupenone - caryophyllene oxide - synergism - Chagas disease

* Los resultados descritos en este capítulo forman parte del Manuscrito "Synergistic effect of lupenone and caryophyllene oxide against *Trypanosoma cruzi*" publicado en Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013. doi: 10.1155/2013/435398. Autores: Glendy Polanco-Hernández, Fabiola Escalante-Erosa, Karlina García-Sosa, María E. Rosado, Eugenia Guzmán-Marín, Karla Y. Acosta-Viana, Alberto Giménez-Turba, Efraín Salamanca, Luis M. Peña-Rodríguez.

2.2 INTRODUCTION

Chagas disease is a chronic parasitosis caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, which is transmitted by an insect vector of the *Reduviidae* family causing cardiac injury leading to death [1]. The disease represents an important public health problem in Latin America, with an estimated 10 million people infected and 25 million people under risk of infection [2]. At present, there is no satisfactory chemotherapy for the disease also known as American trypanosomiasis; the drugs currently used, which include nifurtimox, benznidazole and allopurinol, are toxic, have severe side effects and are effective mainly in the acute phase, while their activity in the chronic phase of the disease is low and controversial [3-5]. Because of this, the WHO has emphasized the need to develop new and better trypanocidal drugs with none or limited side effects [6].

A strategy for the development of new and more efficient pharmaceuticals is to evaluate the synergism between two or more products as part of a treatment of combined therapy. Often, the therapeutic activity of a combination of drugs is greater than the activity of each product when administrated separately; additionally, synergism can improve the efficiency of the treatment, broaden its spectrum of action, limit the development of resistant strains, and reduce its duration and toxicity [7,8]. These arguments supported by the recent recommendation by the WHO that oral artemisinin-based monotherapies are withdrawn from the market and replaced with artemisinin-based combination therapies for the treatment of malaria [9], emphasize the importance of considering combined therapies as an alternative for the treatment of protozoan diseases.

We have recently carried out a study of native plants of the Yucatan peninsula and reported the presence of trypanocidal activity in the leaf extract of *Serjania yucatanensis* [10]. The bioassay-guided purification of the bioactive crude extract resulted in the identification of a 1:1 mixture of terpenoids, lupenone (a triterpene) and caryophyllene oxide (an oxygenated sesquiterpene), as that responsible for the originally detected trypanocidal activity; the mixture also proved to inhibit the egress of trypomastigotes from infected Vero cells without being cytotoxic [11]. We wish to report herein on the synergism of a 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide when tested *in vitro* for trypanocidal activity and *in vivo* when tested against the amastigote form of the parasite during the chronic phase of the infection.

2.3 MATERIALS AND METHODS

2.3.1. Lupenone and caryophyllene oxide

Commercial caryophyllene oxide (Sigma-Aldrich) and lupenone obtained from the oxidation of commercial lupeol (Sigma-Aldrich) were used in all tests. Mixtures were prepared by combining the two terpenoids in different proportions (1:0, 1:4, 2:3, 1:1, 3:2, 4:1 and 0:1; w/w).

2.3.2 Parasites and their growth conditions

Epimastigotes forms of the Tulahuen strain and blood trypomastigote forms of the H4 strain (isolated from a patient with Chagas' disease in Yucatan, Mexico) of *T. cruzi* were used in this study [12]. Epimastigotes were obtained from liver infusion tryptose medium supplemented with 10% fetal bovine serum [13] and blood trypomastigotes were obtained by successive infections of BALB/c mice.

2.3.3 Evaluation of the *in vitro* trypanocidal activity

The trypanocidal activity was assayed on epimastigotes of *T. cruzi* (Tulahuen strain). Experiments were carried out using 96-well microplates containing 1×10^5 epimastigotes/mL. The different proportions of mixture of lupenone and caryophyllene oxide (1:0, 1:4, 2:3, 1:1, 3:2, 4:1, and 0:1), as well as the crude extract of *S. yucatanensis* and the low-polarity (hexane) fraction obtained from the crude extract [10,11] were dissolved in dimethylformamide (DMF; final solvent concentration no greater than 1%) and were evaluated at 100, 50, 25 and 12.5 $\mu\text{g/mL}$. For each experiment there were controls of parasites growing in the presence and absence of DMF. The different mixtures and their corresponding concentrations were added to the wells, and the plates were incubated at 28 °C for 72 h. All assays were performed in duplicate. The activity was evaluated using the XTT colorimetric method, which is based on the reduction of the sodium salt of 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfophenyl)-2-H-tetrazolium-5-carboxanilide) by mitochondrial dehydrogenases to produce formazan crystals [14]; 50 μL of a solution of XTT/PMS (1mg/mL XTT)/ (0.001 mg/mL PMS) were added to each well, and the plates were incubated for an additional 4 h. The plates were read in an ELISA plate spectrophotometer at 450 nm. The activity is expressed as IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$). Amphotericin B was used as positive control because this polyene

antibiotic has been used as a reference drug for the *in vitro* testing of crude extracts and purified natural products on *Trypanosoma* cultures [15,16].

2.3.4 Evaluation of synergism

Fractional inhibitory concentrations (FIC) were calculated as previously described [17]. We have $FIC = F_{Ea} + F_{Eb}$, where $F_{Ea} = IC_{50} \text{ a+b} / IC_{50} \text{ a}$ and $F_{Eb} = IC_{50} \text{ a+b} / IC_{50} \text{ b}$. Values of $FIC < 1$ indicate synergism, values = 1 indicate additive effect, and values > 1 indicate antagonism.

2.3.5 *In vivo* assay against amastigotes of *T. cruzi*

Eight weeks old BALB/c mice and trypomastigotes of *T. cruzi* H4 strain were used to assay for antitrypanosomal activity. Animals were maintained on a light-dark cycle and had access to food and water *ad libitum* during the entire assay.

Thirty BALB/c mice weighing approximately 23 g were randomly divided into five groups ($n = 6$ each). The animals were infected with 100 trypomastigotes through intraperitoneal injection; inoculation conditions were selected based to the reported in previous studies in mice infected with *T. cruzi* in chronic phase [18,19]. Mice were divided into five groups: negative control (CN): infected animals treated with PBS; positive control (CP): infected animals treated with allopurinol (8.5 $\mu\text{g/g}$); hexane fraction (FHex): animals treated with the hexane fraction from the leaf crude extract of *S. yucatanensis* (41.6 $\text{mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$); dose 1 (D1): infected mice treated with a 20.8 $\text{mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$ 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide; dose 2 (D2): infected mice treated with a 41.6 $\text{mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$ 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide. All treatments were administered resuspended in phosphate buffer saline (PBS, NaCl 13.7mM, KCl 2.7mM, Na_2HPO_4 4.3 mM y KH_2PO_4 1.4 mM pH 7.4). Administration started after 45 days post infection, during the chronic phase; the mice in the experimental groups received each treatment orally (adjusted to 50 μL per animal), every 24 hours, for 15 days.

2.3.6 Histopathology study

Samples of cardiac tissue and skeletal muscle from groups of treated and control mice were collected and fixed in 10% formaldehyde for further processing. Paraffin embedded tissue sections were stained with hematoxylin-eosin and examined under a light microscope (40x). The number of amastigotes nest was quantified in 100 fields for each heart tissue and skeletal muscle sample. The experiments were carried out under the approval of the Bioethics Committee of Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", in Mérida, Yucatán, México.

2.3.7 Statistical analyses

The statistical analyses were performed using Prism program 5.0 software. Data are presented as mean values $\pm$ S.D. Statistical analyses: one way ANOVA and post-hoc Tukey's test were used to compare different experimental groups ($p < 0.05$).

2.4 RESULTS AND DISCUSSION

In vitro testing of the leaf crude extract of *S. yucatanensis*, the low-polarity (hexane) fraction from the crude extract, and the different proportions of lupenone and caryophyllene oxide (1:0, 1:4, 2:3, 1:1, 3:2, 4:1 and 0:1) against epimastigotes of *T. cruzi* (Tulahuen strain) showed that the crude extract of *S. yucatanensis* and the hexane fraction had a similar activity (IC_{50} =74.5 and 61.5 μ g/mL, resp.) than that previously reported against *T. cruzi* (Y strain) [11]. Similarly, the trypanocidal activity observed for the 1:1 mixture of lupenone and caryophyllene oxide (IC_{50} =80.3 μ g/mL; Table 2.1) is similar to that reported for the original mixture of terpenoids obtained in a approximate ratio of 1:1 from the leaf extract of *S. yucatanensis* (IC_{50} =80.3 μ g/mL) [11]. However, the highest activity (IC_{50} =10.4 μ g/mL) was observed for the 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide; the synergistic effect of this mixture of terpenoids against epimastigotes was confirmed by a potentiation FIC value of <1 (FIC = 0.46) (Table 2.1). It is interest to point out that the rest of the terpenoid mixtures proportions showed FIC values >1 indicating an antagonistic effect and suggesting that the mixture of terpenoids in a 1:4 proportion is necessary for the full expression of trypanocidal activity and that higher proportions of lupenone result in lower activity. The fact that lupenone does not show significant antiprotozoal activity, and that the activity of

caryophyllene oxide is only moderate, is in agreement with reports in the literature describing a fraction containing lupenone as not showing trypanocidal activity against trypomastigotes of *T. cruzi* [20], and caryophyllene oxide with only a moderate inhibitory activity against cruzipain of *T. cruzi* [21]. However, lupenone has been reported to have anticarcinogenic activity in mouse melanoma [22] and to inhibit the protein tyrosine phosphatase 1B, an attractive target for the development of new drugs for type 2 diabetes and obesity [23]; the biological activities reported for caryophyllene oxide include antifungal [24], anti-platelet aggregation [25], and not being cytotoxic to Vero and THP-1 cells [26].

Table 2.1 *In vitro* trypanocidal activity (IC₅₀ values in µg/mL) of mixtures of lupenone and caryophyllene oxide

Sample	<i>Trypanosoma cruzi</i>	FIC
	Tulahuen strain	
SYH	74.5 µg/mL	---
FHex	61.5 µg/mL	---
Lupenone + caryophyllene oxide 1 : 0	85.0 µg/mL	---
Lupenone + caryophyllene oxide 4 : 1	> 100 µg/mL	5.62
Lupenone + caryophyllene oxide 3 : 2	80.0 µg/mL	3.59
Lupenone + caryophyllene oxide 1 : 1	86.5 µg/mL	3.88
Lupenone + caryophyllene oxide 1 : 4	10.4 µg/mL	0.46
Lupenone + caryophyllene oxide 2 : 3	39.8 µg/mL	1.79
Lupenone + caryophyllene oxide 0 : 1	30.1 µg/mL	---
Amphotericin B	0.7 µg/mL	---

FIC: fractional inhibitory concentrations; SYH: leaf extract of *Serjania yucatanensis*; FHex: hexane fraction

Having the synergism of lupenone and caryophyllene oxide confirmed and taking into account that, to date, there are no reports on their combined trypanocidal activity, the 1:4 mixture was evaluated *in vivo* at two different doses, $20.8 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$ and $41.6 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$, against amastigotes, the parasite form present in the mammalian host and the one responsible for maintaining the infection. The first, most evident results observed were that mice treated with both doses of the 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide did not show the physical deterioration observed in mice belonging to the negative control group (i.e. infected animals only treated with PBS; Figure 2.1A-1D), which presented the clinical signs commonly observed in BALB/c mice infected with *T.cruzi* [27], namely adinamia and alopecia in neck and chest. Additionally, the group treated with both doses of the 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide showed a better survival rate (100% of survival after 60 days of infection, Figure 2.2), than that observed in the positive control (83% of survival, Figure 2.2), which proved to be only slightly higher than that of the negative control (66% of survival; Figure 2.2).

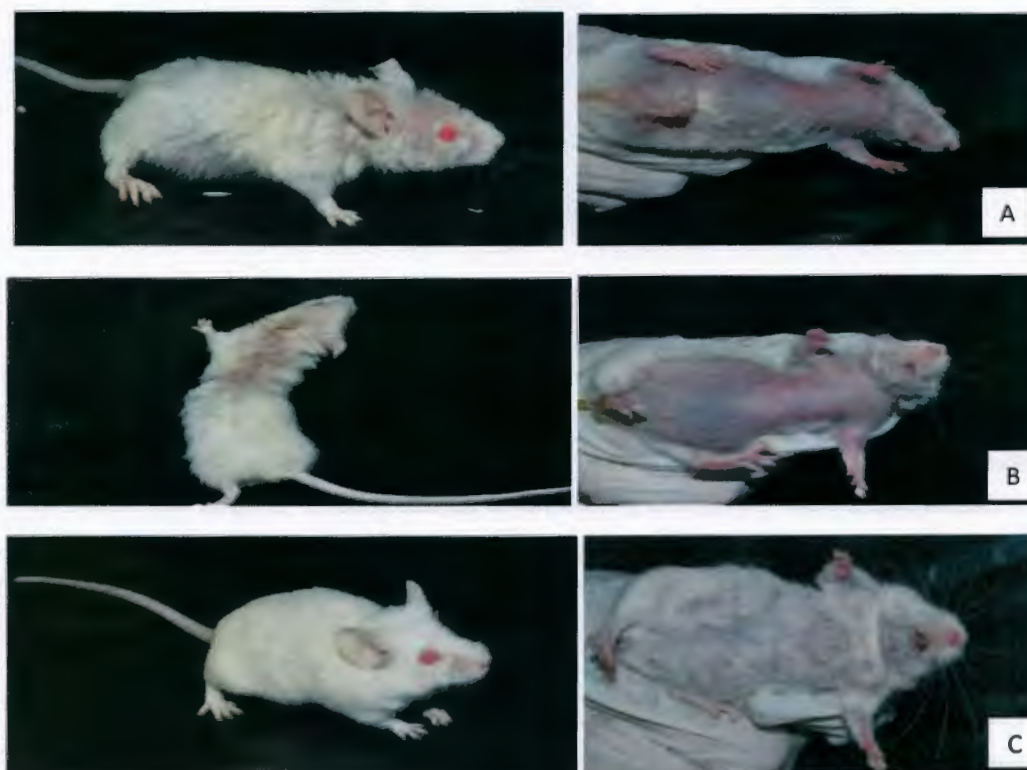




Figure 2.1. Mice belonging to different groups: A) negative control (CN): infected animals treated with PBS; B) positive control (CP): infected animals treated with allopurinol ($8.5\mu\text{g/g}$); C) dose 1 (D1): infected mice treated with a $20.8 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$ 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide; D) dose 2 (D2): infected mice treated with a $41.6 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$ 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide.

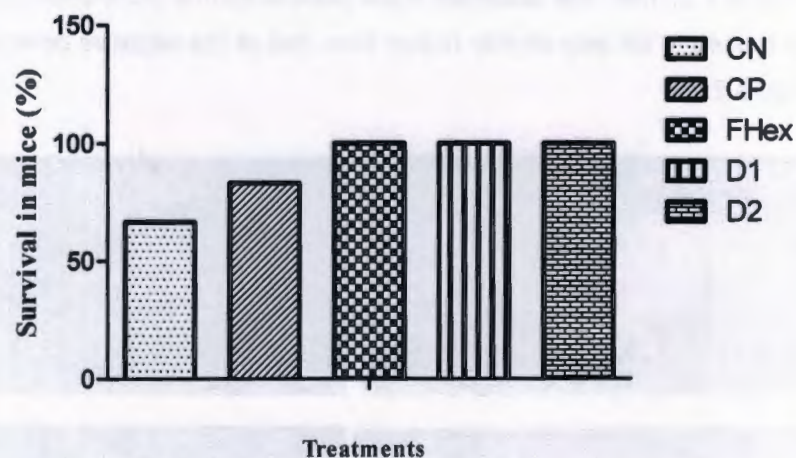


Figure 2.2. Survival rates of the five groups of *T. cruzi*-infected mice during the *in vivo* treatment: CN: negative control, infected animals treated with PBS; CP: positive control, infected animals treated with allopurinol ($8.5\mu\text{g/g}$); FHex: hexane fraction, animals treated with the hexane fraction from the leaf crude extract of *S. yucatanensis* ($41.6 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$); D1: dose 1, infected mice treated with a $20.8 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$ 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide; D2: dose 2, infected mice treated with a $41.6 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$ 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide.

Finally, testing of the hexane fraction ($41.6 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$) and both doses of the 1:4 mixture of terpenoids for their capacity to reduce the number of amastigote nests in infected mice showed that both doses of the 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide reduced the presence of amastigote nests in cardiac tissue by

more than 80% ($p < 0.05$) when compared to untreated mice (Figure 2.3). The 1:4 mixture of terpenoids also showed an important reduction in the number of amastigotes nests in skeletal muscle, with the lowest dose ($20.8 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{day}^{-1}$) showing a reduction of more than 98% ($p < 0.05$) when compared to the negative control (Figure 2.4). The activity of the 1:4 terpenoid mixture against amastigotes of *T. cruzi* is particularly important because most drugs presently used for the treatment of Chagas' disease are effective mainly in the acute phase of the disease but not in the chronic phase (3-5).

It is interesting to point out that the hexane fraction, with *in vitro* activity against epimastigotes, showed no antitrypanosomal activity *in vivo* against amastigote of *T. cruzi* in both heart tissue and skeletal muscle. Additionally, and although mice treated with the reference drug allopurinol showed a decrease in the number of amastigote nests in cardiac tissue and skeletal muscle, the value was not significantly different to that observed in untreated mice (Figures 2.3 ad 2.4); furthermore, the mortality and physical deterioration observed in the animals treated with allopurinol might be due to the reported toxicity of the reference drug when used in the chronic phase of the disease [4,5].

To date there are few reports on the use of synergism as a combined therapy against *T. cruzi*; these include the synergistic effect observed between amiodarone and posaconazole [28], and between aspirin and nifurtimox, the latter reported to be a consequence of the capacity of aspirin to increase the antiparasitic activity of macrophages [29]. A synergistic effect between parthenolide, a terpenoid isolated from *Tanacetum vulgare*, and benznidazole has also been confirmed [30], and the combination of benznidazol and ketoconazol is reported to act synergistically to inhibit the parasite in the acute phase of Chagas' disease in mice infected with CL and Y strains of *T. cruzi* [31]. Taking into account that, to date, there is no adequate treatment for Chagas disease and that the number of studies on the use of synergism as a combined treatment strategy against *T. cruzi* and in the chronic phase of the disease is still limited, the synergistic effect shown by the 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide against *T. cruzi in vivo* represents an important option for the future use of two commercially available natural products to treat this parasitosis.

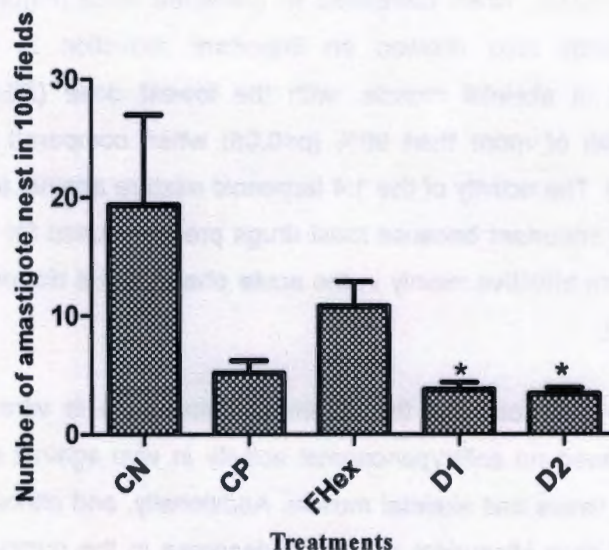


Figure 2.3. *In vivo* antitrypanosomal activity of the different treatments, determined by the number of amastigotes nest observed in cardiac tissue from infected mice. CN: negative control, infected animals treated with PBS; CP: positive control, infected animals treated with allopurinol (8.5 µg/g); FHex: hexane fraction, animals treated with the hexane fraction from the leaf crude extract of *S. yucatanensis* (41.6 mg.kg⁻¹.day⁻¹); D1: dose 1, infected mice treated with a 20.8 mg.kg⁻¹.day⁻¹ 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide; D2: dose 2, infected mice treated with a 41.6 mg.kg⁻¹.day⁻¹ 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and post hoc Tukey's test: *p<0.05 compared with negative control.

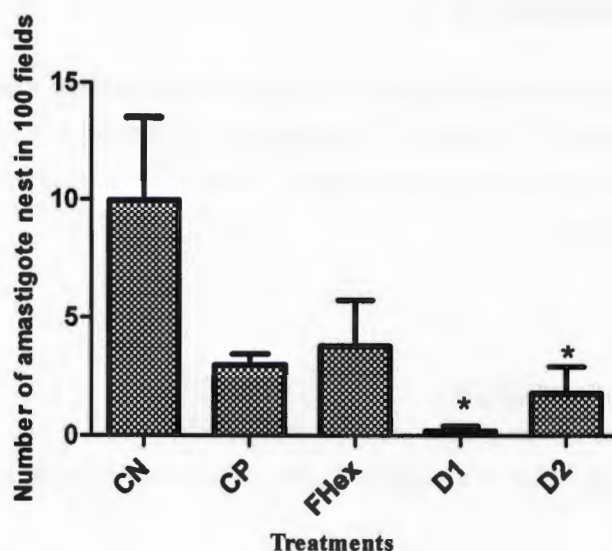


Figure 2.4. *In vivo* antitrypanosomal activity of the different treatments, determined by the number of amastigotes nest observed in skeletal muscle of infected mice. CN: negative control, infected animals treated with PBS; CP: positive control, infected animals treated with allopurinol (8.5µg/g); FHex: hexane fraction, animals treated with the hexane fraction from the leaf crude extract of *S. yucatanensis* (41.6 mg.kg⁻¹.day⁻¹); D1: dose 1, infected mice treated with a 20.8 mg.kg⁻¹.day⁻¹ 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide; D2: dose 2, infected mice treated with a 41.6 mg.kg⁻¹.day⁻¹ 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and post hoc Tukey's test: *p<0.05 compared with negative control.

2.5. CONCLUSIONS

This is the first report on the trypanocidal activity of a mixture of lupenone and caryophyllene oxide against *T. cruzi* *in vitro* and *in vivo*. Our results showed that the 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide is active in the chronic phase of the disease, reducing significantly the number of amastigote nests in both cardiac tissue and skeletal muscle. Future studies will include the evaluation of the trypanocidal activity of the terpenoid mixture at lower concentrations and its administration to infected mice for longer periods of time, together with a better understanding of its mode of action.

2.6 ACKNOWLEDGEMENTS

G. Polanco-Hernández acknowledges the support of the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), through its "Becas Mixtas" program, to carry out a research stay at the University of San Andrés Bolivia. This work was supported by Project FOMIX-Yucatán (66262).

2.7 CONFLICT OF INTEREST

No conflict of interest exists in the results being presented in this paper.

2.8 REFERENCES

- [1] R. Romero, Microbiología y Parasitología Humana, Médica Panamericana, Mexico City, Mexico, 1999.
- [2] World Health Organization (WHO), Descriptive note No.340, 2010, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>.
- [3] J. A. Castro, M. M. De Mecca, and L. C. Bartel, "Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis)," *Human & Experimental Toxicology*, vol. 25, pp. 471-479, 2006.
- [4] V. S. Issa and E. A. Bocchi, "Antitrypanosomal agents: treatment or threat?," *Lancet*, vol. 376, pp. 768-769, 2010.
- [5] M. A. Rodríguez, "Nuevas perspectivas en el manejo terapéutico de la enfermedad de Chagas," *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, vol. 22, pp. 123-131, 2005.
- [6] World Health Organization (WHO), "Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR), Natural products for parasitic diseases," *TDR News*, vol. 62, 2000.
- [7] F. Herrmann and M. Wink, "Synergistic interactions of saponins and monoterpenes in Hela cells, Cos 7 cells and in erythrocytes," *Phytomedicine*, vol. 18, pp. 1191-1196, 2011.
- [8] H. Wagner, "Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals," *Fitoterapia*, vol. 82, pp. 34-37, 2011.
- [9] World Health Organization (WHO), "Reporte mundial de malaria," 2011 http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/es/index.html.
- [10] G. Polanco-Hernández, F. Escalante-Erosa, K. García-Sosa, K. Acosta, M. Chan-Bacab, H. Sagua, J. Gonzalez, L. Osorio, R. E. Moo-Puc and L. M. Peña-Rodríguez, "In vitro and in vivo trypanocidal activity of native plants from the Yucatan península," *Parasitology Research*, vol. 110, pp. 31-35, 2012.

- [11] G. Polanco-Hernández, F. Escalante-Erosa, K. García-Sosa, M. Chan-Bacab, H. Sagua, J. González, L. Osorio and L. M. Peña-Rodríguez, "Metabolites from the leaf extract of *Serjania yucatanensis* with trypanocidal activity against *Trypanosoma cruzi*," *Parasitology Research*, vol. 111, pp. 451-455, 2012.
- [12] M. Barrera-Pérez, M. E. Rodríguez-Félix, E. Guzmán-Marín, J. Zavala and E. Dumonteil, "Biological behaviour of three strains of *Trypanosoma cruzi* from Yucatan, Mexico," *Revista Biomédica*, vol. 12, pp. 224-230, 2001.
- [13] E. P. Camargo, "Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypomastigotes in liquid medium," *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 12, pp. 93-100, 1964.
- [14] J. Rojas, J. R. Satalaya, M. Grandez, L. Vilchez, E. Rengifo, E. Salamanca, N. Flores, A. Giménez, J. A. Ávila and G. Ruiz, "Actividad leishmanicida de plantas medicinales de la amazonía peruana," *Revista Boliviana de Química*, vol. 26, pp. 1-8, 2009.
- [15] V. Yardley and S. L. Croft, "In vitro and in vivo activity of amphotericin B-lipid formulations against experimental *Trypanosoma cruzi* infections," *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 61, pp. 193-197, 1999.
- [16] S. Cencig, N. Colltel, C. Truyens and Y. Carlier, "Parasitic loads in tissues of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with AmBisome," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 5, Article ID e1216, 2011.
- [17] M. C. Berenbaum, "What is synergy?," *Pharmacological Reviews*, vol. 41, pp. 93-141, 1989.
- [18] M. Jiménez-Coello, E. Guzmán-Marín, S. Pérez-Gutiérrez, G. M. Polanco-Hernández and K. Y. Acosta-Viana, "Antitrypanosomal activity of *Senna villosa* in infected Balb/C mice with *Trypanosoma cruzi* during the sub acute phase of infection," *African Journal of Traditional Complementary and alternative medicines*, vol. 8, pp. 164-169, 2011.
- [19] V. Rodriguez-Esperandim, D. da Silva-Ferreira, J. Saraiva, M. L. Andrade, E. Soares-Costa, A. C. Pereira, J. Kenupp-Bastos and S. de Albuquerque,

- "Reduction of parasitism tissue by treatment of mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* with lignano lactones," *Parasitology Research*, vol. 107, pp. 525-530, 2010.
- [20] L.V. Rosas, M. S. C. Cordeiro, F. R. Campos, S. K. R. Nascimento, A. H. Januário, S. C. Franca, A. Nomizo, M. P. Toldo, S. Alburquerque and O. S. Pereira, "In vitro evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae)," *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 40, pp. 663-670, 2007.
- [21] W. Setzer, S. Stokes, A. Bansal, W. Haber, C. Caffrey, E. Hansell and E. J. McKerrow, "Chemical composition and cruzain inhibitory activity of *Croton draco* bark essential oil from Monteverde, Costa Rica," *Natural Products Communications*, vol. 2, pp. 685-689, 2007.
- [22] K. Hata, K. Hori and S. Takahashi, "Differentiation and apoptosis inducing activities by pentacyclic triterpenes on a mouse melanoma cell line," *Journal of Natural Products*, vol. 65, pp. 645-648, 2002.
- [23] M. Na, B. Y. Kim, H. Osada and J. S. Ahn, "Inhibition of protein tyrosine phosphatase 1B by lupeol and lupenone isolated from *Sorbus Commixta*," *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol. 24, pp. 1056-1059, 2009.
- [24] D. Yang, L. Michel, J. P. Chaumont and J. Millet-Clerc, "Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an *in vitro* experimental model of onychomycosis," *Mycopathologia*, vol. 148, pp. 79-82, 1999.
- [25] W. Y. Lin, Y. H. Kuo, Y. L. Chang, C. M. Teng, E. C. Wang and T. Ishikawa, "Anti-platelet aggregation and chemical constituents from the rhizome of *Gynura japonica*," *Planta Medica*, vol. 69, pp. 757-764, 2003.
- [26] P. Escobar, S. M. Leal, L. V. Herrera, J. R. Martínez and E. Stashenko, "Chemical composition and antiprotozoal activities of *Colombian Lippia* spp. essential oils and their major components," *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 105, pp. 184-190, 2010.

- [27] E. Díaz-Limay, H. Escalante and C. A. Jara, "Niveles de parasitemia y alteraciones histopatológicas en *Mus Musculus* BALB/C infectado con *Trypanosoma cruzi* obtenido de *Panstrongylus chinai* del Valle Chamán, La Libertad, Perú," *Parasitología Latinoamericana*, vol. 59, pp. 153-158, 2004.
- [28] P. Veiga-Santos, E. Barrias, J. F. C. Santos, T. L. Barros-Moreira, T. M. Ulisses da Carvalho, J. Urbina and W. de Souza, "Effects of amiodarone and posaconazole on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*," *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 40, pp. 61-71, 2012.
- [29] R. López-Muñoz, M. Faúndez, S. Klein, S. Escanilla, G. Torres, D. Lee-Liu, J. Ferreira, U. Kemmerling, M. Orellana, A. Morello, A. Ferreira and J. Maya, "*Trypanosoma cruzi*: *in vitro* effect of aspirin with nifurtimox and benznidazole," *Experimental Parasitology*, vol. 124, pp. 167-171, 2010.
- [30] K. J. Pelizzaro-Rocha, T. S. Tiuman, E. Izumi, T. Ueda-Nakamura, B. P. D. Filho and C. V. Nakamura, "Synergistic effects of parthenolide and benznidazole on *Trypanosoma cruzi*," *Phytomedicine*, vol. 18, pp. 36-39, 2010.
- [31] M. S. S. Araújo, O. A. Martins-Filho, M. E. S. Pereira and Z. A. Brener, "Combination of benznidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas' disease," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 45, pp. 819-824, 2000.

CAPÍTULO III

ACTIVIDAD LEISHMANICIDA DE TERPENOIDES OBTENIDOS DE *Serjania yucatanensis*

DESCRIPCIÓN DEL CAPÍTULO

La evaluación de la actividad leishmanicida de diferentes mezclas de lupenona y óxido de cariofileno contra especies de *Leishmania* del Viejo y Nuevo Mundo mostraron que tanto el óxido de cariofileno puro y la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno (1:4) son similarmente activos contra promastigotes de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. tropica* y *L. aethiopica*, con valores de IC_{50} entre 14.0 y 39.3 $\mu\text{g/mL}$, y reducen la infectividad de macrófagos por *L. mexicana* y *L. tropica*. Sin embargo, la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno (1:4) es menos citotóxica y mostró mejor Índice de selectividad que el sesquiterpeno puro.

LEISHMANICIDAL ACTIVITY OF TERPENOIDS FROM *Serjania yucatanensis**

Glendy M. Polanco-Hernández,^{a,d} Fabiola Escalante-Erosa,^a Karlina García-Sosa,^a Alberto Giménez-Turba,^b Efraín Salamanca,^b Giulia Getti,^c Rajeev Rai,^c Karla Y. Acosta Viana,^d Rosa E. Moo Puc,^e Luis M. Peña-Rodríguez^a

^aUnidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, México

^bInstituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia.

^cSchool of Science, University of Greenwich at Medway, Kent, UK

^dCentro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Yucatán, México, Universidad Autónoma de Yucatán.

^eUnidad de Investigación Médica Yucatán, Centro Médico "Ignacio García Téllez" IMSS, Yucatán, México.

3.1 ABSTRACT

Evaluation of the leishmanicidal activity of different mixtures of caryophyllene oxide and lupenone against old and new world *Leishmania* spp. showed that both the pure caryophyllene oxide and the 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide are similarly active against promastigotes of *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. tropica* and *L. aethiopica*, with IC₅₀ values ranging from 14.0 to 39.3 µg/mL, and reduce the infectivity of macrophages by *L. mexicana* and *L. tropica*. However, the 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide is less cytotoxic and shows better selectivity index than the pure sesquiterpene.

Keywords: cutaneous leishmaniasis - *Leishmania* - lupenone - caryophyllene oxide – synergism

* Los resultados descritos en este capítulo forman parte del Manuscrito "Leishmanicidal activity of terpenoids from *Serjania yucatanensis*" sometido en PLOS ONE. Autores: Glendy Polanco-Hernández, Fabiola Escalante-Erosa, Karlina García-Sosa, Alberto Giménez-Turba, Efraín Salamanca, Giulia Getti, Rajeev Rai, Karla Y. Acosta-Viana, Rosa E. Moo Puc, Luis M. Peña-Rodríguez.

3.2 INTRODUCTION

Leishmaniasis is a complex disease caused by parasitic protozoa of the genus *Leishmania*; it affects over 12 million people worldwide and is endemic to 88 countries in four continents, with 350 million people at risk of being infected (WHO, 2012). Over 20 species of *Leishmania* parasites are transmitted to humans by around 30 species of phlebotomine sandflies causing a wide spectrum of symptoms. Clinical manifestations vary from self-healing cutaneous lesions (cutaneous leishmaniasis) to deadly visceral forms (visceral leishmaniasis). Cutaneous leishmaniasis, the most common form, ordinarily develops following infection with *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* and *L. guyanensis*, in the new world, and with *L. tropica*, *L. major* and *L. aethiopica*, in the old world (Tay et al., 2003; WHO, 2012).

The chemotherapeutic agents most commonly used for treating leishmaniasis, e.g. sodium stibogluconate, meglumine antimonate, miltefosine and amphotericin B are toxic, costly, require long periods of treatment, and cause serious side effects. These facts, in addition to the established resistance developed by *Leishmania* parasites to some of these drugs, emphasize the importance of searching for new and more effective pharmaceuticals to treat the disease (Sundar, 2001; da Cunha et al., 2010; WHO, 2012).

One of the strategies for developing novel pharmaceuticals is to evaluate the synergism between two or more products as part of a combined therapy treatment. Drug combinations are applied successfully in the treatment of infectious diseases, hypertension, rheumatic diseases, and many types of cancer. Additionally, phytotherapy, which employs extracts and not single chemical entities, is still used in many countries to treat various human diseases and health disorders (Wagner, 2011). The advantages of using drug synergism include an increase of therapeutic efficacy, a decrease in toxicity, as well as a reduction in the development of drug resistance (Herrmann and Wink, 2011; Wagner, 2011). Combination therapy has been especially recommended for visceral leishmaniasis, in order to increase treatment effectiveness and tolerability, to reduce therapy duration and costs, and to limit the emergence of resistance (Sundar and Chakravarty, 2013).

We have recently carried out a study on the antiprotozoal activity of a group of native plants of the Yucatan peninsula and reported the presence of trypanocidal activity in

the leaf extract of *Serjania yucatanensis* (Polanco-Hernández et al., 2012a; 2012b); similarly, we have demonstrated the synergism of a 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide when tested *in vitro* for trypanocidal activity and *in vivo* against the amastigote form of the parasite during the chronic phase of the infection (Polanco-Hernández et al., 2013). In the present study we have extended our evaluation to the possible synergism of mixtures of lupenone and caryophyllene oxide when tested for leishmanicidal activity against different *Leishmania* spp.

3.3 MATERIALS AND METHODS

3.3.1 Caryophyllene oxide and lupenone

Mixtures of commercial caryophyllene oxide and lupenone were prepared by combining the two terpenoids in different proportions (1:0, 1:4, 2:3, 1:1, 3:2, 4:1 and 0:1; w/w).

3.3.2 Culturing of *Leishmania* spp. and cell lines

Promastigotes of *L. amazonensis* (MHOM/BR76/LTB012), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), *L. mexicana* (M5G, GFP expressing clone derived from MNYC/BZ/62/M379), *L. tropica* (O5G, GFP expressing clone derived from MHOM/SU/58/OD) and *L. aethiopica* (L8G, GFP expressing clone derived from MHOM/ET/72/L100) were maintained in Schneider medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1X penicillin-streptomycin-glutamine. GFP expressing parasites were maintained in the same medium as described above, but supplemented with 700µg/mL G418 as previously reported (Parbhu-Patel et al., 2013).

Cell cultures of Vero cells were maintained at 37°C in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% FBS, in 75-cm³ growth flasks kept in a humidified CO₂ (5%) incubator.

THP-1 cell line (ECACC No. 8808120) was routinely cultured at 37°C in a humidified CO₂ (5%) incubator, at 2.5x10⁵ cells/mL in complete RPMI medium supplemented with 10% FBS and 1X penicillin-streptomycin-glutamine.

3.3.3 Leishmanicidal assay

Promastigotes of *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. tropica* and *L. aethiopica* (3×10^6 promastigotes/mL) were seeded in 96 well plates and incubated with the mixture of terpenoids. The different proportions of lupenone and caryophyllene oxide (1:0, 1:4, 2:3, 1:1, 3:2, 4:1 and 0:1; w/w), as well as the crude extract of *S. yucatanensis* and the low polarity (hexane) fraction, were tested in concentrations of 50, 25, 12.5 and 6.25 $\mu\text{g/mL}$. Dimethylformamide, used to dissolve the samples at 0.5%, was evaluated as a blank and showed no effect on the parasites. All assays were performed in triplicate. Amphotericin B was used as the reference drug. The plate was incubated for 48h at 27°C and inhibition of promastigote growth was determined by XTT and flow cytometry methods (Rojas et al., 2009; Parbhu-Patel et al., 2013).

3.3.4 Evaluation of synergism

Fractional inhibitory concentrations (FIC) were calculated as previously described (Berenbaum, 1989). $\text{FIC} = \text{FEa} + \text{FEb}$, where $\text{FEa} = \text{IC}_{50} \text{ a+b} / \text{IC}_{50} \text{ a}$ and $\text{FEb} = \text{IC}_{50} \text{ a+b} / \text{IC}_{50} \text{ b}$. Values of $\text{FIC} < 1$ indicate synergism, values = 1 indicate additive effect, and values > 1 indicate antagonism.

3.3.5 Cytotoxic activity against Vero cells

The cytotoxicity of the different mixtures of lupenone and caryophyllene oxide (1:0, 1:4, 2:3, 1:1, 3:2, 4:1 and 0:1; w/w), as well as the crude extract of *S. yucatanensis* and the low polarity (hexane) fraction, were evaluated on Vero cells adhered to 96-well plates using the sulforhodamine B method (Vichai and Kirtikara, 2006). Cell viability was evaluated after two days of incubation at 37°C in a CO_2 atmosphere. Cytotoxicity is presented as IC_{50} . All assays were performed in triplicate and repeated twice. Samples having a selectivity index of 3 or more were considered to be selective (Valencia et al., 2011).

3.3.6 Infection of THP-1 cells with *Leishmania*

Stationary phase metacyclic promastigotes were isolated via peanut agglutination from transgenic GFP-expressing parasites of *L. mexicana* and *L. tropica* as previously reported (Ready and Smith, 2010; Parbhu-Patel et al., 2013) and used to infect retinoic acid-treated THP-1 cells at a ratio of 10:1. After 24h of infection with GFP-expressing parasites, THP-1 infected cultures were centrifuged at 100g for 5 min and washed thrice with RPMI medium to remove extracellular promastigotes. The remaining cells were transferred to a 96 well plate at a final concentration of 2.5×10^5 cells/mL and treated with the mixture of terpenoids and amphotericin B as positive control. The plates were incubated at 37°C in a CO₂ humidified incubator for 24h. The percentage of THP-1 cells infected with fluorescent parasites was analyzed via flow cytometry (Accuri C6, BD, UK) as previously described.

3.3.7 Statistical analysis

Results in each experiment are reported as the mean values with their corresponding standard deviation determined using the Prism program 5.0 software.

3.4 RESULTS AND DISCUSSION

Testing of the leaf crude extract of *Serjania yucatanensis*, together with its corresponding low-polarity (hexane) fraction and the different mixtures of lupenone and caryophyllene oxide, for leishmanicidal activity against promastigotes of five *Leishmania* species of the old (*L. tropica* and *L. aethiopica*) and new (*L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. mexicana*) world, showed that the crude extract, the semipurified fraction, the pure caryophyllene oxide and the 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide are the most active against all five *Leishmania* spp. (Table 1). Moreover, although both pure caryophyllene oxide and the 1:4 mixture of terpenoids showed the strongest activity against *L. tropica* and *L. mexicana* (IC₅₀=15.1 and 14.0 µg/mL, respectively, for caryophyllene oxide; IC₅₀=19.4 and 17.8 µg/mL, respectively, for the 1:4 mixture of terpenoids), it was only against *L. braziliensis* and *L. amazonensis* that the 1:4 mixture of terpenoids showed a clear potentiation (FIC=0.84) and additive (FIC=1.0) synergistic effect, respectively (Table 1). The synergistic effect

shown by the 1:4 mixture of terpenoids is in agreement with that previously reported against *Trypanosoma cruzi* (Polanco-Hernández et al., 2013).

Taking into account the geographical origin of the two groups of *Leishmania* spp. used in this study, and the fact that both pure caryophyllene oxide and the 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide showed similarly-high levels of activity against *L. tropica* (old world species) and *L. mexicana* (new world species), it is possible to affirm that there is no correlation between the geographical origin of a particular species and its susceptibility to treatment. Furthermore, the fact that the five *Leishmania* spp. used for this evaluation clearly showed differential levels of susceptibility to the bioactive crude extract of *S. yucatanensis*, the semipurified low-polarity (hexane) fraction, as well as pure caryophyllene oxide and the 1:4 mixture of terpenoids (Table 1), is consistent with previous reports of species-specific drug sensitivity (Sundar and Chatterjee, 2006). Since the development of new medicines for leishmaniasis is hampered by the variety of species responsible for human infection (Sundar, 2001; Alvar et al., 2006; Sundar and Chatterjee, 2006), it has been proposed that investigations about the processes behind *Leishmania* infection, as well as identification of novel treatments and/or vaccines, must be based on models that include this variety (Croft et al., 2002; Melby, 2002; Croft et al., 2006).

The highest leishmanicidal activity of the leaf crude extract of *S. yucatanensis*, the semipurified low-polarity (hexane) fraction, and the different mixtures of lupenone and caryophyllene oxide was observed against promastigotes of *L. mexicana* and *L. tropica*. This same group of samples was evaluated for its ability to inhibit infection in cells carrying parasites of *L. mexicana* and *L. tropica*. This bioassay is based on the in vitro model of the clinical stage of the disease and it is carried out following infection of terminally differentiated THP-1 cells with metacyclic promastigotes (Galy et al., 2006; Parbhu-Patel et al., 2013). The results obtained showed that only the 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide (IC_{50} =22.9 and 26.9 μ g/mL for *L. mexicana* and *L. tropica*, respectively) and the pure caryophyllene oxide (IC_{50} =21.6 and 25.5 μ g/mL for *L. mexicana* and *L. tropica*, respectively) (Table 2) were able to significantly reduce the number of infected cells by the two *Leishmania* spp, indicating that both caryophyllene oxide and the 1:4 mixture of terpenoids are similarly effective in reducing infection. These results coincide with those previously reported about a trypanocidal fraction containing a mixture of lupenone and caryophyllene oxide that significantly inhibited the egress of *T. cruzi* from infected Vero cells (Polanco-Hernández et al., 2012b).

Interestingly, even though the leaf crude extract of *S. yucatanensis* and the semipurified low-polarity (hexane) fraction had shown very good activity against promastigotes of *Leishmania* (Table 1), both were unable to reduce the number of infected cells with both *Leishmania* spp. (Table 2). This is often the case with many crude extracts; semipurified fractions and pure metabolites which can exhibit very good activity when tested against promastigotes, but cannot maintain their activity when evaluated against intracellular amastigotes. This contributes to the difficulties associated with development of new pharmaceutical leads for the treatment of leishmaniasis.

Although both pure caryophyllene oxide and the 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide showed a similar profile of activity when tested against promastigotes of *Leishmania* spp. and in the inhibition of infection bioassay, the terpenoid mixture showed a lower cytotoxicity ($IC_{50} = 66.15 \mu\text{g/mL}$) and a better selectivity index (3.7 and 3.4 for *L. mexicana* and *L. tropica*, respectively) than those of pure caryophyllene oxide ($IC_{50} = 43.30 \mu\text{g/mL}$ and $SI < 3.0$). These findings, i.e. a good leishmanicidal activity, a reduction in the infectivity of macrophages, and a high selectivity index, confirmed the importance of synergism in the antiprotozoal activity previously reported for the 1:4 mixture of terpenoids (Polanco-Hernández et al., 2013).

On the basis of the results presented here, it is possible to argue that the 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide may be affecting one or more crucial factors for *Leishmania* spp. survival inside host cells. Possible mechanisms of action could be the inhibition of defense mechanisms of macrophages such as cell signaling, production of hydrolytic enzymes, cytokines and toxic metabolites (Olivier et al., 2005).

The activity shown by the 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide against *Leishmania* spp. identifies this combination of terpenoids as an important option for the future development of a treatment against cutaneous leishmaniasis, since a combination of natural products might reduce the possibility of side effects, improve efficacy and generate less resistance in the parasite. However, further studies *in vivo* are needed in order to establish the place and mechanism of action of the terpenoid mixture and to confirm its therapeutic potential.

Table 3.1. Leishmanicidal activity (IC₅₀ values) of mixtures of lupenone and caryophyllene oxide.

Sample	<i>Leishmania</i> <i>amazonensis</i>	FIC	<i>Leishmania</i> <i>braziliensis</i>	FIC	<i>Leishmania</i> <i>mexicana</i>	FIC	<i>Leishmania</i> <i>tropica</i>	FIC	<i>Leishmania</i> <i>aethiopica</i>	FIC
SYH	73.6 µg/mL±9.0	---	40.2 µg/mL±4.6	---	14.2 µg/mL±4.0	---	6.3 µg/mL±3.2	---	30.0 µg/mL±6.0	---
FHex	50.2 µg/mL±8.3	---	15.9 µg/mL±1.8	---	7.0 µg/mL±2.2	---	8.6 µg/mL±1.4	---	16.6 µg/mL±3.2	---
Lupenone+caryophyllene oxide 1 : 0	> 100 µg/mL	---	>100 µg/mL	---	25.6 µg/mL±7.3	---	49.8 µg/mL±17.5	---	> 100 µg/mL	---
Lupenone+caryophyllene oxide 4 : 1	> 100 µg/mL	3.85	> 100 µg/mL	4.51	25.3 µg/mL±6.5	2.70	34.9 µg/mL±4.7	3.01	94.2 µg/mL±5.0	3.51
Lupenone+caryophyllene oxide 3 : 2	> 100 µg/mL	3.27	> 100 µg/mL	3.50	27.4 µg/mL±6.7	3.02	33.5 µg/mL±3.3	2.88	63.2 µg/mL±2.8	2.35
Lupenone+caryophyllene oxide 1 : 1	83.3 µg/mL±0.5	2.66	68.7 µg/mL±0.7	2.40	37.0 µg/mL±4.0	4.08	49.4 µg/mL±1.9	4.26	81.4 µg/mL±2.4	3.03
Lupenone+caryophyllene oxide 2 : 3	80.4 µg/mL±0.3	2.57	39.4 µg/mL±0.6	1.38	30.0 µg/mL±5.1	3.31	27.4 µg/mL±3.6	2.36	46.5 µg/mL±0.4	1.73
Lupenone+caryophyllene oxide 1 : 4	33.6 µg/mL±4.8	1.0	24.1 µg/mL±2.5	0.84	17.8 µg/mL±0.4	1.96	19.4 µg/mL±0.6	1.66	37.3 µg/mL±3.0	1.38
Lupenone+caryophyllene oxide 0 : 1	39.3 µg/mL±3.8	---	35.1 µg/mL±2.1	---	14.0 µg/mL±1.0	---	15.1 µg/mL±2.9	---	36.6 µg/mL±3.3	---
Amphotericin B	0.3 µg/mL	---	0.07 µg/mL	---	0.1 µg/mL±0.05	---	0.2 µg/mL±0.05	---	0.9 µg/mL±0.07	---

FIC: fractional inhibitory concentrations; SYH: leaf extract of *Serjania yucatanensis*; FHex: hexane fraction. The shaded areas represent samples with higher activity

Table 3.2. Inhibition in the infection of THP-1 cells with *Leishmania tropica* and *Leishmania mexicana* by mixtures of lupenone and caryophyllene oxide (IC₅₀ values)

Sample	<i>Leishmania tropica</i>	<i>Leishmania mexicana</i>
SYH	>100 µg/mL	>100 µg/mL
FHex	61.3 µg/mL±24.0	74.7 µg/mL±25.2
Lupenone+caryophyllene oxide 1 : 0	>100 µg/mL	> 100 µg/mL
Lupenone+caryophyllene oxide 4 : 1	>100 µg/mL	>100 µg/mL
Lupenone+caryophyllene oxide 3 : 2	82.7 µg/mL±7.2	97.7 µg/mL±2.2
Lupenone+caryophyllene oxide 1 : 1	>100 µg/mL	>100 µg/mL
Lupenone+caryophyllene oxide 2 : 3	59.9 µg/mL±8.3	46.7 µg/mL±6.5
Lupenone+caryophyllene oxide 1 : 4	26.9 µg/mL±3.8	22.9 µg/mL±1.9
Lupenone+caryophyllene oxide 0 : 1	25.5 µg/mL±1.3	21.6 µg/mL±2.1
Amphotericin B	0.5 µg/mL±0.05	0.4 µg/mL±0.1

SYH: leaf extract of *Serjania yucatanensis*; FHex: hexane fraction. The shaded areas represent samples with higher activity

GMPH gratefully acknowledge CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) for support through its "Becas Mixtas" Program to carry out a research stays in Bolivia and the UK.

3.6 REFERENCES

- Alvar, J., Croft, S., Olliaro, P., 2006. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 61, 223-274.
- Berenbaum, M., 1989. What is synergy?. *Pharmacol. Rev.* 41, 93-141.
- Croft, S.L., Seifert, K., Yardley, V., 2006. Current scenario of drug development for Leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* 123, 399-410.
- Croft, S.L., Yardley, V., Kendrick, H., 2002. Drug sensitivity of *Leishmania* species: some unresolved problems. *T. Roy. Soc. Trop. Med. H.* 96, 127-129.
- Da Cunha, E., Ramalho, T., Mancini, D., Fonseca, E., Oliveira, A., 2010. New Approaches to the Development of Anti-Protozoan Drug Candidates: a Review of Patents. *J. Braz. Chem. Soc.* 21, 1787-1806.
- Galy, V., Askjaer, P., Franz, C., López-Iglesias, C., Mattaj, I.W., 2006. MEL-28, a novel nuclear-envelope and kinetochore protein essential for zygotic nuclear-envelope assembly in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 16, 1748-1756.
- Herrmann, F., Wink, M., 2011. Synergistic interactions of saponins and monoterpenes in Hela cells, cos 7 cells and erythrocytes. *Phytomedicine.* 18, 1191-1196.
- Melby, P.C., 2002. Vaccination against cutaneous leishmaniasis: Current status. *Am. J. Clin. Dermatol.* 3, 557-570.
- Olivier, M., Gregory, D.J., Forget, G., 2005. Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 293-305.
- Parbhu-Patel, A., Deacon, A., Getti, G., 2013. Development and validation of four *Leishmania* species constitutively expressing GFP protein. A model for drug discovery and disease pathogenesis studies. *Parasitol.* doi:10.1017/S0031182013001777.
- Polanco-Hernández, G., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Acosta, K., Chan-Bacab, M., Sagua, H., Gonzalez, J., Osorio, L., Moo-Puc, R.E., Peña-Rodríguez,

- L.M., 2012a. *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of native plants from the Yucatan peninsula. Parasitol. Res. 110, 31-35.
- Polanco-Hernández, G., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Chan-Bacab, M., Sagua, H., González, J., Osorio, L., Peña-Rodríguez, L.M., 2012b. Metabolites from the leaf extract of *Serjania yucatanensis* with trypanocidal activity against *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Res. 111, 451-455.
- Polanco-Hernández, G., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Rosado, M.E., Guzmán-Marín, E., Acosta-Viana, K.Y., Jimenez-Turba, A., Salamanca, E., Peña-Rodríguez, L.M., 2013. Synergistic effect of lupenone and caryophyllene oxide against *Trypanosoma cruzi*. Evid. Based. Complement. Alternat. Med. doi: 10.1155/2013/435398.
- Ready, P.D., Smith, D.F., 1988. Peanut lectin agglutination and isolation of infective forms of *Leishmania major*. T. Roy. Soc. Trop. Med. H. 82, 418.
- Rojas, J., Satalaya, J.R., Grandez, M., Vilchez, L., Rengifo, E., Salamanca, E., Flores, N., Giménez, A., Ávila, J.A., Ruiz, G., 2009. Actividad leishmanicida de plantas medicinales de la amazonía peruana. Rev. Boliv. Quim. 26, 1-8.
- Sundar, S., 2001. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. Trop. Med. Int. Health. 6, 849-854.
- Sundar, S., Chakravarty, J., 2013. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. Expert. Opin. Pharmacother. 14, 53-63.
- Sundar, S., Chatterjee, M., 2006. Visceral leishmaniasis current therapeutic modalities. Indian. J. Med. Res. 123, 345-352.
- Tay, J., Lara, R., Velasco, O., Gutiérrez, M., 2003. Parasitología Médica. (Ed.), Méndez. México, pp. 876.
- Valencia, L., Muñoz, D.L., Robledo, S.M., Echeverri, F., Arango, G.J., Vélez, I.D., Triana, O., 2011. Actividad tripanocida y citotóxica de extractos de plantas colombianas. Biomed. 31, 552-559.

Vichai, V., Kirtikara, K., 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* 1, 1112–1116.

Wagner, H., 2011. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Fitoterapia*. 82, 34-37.

WHO-World Health Organization, 2012. Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR). Leishmaniasis disease information. IOP Publishing <http://www.who.int/tdr/diseases/leish/info/en/index.html>. Accessed 10 February 2014.

CAPÍTULO IV

LA ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIA DE LA MEZCLA DE TERPENOIDES ¿ES SELECTIVA PARA LA FAMILIA *Trypanosomatidae*?

DESCRIPCIÓN DEL CAPÍTULO

La actividad antiprotozoaria de la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno en diferentes proporciones contra *Giardia lamblia* y *Plasmodium falciparum* mostraron que no presentan actividad y que la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno (1:4) no tiene efecto sinérgico contra estos protozoarios (IC_{50} = 47.3 y 50 μ g/mL para *G. lamblia* y *P. falciparum*, respectivamente), sugiriendo con estos resultados, que la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno (1:4) es únicamente activa y específica para parásitos de la familia *Trypanosomatidae* que incluye *Leishmania* spp. y *T. cruzi*.

SHORT REPORT

THE ANTIPROTOZOAL ACTIVITY OF THE MIXTURE OF TERPENOIDS IS SELECTIVE FOR *Trypanosomatidae* FAMILY?*

Glendy M. Polanco-Hernández,^{a,d} Fabiola Escalante-Erosa,^a Karlina García-Sosa,^a Alberto Giménez-Turba,^b Efraín Salamanca,^b Vanessa Yardley,^c Simon Croft,^c Karla Y. Acosta Viana,^d and Luis M. Peña-Rodríguez^a

^aUnidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, México

^bInstituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia.

^cFaculty of Infectious & tropical Diseases, London School of Hygiene & Tropical Medicine, London , UK.

^dCentro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Yucatán, México, Universidad Autónoma de Yucatán.

Parasitic diseases such as leishmaniasis, american trypanosomiasis, malaria and amebiasis affect billions of people and cause approximately 1.4 million deaths per year, and are considered the main causes of morbidity in most countries of the tropic (WHO, 2011). Evaluation of a 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide, which had shown strong trypanocidal activity both *in vitro* and *in vivo* against *T. cruzi* and good activity against various strains of *Leishmania* spp. from the new and old world, proved to be inactive against *Plasmodium falciparum* and *Giardia lamblia*, suggesting that the

* Los resultados descritos en este capítulo forman parte de un short report: Mixture of terpenoids selective for *Trypanosomatidae* family? Sometido en Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y aromáticas. Autores: Glendy Polanco-Hernández, Fabiola Escalante-Erosa, Karlina García-Sosa, Alberto Giménez-Turba, Efraín Salamanca, Vanessa Yardley, Simon Croft, Karla Y. Acosta Viana and Luis M. Peña-Rodríguez.

mixture of terpenoids is specific in its activity against protozoan parasites of the *Trypanosomatidae* family.

Malaria is a serious and sometimes fatal disease caused by a parasite belonging to the *Plasmodiidae* family and to the genus *Plasmodium*, which is transmitted by the bite of the female *Anopheles* mosquito (CDC, 2010). Amebiasis is an intestinal disease caused by *Entamoeba histolytica* belonging to the *Entamoebidae* family being one the main causes of diarrhea in children younger than five years of age (Rodríguez-Magallán, 1999). Giardiasis is caused by a pathogenic protozoan *Giardia lamblia* belonging to the *Hexamitidae* family transmitted by fecal-oral producing duodenitis, acute or persistent diarrhea, anorexia and weight loss (CDC, 2010).

Moreover, *Trypanosomatidae* family is characterized by flagellated protozoan that present a kinetoplast; the three major human diseases caused by trypanosomatids are Chagas disease caused by *Trypanosoma cruzi* and transmitted by triatomine bugs; leishmaniasis caused by various species of *Leishmania* transmitted by sandflies and African trypanosomiasis caused by *Trypanosoma brucei* and transmitted by Tsetse flies. The medical relevance of this group of parasites continues to be evident, because it is estimated that about 25 million people are affected by trypanosomatids infections and about 250 million people in the world are at risk of become infected with anyone of these diseases (WHO, 2014; WHO, 2012; Texeira, 1998; Gomez et al.1991).

To date the chemotherapeutic agents most commonly used for treating these parasitosis are toxic, require long periods of treatment, are costly and cause serious side effects; added to this has been reported the recent emergence of resistant strains, so the is needed the search of new and more effective antiprotozoal drugs (WHO, 2014; WHO, 2010; da Cunha et al. 2010; Castro and Montalvo, 2006; Rodriguez-Coura and de Castro, 2002;).

Recently, a 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide was identified as the fraction responsible for the trypanocidal activity detected in the leaf extract of *Serjania yucatanensis* (Polanco-Hernández et al. 2012a, 2012b); the synergism of the mixture of terpenoids was demonstrated *in vitro* and *in vivo* against *Trypanosoma cruzi*. The mixture also proved to be active against *Leishmania* spp. (Polanco-Hernández et al. 2013). In the present study antiprotozoal activity of the mixture of terpenoids was evaluated against *Plasmodium falciparum*, *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*.

To meet this aim, were used commercial caryophyllene oxide and lupenona (Sigma-Aldrich). Mixtures were prepared by combining the two terpenoids in different proportions (1:0, 1:4, 2:3, 1:1, 3:2, 4:1 and 0:1; w/w).

Mixtures of terpenoids were evaluated against *Giardia lamblia*: *G. lamblia* trophozoites (1×10^6 parasites/mL) were resuspended in TYI-S-33 medium and placed in 96-well microplates. The different proportions of mixture of lupenone and caryophyllene oxide (1:0, 1:4, 2:3, 1:1, 3:2, 4:1 and 0:1), as well as the crude extract of *S. yucatanensis* and the low-polarity (hexane) fraction obtained from the crude extract were prepared in dimethylformamide and were evaluated at 100, 50, 25 and 12.5 $\mu\text{g/mL}$ for 48h at 37°C. Metronidazol was used as the reference drug. The inhibition of trophozoites growth was determined by resazurin method and the activity of the mixture of terpenoids was expressed as IC_{50} . All assays were performed in duplicate.

Mixtures of terpenoids were evaluated against *Plasmodium falciparum*: *Plasmodium falciparum* strain 3D7 was cultivated at 37°C in RPMI medium with 10% of human serum and 4% of hematocrite (O, Rh+) under anaerobic conditions. Cultures with 1% parasitemic and 2% hematocrite (100 μL) were transferred to a 96 wells plate. The different proportions of mixture of lupenone and caryophyllene oxide (1:0, 1:4, 2:3, 1:1, 3:2, 4:1 and 0:1), as well as the crude extract of *S. yucatanensis* and the low-polarity (hexane) fraction obtained from the crude extract were prepared in dimethylformamide and were evaluated at 100, 50, 25 and 12.5 $\mu\text{g/mL}$ for 48h at 37°C. Chloroquine was used as the reference drug. The IC_{50} values were calculated using the program GraphPad Software. All assays were performed in duplicate.

Results obtained of the extract of *Serjania yucatanensis* and the low-polarity (hexane) fraction obtained from the crude extract showed that they do not have activity against *G. lamblia* ($\text{IC}_{50} = >100$ and 86.6 $\mu\text{g/mL}$, respectively)(Table 1). Also, it was observed that the extract of *Serjania yucatanensis* has no activity against *P. falciparum* ($\text{IC}_{50} = 23.4 \mu\text{g/mL}$), and that low-polarity (hexane) fraction showed moderate activity against the same protozoan ($\text{IC}_{50} = 3.3 \mu\text{g/mL}$)(Table 4.1).

In addition to this, the antiprotozoal activity of mixtures of lupenone and caryophyllene oxide in different proportions against *G. lamblia* and *P. falciparum* showed that have not activity; and that the 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide not have synergistic effect against these protozoan ($\text{IC}_{50} = 47.3$ and 50 $\mu\text{g/mL}$ for *G. lamblia* and

P. falciparum, respectively); contrary to the previously reported against *T. cruzi* and *Leishmania* spp., wherein the 1:4 mixture of terpenoids shows very good trypanocidal and leishmanicidal activity (Polanco-Hernández et al. 2013). These data suggest that 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide is only active and specific for parasites of the *Trypanosomatidae* family that including *Leishmania* spp. and *T. cruzi*.

The *Trypanosomatidae* family, which includes a diverse group of parasitic protozoa, presents a characteristic single flagellum, a sub-pellicle microtubule cytoskeleton and a relatively small kinetoplast containing thickly packed DNA that is organized in mini- and maxi-circles. Trypanosomatids combine its typical morphology to the ability of infecting a diverse range of hosts (Vermelho, 2007). The *Trypanosomatidae* family is very different to the *Plasmodiidae* and *Hexamitidae* family; and this work confirming that the development of new drugs antiprotozoal must be specific for each specie and/or family of protozoals.

Also, the socio-economic impact of these diseases is very considerable, the increased knowledge of cell biology and of the metabolic pathways of these trypanosomatids, as well as a more detailed knowledge of the interaction of these parasites with their hosts may carry new rational approaches to improve existing chemotherapies. In addition, the discovery of new chemotherapeutic targets against these trypanosomatids is one of the major goal of the Millennium that relies on the setting up of better and more effective drugs (Goyard et al. 2014)

The specificity shown by the 1:4 mixture of lupenone and caryophyllene oxide against trypanosomatids represents an important option for the future development of a treatment against parasites belonging to the *Trypanosomatidae* family.

Table 4.1. Antiprotozoal activity (IC₅₀ values) of mixtures of lupenone and caryophyllene oxide.

Sample	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
SYH	> 100 µg/mL	23.4 µg/mL
FHex	86.6 µg/mL	3.3 µg/mL
Lupenone+caryophylleneoxide 1 : 0	> 100 µg/mL	38.0 µg/mL
Lupenone+caryophylleneoxide 4 : 1	76.6 µg/mL	21.6 µg/mL
Lupenone+caryophylleneoxide 3 : 2	79 µg/mL	44.6 µg/mL
Lupenone+caryophylleneoxide 1 : 1	76.8 µg/mL	38.2 µg/mL
Lupenone+caryophylleneoxide 2 : 3	58.4 µg/mL	<50 µg/mL
Lupenone+caryophylleneoxide 1 : 4	47.3 µg/mL	<50 µg/mL
Lupenone+caryophylleneoxide 0 : 1	54 µg/mL	41.7 µg/mL
Metronidazole or chloroquine	0.8 µg/mL	>0.04 µg/mL

SYH: leaf extract of *Serjania yucatanensis*; FHex: hexane fraction

4.1 REFERENCES

- Castro, J.A., Montalvo, M., 2006. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum. Exp. Toxicol.* 25, 471-479.
- Da Cunha, E., Ramalho, T., Mancini, D., Fonseca, E., Oliveira, A., 2010. New Approaches to the Development of Anti-Protozoan Drug Candidates: a Review of Patents. *J. Braz. Chem. Soc.* 21, 1787-1806.
- CDC (Center for Disease Control and Prevention), 2012. Malaria website [Online] Publishing: <http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/> Accessed 19 August 2014.
- CDC (Center for Disease Control and Prevention), 2010. Parasites-Giardia. Biology. [Online] Publishing: <http://www.cdc.gov/parasites/giardia/biology.html> Accessed 21 August 2012.
- Gómez, E., Valdés, A.M., Piñero, D., Hernández, R., 1991. What is a genus in the trypanosomatidae family? *Mol. Biol. Evol.* 8, 254-259.
- Goyard, S., Lourenco- Dutra, P., Deolindo, P., Autheman, D., Archivio, S.D., Minoprio, P., 2014. *In vivo* imaging of trypanosomes for a better assessment of host-parasite relationships and drug efficacy. *Parasitol. Int.* 63, 260-268.
- Polanco-Hernández, G., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Acosta, K., Chan-Bacab, M., Sagua, H., Gonzalez, J., Osorio, L., Moo-Puc, R.E., Peña-Rodríguez, L.M., 2012a. *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of native plants from the Yucatan peninsula. *Parasitol. Res.* 110, 31-35.
- Polanco-Hernández, G., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Chan-Bacab, M., Sagua, H., González, J., Osorio, L., Peña-Rodríguez, L.M., 2012b. Metabolites from the leaf extract of *Serjania yucatanensis* with trypanocidal activity against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.* 111, 451-455.
- Polanco-Hernández, G., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Rosado, M.E., Guzmán-Marín, E., Acosta-Viana, K.Y., Jimenez-Turba, A., Salamanca, E., Peña-Rodríguez, L.M., 2013. Synergistic effect of lupenone and caryophyllene

oxide against *Trypanosoma cruzi*. Evid. Based. Complement. Alternat. Med. doi: 10.1155/2013/435398.

Rodríguez-Coura, J., de Castro, S.L., 2002. A critical review on Chagas disease chemotherapy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 97, 3-24.

Rodríguez-Magallán, A., 1999. Amibiasis intestinal. Rev. Hosp. Jua.Mex. 66, 34-41.

Texeira, S.M.R., 1998. Control of gene expression in Trypanosomatidae. Braz. J. Med. Biol. Res. 31, 1503 -1516.

Vermelho, A.B., 2007. Trypanosomatidae peptidases: a target for drugs development . Curr. Enz. Inhib. 3, 19-48.

WHO (World Health Organization), 2010. Es posible derrotar las enfermedades tropicales desatendidas. [Online] Publishing: http://www.who.int/dg/speeches/2010/ntd_20101014/es/ [Accessed 22 August 2014].

WHO (World Health Organization), 2011. Initiative for Vaccine Research (IVR). [Online] Publishing: http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index3.html [Accessed 25 October 2011].

WHO (World Health Organization), 2014. Descriptive note No.375. Leishmaniasis [Online] Publishing: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/> Accessed 6 August 2014.

WHO (World Health Organization), 2014. Descriptive note No.340. Chagas disease [Online] Publishing: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> Accessed 6 August 2014.

World Health Organization (WHO), 2012. African trypanosomiasis (sleepingsickness) [Online] Publishing: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/> Accessed 5 July 2014.

CAPÍTULO V

ANÁLISIS PROTEÓMICO DIFERENCIAL DE EPIMASTIGOTES DE *Trypanosoma cruzi* EN RESPUESTA A LA MEZCLA DE LUPENONA Y ÓXIDO DE CARIOFILENO

5.1 INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una parasitosis crónica causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*, que puede causar lesiones cardíacas e inclusive la muerte. En la actualidad no se cuenta con un tratamiento satisfactorio para esta enfermedad, debido a que los fármacos empleados, nifurtimox y benznidazol, son tóxicos y presentan efectos secundarios severos (WHO, 2014; da Cunha *et al.*, 2010; Castro y Montalvo, 2006; Vassia *et al.*, 2003; López-Antuñano, 1997). Adicionalmente, la aparición de cepas resistentes a estas drogas (Murta *et al.*, 1998) refleja la urgente necesidad de buscar nuevas opciones para el tratamiento de la tripanosomiasis americana; esto ha llevado a la realización de ensayos que utilizan compuestos elegidos a través de estudios que identifican blancos metabólicos en el parásito. Una de las herramientas mas importantes para la identificación de blancos terapéuticos es la proteómica (Andrade *et al.*, 2008).

La proteómica es el estudio y caracterización de todo el conjunto de proteínas de un genoma expresadas en un momento y bajo condiciones específicas. Con el rápido desarrollo de la tecnología, la proteómica proporciona un enfoque sistemático para el mapeo cuantitativo y cualitativo del proteoma completo bajo tratamiento farmacológico de diversas enfermedades. Las proteínas alteradas identificadas por proteómica pueden ser caracterizadas como potenciales blancos farmacológicos y el análisis global de los cambios en las proteínas puede proporcionar información valiosa para entender su mecanismo de acción (Wang *et al.*, 2007).

El uso de la proteómica en tripanosomátidos es particularmente importante porque estos protozoarios no regulan su expresión génica a nivel transcripcional y las modificaciones post-traduccionales juegan un papel importante en la modulación de la expresión de proteínas en estos parásitos. Por lo anterior el análisis proteómico diferencial es una buena herramienta para evaluar los niveles de expresión de las

proteínas cuando los parásitos se someten a diferentes fármacos o tratamientos (Cuervo *et al.*, 2010; Parodi-Talice *et al.*, 2004).

Asimismo, en ausencia de vacunas para la enfermedad de Chagas, el control de *T. cruzi* depende en gran medida del tratamiento farmacológico que actualmente es insatisfactorio; de esta forma, el descubrimiento de proteínas necesarias para la sobrevivencia y la patogenicidad del parásito convierte el análisis proteómico del *T. cruzi* en una opción importante, tanto para la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas, como para la identificación de biomarcadores importantes para el desarrollo de nuevos fármacos contra la enfermedad de Chagas (Lacerda-Sodré *et al.*, 2005).

El conocimiento del genoma y el proteoma de *T. cruzi* es esencial para desarrollar herramientas precisas y eficaces a corto y largo plazo que permitan prevenir su transmisión (López-Ordoñez *et al.*, 2009). En el 2005 se completó la secuencia del genoma de *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005) y en el proteoma reportado de *T. cruzi* cepa CL Brener, se identificaron 2784 proteínas (Atwood III *et al.*, 2005).

Hasta ahora se han realizado varios estudios de proteómica de diferentes cepas o estadios de *T. cruzi* (Pérez-Morales *et al.*, 2012; Akemi-Kikuchi, 2007; Lacerda-Sodré *et al.*, 2009; Paba *et al.*, 2004; Parodi-Talice *et al.*, 2004); sin embargo, son pocos los estudios de proteómica relacionados con la resistencia de *T. cruzi* a fármacos y con la búsqueda de proteínas como blancos terapéuticos. Entre los estudios de proteómica diferencial realizados hasta ahora, se reporta el perfil proteico de *T. cruzi* resistente a benznidazol, identificándose 36 proteínas en los parásitos resistentes. Entre las proteínas sobreexpresadas se encontró a la ciclofilina A, la glutamato deshidrogenasa, la tirosina aminotransferasa, la superóxido dismutasa y la peroxirredoxina, entre otras; siendo éstas dos últimas enzimas antioxidantes y componentes del sistema de defensa oxidativo del parásito que podrían tener potencial como dianas terapéuticas (Andrade *et al.*, 2008).

Un segundo estudio de proteómica diferencial reportó el análisis de epimastigotes de *T. cruzi* tratados con naftoimidazoles, observándose que la biosíntesis de aminoácidos y el metabolismo de las proteínas son los principales blancos de estos fármacos, afectando vías bioquímicas diferentes e independientes, observándose una sobreexpresión de la tripanotión sintetasa, crucial para la producción de tripanotión, principal defensa antioxidante del parásito. Estos resultados sugieren que la incubación con potentes

antioxidantes suprime el efecto de los naftoimidazoles y que uno de los mecanismos de acción de los naftoimidazoles involucra al estrés oxidativo. En este estudio también se observó una disminución en la expresión de proteínas implicadas en la producción de energía de *T. cruzi* (piruvato deshidrogenasa, enolasa y citocromo C oxidasa), ocasionando un desequilibrio en la generación de ATP que podría conducir a la muerte del protozooario, además encontraron que hay una disminución en la expresión de la tubulina, sugiriendo que estos fármacos también bloquean la mitosis del agente (Menna-Barreto *et al.*, 2010).

Recientemente se observó que una fracción proveniente del extracto crudo de *Serjania yucatanensis* que contenía una mezcla de lupenona y óxido de cariofileno posee actividad antiprotozoaria significativa contra tripomastigotes de *T. cruzi* (Polanco-Hernández *et al.*, 2012). Asimismo, se confirmó que la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno (1:4) presenta actividad contra *T. cruzi in vitro* e *in vivo* (Polanco-Hernández *et al.*, 2013). Sin embargo, se desconoce cual es el mecanismo de acción de esta mezcla de terpenoides.

Tomando en cuenta que la proteómica diferencial es una buena herramienta para el estudio de potenciales blancos de acción y elucidación de mecanismos de acción de fármacos o tratamientos, este trabajo tiene como objetivo identificar potenciales proteínas blanco en *Trypanosoma cruzi*, mediante el análisis de los cambios en los patrones de expresión de proteínas en respuesta a la exposición del parásito a la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno (1:4) y dilucidar el potencial mecanismo de acción de esta mezcla de terpenoides.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 Estrategia general para proteómica diferencial

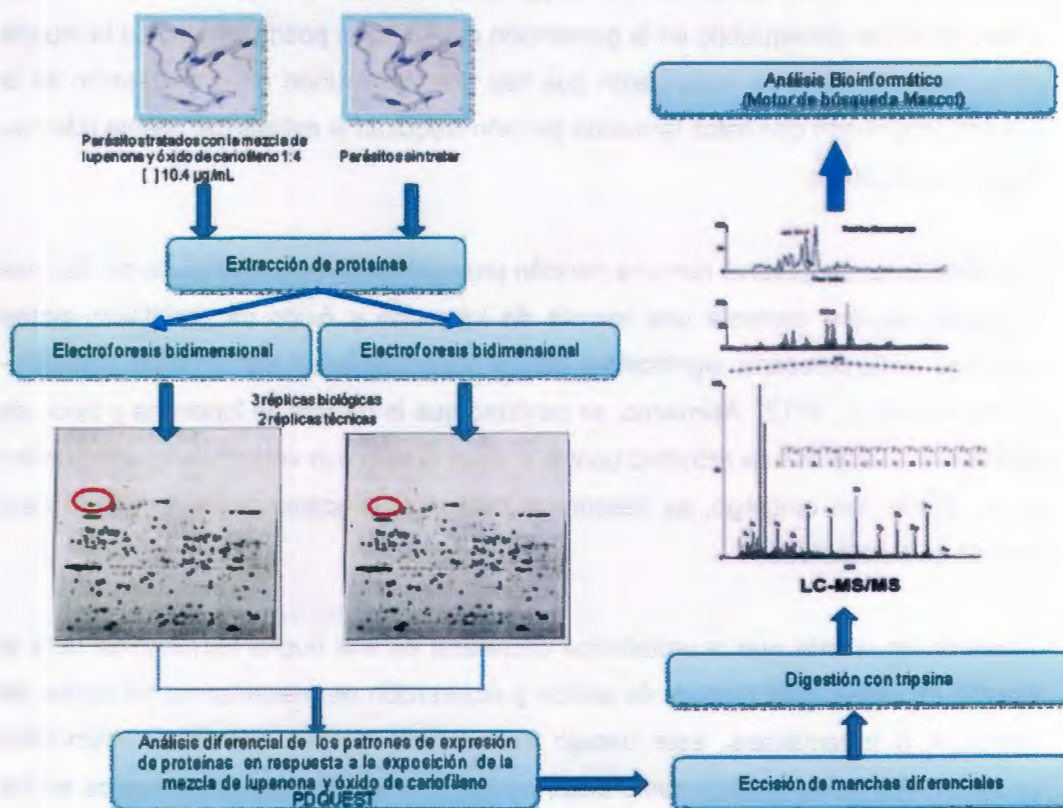


Figura 5.1 Esquema general de la metodología empleada para los análisis de proteómica

5.2.2 Exposición de epimastigotes de *T. cruzi* con la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno (1:4)

La lupenona y el óxido de cariofileno, adquiridos de una casa comercial (Extrasynthese) se combinaron en proporción 1:4 peso/peso. Epimastigotes de *T. cruzi* cepa H4 en fase de crecimiento exponencial fueron cultivados en medio LIT suplementado con SFB al 10% a 28°C. Los parásitos se utilizaron a una concentración de 1×10^9 parásitos/mL y fueron tratados por 72h con 10.4 µg/mL de la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno (1:4) disuelta en dimetilformamida (concentración correspondiente al IC_{50} previamente determinado para esta mezcla de terpenoides

contra *T. cruzi*; Polanco-Hernández *et al.*, 2013). Como control se utilizaron parásitos cultivados en medio LIT y dimetilformamida al 0.5%. Los parásitos expuestos a la mezcla de terpenoides y sus controles fueron cultivados bajo las mismas condiciones. Se realizaron 3 réplicas biológicas y cada una de éstas con 2 réplicas técnicas.

5.2.3 Preparación de los extractos de proteínas para los análisis 2D

Para realizar los análisis de 2D se prepararon extractos de proteínas solubles de todas las réplicas (incluyendo testigos) utilizando el estuche comercial Sample Grinding Kit (GE Healthcare, núm. catálogo 80-6483-37) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Epimastigotes tratados y sus controles fueron colectados por centrifugación, lavados siete veces con PBS comercial 1X. Después la pastilla se resuspendió con amortiguador de extracción (urea 8M, CHAPS 2%, buffer IPG 0.5%, DTT 40mM, agua) conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas (GE Healthcare, núm. catálogo 80-6501-23). Para obtener la fracción proteica se llevó a cabo una centrifugación a 14,600 rpm durante 10 min. La concentración de proteínas fue determinada mediante un nanodrop (Thermo scientific G520) usando el método de Bradford (Biorad 500-02-05) y empleando albúmina bovina como proteína estándar.

Para la eliminación de sales que pudieran interferir en la primera dimensión o isoelectroenfoque (IEF) se utilizó el estuche comercial 2D-Clean Up Kit (Amersham Biosciences 80-6484-51).

5.2.4 Análisis de proteínas en 2D

Se tomaron 340 µg de proteína para cada muestra (incluyendo testigos y tratamientos) diluida en 140 µL de solución de rehidratación (proveniente del 2D-Clean Up-Kit) y se homogenizó durante 15 min en un baño de ultrasonido, posteriormente esta solución se utilizó para hidratar, durante 12 h, las tiras prefabricadas con anfolinas con un gradiente de pH 4-7 rango lineal (Immobiline DryStrip, 7cm, GE Healthcare 17-6001-11), las tiras se cubrieron con Dry Strip Cover Fluid (GE Healthcare 17-1335-01) para evitar la evaporación de las muestras y/o la cristalización de la urea. Posteriormente las tiras fueron analizadas en una primera dimensión de acuerdo a su punto isoelectrico utilizando el equipo Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare, núm. catálogo 80-

6505-03) de acuerdo al siguiente programa 400V (1h 30 min) 300V/h, 1000V (1h) 300V/h, 5000V(1h) 4000 V/h, 5000V (30min) 3000V/h.

Una vez que las tiras fueron retiradas del equipo de IEF se equilibraron por 15 min en 10 mL de amortiguador de equilibrio SDS (urea 6M, Tris-HCl pH8.8 75mM, glicerol 29.3%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.002%), primero con DTT a una proporción de 100 mg/10mL, seguida de una segunda incubación con yodoacetamida a una proporción de 250 mg/10mL en el mismo amortiguador de equilibrio por 15 min.

Posteriormente las proteínas separadas en la primera dimensión se separaron en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE al 12%) durante 1h a 120 Volts, como ha sido descrito por Laemli (Laemli, 1970), posteriormente los geles fueron teñidos con azul de Coomassie (0.75 gr de Coomassie R-250, 0.5 gr de Coomassie G-250, 10% de ácido acético, 20% de metanol, 10% de etanol y agua) durante una hora, luego se destiñó el gel con la solución desteñidora I (10% de ácido acético, 45% de metanol y agua) durante media hora y por último con una solución desteñidora II (7% de ácido acético, 5% de metanol y agua) durante toda la noche.

5.2.5. Adquisición y análisis de imágenes

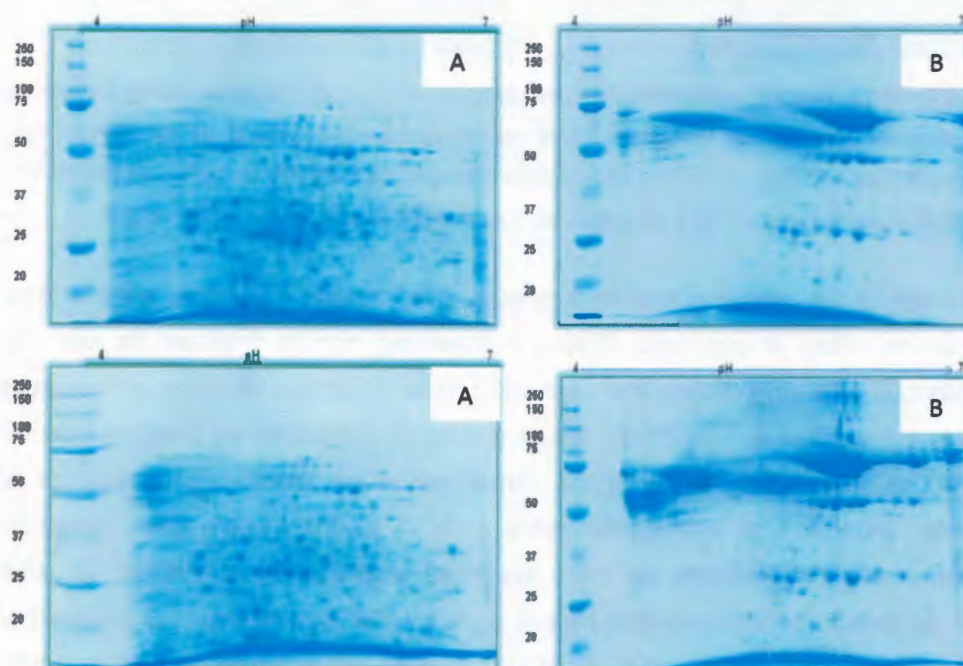
Después del SDS-PAGE y tinción, los geles fueron digitalizados usando un densitómetro (GS-900 Calibrated Densitometer, BIORAD).

Las imágenes digitalizadas (6 geles para el testigo y 6 geles para el tratamiento) fueron analizadas usando el programa PDQuest Advanced (Versión 8.0.1, BIORAD). La autenticidad de cada spot se validó por inspección visual y se editó cuando fue necesario con el fin de mejorar la precisión. La intensidad de cada spot proteico se normalizó expresando la intensidad de cada mancha respecto a la intensidad total de todas las manchas presentes en el gel. Después de la normalización y eliminación de fondo, se crearon geles maestros para cada par de geles (parásitos tratados con la mezcla de terpenoides y su testigo). El análisis de expresión diferencial de proteínas fue realizado comparando la intensidad de las manchas en el tratamiento vs el grupo testigo. Las proteínas con expresión diferencial, reproducibles y muy sobreexpresadas fueron cortadas del gel y seleccionadas para su identificación.

5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se llevó a cabo la estandarización de la técnica de doble dimensión realizando la metodología previamente descrita, utilizando un pH de 4 a 7. Este protocolo condujo a la obtención de geles 2D con muy buena reproducibilidad y calidad.

El análisis proteómico diferencial fue realizado en epimastigotes de *T. cruzi* tratados con la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno (1:4), la cual se confirmó previamente que es la proporción con mayor actividad tripanocida, y en epimastigotes sin tratamiento (testigo), mostrando cambios significativos en la expresión de sus proteínas cuando éstos son expuestos a la mezcla de terpenoides, ya sea sobreexpresándose o disminuyendo su expresión (Figura 5.2).



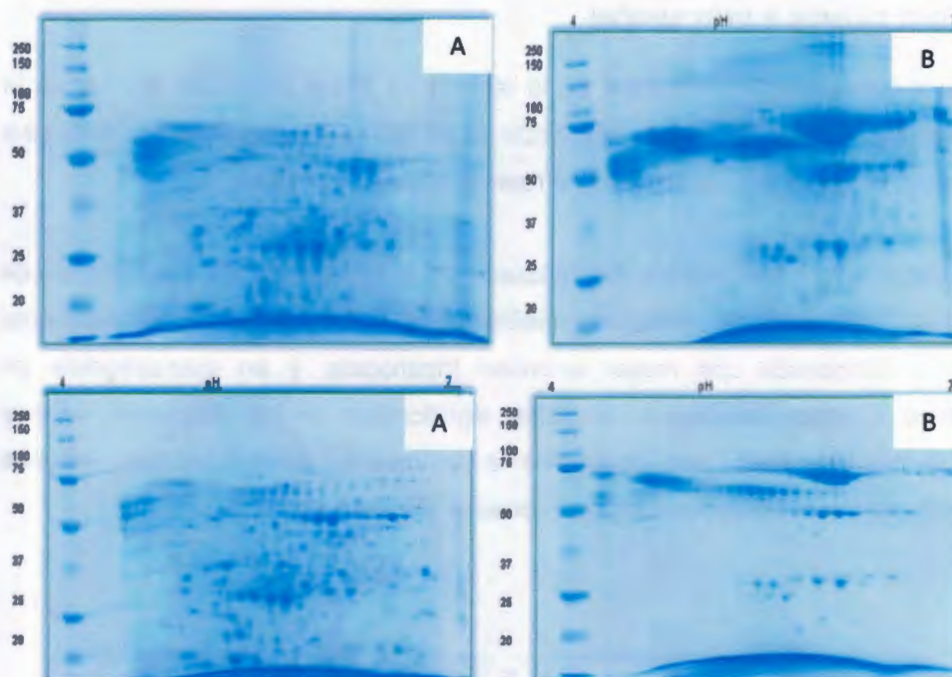


Figura 5.2. Geles 2D representativos de epimastigotes de *T. cruzi* tratados con la mezcla de terpenoides. A) Testigos, B) 10.4 $\mu\text{g/mL}$ de la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno (1:4). IEF fue realizado con 340 μg de proteína usando tiras IPG de 7cm con un rango de pH de 4-7. El SDS-PAGE se realizó al 12% y las proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie.

Para identificar las proteínas que se expresaron de manera diferencial entre ambas muestras se utilizó el programa PDQuest Advanced con la finalidad de detectar proteínas que difieren en intensidad, que son común en ambas muestras y que están ausentes o presentes en una de las dos muestras. El análisis de las imágenes de los geles 2D se presenta en la figura 5.3, mostrando el gel maestro generado por el programa tanto para el tratamiento como para el control; estos geles maestros contienen todas las manchas de todos los geles usados para el estudio. En este análisis se detectaron 291 manchas para el control y 198 manchas para el tratamiento con la mezcla de terpenoides (1:4) (Cuadro 5.1). Bajo estas condiciones se pudieron detectar en los controles 291 manchas, coincidiendo con lo previamente reportado por Lacerda-Sodré *et al.*, 2009, los cuales detectan 338 manchas en un rango de pH de 4-7; asimismo el gran número de proteínas con un punto isoeléctrico de 4.5 a 7.0 y una masa molecular de 20 a 75 kDa, coinciden con lo reportado previamente (Parodi-Talice *et al.*, 2004).

De las 409 proteínas detectadas, 80 fueron comunes para ambas muestras, 211 únicamente se expresaron en el control y 118 únicamente se expresaron en el tratamiento (Figura 5.4); la mayor cantidad de proteínas en la muestra testigo sugiere que la mezcla de terpenoides podría estar inhibiendo la expresión de proteínas importantes para la sobrevivencia de *T. cruzi*.

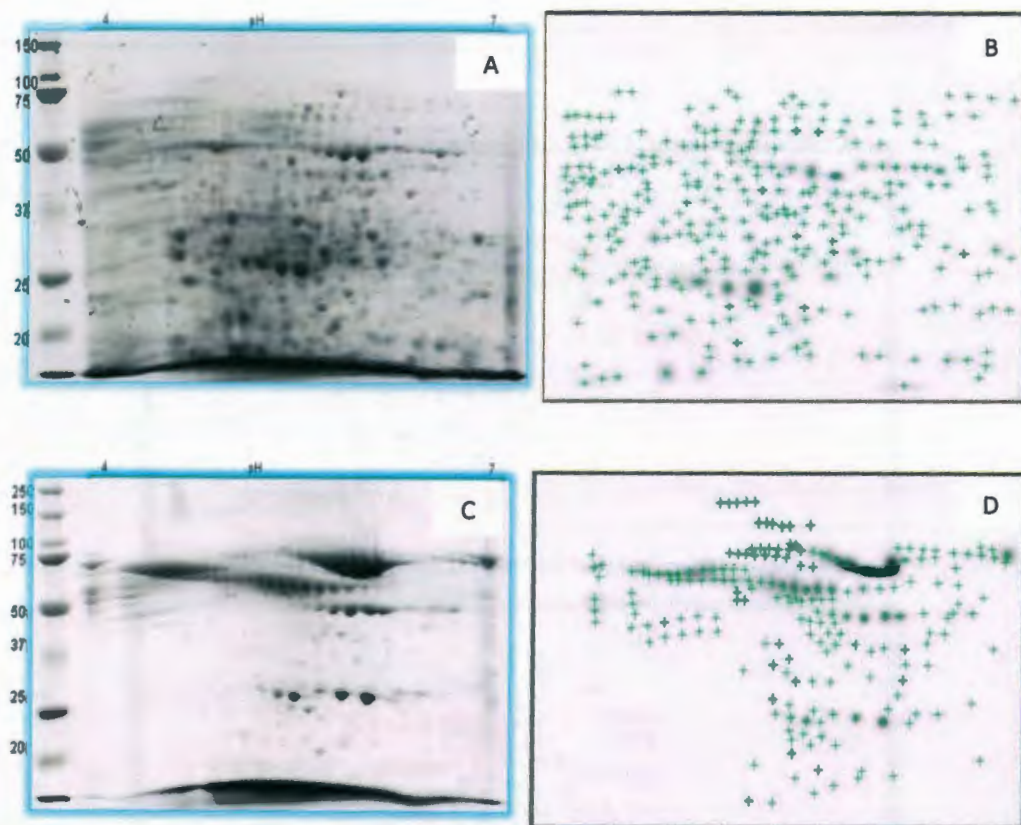


Figura 5.3. Análisis de las proteínas presentes en los geles de doble dimensión mediante el programa PDQuest Advanced. A) Gel 2D representativo de epimastigotes de *T. cruzi* sin tratamiento (testigo), B) Análisis de los perfiles proteicos usando el programa PDQuest Advanced en el gel maestro de la muestra testigo, C) Gel 2D representativo de epimastigotes de *T. cruzi* tratados con la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno (1:4) (tratamiento), D) Análisis de los perfiles proteicos usando el programa PDQuest Advanced en el gel maestro del tratamiento. Las cruces verdes representan las proteínas analizadas con el programa para cada muestra.

Tabla 5.1. Resumen del análisis del perfil proteico de epimastigotes de *T. cruzi* expuestos a la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno (1:4) comparándolo con el testigo.

Muestras	Manchas totales	Manchas diferenciales	Manchas comunes
Testigo	291	211	80
Lupenona y óxido de cariofileno 1:4	198	118	80

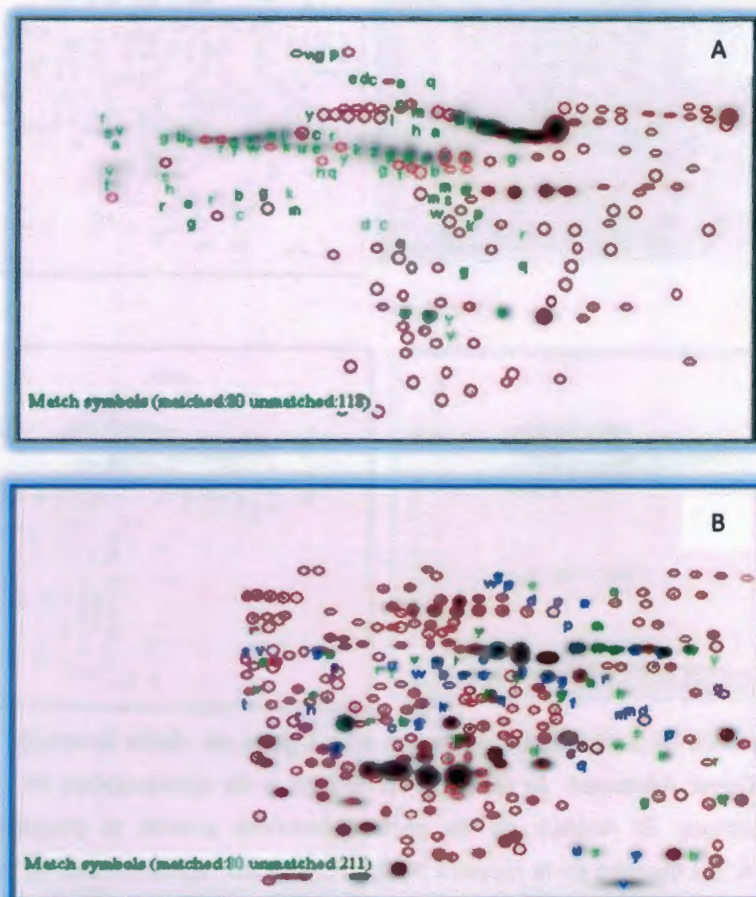


Figura 5.4. Análisis comparativo mediante el programa PDQuest Advanced del perfil proteico de: A) Epimastigotes de *T. cruzi* tratados con la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno (1:4) B) Muestra testigo. Letras verde y azul: representan proteínas expresadas simultáneamente en los dos geles. Círculos rojos: proteínas expresadas únicamente por alguna condición.

Por otro lado, de las 329 manchas diferenciales, 21 proteínas fueron seleccionadas para su identificación, 11 correspondientes al testigo (Figura 5.5) y 10 correspondientes al tratamiento con la mezcla de terpenoides 1:4 (Figura 5.6). La selección de las proteínas se llevó a cabo tomando en cuenta que las manchas estuvieran bien definidas, que fueran reproducibles tanto en las réplicas biológicas como en las réplicas técnicas, que demostraran una evidente sobreexpresión y que su expresión estuviera apagada/encendida en alguna de las dos condiciones. En la figura 5.5 y 5.6 se presentan los histogramas representativos de la expresión diferencial de algunas de las manchas seleccionadas, observándose proteínas que son apagadas por la mezcla de terpenoides (1:4) en comparación con el control, así como proteínas que se encienden y se sobreexpresan en el tratamiento y que están ausentes en el control. En el cuadro 5.2 se presenta la masa molecular y el punto isoeléctrico estimado de las 21 proteínas seleccionadas para la secuenciación.

Las 21 proteínas/manchas seleccionadas fueron excisadas de los geles y se enviaron a analizar en la Universidad de Columbia en Nueva York, donde serán digeridas con tripsina y posteriormente determinada su secuencia por espectrometría de masas MALDI-TOF, que es una buena herramienta para la determinación de proteínas y que al utilizar una matriz éste método es menos susceptible a interferencias por sales o detergentes; y por último se llevará a cabo su identificación mediante el motor de búsqueda MASCOT.

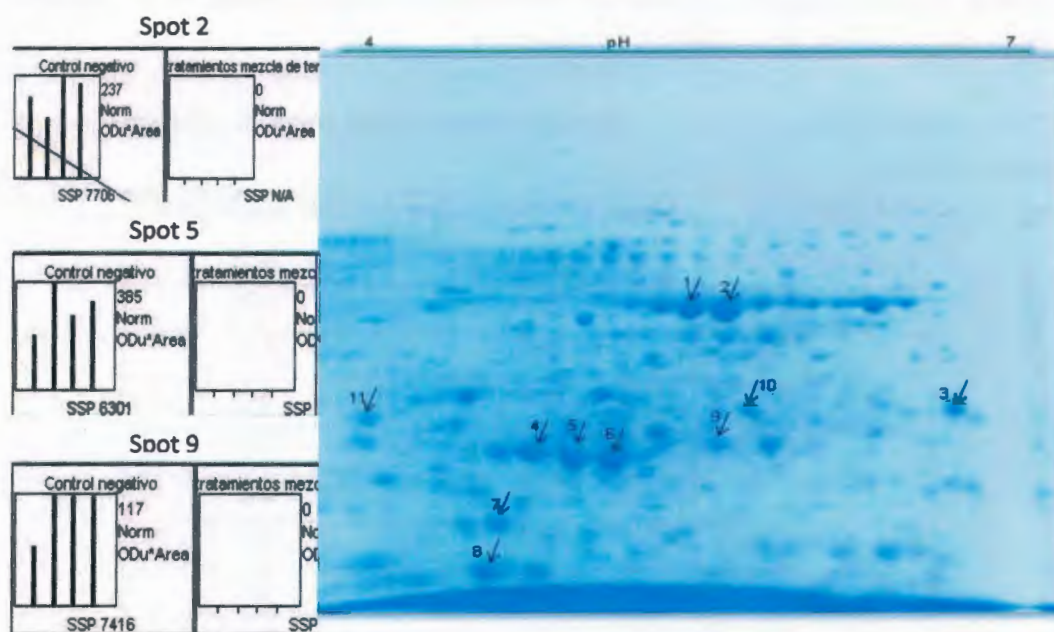


Figura 5.5. Proteínas seleccionadas para identificación del perfil proteico de epimastigotes de *T.cruzi* (testigo) que son apagadas por la mezcla de terpenoides (1:4). Del lado izquierdo se observan los histogramas representativos de la expresión diferencial de algunas de las manchas seleccionadas.

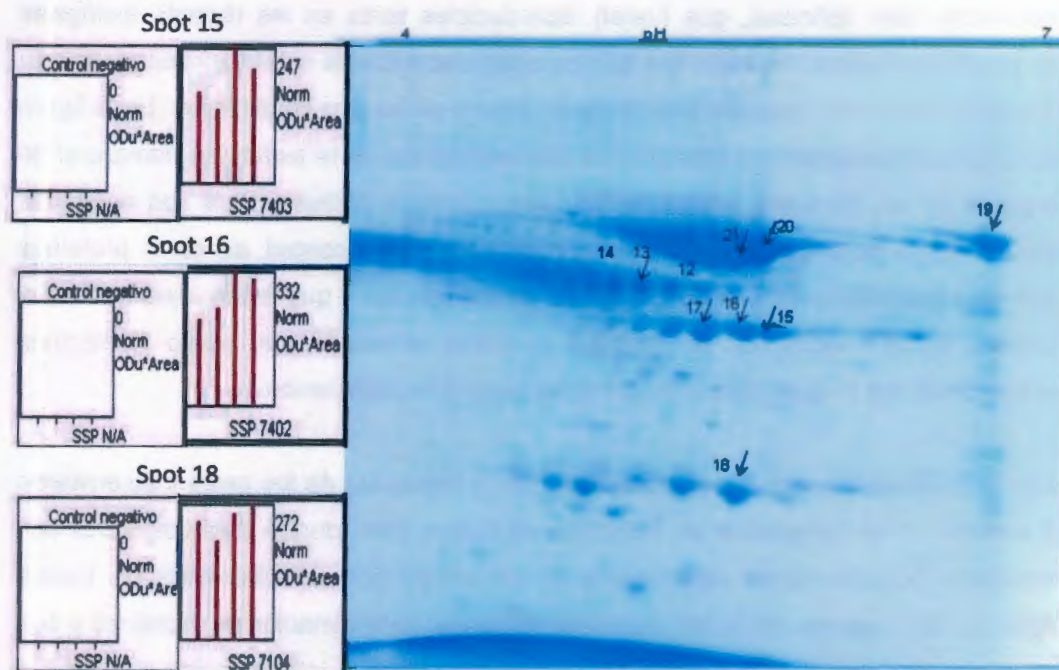


Figura 5.6. Proteínas seleccionadas para identificación del perfil proteico de epimastigotes tratados con la mezcla de lupenona y oxido de cariofileno (1:4) que son expresadas por esta mezcla. Del lado izquierdo se observan los histogramas representativos de la expresión diferencial de algunas de las manchas seleccionadas.

Tabla 5.2. Masa molecular y punto isoelectrico estimado de las proteínas seleccionadas para la secuenciación.

Número de proteína/mancha	Masa molecular (KDa)	Punto isoelectrico (pI)
1	52.8	5.7
2	52.3	5.8
3	34.9	6.6
4	29.2	5.1
5	28.2	5.3
6	28.2	5.5
7	22.6	5.0

8	19.6	4.9
9	30.1	5.7
10	34.3	5.8
11	33.8	4.5
12	61.5	5.8
13	62.3	5.7
14	63.3	5.6
15	51.2	6.2
16	51.3	6.1
17	50.6	5.9
18	28.3	6.1
19	84.8	7.0
20	72.1	6.2
21	73.7	6.1

Con base en lo publicado, la mancha 1 coincide con la masa molecular y *pI* reportado para la proteína cinasa C activada (P.M. 52.8 KDa, *pI* 5.73)(Akemi-Kikuchi, 2007). Se ha reportado que la proteína cinasa C activada en *T. cruzi* participa en varios eventos celulares como promover la fosforilación de proteínas desencadenando reacciones celulares como proliferación y diferenciación celular, y regulando diferentes sistemas de transporte (Akemi-Kikuchi, 2007; Saraiva *et al.*, 2002). Como en el caso de la mitofosina que inhibe el crecimiento de *T. cruzi* a través de la inhibición de la Na⁺ATPasa y la proteína cinasa C, proponiendo a la proteína cinasa C como un objetivo terapéutico para el tratamiento de chagas (Saraiva *et al.*, 2009). Asimismo se ha reportado que el óxido de cariofileno suprime significativamente la proliferación celular de cáncer de próstata y mama (Kyung-Ran *et al.*, 2011)

Tomando en cuenta también los reportes en la literatura, la mancha 4 tiene una masa molecular y punto isoeléctrico similar al de la peroxirredoxina, reportada como enzima antioxidante de *T. cruzi*, utilizada como protección contra el daño mediado por peróxido y que es esencial para la sobrevivencia del parásito en ambientes altamente oxidantes (Akemi-Kikuchi, 2007).

La mancha 14 presenta una masa molecular y punto isoeléctrico similar al reportado para la proteína HSP70 (Heat Shock Protein) con una masa molecular de 63.4 KDa y un punto isoeléctrico de 5.8, siendo de interés dado que las HSP están envueltas en condiciones de estrés (Pérez-Morales *et al.*, 2012; Dragon *et al.*, 1987).

Con base en los resultados obtenidos se sugiere que la mezcla (1:4) de lupenona y óxido de cariofileno provoca cambios en proteínas de *T. cruzi* que pudieran ser vitales para la sobrevivencia del parásito. Sin embargo, es necesaria la secuenciación de estas proteínas para su identificación y poder elucidar el probable mecanismo de acción de la mezcla de terpenoides.

Asimismo, con los resultados obtenidos se confirma al estudio de proteómica diferencial de epimastigotes con tratamiento y sin tratar como una herramienta importante para la identificación de proteínas blanco de *T. cruzi*, que son cruciales para la sobrevivencia del parásito y que podrían ser explorables para el desarrollo de nuevos fármacos antichagásicos.

5.4 REFERENCIAS

- Akemi-Kikuchi, S. (2007). Análise do perfil protéico de cepas de *trypanosoma cruzi* pertencentes ao zimodema III. Tesis de Maestría. Instituto Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Brasil. 129 p. [Online] Disponible en: <http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/cp074222.pdf> [Acceso 29 mayo 2011].
- Andrade, H.M., S.M. Murta, A. Chapeaurouge, J. Perales, P. Nirdé y A.J. Romanha (2008). Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to benznidazole. *Journal of Proteome Research*, 7, 2357-2367.
- Atwood III, J.A., B.D. Weatherly, T.A. Minning, B. Bundy, C. Cavola, F.R. Oppendoes, R. Orlando y R.L. Tarleton (2005). The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science*, 309, 473-476.
- Castro, J.A. y M. Montalvo (2006). Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Human & Experimental Toxicology*, 25, 471-479.
- Cuervo, P., G.B. Domont y J.B. De Jesús (2010). Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. *Journal of Proteomics*, 73, 845-867.
- Da Cunha, E., T. Ramalho, D. Mancini, E. Fonseca y A. Oliveira (2010). New Approaches to the Development of Anti-Protozoan Drug Candidates: a Review of Patents. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21, 1787-1806.
- Dragon, E.A., S.R. Sias, E.A. Kato y J.D. Gabe (1987). The genome of *Trypanosoma cruzi* contains a constitutively expressed, tandemly arranged multicopy gene homologous to a major heat shock protein. *Molecular and Cellular Biology*, 7, 1271-1275.
- El-Sayed, N.M., P.J. Myler, D.C. Bartholomeu, D. Nilsson, G. Aggarwal, A.N. Tran, E. Ghedin, E.A. Wortley, A.L. Delcher, G. Blandin, *et al* (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, 309, 409-415

- Kyung-Ran, P., N. Dongwoo, Y. Hyung-Mun, L. Seok-Geun, J. Hyeung-Jin, S. Gautam, C. Somi y S.A. Kwang (2011). B-Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. *Cancer Letters*, 312, 178-188.
- Lacerda-Sodré, C., A.D. Chapeaurouge, D.E. Kalume, L. de Mendonça-Lima, J. Perales y O. Fernandes (2009). Proteomic map of *Trypanosoma cruzi* CL Brener: the reference strain of the genome project. *Archives of Microbiology*, 191, 177-184.
- Lacerda-Sodré, C., E. Kalume, M.E. Ricci da Silva y O. Fernandes (2005). Proteoma [Online] (Actualizado Julio 2005) Disponible en: http://www.fiocruz.br/chagas_eng/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=81 [Acceso 2 junio 2011].
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- López-Antuñano, F.J. (1997). Quimioterapia de las infecciones producidas por *Trypanosoma cruzi*. *Salud Pública de México*, 39, 463-471.
- López-Ordóñez, T., F. Panzera, E. Tun-Ku, I. Ferrandis y J.M. Ramsey (2009). Contribuciones de la genética y la proteómica al estudio de la enfermedad de Chagas. *Salud Pública de México*, 51, 410-423.
- Mena-Barreto, R., D.G. Beghini, A.T.S. Ferreira, A. Pinto, S. De Castro y J. Perales (2010). A proteomic analysis of the mechanism of action of naphthoimidazoles in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes in vitro. *Journal of Proteomics*, 73, 2306-2315.
- Murta, S.M., R.T. Gazzinelli, Z. Brener y A.J. Romanha (1998). Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to Benznidazole and nifurtimox. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 93, 203-214.
- Paba, J., J.M. Santana, A.R. Teixeira, W. Fontes, M.V. Sousa y C.A.O. Ricart (2004). Proteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Proteomics*, 4, 1052-1059.

- Parodi-Talice, A., R. Durán, N. Arrambide, V. Prieto, M.D. Piñeyro, O. Pritsch, A. Cayota, C. Cerveñasky y C. Robello (2004). Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. *International Journal for Parasitology*, 34, 881-886.
- Pérez-Morales, D., H. Lanz-Mendoza, G. Hurtado, R. Martínez-Espinosa y B. Espinoza (2012). Proteomic Analysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes subjected to heat shock. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. doi: 10.1155/2012/902803.
- Polanco-Hernández, G., F. Escalante-Erosa, K. García-Sosa, M. Chan-Bacab, H. Sagua, J. Gonzalez, L. Osorio y L.M. Peña-Rodríguez (2012). Metabolites from the leaf extract of *Serjania yucatanensis* with trypanocidal activity against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, 111, 451-455.
- Polanco-Hernández, G., F. Escalante-Erosa, K. García-Sosa, M.E. Rosado, E. Guzmán-Marín, K.Y. Acosta-Viana, A. Jimenez-Turba, E. Salamanca y L.M. Peña-Rodríguez (2013). Synergistic effect of lupenone and caryophyllene oxide against *Trypanosoma cruzi*. *Evidence-Based Complementary Alternative Medicine*. doi: 10.1155/2013/435398.
- Saraiva, V.B., D. Gibaldi, J.O. Previato, L. Mendonça-Previato, M. Bozza, C. Freire de Lima y N. Heise (2002). Proinflammatory and cytotoxic effects of hexadecylphosphocoline (mitelfosine) against drug-resistant strains of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemoteraphy*, 46, 3472-3477.
- Saraiva, V.B., M. Wengert, N. Heise, E. Gómez-Quintana y C. Caruso-Neves (2009). Na⁺-ATPase and protein kinase C are targets to hexadecylphosphocoline (mitelfosine) in *Trypanosoma cruzi*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 481, 65-71.
- Vassia, M., C. Patti, S. Burrote y J. Bustamante (2003). Análisis electrocardiográficos post-tratamiento con benznidazol en infección con dos cepas de *T. cruzi*. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Córdoba. [Online] (Actualizado octubre 2003). Disponible en: <http://www.fac.org.ar/tcvc/llave/tl334.pdf> [Acceso 3 septiembre de 2014].

Wang, Y., Q.Y. He, H. Chen y J.F. Chiu (2007). Synergistic effects of retinoic acid and tamoxifen on human breast cancer cells: proteomic characterization. *Experimental Cell Research*, 313, 357-368.

WHO (World Health Organization), 2014. Descriptive note No.340. Chagas disease [Online] (Actualizado marzo 2014) Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> [Acceso 6 Agosto 2014].

CAPÍTULO VI

6.1 DISCUSIÓN GENERAL

Las enfermedades infecciosas y en particular las parasitarias como la leishmaniasis, la tripanosomiasis americana, la malaria y la amibiasis son consideradas por la OMS como principales causas de muerte en el mundo (Jemal, *et al.*, 2003). Hasta ahora, los tratamientos existentes para estas enfermedades parasitarias son insatisfactorios, por lo que la OMS estableció como prioritaria la búsqueda de nuevos agentes antiprotozoarios. En la actualidad, dos de las estrategias que se siguen para el desarrollo de nuevos medicamentos son la terapia combinada y la proteómica.

Recientemente se reportó la actividad tripanocida del extracto de hojas de *Serjania yucatanensis*, una planta nativa de la península de Yucatán; la purificación biodirigida del extracto crudo bioactivo de esta planta resultó en la obtención de una mezcla de lupenona y óxido de cariofileno con actividad tripanocida (Polanco-Hernández *et al.*, 2012). Dada la actividad presentada por la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno, en este trabajo se evaluó la actividad antiprotozoaria (tripanocida, leishmanicida, antimalárica, antiamebiana y anti-giardica) de mezclas con diferentes proporciones de cada terpenoide y para el caso de *T. cruzi* se realizaron estudios de proteómica diferencial con la finalidad de determinar potenciales proteínas blanco.

Los resultados obtenidos en la evaluación de actividad tripanocida *in vitro* permitieron ubicar a la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno (1:4) como la más activa, confirmando un efecto sinérgico de potenciación, observándose que el efecto combinado de la mezcla de terpenoides es mayor que el que se obtiene con cada metabolito de manera individual. Asimismo, los resultados demostraron que la proporción 1:4 en la mezcla de éstos terpenoides es la óptima y necesaria para la expresión máxima de la actividad tripanocida, y que a mayores proporciones de lupenona la actividad tripanocida disminuye, y que el óxido de cariofileno probablemente es el principal responsable de la actividad tripanocida. Esto último coincide con lo previamente reportado, donde se describe que una fracción que contiene lupenona no demuestra actividad tripanocida contra tripomastigotes de *T. cruzi* (Rosas *et al.*, 2007).

Con base en la actividad tripanocida mostrada bajo condiciones *in vitro*, la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno (1:4) fue evaluada *in vivo* a dos diferentes dosis (20.8 mg.kg⁻¹.día⁻¹ y 41.6 mg.kg⁻¹.día⁻¹) contra amastigotes de *T. cruzi*, el estadio replicativo intracelular en los tejidos del hospedero mamífero que tiene la capacidad para infectar otras células. Los resultados obtenidos mostraron que ambas dosis evaluadas de la mezcla de éstos terpenoides (1:4) son capaces de reducir significativamente la presencia de nidos de amastigotes en tejido cardíaco y músculo esquelético. La disminución de los nidos de amastigotes en los individuos tratados con la mezcla (1:4) de lupenona y óxido de cariofileno, fue mayor que la observada para los animales tratados con el fármaco de referencia alopurinol ($p \leq 0.05$), destacando que se reflejó una ausencia de mortalidad en el grupo experimental. Cabe mencionar que la mortalidad y el importante deterioro físico registrado en los animales tratados con alopurinol puede deberse a la toxicidad reportada para este fármaco cuando es utilizado en la fase crónica de la enfermedad de Chagas (Issa y Bocchi, 2010; Rodríguez, 2005).

Los resultados de la evaluación *in vivo* de la mezcla (1:4) de lupenona y óxido de cariofileno mostraron también que ésta no presenta un efecto de dosis-respuesta, dado que las dos dosis evaluadas de la mezcla no mostraron diferencias significativas en su actividad tripanocida. Por otra parte, la actividad mostrada por la mezcla de éstos terpenoides (1:4) durante la fase crónica de la tripanosomiasis americana es de particular importancia, debido a que los fármacos utilizados comercialmente para tratar esta parasitosis son principalmente efectivos durante la fase aguda, en tanto que su eficacia en la fase crónica no es clara y limitada por su alta toxicidad (da Cunha *et al.*, 2010; Castro y Montalvo, 2006; Vassia *et al.*, 2003; López-Antuñano, 1997).

De la misma manera, al evaluar la actividad leishmanicida de las diferentes mezclas de lupenona y óxido de cariofileno contra promastigotes de *Leishmania* del viejo mundo (*L. tropica* y *L. aethiopica*) y del nuevo mundo (*L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. mexicana*) se observó que la mezcla (1:4) de terpenoides y el óxido de cariofileno en forma pura son activos contra las cinco especies de *Leishmania* y particularmente contra *L. tropica* y *L. mexicana*. Adicionalmente, los resultados obtenidos mostraron un sinergismo de potenciación y aditivo de la mezcla de terpenoides al ser evaluada contra *L. braziliensis* y *L. amazonensis*, respectivamente. Estos últimos resultados coinciden con los obtenidos contra *T. cruzi*. En este estudio las cinco especies de

Leishmania spp. mostraron diferentes niveles de susceptibilidad a los diferentes tratamientos, siendo esto consistente con lo reportado en la literatura que describe la susceptibilidad de *Leishmania* spp. a los diferentes fármacos como especie específica (Sundar y Chatterjee, 2006). Por esta razón, el desarrollo de nuevos medicamentos para el tratamiento universal de los diferentes tipos de leishmaniasis es difícil debido a la gran variedad de especies de *Leishmania* que afectan al hombre.

En este estudio se observó también que la mezcla (1:4) de lupenona y óxido de cariofileno y el óxido de cariofileno puro son capaces de reducir el número de células infectadas por *L. mexicana* y *L. tropica*, al inhibir la capacidad de infección del parásito. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente, donde se observó que una fracción conteniendo una mezcla de lupenona y óxido de cariofileno inhibe la egresión de *T. cruzi* de células infectadas (Polanco-Hernández *et al.*, 2012), y sugieren que esta mezcla podría estar afectando uno o más factores que son cruciales para la sobrevivencia de *Leishmania* spp. dentro de las células hospederas. Sin embargo, es importante mencionar que la mezcla (1:4) de terpenoides presentó una menor citotoxicidad y un mejor índice de selectividad que el óxido de cariofileno en forma pura, confirmando la importancia del sinergismo en la actividad antiprotozoaria.

Es interesante comentar que la evaluación de diferentes mezclas de lupenona y óxido de cariofileno contra *G. lamblia* y *P. falciparum* no mostró actividad anti-giardica y antimalárica para ninguna de las mezclas de terpenoides, sugiriendo que la actividad antiprotozoaria de la mezcla (1:4) de lupenona y óxido de cariofileno es específica para parásitos de la familia *Trypanosomatidae*, que incluye a *T. cruzi* y *Leishmania* spp. Estos resultados son de particular interés dado que el descubrimiento de nuevos blancos quimioterapéuticos contra tripanosomátidos está contemplado en el objetivo 6 del Desarrollo del Milenio (ODM, por sus siglas en inglés) que se refiere, en general, a la tarea de combatir enfermedades infecciosas entre la población (Goyard *et al.*, 2014; ONU, 2014).

Con base en la actividad tripanocida *in vitro* e *in vivo* presentada por la mezcla (1:4) de lupenona y óxido de cariofileno se realizaron estudios de proteómica diferencial, analizando los cambios en los patrones de expresión de proteínas de epimastigotes de *T. cruzi* tratados con la mezcla de terpenoides, con el fin de identificar posibles proteínas blanco en el parásito.

En el análisis proteómico, el número de proteínas y el perfil proteico observado en el testigo (parásitos no expuestos a la mezcla de terpenoides) son comparables a los previamente reportados (Lacerda-Sodré *et al.*, 2009; Parodi-Talice *et al.*, 2004). Cuando los parásitos son tratados con la mezcla (1:4) de lupenona y óxido de cariofileno, se observaron cambios significativos en el perfil proteico de epimastigotes de *T. cruzi*. En el análisis diferencial se detectaron 291 proteínas para el testigo y 198 proteínas para el tratamiento con la mezcla de terpenoides; la reducción en el número de manchas observada en el tratamiento sugiere que la mezcla podría afectar proteínas importantes para la sobrevivencia del parásito. La mayoría de estas proteínas tenían una masa molecular de 20 a 75 kDa y un punto isoelectrico de 4.5 a 7.0, coincidiendo con lo reportado previamente (Parodi-Talice *et al.*, 2004).

De las 409 proteínas totales detectadas (tratamiento y testigo), 80 proteínas fueron comunes para ambas muestras, 211 se expresaron únicamente en el control y 118 se expresaron únicamente en el tratamiento. De las 329 proteínas/manchas diferenciales, 21 proteínas fueron seleccionadas para su identificación, 11 correspondientes al control y 10 correspondientes al tratamiento. Esto indica que el tratamiento induce la acumulación de proteínas posiblemente útiles para usarse como blancos.

El punto isoelectrico y la masa molecular (estimado en los análisis 2D) de las proteínas seleccionadas para su identificación por MALDI-TOF, coinciden con los de otras proteínas reportadas en otros estudios, lo que sugiere que la mezcla (1:4) de lupenona y óxido de cariofileno apaga la expresión de proteínas involucradas en diferentes mecanismos y/o funciones vitales para la sobrevivencia de *T. cruzi*, y que estas proteínas expresadas diferencialmente pueden ser útiles para la identificación de blancos de *T. cruzi*.

Los resultados del estudio de proteómica diferencial de epimastigotes confirman su importancia como una herramienta clave para la identificación de proteínas blanco de *T. cruzi* que conduzcan al desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos contra la enfermedad de Chagas.

Finalmente, con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se identifica a la mezcla (1:4) de lupenona y óxido de cariofileno como una importante opción para el

futuro desarrollo de un tratamiento contra la tripanosomiasis americana en fase crónica.

6.2 CONCLUSIONES

- ❖ La actividad de la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno (1:4) contra *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis* y *Leishmania braziliensis* demuestra la importancia del sinergismo como una estrategia clave para mejorar la eficacia de un tratamiento y reducir la citotoxicidad.
- ❖ La actividad tripanocida *in vivo* de la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno (1:4), reduce el número de nidos de amastigotes en tejido cardíaco y músculo esquelético, lo que permite proponerla como una opción importante y eficaz de tratamiento en la fase crónica de la enfermedad de Chagas.
- ❖ La actividad tripanocida y leishmanicida de la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno (1:4), y su falta de actividad contra *Giardia lamblia* y *Plasmodium falciparum*, sugirieron que la actividad antiprotzoaria de la mezcla es selectiva contra parásitos de la familia *Trypanosomatidae*.
- ❖ Los cambios significativos observados en el proteoma de *T. cruzi* como consecuencia de su tratamiento con la mezcla de lupenona y óxido (118 proteínas expresadas únicamente en el tratamiento y 211 expresadas únicamente en el testigo) confirman la importancia de la utilización de la proteómica diferencial para la identificación de nuevas dianas terapéuticas en la enfermedad de Chagas.
- ❖ La mezcla de lupenona y óxido de cariofileno (1:4) es una importante opción para el futuro desarrollo de un tratamiento contra la tripanosomiasis americana y la leishmaniasis cutánea.

6.3 PERSPECTIVAS

En este trabajo se observa que la terapia combinada y la proteómica son dos importantes estrategias para el desarrollo de nuevos fármacos, basada la primera en la evaluación del efecto sinérgico de combinaciones de metabolitos bioactivos, en tanto que la segunda está dirigida hacia la búsqueda de nuevos blancos para el diseño de fármacos. Sin embargo, es importante evaluar los efectos y la actividad de la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno (1:4) al administrarse por tiempos más prolongados en ratones infectados con *T. cruzi*.

Asimismo, es necesaria la identificación de las 21 proteínas seleccionadas para su identificación, con el fin de confirmar los blancos potenciales en *T. cruzi* y establecer el posible mecanismo de acción de la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno.

Finalmente, la mezcla de lupenona y óxido de cariofileno debe ser evaluada como una alternativa importante para el futuro tratamiento de la enfermedad de Chagas.

6.4 REFERENCIAS

- Akemi-Kikuchi, S. (2007). Análise do perfil protéico de cepas de *trypanosoma cruzi* pertencentes ao zimodema III. Tesis de Maestría. Instituto Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Brasil. 129 p. [Online] Disponible en: <http://www.dominiopublico.gov.br/download/texto/cp074222.pdf> [Acceso 29 mayo 2011].
- Dragon, E.A., S.R. Sias, E.A. Kato y J.D. Gabe (1987). The genome of *Trypanosoma cruzi* contains a constitutively expressed, tandemly arranged multicopy gene homologous to a major heat shock protein. *Molecular and Cellular Biology*, 7, 1271–1275.
- Goyard, S., P. Lourenco- Dutra, P. Deolindo, D. Autheman, S.D. Archivio y P. Minoprio (2014). *In vivo* imaging of trypanosomes for a better assessment of host–parasite relationships and drug efficacy. *Parasitology International*, 63, 260-268.
- Issa, V.S. y E.A. Bocchi (2010). Antitrypanosomal agents: treatment or threat?. *Lancet*, 376, 768-769.
- Jemal, A., T. Murray, A. Samuels, A. Ghafoor, E. Ward y M.J. Thun (2003). Cancer statistics. *Cancer Journal of Clinicians*, 53, 5-26.
- Kyung-Ran, P., N. Dongwoo, Y. Hyung-Mun, L. Seok-Geun, J. Hyeung-Jin, S. Gautam, C. Somi y S.A. Kwang (2011). B-Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation. *Cancer Letters*, 312, 178-188.
- Lacerda-Sodré, C., A.D. Chapeaurouge, D.E. Kalume, L. de Mendonça-Lima, J. Perales y O. Fernandes (2009). Proteomic map of *Trypanosoma cruzi* CL Brener: the reference strain of the genome project. *Archives of Microbiology*, 191, 177-184.
- ONU (Organización de las Naciones Unidas), 2014. Objetivos de desarrollo del milenio y más allá de 2015. [Online] Disponible en: <http://www.un.org/es/millenniumgoals/> [Acceso 20 Noviembre 2014].

- Parodi-Talice, A., R. Durán, N. Arrambide, V. Prieto, M.D. Piñeyro, O. Pritsch, A. Cayota, C. Cerveñasky y C. Robello (2004). Proteome analysis of the causative agent of Chagas disease: *Trypanosoma cruzi*. International Journal for Parasitology, 34, 881-886.
- Pérez-Morales, D., H. Lanz-Mendoza, G. Hurtado, R. Martínez-Espinosa y B. Espinoza (2012). Proteomic Analysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes subjected to heat shock. Journal of Biomedicine and Biotechnology. doi: 10.1155/2012/902803.
- Polanco-Hernández, G., F. Escalante-Erosa, K. García-Sosa, K. Acosta-Viana, M. Chan-Bacab, H. Sagua, J. Gonzalez, L. Osorio, R.E. Moo-Puc y L.M. Peña-Rodríguez (2012). *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of native plants from the Yucatan peninsula. Parasitology Research, 110, 31-35.
- Polanco-Hernández, G., F. Escalante-Erosa, K. García-Sosa, M. Chan-Bacab, H. Sagua, J. Gonzalez, L. Osorio y L.M. Peña-Rodríguez (2012). Metabolites from the leaf extract of *Serjania yucatanensis* with trypanocidal activity against *Trypanosoma cruzi*. Parasitology Research, 111, 451-455.
- Rodríguez, M.A. (2005). Nuevas perspectivas en el manejo terapéutico de la enfermedad de Chagas. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 22, 123-131.
- Rosas, L.V., M.S.C., Cordeiro, F.R. Campos, S.K.R. Nascimento, A.H. Januário, S.C. Franca, A. Nomizo, M.P. Toldo, S. Albuquerque y O.S. Pereira (2007). *In vitro* evaluation of the cytotoxic and trypanocidal activities of *Ampelozizyphus amazonicus* (Rhamnaceae). Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 40, 663-670.
- Sundar, S. y M. Chatterjee (2006). Visceral leishmaniasis current therapeutic modalities. Indian Journal of Medical Research, 123, 345-352.