



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN CITOTÓXICA DE ESPARTEÍNA, ALCALOIDE EXTRAÍDO DEL CHOCHO  
ANDINO (*LUPINUS MUTABILIS SWEET*) PARA EL CONTROL DEL PARÁSITO  
PROTOZOARIO DE LA ESPECIE *LEISHMANIA MEXICANA*

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos  
para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

Ing. Stephanie Santander Vásquez

Autora

Nathalia Sophia Rodríguez Burneo

Año

2014

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

**“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante(s), orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”**

---

**Stephanie Carolina Santander Vásquez.**

**Ingeniera en Biotecnología**

**17171536166-1**

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

---

Nathalia Sophia Rodríguez Burneo

110408225-8

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres por el amor incondicional y apoyo en todas las decisiones.

A mi hermana por el cariño y paciencia.

A mi familia, por ser el pilar fundamental en mi vida.

A Stephy Santander por su amistad y apoyo.

Al Dr. Manuel Baldeón y a todo el equipo de trabajo del CIT.

A Bernardo por su infinita paciencia, por sus palabras de aliento y cariño incondicional.

A todos los "Bios" que forman una parte primordial en mi vida profesional y personal.

**DEDICATORIA**

**A mis padres y a mi familia.**

## RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad ocasionada por el parásito protozoario del género *Leishmania*. Es considerada dentro de las seis enfermedades de importancia a nivel mundial y de amplia distribución en América Latina y Ecuador.

La parasitosis presenta tres formas clínicas: cutánea, mucocutánea y visceral. Para tratar la enfermedad se emplean dosis bajas de antimoniales pentavalentes, los cuales presentan toxicidad debido a la acumulación en el organismo. Uno de los principales problemas del control de la parasitosis es la adquisición de resistencia al medicamento como consecuencia del no cumplimiento del tratamiento por parte del paciente.

La presente investigación analiza la actividad leishmanicida del extracto enriquecido de esparteína, un alcaloide proveniente de *Lupinus mutabilis* (chocho andino). La actividad fue comparada con controles de resistencia de antimonio de meglumine (Glucantime®), extracto E5 con actividad leishmanicida y agua como control negativo. Individuos de *L. mexicana* en las fases promastigote y amastigote fueron tratados con distintas concentraciones del alcaloide y evaluados mediante la prueba colorimétrica MTT. De igual manera, se evaluó la toxicidad de la esparteína en cultivos celulares de macrófagos murinos (línea celular RAW 264.7). Las distintas concentraciones evaluadas presentaron actividad antiparasitaria, donde el IC<sub>50</sub> para promastigotes fue de 0.403 µg/ml, mientras que para amastigotes el valor fue 0.568 µg/ml. De igual manera, el extracto resultó ser tóxico para macrófagos con un valor de IC<sub>50</sub> de 0.586 µg/ml. Además se obtuvo como resultado que el extracto genera producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en mínimas proporciones.

Los resultados obtenidos contribuyen al desarrollo y búsqueda de nuevos tratamientos para tratar la leishmaniasis, sin embargo es necesario identificar la vía de acción del alcaloide y su evaluación en modelos animales.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a zoonotic disease caused by protozoans of *Leishmania* genus. It is considered one of the most important diseases in the tropics with high incidence in Latin America and Ecuador. The infection with the protozoan presents three different clinical forms: cutaneous, mucocutaneous and visceral. Traditional treatment of the disease includes the use of pentavalent antimonial compounds, which accumulate in the organism and lead to poisoning. The main issue to control the infection is related to the acquisition of resistance to current drug treatments, induced by the non-compliance of the medical indications.

The present study tests the leishmanicidal activity of the extract of sparteine isolated from *Lupinus mutabilis* (Ecuadorian Andean lupine). The activity was tested and compared to positive controls of meglumina antimonate (Glucantime®), E5 extract with leishmanicidal activity and water as negative control. *L. Mexicana* promastigotes and amastigotes were tested with different concentrations of the extract and evaluated by the MTT colorimetric assay. The extract toxicity was evaluated in cultured murine macrophages (cell line RAW 264.7). The different tested concentrations showed anti-*Leishmania* activity; the  $CI_{50}$  for promastigotes was 0.403 $\mu$ g/ml and the value for amastigotes was 0.568 $\mu$ g/ml. The macrophages presented toxicity to the alkaloid with a  $CI_{50}$  value of 0.586 $\mu$ g/ml. It was also found that the extract produces reactive oxygen species (ROS) in small amounts.

The results contribute to the development and research of new treatments against leishmaniasis. However, it is necessary to identify the pathway of the alkaloid and their future evaluation in animal models.

## ÍNDICE

1. Capítulo 1: Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Justificación del problema.....	5
1.3 Objetivos.....	6
1.3.1 Objetivo general.....	6
1.3.2 Objetivos específicos.....	6
2. Capítulo 2.....	7
2.1 Marco teórico.....	7
2.1.1 Generalidades.....	7
2.1.1.1 Agente causal.....	10
2.1.1.2 Vectores y ciclo biológico.....	12
2.1.1.3 Epidemiología y formas clínicas.....	14
2.1.1.4 Respuesta inmune hacia <i>leishmania sp.</i> en humanos.....	17
2.1.1.5 Diagnóstico.....	19
2.1.1.6 Tratamiento.....	21
2.1.2 <i>Lupinus sp.</i> .....	23
2.1.2.1 Generalidades: morfología y taxonomía.....	23
2.1.2.2 <i>Lupinus mutabilis</i> .....	24
2.1.2.3 Alcaloides en <i>L. mutabilis</i> .....	25
2.2 Materiales y métodos.....	29
2.2.1 Toxicidad en <i>Artemia salina L.</i> .....	29
2.2.2 Preparación de diluciones del extracto de esparteína.....	30
2.2.3 Cultivo de <i>L. mexicana</i> . .....	31
2.2.3.1 Cultivo de promastigotes.....	31
2.2.3.2 Cultivo de amastigotes axénicos.....	32



2.2.4	Cultivo de macrófagos raw 264.7.....	32
2.2.5	Toxicidad en promastigotes.....	33
2.2.6	Toxicidad en amastigotes axénicos.....	34
2.2.7	Toxicidad en línea celular Raw 264.7.....	35
2.2.8	Modelo de infección en líneas celulares.....	35
2.2.9	Determinación de carga parasitaria por PRC en tiempo real.....	36
2.2.10	Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por medio de CellROX®.....	37
3.	Capítulo 3: Resultados .....	38
3.1	Efecto del extracto de alcaloides de <i>L. mutabilis</i> en <i>Artemia salina</i> L. ....	38
3.2	Efecto citotóxico del extracto enriquecido de esparteína en cultivos <i>in vitro</i> de promastigotes y amastigotes axénicos de <i>L. mexicana</i> . ....	39
3.3	Efecto citotóxico del extracto enriquecido de esparteína en células murinas Raw264.7 .....	43
3.4	Citotoxicidad del extracto enriquecido con esparteína evaluada cada 12 horas en cultivos de promastigotes, amastigotes axénicos, macrófagos y macrófagos infectados.....	45
3.4.1	Citotoxicidad en cultivos de promastigotes y amastigotes axénicos..	45
3.4.2	Citotoxicidad en cultivos de macrófagos Raw 264.7.....	49
3.4.3	Citotoxicidad en cultivos de macrófagos Raw 264.7 infectados con <i>L. mexicana</i> .....	51

3.5	Efecto leishmanicida del extracto enriquecido con esparteína evaluada por citometría de flujo.....	52
3.6	Efecto leishmanicida del extracto enriquecido con esparteína evaluado por PCR en tiempo real.....	55
3.7	Generación de especies reactivas de oxígeno evaluado con CellROX®.....	56
4.	Capítulo 4: Discusión.....	58
5.	Capítulo 5.....	64
5.1	Conclusiones.....	64
5.2	Recomendaciones.....	65
	REFERENCIAS.....	64

## CAPÍTULO 1

### 1. INTRODUCCIÓN

#### 1.1 ANTECEDENTES

La leishmaniasis es una enfermedad zoonótica ocasionada por un parásito protozoario intracelular obligado del género *Leishmania*. Sobrevive dentro de las células macrófagas del sistema inmune de mamíferos y se transmite por la picadura de mosquitos del género *Phlebotomus* o *Lutzomyia* (Calvopiña M., Llor R., Lara F., Zambrano P. y Hashiguchi Y., 2012, pp. 31-38). Los vectores adquieren el parásito al alimentarse de la sangre de reservorios animales infectados, en su mayoría mamíferos. El parásito ingresa a los macrófagos en forma de amastigotes no motiles, sin flagelo, cuya dimensión varía entre los 3 a 7  $\mu\text{m}$  de diámetro. El mosquito ingiere los macrófagos infectados cuando se alimenta de la sangre de los huéspedes y los amastigotes son liberados en el estómago del insecto, donde se transforman en promastigotes motiles y flagelados, cuyas dimensiones varían de 10 a 20  $\mu\text{m}$  (Awasthi A., Mathur R.K. y Saha B., 2004, pp. 238-258). Los promastigotes migran al tracto alimenticio de los mosquitos, donde viven de manera extracelular y se multiplican por división simple. El ciclo continúa cuando el mosquito infectado se alimenta de la sangre de algún mamífero no infectado y transfiere los parásitos de *Leishmania* en forma de promastigotes a través de la saliva (Awasthi A. et al., 2004, pp. 238-258).

El desarrollo de la leishmaniasis depende de varios factores: las especies infectantes de *Leishmania* y el estado inmune del hospedador, determinando así las distintas formas de la enfermedad y su distribución geográfica. Existen tres formas clínicas: cutánea (LC), mucocutánea (LMC) y visceral (LV). Las

formas cutánea y mucocutánea son las de mayor prevalencia a nivel mundial, las mismas que se caracterizan por la presencia de una o varias lesiones o pápulas en la piel que generalmente presentan úlceras (Awasthi A. et al., 2004, pp. 238-258). Los principales factores de riesgo vinculados con el desarrollo de la parasitosis son: malnutrición, medicamentos inmunosupresivos y, principalmente, la co-infección con VIH (Guerin P.J et al., 2002, pp. 494-501; Ready P.D., 2014, pp. 147-154).

Existen reportes de casos de leishmaniasis en 98 países de América, Europa, África y Asia (Alvar J. et al., 2012). Las zonas de prevalencia de ésta enfermedad son principalmente áreas tropicales y subtropicales (Dajem S.M.B., 2010, pp. 67-71).

La forma visceral, o kala azar, es la principal causa de muertes y problemas de salud en varios países en vías de desarrollo. Es ocasionada por más de 20 especies de *Leishmania* entre las que se destacan *L. infantum* y *L. donovani*, responsables de más de 58000 casos de leishmaniasis visceral, para los cuales existen de 30 a 100 infecciones subclínicas por cada caso de leishmaniasis visceral (Alvar J. et al., 2012). Más del 90% de casos de la forma visceral se presentan en: India, Bangladesh, Sudan, Brasil, Etiopia (Alvar J. et al., 2012). Por otro lado, la forma cutánea no es mortal, aunque presenta una distribución más extensa: América, la zona del Mediterráneo, Asia Central y Occidental. Los países con mayor incidencia de leishmaniasis cutánea (70 – 75% de la estimación global) son: Afganistán, Argelia, Colombia, Brasil, Irán, Siria, Etiopía, norte de Sudán, Costa Rica y Perú (Alvar J. et al., 2012). En el continente americano las especies de *Leishmania* que predominan son *L. mexicana*, causante de la forma cutánea, y *L. brasiliensis*, causante de la forma mucocutánea (Awasthi A. et al., 2004, pp. 238-258). El área de distribución de leishmaniasis en América comprende desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina. En el Ecuador las formas clínicas más comunes reportadas son la mucocutánea y la cutánea, sin embargo, no se han confirmado casos de la forma visceral. Se han registrado infecciones con *Leishmania* en 22 de las 24 provincias del país, con mayor incidencia en las regiones de bosques húmedos

subtropicales, tropicales y en los valles andinos (Calvopiña M. et al., 2012, pp. 31-38).

La leishmaniasis constituye un problema de salud pública mundial, ubicándose así en el sexto lugar en importancia dentro de las enfermedades tropicales (Rios R., Mattary S. y Gonzales M., 2011, p. 302). El tratamiento para esta enfermedad se basa en la quimioterapia con antimoniales pentavalentes, tales como Glucantime®, Anfotericina B, Pentamidina, Alopurinol, azoles, ketoconazol, sulfonatas, metronizadol, entre otros. El uso excesivo de estas drogas deriva en reacciones adversas de tipo cardiovascular, renal, hepático y gastrointestinal, a lo que se suma los períodos largos de tratamiento, costos elevados, la adquisición de resistencia parasitaria y la acumulación de medicamentos en el cuerpo (Brito S., Crescente O., Fernández A., Coronado A. y Rodríguez N., 2006, pp. 180-187 ; Mishra B.B. et al., 2009, pp. 81-90).

Actualmente la búsqueda continua de tratamientos alternativos para tratar la leishmaniasis ha resultado en el descubrimiento y utilización de distintos tratamientos naturales. Los metabolitos secundarios más estudiados con este fin son los alcaloides producidos por las plantas, que en su estado natural son utilizados como defensa química contra herbívoros o patógenos. Algunos de estos alcaloides poseen propiedades farmacológicas, como por ejemplo: analgésicos, estimulantes del sistema nervioso central, depresivos del sistema nervioso central, antihipotensivos, antihipertensivos, antipiréticos, anticolinérgicos, antieméticos, oxitócicos, vasoconstrictores, antitumorales o con actividad antipalúdica (Cushnie T.P.T., Cushnie B. y Lamb A.J., 2014; Koper S., Wink M. y H.A R., 1998). Se ha reportado que los alcaloides de tipo quinolino, quinolicidino, isoquinolino, indol, terpeno, esteroide y piperidinos poseen actividad antiparasitaria, por ejemplo en varias formas de tripanosomas como leishmania (Rosenkranz V. y Wink M., 2008, pp. 2463).

Las especies de *Lupinus* "amargo" se caracterizan por poseer gran cantidad de alcaloides de tipo quinolicidino, como la esparteína, lupanina y sus respectivos análogos, mientras que las especies de *Lupinus* "dulce" presentan una cantidad

de alcaloides más baja en comparación con otras especies (Fattorusso E. y Tagliabatella-Scafati O., 2008 ).

El efecto antiparasitario de los alcaloides ha permitido desarrollar investigaciones sobre tratamientos a partir de productos naturales, los cuales poseen propiedades biológicas que les otorgan un valor incalculable como productos para la salud y están siendo utilizados como una alternativa para tratar enfermedades tropicales causadas por parásitos (Mishra B.B. et al., 2009, pp. 81-90).

## 1.2 JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

En el Ecuador existe una elevada incidencia de leishmaniasis cutánea y mucocutánea en las regiones rurales de la Costa, la Amazonía, e inclusive en valles andinos, donde el acceso al medicamento es limitado y el tratamiento es prolongado y doloroso, por lo que un gran porcentaje de los pacientes no culminan el tratamiento (Weigel M. y Armijo R.X., 2001). Los medicamentos empleados para su tratamiento se caracterizan por su alta toxicidad y acumulación en el cuerpo, por lo que constantemente se están evaluando alternativas para tratamientos baratos, menos prolongados y de baja toxicidad. Actualmente, se han realizado investigaciones a nivel internacional donde se emplean los alcaloides provenientes de distintas especies de *Lupinus* sp., comprobando su actividad antiparasitaria en especies de la familia Trypanosomatidae (Mishra B.B. et al., 2009, pp. 81-90).

No se han reportado estudios específicos que evalúen el efecto de la esparteína extraída de *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho andino) para tratar leishmaniasis. La búsqueda de medicamentos alternativos que no generen efectos secundarios para el ser humano, de obtención sencilla y cuyo costo de inversión sea menor, son el principal motor para el desarrollo de la presente investigación. La determinación del efecto citotóxico y anti-*Leishmania* de la esparteína en cultivos in vitro de *Leishmania mexicana* y en modelos de infección en macrófagos constituye una importante contribución en el tratamiento de esta enfermedad.

## **1.3 OBJETIVOS**

### **1.3.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la actividad anti-Leishmania de esparteína extraída de *Lupinus mutabilis* Sweet (chocho andino) para el control del parásito protozoario de la especie *Leishmania mexicana*.

### **1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar el efecto citotóxico de los alcaloides del chocho andino en *Artemia salina*.
- Determinar el efecto citotóxico del extracto enriquecido de esparteína en cultivos in vitro de células RAW 264.7.
- Valorar el efecto citotóxico del extracto enriquecido de esparteína en cultivos in vitro de *L. mexicana*.
- Determinar la concentración del extracto enriquecido de esparteína al que el 50% de la población celular se inhibe (IC<sub>50</sub>) en cultivo in vitro de *L. mexicana*.
- Evaluar el efecto citotóxico del extracto enriquecido de esparteína sobre cultivos de promastigotes, amastigotes axénicos y cultivos celulares Raw 264.7 en función del tiempo.
- Evaluar el efecto citotóxico del extracto enriquecido de esparteína mediante ensayos de carga parasitaria por qPCR y citometría de flujo.
- Evaluar el estrés oxidativo generado por la esparteína en cultivos in vitro de *L. mexicana*.



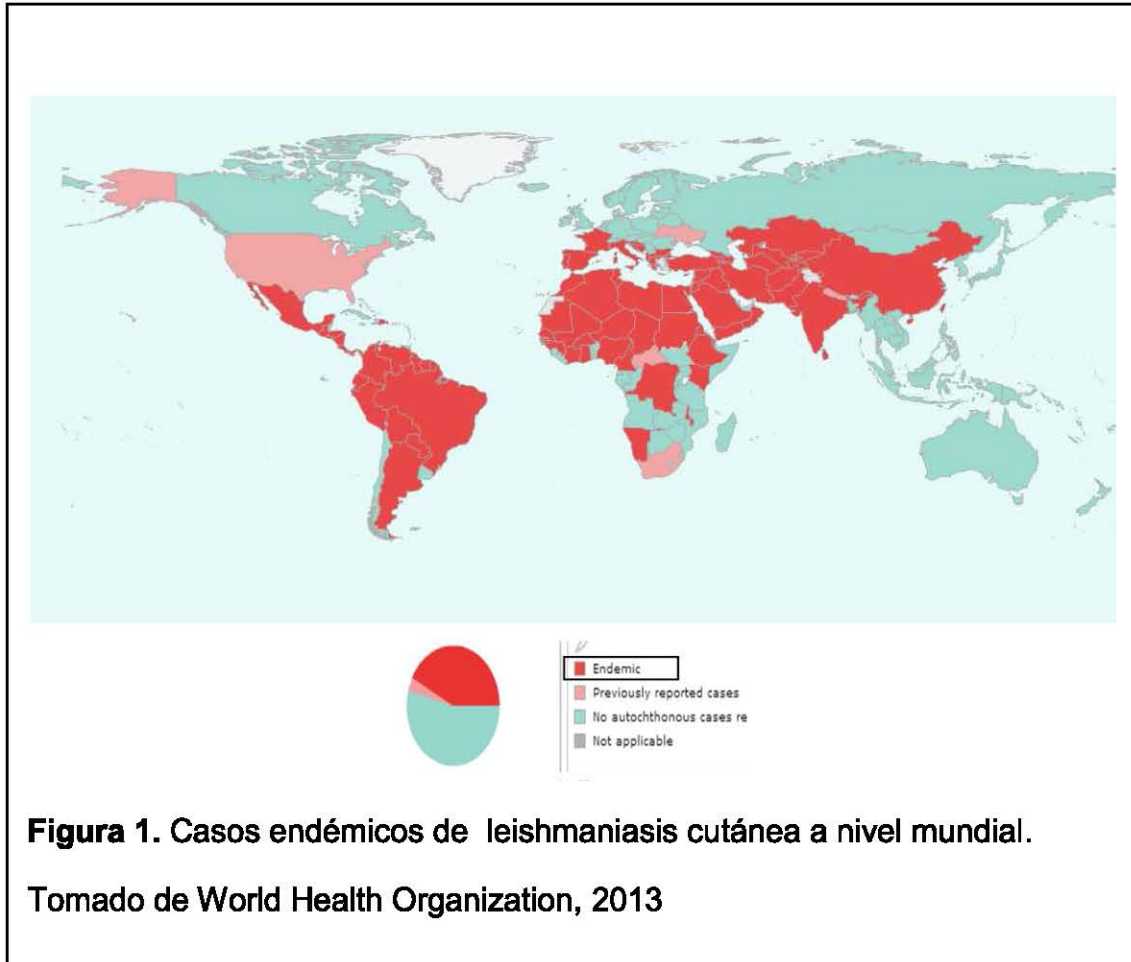
## **CAPÍTULO 2**

### **2.1 MARCO TEÓRICO**

#### **2.1.1 Generalidades**

La leishmaniasis es un importante problema de salud pública a nivel mundial, sobre todo en zonas rurales de países en vías de desarrollo, donde el sistema de salud es deficiente (Mishra B.B. et al., 2009, pp. 81-90). La transmisión se da por la picadura de insectos hematófagos de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, cuyo reservorio son animales vertebrados (Sánchez-S. L., Sáenz-A. E., Pancorbo-M. J., Carpio R.Z.D., Garcés-V. N. et al., 2004, pp. 82-98). El espectro de infecciones comprende formas asintomáticas, formas deformativas y viscerales con consecuencias fatales si no se tratan adecuadamente. Las diferentes formas clínicas manifestadas dependen de la especie de parásito involucrado. Su diagnóstico es complicado y el control y tratamiento no son adecuados para todas las variantes clínicas (Myler P.J. y Fasel N., 2008, p. 350; Serafim T.D. et al., 2012).

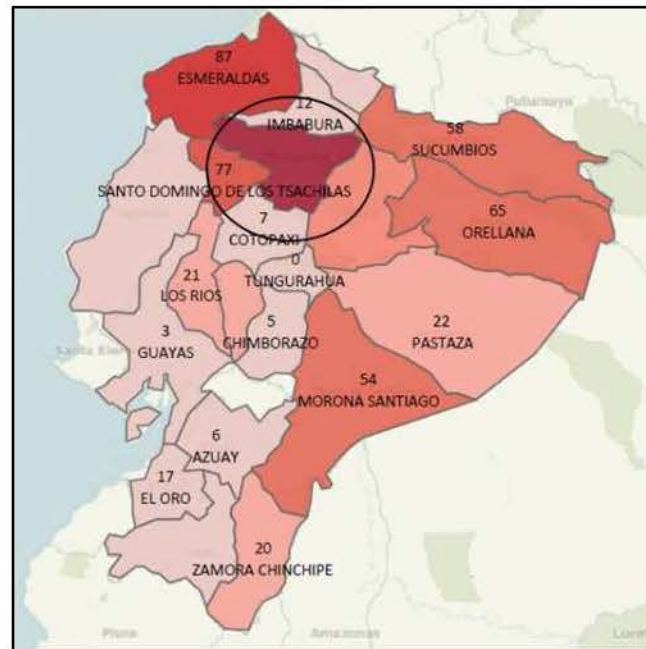
Esta enfermedad es endémica en 88 países a nivel mundial, de los cuales 72 son países en vías en desarrollo (Figura 1). Las zonas de mayor prevalencia de leishmaniasis son el este y sureste de Asia, Medio Oriente, norte y este de África, la cuenca del Mediterráneo en Europa, América Central y Sudamérica. En el continente americano la incidencia de leishmaniasis es alta, encontrándose en 24 países, como por ejemplo Colombia, Ecuador, Perú, Brasil (Sánchez-S. L. et al., 2004).



La enfermedad está limitada geográficamente debido a la distribución del vector. Sin embargo, los cambios en el medio ambiente aumentan la exposición del huésped humano al vector, por lo que los reportes de casos de leishmaniasis se encuentran en constante aumento (Sánchez-S. L. et al., 2004, pp. 82-98). En el Ecuador se han registrado casos de leishmaniasis en los bosques húmedos, subtropicales y tropicales de la región Costa y Amazonía, donde existe una mayor incidencia de la parasitosis (Calvopiña M. et al., 2012, pp. 31-38). Existen reportes de leishmaniasis hasta los 2700 m.s.n.m. en algunos valles de la Sierra, tales como Paute, Alausí y Huigra. La transmisión de *Leishmania* es mayor durante épocas de alta precipitación, aumentando considerablemente el número de casos, principalmente en la región costera (Castañeda M., 2014). Este fenómeno se puede atribuir a la modificación del

paisaje y del suelo para la agricultura, la construcción de nuevas represas y los patrones de actividad humana, como la migración interna. Aunque no existen evidencias directas, el fenómeno del Niño podría estar relacionado con el incremento de casos de leishmaniasis debido a la proliferación de vectores asociados a cambios climáticos temporales vinculados con el incremento de lluvias e inundaciones (Calvopiña M., Armijos R. y Hashiguchi Y., 2004, pp.663-672; Calvopiña M. et al., 2012, pp. 31-38).

En el Ecuador las formas clínicas prevalentes de leishmaniasis son cutánea, mucocutánea y sus variantes (Figura 2) (Calvopiña M. et al., 2012, pp. 31-38). En la región andina las lesiones que predominan son de tipo pápulo-ulcerosas, llamadas comúnmente “nigua de ratón” o leishmaniasis andina. En la región tropical y subtropicales encuentran las variantes clínicas ulcerosas húmedas, recidiva cutis, mucocutánea y la cutánea-difusa, propias de las zonas tropicales costeras (Calvopiña M. et al., 2004, pp. 663-672).



**Figura 2.** Distribución de leishmaniasis en Ecuador por regiones y provincias.

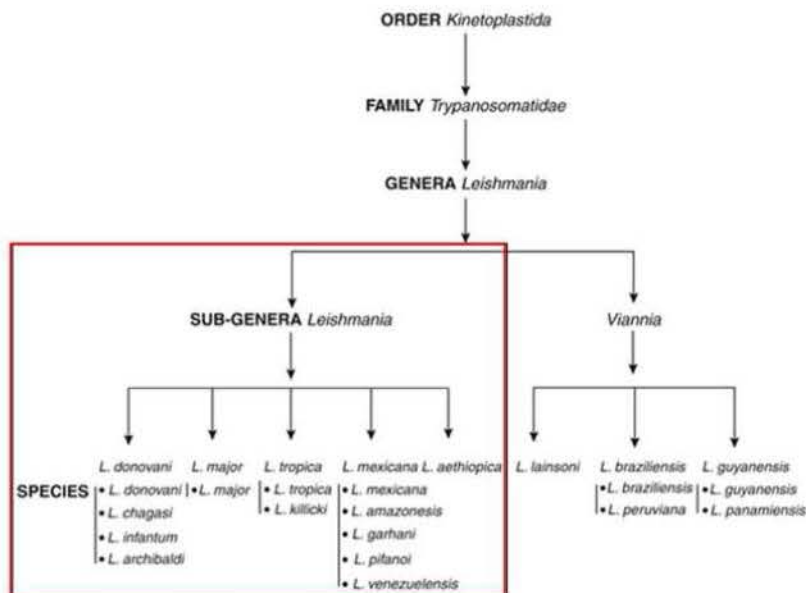
Tomado de Gaceta Epidemiológica, Ministerio de Salud Pública, 2014.

- a. Número de casos registrados en las semanas de la 1 a la 31 del presente año. La intensidad de los colores refleja el número de casos por provincia, es decir, mayor intensidad del color, mayor número de casos reportados

### 2.1.1.1 Agente Causal

El agente etiológico de la parasitosis es un protozooario dimórfico perteneciente al Reino Protista, Subreino Protozoa, Orden Kinetoplastida, Familia Trypanosomatidae, Género *Leishmania* (Kato H., Gomez E.A., Caceres A.G., Uezato H., y Mimori T, 2010, pp. 814-826)(Figura 3). Según el desarrollo del parásito en el intestino del vector, se divide en dos subgéneros: *Leishmania* y *Viannia* (Sánchez-S. L. et al., 2004, pp. 82-98).

Leishmaniasis es ocasionada por aproximadamente 21 especies del género *Leishmania* (Myler P.J. y Fasel N., 2008, p. 353). En el antiguo continente la leishmaniasis cutánea es causada principalmente por 7 especies del género *Leishmania* entre las que se destacan *L. (L.) major* y *L. (L.) tropica*, mientras que en el nuevo continente las especies de mayor prevalencia son *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (Vannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* y *L. (V.) peruviana*. La forma clínica de leishmaniasis mucocutánea es endémica de América Central y Suramérica, su principal agente causal es *L. (L.) braziliensis*, aunque se han reportado casos de otras especies de *Leishmania* que afectan al tejido de las mucosas tales como *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis* y *L. (L.) amazonensis* (Kato H. et al., 2010, pp. 814-826).



**Figura 3.** Taxonomía del género *Leishmania*

Tomado de Mishra B.B., Kishore N., Singh R.K. y Tiwari V.K., 2013, p. 1264

### **2.1.1.2 Vectores y Ciclo Biológico.**

La parasitosis es transmitida por la picadura de 5 mosquitos pertenecientes a los géneros: *Phlebotomus*, *Sergentomya*, *Lutzomya*, *Warielya* y *Brumptomya*. Los únicos vectores reconocidos son los géneros *Phlebotomus* para Europa, Asia y África, y *Lutzomya* para América. Estos vectores abundan todo el año en zonas tropicales, mientras que su presencia en las zonas templadas se limita a la época de verano (Sánchez-S. L. et al., 2004, pp. 82-98). Se caracterizan por ser mosquitos pequeños de 1.5 a 3 mm de vuelo silencioso y bajo. Su rango de vuelo puede abarcar hasta 200 m, aunque puede alcanzar mayor área si es arrastrado por el viento (Sánchez-S. L. et al., 2004, pp. 82-98).

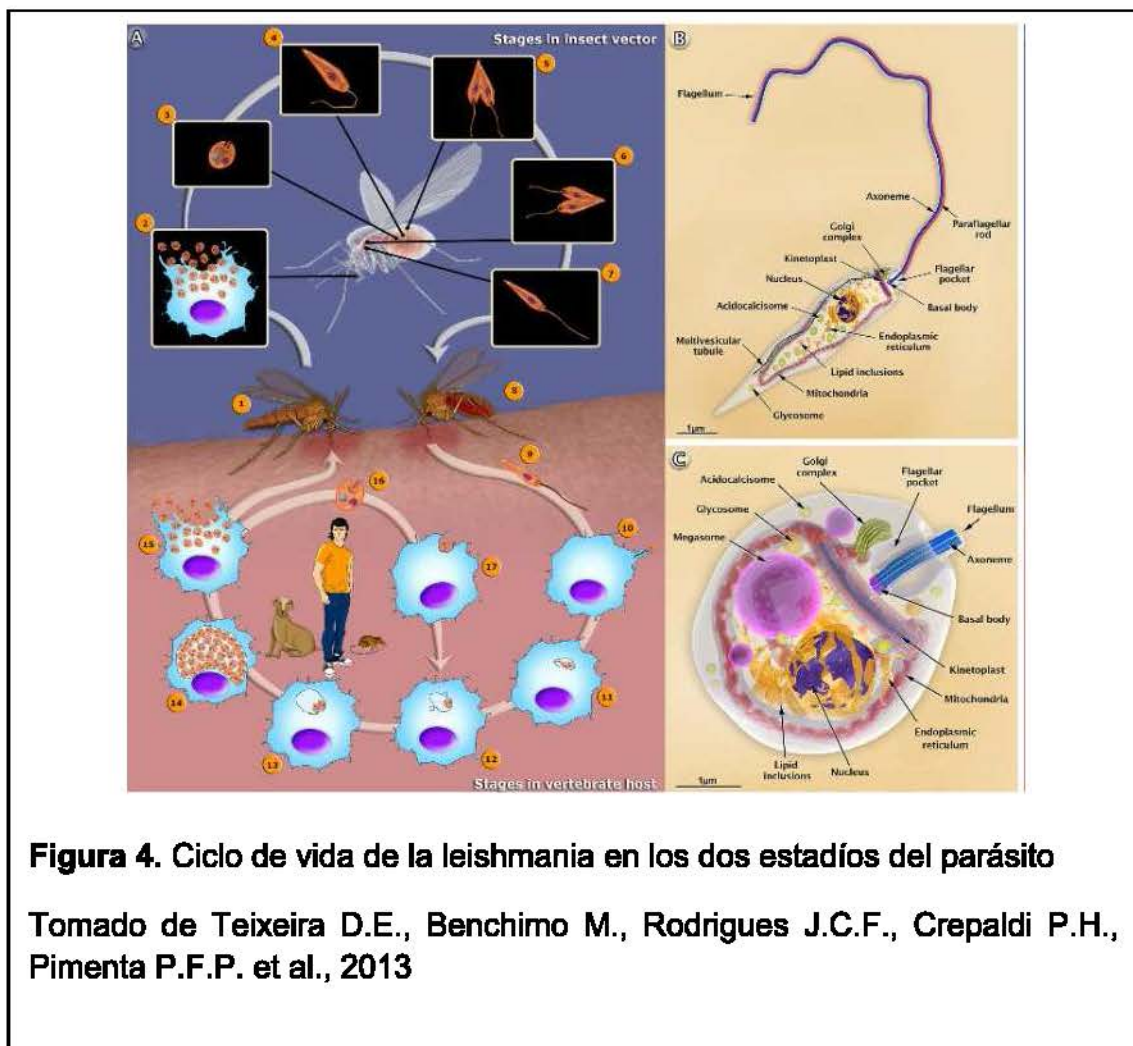
Los mosquitos hembras son los únicos capaces de transmitir los parásitos de *Leishmania* por medio de la picadura, debido a que son hematófagas ya que requieren las proteínas y hierro presentes en la sangre para poder producir huevos (Scott T.W. y Takken W., 2012, p. 117). Todas las especies de *Lutzomya* pueden ser vectores potenciales de *Leishmania* y dependerá de sus preferencias alimenticias (Sánchez-S. L. et al., 2004, pp. 82-98).

El ciclo biológico general de *Leishmania* incluye dos fases: 1) en los macrófagos del mamífero huésped y, 2) en el vector. La fase en los macrófagos presenta una biología parasitaria relativamente simple y consistente entre las especies (Gossage S.M., Rogers M.E. y Bates P.A., 2003, pp. 1027-1034).

Los promastigotes metacíclicos son la forma infectiva del parásito que se introducen en el huésped por la picadura del mosquito y son fagocitados por macrófagos. Ahí se transforman en amastigotes intracelulares en un tiempo de incubación de 12 a 24 horas. Los parásitos permanecen en esta forma durante la fase en el huésped mamífero. Los amastigotes se replican dentro de los macrófagos hasta lisis de la célula y liberar más amastigotes para infectar otros macrófagos. Esta fase es crónica y puede continuar por varios meses o años sin presentar síntomas notorios, dependiendo de la susceptibilidad y del



sistema inmune del hospedero (Sharma U. y Singh S., 2008, pp. 255–272; Awasthi A. et al., 2004, pp. 238-258). El desarrollo del parásito en el vector es más complejo. El mosquito se alimenta del huésped infectado, ingiriendo los amastigotes que se transformarán nuevamente en promastigotes a las 24 a 48 horas de haber sido ingeridos. Los promastigotes metacíclicos maduros se acumulan en el intestino medio y anterior. El mosquito transmite el parásito al alimentarse de otra especie hospedera completando así el ciclo. El vector puede transmitir con éxito la infección sólo a unos pocos pacientes, a pesar de que éste permanezca infectado (Sharma U. y Singh S., 2008, pp. 255–272) (Figura 4). En el vector, el promastigote se caracteriza por poseer una forma elongada y es motil. En vertebrados, el amastigote es de forma ovalada y carece de motilidad (Gossage S.M., et al., 2003, pp. 1027-1034).



**Figura 4.** Ciclo de vida de la leishmania en los dos estadios del parásito

Tomado de Teixeira D.E., Benchimo M., Rodrigues J.C.F., Crepaldi P.H., Pimenta P.F.P. et al., 2013

### **2.1.1.3 Epidemiología y Formas Clínicas.**

La leishmaniasis es una enfermedad cuya afección se enfoca en las poblaciones más pobres del planeta. La estimación de esta parasitosis es de 1,3 millones de nuevos casos anuales, y presenta entre 20000 y 30000 defunciones (OMS, 2014). En Ecuador se han reportado un total de 709 casos de leishmaniasis en las 31 semanas de éste año, siendo la provincia de Pichincha con mayor número de casos reportados con un total de 155 casos (Ministerio de Salud Pública, 2014) (Tabla 1).



**Tabla 1.** Casos de Leishmaniasis totales reportados en las primeras cinco semanas del 2014

Provincia	Número total de casos
Bolivar	29
Azuay	6
Cotopaxi	7
Carchi	6
Chimborazo	5
Esmeraldas	87
Guayas	3
El Oro	17
Imbabura	12
Loja	4
Los Ríos	21
Manabí	8
Morona Santiago	54
Napo	50
Orellana	65
Pastaza	22
<b>Pichincha</b>	<b>155</b>
Santo Domingo de los Tsáchilas	77
Sucumbíos	58
Zamora Chinchipe	20

Tomado de Ministerio de Salud Pública, 2014

La leishmaniasis cutánea es la forma clínica más frecuente. En las Américas es causada por las especies de *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* y en los demás continentes se presenta por contagio de *L. major* o *L. tropica*. Los casos de *L. major* y *L. tropica* suelen ser menos severos, sanar más rápidamente y, por tanto, asumir un curso relativamente benigno (David C.V. y Craft N., 2009, pp. 491–450; Hernández M.Á.M., 2002). Producen úlceras en la

piel, pero las lesiones suelen sanar espontáneamente aunque las personas infectadas tienden a reulcerarse. Independientemente de la especie, la leishmaniasis cutánea no es potencialmente mortal. Sin embargo, las lesiones pueden llevar a la desfiguración y la estigmatización social. En un pequeño porcentaje de casos, el tratamiento inadecuado de una lesión primaria por la forma cutánea puede dejar a una persona en riesgo de desarrollar posteriormente leishmaniasis mucocutánea (David C.V. y Craft N., 2009, 491–450; Hernández M.Á.M., 2002). El 95% de los casos se presentan en las Américas, la cuenca del Mediterráneo, Medio Oriente y Asia Central, a nivel mundial se producen entre 0,7 y 1,3 millones de casos anualmente (OMS, 2014).

La leishmaniasis mucocutánea es potencialmente mortal y requiere tratamiento. Las especies involucradas con esta condición son *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. panamensis* y *L. guyanensis* en las Américas. La progresión clínica de la enfermedad depende de la inmunidad del huésped y la virulencia del parásito. Entre una población de individuos infectados, la infección progresa a la mucosa entre el 1-10% de los pacientes (David C.V. y Craft N., 2009, 491–450). Aproximadamente el 90% de casos de LMC se presentan en Brasil, Bolivia y Perú (OMS, 2014).

La leishmaniasis visceral es la forma más severa de ésta enfermedad, causada por las especies *L. donovani* y *L. infantum* con un porcentaje de mortalidad casi del 100%, si no se la trata adecuadamente. Es endémica en el subcontinente indio y en África Oriental, cada año se estima que se producen entre 200000 y 400000 nuevos casos y de éstos casos más del 90% se encuentran en Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Sudán y Sudán del Sur (OMS, 2014). El tiempo de incubación de esta forma clínica es de dos meses aunque podría presentarse en un periodo hasta de dos años. Los órganos atacados son el bazo, médula ósea, hígado, mucosa intestinal, etc. Por lo general, los síntomas incluyen fiebre, leucopenia, hepatoesplenomegalia, además de pérdida de peso y tos. En el caso de un tratamiento ineficaz de ésta enfermedad, podrían

aparecer nódulos indurados en la piel meses o años después (Hernández M.Á.M., 2002; Sharma U. y Singh S., 2008, pp. 255–272).

#### **2.1.1.4 Respuesta Inmune hacia *Leishmania* sp. en humanos.**

La infección por parásitos induce diferentes respuestas inmunes debido a la heterogeneidad estructural y antigénica de los mismos. La complejidad de los ciclos biológicos de los parásitos, el estado de desarrollo y el estado de infección son factores que determinan la ubicación anatómica de los parásitos en el hospedero y por lo tanto la respuesta inmune producida. La expresión de antígenos puede cambiar en el caso de los parásitos con diferentes estadios de desarrollo dependiendo de la etapa en la que se encuentre el parásito, destacándose la respuesta inmune fase-específica. Es importante recalcar que las infecciones por parásitos generalmente son crónicas debido a que la respuesta inmune no es lo suficientemente fuerte como para eliminar éstos patógenos, especialmente si utilizan mecanismos de evasión y modulación del sistema inmune (Tormo N. et al., 2011, pp. 23–43).

La primera línea de defensa contra patógenos es la respuesta inmune innata, la cual es mediada por células fagocíticas entre las que se destacan macrófagos, granulocitos y células presentadoras de antígeno (APCs) tales como células dendríticas y linfocitos. El sistema inmune innato es capaz de reconocer estructuras de microorganismos llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a través de los receptores de reconocimiento (PRRs). Los PRRs más estudiados son los receptores Toll-like receptors (TLR), se han clasificado en 13 tipos y cada uno de ellos reconoce distintas moléculas de microorganismos, siendo TLR2 capaz de reconocer PAMPs derivados de especies de *Tripanosoma* y *Leishmania* (Kumar H., Kawai T. y Akira S., 2011, pp. 16-34; Tolouei S., Hejazi S.H., Ghaedi K., Khamesipour A. y Hasheminia S.J., 2013, p. 478). Para la iniciación de la respuesta inmune hacia patógenos, es necesario la unión de los PRR con su ligando específico, activando varias vías

control de cómo la fagocitosis y la secreción de citoquinas las cuales determinan el tipo de respuesta adaptativa por medio de señalización química (Abbas A.K., Lichtman A.H.H. y Pillai S., 2008; Tormo N. et al., 2011, pp. 23-43)

La respuesta inmune se desencadena una vez que existe la interacción del parásito con los receptores de las células hospederas. Pequeñas partes de los parásitos son fagocitadas por los macrófagos y neutrófilos, activando los factores citotóxicos para destruir los parásitos grandes, aunque estas funciones desarrollarán su capacidad total una vez activadas las células de la respuesta inmune adaptativa. Por otra parte, una vez activados los macrófagos y neutrófilos desencadenan una serie de moléculas pro-inflamatorias tales como TNF $\alpha$ , interleuquinas (IL-1), y algunos otros mediadores que promueven el crecimiento y diferenciación de otras células inmunes. Adicionalmente, las células fagocíticas actúan como APCs, la respuesta inmune adaptativa (Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S. et al., 2000; Tormo N. et al., 2011, pp. 23-43).

Algunas otras células involucradas en la respuesta inmune innata hacia parásitos son los granulocitos, células Natural Killer (NK), células T Natural Killer (NKT), linfocitos B-1 y MZ ("Marginal Zone") y linfocitos T $\gamma\delta$  (Tormo N. et al., 2011, pp. 23-43). Los granulocitos son células que se encargan de la activación de la respuesta inmune adaptativa por dos formas: por la interacción y activación de las células dendríticas o por la producción de citoquinas y otros mediadores. Tanto los granulocitos como los basófilos, eosinófilos y mastocitos están implicados en la producción inicial de citoquinas IL-4 e IL-13 (Gessner A., Mohrs K. y Mohrs M., 2005, p. 1065). Las células NK son importantes en infecciones con patógenos intracelulares ya que poseen dos funciones esenciales: destruir las células anormales mediante mecanismos citotóxicos, y la liberación de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas, principalmente INF $\gamma$  (Kim S., Iizuka K., Aguila H.L., Weissman I.L. y Yokoyama W.M., 2000, pp. 2731-2736; Lieberman J., 2003, p. 367). Por otro lado las células NKT se encargan del reconocimiento de glicolípidos asociados con moléculas CD1, las cuales son presentadas por APCs (Kawano T., Cui J.,

Koezuka Y., Toura I., Kaneko Y. et al., 1997, p. 1627). Los linfocitos B-1 y MZ generalmente se los encuentra en la cavidad peritoneal y en áreas marginales, actúan como intermediarios entre la inmunidad innata y adaptativa, no requiere de la intervención de Th para su crecimiento y pueden sobrevivir por meses. Para eliminar directamente al patógeno, son capaces de producir especies reactivas del oxígeno y citoquinas proinflamatorias (Oliver A.M., Martin F., Gartland G.L., Carter R.H. y Kearney J.F., 2005, p. 2368; Viau M. y Zouali M., 2005, p. 20).

Las células representativas de la respuesta inmune adaptativa hacia parásitos son los linfocitos B y T. La respuesta de las células Th dependen del estado de infección y del tipo del parásito, donde se ha establecido que la respuesta mediada por células Th1 elimina patógenos intracelulares, mientras que las células Th2 regula la eliminación de patógenos extracelulares (Tormo N. et al., 2011, pp. 23-43). Durante la infección por *Leishmania* existe una relación sanación/no sanación donde la respuesta inmune para controlar la enfermedad es mediada por células Th1 a través de la producción de citoquinas, mientras que la respuesta mediada por células Th2 y citoquinas se asocian con la progresión de la parasitosis (Alexander J. y Bryson K., 2005, p. 18).

#### **2.1.1.5 Diagnóstico.**

El diagnóstico para ésta enfermedad se fundamenta en demostrar la presencia del parásito en muestras de la piel para la forma cutánea, en lesiones mucocutáneas para la forma mucocutánea o en tejido de médula ósea, bazo y nódulos linfáticos para la forma visceral. El método de placa teñida o raspado en placa requiere un muestreo invasivo y una técnica de laboratorio, por lo general carece de sensibilidad. La sensibilidad puede ser aumentada mediante la inoculación en medios bifásicos o mediante la inoculación en animales de

laboratorio. En la práctica, en entornos de bajos recursos, las posibilidades de diagnóstico son generalmente limitadas aunque si se realiza diagnóstico a través del raspado y tinción en placa (Farrar J., Hotez P.J., Junghanss T., Kang G. y Laloo D., 2009).

El espectro clínico de leishmaniasis cutánea es amplio y el diagnóstico diferencial incluye otras condiciones de la piel tales como lepra, infecciones por estafilococos o estreptococos, úlceras micobacterianas, esporotricosis y otras micosis, cáncer, sarcoidosis y úlcera tropical. Debido a que la presentación clínica de la leishmaniasis cutánea carece de especificidad, el tratamiento es costoso, incómodo y/o tóxico, por lo que es indispensable un diagnóstico confirmativo (Farrar J. et al., 2009).

El estándar de referencia en el diagnóstico de la forma cutánea es el diagnóstico parasitológico, debido a su alta especificidad. La muestra se puede obtenerse por raspado, aspiración con aguja fina o biopsia de las lesiones. El material obtenido por cualquiera de estos métodos se puede utilizar para el examen microscópico con tinción Giemsa, cultivo celular y técnicas de diagnóstico molecular (Lopez M. et al., 1993, p. 350; Vega-Lopez F., 2003, pp. 97-101). Por otro lado, el diagnóstico inmunológico para la forma cutánea no es tan efectivo, ya que *L. major* o *L. tropica* no suele dar lugar a una respuesta detectable de anticuerpos. La evaluación por lo general es positiva y puede permanecer así durante toda vida. Por esta razón, el ensayo no distingue entre infecciones pasadas ni presentes (Farrar J. et al., 2009).

Para el diagnóstico de leishmaniasis mucocutánea se debe tomar en cuenta antecedentes de leishmaniasis cutánea con una o varias lesiones, rinitis alérgica y lepra. La confirmación del diagnóstico es compleja debido a la dificultad de obtener muestras para realizar PCR o ELISA (Farrar J. et al., 2009).

La sospecha de infección con leishmaniasis visceral considera algunos parámetros como la presentación clínica, epidemiología y algunos parámetros inespecíficos. La confirmación de la misma se la realiza mediante métodos

parasitológicos o serológicos. El aspirado de ganglios linfáticos, médula ósea o bazo, permite el análisis microscópico para la visualización de la forma de amastigote del parásito. La especificidad de este ensayo es alta, aunque la sensibilidad varía dependiendo de la muestra. La sensibilidad para detectar leishmaniasis visceral puede aumentar por medio de cultivos o técnicas moleculares como PCR (Farrar J. et al., 2009; World Health Organization, 2010).

Se han desarrollado varias pruebas de detección de anticuerpos en leishmaniasis visceral tales como pruebas de anticuerpos con fluorescencia indirecta (IFAT), ensayo inmunosorbenteligado a enzimas (ELISA), inmuno-electroforesis, hemaglutinación indirecta einmunoblot. Técnica que han resultado ser altamente precisas, pero están mal adaptadas al trabajo del campo (Gidwani K. et al., 2011, pp. 346-348).

#### **2.1.1.6 Tratamiento.**

Entre los tratamientos más comunes se encuentran los antimoniales pentavalentes tales como stibogluconato de sodio (Pensotam®) y antimonio de meglumine (Glucantime®), que poseen una toxicidad y efecto similar, aunque los productos difieren de la concentración de antimonio (Moore E. et al., 2001, p. 389; Veeken H., Ritmeijer K., Seaman J. y Davidson R., 2000, pp. 312-317). El efecto tóxico de los antimoniales se fundamenta en la reducción de  $Sb^V$  a  $Sb^{III}$  y en la restauración indirecta de los mecanismos de defensa de las células hospederas (Croft S.L., Sundar S. y Fairlamb A.H., 2006, p. 117). El  $Sb^{III}$  actúa en el metabolismo redox del tiol del parásito, incrementando el flujo de salida de tiol e inhibiendo al tripanotión reductasa. Los antimoniales tienen mala absorción oral y por lo tanto se administran por vía parenteral y son excretados rápidamente por los riñones. Se recomienda este tratamiento para leishmaniasis visceral en zonas que no presenten resistencia al tratamiento y la dosis administrada corresponde a 20 mg/kg durante 30 días vía intramuscular o

intravenoso. El fracaso de la droga es atribuido a la prescripción irracional y el mal uso del enfoque antroponótico con transmisión aguda. En el caso de las formas cutáneas y mucocutáneas el tratamiento se lo realiza durante 20 a 30 días respectivamente (Bryceson A., 2001, p, 930; Farrar J. et al., 2009). El tratamiento con antimoniales es poco tóxico, aunque provoca varios efectos secundarios como anorexia, náuseas, vómitos, dolor abdominal, sabor metálico en la boca, dolor artralgia, mialgia, pancreatitis aguda, y en pacientes infectados con VIH se presentan casos de hepatitis y arritmias cardíacas (Collin et al., 2004, p. 613).

La Anfotericina B es un antibiótico con actividad fungicida y leishmanicida, se utiliza generalmente para tratar leishmaniasis visceral. Se une a los ergosteroles de la membrana del parásito generando poros y permitiendo así la liberación de iones seguido de la muerte celular. El antibiótico es formulado en una suspensión coloidal (Fungizone®) de administración lenta (6-8 horas) en una dosis de 0.5-1 mg/kg durante 15 a 20 días. El factor limitante de la Anfotericina B, son las reacciones adversas a la infusión tales como fiebre alta, escalofríos, tromboflebitis, miocarditis, hipopotasemia severa, disfunción renal e incluso la muerte. Generalmente requiere de hospitalización prolongada, adecuada hidratación, suplementos de potasio y un adecuado seguimiento, lo que impide su uso en la mayoría de los centros de salud de escasos recursos. La utilización de liposomas con el antibiótico facilita la captación de la droga por los macrófagos proporcionando una mejor terapia (Abelcet®) (Farrar J. et al., 2009).

El primer tratamiento oral para tratar leishmaniasis fue la Metilfosina. La dosis recomendada en adultos con un peso mayor a 25kg es 100mg diarios durante 28 días. Para niños menores a 12 años la dosis es 2.5 mg/kg diario. Se utiliza principalmente en leishmaniasis visceral, ya que la efectividad para tratar las formas cutánea y mucocutánea es baja en *L. major* (van Thiel P.P. et al., 2010, pp. 80-83). Por otro lado, en *L. braziliensis* la efectividad varía de país a país. Con un tratamiento de 4 a 6 semanas con Miltefosine el 70% de pacientes con la forma mucocutánea fueron curados (Soto J. et al., 2008, pp. 210-211; Soto J.



et al., 2009, pp. 387-389). Los efectos del tratamiento incluyen vómito moderado en 40% de los pacientes y diarrea en 20% y hepatotoxicidad e insuficiencia renal en 1,5%. Es un medicamento teratogénico y posee una larga vida media, motivo por el cual la resistencia del parásito puede ser inducida fácilmente *in vitro* (Bhattacharya S.K. et al., 2007, p. 595; Perez-Victoria F.J. et al., 2006, pp. 28).

Se utiliza Pentamidita (Pentacarinat®) como tratamiento de segunda línea en casos de leishmaniasis visceral resistente al antimonio en India. Ocasiona severos efectos secundarios tales como diabetes insulino-dependiente, hipoglicemia y shock. En leishmaniasis cutánea causada por *L. guayanesys* y *L. panamensis* en las cuencas del norte del Amazonas se utiliza cuatro dosis de 4mg/kg vía intramuscular o intravenosa alternando los días de tratamiento y siguiendo estrictas precauciones (Lightburn E. et al., 2003, pp. 35-44).

Las drogas comerciales en su mayoría generan efectos colaterales en el ser humano, siendo el desarrollo de fármacos a partir de productos naturales la principal línea de investigación

## **2.1.2 Lupinus sp.**

### **2.1.2.1 Generalidades: Morfología y Taxonomía.**

Se lo clasifica taxonómicamente en el Orden Fabales, Familia Fabaceae, Género *Lupinus*. El número de especies de este género no está aun claramente definido pero se estima que son alrededor de 1000 (Government A., 2013). En la actualidad, el número de especies aceptadas de *Lupinus* es 164. Se han agrupado estas especies en dos grandes grupos: las especies del Viejo Continente y las del Nuevo Continente. El género *Lupinus* posee especies perennes y anuales y algunas de tipo arbustivas y en árbol (Government A., 2013).

En el Viejo Continente el número está representado por 12 especies anuales, que se dividen en dos grupos principales: Malacospermae (semilla lisa) y Scabrispermae (semilla rugosa). En el grupo de las de semilla lisa se encuentran: *L. angustifolius*, *L. albus*, *L. luteus*, *L. hispanicus* y *L. micranthus*. Mientras que en el grupo de las de semilla rugosa se encuentran siete especies: *L. pilosus*, *L. cosentinii*, *L. digitatus*, *L. princei*, *L. palaestinus*, *L. atlanticus* y *L. somaliensis*. Por otro lado, la clasificación en el Nuevo Continente consta de aproximadamente 500 taxones y alrededor de 1700 especies. La mayoría de las especies de *Lupinus* se emplean para estudios citológicos, entre las que se destaca *L. mutabilis* (Government A., 2013; Naganowska B., Wolko B., Sliwiska E. y Kaczmarek Z., 2003, pp. 349-355).

La morfología de la planta es variable y su tamaño va de 0.2 a 1.5 metros y algunos arbustos alcanzan hasta los 2.5 metros. Poseen un sistema de raíz primaria con formas que van desde raíces principales largas con pocas raíces laterales secundarias hasta especies con un sistema de raíces laterales desarrollados. El tallo de la planta es fascicular para especies herbáceas y arbóreo para especies arbustivas (Government A., 2013).

#### **2.1.2.2 *Lupinus mutabilis*.**

*Lupinus sp.* es un cultivo de importancia mundial. El Lupino Andino (*Lupinus mutabilis* Sweet) es una leguminosa que se la encuentra desde Colombia hasta el norte de Argentina, siendo Ecuador, Perú y Bolivia los principales países que la cultivan. En Perú crece principalmente a los alrededores del Lago Titicaca, desde Llave hasta la frontera con Bolivia en Desaguadero, en el norte en Cajamarca y en sur en Cusco. En Ecuador se cultiva en las provincias de Carchi, Imbabura, Tungurahua, Cotopaxi, Chimborazo, Bolívar y Pichincha (Jacobsen S.-E. y Mujica A., 2008, pp. 1-8.).

*Lupinus mutabilis* es utilizado como una fuente importante de proteína en animales y humanos, no solo por su valor nutricional sino por la capacidad de adaptación. En comparación con otras leguminosas, el chocho andino es rico en lisina y el porcentaje de proteínas es de 42–51%, adicionalmente presenta 30% de ácidos grasos esenciales, de tal manera que el consumo del chocho mejoraría el estado nutricional de poblaciones rurales (Güemes-Vera N., Peña-Bautista R.J., Jiménez-Martínez C., Dávila-Ortiz G. y Calderón-Domínguez G., 2008, p. 1137; Villacrés E., Navarrete M., Lucero O., Espín S. y Peralta E., 2010, ).

### **2.1.2.3 Alcaloides en *L. mutabilis*.**

El chocho posee gran potencial como alimento y forraje, aunque también cuenta con componentes antinutricionales como los alcaloides. En *Lupinus* sp. y en otras plantas de la Familia Fabaceae se encuentran los alcaloides quinolizidinos, los cuales son metabolitos secundarios que actúan como protección contra patógenos y herbívoros además de ser una reserva de nitrógeno para la planta. Son sintetizados en el tejido verde de la planta y son transportados por el floema y almacenados en todos los órganos y semillas. Algunos alcaloides poseen actividad antimicrobiana, bactericida y fungicida. Los alcaloides provenientes de *Lupinus* sonde sabor amargo y resultan ser tóxicos al ingerirlos (Boschin G., Annicchiarico P., Resta D., D'Agostina A. y Arnold A., 2008, p. 3659; Government A., 2013; Kordan B. et al., 2008, p. 140).

Los alcaloides son un grupo químico muy grande y diverso de productos naturales cuyo origen puede ser microbiano, vegetal y animal. Son los responsables de los beneficios de algunos medicamentos tradicionales (Hesse M., 2002, p. 4853). Se han atribuido varios roles a los alcaloides dependiendo del organismo que los produzca, la mayoría poseen una función de auto preservación, inhibición de competidores o comunicación (Cushnie T.P., Cushnie B. y Lamb A.J., 2014).

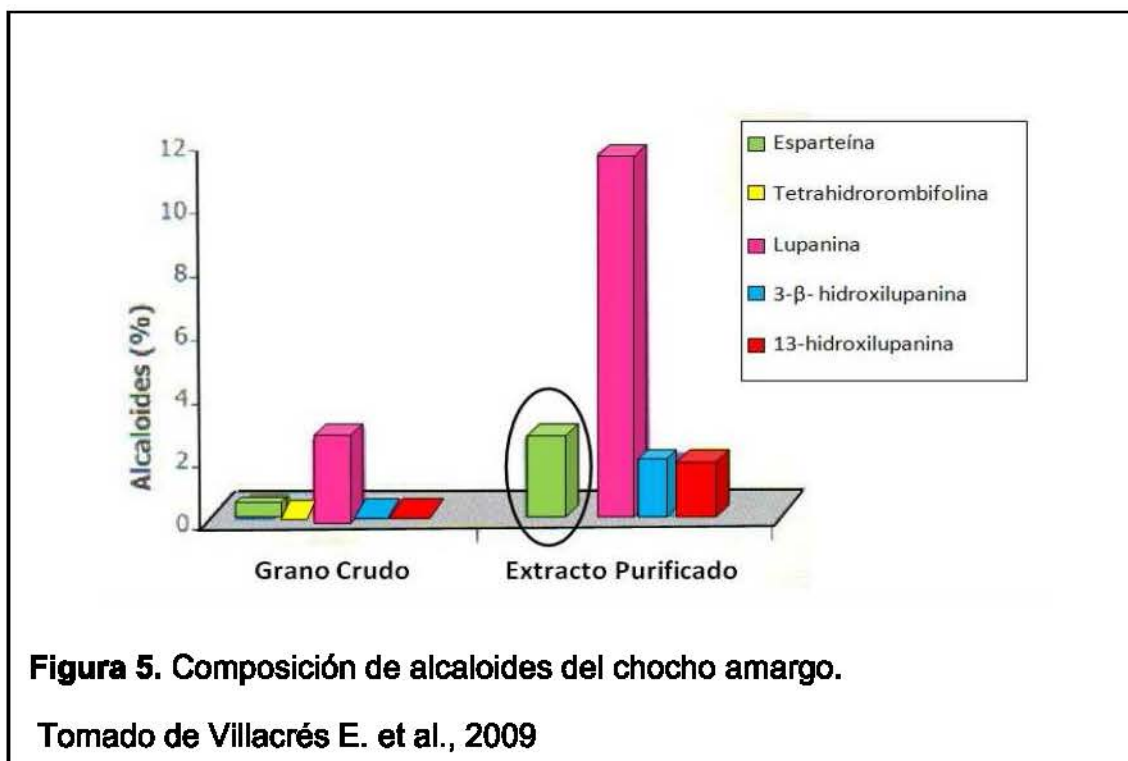
A pesar de la diversidad estructural que poseen los alcaloides, estos comparten propiedades físicas y químicas. Son compuestos básicos, ya que poseen un átomo de nitrógeno, el grado de basicidad varía dependiendo de la molécula y ubicación de sus grupos funcionales. En su mayoría son sólidos, aunque los que poseen oxígeno en su estructura se caracterizan por su forma líquida. Son insolubles o poco solubles en agua, son altamente solubles en solventes no polares (Cushnie T.P. et al., 2014).

Las principales formas en las que se encuentran los alcaloides quinolizidínicos son bicíclicos (lupinina), tricíclicos (angustifolina), y tetracíclicos (lupanina, 13-hidroxilupanina, esparteína, multiflorina y  $\alpha$ -isolupaniana). La concentración total de alcaloides se encuentra entre 0.01 a 4%. Dependiendo de la especie de *Lupinus* las proporciones de los alcaloides varían, es decir, las especies silvestres poseen perfiles más complejos de alcaloides, comparados con los cultivados domésticamente (Government A., 2013) (Tabla 2 y Figura 5).

**Tabla2.** Porcentaje total de Alcaloides en especies representativas de *Lupinus*

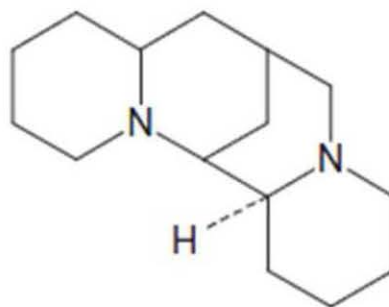
Alcaloides	L. angustifolius	L. albus	L. luteus	L.mutabilis
Albina	-	15	-	-
Ammodendrina	-	-	-	2
13- angeloyloxilupanina	-	-	-	2
Angustifolina	10	-	-	1
3- hidroxilupanina	-	-	-	12
13-hidroxilupanina	12	8		12
Lupanina	70	70	-	46
Lupinina	-	-	-	-
Multiflorina	-	3	60	-
Esparteína	-	-	30	16
Tetrahidrohombifolina	-	-	-	2

Adaptado de Government A., 2013



Los alcaloides que se encuentran en mayor proporción son lupanina y esparteína. En la variedad ecuatoriana (*Lupinus mutabilis* Sweet) el alcaloide en mayor proporción es la lupanina con 2,5% en el grano crudo y 11,5% en el extracto, seguido de la esparteína con una concentración de 0,32% en el grano crudo y 2,5% en el extracto purificado (Villacrés E. et al., 2009)

La esparteína es un alcaloide tetracíclico cuya fórmula química es  $C_{15}H_{26}N_2$ . Su principal efecto es a nivel de los neuroreceptores y receptores de acetilcolina muscarínico con un efecto agonista, mientras que posee un efecto antagonista a nivel de canales de  $Na^+/K^+$  (Fattorusso E. y Taglialatela-Scafati O., 2008) (Figura 6).



**Figura 6.** Estructura química de la esparteína

Tomado de Fattorusso E. y Tagliatela-Scafati O., 2008

Por su parte, el alcaloide presenta efecto leishmanicida y tóxico para células murinas a bajas concentraciones del mismo.

## **2.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1 Toxicidad en Artemia salina L.**

Para conocer el efecto tóxico de los alcaloides de *Lupinus*, se realizó una prueba rápida de biocontrol o toxicidad en modelos de *Artemia salina*.

Los ensayos de toxicidad en *Artemia* se realizaron con el extracto total de alcaloides de *L. mutabilis* proporcionados por Elena Villacrés del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) obtenidos por evaporación del agua proveniente del proceso de desagüe del chocho. Se prepararon diluciones seriadas en una relación 1:1 y se evaluó la toxicidad a las 24h. El medio utilizado fue medio salino (sal no yodada) a una concentración de 35g/L.

En una placa estéril de 24 pocillos se colocó 1ml del medio de cultivo en cada pocillo, con una pipeta se transfirieron 10 nauplios de *Artemia* y se adicionó 10µl de cada dilución del extracto. Como control positivo se utilizó 5µl de sulfato de cobre ( $\text{Cu}_2\text{SO}_4$ ) y como control negativo medio salino. Se cuantificó el número de *Artemias* vivas a las 24h (Álvarez R.S., 2002)(Tabla 3).

**Tabla 3. Concentraciones de extracto de alcaloides.**

Concentración Vf=1ml	
<b>C+</b>	5µl/ ml
<b>C-</b>	35 g/L
<b>1</b>	$2.28 \times 10^{-1} \mu\text{g/ ml}$
<b>2</b>	$2.28 \times 10^{-3} \mu\text{g/ ml}$
<b>3</b>	$2.28 \times 10^{-5} \mu\text{g/ ml}$
<b>4</b>	$2.28 \times 10^{-7} \mu\text{g/ ml}$
<b>5</b>	$2.28 \times 10^{-9} \mu\text{g/ ml}$
<b>6</b>	$2.28 \times 10^{-11} \mu\text{g/ ml}$
<b>7</b>	$2.28 \times 10^{-13} \mu\text{g/ ml}$
<b>8</b>	$2.28 \times 10^{-15} \mu\text{g/ ml}$

\*Vf= Volumen final.

### 2.2.2 Preparación de diluciones del extracto de esparteína

El extracto enriquecido de esparteína se obtuvo a partir de extracto total de alcaloides por cromatografía de capa fina (Zarzycki P.K., Slaczka M.M., Zarzycka M.B., Włodarczyk E. y Baran M.J., 2011, p. 170), donde se separaron los dos alcaloides que se encontraban en mayor concentración, siendo la esparteína el segundo compuesto en separarse. Se realizaron doce diluciones seriadas del extracto en agua destilada, la relación que se utilizó fue de 1:1. Se partió del extracto de la esparteína, cuya concentración fue de 8.19µg/ml, hasta llegar a la concentración más baja de 0.0004µg/ml (Concentraciones Stock). Estas diluciones se mantuvieron a 4°C (Tabla 4).



**Tabla 4. Concentraciones de esparteína en stock.**

<b>Concentraciones Stock (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	
<b>a.</b>	8.19
<b>b.</b>	4.095
<b>c.</b>	2.047
<b>d.</b>	1.023
<b>e.</b>	0.512
<b>f.</b>	0.256
<b>g.</b>	0.128
<b>h.</b>	0.064
<b>i.</b>	0.032
<b>j.</b>	0.016
<b>k.</b>	0.007
<b>l.</b>	0.004

### **2.2.3 Cultivo de *L. mexicana*.**

#### **2.2.3.1 Cultivo de promastigotes.**

Para descongelar líneas celulares de *L. mexicana* MHOM/B2/82/BEL-21 (BEL-21) se preparó medio líquido Infusión Bacto de Cerebro y Corazón (BHI; Infusion Becton, Dickinson and Company) suplementado con 400 $\mu\text{l}$  de Suero Fetal Bovino (FBS; Gibco®, Invitrogen™, USA), 70  $\mu\text{l}$  de hemina (Hemin Chloride; CALBIOCHEM, EMD Biosciences) y 5 $\mu\text{l}$  de antibiótico Penicilina-Streptomicina (Pen Strep; Gibco®, Invitrogen™, USA)(Santander S., 2010).

En botellas para cultivo celular de 25cm<sup>3</sup> estériles se colocaron 13ml de medio suplementado y se adicionó todo el contenido de los tubos de criopreservación. Los cultivos de *L. mexicana* se mantuvieron en 13ml de medio

líquido BHI suplementado y se realizaron pases sucesivos cada 7 días (Santander S., 2010).

#### **2.2.3.2 Cultivo de Amastigotes Axénicos.**

La transformación de promastigotes a amastigotes axénicos se realizó con cultivo de promastigotes en fase móvil de 4 a 6 días. Se tomaron 10ml del cultivo, se centrifugó durante 8 minutos a 3000rpms. Se eliminó el sobrenadante y se realizaron 3 lavados con Búfer Salino Fosfatado1X (PBS; Gibco®, Invitrogen™, USA) estéril (5ml). Al finalizar el tercer lavado se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1ml de PBS 1X estéril. Este volumen se colocó en una botella de cultivo celular con 10ml de medio MMA/20 suplementado con 20% FBS y 2,5µl de antibiótico Penicilina-Streptomina. Se incubó durante 5 días a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub> y humedad relativa del 90%. Se realizaron revisiones diarias del cultivo hasta obtener una transformación de aproximadamente del 90% de parásitos (Laboratory M., 2008; Santander S., 2010).

#### **2.2.4 Cultivo de Macrófagos RAW 264.7**

Para el cultivo de la línea celular de Monocitos Macrófagos de Ratón (Mouse Leukaemic Monocyte Macrophage Cell Line) (RAW 264.7 o MΦ), se preparó medio líquido Medio Instituto Conmemorativo al Parque Roswell (Roswell Park Memorial Institute Medium) (RPMI-1640, Gibco®, Invitrogen™, USA) suplementado con 10% de FBS, y 1% de antibiótico Penicilina-Streptomina.

En placas para cultivo celular estériles se colocaron 10ml de medio suplementado y se adicionó 1ml de la suspensión celular de un cultivo previo. Se incubó durante 5 días a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub> y humedad relativa del 90%.

Una vez transcurrido el periodo de incubación se succionó el medio con pipetas Pasteur y se realizaron 3 lavados con PBS 1X estéril. Después del último lavado se adicionó 10ml de medio suplementado y con un scraper estéril se levantaron las células. Para determinar la concentración celular se tomaron 10 $\mu$ l del medio y se contaron los M $\Phi$  en una cámara de Neubauer. Se realizaron pases sucesivos y se sembró en placas de 48 pocillos para alcanzar una concentración de 5x10<sup>5</sup> células por pocillo (Santander S., 2010).

### **2.2.5 Toxicidad en Promastigotes.**

Los ensayos de toxicidad se realizaron con cultivo de *L. mexicana* en fase móvil de 5 días de incubación. Se tomaron 10ml de medio BHI suplementado y se le adicionó 1ml del cultivo, seguido de una homogenización. Las siembras se realizaron en placas de 96 pocillos estériles, en los que se procuró colocar un valor constante de 3x10<sup>6</sup> a 5x10<sup>6</sup> parásitos aproximadamente por cada pocillo. Se adicionó la concentración correspondiente a cada dilución del extracto de esparteína en cada pocillo (40 $\mu$ l). Se incubó por un periodo de 24 horas. La viabilidad celular fue medida por medio de espectrofotometría con la prueba colorimétrica bromuro de 3-(4,5-dimetiltiasol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Invitrogen™, USA), basada en la reducción de la sal. Este proceso se lleva a cabo en la mitocondria, dando como resultado cristales de formazan, un producto insoluble. Este ensayo se midió a una longitud de onda de 570nm, donde la reducción y cambio de coloración se da únicamente en células activas metabólicamente, en el cual la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de viabilidad celular (Capusiri E.S., Pinell G.R., Huallpara J.C.T. y Turba A.G., 2008, pp. 21-27)

Como control positivo para todos los ensayos de toxicidad se utilizó *E5 Scrophulariaceae* (extracto con actividad leishmanicida evaluado en ensayos anteriores).

**Tabla 5. Concentración de esparteína para ensayos de toxicidad**

	Concentración esparteína( $\mu\text{g/ml}$ )
I.	1.638
II.	0.819
III.	0.410
IV.	0.205
V.	0.102
VI.	0.051
VII.	0.026
VIII.	0.013
IX.	0.006
X.	0.0032
XII.	0.0016
XII.	0.008

### 2.2.6 Toxicidad en Amastigotes Axénicos.

La evaluación de los efectos tóxicos de esparteína en amastigote saxénicos se realizaron con cultivos de 5 días. En placas estériles de 96 pocillos, se colocaron  $3 \times 10^6$  parásitos por pocillo y se los enfrentó a las mismas concentraciones del extracto descritas en la tabla 5. La evaluación de los efectos citotóxicos se las realizó a las 24 horas de tratamiento y por el método colorimétrico MTT descrito anteriormente.

### **2.2.7 Toxicidad en línea celular Raw 264.7.**

Los ensayos se realizaron en placas estériles de 48 pocillos, con una concentración aproximada de  $3 \times 10^6$  células. Se realizaron lavados con PBS 1X y se adicionó medio RPMI suplementado en cada pocillo. Se adicionó las distintas concentraciones del extracto y los respectivos controles. Se incubó durante 24 horas y se evaluó la viabilidad celular a través del ensayo de MTT.

Tanto para los ensayos de promastigotes, amastigotes y macrófagos, se realizaron tres ensayos con tres repeticiones cada uno.

### **2.2.8 Modelo de infección en líneas celulares.**

El análisis del efecto de la esparteína en amastigotes intracelulares se realizó por citometría de flujo. Los promastigotes de *L. mexicana* de 7 a 8 días, fueron coloreados con un fluorocromo específico succinimidyl éster diacetato de carboxifluoresceína (CFSE) (Molecular Probes®) seguido de un proceso de infección de macrófagos de la línea celular RAW 264.7. El ratio de infección utilizado fue de 1 a 10 (macrófago: *Leishmania*). El fluorocromo actúa ingresando a la célula y se pega a las proteínas de membrana del parásito, determinando así la viabilidad celular (Sampaio W.M. et al., 2007).

El proceso de infección requiere de un tiempo de incubación de 2 horas. Una vez transcurrido éste periodo se procedió a aplicar las mismas concentraciones del extracto por 24 horas, a 37°C con 5 % de CO<sub>2</sub> y humedad relativa del 90%. A las 24 horas de aplicado el tratamiento, se realizaron tres lavados con PBS 1X estéril y se colectaron las células de cada pocillo en tubos eppendorf estériles a un volumen final de 1 ml.

Para hacer la lectura en el citómetro de flujo se tomaron 300µl de células suspendidas y se las diluyó en 700µl de PBS 1X estéril. La respuesta a analizar fue la efectividad del alcaloide, de tal manera que el Índice Medio de Fluorescencia (MFI) emitido por los parásitos disminuya conforme la concentración del alcaloide aumente. Procurando matar al parásito intracelular, sin causar daño al macrófago.

### **2.2.9 Determinación de Carga Parasitaria por PCR en Tiempo Real**

Para complementar los análisis de citometría de flujo y con la finalidad de evaluar la carga parasitaria se utilizó también la técnica de PCR en tiempo real (qPCR). El ensayo se basa en la amplificación del ADN del kinetoplasto para cuantificar la presencia de *L. mexicana* en cultivos de MΦ infectados con el parásito y tratados con el extracto enriquecido de esparteína. Se utilizó SsoFast™ SupermixEvaGreen (BIORAD, USA) en el equipo CFX99™ ThermalCycler (BIORAD, USA).

Se utilizó el set comercial High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) para la extracción de DNA, siguiendo las especificaciones descritas por el fabricante. Los cebadores específicos para *Leishmania* utilizados fueron JW11 y JW12 (Forward, 5'-CCTATTTTACACCAACCCCGAGT-3'; Reverse, 5'-GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA-3'. El fragmento amplificado por éstos cebadores es de 120pb del kinetoplasto del parásito (Rodríguez-Gonzalez I. et al., 2007, pp. 9-16)

Las reacciones preparadas para el ensayo fueron en un volumen final de 20µl con 8µl de ADN extraído. El programa de qPCR utilizado se describe a continuación en la tabla 6.

**Tabla 6.** Condiciones de qPCR para CFX96 (BIORAD)

	Tiempo	Temperatura	Ciclos
<b>Desnaturalización</b>	10'	95°C	45
<b>Alineación</b>	10'	56°C	45
<b>Extensión</b>	5'	72°C	45

Adaptado de Santander S., 2010

Para todos los ensayos realizados, se utilizó 40µl de agua destilada como control negativo y como control positivo de resistencia 300µg/ml de antimonio de meglumine (Glucantime®).

#### **2.2.10 Determinación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por medio de CellROX®**

La generación de ROS, es producida a una velocidad controlada en células sanas. En condiciones de estrés oxidativo, los niveles de ROS incrementan dramáticamente (kit CellROX®, Life Technologies®, USA). Para demostrar esta posible ruta metabólica y el efecto de la esparteína, se utilizó el kit comercial CellROX®Green and CellROX® Orange FlowCytometryAssay Kit (Life Technologies®, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. El volumen final al que se trabajó fue 500µl. Como control positivo, adicionalmente a los controles empleados en el kit, se utilizó el extracto etanólico E5 Scrophulariaceae y el control de resistencia Glucantime®, mientras que el control negativo fue agua.

El cultivo se encontraba en fase logarítmica tardía, es decir, al quinto día de cultivo y el número de parásitos por cada pocillo fue de  $3 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$ . Los resultados fueron evaluados a las 24 horas y las concentraciones de la esparteína utilizadas fueron las tres primeras diluciones descritas en la tabla 5.

## CAPÍTULO 3

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Efecto del extracto de alcaloides de *L. mutabilis* en *Artemia salina* L.

El efecto tóxico de los alcaloides de *L. mutabilis* fue evaluado en *Artemia salina* L. debido a que este crustáceo es un organismo blanco importante para ensayos toxicológicos, ya que posee características que facilitan su uso (Álvarez R.S., 2002).

El extracto de los alcaloides evaluados presenta un efecto tóxico para *Artemia*, demostrando una relación directa entre la concentración del extracto y el porcentaje de mortalidad de los nauplios, es decir, a mayor concentración mayor porcentaje de mortalidad. El porcentaje de mortalidad fue calculado por la fórmula corregida de Abbott y la concentración inhibitoria al 50% (IC50) se calculó mediante el programa estadístico SPSS- Probit.

$$\%M = \frac{Me - Mb}{n - Mb} \times 100 \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Fórmula de Abbott (S M.P., et al., 2006)

Donde:

M = Mortalidad

Me= Mortalidad en el extracto

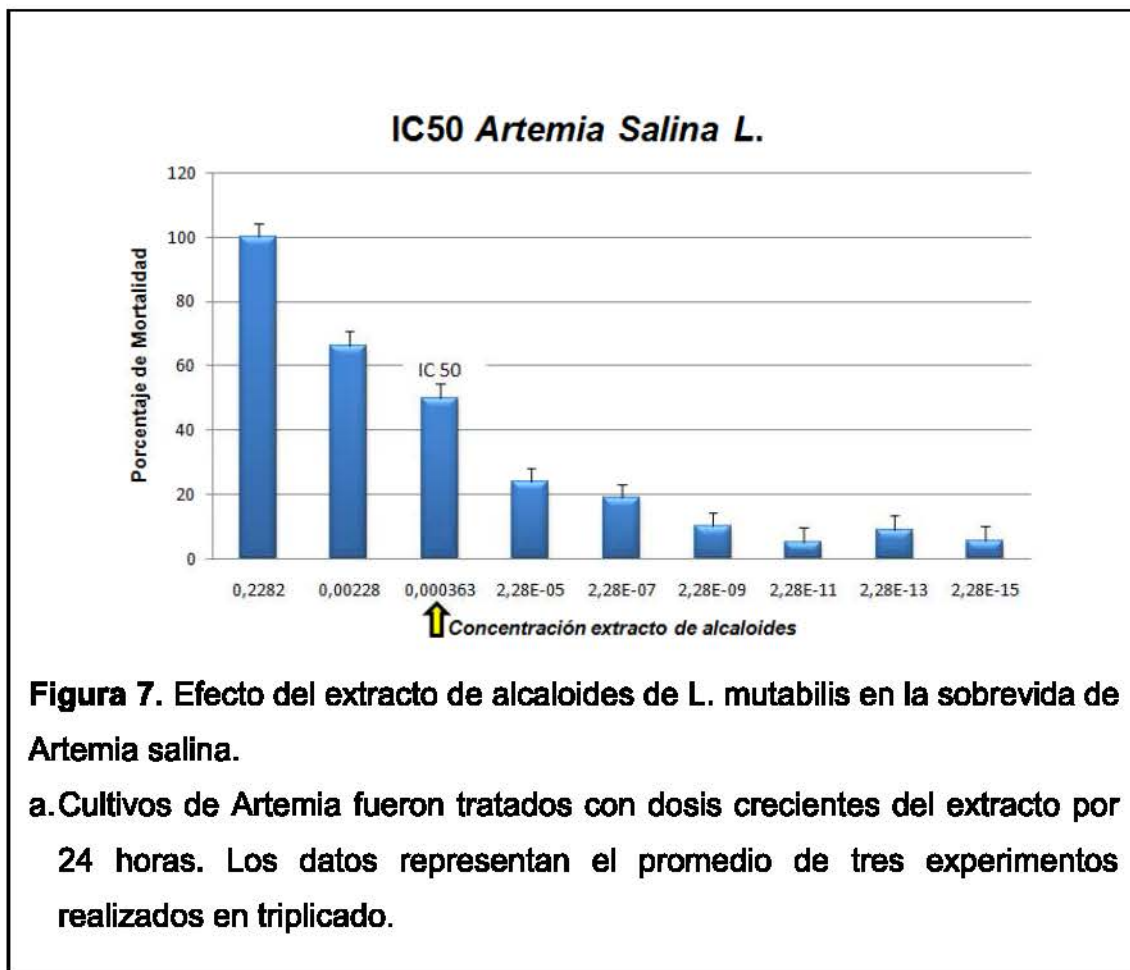
Mb= Mortalidad en blancos.

n= Número de nauplios =10

La concentración más alta correspondiente a  $2,28 \times 10^{-1} \mu\text{g/ml}$  presentó una mortalidad del 100%, mientras que la concentración más baja del extracto  $2,28 \times 10^{-15} \mu\text{g/ml}$  presentó una mortalidad del 5,56%. El IC<sub>50</sub> del extracto de



alcaloides fue un valor obtenido a través de una regresión logarítmica, cuyo valor resulto ser  $3,36 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$  (véase figura 7).



### 3.2 Efecto citotóxico del extracto enriquecido de esparteína en cultivos in vitro de promastigotes y amastigotes axénicos de *L. mexicana*.

Para determinar el potencial efecto antileishmania de la esparteína, cultivos de promastigotes y amastigotes axénicos de *L. mexicana* resistente al Glucantime® fueron tratados con dosis crecientes de esparteína evaluadas a las 24 horas (Tabla 5).

Las distintas concentraciones del extracto enriquecido de esparteína presentaron efecto leishmanicida. Los ensayos se realizaron en éstas dos fases del parásito debido a las diferencias metabólicas y morfológicas que presentan. La figura 8 y 9, demuestran el porcentaje de mortalidad del tratamiento con esparteína en los cultivos de *Leishmania*. La viabilidad de las células se determinó por el método de MTT como se indica en la sección materiales y métodos. Las absorbancias obtenidas, indican el número de células vivas del cultivo (Capusiri E.S. et al., 2008, pp. 21-27).

La actividad leishmanicida fue evidente tanto para el cultivo de promastigotes como para el de amastigotes axénicos en los ensayos de toxicidad evaluados a las 24 horas. Sin embargo, los amastigotes presentaron menor porcentaje de mortalidad comparado con el de promastigotes (Tabla 7).

$$\% Viabilidad = \frac{Abs.Tratamiento}{Abs.Control\ negativo} \times 100 \quad \text{(Ecuación 2)}$$

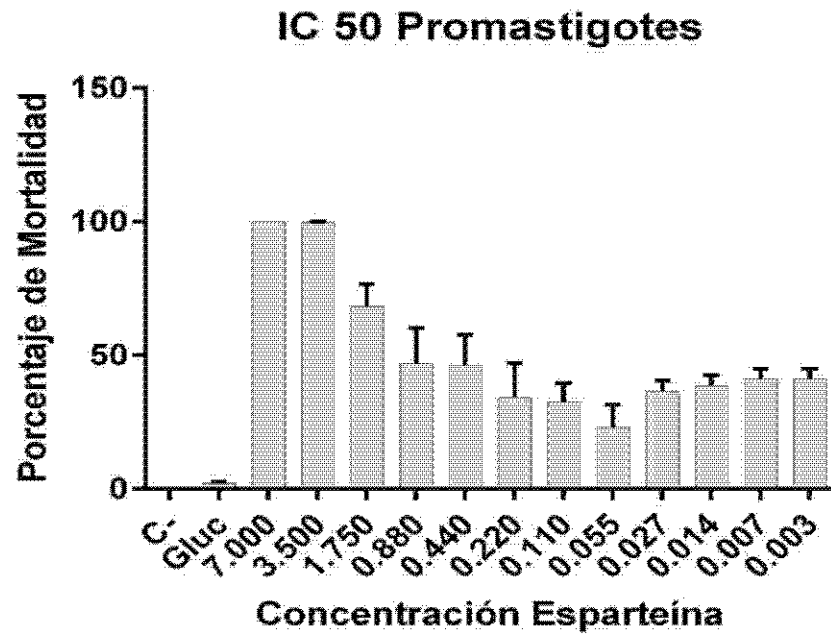
Fórmula adaptada de Castro C., 2006, p. 9

$$\%Mortalidad = 100 - \%Viabilidad \quad \text{(Ecuación 3)}$$

**Tabla 7.** Porcentaje promedio de mortalidad en cultivos de promastigotes y amastigotes axénicos evaluados a las 24 horas

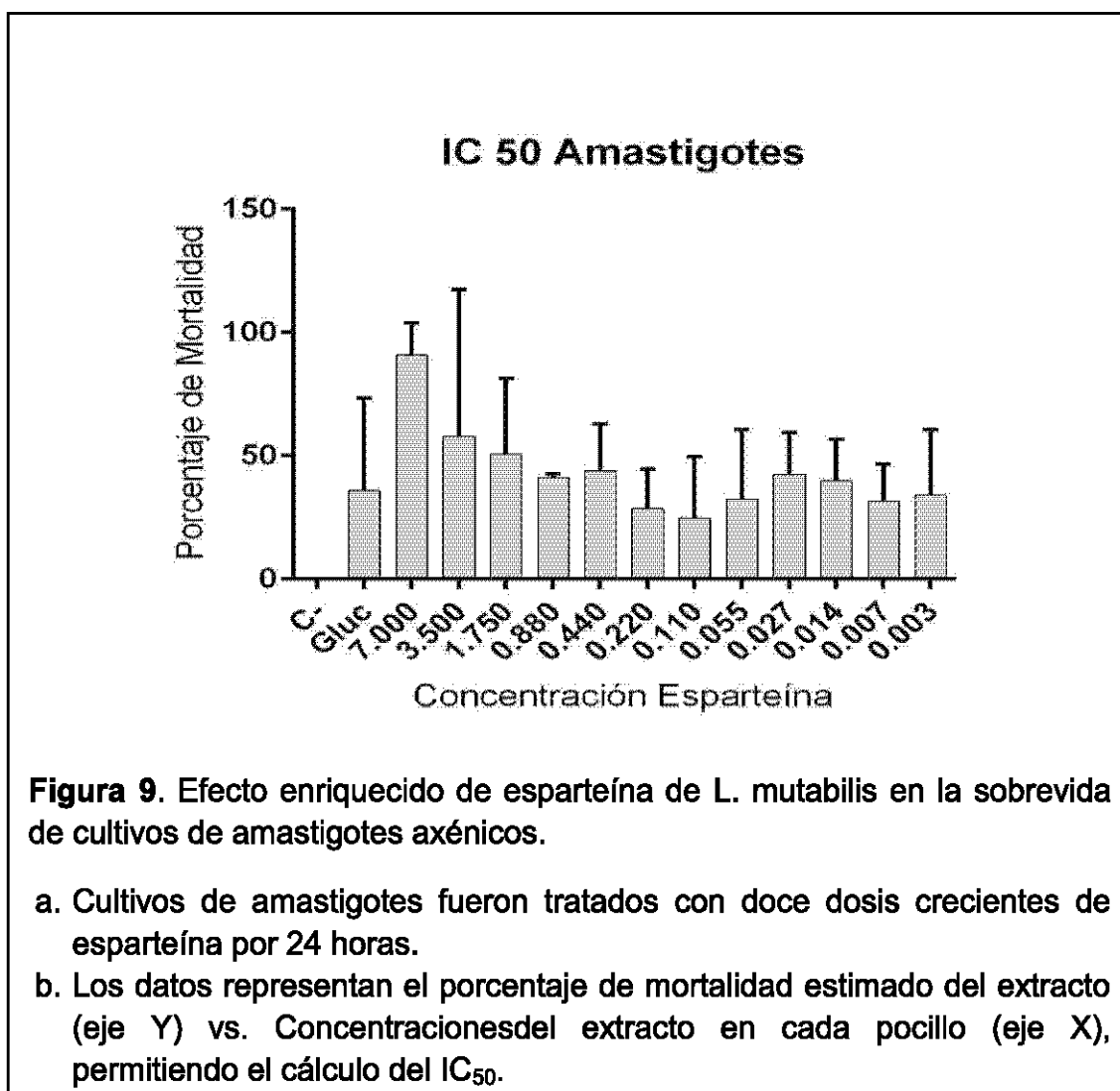
<b>Tratamiento</b>	<b>Promastigotes</b>	<b>Amastigotes Axénicos</b>
<b>Glucantime</b>	0.76	36.19
<b>1.638 µg/ml</b>	100	81.32
<b>0.819 µg/ml</b>	100	79.24
<b>0.410 µg/ml</b>	68.62	50.34
<b>0.205 µg/ml</b>	47.53	41.15
<b>0.102 µg/ml</b>	46.74	44.16
<b>0.051 µg/ml</b>	34.76	28.85
<b>0.026 µg/ml</b>	32.91	24.81
<b>0.013 µg/ml</b>	23.45	32.79
<b>0.006 µg/ml</b>	36.73	42.55
<b>0.0032 µg/ml</b>	38.80	40.06
<b>0.0016 µg/ml</b>	41.34	31.92
<b>0.008 µg/ml</b>	41.40	34.30

La inhibición del 50% del cultivo de parásitos enfrentado al alcaloide, se define como concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>). El cultivo alcanza su crecimiento máximo cuando no se lo enfrenta a ningún tratamiento; por lo tanto, su porcentaje de mortalidad resulta ser 0 o valores cercanos a 0 (Castañeda M., 2014). El IC<sub>50</sub> fue calculado a través del programa GraphPadPrism 6.0 (versión gratuita), donde el IC<sub>50</sub> para promastigotes fue de 0.403 µg/ml, mientras que para amastigotes el valor calculado corresponde a 0.568µg/ml.



**Figura 8.** Efecto del extracto enriquecido de esparteína de *L. mutabilis* en la sobrevivencia de cultivos de promastigotes.

- a. Cultivos de promastigotes fueron tratados con doce dosis crecientes de esparteína por 24 horas.
- b. Los datos representan el porcentaje de mortalidad estimado del alcaloide (eje Y) vs. Concentraciones del extracto en cada pocillo (eje X), permitiendo el cálculo del  $IC_{50}$ .



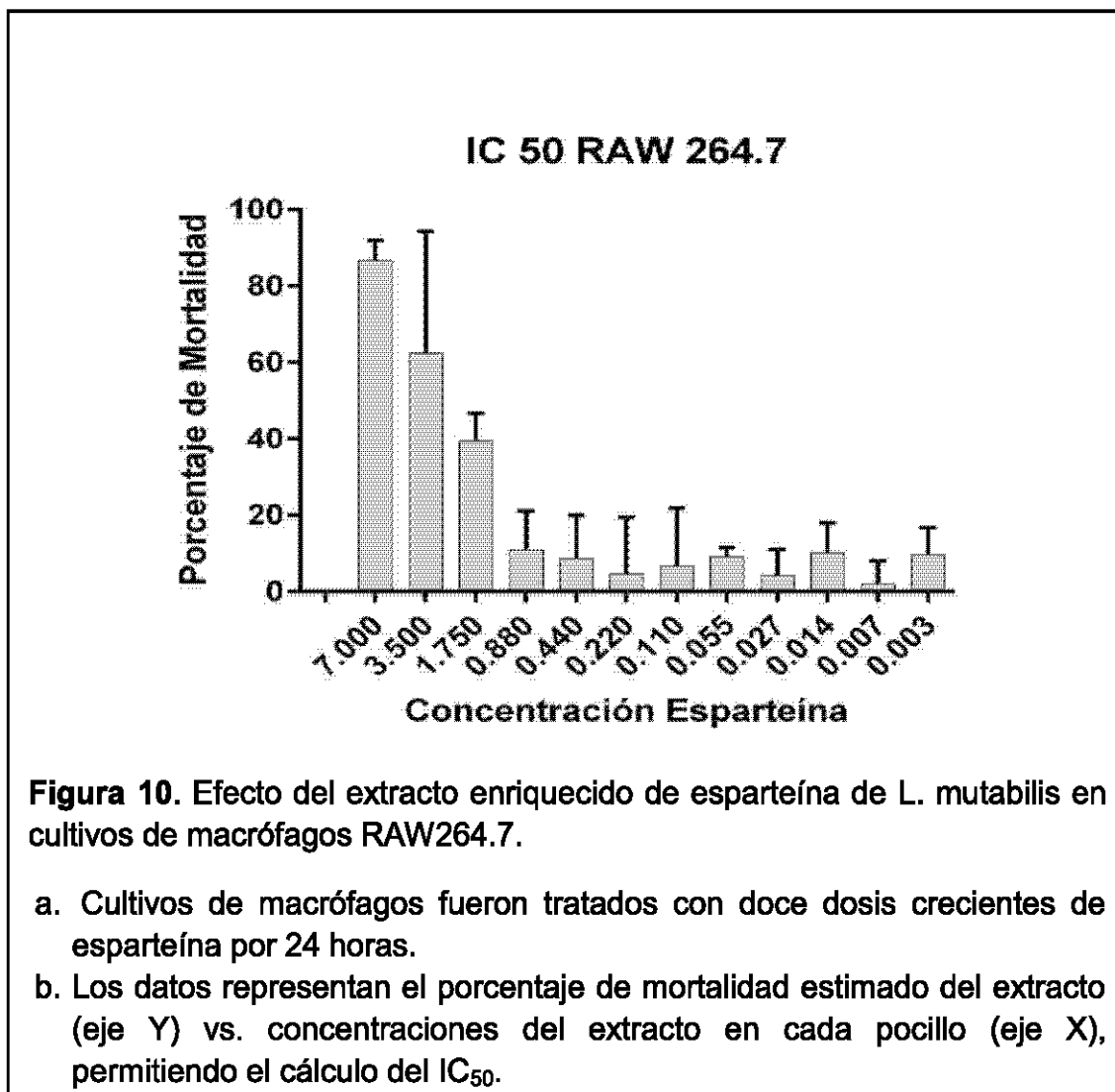
### 3.3 Efecto citotóxico del extracto enriquecido de esparteína en células murinas Raw264.7.

Los cultivos de macrófagos (RAW 264.7) fueron enfrentados a las distintas diluciones de la esparteína, con la finalidad de evaluar la toxicidad del alcaloide y determinar el IC<sub>50</sub> para las células blanco de la parasitosis. Los resultados se evaluaron a las 24 horas y el porcentaje de mortalidad se calculó utilizando la ecuación 2 descrita anteriormente. Los porcentajes de mortalidad obtenidos se describen a continuación en la tabla 8 y su representación gráfica en la figura

10. A partir de estos datos se calculó el IC<sub>50</sub> a través del programa estadístico GraphPadPrism 6.0 (versión gratuita), cuya concentración fue de 0.586 µg/ml.

**Tabla 8.** Porcentaje promedio de mortalidad evaluado a las 24 horas en cultivos de macrófagos (Raw 264.7)

<b>Concentraciones Esparteína</b>	<b>Porcentaje de Mortalidad</b>
<b>1.638 µg/ml</b>	87.644
<b>0.819 µg/ml</b>	70.426
<b>0.410 µg/ml</b>	33.292
<b>0.205 µg/ml</b>	12.586
<b>0.102 µg/ml</b>	10.522
<b>0.051 µg/ml</b>	8.103
<b>0.026 µg/ml</b>	10.267
<b>0.013 µg/ml</b>	9.321
<b>0.006 µg/ml</b>	6.77
<b>0.0032 µg/ml</b>	10.707
<b>0.0016 µg/ml</b>	9.419
<b>0.008 µg/ml</b>	10.851



### 3.4 Citotoxicidad del extracto enriquecido de esparteína evaluada cada 12 horas en cultivos de promastigotes, amastigotes axénicos, macrófagos y macrófagos infectados.

#### 3.4.1 Citotoxicidad en cultivos de promastigotes y amastigotes axénicos.

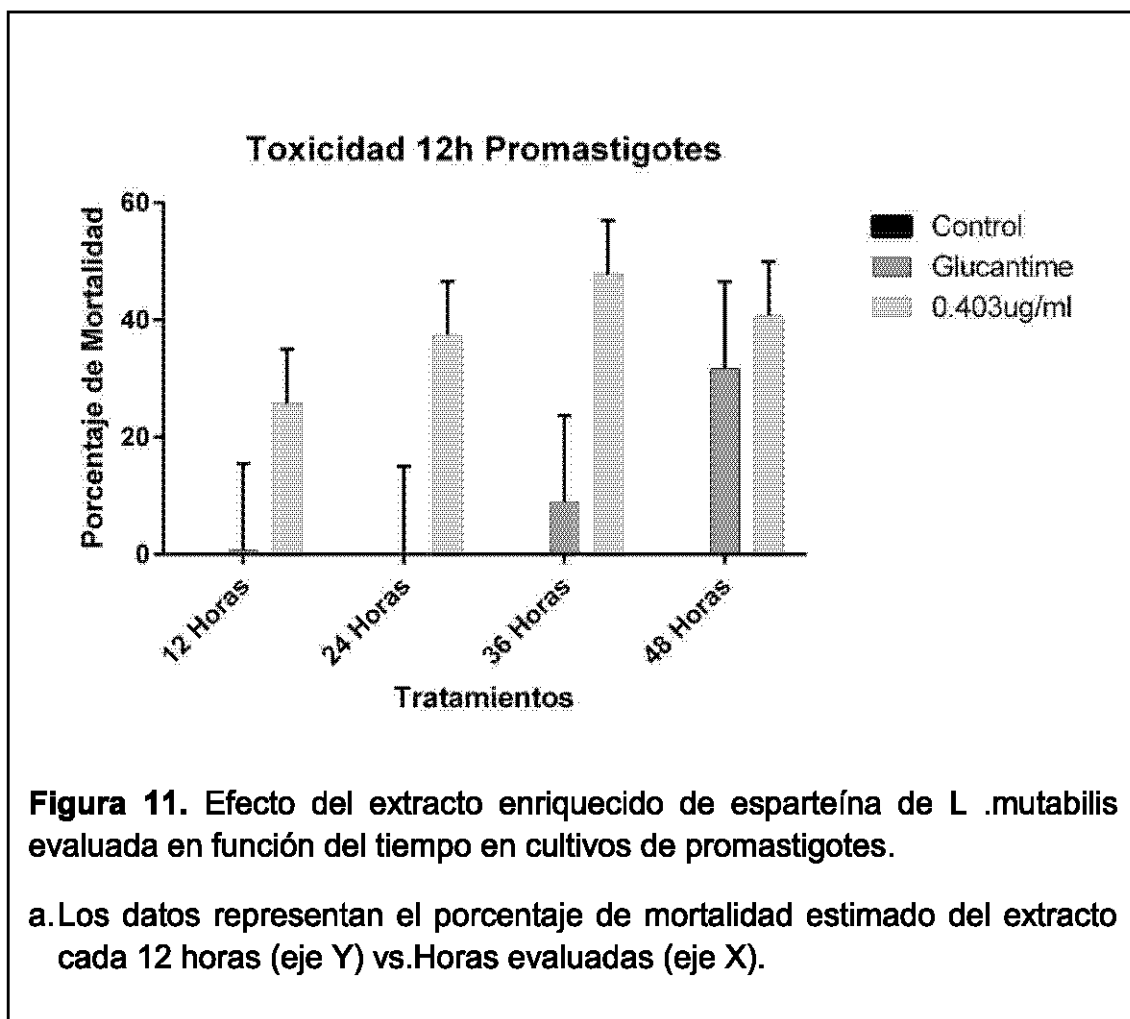
Conociendo el IC<sub>50</sub> para cada estadio del parásito, se evaluó el efecto tóxico cada 12 horas. En cultivos in vitro de promastigotes, el mejor efecto reportado es a las 36 horas con un porcentaje de mortalidad del 47.7%. El extracto empieza a presentar efecto citotóxico a las 12 horas donde su porcentaje de

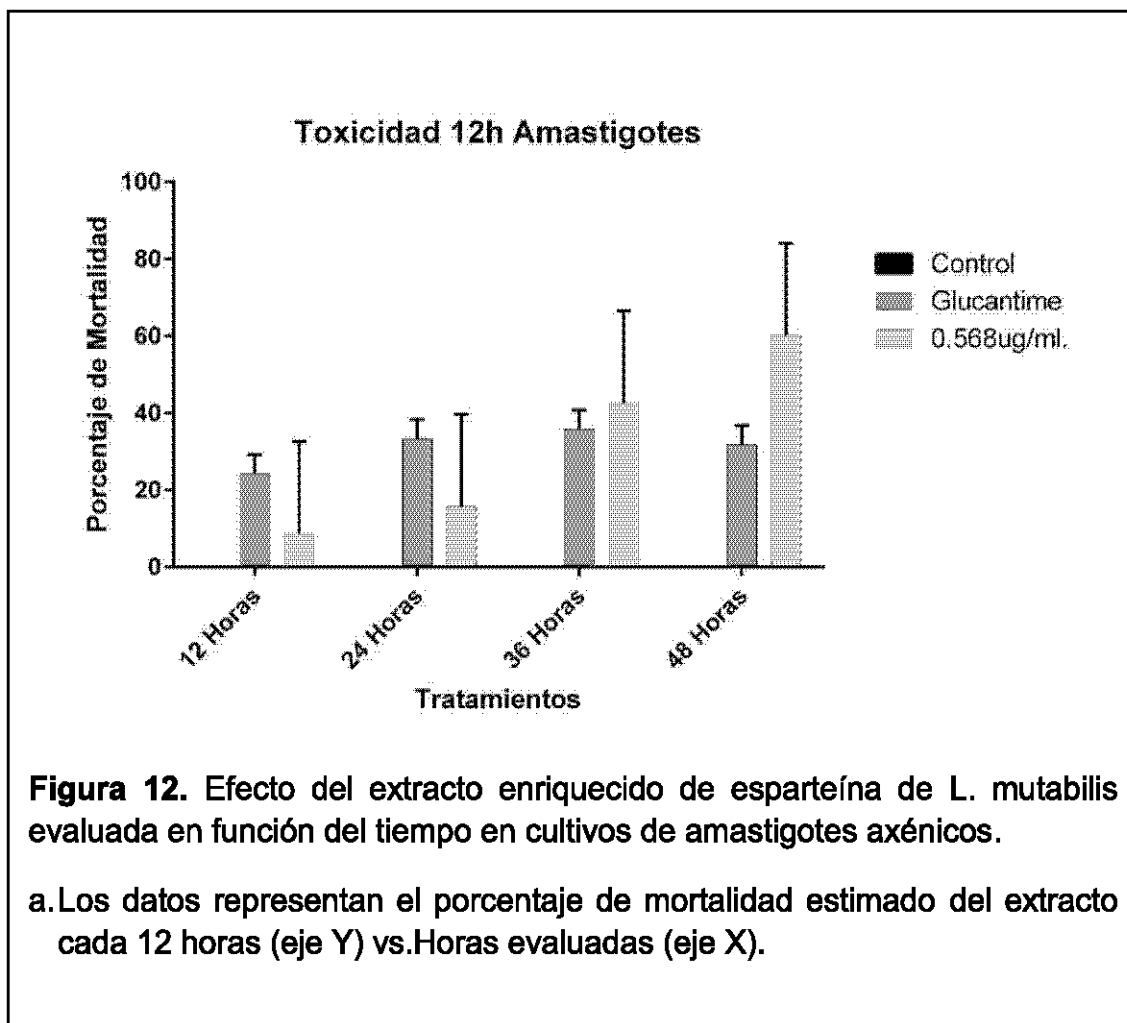
mortalidad es de 25.8%, siendo éste un valor elevado para las primeras horas de exposición. En cuanto al cultivo de amastigotes axénicos, el mejor efecto se presentó a las 48 horas con un porcentaje de mortalidad del 60.1%. Mientras que a las 12 horas de exposición al alcaloide el porcentaje de mortalidad corresponde a 8.6%. En cultivos de amastigotes axénicos no se ve un porcentaje de mortalidad elevado durante las primeras 24 horas de tratamiento, sin embargo, a partir de las 36 horas el porcentaje de mortalidad incrementa significativamente (véase tabla 9). En el caso de células murinas el mayor porcentaje de mortalidad (67.6%) se observó a las 48 horas, los porcentajes de mortalidad y tiempos de exposición fueron similares a los ensayos realizados en amastigotes axénicos (Figura 11 y 12).

**Tabla 9.** Porcentaje promedio de mortalidad evaluado cada 12 horas utilizando el valor del IC<sub>50</sub> calculado, sobre cultivos de promastigotes y amastigotes axénicos.

Promastigotes			Amastigotes axénicos			
Horas evaluadas	Concentración esparteína (µg/ml)	% Mortalidad	Concentración esparteína (µg/ml)	% Mortalidad		
12	0.403	25,83	0.568	8,68		
24	0.403	37,40	0.568	15,68		
36	0.403	47,79	0.568	42,59		
48	0.403	40,78	0.568	60,17		
Controles						
Horas evaluadas	C-	Agua	Glucantime	C-	Agua	Glucantime
12	0.00	9,78	0.00	0.00	3,93	24,19
24	0.00	19,08	0.00	0.00	9,07	33,30
36	0.00	26,25	8,970	0.00	19,44	35,74
48	0.00	30,07	31,75	0.00	21,12	47,01







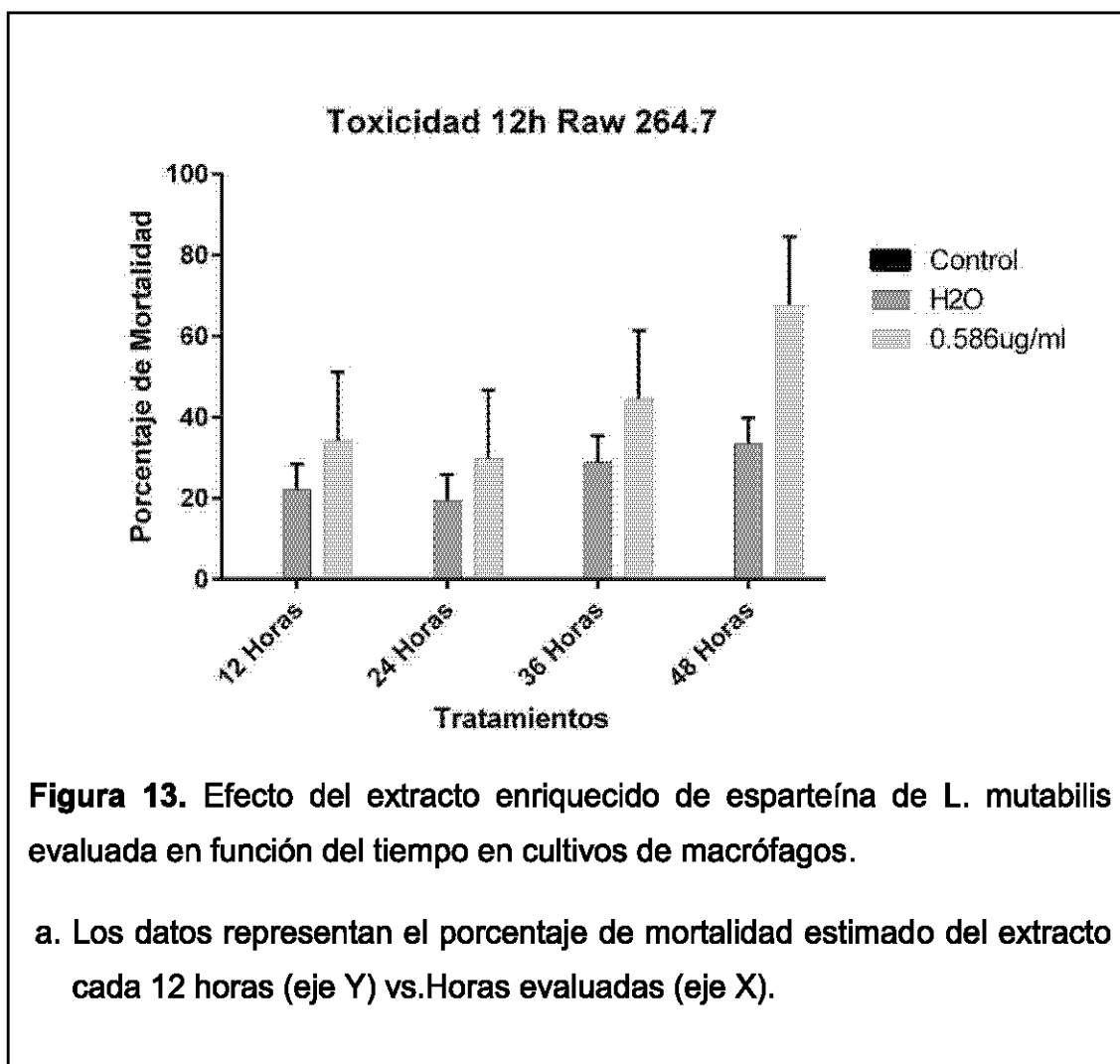
El  $IC_{50}$  calculado para el cultivo de promastigotes, es estadísticamente significativo con  $p=0.003$ , comparado con el control negativo. En este ensayo el único tratamiento que no resulta estadísticamente significativo es el tratamiento con Glucantime® ( $p=0.9332$ ). Por otro lado, en el ensayo de amastigotes axénicos, la dosis utilizada no es estadísticamente significativa ( $p=0.0764$ ), aunque si presenta mortalidad en el cultivo. Al contrario del ensayo con promastigotes, el Glucantime® resulta poseer una diferencia estadística significativa ( $p=0.0011$ ).

### 3.4.2 Citotoxicidad en cultivos de macrófagos RAW 264.7

Utilizando la concentración del IC<sub>50</sub> calculada para cultivos de macrófagos, se evaluó el efecto de esta concentración cada 12 horas. La esparteína presentó el mejor efecto citotóxico a las 48 horas a una concentración de 0.568 µg/ml con un porcentaje de mortalidad del 67.646%, mientras que el menor efecto del alcaloide se observó a las 24 horas con un porcentaje de mortalidad del 29.781% (Véase en la tabla 10 y figura 13).

**Tabla 10.** Porcentaje promedio de mortalidad en cultivos de macrófagos (Raw 264.7) evaluado cada 12 horas, utilizando la concentración del IC<sub>50</sub> calculado.

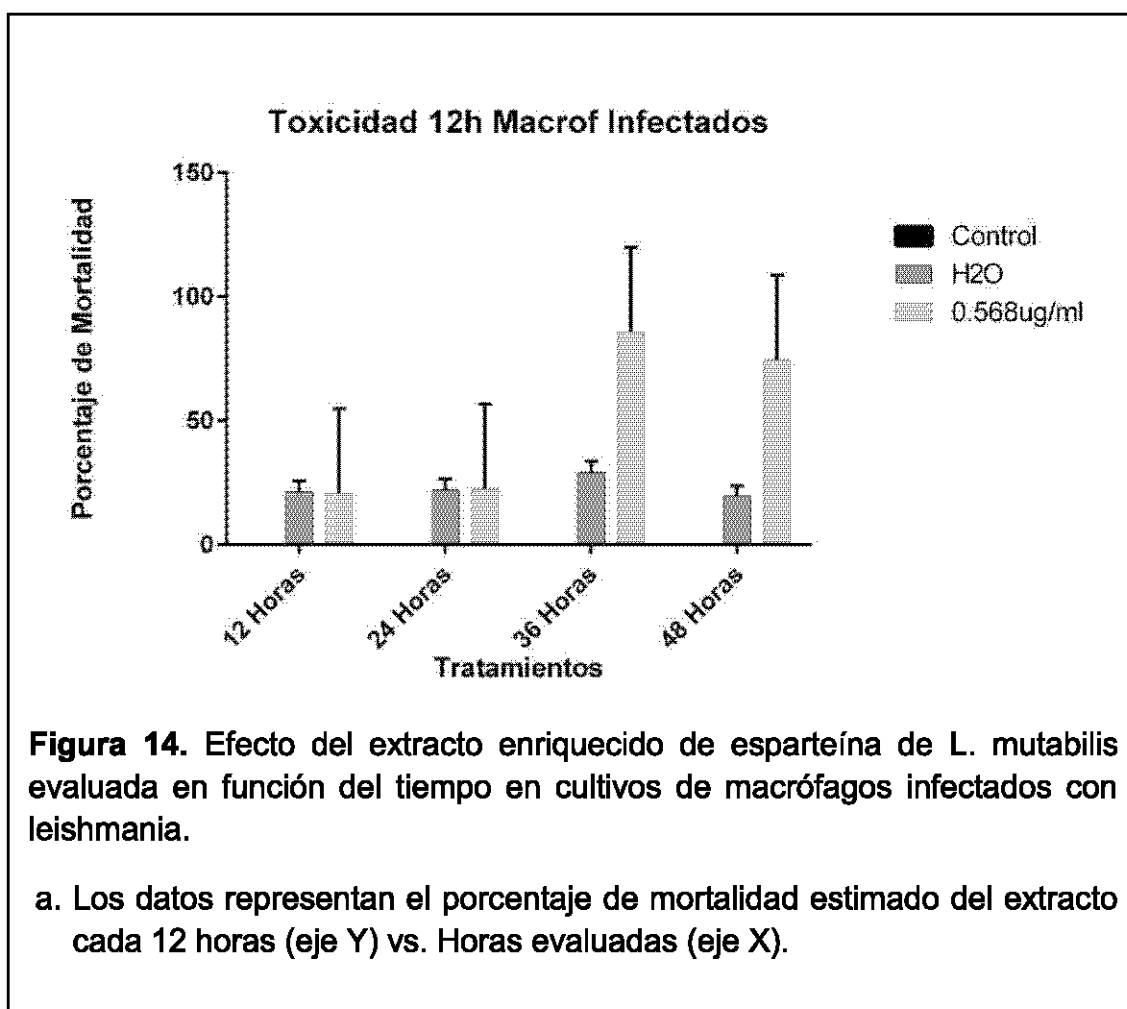
Hora evaluada	12	24	36	48
<b>Control negativo</b>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
<b>Agua</b>	22,092%	27,763%	29,036%	33,436%
<b>Esparteína 0,5863 µg/ml</b>	34,258%	29,781%	44,472%	67,646%



Tanto el tratamiento con el IC<sub>50</sub> calculado y el control negativo poseen valores estadísticamente significativos. El extracto enriquecido de esparteína a una concentración de 0.586 µg/ml resulta ser tóxica en cultivos de líneas celulares RAW 264.7 (p=0.0137).

### 3.4.3 Citotoxicidad en cultivos de macrófagos RAW 264.7 infectados con *L. mexicana*.

El mismo ensayo se realizó con macrófagos infectados, pero la concentración utilizada fue la correspondiente al  $IC_{50}$  para amastigotes axénicos  $0.568\mu\text{g/ml}$ . En este caso el mejor efecto se observó a las 36 horas, donde el porcentaje de mortalidad fue de 85.780 %, mientras que el menor efecto del alcaloide sobre macrófagos infectados se vio a las 12 horas con un porcentaje de mortalidad del 20.771 %. Los porcentajes de mortalidad se describen en la representación gráfica de los resultados en la figura 14.



**Figura 14.** Efecto del extracto enriquecido de esparteína de *L. mutabilis* evaluada en función del tiempo en cultivos de macrófagos infectados con leishmania.

a. Los datos representan el porcentaje de mortalidad estimado del extracto cada 12 horas (eje Y) vs. Horas evaluadas (eje X).

La dosis utilizada para el ensayo de toxicidad en macrófagos infectados fue la correspondiente al IC<sub>50</sub> de amastigotes. En éste ensayo no se observa una diferencia estadística significativa ( $p=0.0581$ ), a pesar que la dosis utilizada si exhibe mortalidad en los ensayos realizados cada 12 horas.

### 3.5 Efecto leishmanicida del extracto enriquecido de esparteína evaluada por Citometría de Flujo

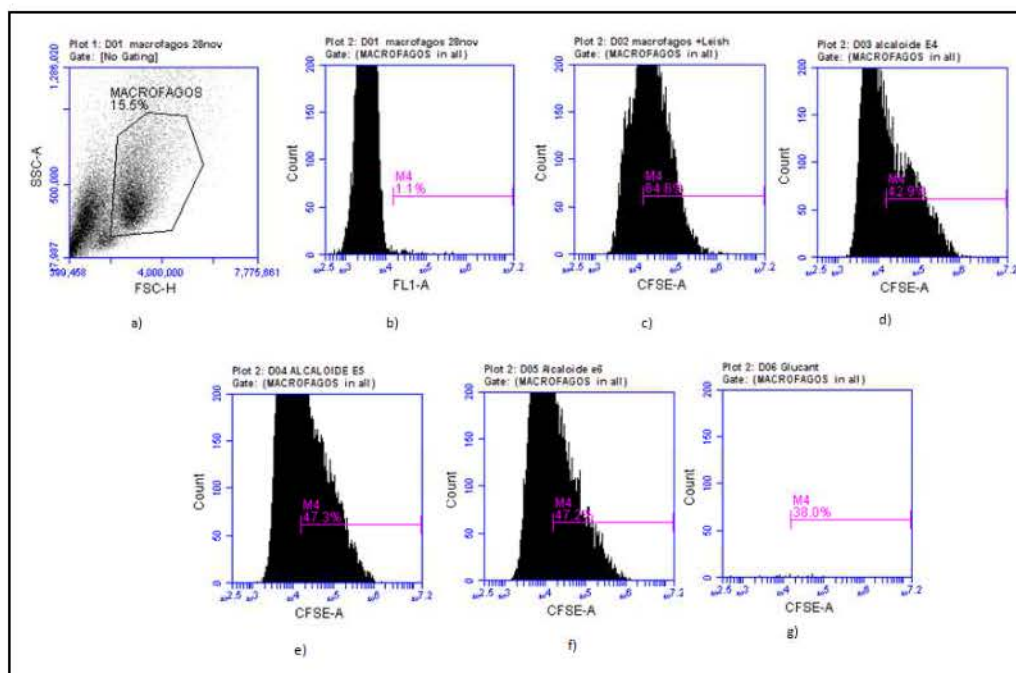
El efecto tóxico de la extracto fue evaluado determinando el porcentaje de parásitos intra-macrófagos utilizando Citometría de Flujo. Análisis en el cual se midió el porcentaje de fluorescencia emitido por los parásitos intracelulares enfrentados a las concentraciones de esparteína de 0.205µg/ml(IV),0.102µg/ml(V) y 0.051 µg/ml(VI). Donde la fluorescencia evaluada es directamente proporcional a la viabilidad de los parásitos teñidos (Tabla 11). El procedimiento de la tinción se describe en la sección de materiales y métodos,

**Tabla 11.** Porcentaje promedio de células viables y células muertas

	% Viabilidad	%Mortalidad
<b>Macrófagos +L.mex</b>	100	0
<b>Macrófagos + L.mex +H2O</b>	98.29	7.33
<b>Macrófagos + Glucantime</b>	60.87	41.166
<b>Macrofagos+L.mex+ IV</b>	73.15	26.846
<b>Macrofagos+L.mex+ V</b>	77.28	22.720
<b>Macrofagos+L.mex+ V</b>	69.97	30.334

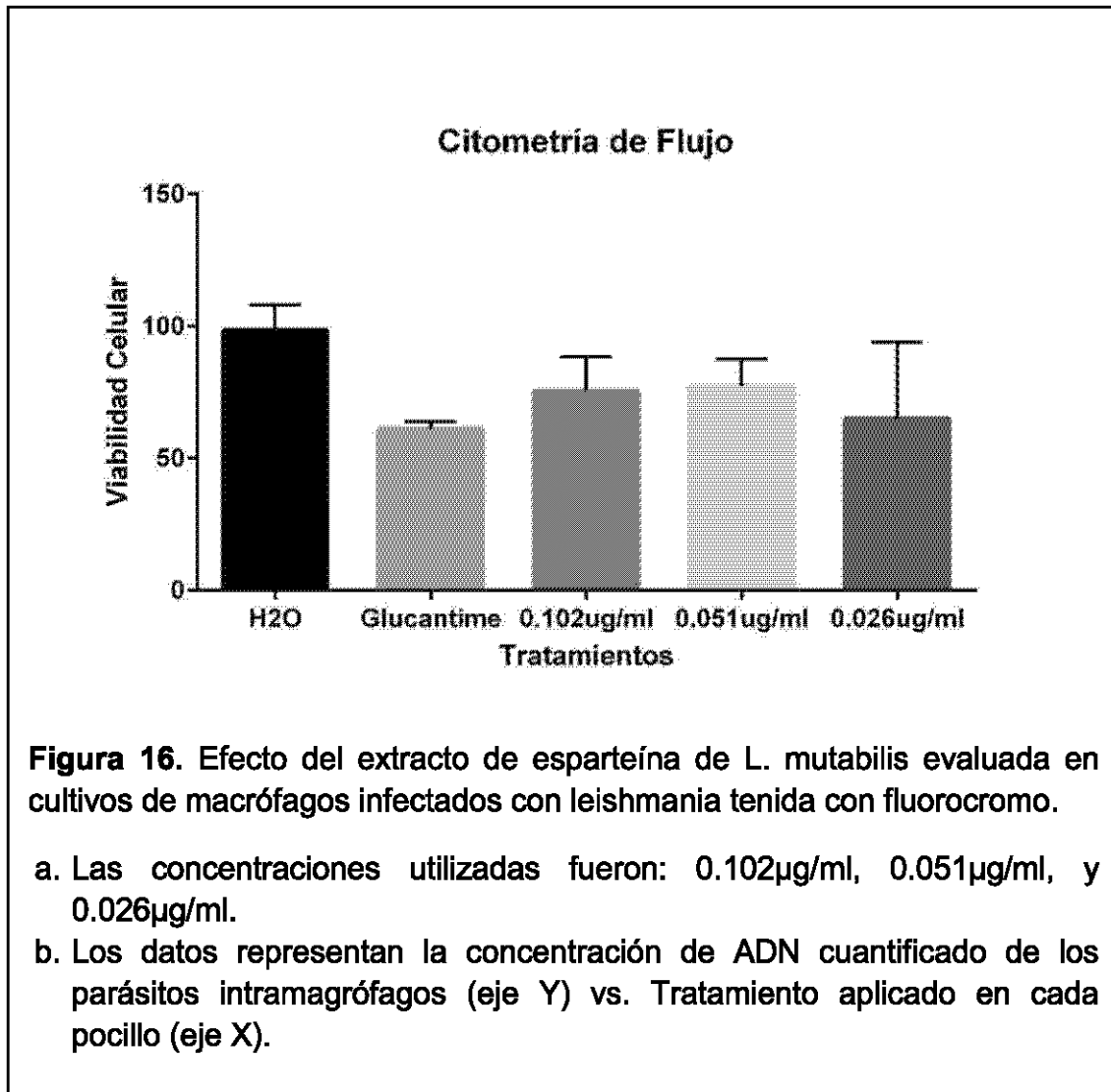
Se observa un efecto leishmanicida tanto del Glucantime® como del extracto para este análisis. La concentración más alta del extracto utilizada en este

experimento presenta menor fluorescencia comparada con la concentración más baja del mismo. Se observa una relación directamente proporcional en la que a mayor concentración del extracto enriquecido de esparteína utilizada, mayor porcentaje de mortalidad (figura 15 y 16).



**Figura 15.** Resultados obtenidos por citometría de flujo (Figura representativa de un ensayo).

- a. Porcentaje de fluorescencia correspondiente a M $\Phi$  sin infección (1.1%),
- b. Porcentaje de fluorescencia correspondiente a M $\Phi$  infectados sin tratamiento (64.64 %).
- c. M $\Phi$  infectados tratado con extracto de esparteína concentración 0.102 $\mu$ g/ml (42.89 %).
- d. M $\Phi$  infectados tratado con extracto de esparteína concentración 0.051 $\mu$ g/ml (47.25%).
- e. M $\Phi$  infectados tratado con extracto de esparteína concentración 0.026 $\mu$ g/ml (47.25%).
- f. M $\Phi$  infectados tratado con Glucantime.

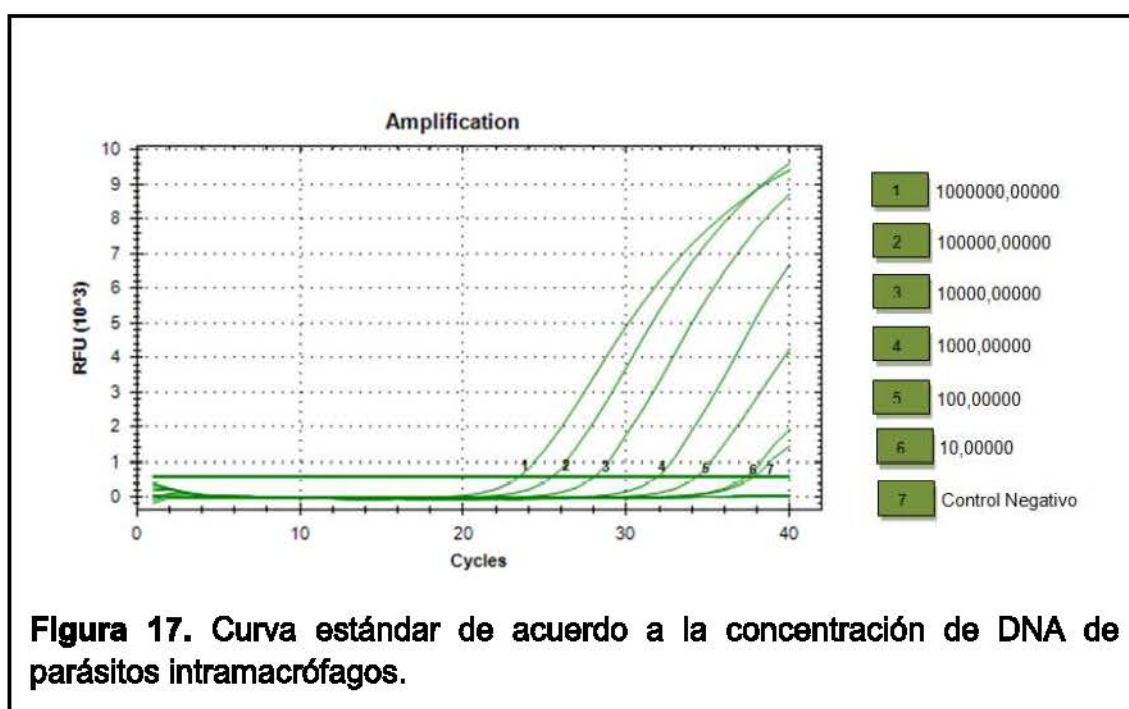


Las diluciones correspondientes a 1.024µg/ml y 0.512µg/ml son las concentraciones estadísticamente significativas para este ensayo con  $p=0.0097$  y  $p=0.0058$  respectivamente. Mientras que la dilución más baja para este ensayo no posee un efecto significativo en comparación con el control.



### 3.6 Efecto leishmanicida del extracto enriquecido de esparteína evaluado por PCR en Tiempo Real

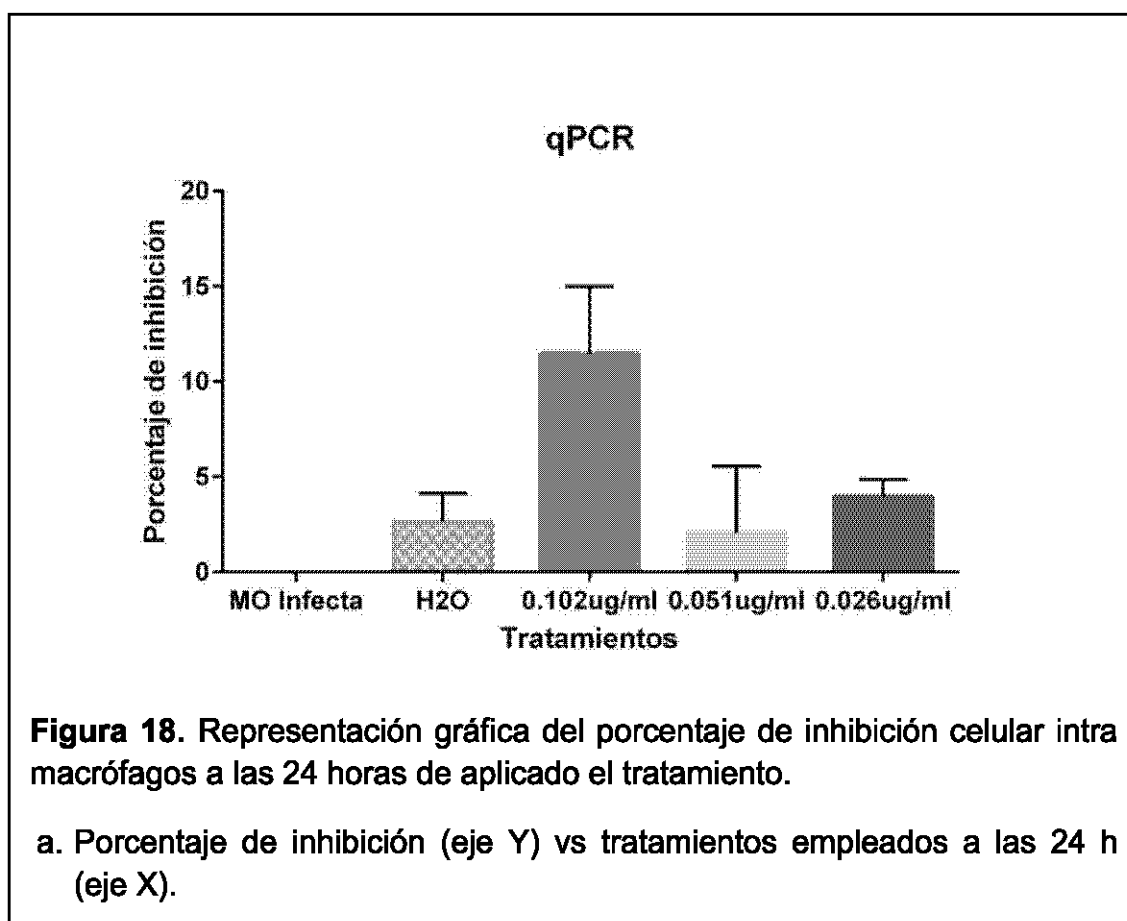
Con la finalidad de complementar los resultados obtenidos a través de Citometría de Flujo, se evaluó el efecto citotóxico del extracto en relación al número de parásitos intra-macrófagos utilizando PCR en tiempo real. Se partió de una estandarización en la que se cuantificó la cantidad de ADN de acuerdo al número estimado de parásitos, tal como se describe en la figura 17, y se comparó con el ADN extraído de los macrófagos infectados y enfrentados a los distintos tratamientos empleados.



$$\% \text{ de Inhibición} = \left( \frac{\left( \frac{c}{100} \right) - \left( \frac{M}{100} \right)}{\left( \frac{c}{100} \right)} \right) * 100 \quad (\text{Ecuación 4})$$

Fórmula adaptada de Santander S., 2010

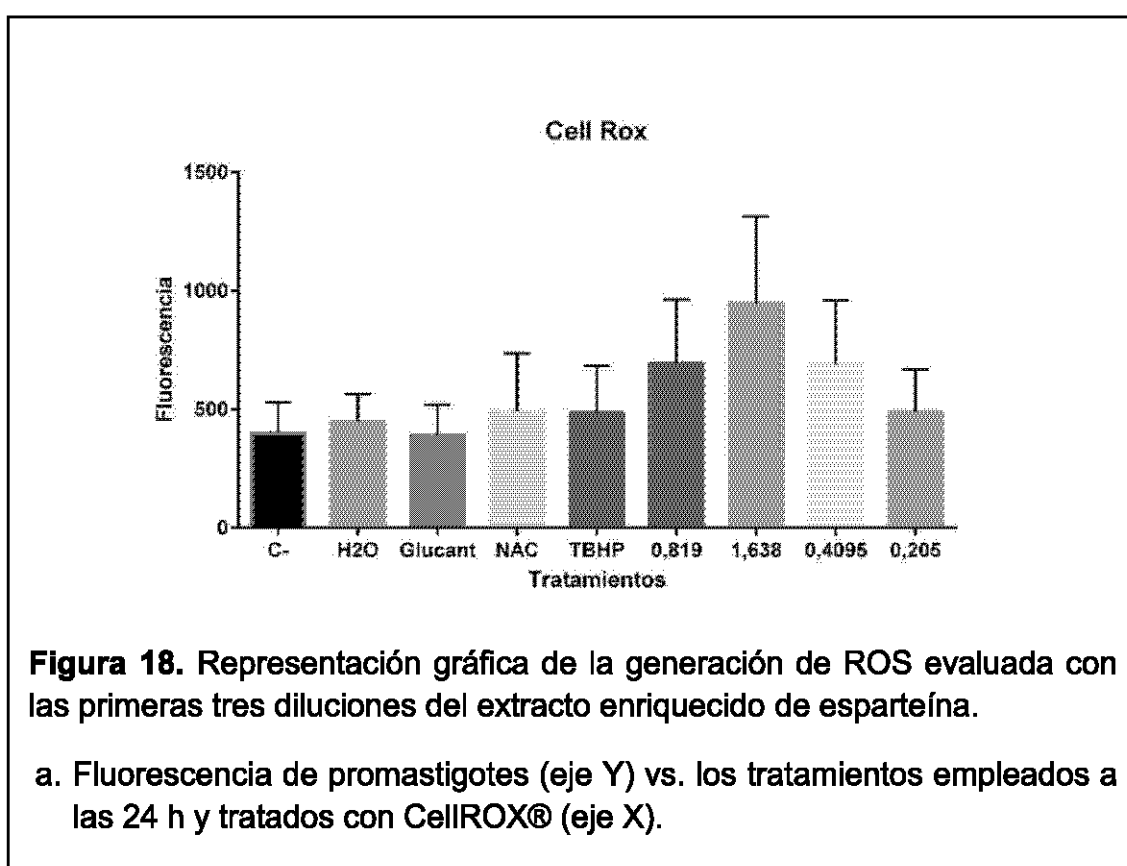
En este análisis se observa la acción del extracto respecto a las concentraciones evaluadas del mismo, donde la inhibición celular fue calculada a partir de la ecuación descrita anteriormente. La inhibición no es estadísticamente significativa con respecto al control ( $p=0.1385$  para la dilución más alta); sin embargo, se puede observar efecto de las distintas diluciones del extracto, es decir, la concentración de ADN disminuye conforme las dosis utilizadas para cada tratamiento también disminuyen (Figura 18).



### 3.7 Generación de especies reactivas de oxígeno evaluado con CellROX®

Los ensayos realizados para evaluar la posible ruta metabólica del alcaloide, fueron evaluados en la fase promastigote del parásito. Se emplearon las primeras tres diluciones del extracto enriquecido de esparteína. Como control

positivo se utilizó Hidroperóxido ter-butil (TBPH), el cual induce la generación de ROS, mientras que el antioxidante N-acetilcisteína(NAC) como control negativo. Por su parte, el extracto enriquecido de esparteína sí genera estrés oxidativo sobre cultivos de Leishmania, aunque en bajas proporciones. Los controles utilizados no poseen una diferencia significativa en la generación de ROS, mientras que las diluciones utilizadas poseen un valor de  $p=0.046$  (Figura 19).



## CAPÍTULO 4

### 4 DISCUSIÓN

La resistencia a antibióticos para tratar enfermedades de incidencia mundial como la leishmaniasis, se encuentra en continuo aumento y por lo tanto la esperanza de vida se ha visto limitada aun con las debidas precauciones, por lo que no se descarta la necesidad del desarrollo de nuevos medicamentos anti-infectivos. En la actualidad los estudios se ven enfocados en la utilización de moléculas naturales y síntesis de las mismas utilizando los productos conocidos con bioactividad (Cushnie T.P. et al., 2014).

En la primera fase de esta investigación (ensayo en artemia) se trabajó con el extracto líquido de todos los alcaloides de *L. mutabilis* (chocho). Si bien es cierto, este ensayo no influencia directamente en los ensayos posteriores, se lo realizó con la finalidad de conocer la toxicidad del mismo en modelos biológicos. El extracto utilizado fue fácilmente soluble en agua y el  $IC_{50}$  calculado fue de  $3.36 \times 10^{-4} \mu\text{g/ml}$ , comparados con el control negativo donde el porcentaje de mortalidad fue 0% en todos los ensayos realizados. Se han realizado estudios utilizando extractos metanólicos provenientes de veinte plantas distintas de la familia Fabaceae, en la que la planta con la mejor bioactividad reportada fue *Taverniera sparteae*, donde el  $IC_{50}$  de alcaloides evaluados en artemia salina corresponde a  $0.34 \pm 0.01 \mu\text{g/ml}$  (Khalighi-Sigaroodia F. et al., 2012, p. 296). El extracto de alcaloides del chocho reporta mejor actividad que la obtenida de otras plantas de la misma familia, indicándonos un grado elevado de toxicidad.

Conociendo la alta toxicidad de los alcaloides, se fraccionaron los mismos y se trabajó con el extracto enriquecido de esparteína para evaluar el efecto citotóxico en todas las fases del parásito. El extracto empleado se encuentra en forma líquida y es soluble en agua. Por otro lado, es importante resaltar que la

cepa utilizada de *Leishmania*, presentaba resistencia al medicamento comercial Glucantime®. El método utilizado para la determinación de toxicidad en la fase in vitro de promastigotes fue MTT, el cual ha sido valorado en distintas investigaciones donde se evalúa la actividad leishmanicida (Ghosh A.K., Rakshit M.M. y Ghosh D.K., 1983, p. 409; Haldar N., Basu S., Bhattacharya S., Pandey J.N. y Biswas M., 2012, p. 8190; Pal D., Bhattacharya S. et al., 2011, p. 98).

Existen varios reportes en los que se menciona el efecto tóxico de los alcaloides quinolizidínicos extraídos de distintas leguminosas contra distintos parásitos de la familia Trypanosomatidae (Mishra B.B. et al., 2009, pp. 81-90; Rosenkranz V. y Wink M., 2008, pp. 2462-2473 ). Se han realizado estudios con extractos de *Millettia richardiana* (Fabaceae), la cual presenta valores prometedores de IC<sub>50</sub> contra parásitos protozoarios comparados con antimoniales. La actividad leishmanicida de este extracto en cultivos de *L. donovani* fue de 11.8 µg/ml versus 1.4 µg/ml para pentamidina y 1.2 µg/ml para metilfosina, es decir, el extracto presenta menor efecto citotóxico que los medicamentos empleados (Rajemiarimiraho M. et al., 2014, p. 4205). Por otro lado, durante la presente investigación se analizaron doce concentraciones del extracto enriquecido de esparteína, donde se demostró que el extracto evaluado posee mejor actividad leishmanicida comparada con el efecto del Glucantime® que fue utilizado como control positivo de resistencia. El IC<sub>50</sub> calculado para promastigotes fue de 0.403 µg/ml, siendo este valor aún más bajo que el obtenido del extracto de *M. richardiana*, incluso resulta tener menor IC<sub>50</sub> comparado con los medicamentos evaluados.

En cultivos de amastigotes axénicos el Glucantime® presentó un porcentaje de mortalidad del 35.793%, comparado con la dilución más alta de los alcaloides cuyo porcentaje de mortalidad fue 81.318% (tabla 7). En estudios realizados con aceites obtenidos de *Copaifera* sp. (Fabaceae) el valor del IC<sub>50</sub> fue de 15 µg/ml sobre cultivos de *L. amazonensis*, mientras que para el extracto enriquecido de esparteína el valor del IC<sub>50</sub> calculado fue de 0.568 µg/ml en *L. mexicana*.

El efecto citotóxico del extracto enriquecido de extracto sobre cultivos de promastigotes demostró una eficiencia superior comparada con el efecto causado por el medicamento utilizado como control positivo. Sin embargo, este fenómeno no se observó en los cultivos de amastigotes axénicos, en los cuales el Glucantime® presenta un porcentaje de mortalidad similar a los ensayos realizados con la concentración más baja del alcaloide (0.008µg/ml) (tabla 7). Esta diferenciación ha reportado en distintas investigaciones, determinando que una de las causas principales de este evento se debe a que las formulaciones leishmanicidas se enfocan en interferir el metabolismo intracelular, generando un efecto tóxico en amastigotes (Arévalo Y. et al., 2009, pp. 131-141).

Los metabolitos secundarios provenientes de distintos extractos de plantas, podrían exhibir variantes en el efecto leishmanicida de las dos fases de parásito, debido a las diferencias morfológicas y metabólicas que presentan, ya que la fuente energética para promastigotes se fundamenta en azúcares y aminoácidos, mientras que para los amastigotes su fuente energética son los ácidos grasos (Campos J., 2008; Castañeda M., 2014). Por otro lado, las distintas plantas utilizadas como modelos de comparación presentan alcaloides quinolizidínicos en sus extractos, aunque las proporciones de los mismos varían dependiendo de especie (Dos Santos A.O., Ueda-Nakamura T., Dias Filho B.P., da Veiga Junior V.F. y Nakamura C.V., 2012).

Los macrófagos participan activamente en la respuesta inflamatoria a través de la secreción de moléculas mediadoras. Por su parte, los macrófagos murinos pertenecientes a la línea celular RAW 264.7 son ampliamente utilizados para establecer modelos inflamatorios in vitro (Szliszka E., Skaba D., Czuba Z.P. y Krol W., 2011, pp. 3701-3712). El IC<sub>50</sub> del extracto enriquecido de esparteína calculado para cultivos in vitro de macrófagos corresponde a 0.568µg/ml. Si se comparan los dos resultados obtenidos, tanto el IC<sub>50</sub> de amastigotes como el de macrófagos, no presentan una diferencia significativa. Sin embargo los macrófagos muestran mayor resistencia al alcaloide utilizado. Estudios realizados con extractos de *Amorpha fruticosa* (Fabaceae) sobre la misma línea celular de macrófagos, presentan un IC<sub>50</sub> de 28.5µM (Cho J.Y. et al., 2000, p.

130). En éste análisis, el extracto exhibe una actividad comparable a la obtenida del extracto de *A. fruticosa*.

Los ensayos con extractos enriquecidos con esparteína presentan una toxicidad alta comparada con extractos de plantas de la familia Fabaceae evaluados en las dos fases del parásito y en las células blanco del mismo. En todos los ensayos realizados, se observó que el alcaloide requiere de menor concentración para alcanzar su  $IC_{50}$ , siendo el extracto proveniente de *L. mutabilis* altamente tóxico tanto para parásitos protozoarios como para macrófagos.

Se evaluó la toxicidad en función del tiempo sobre cultivos de macrófagos infectados. El proceso de infección es mediado por proteínas con un mecanismo ligando-receptor, de tal manera que el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios capaces de inhibir estas proteína, ocasionaría una pérdida de la capacidad infectiva del parásito (Castañeda M., 2014; Dajem S.M.B., 2010, pp. 67-71; Fidalgo L.M., 2010). La dosis aplicada al ensayo correspondió al  $IC_{50}$  de amastigotes ( $0.568\mu\text{g}/\text{mL}$ ), donde el mayor porcentaje de mortalidad se observó a las 36 horas. En este ensayo no se puede determinar específicamente cuales células se vieron afectadas por la exposición al alcaloide, aunque el porcentaje de mortalidad calculado hace referencia a un valor total de macrófagos y parásitos, tratando de mantener un número de macrófagos constante entre 3 a 5 millones y un rango de infección 1:10. Por otra parte, los macrófagos infectados, utilizados como control se mantuvieron viables durante los distintos tiempos de evaluación.

En estudios anteriores se ha demostrado el efecto de leguminosas como un potente leishmanicida, aunque el mecanismo de acción es aún desconocido. Con la finalidad de aclarar la acción celular del alcaloide contra *L. mexicana*, se investigó una posible ruta de acción del extracto enriquecido de esparteína, la cual induce a la muerte celular y se observó que el extracto a las distintas diluciones induce a la muerte en *Leishmania*.

En el presente estudio se encontró inhibición de crecimiento en las dos fases de *L. mexicana* ocasionado por la exposición al extracto enriquecido de esparteína de manera dosis-dependiente, en concordancia con alcaloides de la misma familia (Mishra B.B. et al., 2009, pp. 81-90; Rosenkranz V. y Wink M., 2008, pp. 2462-2473). Un evento establecido en la mayoría de las células que entran en fase de apoptosis es la generación de especies reactivas al oxígeno (ROS), la cual induce a la célula a la muerte (Chipuk J.E. y Green D.R., 2005, pp. 268-275). Aún no se ha establecido si el extracto enriquecido posee un efecto anti-oxidativo o pro-oxidativo. Durante el ensayo se utilizaron las tres diluciones más altas del alcaloide (I, II, III), donde la dilución más concentrada presentó un ligero desplazamiento hacia la derecha, tal como se describe en el capítulo anterior, indicando un posible estrés oxidativo. Se encontró diferencia representativa entre el extracto y el control positivo. Según los resultados encontrados, la reacción de generar ROS depende de la concentración del tratamiento (Horta M.F. et al., 2012). Por lo que se podrían evaluar concentraciones más altas del extracto enriquecido del alcaloide y durante más tiempo de exposición. La posible explicación para el incremento de la actividad oxidativa a mayor concentración del alcaloide, podría explicarse debido a que a mayor concentración del alcaloide, la tasa de generación de ROS exceda la tasa de actividad evaluada. Y así la concentración utilizada en la investigación favorecería la generación de ROS en el parásito (Cui L., Miao J. y Cui L., 2007, pp. 488-494; Horta M.F. et al., 2012).

La actividad oxidativa de medicamentos naturales parece ser mediada por la generación de radicales fenoxilo a través del sistema peroxidasa, el cual co-oxida el NADH, acompañado de la captación de  $O_2$  para así formar ROS (Horta M.F. et al., 2012). En la presente investigación se reporta una ligera actividad oxidativa inducida por el extracto enriquecido de esparteína, aunque se comprobó que el extracto resulta ser tóxico para cultivos de *L. mexicana*. No se realizaron ensayos para determinar si el alcaloide presentaba una actividad tiempo-dependiente para la generación de ROS.



No se han realizado estudios donde se demuestre el mecanismo de acción o toxicidad de extracto enriquecido como tal en *L. mexicana*. Por ello, es indispensable evaluar el método por el cual el extracto mata al parásito, permitiendo así el desarrollo de fármacos poco tóxicos para el ser humano y altamente efectivos.

## CAPÍTULO 5

### 5.1 CONCLUSIONES

- El extracto enriquecido de esparteína posee actividad leishmanicida sobre cultivos de promastigotes y amastigotesaxénicos de *L. mexicana*.
- El IC<sub>50</sub> para promastigotes es 0.403 µg/ml, mientras que para amastigotes es 0.568µg/ml.
- El IC<sub>50</sub> para células murinas RAW264.7 es de 0.586 µg/ml.
- El cultivo de amastigotes requirió de mayor dosis para alcanzar su IC<sub>50</sub> y una dosis similar a los macrófagos.
- El extracto enriquecido de esparteína mostró mejor actividad que la del Glucantime®, aunque su toxicidad fue menor a la del control positivo.
- El mejor efecto tóxico en cultivos de promastigotes utilizando el IC<sub>50</sub> fue a las 36 horas, mientras que en amastigotesaxénicos el mejor efecto citotóxico se observó a las 48 horas.
- Las distintas concentraciones del extracto enriquecido de esparteína disminuyen la carga parasitaria intra-macrófagos.
- El extracto enriquecido de esparteína genera producción de ROS en mínimas proporciones sobre cultivos de promastigotes de *L. mexicana*, ocasionando muerte celular.

## 5.2 RECOMENDACIONES

- Al utilizar alternativas naturales como tratamientos leishmanicidas, es indispensable evaluar la actividad citotóxica en las dos fases del parásito y en células macrófagas.
- Es necesaria la evaluación del tratamiento en función del tiempo, para determinar el mejor efecto obtenido.
- Se deben realizar estudios en modelos in vivo, debido a la alta toxicidad del alcaloide y a los efectos secundarios que podría ocasionar.
- Un factor importante durante la investigación es la cepa utilizada para todos los ensayos, ya que esta presentaba resistencia al medicamento comercial Glucantime®. Los resultados pueden cambiar dependiendo las cepas de leishmania.
- Estudiar el sinergismo/antagonismo que podrían tener todos los alcaloides extraídos de *L.mutabilis*.
- Continuar con estudios en modelos in vitro con la finalidad de determinar la ruta metabólica de la esparteína en el parásito.
- Según la experiencia obtenida por el desarrollo de la investigación, se recomienda trabajar con concentraciones de parásitos y células constantes.

## REFERENCIAS

- Abbas A.K., Lichtman A.H.H. y Pillai S. (2008). *Cellular and Molecular Immunology* (6th ed.): Saunders: Elsevier Imprint.
- Alexander J. y Bryson K. (2005). T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. *Immunol Lett*, 99(1), 17-23. doi: 10.1016/j.imlet.2005.01.009
- Alvar J., D I.n., Bern C., Herrero M., Desjeux P., Cano J. (2012). Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ON*, 7(5).
- Álvarez R.S. (2002). Toxicidad y Acumulación de Cadmio en Poblaciones de Diferentes Especies de Artemia. Universidad de Valencia, Burjassot, Valencia.
- Arévalo Y., Robledo S., Muñoz D., Granados-Falla D., Cuca L. y Delgado G. (2009). Evaluación in vitro de la actividad de aceites esenciales de plantas colombianas sobre *Leishmania braziliensis*. *Rev.Colomb.Cienc. Quím.Farm.*, 38(2), 131–141.
- Awasthi A., Mathur R.K. y Saha, B. (2004). Immune Response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res* 119, 238-258.
- Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y.J. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 18, 767-811. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.767
- Bhattacharya S.K., Sinha P.K., Sundar S., Thakur C.P., Jha T.K. y Pandey K. (2007). Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, 196(4), 591-598. doi: 10.1086/519690
- Boschin G., Annicchiarico P., Resta D., D'Agostina A. y Arnold, A. (2008). Quinolizidine Alkaloids in Seeds of Lupin Genotypes of Different Origins. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 3657–3663.
- Brito S., Crescente O., Fernández A., Coronado A. y Rodríguez N. (2006). Eficacia de un ácido kaurénico extraído de la planta venezolana *Wedelia trilobata* (Asterácea) contra *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Biomédica*, ISSN, 26(Supl. 1), 180-187.
- Bryceson A. (2001). A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. *Trop Med Int Health*, 6(11), 928-934.

- Calvopiña M., Armijos R. y Hashiguchi Y. (2004). Epidemiology of Leishmaniasis in Ecuador: Current Status of Knowledge -A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99 (7), 663-672.
- Calvopiña M., Llor R., Lara F., Zambrano P. y Hashiguchi Y. (2012). Prevalencia y formas clínicas de las Leishmaniasis en el noroccidente de la Provincia de Pichincha - Ecuador. *Rev Fac Cien Med*, 37, 31-38.
- Campos J. (2008). Caracterización de las Proteínas LABC1 y LABC5 de Leishmania Implicación en el tráfico intracelular de hemo y en la infección de macrófagos. Universidad de Granada, Granada-España.
- Capusiri E.S., Pinell G.R., Huallpara J.C.T. y Turba A.G. (2008). Método Colorimétrico - XTT: Como Evaluación de Alto rendimiento de Sustancias con Actividad Leishmanicida. *Colorimetric method - XTT : as a tool for high performance evaluation of substances with leishmanicidal activity BIOFARBO*, 16, 21-27.
- Castañeda M. (2014). Evaluación de la Actividad Antiparasitaria de Extractos Etanólicos de Cinco Plantas Ecuatorianas Frente a Leishmania mexicana Caracterizada de Acuerdo al Perfil de Resistencia en Base a los Genes MRP, MDR1, ODC, TDR, GCS, LABC1 Y LABC5. Universidad de las Fuerzas Armadas.
- Castro C. (2006). Determination of the Cytotoxic Effects of Extracts, Fractions, or Substances, by Means of MTT Teste. Faculty of Medicine, Fundación Universitaria San Martín, Bogotá, Colombia, 7-10.
- Collin S., Davidson R., Ritmeijer K., Keus K., Melaku Y., Kipnetich S. (2004). Conflict and kala-azar: determinants of adverse outcomes of kala-azar among patients in southern Sudan. *Clin Infect Dis*, 38(5), 612-619. doi: 10.1086/381203
- Croft S.L., Sundar S. y Fairlamb A.H. (2006). Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev*, 19(1), 111-126. doi: 10.1128/cmr.19.1.111-126.2006
- Cui L., Miao J. y Cui L. (2007). Cytotoxic effect of curcumin on malaria parasite Plasmodium falciparum: inhibition of histone acetylation and generation

- of reactive oxygen species. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(2), 488-494. doi: 10.1128/aac.01238-06
- Cushnie T.P., Cushnie B. y Lamb, A.J. (2014). Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *Int J Antimicrob Agents*. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.06.001
- Chipuk J.E. y Green D.R. (2005). Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(3), 268-275. doi: 10.1038/nrm1573
- Cho J.Y., Kim P.S., Park J., Yoo E.S., Baik K.U., Kim Y.K. (2000). Inhibitor of tumor necrosis factor-alpha production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells from *Amorpha fruticosa*. *J Ethnopharmacol*, 70(2), 127-133.
- Dajem S.M.B. (2010). In vitro evaluation of the efficacy of deferoxamine against *Leishmania major* life cycle stages. *Journal of King Saud University - Science*, 22(2), 67-71.
- David C.V. y Craft N. (2009). Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Dermatologic Therapy*, 22, 491-450.
- Dos Santos, A.O., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., da Veiga Junior, V.F. y Nakamura, C.V. (2012). Copaiba Oil: An Alternative to Development of New Drugs against Leishmaniasis. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 898419. doi: 10.1155/2012/898419
- Farrar J., Hotez P.J., Junghanss T., Kang, G. Laloo, D. y White, N.J. (2009). *Manson's Tropical Diseases*. Saunders Ed. 23
- Fattorusso E. y Tagliatela-Scafati O. (2008). *Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis and Biology* (W. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Ed.).
- Fidalgo L.M. (2010). Potencial terapéutico del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* y algunos de sus componentes frente a *Leishmania*., Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kour", la Habana - Cuba.
- Gessner A., Mohrs K. y Mohrs M. (2005). Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during

- lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production. *J Immunol*, 174(2), 1063-1072.
- Ghosh A.K., Rakshit M.M. y Ghosh D.K. (1983). Effect of berberine chloride on *Leishmania donovani*. *Indian J Med Res*, 78, 407-416.
- Gidwani K., Picado A., Ostyn B., Singh S.P., Kumar R. y Khanal B. (2011). Persistence of *Leishmania donovani* antibodies in past visceral leishmaniasis cases in India. *Clin Vaccine Immunol*, 18(2), 346-348. doi: 10.1128/cvi.00473-10
- Gossage S.M., Rogers M.E. y Bates P.A. (2003). Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International Journal for Parasitology*, 33(10), 1027-1034. doi: 10.1016/s0020-7519(03)00142-5
- Government A. (2013). *The Biology of Lupinus L. (lupin or lupine)*.
- Güemes-Vera N., Peña-Bautista R.J., Jiménez-Martínez C., Dávila-Ortiz G. y Calderón-Domínguez, G. (2008). Effective detoxification and decoloration of *Lupinus mutabilis* seed derivatives, and effect of these derivatives on bread quality and acceptance. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(7), 1135-1143. doi: 10.1002/jsfa.3152
- Guerin P.J., Olliaro P., Sundar S., Boelaert M., Croft S.L., Desjeux P. (2002). Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *The Lancet Infectious Diseases*, 2(8), 494-501. doi: 10.1016/s1473-3099(02)00347-x
- Haldar N., Basu S., Bhattacharya S., Pandey J.N. y Biswas M. (2012). Antileishmaniasis Activity of *Mangifera indica* Leaf extracts on the in vitro Growth of *Leishmania donovani* Promastigotes. *Elixir Pharmacy*, 46, 8189-8191.
- Hall B.F. y Joiner K.A. (1991). Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defences. *Immunol Today*, 12(3), A22-27. doi: 10.1016/s0167-5699(05)80007-6.
- Hernández M.Á.M. (2002). *Epidemiología Molecular de la Coinfección por Leishmania-VIH.*(Doctor), Universidad Complutense de Madrid.

- Hesse M. (2002). Alkaloids. Nature's Curse or Blessing? . *Angewandte Chemie International Edition*, 42(40), 4852-4854. doi: 10.1002/anie.200385928
- Horta M.F., Mendes B.P., Roma E.H., Noronha F.S., Macedo J.P., Oliveira L.S. (2012). Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol Res*, 2012, 203818. doi: 10.1155/2012/203818
- Jacobsen S.-E. y Mujica A. (2008). Geographical Distribution of the Andean Lupin. *Lupin*. 155, 1-8.
- Kato H., Gomez E.A., Caceres, A.G., Uezato H., Mimori T. y Hashiguchi Y. (2010). Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. *Int J Environ Res Public Health*, 7(3), 814-826.
- Kawano T., Cui J., Koezuka Y., Toura I., Kaneko Y. y Motoki K. (1997). CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science*, 278(5343), 1626-1629.
- Khalighi-Sigaroodia F., Ahvazib M., Hadjiakhoondic A., Taghizadeha M., Yazdania D., Khalighi-Sigaroodid S. (2012). Cytotoxicity and Antioxidant Activity of 23 Planta Species of Leguminosae Family. *ServicesIranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11 (1), 295-302.
- Kim S., Iizuka K., Aguila H.L., Weissman I.L. y Yokoyama W.M. (2000). In vivo natural killer cell activities revealed by natural killer cell-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(6), 2731-2736. doi: 10.1073/pnas.050588297.
- Koper S., Wink M. y H.A, R. (1998). Differential Effects of Alkaloids on Sodium Currents of Isolates Single Skeletal Muscle Fibers. *FEBS* 20895, 436, 252-255.
- Kordan B., Gabryś B., Dancewicz K., Lahuta L.B., Piotrowicz-Cieślak A. y Rowińska, E. (2008). European yellow lupine, *Lupinus luteus*, and narrow-leaf lupine, *Lupinus angustifolius*, as hosts for the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 128(1), 139-146. doi: 10.1111/j.1570-7458.2008.00702



- Kumar H., Kawai T. y Akira S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol*, 30(1), 16-34. doi: 10.3109/08830185.2010.529976.
- Laboratory M. (2008). *Protocols for Handling and Working with Leishmania Species*.
- Lieberman J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol*, 3(5), 361-370. doi: 10.1038/nri1083
- Lightburn E., Morand J.J., Meynard J.B., Kraemer P., Chaudier B., Pages F. (2003). [Management of American cutaneous leishmaniasis. Outcome apropos of 326 cases treated with high-dose pentamidine isethionate]. *Med Trop (Mars)*, 63(1), 35-44.
- Lopez M., Inga R., Cangalaya M., Echevarria J., Llanos-Cuentas A., Orrego C. (1993). Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: a simplified procedure for field work. *Am J Trop Med Hyg*, 49(3), 348-356.
- Ministerio de Salud Pública. (2014). *Gaceta Epidemiológica Semanal. Semana Epidemiológica N 30*.
- Mishra B.B., Kale R.R., Singh R.K. y Tiwari V.K. (2009). Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia*, 80(2), 81-90.
- Mishra B.B., Kishore N., Singh R.K. y Tiwari V.K. (2013). *Scope of Alkaloids in Antileishmanial Drug Discovery and Development Natural Products* (pp. 1263-1299): Springer Berlin Heidelberg.
- Moore E., O'Flaherty D., Heuvelmans H., Seaman J., Veeken H., de Wit S. (2001). Comparison of generic and proprietary sodium stibogluconate for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *Bull World Health Organ*, 79(5), 388-393.
- Myler P.J. y Fasel N. (2008). *Leishmania: After the Genome*: Caister Academic.
- Naganowska B., Wolko B., Sliwinska E. y Kaczmarek, Z. (2003). Nuclear DNA content variation and species relationships in the genus *Lupinus* (Fabaceae). *Ann Bot*, 92(3), 349-355. doi: 10.1093/aob/mcg145.

- Nicolas L., Prina E., Lang T. y Milon G. (2002). Real-Time PCR for Detection and Quantitation of Leishmania in Mouse Tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(5), 1666-1669.
- Oliver A.M., Martin F., Gartland G.L., Carter R.H. y Kearney J.F. (2005). Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *Eur J Immunol*, 27(9), 2366-2374. doi: 10.1002/eji.1830270935
- OMS. Recuperado el 29 de mayo de 2014 de:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>
- Pal D., Bhattacharya S., Baidya P., De B.k., Pandey J.N. y Biswas M. (2011). Antileishmanial Activity of Polyalthia longifolia Leaf Extract on the in vitro Growth of Leishmania donovani Promastigotes.pdf. *Global Journal of Pharmacology*, 5 (2), 97-100.
- Perez-Victoria F.J., Sanchez-Canete M.P., Seifert K., Croft S.L., Sundar S. y Castanys, S. (2006). Mechanisms of experimental resistance of Leishmania to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug Resist Updat*, 9(1-2), 26-39. doi: 10.1016/j.drug.2006.04.001
- Rajemiarimiraho M., Banzouzi J.T., Nicolau-Travers M.L., Ramos S., Cheikh-Ali Z., Bories C. (2014). Antiprotozoal activities of Millettia richardiana (Fabaceae) from Madagascar. *Molecules*, 19(4), 4200-4211. doi: 10.3390/molecules19044200
- Ready P.D. (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clin Epidemiol*, 6, 147-154. doi: 10.2147/CLEP.S44267
- Rios R., Mattary S. y Gonzales M. (2011). Análisis Bibliométrico de las Publicaciones Sobre Enfermedades Infecciosas en Colombia, 2000-2009. *Rev. salud pública*, 13 (2), 298-307.
- Rodriguez-Gonzalez I., Marin C., Longoni S.S., Mateo H., Alunda J.M., Minaya G. (2007). Identification of New World Leishmania species from Peru by biochemical techniques and multiplex PCR assay. *FEMS Microbiol Lett*, 267(1), 9-16. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00574.

- Rosenkranz V. y Wink M. (2008). Alkaloids induce programmed cell death in bloodstream forms of trypanosomes (*Trypanosoma b. brucei*). *Molecules*, 13(10), 2462-2473.
- S M.P., Solari L., León W., Vega R., Vergaray M., Cubillas L. (2006). Evaluación de Efecto Residual del Templos en Larvas de *Aedes aegypti* en Lima, Perú. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 23(3).
- Sampaio W.M., Moura E.P., Arruda F.C., Ribeiro R.R., Alves C.F., Melo F.A. (2007). In vitro binding and survival assays of *Leishmania* parasites to peripheral blood monocytes and monocyte-derived macrophages isolated from dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *BMC Vet Res*, 3, 11. doi: 10.1186/1746-6148-3-11
- Sánchez-S. L., Sáenz-A. E., Pancorbo-M. J., Carpio R.Z.D., Garcés-V. N. y Regis-R. A. (2004). Leishmaniasis. *Dermatología Peruana*, 14 (2), 82-98.
- Santander S. (2010). Evaluación in vitro del Efecto Tóxico de una Formulación de Glucantime en Nanoemulsion contra Parásitos del Género *Leishmania*. Escuela Politécnica del Ejército, Quito-Ecuador.
- Scott T.W. y Takken W. (2012). Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. *Trends Parasitol*, 28(3), 114-121. doi: 10.1016/j.pt.2012.01.001
- Serafim T.D., Figueiredo A.B., Costa P.A., Marques-da-Silva E.A., Goncalves R., de Moura, S.A. (2012). *Leishmania* Metacyclogenesis is Promoted in the Absence of Purines. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(9), e1833.
- Sharma U. y Singh S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* 45,, 255–272.
- Soto J., Rea J., Balderrama M., Toledo J., Soto P. y Valda L. (2008). Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 78(2), 210-211.
- Soto J., Rea J., Valderrama M., Toledo J., Valda L. y Ardiles J. (2009). Efficacy of extended (six weeks) treatment with miltefosine for mucosal leishmaniasis in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg*, 81(3), 387-389.

- Szliszka E., Skaba D., Czuba Z.P. y Krol W. (2011). Inhibition of inflammatory mediators by neobavaisoflavone in activated RAW264.7 macrophages. *Molecules*, 16(5), 3701-3712. doi: 10.3390/molecules16053701
- Teixeira D.E., Benchimo M., Rodrigues J.C.F., Crepaldi P.H., Pimenta P.F.P. y Souza, W.d. (2013). The Cell Biology of Leishmania: How to teach Using Animations. *PLOS Pathogens*, 8(10).
- Tolouei S., Hejazi S.H., Ghaedi K., Khamesipour A. y Hasheminia S.J. (2013). TLR2 and TLR4 in Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania major. *Scandinavian Journal of Immunology*, 78(5), 478-484. doi: 10.1111/sji.12105
- Tomo N., Guna M.d.R., Fraile M.T., Ocete M.D., Garcia A., Navalpotro D. (2011). Immunity to Parasites. *Current Immunology Reviews*, 7, No. 1, 23-43. doi: 1573-3955/11.
- van Thiel P.P., Leenstra T., Kager P.A., de Vries H.J., van Vugt M., van der Meide W.F. (2010). Miltefosine treatment of Leishmania major infection: an observational study involving Dutch military personnel returning from northern Afghanistan. *Clin Infect Dis*, 50(1), 80-83. doi: 10.1086/648726
- Veeken H., Ritmeijer K., Seaman J. y Davidson R. (2000). A randomized comparison of branded sodium stibogluconate and generic sodium stibogluconate for the treatment of visceral leishmaniasis under field conditions in Sudan. *Trop Med Int Health*, 5(5), 312-317.
- Vega-Lopez F. (2003). Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis*, 16(2), 97-101. doi: 10.1097/01.aco.0000065077.06965.4d
- Viau M. y Zouali M. (2005). B-lymphocytes, innate immunity, and autoimmunity. *Clin Immunol*, 114(1), 17-26. doi: 10.1016/j.clim.2004.08.019
- Villacrés E., Navarrete M., Lucero O., Espín S. y Peralta E. (2010). Evaluación del Rendimiento, Características Físico-Químicas y Nutraceuticas del Aceite de Chocho (*Lupinus mutabilis* sweet). *Revista Tecnológica ESPOL – RTE*, 23, N. 2., 57-62.

- Villacrés E., Peralta E., Cuadrado L., Revelo J., Abodo S. y Aldaz R. (2009). Propiedades y Aplicaciones de los Alcaloides del Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). INIAP-ESPOCH-SENACYT, 133.
- Weigel M. y Armijo R.X. (2001). The Traditional and Conventional Medical Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Rural Ecuador. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health*, 10(6), 395-404.
- World Health Organization. (2010). Control of the Leishmaniasis: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. WHO Technical Report Series, 949.
- Zarzycki P.K., Slaczka M.M., Zarzycka M.B., Włodarczyk E. y Bara, M.J. (2011). Application of micro-thin-layer chromatography as a simple fractionation tool for fast screening of raw extracts derived from complex biological, pharmaceutical and environmental samples. *Anal Chim Acta*, 688(2), 168-174. doi: 10.1016/j.aca.2011.01.001