



FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ANÁLISIS DEL EFECTO CITOTÓXICO DEL ALCALOIDE LUPANINA DE *Lupinus mutabilis* (chocho andino ecuatoriano) SOBRE CULTIVOS *IN VITRO* DE *Leishmania mexicana*

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

Profesora Guía
Ing. Stephanie Santander Vasquez

Autora
Anabel Natalia Zabala Peñafiel

Año
2014

DECLARACIÓN DE LA PROFESORA GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante, 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 Santander Vasquez
Ingeniera en Biotecnología
C.C: 1715361661

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.”

Anabel Natalia Zabala Peñafiel
C.C: 0602871667

AGRADECIMIENTOS

“Gracias a la vida que me ha dado tanto”

VP

DEDICATORIA

A Gilberto, Sonia, Pablito, Tania, MaLaura, Susi y Pablo por el apoyo y amor incondicional.

Al CIT, Stephy y Manuel por su paciencia y dedicación a este trabajo.

RESUMEN

Las leishmaniasis cutánea y muco-cutánea registradas en el Ecuador son causadas por protozoarios del género *Leishmania*, parásito que es endémico en nuestro país. El tratamiento actual de la leishmaniasis consiste en la administración intramuscular de antimoniatos pentavalentes como el Glucantime®. Este tratamiento presenta complicaciones debido a su dificultad de administración, falta de adherencia y generación de resistencia a los antimoniatos. Varios estudios sobre la acción citotóxica de compuestos naturales demuestran su actividad leishmanicida *in vitro*, incluyendo a los alcaloides. El objetivo de esta investigación fue analizar la acción citotóxica de la lupanina, alcaloide quinolizidínico purificado de *Lupinus mutabilis* Sweet, chocho andino, en cultivos *in vitro* de *Leishmania mexicana* resistente al Glucantime®. El extracto de lupanina se obtuvo de *L. mutabilis* Sweet por cromatografía en capa fina. Este extracto de alcaloide se utilizó para tratar cultivos de *L. mexicana* y a las líneas celulares HUVEC (células endoteliales humanas de la vena umbilical) y macrófagos RAW 264.7. La viabilidad tanto del parásito como de las células eucariotas se analizó por colorimetría con MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol). La carga parasitaria en macrófagos infectados con promastigotes de *L. mexicana* fue medida por citometría de flujo y qPCR. Finalmente, se evaluó la producción de radicales libres de oxígeno en cultivos tratados con lupanina. El tratamiento de *L. mexicana* con concentraciones decrecientes de lupanina demostró actividad leishmanicida y se determinó un valor de IC_{50} de 0.24 mg/ml \pm 0.032 para promastigotes y 0.78 mg/ml \pm 0.049 para amastigotes axénicos. El tratamiento de macrófagos infectados con *L. mexicana* con lupanina disminuyó significativamente la carga parasitaria ($p < 0.5$). El efecto leishmanicida de la lupanina podría deberse a la inhibición en la producción de radicales libres de oxígeno (ROS) que produjo el tratamiento del alcaloide en cultivos de promastigotes de *L. mexicana*. Estos datos sugieren que la lupanina tiene efecto leishmanicida y su uso podría contribuir al control de la leishmaniasis.

ABSTRACT

Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis registered in Ecuador is caused by *Leishmania* sp. protozoa, an endemic parasite. Current treatments against leishmaniasis consist mainly on pentavalent antimonites (SbV) such as Glucantime®. These treatments present complications like difficult administer, lack of effectiveness and resistance of the parasite. Several studies about cytotoxic activity of natural compounds have shown leishmanicidal in vitro activity, such as alkaloids. The main objective of this research was to analyze the cytotoxic activity of lupanina extract, a quinolizidine alkaloid isolated from *Lupinus mutabilis* Sweet, an Ecuadorian bean, on in vitro cultures of *Leishmania mexicana*, one of the species that causes leishmaniasis in Ecuador. Lupanine was purified from *L. mutabilis* Sweet by thin layer chromatography. This alkaloid was used to analyze its effect on *L. mexicana* cell cultures resistant to Glucantime®, HUVEC (Human umbilical vein endothelial cell) and RAW 264.7 cells. Cell viability was measured with a colorimetric assay, MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide. Parasite load in macrophages infected with *L. mexicana* promastigotes was measured by flow cytometry and qPCR. Finally, production of reactive oxygen species (ROS) was evaluated on *L. mexicana* cultures exposed to lupanina. Treatment of *L. mexicana* with this alkaloid showed leishmanicidal activity with IC₅₀ values of 0.24 mg/ml ±0.032 for promastigotes and 0.78 mg/ml ±0.049 for axenic amastigotes. Treatment of infected macrophages decreased the parasite load significantly ($p < 0.5$). Leishmanicidal effect of lupanine could rely on the fact that ROS production decrease on promastigotes cultures exposed to the alkaloid. All the data presented on this research suggests that lupanine has a leishmanicidal activity and its use could be useful to the treatment of leishmaniasis.

ÍNDICE

Introducción.....	1
Capítulo I	5
1. Marco Teórico	5
1.1. Leishmaniasis	5
1.1.1. Agente causal.....	9
1.1.2. Manifestaciones Clínicas.....	14
1.1.2.1. Leishmaniasis cutánea.....	14
1.1.2.2. Leishmaniasis mucocutánea.....	16
1.1.2.3. Leishmaniasis visceral.....	17
1.2. <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet	19
1.2.1. Propiedades generales.....	20
1.2.2. Taxonomía.....	21
1.2.3. Composición.....	22
1.2.3.1. Compuestos anti nutricionales.....	22
1.2.3.2. Alcaloides quinolizidínicos (AQ).....	23
1.3. Lupanina	24
1.3.1. Características.....	24
Capítulo II	26
2. Metodología	26
2.1. Cultivo de las líneas celulares RAW 264.7 y células endoteliales humanas de la vena umbilical (HUVEC)	26
2.1.1. Cultivo de macrófagos murinos RAW 264.7.....	26
2.1.2. Cultivo de células endoteliales humanas de la vena umbilical HUVEC.....	26
2.2. Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Leishmania mexicana</i>	27

2.2.1. Cultivo de estado biológico promastigote.....	27
2.2.2. Cultivo del estado biológico amastigote axénico.....	28
2.2.3. Cultivo del estado biológico amastigote intracelular.....	28
2.3. Lupanina vs. <i>Leishmania mexicana</i> en estado	
promastigote y amastigote axénico	29
2.3.1. Concentraciones de lupanina.....	29
2.3.2. Aplicación de las concentraciones de lupanina y controles	
en cultivos <i>in vitro</i> de <i>L. mexicana</i>	30
2.3.3. Análisis de viabilidad celular por Bromuro de 3-	
(4,5-dimetiltiazol 2-ilo)-2,5- difeniltetrazol (MTT)	30
2.3.4. Análisis de estrés oxidativo por citometría de flujo	31
2.4. Toxicidad de la lupanina sobre macrófagos murinos	
(RAW 264.7) y células endoteliales de la vena	
umbilical humana (HUVEC).....	32
2.5. Lupanina vs. <i>Leishmania mexicana</i> en	
amastigotes intracelulares.....	33
2.5.1. Infección de macrófagos RAW 264.7 con	
promastigotes infectivos de <i>L. mexicana</i> teñidos con	
[5(6)]- diacetato de carboxifluoresceína éster	
succinimidil (CFSE)	33
2.5.2. Carga Parasitaria	33
2.5.2.1. Análisis de carga parasitaria mediante	
citometría de flujo	33
2.5.2.2. Análisis de inhibición de carga parasitaria	
de amastigotes intracelulares PCR cuantitativa	34
2.6. Análisis estadístico	36
Capítulo III	37
3. Resultados	37
3.1. Dosis-Respuesta y determinación de IC ₅₀	37
3.2. Análisis de estrés oxidativo por citometría de flujo.....	39

3.3. Toxicidad de la lupanina sobre macrófagos de ratón (RAW 264.7) y células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC).....	40
3.4. Análisis de la carga parasitaria en amastigotes intracelulares	41
3.4.1. Análisis de viabilidad celular mediante citometría de flujo	41
3.4.2. Análisis de inhibición de carga parasitaria de amastigotes intracelulares mediante PCR cuantitativa.....	43
Capítulo IV	46
4. Discusión	46
Capítulo V	52
5. Conclusiones y Recomendaciones	52
Referencias.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Casos endémicos de leishmaniasis a nivel mundial.....	6
Figura 2. Tendencia epidemiológica de leishmaniasis en el Ecuador.	9
Figura 3. Estructura de las formas biológicas de <i>Leishmania</i> sp.....	12
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp.....	13
Figura 5. Lesión generada por leishmaniasis cutánea.	15
Figura 6. Lesión generada por leishmaniasis mucocutánea.	16
Figura 7. <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet.....	21
Figura 8. Estructura química de la lupanina.	25
Figura 9. Viabilidad de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	38
Figura 10. Viabilidad de amastigotes axénicos de <i>L. mexicana</i>	38
Figura 11. Análisis de ROS..	40
Figura 12. Toxicidad de la lupanina en líneas celulares.....	41
Figura 13. Tinción de <i>L. mexicana</i> con CFSE.	42
Figura 14. Emisión de fluorescencia relativa correspondiente a amastigotes intracelulares.	43
Figura 15. Análisis por qPCR de inhibición de carga parasitaria de <i>L. mexicana</i> vs. tratamientos	44
Figura 16. Porcentaje de inhibición de carga parasitaria de amastigotes intracelulares.	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de especies de Leishmania sp.	10
Tabla 2. Concentraciones de lupanina.	29
Tabla 3. Perfil térmico qPCR.	35

Introducción

Antecedentes

La leishmaniasis es una enfermedad tropical parasitaria de preocupación mundial, generada por protozoos del género *Leishmania*. En el continente americano, la leishmaniasis presenta una prevalencia e incidencia variable que dependen de factores extrínsecos como cambio climático, malnutrición del hospedador y tratamientos ante esta parasitosis (Alvar, J., Velez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., 2012, pp. 1-2).

La leishmaniasis presenta distintas manifestaciones: leishmaniasis cutánea, leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis visceral. En el Ecuador, se ha diagnosticado la forma cutánea y mucocutánea, causadas, en su mayoría, por las especies: *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania guyanensis* y *Leishmania amazonensis* (OMS, 2010, p. 68). Este parásito es un organismo con ciclo biológico digénico, con una fase promastigote que se encuentra en el insecto vector (género *Phlebotomus* en el Viejo Mundo o *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo) y una fase amastigote, que se diferencia y multiplica en el fagolisosoma del macrófago (célula blanco del parásito) del hospedador. La capacidad de supervivencia y resistencia de este parásito, además de su infección exitosa, depende de la interacción huésped-*Leishmania* sp. (Kaye, P., y Scott, P., 2011, pp. 605-606).

El tratamiento común para leishmaniasis, y el que se utiliza en el Ecuador es la administración de compuestos antimoniales como el Glucantime® y Pentostam®. Lastimosamente, estos medicamentos son de uso limitado para la población debido a su elevado costo, dificultad de administración, efectos tóxicos secundarios y generación de resistencia por parte del parásito, lo que resta éxito a este tratamiento leishmanicida (Mishra, B., Kale, R. R., Singh, R. K., y Tiwari, V. K., 2009, pp. 82-83). La resistencia desarrollada por los parásitos causantes de la leishmaniasis, es de carácter alarmante y se sabe que es generada por distintos mecanismos de defensa, tales como cambios en

proteínas transportadoras específicas como la glicoproteína P (Pgp), que impide el ingreso del compuesto activo a la célula, generando la pérdida de habilidad del hospedero a dar una respuesta positiva al medicamento y resistencia relacionada con la capacidad exclusiva del parásito a rechazar un tratamiento químico inicial. En primera instancia, el microorganismo es sensible al tratamiento pero después de su sobreexposición a éste, el parásito adquiere resistencia múltiple (Osorio, E., Robledo, S., Arango, G., y Muskus, C., 2005, pp. 244-245).

Debido a las limitantes de estos tratamientos convencionales, existe la necesidad de establecer terapias con mejores resultados que superen a los ya conocidos. Los productos naturales han retomado interés dentro del marco científico de investigación sobre posibles nuevos tratamientos médicos contra distintas parasitosis y se han establecido distintas soluciones utilizando compuestos biológicos. Estos compuestos son conocidos por su biotoxicidad y entre ellos se encuentran los alcaloides. Se ha demostrado la actividad tóxica de los alcaloides contra parásitos infecciosos como la *Leishmania* spp, *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi* (Merschjohann, K., Sporer, F., Steverding, D., y Wink, M., 2001, p. 625). Se conoce que los alcaloides de tipo quinolizidínico, como la lupanina, son metabolitos secundarios, característicos de la familia Fabaceae a la que pertenece el género *Lupinus* (Montes, E., Corona, M., Corona, A., Cantor del Angel, J., Sanchez, J., Sporer, F., Bermúdez, K., 2011, p. 826). La lupanina del chocho andino *Lupinus mutabilis* Sweet, leguminosa andina, es anti nutritiva, tóxica y juega un rol importante al combatir microorganismos (Villacrés, E., Peralta, J., Cuadrado, L., Revelo, J., Abdo, S., y Aldaz, R., 2009, pp. 8-9).

Para demostrar la actividad leishmanicida de los alcaloides de *Lupinus mutabilis* Sweet, es necesario realizar ensayos preliminares en modelos que funcionen como bioindicadores de toxicidad y actividad antiparasitaria. Los modelos, mencionados en la literatura, conocidos como los más favorables en ensayos de citotoxicidad son las líneas celulares: macrófagos RAW 264.7 y HUVEC. A través del manejo de estos cultivos se puede establecer

experimentos de laboratorio que incluyan el planteamiento de un ensayo toxicológico.

Hipótesis

El alcaloide lupanina extraído del chocho andino, *Lupinus mutabilis* Sweet, presenta actividad leishmanicida sobre cultivos in vitro de *Leishmania mexicana*, una de las especies causantes de leishmaniasis cutánea y mucocutánea en el Ecuador.

Alcance

A través de este trabajo, se pretendió probar la actividad leishmanicida de la lupanina, del chocho andino *Lupinus mutabilis* Sweet en cultivos in vitro de *Leishmania mexicana*. Esta investigación se llevó a cabo bajo condiciones controladas en el laboratorio del Centro de Investigación Traslacional (CIT) de la Universidad de las Américas (UDLA) en Quito-Ecuador. A través de los resultados obtenidos en esta investigación se estableció una base para el estudio de la lupanina como posible tratamiento contra la leishmaniasis.

Al realizar esta investigación fue necesaria la revisión de cátedras como Bioquímica, Biología Celular, Biología Molecular, Estadística, Genética de Microorganismos y Biotecnología Vegetal. Sin duda, la aplicación y práctica de estas materias ayudaron a cumplir con el objetivo principal del proyecto.

Justificación

Debido a la poca atención médica e histórica brindada a la leishmaniasis en el Ecuador, la comunidad científica se ve obligada a innovar en alternativas que combatan de manera eficaz esta enfermedad. Así mismo, como consecuencia de las limitaciones que presentan los tratamientos convencionales ya conocidos, se plantea a través de esta investigación y por

primera vez, el uso del alcaloide lupanina de *Lupinus mutabilis* Sweet, producto natural destacado por su toxicidad ante microorganismos, en la comprobación de su efecto citotóxico sobre cultivos in vitro de *Leishmania mexicana*.

El fácil acceso al "chocho andino" en el Ecuador, aumenta aún más la demanda, necesidad y beneficios que conllevarían esta investigación sobre análisis de toxicidad de sus elementos, como la lupanina, y la comprobación de su actividad leishmanicida. De esta manera, se podría generar producción comercial de una posible cura natural que provenga de este grano leguminoso tan común en la región andina.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar la actividad leishmanicida del alcaloide quinolizidínico lupanina del chocho andino ecuatoriano, *Lupinus mutabilis* Sweet, sobre cultivos in vitro de *Leishmania mexicana*.

Objetivos Específicos

- I Determinar la concentración inhibitoria al 50% (IC_{50}) de la lupanina de *Lupinus mutabilis* Sweet en cultivos in vitro de *Leishmania mexicana*.
- II Evaluar el efecto citotóxico de la lupanina de *Lupinus mutabilis* Sweet en líneas celulares RAW 264.7 y HUVEC.
- III Comparar la carga parasitaria de macrófagos infectados antes y después de aplicación de la lupanina, a través de citometría de flujo y qPCR.

Capítulo I

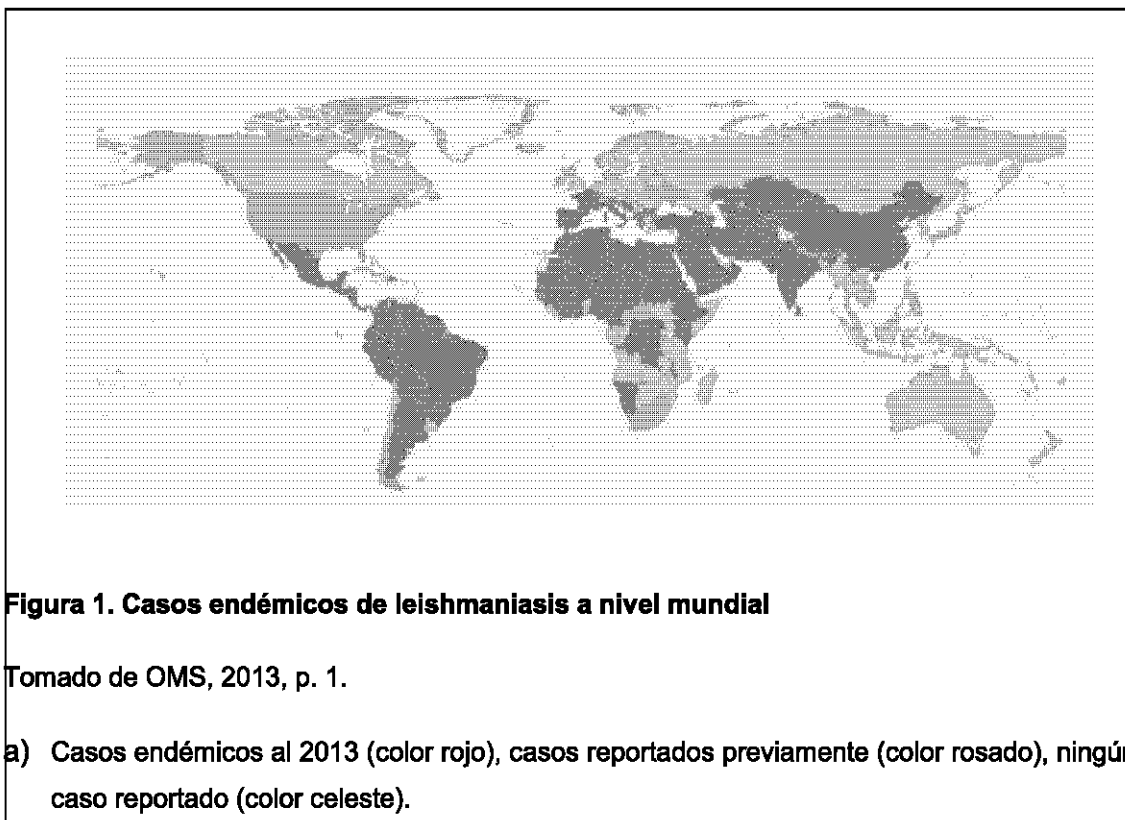
1. Marco Teórico

1.1. Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria tropical y descuidada que se presenta como un conjunto de manifestaciones clínicas entre laceraciones cutáneas que generan desfiguraciones graves hasta afectaciones viscerales mortales. La organización mundial de la salud (OMS) la ha declarado como parasitosis emergente olvidada y estima que existen alrededor de 1,3 millones de nuevos casos de infección por leishmaniasis cada año (OMS, 2014, p.1).

Esta enfermedad es una parasitosis olvidada y no atendida porque a pesar de su significativa mortalidad (aproximadamente 40.000 muertes al año) no existe un esfuerzo trascendental a nivel global por invertir en investigación de posibles curas y desarrollo de terapias que mejoren la calidad de vida de los pacientes (Salam, N., Al-Shaqha, W. M., y Azzi, A., 2014, p. 1). La leishmaniasis es atendida en menor grado por la comunidad científica que la malaria, la infección por VIH y la tuberculosis, a pesar de que ésta parasitosis ocupa el segundo lugar en mortalidad de pacientes después de la malaria, y cuarto lugar en morbilidad entre las infecciones tropicales (Kedzierski, L., 2011, p. 1204). La leishmaniasis es endémica en 98 países de los cuales 72 son naciones en vías de desarrollo (Rice, S., y Patrick, S., 2008, p. 41) como el Ecuador (Figura 1) (OMS, 2014, p. 1).

Esta parasitosis es transmitida por picaduras de hembras infectadas de vectores del género *Lutzomya* (Nuevo mundo) o *Phlebotomus* (Viejo mundo). A nivel mundial, existen alrededor de 12 millones de personas infectadas con leishmaniasis por lo que es considerada como un problema de salud pública (Mishra, B. et al, 2009, p. 82).



La mayoría de casos de leishmaniasis son de tipo zoonótico, es decir, el reservorio es un animal y se presenta exclusivamente en zonas rurales, pero también se la puede encontrar en zonas urbanas de forma antroponótica, siendo el reservorio un ser humano. Debido a que la mayor cantidad de casos se presentan en zonas rurales y a veces remotas, es difícil estimar de manera exacta su incidencia y prevalencia, considerando que también existen casos que no llegan a ser reportados ni diagnosticados y también en algunos pacientes se presenta naturaleza asintomática (Alvar, J., 2001, p. 17).

Según Alvar (2001, p. 17) el incremento de la prevalencia de esta parasitosis se explica por el movimiento de la población humana hacia zonas selváticas y rurales, lo que aumentan su exposición a vectores y su inclusión en el ciclo natural del parásito.

La epidemiología de esta parasitosis depende de varios factores, tanto del parásito como del hospedero, condiciones ambientales y comportamiento. Las características de cada una de las especies de *Leishmania*, su ecología y metabolismo en combinación con la nutrición, estilo de vida, exposición y

entorno de la población infectada son factores principales para una diseminación en menor o mayor grado de la leishmaniasis (OMS, 2010, pp. 39-41).

Los casos reportados indican mayor cantidad de hombres infectados que de mujeres, esto puede deberse a la exposición mayoritaria de la población masculina a trabajos de campo al aire libre y sin una protección adecuada. Otro factor que aumenta el riesgo de infección es el calentamiento global, las variaciones drásticas de temperatura, humedad y contaminación que afectan directamente a la distribución y carga de la enfermedad (Soares, L., Abad-Franch, F., y Ferraz, G., 2014, p. 988).

Los brotes de leishmaniasis se deben a un conjunto de causas entre ellas la pobreza, difícil acceso a centros médicos, tratamientos actuales muy costosos y dolorosos, migración humana y urbanización acelerada y no planificada. Todas estas aportan a incrementar la incidencia de esta parasitosis (Salam, N. et al., 2014, p. 5-6).

La mayoría de la población infectada forma parte de los grupos más pobres y vulnerables de los países afectados. La prevalencia de la enfermedad, en esta población, aumenta por un mal estilo de vida, precarias condiciones sanitarias, personal sanitario inadecuado y migración poblacional sin control por factores económicos. Debido a estas causas, la población presenta inmunidad baja o nula a la leishmaniasis, lo que aumenta su probabilidad de presentar esta enfermedad (Alvar, J., Yactayo, S., y Bern, C., 2006, pp. 553-554).

El movimiento acelerado y sin planificación de poblaciones rurales hacia zonas urbanas no permite establecer un programa de sanidad adecuado ni ofrece condiciones de vivienda de calidad. El ingreso de población humana en estas zonas rurales o selváticas incrementa su riesgo de infección de leishmaniasis debido a la falta de protección ante los vectores que transmiten esta enfermedad (Salam, N. et al., 2014, p. 6).

Los factores mencionados son parte de la realidad de la mayoría de países, a nivel mundial, que presentan leishmaniasis como enfermedad endémica. En el

continente americano se considera que los casos registrados de leishmaniasis son de tipo zoonótico (Alvar, J., 2001, p. 86). En Sudamérica, esta parasitosis es endémica en todos sus países a excepción de Chile y Uruguay (OMS, 2010, p. 29).

En el Ecuador, el organismo encargado de reportar y controlar esta parasitosis es el Ministerio de Salud Pública (MSP). El país presenta casos reportados en 20 de sus 24 provincias, manifestándose la enfermedad en sitios que se encuentran a nivel del mar hasta zonas a 2700 m.s.n.m. Para el año 2004, se determinó un cinturón epidemiológico entre la región Sierra y su frontera al occidente con la región Costa, determinando nuevas provincias prevalentes como Imbabura, Cotopaxi, Pichincha, Cañar y Bolívar (Calvopina, M., Armijos, R., y Hashiguchi, Y., 2004, pp. 663-664).

A través de la Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, parte del MSP, se presentan gacetas epidemiológicas que revelan información actualizada sobre brotes y epidemias de distintas enfermedades infecciosas en el Ecuador. A la semana 38 del 2014 se han reportado un total de 846 casos de leishmaniasis en el país. La mayoría de casos están presentes en la provincia de Pichincha, seguido de Esmeraldas y Santo Domingo de los Tsáchilas. El rango de edad en el que se presentan la mayoría de casos es en poblaciones entre 20 a 49 años en su mayoría hombres, es decir, los adultos jóvenes están más susceptibles a contraer leishmaniasis que niños o adultos mayores (MSP, 2014, p. 17).

Comparando los casos del presente año con los del 2013 (Fig. 2), se puede observar que a la semana 38, los casos registrados de leishmaniasis aumentaron entre el pasado y presente año. Como resultado se puede decir que la tendencia podría seguir incrementando, dependiendo de los factores mencionados anteriormente.

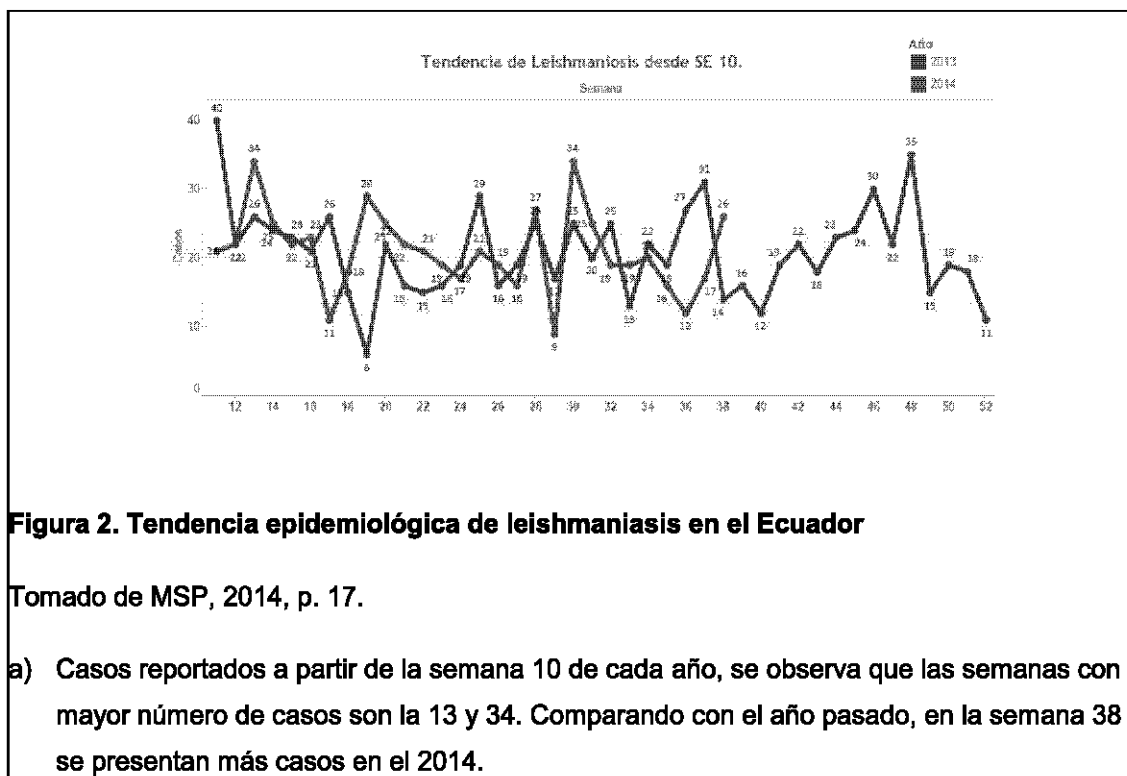


Figura 2. Tendencia epidemiológica de leishmaniasis en el Ecuador

Tomado de MSP, 2014, p. 17.

- a) Casos reportados a partir de la semana 10 de cada año, se observa que las semanas con mayor número de casos son la 13 y 34. Comparando con el año pasado, en la semana 38 se presentan más casos en el 2014.

1.1.1. Agente causal

El parásito que causa la leishmaniasis es un protozoo perteneciente al género *Leishmania*. Este parásito pertenece al orden Kinetoplastida, del cual también son parte los tripanosomas de la familia Trypanosomatidae. Ambos parásitos comparten características morfológicas y han sido utilizados para análisis y evaluación de tratamientos alternativos contra las parasitosis generadas por estos protozoos (Merschjohann, K. et al., 2001, p. 623).

1.1.1.1. Clasificación Taxonómica

El parásito que causa la leishmaniasis pertenece al Reino Protista, Subreino Protozoa, Orden Kinetoplastida, Suborden Trypanosomatina, Familia Trypanosomatidae y Género *Leishmania*. Entre las especies de este género no existen diferencias morfológicas pero taxonómicamente se pueden diferenciar por su manifestación clínica en el hospedero vertebrado. De igual forma, se ha podido establecer una clasificación taxonómica de estos protozoos a través de

caracterización fenotípica de enzimas y anticuerpos, y genotípicas mediante análisis de fragmentos de DNA y amplificación de genoma. (Alvar, J., 2001, p. 35).

La Organización Mundial de la Salud, mediante su informe sobre control de las leishmaniasis (2010, p. 20) determinó la existencia de 16 especies registradas y reportadas que causan leishmaniasis, tanto en el Viejo Mundo como en las Américas (Nuevo Mundo) (Tabla 1).

Las especies de *Leishmania*, descritas por la OMS, que generan manifestaciones clínicas de esta parasitosis en el Ecuador son las siguientes: *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania amazonensis*.

Tabla 1. Clasificación de especies de *Leishmania* sp.

Género	Leishmania	
Subgénero	L. (<i>Leishmania</i>)	L (<i>Viannia</i>)
Especie		
Viejo Mundo	L. donovani L. infantum L. major L. tropica L. aethiopica	
Nuevo Mundo	L. infantum L. mexicana L. venezuelensis L. amazonensis	L. braziliensis L. guyanensis L. panamensis L. shawi L. naiffi L. lainsoni L. lindenbergi L. peruviana

Nota: Especies del género *Leishmania* que generan manifestaciones clínicas de la enfermedad, en el Viejo Mundo y Nuevo Mundo.

1.1.1.2. Ciclo Biológico

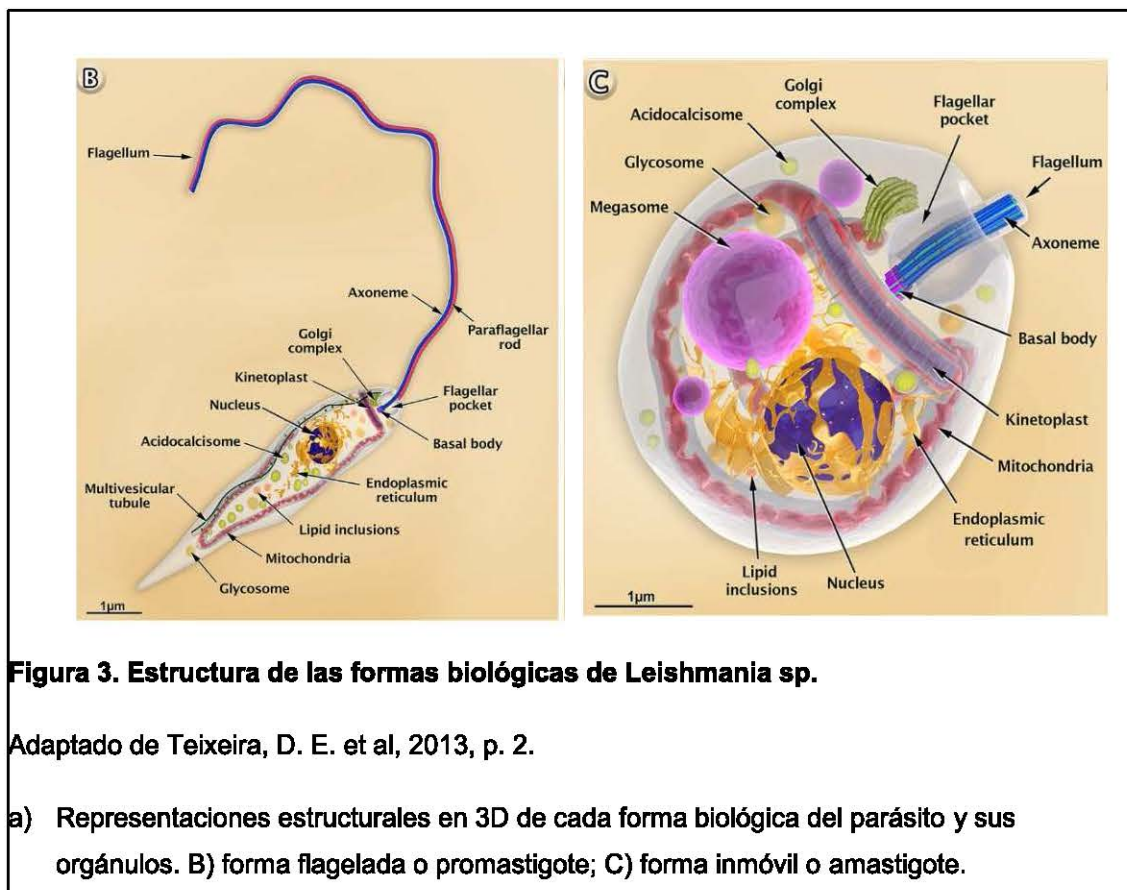
El ciclo biológico del parásito *Leishmania* sp. es digénico porque presenta dos fases de desarrollo: promastigote, forma flagelada (Fig. 3) que se ubica en el tubo digestivo del vector, y fase amastigote la forma aflagelada, inmóvil e infectiva (Fig.3) que se fagocita dentro de las células blanco del hospedero (macrófagos) (Teixeira, D. E., Benchimol, M., Rodrigues, J. C., Crepaldi, P. H., Pimenta, P. F., y de Souza, W., 2013, pp. 1-2).

El promastigote es la fase que sobrevive en el tracto digestivo del vector a una temperatura entre 25-27 °C y pH 7, mide alrededor de 10 µm. En el hospedero vertebrado, dentro de las células blanco del parásito (macrófagos), el amastigote se desarrolla a temperatura de 37°C y pH 4-6 (Campos, J., 2008, p. 16).

Según lo descrito por Alvar, J. (2001, p. 19) el ciclo inicia con un vector infectado con *Leishmania* sp. El vector ingiere sangre de un vertebrado inoculando con su saliva a promastigotes metacíclicos (periodo en el que el parásito alcanza su capacidad infectiva) que se encuentran en su organismo. Cuando este parásito entra en contacto con la dermis del hospedero, es fagocitado por los macrófagos. Durante este proceso, el macrófago intenta eliminarlo mediante la generación de metabolitos tóxicos como el óxido nítrico y radicales libres de oxígeno (ROS). En ciertos casos, el parásito evade este sistema de defensa y logra multiplicarse y sobrevivir en forma de amastigote intracelular.

El avance de la leishmaniasis depende de la respuesta inmune del hospedero y virulencia del parásito. Si la respuesta inmune es débil y los parásitos logran superarla, se establece la infección en el hospedero, posteriormente los macrófagos parasitados son ingurgitados por otro vector y en su intestino se liberan amastigotes axénicos que se convierten en promastigotes. Durante los primeros 10 días en el organismo vector, el parásito se multiplica y su flagelo le permite adherirse al tubo digestivo del mismo (Alvar, J., 2001, p. 19).

Posteriormente, el promastigote pierde adherencia y deja de multiplicarse convirtiéndose en promastigote metacíclico, listo para ser inoculado, cerrando el ciclo (Fig. 4).



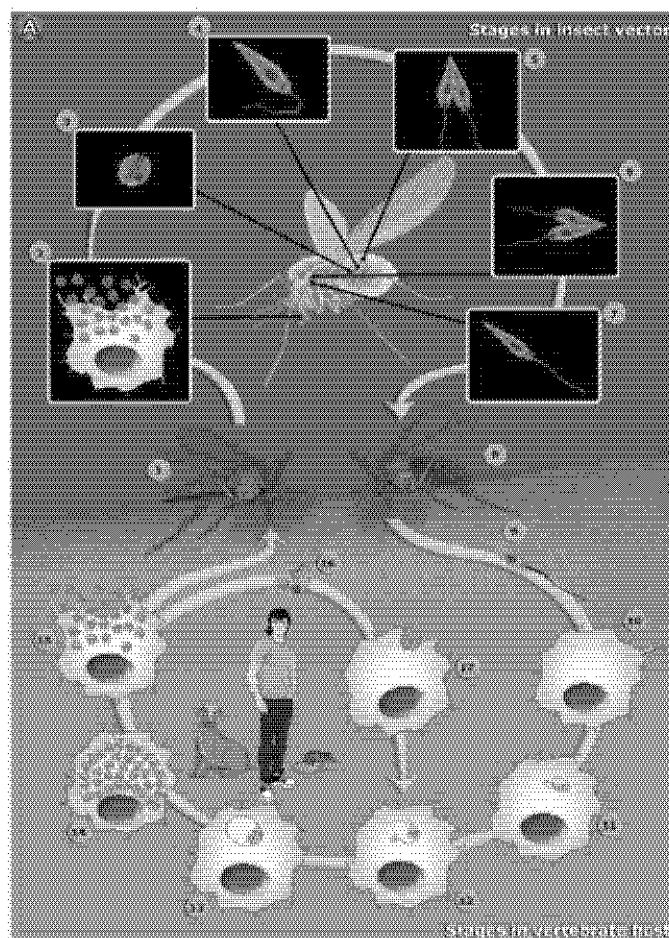


Figura 4. Ciclo de vida de *Leishmania* sp.

Adaptado de Teixeira, D. E. et al, 2013, p. 2.

a) (1) insecto pica a un vertebrado infectado; (2) macrófagos infectados con la forma amastigote; (3) amastigote axénico; (4) amastigote se transforma en promastigotes procíclicos; (5) promastigotes se multiplican en el intestino del parásito; (6) promastigotes migran al tracto digestivo y reinician división celular; (7) promastigotes se transforman en promastigotes metacíclicos; (8) el vector hembra inocula promastigotes metacíclicos en el huésped vertebrado final mediante regurgitación al alimentarse de la sangre; (9) promastigotes metacíclicos; (10) macrófagos infectados por promastigotes; (11) transformación a amastigotes; (12) amastigote intracelular, (13-14) fagocitosis de amastigotes intracelulares; (15) amastigotes salen del macrófago; (16) amastigote axénico; (17) infección de macrófago por amastigote. Los hospedadores más comunes son el ser humano, perro y roedores.

1.1.1.3. Características bioquímicas del parásito

Los parásitos pertenecientes al orden Kinetoplástida tienen características celulares que los diferencian de otros organismos. Son haploides y presentan un kinetoplasto, orgánulo donde se concentra el DNA (kDNA) de su única mitocondria. Este DNA se presenta como una red, conformada por maxicírculos y minicírculos que representan el 10 a 15% del total de DNA del parásito (Jackson, A. P., 2014, p. 8).

El genoma de *Leishmania* sp. se caracteriza y diferencia de otros eucariotes porque contiene secuencias muy poco repetidas (< 10%) y también se destaca por su plasticidad. Debido a esto, se explica la gran cantidad de procesos de amplificación génica que se presentan al momento de ser expuestos a un fármaco. La kDNA-heterogeneidad entre especies de *Leishmania* sp. explica la diferencia de comportamiento entre cada una y, por lo tanto, su distinción en cada manifestación clínica de la leishmaniasis (Myler, P. J., y Fasel, N., 2008, pp. 20-23).

1.1.2. Manifestaciones Clínicas

La leishmaniasis tiene varias manifestaciones clínicas, según la especie de parásito que infecte al hospedero y por su entorno. Entre las manifestaciones clínicas más prevalentes a nivel mundial se encuentran, leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV) (OMS, 2010, p. 7).

1.1.2.1. Leishmaniasis cutánea

Esta forma clínica de la enfermedad es causada por los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*. Los efectos de la leishmaniasis cutánea son lesiones

dérmicas que no se ubican en un sitio específico sino en todo el cuerpo. Su punto de origen es el sitio de inoculación, generándose la herida que a continuación será una úlcera, extendiéndose hasta formar una lesión nodular (OMS, 2010, pp. 10-11). Una de las características de esta forma clínica es que tiende a cronificarse y a ser muy agresiva (Fig. 5) (Alvar, J., 2001, p. 86).

Existen dos formas de leishmaniasis cutánea, la localizada (LCL) y difusa (LCD). La diferencia entre ellas radica en que en la LCL presenta una o muy pocas lesiones, casi siempre son úlceras mientras que la LCD genera varias lesiones entre pápulas y nódulos (Zegarra-Del-Carpio, R., y Sánchez-Saldaña, L., 2005, p. 60).

Las lesiones no aparecen inmediatamente después de la infección y pueden tardarse entre semanas hasta años. La LC causada por *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* se observa en las Américas y es la forma clínica con mayor prevalencia en el Ecuador (Calvopina, M. et al., 2004, p. 665).



Figura 5. Lesión generada por leishmaniasis cutánea.

a) Herida ubicada en la parte superior del codo, paciente del cantón Pedro Vicente Maldonado-Pichincha.

1.1.2.2. Leishmaniasis mucocutánea

Esta forma clínica también se presenta en el Ecuador y se caracteriza por lesiones en las mucosas, que se presentan después de meses o años de la generación de una lesión cutánea. Los parásitos invaden, por vía linfática, las mucosas del hospedero y las lesiones se presentan como nódulos que evolucionan hasta convertirse en úlceras que pueden llegar a perforar el tabique nasal, deformando la nariz. También se puede generar lesiones en la mucosa bucal (Fig. 6) que llegan a destruir la úvula del hospedero (Rama, S., 2005, p. 15).

La leishmaniasis mucocutánea (LMC) avanzada es una enfermedad destructiva y desfigura el área infectada, esto se debe a que la infección nasal puede presentar sepsis y destrucción, en la laringe la LMC puede provocar asfixia, sofocamiento y ronquera (Lawn, S., Whetham, J., Chiodini, P., Kanagalingam, J., Watson, J., Behrens, R. y Lockwood, D., 2004, p. 782).



Figura 6. Lesión generada por leishmaniasis mucocutánea.

Tomado de Lawn, S., et al., 2004, p. 785.

a) Lesión en la faringe en paciente con LMC.

1.1.2.3. Leishmaniasis visceral

Esta forma clínica (LV), es conocida como la leishmaniasis mortal e inicia como una lesión primaria en el área de infección que sigue con un periodo de incubación que varía según la especie del parásito. Los síntomas pueden ser muy severos y aparecen de forma rápida o insidiosa, confundiendo con ataques de malaria. El síntoma más importante es la hinchazón abdominal y esplenomegalia que ayudan a determinar que se trata de LV, la pérdida de pelo, leucopenia y anemia también forman parte de sus síntomas (Rama, S., 2005, pp. 15-16).

Al 2009, se reportaron casos de esta forma clínica en países de Sudamérica como Bolivia, Argentina, Brasil, Colombia, Paraguay y Venezuela por las especies *L. infantum* y *L. donovani*. En el Ecuador no se han reportado ni registrado casos de leishmaniasis visceral (OMS, 2010, pp. 108-112).

1.1.3. Tratamientos

1.1.3.1. Tratamientos convencionales

A partir de 1924, el tratamiento contra la leishmaniasis se basa en moléculas de antimonio pentavalente (SbV) como Glucantime®, Pentamidina®, Pentostam®, formulaciones de Anfotericina B® y en casos más recientes se registra el uso de Miltefosina®. (Ait-Oudhia, K., Gazanion, E., Vergnes, B., Oury, B., y Sereno, D., 2011, p. 1225).

La falta de eficacia de estos tratamientos radica en la resistencia adquirida por los parásitos debido a su exposición demasiado prolongada a un mismo tipo de medicamento. Ait-Oudhia, K., et al., (2011, p. 1226) menciona que también existen factores asociados al hospedero, a la droga misma y mala práctica médica, que convierten al tratamiento pentavalente en poco eficaz.

Es necesario entender que el antimonio trivalente (SbIII) es la forma activa del antimonio pentavalente (SbV). Es decir, el SbIII es la forma leishmanicida de la droga, el cual sufre una bioconversión a partir de SbV, en el organismo hospedero o el mismo parásito (Denton, H., McGregor, J. C., y Coombs, G. H., 2004, p. 407).

La exposición del parásito *Leishmania* sp. a SbIII conlleva a varias respuestas como la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), alteración del potencial redox y ruta metabólica del tiol, y pérdida de defensa antioxidante (Ait-Oudhia, K. et al., 2011, p. 1226). El resultado que los antimonios pentavalentes reflejan dependen de la susceptibilidad del parásito a la droga y a otras moléculas leishmanicidas generados por los macrófagos del organismo huésped (Carter, K. C., Hutchison, S., Henriquez, F. L., Legare, D., Ouellette, M., Roberts, C. W., y Mullen, A. B., 2006, p. 89).

La Anfotericina B®, se utiliza para tratar la LV y presenta efectos secundarios como fiebre, escalofríos y trombosis. La Miltefosina®, es la primera droga de ingesta oral contra la LV y LC, entre sus efectos secundarios presenta alteración del tracto gastrointestinal y elevación de enzimas hepáticas. Al hablar de la Pentamidina®, se menciona que es el tratamiento de primera línea utilizado para tratar LC y LV pero uno de sus efectos secundarios más graves es el inicio de diabetes de tipo insulino-dependiente. Al hablar de Glucantime®, es la droga de primera línea utilizada en el Ecuador para tratar la LC y LMC, se aplica por vía intradérmica en dosis diarias durante 20 días. Sus efectos secundarios son molestia en los sitios de inyección, dolores articulares, mialgias y alteraciones electrocardiográficas (Hussain, H., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., Green, I. R., y Gibbons, S., 2013, pp. D-E).

Debido a todas las limitantes que presentan los tratamientos convencionales usados contra leishmaniasis se ha iniciado la búsqueda de nuevos tratamientos provenientes de fuentes naturales.

1.1.3.2. Nuevos tratamientos

La búsqueda de tratamientos alternativos a la leishmaniasis nace debido a la reducida eficacia de los tratamientos convencionales utilizados a nivel mundial. Se ha iniciado la investigación de varios compuestos, de origen natural, para el tratamiento de un amplio rango de enfermedades infecciosas. Como resultado de estas investigaciones, se conoce que algunos metabolitos secundarios son los que muestran capacidad de contrarrestar el avance de estas enfermedades.

En el caso de la leishmaniasis, la literatura indica que existen varios productos naturales con efecto leishmanicida, siendo los alcaloides los más efectivos (Mishra, B. et al., 2009, pp. 83-84).

A pesar de que se ha comprobado una mayor efectividad de los alcaloides, se ha estudiado la naturaleza anti-parasitaria de derivados fenólicos, terpenos, quinonas, péptidos y derivados etanólicos de plantas utilizadas tradicionalmente para curar leishmaniasis. De igual manera, se ha generado compuestos sintéticos derivados de cúrcuma, quinolina, entre otros. Todos los compuestos antes mencionados son útiles al momento de analizar su acción leishmanicida, ya que cada uno tiene diferente ruta de acción y presentan resultados interesantes al ser comparados con el efecto de los tratamientos convencionales (Hussain, H. et al., 2013, pp. L-AQ). Cabe recalcar que todos los nuevos tratamientos han sido únicamente probados experimentalmente a nivel de laboratorio.

1.2. Lupinus mutabilis Sweet

Teniendo en cuenta las propiedades de las plantas y su utilidad como tratamientos con efectos anti parasitarios, se ha iniciado la investigación de las propiedades de *Lupinus mutabilis* Sweet, planta endémica de la región andina que es de fácil acceso y tiene múltiples usos.

1.2.1. Propiedades generales

La leguminosa, *Lupinus mutabilis* Sweet (Fabaceae), es comúnmente conocida en el Ecuador como chocho. Es una planta tradicional de los Andes, su grano es de gran importancia en la dieta diaria de los ecuatorianos y su siembra se da en zonas sobre los 2000 m.s.n.m. El cultivo del chocho se da a lo largo de la cordillera andina, siendo tradicional también en Perú y Bolivia donde comúnmente se lo denomina tarwi (Aldaz, R., 2009, p. 4).

El cultivo de *L. mutabilis* Sweet debe darse en zonas secas, es muy sensible a heladas durante el proceso de racimo y madurez y es medianamente susceptible a la sequía en periodos de floración. Las características que ayudan a reconocer una planta de chocho (Fig. 7) son sus hojas de forma digitada de color amarillo verdoso a verde oscuro; su altura varía entre 0,5-2 m y su tallo es leñoso por lo que es muy utilizado para procesos de combustión. Posee vainas en donde alberga las semillas que tienen un recubrimiento tóxico conformado en su mayoría por alcaloides. Por último, sus flores tienen una coloración entre azul intenso y morado que es muy variable y por esta razón se la denomina *mutabilis* (cambiante) (Rodríguez, A., 2009, pp. 11-15).

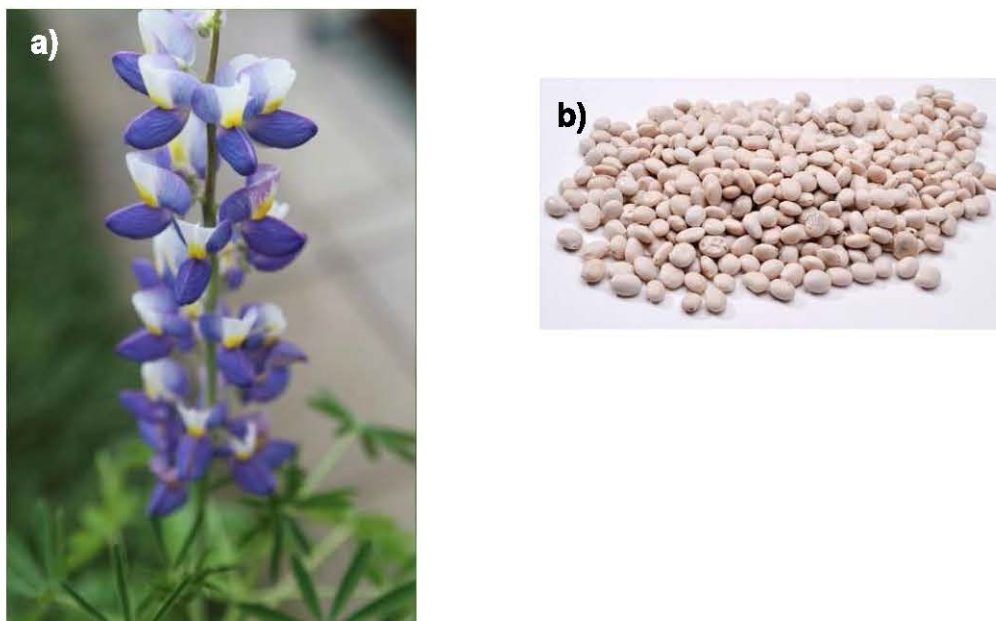


Figura 7. *Lupinus mutabilis*

Tomado de Rodríguez, A., 2009, p. 10.

a) flores y tallo

b) semilla del chocho de gran uso en la gastronomía andina.

1.2.2. Taxonomía

La división taxonómica del género *Lupinus* se ha dividido por especies presentes en el Viejo y Nuevo Mundo. Al hablar de la presencia del este género en el Nuevo Mundo, su taxonomía se presenta de la siguiente manera (Wolko, B., Clements, J., Naganowska, B., Nelson, M., y Yang, H., 2011, p. 160):

- Tronco: Cormofitas
- Clase: Dicotiledónea
- Orden: Rosales
- Familia: Leguminosa
- Sub familia: Papilionáceas
- Género: *Lupinus*

- Especie: mutabilis
- Nombre científico: Lupinus mutabilis Sweet

1.2.3. Composición

“El grano del chocho ecuatoriano está compuesto aproximadamente por 35.5% de proteínas, 16.9% de aceites, 35.77% de carbohidratos y 7.65% de fibra cruda.” (Aldaz, R., 2009, p. 27).

También existen reportes que indican la presencia de vitaminas, lípidos, ácidos grasos, minerales y ciertos aminoácidos como la leucina, arginina y ácido glutámico en mayor cantidad. El conjunto de estos compuestos otorgan un gran contenido nutritivo al grano de *L. mutabilis* Sweet (Rodríguez, A., 2009, pp. 17-20).

1.2.3.1. Compuestos anti nutricionales

Como es característico en las leguminosas, el grano de *Lupinus mutabilis* Sweet no solo tiene un alto valor nutritivo sino también está compuesto por sustancias anti nutricionales. Debido a esto, no es posible la ingesta directa del chocho, por lo que, previo a su uso alimenticio, se lo debe lavar y cocer. Los compuestos anti nutritivos que se eliminan en estos procesos son, principalmente (Rodríguez, A., 2009, p. 20):

- Hemaglutininas
- Glucósidos
- Inhibidores de proteasas
- Alcaloides

Los alcaloides son el principal compuesto anti nutritivo, brindando toxicidad y sabor amargo al grano. Estos compuestos son metabolitos secundarios que funcionan como defensa natural de la planta contra herbívoros como las

abejas, nemátodos, roedores, y ganado vacuno. También presenta propiedades antivirales, antibacterianas y antifúngicas (Wolko, B. et al., 2011, p. 161).

Refiriéndose a estudios anteriores realizados por Sweetingham, M. y colaboradores (2006, p. 2) se sabe que la ruta biosintética de los alcaloides inicia con la lisina, la cual se convierte en cadaverina que luego producirá, principalmente, dos moléculas tetracíclicas: lupanina y esparteína.

La lupanina es la molécula anti nutricional más abundante presente en *L. mutabilis* Sweet y es un alcaloide de tipo quinolizidínico. La lupanina corresponde al 2,5% de composición en el grano crudo y 11,5% en el extracto purificado de alcaloides (Villacrés, E. et al., 2009, pp. 7-8).

1.2.3.2. Alcaloides quinolizidínicos (AQ)

Los alcaloides de esta naturaleza química son derivados de la cadaverina, y están ampliamente distribuidos entre las leguminosas. Algunos alcaloides quinolizidínicos (AQ) presentan propiedades farmacéuticas beneficiosas de tipo citotóxico, antibacteriano, antiviral y oxitóxico. Estructuralmente, estos alcaloides poseen un anillo quinolizidínico y se dividen en: bicíclicos, tricíclicos y tetra cíclicos como la lupanina (Bunsupa, S., Saito, K., y Yamazaki, M., 2013, pp. 263-265).

Al hablar del género *Lupinus*, se ha determinado que los AQ son producto de biosíntesis y reserva de la planta. Los alcaloides cíclicos (lupanina), sufren modificaciones por esterificación, hidroxilación y glicosilación, lo que da lugar a una variedad de alcaloides. De la esterificación se genera la 3- β -hidroxilupanina y 13-hidroxilupanina, alcaloides pertenecientes también a *L. mutabilis* Sweet pero que se encuentran en cantidades mínimas (Ohmiya, S., 2007, p. 1560).

La biosíntesis de los alcaloides quinolizidínicos ocurre generalmente en las zonas verdes de la planta, donde se acumulan las enzimas que dan lugar a procesos de formación de la lisina, cadaverina y lupanina. Los AQ se acumulan en los órganos reproductivos de la planta, la mayor concentración que puede alcanzar un alcaloide en la semilla es del 5% de su peso seco (Bunsupa, S. et al., 2013, pp. 273-274). A pesar de conocer a detalle la biosíntesis de los AQ, muy poco se sabe sobre sus mecanismos moleculares, metabolómica y transcriptómica.

1.3. Lupanina

1.3.1. Características

La lupanina es un alcaloide quinolizidínico presente en el chocho *L. mutabilis* Sweet, su fórmula química es $C_{15}H_{24}N_2O$ (Fig. 8) y su peso molecular de 248,36 g/mol. Este alcaloide es el más abundante dentro de las especies del género *Lupinus*, es soluble en agua, alcohol y éter (Wolko, B. et al., 2011, p. 162).

La estructura de este alcaloide le confiere versatilidad y le permite ser materia prima de la semisíntesis de otros alcaloides (Carmali, S., Alves, V., Coelho, I., Ferreira, L., y Lourenco, A., 2010, p. 38).

Se ha descrito que la lupanina actúa como reductor de la presión arterial e hiperglicemia (Lopez, P., de la Mora, P. G., Wysocka, W., Maiztegui, B., Alzugaray, M. E., Del Zotto, H., y Borelli, M. I., 2004, p. 140). Al ser defensa de la planta ante predadores, su actividad biológica ha sido analizada y comprobada sobre distintos organismos como: bacterias, nemátodos y hongos (Aldaz, R., 2009, p. 108; Villacrés, E. et al., 2009, pp. 11-15), demostrando que los alcaloides de *L. mutabilis* Sweet tienen acción bactericida contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*; actividad contra los hongos *Mycrosporium canis*, *Trichophyton robur*; y actividad nematicida contra *Meloidoyne incognita* (Villacrés, E. et al., 2009, p. 11-17).

Debido a estos antecedentes, es importante analizar el efecto de este alcaloide quinolizidínico sobre parásitos causantes de la leishmaniasis en el Ecuador, *Leishmania mexicana*.

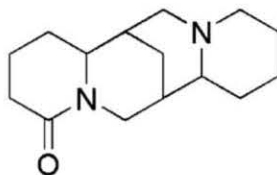


Figura 8. Estructura química de la lupanina.

Tomado de Bunsupa, S., et al, 2013, p. 265.

a) Alcaloide tetra cíclico que posee un núcleo quinolizidínico con un grupo amida (lactama).

Capítulo II

2. Metodología

2.1. Cultivo de las líneas celulares RAW 264.7 y células endoteliales humanas de la vena umbilical (HUVEC)

Las líneas celulares RAW 264.7 y HUVEC se obtuvieron del laboratorio del Dr. Ilva Raskin de la Universidad de Rutgers- USA, y se mantuvieron en el CIT-UDLA.

2.1.1. Cultivo de macrófagos murinos RAW 264.7

Siguiendo lo descrito por Wetzel, D., McMahon-Pratt, D., y Koleske, A. (2012, pp. 3176) se sembró la línea celular RAW 264.7 (Mø), que corresponde a macrófagos de ratón realizando modificaciones en el medio de cultivo con RPMI-1640 (Gibco®, Invitrogen USA) suplementado con 10% de FBS inactivado (Fetal Bovine Serum; Gibco®, Invitrogen USA) y 1% de antibiótico Penicilina/Estreptomicina (Gibco®, Invitrogen USA). Los macrófagos se sembraron en placas de cultivo celular de 96 y 6 pocillos (CELLSTAR, Greiner Bio-one) dependiendo del ensayo y se incubaron durante 24h a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa (Thermo Scientific, REVCO). Esta cepa es mantenida en el Centro de Investigación Traslacional (CIT) de la Universidad de las Américas.

2.1.2. Cultivo de células endoteliales humanas de la vena umbilical HUVEC

La línea celular HUVEC corresponde a células endoteliales humanas de la vena umbilical. Estas células se cultivaron en placas de cultivo celular de 96 pocillos (CELLSTAR, Greiner Bio-one), en medio DMEM (Dulbecco's Modified

Eagle's Medium) suplementado con 20% FBS inactivado (Fetal Bovine Serum; Gibco®, Invitrogen USA) y 1% de antibiótico Penicilina/Estreptomicina (Gibco®, Invitrogen USA) durante 24h a 37°C, 5% CO₂ y 90% de humedad relativa. Esta cepa es mantenida en el Centro de Investigación Traslacional (CIT) de la Universidad de las Américas.

2.2. Cultivo in vitro de Leishmania mexicana

Se trabajó con el protozooario *L. mexicana* MHOM/B2/82/BEL-21 (BEL-21) resistente al antimonio pentavalente Glucantime®. Esta cepa es mantenida en el Centro de Investigación Traslacional (CIT) de la UDLA.

2.2.1. Cultivo de estado biológico promastigote

Como lo describe Castañeda, A. (2013, p. 60) la fase móvil del parásito (promastigotes) se mantuvo a 27°C mediante pases secuenciales de cultivos de 7 días de crecimiento. Se suplementó 13 ml de medio fresco BHI (Bacto Brain Heart Infusion; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD 21152) con 0,53% de hemina [2 mg/ml] (Hemin Chloride; CALBIOCHEM, EMD Biosciences, Inc. La Jolla, CA92039-2087), 0,03% de antibiótico Penicilina/Estreptomicina (Gibco®, Invitrogen USA) y 3% de suero fetal bovino (FBS) inactivado (Fetal Bovine Serum; Gibco®, Invitrogen USA). Los ensayos de citotoxicidad se realizaron entre el sexto y séptimo día de cultivo debido a que en esta etapa los parásitos alcanzan su fase infectiva, como lo determinaron Colares, V., Almeida-Souza, F., Taniwaki, NN., Souza, Cda S., da Costa, JG., Calabrese Kda, S., y Abreu-Silva, AL (2013, p. 5).

2.2.2. Cultivo del estado biológico amastigote axénico

De acuerdo a Bates, P. (1993, pp. 144-145) se desarrolló el estado biológico no móvil (amastigote) de *L. mexicana* tomando 8 ml de cultivo de promastigotes del séptimo día (fase infectiva del parásito). Se realizaron las siguientes modificaciones al medio de cultivo. Los 8 ml se centrifugaron a 22°C durante 8 minutos x 3000 rpm. Se removió el sobrenadante y se realizó 3 lavados con PBS 1x estéril (Gibco®, Invitrogen USA). Posteriormente, se homogenizó el pellet en 1,5 ml de medio MMA (Medio Base 199; 0,5% Tryptic Soy agar, 0,01 mM Bathocuproine, 3 mM L-cisteína, 15 mM glucosa, 5 mM glutamina, 4 mM NaHCO₃, 0,023 mM hemina, 25mM Hepes) suplementado con 20% de FBS inactivado (Gibco®, Invitrogen USA), 2% de antibiótico Penicilina/Estreptomina (Gibco®, Invitrogen USA) y 50 µl de HCl 1N. Finalmente, se incubó a 37°C, 18% O₂, 5% CO₂, durante 3 a 5 días hasta observar transformación completa (absorción del flagelo móvil y cambio de morfología fusiforme a globular del parásito) mediante cámara de Neubauer.

2.2.3. Cultivo del estado biológico amastigote intracelular

Este estado se obtiene a partir del modelo de infección Mø-promastigote de *L. mexicana*. Los Mø cultivados según lo descrito en el punto 2.1.1 se lavaron con medio fresco RPMI-1640 suplementado para eliminar células libres y se infectó estos Mø con promastigotes de *L. mexicana* en fase infectiva del sexto a séptimo día en relación 1:20 (parásito:macrófago), incubando a 37°C, 18% O₂, 5% CO₂ como lo describe Castañeda, A. (2013, p. 63). El tiempo de infección óptimo se determinó en el laboratorio mediante curva de infección con variación en tiempo entre 1 a 5 horas, determinando que el tiempo de infección ideal es de 2 horas.

2.3. Lupanina vs. *Leishmania mexicana* en estado promastigote y amastigote axénico

2.3.1. Concentraciones de lupanina

La lupanina purificada (98%) fue otorgada por en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), se obtuvo mediante cromatografía en capa fina a partir del extracto enriquecido de alcaloides de *Lupinus mutabilis* Sweet (chocho). Dentro de este extracto, la lupanina presenta una concentración de 12,4%, siendo el alcaloide más abundante en esta leguminosa (Villacrés, E. et al., 2009, p. 8).

Para poder realizar los ensayos de citotoxicidad se obtuvo una concentración inicial de 4 mg/ml (Concentración 1: C1) al disolver 200 mg de lupanina en 50 ml de H₂O destilada, alcalinizando la solución con 0.2 ml de NaOH 0.1 N (pH 10) como lo describe Zamora, J. et al. (2005, p. 128). A partir de C1 se realizaron seis diluciones seriales como se explica en la Tabla 2.

Tabla 2. Concentraciones de lupanina.

Lupanina	[mg/ml]
C1	4
C2	2
C3	1
C4	0.5
C5	0.48
C6	0.048
C7	0.0048

Nota: Alcaloide lupanina disuelto en H₂O destilada a pH 10.

2.3.2. Aplicación de las concentraciones de lupanina y controles en cultivos in vitro de *L. mexicana*

Se colocaron 1×10^6 parásitos por pocillo en placas de cultivo celular de 96 pocillos (Corning Incorporated) aplicando 10 μ l de cada concentración de lupanina (Tabla 2) en un volumen final de 200 μ l. Por otra parte, los controles positivos consistieron en aplicación de Glucantime® [300 mg/ml], un extracto etanólico de la planta de la familia *Scrophulariaceae* (C+) [500 mg/ml] y NaOH 0.1N [11.7 mg/ml]. Como control de resistencia se utilizó Glucantime® y NaOH. Como control positivo (C+) se utilizó utilizando el extracto etanólico de la planta de la familia *Scrophulariaceae* porque su actividad leishmanicida fue comprobada en estudios anteriores realizados en el CIT-UDLA. El control negativo de cada experimento consistió en células sin tratamiento. Cada experimento se realizó por triplicado y en un mínimo de 3 ensayos por cada estado biológico y línea celular.

2.3.3. Análisis de viabilidad celular por Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol (MTT)

El análisis colorimétrico, a través de MTT, determina el número de células vivas mediante la reducción de la sal 3-dimetiltiazol-2 difeniltetrazol a cristales de formasan (precipitado violeta) por acción de las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables como lo explica Paloque, L. et al. (2013, pp. 320-323).

La solución MTT se preparó bajo condiciones estériles y en obscuridad disolviendo 0.075 g de MTT en 15ml de agua destilada estéril. Luego de 24h de exposición a cada tratamiento, se añadió 10% de MTT al volumen final de cada pocillo de la placa a analizar y se incubó bajo las condiciones de cultivo específicos de cada organismo celular (parásitos y líneas celulares) durante 4 horas. La reacción se detuvo con la adición de 100 μ l de solución Stop (20% de

Dodecilsulfato sódico (SDS) homogenizados en 50% de isopropanol, aforado con H₂O destilada a un volumen final de 50 ml) en cada pocillo. Mediante pipeteo se homogenizó cada pocillo y se leyó la absorbancia de las soluciones a 570 nm (espectrofotómetro BioTek). Los datos se normalizaron y ajustaron utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Mortalidad} = \left[1 - \left(\frac{\text{AbsorbanciaMuestra}}{\text{AbsorbanciaControl}} \right) \right] * 100$$

(Ec. 1)

(Colares, V. et al., 2013, p. 3)

Los resultados se utilizaron para calcular la concentración inhibitoria al 50% (IC₅₀). El porcentaje de viabilidad celular se calculó siguiendo la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Viabilidad} = \left[\left(\frac{\text{AbsorbanciaMuestra}}{\text{AbsorbanciaControl}} \right) \right] * 100$$

(Ec. 2)

(Colares, V. et al., 2013, p. 3)

2.3.4. Análisis de estrés oxidativo por citometría de flujo

Utilizando el kit de CellROX® Deep Red (Life Technologies Cat. No. 10491) se analizó el nivel de producción de radicales libres de oxígeno (ROS) bajo condiciones controladas de laboratorio. El estudio del estrés oxidativo generado por la lupanina y el C+ se realizó a través de citometría de flujo (Accuri C6) a longitud de onda de emisión de 675 ± 25 nm. Se trabajó con placas de cultivo celular de 48 pocillos (Corning Incorporated) con 1x10⁶ parásitos en estado promastigote infectivo y un volumen final de 500 µl, se trabajó con las

concentraciones de lupalina y controles como se menciona en el punto 2.3.2 bajo condiciones y tiempo de incubación mencionadas en el punto 2.2.1.

Se realizó el tratamiento de promastigotes de 7 días con las concentraciones de lupalina y C+ como se indica en la sección de metodología. Luego de 24h de tratamiento se realizó una tinción para determinar la producción de ROS siguiendo el protocolo del inserto del kit de CellROX® Deep Red (Life Technologies catálogo No. C10491) para citometría de flujo con las siguientes modificaciones. El control positivo fue el extracto etanólico C+ y para el control negativo se reconstituyó 10 mg del componente C del kit en 245 µl de PBS 1X estéril (Gibco®, Invitrogen USA). Se añadieron 10 µl de esta solución a un volumen final de 500 µl, 2 horas antes de leer en el citómetro de flujo (Accuri C6 BD). Después de 1 hora de incubación se añadió 1 µl de la solución de tinción intermedia del reactivo CellROX® Deep Red con DMSO a una concentración final de 500 nM en todos los pocillos a analizar. Durante los últimos 15 minutos de la tinción, se añadió 0.5 µl de SYTOX® Blue Dead Cell 1 µM que tiñe parásitos muertos.

Se escogió trabajar con el kit CellROX® Deep Red (Life Technologies) debido a su previo uso en tinción de membrana en otras células y a su facilidad de lectura. CellROX® Deep Red no es fluorescente por sí solo (Lifetechnologies, 2011, p. 10), sino que emite fluorescencia al ser oxidado (Lipoldová, M., 2012, p. 38).

Se trabajó únicamente con las concentraciones C1 a C4 de lupalina y C+ ajustando la cantidad de cada compuesto para un volumen final de 500 µl.

2.4. Toxicidad de la lupalina sobre macrófagos murinos (RAW 264.7) y células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC)

Se utilizó macrófagos RAW 264.7 porque son las células blanco del parásito *Leishmania* sp. Y células HUVEC porque han sido utilizadas en varios estudios

al determinar citotoxicidad de distintos compuestos. La toxicidad de las distintas soluciones se evaluó sobre células RAW 264.7 y HUVEC mediante el método MTT ya mencionado en el punto 2.3.3.

2.5. Lupanina vs. Leishmania mexicana en amastigotes intracelulares

2.5.1. Infección de macrófagos RAW 264.7 con promastigotes infectivos de *L. mexicana* teñidos con [5(6)]- diacetato de carboxifluoresceína éster succinimidil (CFSE)

Se trabajó con el modelo de infección expuesto en el punto 2.2.3 con la variante de la tinción de promastigotes infectivos. Esta tinción se realizó con CFSE 5 μ M tiñendo la cantidad de parásitos calculada en relación 1:20 y volumen final de 3 ml, estandarizando protocolos ya descritos por Lyons, A., 2000 y Quah, B. et al., 2012. Se realizó un mínimo de tres ensayos de esta tinción y se analizó la carga parasitaria mediante lecturas en un citómetro de flujo Accuri C6 a longitud de onda de emisión de 533 ± 30 nm. La tinción de los promastigotes con el fluoróforo CFSE se realizó antes de su infección a los $M\phi$, lo que garantiza que al momento de analizar en el citómetro de flujo se tome en cuenta únicamente la fluorescencia de los promastigotes que se convirtieron en amastigotes intracelulares como lo indica Forestier, C., et al. (2011, pp. 322-323).

2.5.2. Carga Parasitaria

2.5.2.1. Análisis de carga parasitaria mediante citometría de flujo

Siguiendo el modelo de infección y tinción descrita en el punto 2.5.1, se evaluó la cantidad de parásitos (carga parasitaria) que reaccionaron a las concentraciones de lupanina y a los tratamientos mencionados. A través de citometría de flujo se comparó el porcentaje de fluorescencia de los controles

positivos: promastigotes de *L. mexicana*, macrófagos RAW 264.7 y amastigotes intracelulares con y sin tratamientos. Se analizó los resultados mediante citómetro de flujo Accuri C6 a longitud de onda de emisión de 533 ± 30 nm.

2.5.2.2. Análisis de inhibición de carga parasitaria mediante

PCR cuantitativa

La inhibición de la división celular de amastigotes intracelulares o carga parasitaria de *L. mexicana* causada por las concentraciones de lupanina, Glucantime®, C+ y NaOH se determinó mediante PCR cuantitativa (qPCR). En primer lugar se estableció una curva estándar de muestras de DNA de *L. mexicana* sin tratamiento (Fig. 15).

La qPCR se realizó amplificando un fragmento de DNA del kinetoplasto del minicírculo de promastigotes de *Leishmania* a partir de la extracción de DNA de amastigotes intracelulares expuestos a los distintos tratamientos siguiendo el protocolo del inserto del kit High Pure Template Preparation (Roche LOT: 10202700) realizando las modificaciones mencionadas a continuación. En el paso final de elución del DNA se realizó dos centrifugaciones por 1 minuto a 8000 g, de esta manera se obtuvo mayor concentración de DNA de cada muestra. Posteriormente, se cuantificó el DNA extraído (Take3™ BioTek) y se procedió a preparar el mix para qPCR (CFX96™ Real-Time System de BIO-RAD).

Como lo describe Nicolas, L., et al. (2002, pp. 1666-1668) el fragmento de 120-bp del kinetoplasto de *Leishmania* sp. fue amplificado utilizando los primers: forward, 5'-CCTATTTTACACCAACCCCCAGT-3' [JW11]; reverse, 5'-GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA-3' [JW12] que se adquirieron a Integrated DNA technologies. Este fragmento de amplificación es específico para la familia Trypanosomatidae a la que pertenece el parásito *L. mexicana*.

Para la reacción de qPCR se siguió el inserto del kit de SsoFast™ EvaGreen® Supermix de BIO-RAD a un volumen final de 20 µl añadiendo 1 µl de cada primer, 1 µl de H₂O High Pure, 9 µl de EvaGreen® Supermix y 8 µl de DNA. El

perfil térmico de la qPCR se modificó y estandarizó a partir del descrito por Nicolas, L., et al. (2002, p. 1667) (Tabla 3).

Tabla 3. Perfil térmico qPCR.

	Ciclos	Temperatura [°C]	Tiempo [s]
Desnaturalización	1	95	600
Amplificación	40	95	10
		56	10
		72	5
Melting	1	65	5
END		40	30

Nota: Condiciones de amplificación de DNA extraído de amastigotes intracelulares de *L. mexicana*.

Se determinó el porcentaje de inhibición de carga parasitaria que presentó cada concentración de lupanina utilizada, Glucantime®, C+ y NaOH comprándolos con el control (amastigotes intracelulares de *L. mexicana* sin tratamiento). Este porcentaje se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[\frac{\left(\frac{\text{Control}}{100} \right) - \left(\frac{\text{Muestra}}{100} \right)}{\frac{\text{Control}}{100}} \right] * 100$$

(Ec. 3)

(Doroud, D. et al., 2011, p. 157)

2.6. Análisis estadístico

Los ensayos se realizaron en un mínimo de 3 repeticiones y cada ensayo por triplicado para cada concentración de los tratamientos. Los datos fueron analizados mediante el software GraphPad Prism 6.0 tomando en cuenta una diferencia estadísticamente significativa con valor $p < 0.05$ e intervalos de confianza del 95%.

Capítulo III

3. Resultados

3.1. Dosis-Respuesta y determinación de IC₅₀

Con el propósito de determinar el efecto de la lupanina sobre los parásitos se ensayó el grado de toxicidad del alcaloide sobre los diferentes estados biológicos de *L. mexicana*. Se procedió a determinar el valor de IC₅₀ de lupanina en cultivos de *L. mexicana* preparados como se describe en la sección de metodología.

Utilizando como referencia el control (parásitos sin tratamiento) se determinó el valor de la concentración inhibitoria al 50% (IC₅₀) a las 24 horas de su exposición a las 7 concentraciones de lupanina. El valor IC₅₀ fue 0.24 mg/ml \pm 0.032 para promastigotes y 0.78 mg/ml \pm 0.049 en amastigotes axénicos.

Se realizó un análisis en el tiempo del valor de IC₅₀ de lupanina, Glucantime® y C+ sobre promastigotes y amastigotes axénicos de *L. mexicana* a las 12, 24, 36 y 48 horas, calculando el porcentaje de viabilidad mediante la ecuación 2. En el caso de promastigotes (Figura 9) se observó que a las 12 horas existe menor número de células viables expuestas a la dosis IC₅₀ de lupanina. En amastigotes axénicos, se observa que a las 12 y 24 horas el 50% de la población muere en comparación al control (amastigotes axénicos sin tratamiento) (Figura 10).

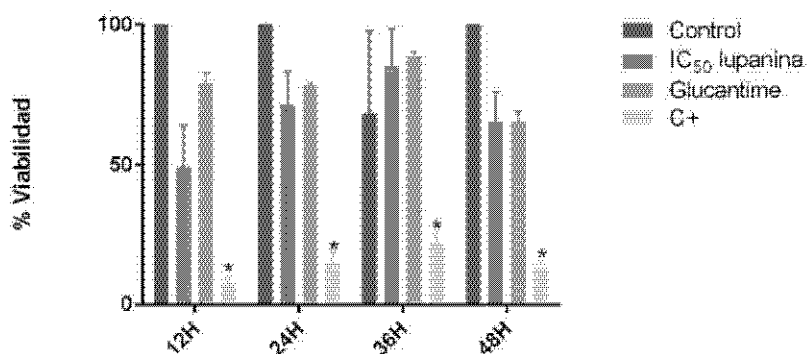


Figura 9. Viabilidad de promastigotes de *L. mexicana*.

a) Análisis de viabilidad celular de promastigotes del séptimo día tratados con IC₅₀ de lupanina: 0.24 mg/ml \pm 0.032; Glucantime® y C+ durante 12, 24, 36 y 48 horas. * indica diferencia significativa $p = 0.0286$ analizada con prueba estadística Kolmogorov-Smirnov.

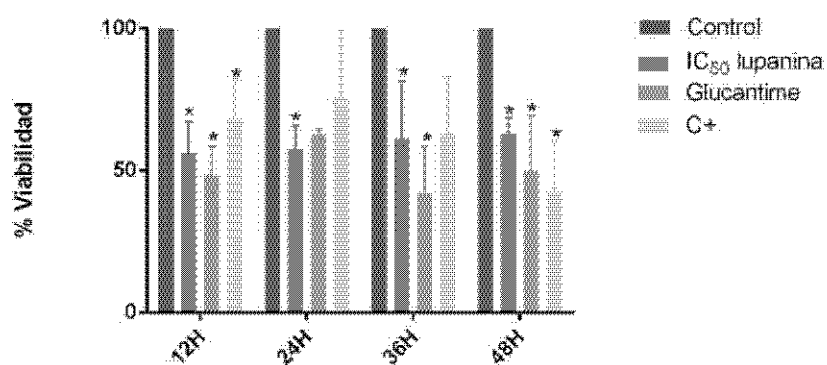


Figura 10. Viabilidad de amastigotes axénicos de *L. mexicana*.

a) Análisis del porcentaje de supervivencia de amastigotes axénicos del tercer día tratados con IC₅₀ de lupanina: 0.78 mg/ml \pm 0.049, Glucantime® y C+ durante 12, 24, 36 y 48 horas. * indica diferencia significativa $p = 0.0286$ analizada con prueba estadística Kolmogorov-Smirnov.

3.2. Análisis de estrés oxidativo por citometría de flujo

Con el propósito de determinar si los tratamientos lupanina tienen acción sobre la producción de radicales libres de oxígeno en promastigotes de *L. mexicana* se realizó la tinción de promastigotes al séptimo día de su crecimiento y a 24h de su tratamiento con lupanina y C+ como se indica en la sección de metodología.

Se analizó resultados generados por el software del citómetro de flujo Accuri C6 y se promedió 3 ensayos representativos del valor de Intensidad de fluorescencia (MFI) específico de CellROX® Deep Red (Figura 11) en el software estadístico GraphPad Prism 6.0 comparando el control de ensayo (promastigotes sin tratamiento) con las 4 primeras concentraciones de lupanina (C1 a C4). En la Figura 11, se puede observar que el control (parásitos sin tratamiento) tiene fluorescencia innata debido a su producción basal de ROS, las concentraciones C1 a C4 de lupanina inhiben esta generación de ROS mientras que el C+ la incrementa. Mediante estos resultados se puede predecir que el alcaloide lupanina tiene un efecto sobre promastigotes de *L. mexicana* mediante una inhibición en su producción basal de ROS a diferencia del C+ que la incrementa, teniendo ambos compuestos leishmanicidas distintas rutas de acción sobre estos parásitos.

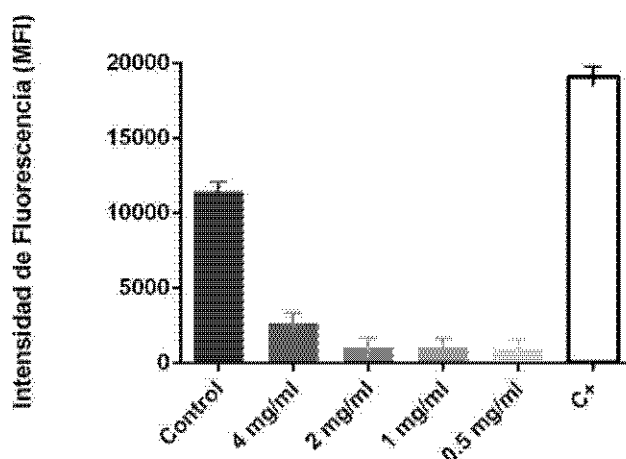


Figura 11. Análisis de ROS.

- a) Promastigotes fueron teñidos con 1 μ l de CellROX® Deep Red como se describe en la sección de metodología. La recolección de datos y su análisis se realizó tomando datos reflejados a una longitud de onda de emisión de 675 ± 25 nm del citómetro de flujo Accuri C6. El análisis estadístico se lo realizó tomando 3 ensayos significativos y promediando los valores de MFI. Los datos se expresan en comparación a cuanto aumenta o disminuye su generación de ROS con respecto al control (promastigotes teñidos sin tratamiento), C1 a C4 de lupanina y C+.

3.3. Toxicidad de la lupanina sobre macrófagos de ratón (RAW 264.7) y células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC)

Utilizando como referencia el control (RAW 264.7 y células HUVEC sin tratamientos), se analizó la toxicidad de la lupanina sobre estas células eucariotas (Fig. 12). No se determinó una diferencia significativa entre las células HUVEC sin tratamiento y las tratadas. En macrófagos se observa una mayor diferencia en comparación a las HUVEC pero se determinó mediante el software estadístico GraphPad Prism 6.0 que esta diferencia no es estadísticamente significativa.

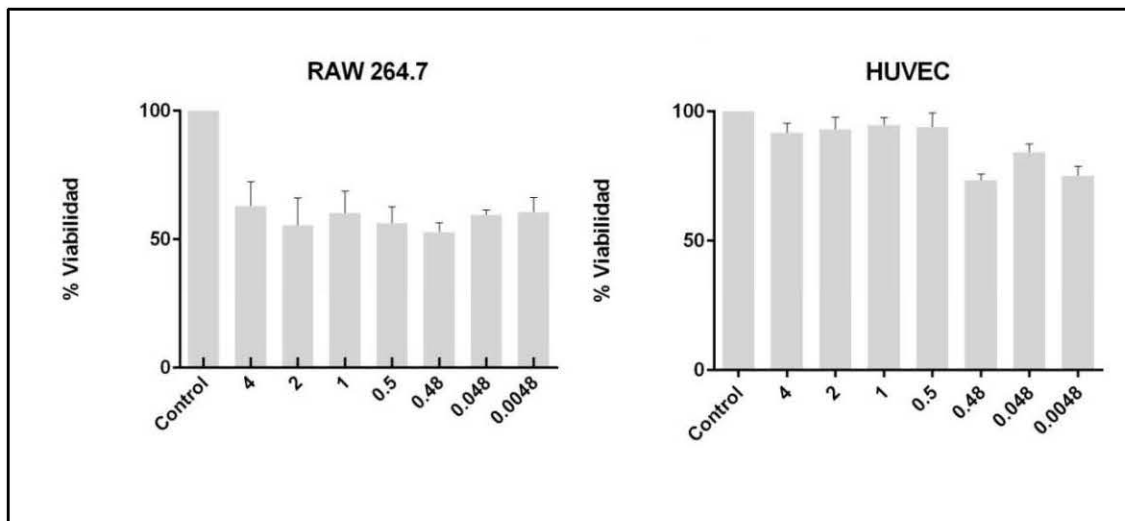


Figura 12. Toxicidad de la lupanina en líneas celulares.

- a) Se trató a células HUVEC y RAW 264.7 con las 7 concentraciones de lupanina y se analizó viabilidad celular con MTT como se describe en la sección de metodología. El control son células sin ningún tratamiento que presentan 100% de supervivencia o viabilidad celular. No presentan diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$.

3.4. Análisis de la carga parasitaria en amastigotes intracelulares

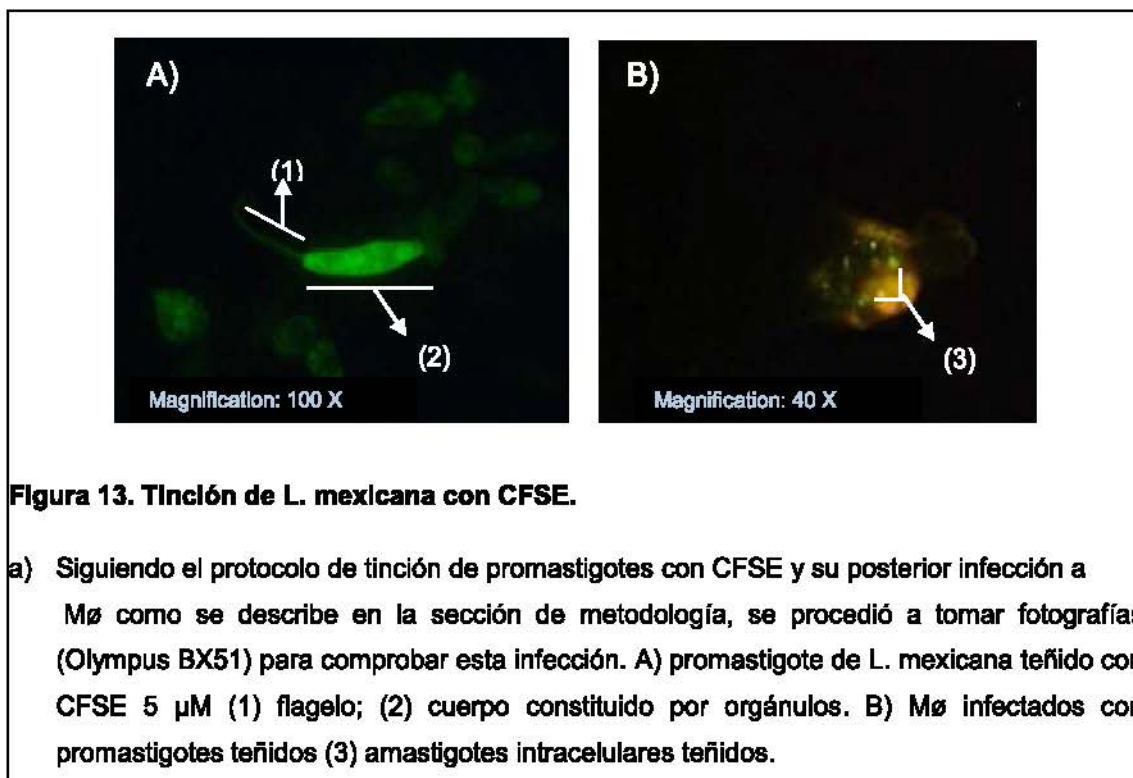
Con el propósito de determinar el efecto de las concentraciones de lupanina en amastigotes de *L. mexicana* en el interior de macrófagos se evaluó la carga parasitaria de estos amastigotes intracelulares mediante citometría de flujo y qPCR.

3.4.1. Análisis de viabilidad celular mediante citometría de flujo

Mediante citometría de flujo se analizó la viabilidad celular que es directamente proporcional a la fluorescencia de los parásitos teñidos con CFSE como se describe en la metodología. Esto se realizó para determinar la cantidad de parásitos que emitían fluorescencia y como ésta disminuía por efecto de cada tratamiento. En primera instancia, se comprobó la infección de promastigotes de *L. mexicana* con *Mø* y su tinción con CFSE, mediante fotografías en

microscopio de contraste (Olympus BX51-software cellSense Dimensions) como se observa en la Figura 13. Al analizar carga parasitaria (cantidad de parásitos) de amastigotes intracelulares se trabajó con los datos de intensidad de fluorescencia (MFI) del fluoróforo CFSE arrojados por el citómetro de flujo Accuri C6. Estos datos se convirtieron en porcentaje de fluorescencia (Figura 14).

Con respecto al control, se puede determinar que la C1 de lúpulina tiene mayor acción tóxica sobre amastigotes intracelulares. Mientras que su exposición a Glucantime®, medicamento al cual esta cepa de *Leishmania* es resistente, no presenta mayor diferencia en comparación al control. El NaOH que se utiliza para solubilizar y mantener la lúpulina, tampoco presenta diferencia significativa, lo que quiere decir que el efecto de la lúpulina sobre amastigotes intracelulares de *L. mexicana* teñidos con CFSE se debe exclusivamente a su naturaleza tóxica más no a su mezcla con NaOH.



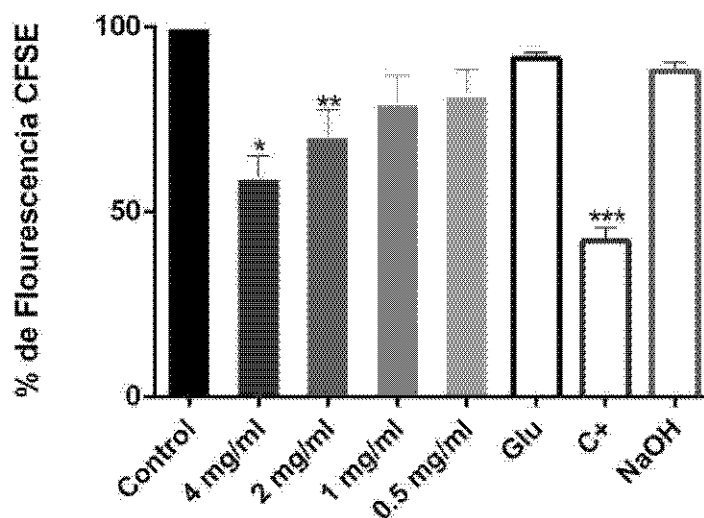


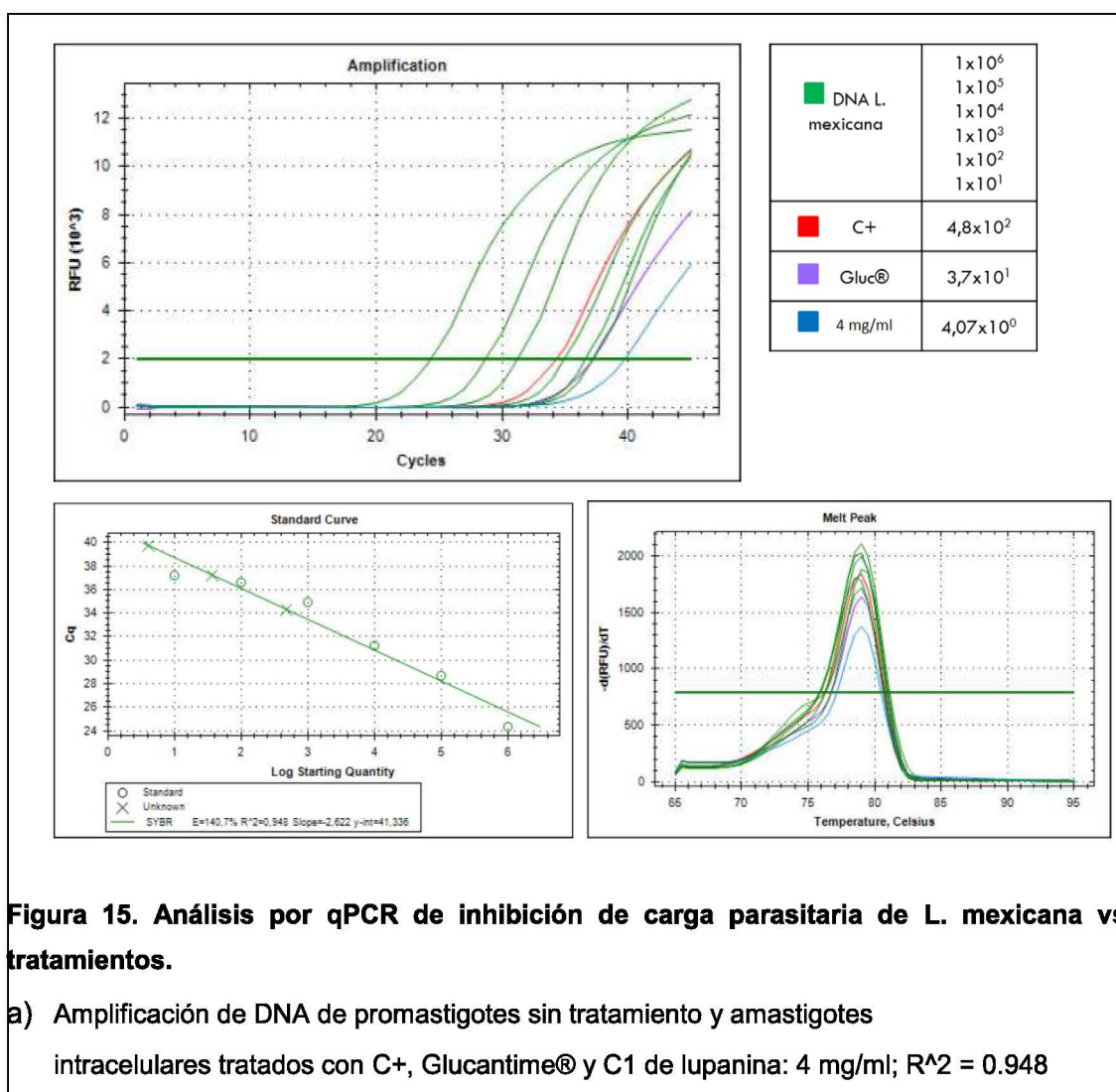
Figura 14. Emisión de fluorescencia relativa de carga parasitaria de amastigotes intracelulares.

- a) MØ se infectaron con promastigotes teñidos con CFSE como se indica en la metodología. La recolección de datos se hizo a través del citómetro de flujo Accuri C6. El análisis estadístico se lo realizó tomando 3 ensayos significativos de los valores de MFI y convirtiéndolos en porcentajes de fluorescencia, medida a longitud de onda de emisión de 533 ± 30 nm. El control está compuesto de los amastigotes intracelulares teñidos. * indica diferencia significativa $p = 0.0144$; ** indica diferencia significativa $p = 0.0021$; *** indica diferencia muy significativa $p = 0.0001$, todas con respecto al grupo control (amastigotes intracelulares teñidos y sin tratamiento).

3.4.2. Análisis de inhibición de carga parasitaria mediante PCR cuantitativa

A través de PCR cuantitativa (qPCR) se realizó una curva estándar de DNA extraído de *L. mexicana* como se indica en el punto 2.5.2.2 de la metodología. En la Figura 15 se observa la primera curva de color verde perteneciente a 1×10^6 parásitos, de forma descendente las curvas corresponden a 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 y 1×10^1 respectivamente.

Mediante los resultados obtenidos por la qPCR se tomó los datos de cantidad de DNA amplificado en logaritmo para determinar el porcentaje de inhibición de carga parasitaria mediante la Ec. 2. Estos porcentajes se analizaron con la prueba estadística t de student entre el control y cada tratamiento determinando diferencias significativas con valor $p < 0.05$ (Figura 17). En esta figura se puede observar que la C1 de lupanina es la que presenta aproximadamente un 45% de inhibición en comparación con el control (DNA de *L. mexicana* sin tratamiento) Glucantime® y NaOH no presenta un efecto significativo sobre los parásitos.



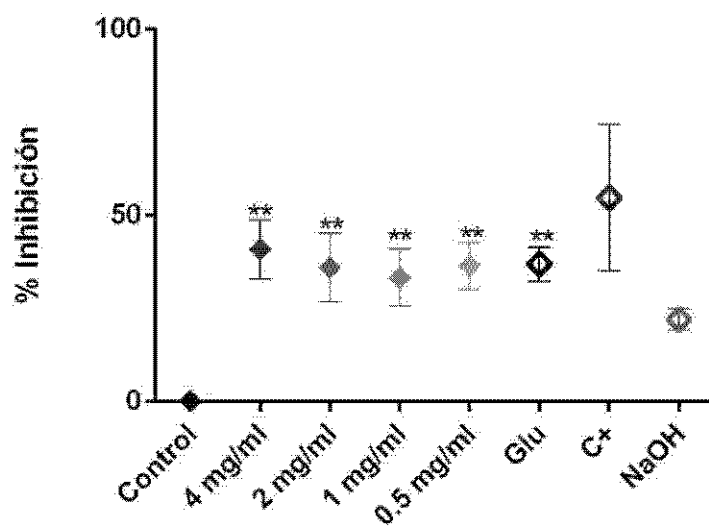


Figura 16. Porcentaje de inhibición de carga parasitaria de amastigotes intracelulares.

- a) *Mø* infectados con promastigotes como se menciona en la metodología. Se realizó el análisis estadístico tomando en cuenta 5 ensayos significativos, transformando al valor logarítmico de DNA amplificado en los porcentajes de inhibición para cada concentración de lupanina y tratamiento agregado. * indica diferencia significativa $p = 0.0234$; ** indica diferencia significativa $p = 0.0047$; todas en comparación con el control (amastigotes intracelulares sin tratamiento).

Capítulo IV

4. Discusión

Los datos del presente estudio demostraron que el tratamiento de promastigotes y amastigotes axénicos de *L. mexicana* con el alcaloide quinolizidínico lupanina produjo la muerte de esta cepa de parásitos resistente al Glucantime®.

Mediante esta investigación se determinaron diferencias entre las respuestas de cada estadio biológico de *L. mexicana* y su exposición a la lupanina. Como lo dice Rojas, J., et al. (2012, p. 93) en amastigotes axénicos de *L. mexicana* el valor de IC_{50} es más alto debido a su sensibilidad hacia compuestos leishmanicidas. La sensibilidad innata de cada forma biológica del parásito es diferente, siendo la de la fase no móvil (amastigote axénico) superior a la de la fase móvil (promastigote), también existen diferencias morfológicas, metabólicas y de fuente de energía. (Rojas, J. et al., 2012, p. 93).

La diferente respuesta entre promastigotes y amastigotes axénicos de *L. mexicana* se debe también a los distintos ambientes in vitro en el que cada estadio biológico se desarrolla. La forma promastigote no necesita una célula hospedera y convierte a los aminoácidos y azúcares en su fuente de energía, mientras que el amastigote prolifera al interior de las células blanco (macrófagos) y su fuente de energía son los ácidos grasos que se metabolizan en H_2O y CO_2 . Otra diferencia importante es el pH y temperatura de sus entornos, el promastigote desarrolla su crecimiento a $27^{\circ}C$ y pH 7, a diferencia del amastigote que obligadamente necesita $37^{\circ}C$ y un ambiente ácido para sobrevivir con pH 4-6 (Campos, J., 2008, p. 16).

Al hablar específicamente de alcaloides quinolizidínicos (AQ) como la lupanina, se ha analizado y determinado su actividad antiparasitaria sobre *Trypanosoma* sp.. Este tipo de alcaloides han sido reportados como importantes compuestos con un amplio rango de actividad biológica y posibles candidatos para nuevos

tratamientos contra distintas parasitosis (Turabekova, M. et al., 2011, p. 183). Por ejemplo, existen reportes sobre el efecto de la esparteína y lupanina (AQ) sobre *Trypanosoma b. brucei*, parásito perteneciente a la misma familia que *Leishmania sp.* y que causa tripasoniomiasis, el efecto anti parasitario fue ineficiente a concentraciones menores de 100 µg/ml (Rosenkranz, V., y Wink, M., 2008, pp. 2467-2468). A diferencia de los datos obtenidos en esta investigación, en la que la lupanina presenta su actividad citotóxica sobre *L. mexicana* con valores IC_{50} de 0.24 mg/ml \pm 0.032 para promastigotes y 0.78 mg/ml \pm 0.049 sobre amastigotes axénicos.

En otro estudio, se reportó que la lupanina no tiene efecto sobre *Trypanosoma congolense* pero sí sobre *Trypanosoma brucei* con concentraciones mayores a 1000 µM (Merschjohann, K. et al., 2001, p. 624). La esparteína (AQ) de la misma clase que la lupanina presenta un IC_{50} entre 8.7 a 77 µg/ml sobre amastigotes axénicos de *Leishmania donovani* (Turabekova, M. et al., 2011, pp. 183-185).

Otra forma de determinar el efecto de los compuestos anti leishmania, es el estrés oxidativo generado por los radicales libres de oxígeno (ROS) y los resultados observados en esta investigación abren una puerta sobre cómo funcionaría la lupanina sobre promastigotes de *L. mexicana* determinando que este alcaloide causa inhibición de la producción de ROS. Sin embargo, debe realizarse mayor investigación sobre el efecto de esta inhibición y cuáles podrían ser las moléculas del parásito afectadas por la lupanina.

La producción de ROS es un fenómeno común en bacterias, parásitos y células eucariotas y se genera por su exposición a agentes nocivos externos. Como un mecanismo de defensa ante los agentes externos (Mittler, R. et al., 2011, p. 300-304). Una manera de comprobar el efecto antiparasitario de un compuesto específico es mediante la cuantificación de la generación de ROS, por ser la señalización que destruye componentes macromoleculares de la célula como DNA, proteínas y lípidos (Fonseca-Silva, F. et al., 2011, p. 1).

Como lo describieron Fonseca-Silva y colaboradores (2011, p. 1), al determinar acción leishmanicida de un compuesto es necesario saber si en promastigotes de *Leishmania* sp. existe una disfunción mitocondrial causada por la generación de estos radicales. Esta determinación se la hace tiñendo promastigotes específicamente para detectar radicales libres de oxígeno con fluorogénicos (reactivo que emite fluorescencia) y analizando resultados a través de citometría de flujo.

En este trabajo, se inició la investigación de una posible ruta o mecanismo de acción de la lupanina. En primera instancia, se observó que la lupanina podría apagar el sistema de defensa de promastigotes de *L. mexicana* inhibiendo la producción de ROS. Al obtener estos resultados se podría decir que la ruta de acción de la lupanina tiene relación con la ruta de glutatión (GSH) de este parásito ya que el GSH es una de las defensas celulares más importantes contra estrés oxidativo intracelular en *Leishmania* sp., además de ser una molécula que protege los kinetoplastos de compuestos tóxicos como ROS (Sengupta, S. et al., 2011, pp. 1-2). Se ha determinado la relación íntima existente entre producción de ROS y los niveles de GSH al causar apoptosis celular durante el incremento del nivel de producción de ROS y disminución de los niveles de GSH (Sengupta, S. et al., 2011, p. 7). Dicho esto, se podría concluir que la lupanina reduce los niveles de producción de ROS al comparar la producción basal de estos radicales en parásitos sin tratamiento con la de los parásitos expuestos al tratamiento. Mediante los resultados de esta investigación se puede determinar también que la posible ruta de acción del alcaloide lupanina es diferente al del C+ de este experimento y se podría deducir que los niveles de GSH en parásitos expuestos a lupanina son mayores a los tratados con C+.

Como ya se ha mencionado, el promastigote ingresa y se fagocita en las células blanco (macrófagos) del hospedero, denominándose amastigote intracelular. Este es la forma biológica del parásito que genera la enfermedad por lo que es trascendental realizar ensayos sobre el efecto del compuesto leishmanicida sobre este estadio biológico.

La determinación de la carga parasitaria (cantidad de parásitos) de amastigotes intracelulares ya ha sido analizada en otros sistemas y se ha comprobado la acción de alcaloides mediante citometría de flujo y qPCR. Mediante citometría de flujo, se puede comparar el efecto de un determinado compuesto sobre amastigotes intracelulares teñidos, esta diferencia se nota tanto en los picos de fluorescencia emitidos por el programa como por el valor de la medida de intensidad de la fluorescencia (MFI). En el caso de tinción con CFSE, la fluorescencia emitida es directamente proporcional a la cantidad de parásitos vivos (Messaritakis, I. et al., 2010, pp. 384-385), por lo tanto, la comparación de cada tratamiento añadido a los parásitos con el control (parásitos sin tratamiento) es la clave para verificar un efecto leishmanicida de la lupanina. Como se observa en la Figura 14, la C1: 4 mg/ml tiene mayor efecto leishmanicida que las otras concentraciones.

Se realizó también la extracción de DNA de *L. mexicana* para determinar la carga parasitaria y porcentaje de inhibición de la división celular de los parásitos generada por los tratamientos, mediante PCR cuantitativa (qPCR). La técnica de qPCR es popular debido a su alta sensibilidad, amplio rango de cuantificación y buena reproducibilidad. La fidelidad hacia esta prueba se asocia con su especificidad real, validez y por ser un método cuantitativo confiable y exacto (Pfaffl, M. W., 2004, p. 88).

Esta prueba ha sido realizada para comprobar la presencia del parásito (Van Der Meide, W. et al., 2008, pp. 75-76) y siguiendo este principio se puede determinar el porcentaje de inhibición de carga parasitaria que cada concentración de lupanina, Glucantime®, NaOH y C+ presentaron. Este valor es una manera de comprobar el efecto de los compuestos sobre la inhibición de la división celular de amastigotes intracelulares de *L. mexicana* (Doroud, D. et al., 2011, pp. 158-159). En el caso de la lupanina, la C1 fue la que presentó mayor efecto en comparación al control.

En esta investigación es necesaria la evaluación del efecto tóxico de la lupanina sobre las líneas celulares HUVEC y RAW 264.7. La principal razón para realizar este experimento es que las células RAW 264.7 son los

macrófagos (células blanco del parásito) que se encuentran naturalmente en el hospedero final del parásito y se debe comprobar que el alcaloide tiene un efecto exclusivo sobre los parásitos más no sobre las células del hospedero. A pesar de que en esta investigación se observa que existe alrededor del 40% de macrófagos afectados por la lupanina se determinó mediante análisis estadístico (ANOVA-GraphPad Prism 6.0) que no existe diferencia estadísticamente significativa entre células tratadas y el control (células sin tratamiento) por lo que se puede determinar que la lupanina no presenta un efecto citotóxico.

Cabe mencionar que existen extractos etanólicos y alcaloides de otras leguminosas de la familia Fabaceae, a la que pertenece *Lupinus mutabilis* Sweet, que han sido estudiados y analizados como derivados antiparasitarios y con actividad citotóxica. Por ejemplo, extractos etanólicos de la Fabaceae de seda, *Albizia coriaria* presentan actividad leishmanicida sobre amastigotes axénicos de *Leishmania major* a concentraciones de 1000 µg/ml (Kigundu, E. V. et al., 2009, pp. 504-505).

Al igual que extractos etanólicos de las leguminosas: Entada africana, *Cassia sieberiana*, *Piliostigma thonningii*, *Bobgunnia madagascarensis*, *Tamarindus indica* que presentan actividad leishmanicida versus promastigotes y amastigotes axénicos de *Leishmania major* entre valores de 0.2 hasta 99 µg/ml (Ahua, K. M. et al., 2007, pp. 100-103). Se debe tomar en cuenta que la especie utilizada en estos estudios se presenta únicamente en el Viejo Mundo y genera leishmaniasis visceral, a diferencia de la cepa utilizada en este estudio.

También se ha realizado estudios acerca de los alcaloides y su potencial leishmanicida (Hussain, H. et al., 2013, pp. F-J). Alcaloides de la leguminosa conocida como carnavalito (*Senna spectabilis*) presentan actividad citotóxica sobre promastigotes de *Leishmania major* con valores IC_{50} entre 20 a 30 µg/mL (De Albuquerque, G. et al., 2014, pp. 279-280). De igual forma, los alcaloides de *Erythrina verna* (leguminosa de la familia Fabaceae) presentan actividad leishmanicida versus promastigotes de *Leishmania amazonensis* a

concentraciones desde 39 y mayores a 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Callejon, D. R. et al., 2014, p. 5696).

Por lo datos expuestos en este estudio, se puede sugerir que la lupanina podría utilizarse eventualmente como un tratamiento contra leishmaniasis cutánea y muco-cutánea. Sin embargo, ensayos in vivo son necesarios para comprobar los resultados de esta investigación.

Capítulo V

5. Conclusiones y Recomendaciones

La leishmaniasis es un problema de salud pública y su diagnóstico y tratamiento es complicado debido a su amplio rango de epidemiología.

Los alcaloides de tipo quinolizidínico como la lupanina podrían presentarse como una alternativa sustentable para el tratamiento de leishmaniasis en el Ecuador.

El efecto leishmanicida de la lupanina, alcaloide quinolizidínico derivado de *Lupinus mutabilis* Sweet, tiene acción citotóxica sobre promastigotes, amastigotes axénicos y modelo de infección de *Leishmania mexicana* MHOM/B2/82/BEL-21 (BEL-21) cepa resistente al antimonio pentavalente Glucantime®, mantenida bajo condiciones controladas de laboratorio.

Los valores de IC_{50} son de 0.24 mg/ml \pm 0.032 y 0.78 mg/ml \pm 0.049, para promastigotes y amastigotes axénicos de *L. mexicana*, respectivamente. Siendo este último la forma biológica más sensible a la lupanina.

El análisis de citotoxicidad de lupanina sobre células RAW 264.7 y HUVEC determinó que este alcaloide no es significativamente tóxico sobre estas células eucariotas tratadas.

La lupanina presenta una inhibición en la producción de ROS de promastigotes de *L. mexicana*, lo que podría explicarse al comparar los parásitos tratados con lupanina con el control negativo (parásitos sin tratamiento) y C+.

La determinación de la carga parasitaria mediante citometría de flujo y qPCR, son dos métodos importantes para el estudio del efecto de la lupanina sobre amastigotes intracelulares de *L. mexicana*.

Al analizar la carga parasitaria, la concentración con mayor efecto es C1:4 mg/ml, tanto en la prueba de tinción con CFSE como en el análisis mediante qPCR.

Con la prueba CFSE se puede concluir que las concentraciones por debajo de C3 presentan un efecto significativo mientras que las concentraciones C1: 4 mg/ml y C2: 2 mg/ml presentan un efecto leishmanicida significativo en comparación al grupo control.

Mediante el análisis de carga parasitaria por qPCR, se determinó el efecto tóxico de C1 de lupanina. En este caso, las concentraciones C2 a C4 si presentaron diferencias y efecto leishmanicida, todas menores a C1.

Se debe tomar en cuenta que los resultados obtenidos en la presente investigación pueden variar en otras especies y cepas de leishmania por su diferencia en composición bioquímica. En consecuencia, la actividad leishmanicida de la lupanina puede o no tener un efecto similar.

Se recomienda estudiar, a nivel molecular, el efecto de la lupanina. Es decir, cual es la respuesta del parásito, como éste asimila la lupanina y determinar la ruta específica de acción del mismo. Se sugiere estudiar la generación de ROS y los niveles de GSH en *L. mexicana*, porque este podría ser el mecanismo de acción de este alcaloide.

Finalmente, es recomendable un estudio posterior en base a los resultados de esta investigación. Analizar el efecto de la lupanina en modelos in vivo de infección por leishmaniasis, como puede ser el uso de ratones BALB/c infectados con la enfermedad.

REFERENCIAS

- Ahua, K. M., Ioset, J. R., Ioset, K. N., Diallo, D., Muel, J., y Hostettmann, K. (2007). Antileishmanial activities associated with plants used in the Malian traditional medicine. *J Ethnopharmacol*, 110(1), 99-104. doi: 10.1016/j.jep.2006.09.030
- Ait-Oudhia, K., Gazanion, E., Vergnes, B., Oury, B., y Sereno, D. (2011). Leishmania antimony resistance: what we know what we can learn from the field. *Parasitol Res*, 109, 1225-1232. doi: DOI 10.1007/s00436-011-2555-5
- Aldaz, R. (2009). Efecto de la Aplicación de recubrimientos alcaloidales del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet) en la vida útil del borjón (*Borjón patinoi* Cuat.). (Bioquímico Farmacéutico), Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Alvar, J. (2001). LAS LEISHMANIASIS: DE LA BIOLOGÍA AL CONTROL (L. I. S.A. Ed. 2da ed.). Instituto de Salud Carlos III. pp. 1-200.
- Alvar, J., Velez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Team, W. H. O. Leishmaniasis Control. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, 7(5), e35671, 35671-35612. doi: 10.1371/journal.pone.0035671
- Alvar, J., Yactayo, S., y Bern, C. (2006). Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol*, 22(12), 552-557. doi: 10.1016/j.pt.2006.09.004
- Bates, P.A. (1993). Axenic culture of *Leishmania* Amastigotes. *Parasitology Today*, 9(4), 143-146. doi: 10.1016/0169-4758(93)90181-E
- Bunsupa, S., Saito, K., y Yamazaki, M. (2013). Molecular Biology and Biotechnology of Quinolizidine Alkaloid Biosynthesis in Leguminosae Plants. In S. L. Chandra, H., Varma, A. (Ed.), *Biotechnology for Medicinal Plants. Micropropagation and Improvement* (pp. 263-274). Springer. doi: 10.1007/978-3-642-29974-2
- Calvopina, M., Armijos, R., y Hashiguchi, Y. (2004). Epidemiology of Leishmaniasis in Ecuador: Current Status of Knowledge - A Review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(7), 663-672.

- Callejon, D. R., Riul, T. B., Feitosa, L. G., Guaratini, T., Silva, D. B., Adhikari, A., Lopes, N. P. (2014). Leishmanicidal evaluation of tetrahydroprotoberberine and spirocyclic erythrina-alkaloids. *Molecules*, 19(5), 5692-5703. doi: 10.3390/molecules19055692
- 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. (Doctor en Bioquímica y Biología Molecular), Universidad de Granada. 5-149
- Carmali, S., Alves, V., Coelho, I., Ferreira, L., y Lourenco, A. (2010). Recovery of lupanine from *Lupinus albus* L. leaching waters. *Separation and Purification Technology*, 74, 38-43. doi: 10.1016/j.seppur.2010.05.005
- Carter, K. C., Hutchison, S., Henriquez, F. L., Legare, D., Ouellette, M., Roberts, C. W., y Mullen, A. B. (2006). Resistance of *Leishmania donovani* to sodium stibogluconate is related to the expression of host and parasite gamma-glutamylcysteine synthetase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(1), 88-95. doi: 10.1128/AAC.50.1.88-95.2006
- Castañeda, A. (2013). 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. (Ingeniera en Biotecnología), Escuela Superior Politécnica del Ejército.
- Colares, V., Almeida-Souza, F., Taniwaki, NN., Souza, Cda S., da Costa, JG., Calabrese Kda, S., y Abreu-Silva, AL. (2013). In Vitro Antileishmanial Activity of Essential Oil of *Vanillosmopsis arborea* (Asteraceae) Baker. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 1-7. doi: 10.1155/2013/727042
- Cushnie, T. P., Cushnie, B., y Lamb, A. J. (2014). Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.06.001

- de Albuquerque, G., Silva, M. C., Guimaraes, T. P., Pinheiro, K. M., da Matta, C. B., de Queiroz, A. C., Viegas, C., Jr. (2014). Leishmanicidal activity of the crude extract, fractions and major piperidine alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis*. *Phytomedicine*, 21(3), 277-281. doi: 10.1016/j.phymed.2013.09.024
- Denton, H., McGregor, J. C., y Coombs, G. H. (2004). Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochemical Journal*, 381(Pt 2), 405-412. doi: 10.1042/BJ20040283
- Doroud, D., Zahedifard, F., Vatanara, A., Najafabadi, A. R., Taslimi, Y., Vahabpour, R., . . . Rafati, S. (2011). Delivery of a cocktail DNA vaccine encoding cysteine proteinases type I, II and III with solid lipid nanoparticles potentiate protective immunity against *Leishmania major* infection. *J Control Release*, 153(2), 154-162. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.04.011
- Fonseca-Silva, F., Inacio, JDF., Canto-Cavalheiro, MM., y Almeida-Amaral, EE. (2011). Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Dysfunction Contribute to Quercetin Induced Death in *Leishmania amazonensis*. *PLoS ONE*, 6(2), 1-7. doi:10.1371/journal.pone.0014666
- Forestier, C. L., Machu, C., Loussert, C., Pescher, P., y Spath, G. F. (2011). Imaging host cell-*Leishmania* interaction dynamics implicates parasite motility, lysosome recruitment, and host cell wounding in the infection process. *Cell Host Microbe*, 9(4), 319-330. doi: 10.1016/j.chom.2011.03.011
- Hussain, H., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., Green, I. R., y Gibbons, S. (2013). Fruitful Decade for Antileishmanial Compounds from 2002 to Late 2011. *Chemical Reviews*, A-BH. doi: 10.1021/cr400552x
- Jackson, A. P. (2014). Genome evolution in trypanosomatid parasites. *Parasitology*, 1-17. doi: 10.1017/S0031182014000894
- Kaye, P., y Scott, P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, 9, 604-615. doi: doi:10.1038/nrmicro2608

- Kedzierski, L. (2011). Leishmaniasis. *Hum Vaccin*, 7(11), 1204-1214. doi: 10.4161/hv.7.11.17752
- Kigonde, E. V., Rukunga, G. M., Keriko, J. M., Tonui, W. K., Gathirwa, J. W., Kirira, P. G., Ndiege, I. O. (2009). Anti-parasitic activity and cytotoxicity of selected medicinal plants from Kenya. *J Ethnopharmacol*, 123(3), 504-509. doi: 10.1016/j.jep.2009.02.008
- Lawn, S., Whetham, J., Chiodini, P., Kanagalingam, J., Watson, J., Behrens, R. y Lockwood, D. (2004). New world mucosal and cutaneous leishmaniasis: an emerging health problem among British travellers. *Q J Med*, 97, 781-788. doi: 10.1093/qjmed/hch127
- LIFETECHNOLOGIES. (2011). Fluorescence imaging of oxidative stress in live cells
CELLROX™ DEEP RED REAGENT: A BRIGHT AND PHOTOSTABLE
ROS SENSOR. 10, from *BioProbes* 65, 1-10
- Lipoldová, M. (2012). Genetics of pathogenesis of leishmaniasis, gene mapping, functional diversity, general and species-specific control
Research Groups (Vol. Annual Report 2011-2012, pp. 8-50): Institute of
Molecular Geneticsof the ASCR, v.v.i.
- Lopez, P., de la Mora, P. G., Wysocka, W., Maiztegui, B., Alzugaray, M. E., Del Zotto, H., y Borelli, M. I. (2004). Quinolizidine alkaloids isolated from *Lupinus* species enhance insulin secretion. *Eur. J. Pharmacol*, 504, 139-142.
- Mary, C., Faraut, F., Lascombe, L., y Dumon, H. (2004). Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol*, 42(11), 5249-5255. doi: 10.1128/JCM.42.11.5249-5255.2004
- Merschjohann, K., Sporer, F., Steverding, D., y Wink, M. (2001). In vitro effect of alkaloids on bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and *T. congolense*. *Planta Medica*, 67(7), 623-627. doi: 10.1055/s-2001-17351
- Messaritakis, I., Mazeris, A., Koutala, E., y Antoniou, M. (2010). *Leishmania donovani* s.l.: evaluation of the proliferation potential of promastigotes using CFSE staining and flow cytometry. *Exp Parasitol*, 125(4), 384-388. doi: 10.1016/j.exppara.2010.03.006

- Mishra, B., Kale, R. R., Singh, R. K., y Tiwari, V. K. (2009). Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia*, 80(2), 81-90. doi: 10.1016/j.fitote.2008.10.009
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V., Vandepoele, K., Van Breusegem, F. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science*, 16(6), 300-309. doi: 10.1016/j.tplants.2011.03.007
- Montes, E., Corona, M., Corona, A., Cantor del Angel, J., Sanchez, J., Sporer, F., Bermúdez, K. (2011). Quinolizidine alkaloid composition in different organs of *Lupinus aschenbornii*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(5), 824-828.
- MSP. (2014). GACETA EPIDEMIOLOGICA SEMANAL No. 37. 1-37, Subsecretaria de Vigilancia de la Salud Pública: Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica Recuperado el 15 de octubre de 2014 de http://instituciones.msp.gob.ec/images/Documentos/Ministerio/EPIDEMIOLOGIA/gaceta2014/Gaceta%20N%2037%20SE%2038_opt.pdf
- Myler, P. J., y Fasel, N. (2008). *Leishmania: after the genome*. Caister Academic Press, Northfolk-UKpp. 1-297.
- 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. doi: 10.1128/JCM.40.5
- Ohmiya, S. (2007). Stereochemistry, syntheses and biological activity of lupine alkaloids-from studies on the leguminous plants growing mainly in Japan. *Yakugaku Zasshi*, 127(10), 1557-1577.
- OMS. (2010). Control de las leishmaniasis. Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis. 1-200, from Organización Mundial de la Salud. Serie de Informes Técnicos, 949 Recuperado el 13 de octubre de 2014 de http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/82766/1/WHO_TRS_949_spa.pdf
- OMS. (2014). Leishmaniasis: Fact Sheet No 375. Recuperado el 10 de octubre de 2014 de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>

- Osorio, E., Robledo, S., Arango, G., y Muskus, C. (2005). Leishmania: papel de la glicoproteína P en la mediación de resistencia a medicamentos y estrategias de reversión. Recuperado el 1 de octubre de 2014 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84325211>
- Paloque, L., Vidal, N., Casanova, M., Dumétre, A., Verhaeghe, P., Parzy, D., y Azas, N. (2013). A new, rapid and sensitive bioluminescence assay for drug screening on Leishmania. *Journal of Microbiological Methods*, 95(3), 320-323. doi: 10.1016/j.mimet.2013.09.006
- Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. In E. S. Bustin (Ed.), *A-Z of quantitative PCR* (pp. 87-112). gene-cuantificacion.eu: International University Line (IUL); La Jolla, CA, USA. Recuperado el 24 de octubre de 2014 de <http://www.gene-quantification.de/chapter-3-pfaffl.pdf>.
- Rama, S. (2005). LEISHMANIOSIS VISCERAL EN EL CRICETO DORADO: VALORACION DE NUEVAS FORMULACIONES DE ANFOTERICINA B (Doctor en Parasitología), Universidad Complutense de Madrid. 1-243
- Rasoanaivo, P., Wright, C. W., Willcox, M. L., y Gilbert, B. (2011). Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions. *Malar J*, 10 Suppl 1, S4. doi: 10.1186/1475-2875-10-S1-S4
- Rice, S., y Patrick, S. (2008). Index of State Weakness In the Developing World (pp. 1-47).
- Rodriguez, A. (2009). Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de los Alcaloides del agua de cocción del proceso de desamaargado del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). (Bioquímico Farmacéutico), Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Rojas, J., Ronceros, S., y Palacios, O. (2012). Evaluación In Vitro de la actividad antileishmaniásica del extracto metanólico de siete plantas medicinales. *Ciencia e Investigación*, 15, 90-95.
- Rosenkranz, V., y Wink, M. (2008). Alkaloids induce programmed cell death in bloodstream forms of trypanosomes (*Trypanosoma b. brucei*). *Molecules*, 13(10), 2462-2473. doi: 10.3390/molecules13102462

- Salam, N., Al-Shaqha, W. M., y Azzi, A. (2014). Leishmaniasis in the Middle East: Incidence and Epidemiology. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(10), e3208. doi: 10.1371/journal.pntd.0003208
- Sengupta, S., Chowdhury, S., Bosedasgupta, S., Wright, C. W., y Majumder, H. K. (2011). Cryptolepine-Induced Cell Death of *Leishmania donovani* Promastigotes Is Augmented by Inhibition of Autophagy. *Mol Biol Int*, 2011, 1-12. doi: 10.4061/2011/187850
- Soares, L., Abad-Franch, F., y Ferraz, G. (2014). Epidemiology of cutaneous leishmaniasis in central Amazonia: a comparison of sex-biased incidence among rural settlers and field biologists. *Tropical Medicine and International Health*, 19(8), 988-995. doi: 10.1111/tmi.12337
- Sweetingham, M. W., Adhikari, K., Clements, JC, y Shea, G. (2006). Yellow lupin workshop report. Department of Agriculture and Food Western Australia and Centre for Legumes in Mediterranean Agriculture.
- Teixeira, D. E., Benchimol, M., Rodrigues, J. C., Crepaldi, P. H., Pimenta, P. F., y de Souza, W. (2013). The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. *PLoS Pathog*, 9(10), e1003594. doi: 10.1371/journal.ppat.1003594
- Turabekova, M., Vinogradova, V., Werbovetz, K., Capers, J., Rasulev, B., Levkovich, M., Abdullaev, N. (2011). Structure-activity relationship investigations of leishmanicidal N-benzylcytisine derivatives. *Chem Biol Drug Des*, 78(1), 183-189. doi: 10.1111/j.1747-0285.2011.01092.x
- Van der Meide, W., Guerra, J., Schoone, G., Farenhorst, M., Coelho, L., Faber, W., Schallig, H. (2008). Comparison between quantitative nucleic acid sequence-based amplification, real-time reverse transcriptase PCR, and real-time PCR for quantification of *Leishmania* parasites. *J Clin Microbiol*, 46(1), 73-78. doi: 10.1128/JCM.01416-07
- Villacrés, E., Peralta, J., Cuadrado, L., Revelo, J., Abdo, S., y Aldaz, R. (2009). Propiedades y Aplicaciones de los Alcaloides del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). In INIAP-ESPOCH-SENESCYT (Ed.), (pp. 6-18). Quito-Ecuador: Boletín Técnico No 133.

- Wetzel, D., McMahon-Pratt, D., y Koleske, A. (2012). The Abl and Arg Kinases Mediate Distinct Modes of Phagocytosis and Are Required for Maximal Leishmania Infection. *Molecular and Cellular Biology*, 32(5), 3176-3186. doi: 10.1128/MCB.00086-12
- Wolko, B., Clements, J., Naganowska, B., Nelson, M., y Yang, H. (2011). *Lupinus Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources* (pp. 153-206): Springer Berlin Heidelberg.
- Zamora, J., Bernal, A., Ruiz, M., Soto, M., Escalante, A., y Vibrans, H. (2005). Perfil de Alcaloides de Semillas de *Lupinus exaltus* Zucc. (Fabaceae) y la Evaluación Antifúngica del Extracto Alcaloideo y Lupanina contra Fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(2), 124-139.
- Zegarra-del-Carpio, R., y Sánchez-Saldaña, L. (2005). Leishmaniasis cutánea: Presentación en placa verrucosa. *Dermatol. peru.*, 15(1), 60-63.