



## Método fluorométrico para identificar agentes naturales citotóxicos y su aplicación en la evaluación de agentes antiparasitarios selectivos

Fluorometric method for the identification of cytotoxic natural agents and its application in the evaluation of selective antiparasitic agents

PALMA TOVAR, CAMILA ISABEL<sup>1</sup>  
 SALAMANCA CAPUSIRI, EFRAÍN<sup>2</sup>  
 TICONA HUALLPARA, JUAN CARLOS<sup>3</sup>  
 UDAETA VELÁSQUEZ, ENRIQUE<sup>4</sup>  
 MITA DÍAZ, VERONICA<sup>5</sup>  
 VELA RAMIREZ, CATHERINE ELENA<sup>6</sup>  
 ALACAMA CONDORI, WARA<sup>6</sup>  
 IBAGUARI, LUCIO<sup>7</sup>

IBAGUARI, MARÍA<sup>7</sup>  
 NAVI, VICTORIA<sup>7</sup>  
 TITOA VIRARI, DEMETRIO<sup>8</sup>  
 SERRATO, ALSIDES<sup>9</sup>  
 MARUPA, NATALIO<sup>9</sup>  
 CHAO, BENIGNO<sup>9</sup>  
 GIMÉNEZ TURBA, ALBERTO<sup>\*10</sup>

FECHA DE RECEPCIÓN: 13 FEBRERO DE 2019

FECHA DE ACEPTACIÓN: 16 DE ABRIL DE 2019

### Resumen

El ministerio de salud tiene como una de las prioridades en investigación a las enfermedades infecciosas, entre las que incluye a las leishmaniasis y la tripanosomiasis americana. En la Facultad Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas se estudian especies vegetales medicinales utilizadas por la cultura Tacana como fuente de agentes antiparasitarios potenciales.

Los laboratorios dedicados al descubrimiento de moléculas naturales con actividad antiparasitaria, tienen el desafío de desarrollar protocolos que permitan detectar biomoléculas selectivas, efectivas y me-

### Abstract

The Ministry of Health has infectious diseases as one of the research priorities, including leishmaniasis and American trypanosomiasis. The Faculty of Pharmaceutical and Biochemical Sciences develops evaluations of medicinal plant species used by the Tacana culture as a source of potential antiparasitic agents.

Laboratories dedicated to the discovery of natural molecules with antiparasitic activity, have the challenge of developing protocols that allow the detection of selective, effective and less toxic biomolecules than those available. Therefore, *in vitro* antipar-

- Licenciada en Bioquímica, Maestrante de la Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas. e-mail: camila.i.palma.t@gmail.com
- Master of Science. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas. e-mail: efrain\_salamanca@hotmail.com
- Philosophy Doctor. Instituto de Investigaciones Fármaco e-mail: biojuancarlos@yahoo.com
- Licenciado en Bioquímica y Farmacia. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. e-mail: udaepuma@gmail.com
- Estudiante de Internado Rotatorio. Carrera Química Farmacéutica. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas.
- Estudiantes de 1er año Carrera de Bioquímica. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas.
- Comunarios de San Silvestre, Provincia Abel Iturralde. Médicos tradicionales.
- Comunario de San Miguel, Provincia Abel Iturralde. Médico tradicional
- Comunarios de Buena Vista, Provincia Abel Iturralde. Médicos tradicionales.
- \*10. Philosophy Doctor. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas. e-mail: agimenez@megalink.com

nos tóxicas que las disponibles. Por ende, las evaluaciones antiparasitarias *in vitro* ( $CI_{50}$ ), deberían ir acompañadas de evaluaciones de citotoxicidad ( $DL_{50}$ ), con el fin de calcular un Índice de Selectividad ( $IS=DL_{50} / CI_{50}$ ) como parámetro de especificidad biológica.

La citotoxicidad fue medida sobre líneas de macrófagos (RAW 264.7, murino), células involucradas en las infecciones por parásitos intracelulares. El protocolo fluorométrico parte con una población de  $5 \times 10^4$  células/mL, incubada a  $37^\circ\text{C}$  en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium), por 96 horas, con adición de resazurina (2mM) 3 horas antes de las lecturas finales. Bajo estas condiciones se evaluó la citotoxicidad de drogas control y 15 extractos vegetales seleccionados por su actividad anti-kinetoplastida. El extracto de Cosmailu fue el más citotóxico, Ejije bid'u resultó selectivo para *T. cruzi* y *Leishmania amazonensis*, mientras que Id'ene eidhue, fue selectivo para *L. amazonensis*. Finalmente, los otros 12 extractos resultaron ser poco selectivos o citotóxicos.

### PALABRAS CLAVE

*Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis*, Células RAW 264.7, Cultura Tacana, Método Fluorométrico Resazurina, Índice de Selectividad.

asitic evaluations ( $IC_{50}$ ) should be accompanied by cytotoxicity evaluations ( $LD_{50}$ ), in order to calculate a Selectivity Index ( $IS = LD_{50} / IC_{50}$ ) as a parameter of biological specificity.

The cytotoxicity was measured on macrophage line (RAW 264.7, murine), cells engaged on intracellular parasites infections. The fluorometric protocol starts with an initial population of  $5 \times 10^4$  cells/mL, incubated at  $37^\circ\text{C}$ , in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) for 96 hours with addition of resazurin (2mM) 3 hours, before final readings. Under these conditions the cytotoxicity of control drugs and 15 plant extracts, selected by their anti-kinetoplastid activity, was evaluated. Cosmailu extract was the most cytotoxic, Ejije bid'u was selective for *T. cruzi*, and *Leishmania amazonensis*, while Id'ene eidhue, was selective for *L. amazonensis*. Finally, the other 12 extracts were little selective or cytotoxic.

### KEY WORDS

*Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis*, RAW 264.7 cells, Tacana culture, Resazurin Fluorometric Method, Selectivity Index.

## INTRODUCCIÓN

Las Leishmaniasis, con sus diversas manifestaciones clínicas, causada por distintas cepas de parásitos del género *Leishmania spp.* y la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana), potencialmente mortal, causada por el parásito protozoo *Trypanosoma cruzi*, forman parte de las enfermedades infecciosas desatendidas (OMS, 2015). En nuestro país, las infecciones por parásitos de *Leishmania* ocurren en 7 de los 9 Departamentos (Martínez *et al.*, 2002) y se estima que existen más de medio millón de casos de Chagas (Coalición Chagas, 2017). A causa del gran número de animales silvestres que sirven de reservorio a estos parásitos, estas enfermedades son difíciles de erradicar y requieren de un acceso temprano a la asistencia sanitaria para su cura (WHO, 2018).

El benznidazol y el nifurtimox son agentes antiparasitarios empleados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, mientras que el glucantime y la anfotericina B son utilizados en el tratamiento de las leishmaniasis. Los efectos adversos, de todas estas drogas, denotan la necesidad de encontrar agentes

antiparasitarios menos tóxicos (WHO, 1995). La medicina tradicional es una base interesante en la búsqueda de nuevos tratamientos, ya que las plantas son fuente de moléculas bioactivas, que podrían servir de base para el desarrollo de nuevos tratamientos antiparasitarios. La etnia Tacana, ubicada al norte del Departamento de La Paz, cuenta con centenares de especies vegetales documentadas que se utilizan para el tratamiento de diferentes dolencias, por lo que el Área de Química Farmacéutica del Instituto de Investigaciones Farmaco Bioquímicas se ha interesado en valorar su medicina tradicional, con el propósito de buscar agentes antiparasitarios eficaces y selectivos.

Históricamente, el inicio del proceso de descubrimiento de fármacos se concentra en reconocer la efectividad *in vitro* y/o *in vivo* de las drogas candidatas, utilizando como parámetro el valor estimado de la Concentración Inhibitoria Máxima Media ( $CI_{50}$ ), que indica la cantidad de una sustancia necesaria para inhibir un proceso biológico a la mitad (Aykul *et al.*, 2016). Al mismo tiempo, la seguridad de las drogas es un criterio clave para el desarrollo de nuevos tratamientos. Las observaciones que se logran obtener en ensayos de eficacia y seguridad, *in vitro*, se encuentran en los primeros pasos de desarrollo de un fármaco y sirven para justificar y ahondar en mediciones de seguridad y eficiencia en modelos más próximos al desarrollo, de estas complejas enfermedades parasitarias (Muller *et al.*, 2012).

Las células RAW 264.7 son macrófagos murinos transformados con el virus Abelson de leucemia murina (ATCC, 2017) y suelen ser utilizados para estudios de citotoxicidad (Habtemariam, 1997) y para evaluar el efecto, de productos naturales, en la producción de citosinas y mediadores inflamatorios (Kolodziej *et al.*, 2005). La citotoxicidad *in vitro* se mide por medio de ensayos de proliferación como el método fluorométrico con resazurina, un compuesto azul no tóxico y no fluorescente, que es reducido a un colorante rojo fluorescente, llamado resofurina, debido a la transferencia electrónica mediada por enzimas mitocondriales, en todas las células vivas. La detección de esta reacción se realiza empleando un lector de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 530 a 560 nm y una lectura de emisión a 590 nm longitud de onda. La reducción de la resazurina se correlaciona con el número de organismos vivos con actividad metabólica. Es un ensayo rápido, confiable, sensible, seguro y económico (Biotium: Glowing Products for Science, 2015; Carneiro-Borra *et al.*, 2009). El contar con datos de dosis letal media frente a células ( $DL_{50}$ ) y datos de Inhibición media frente a parásitos ( $IC_{50}$ ), permite calcular el Índice de Selectividad (IS), herramienta matemática utilizada para identificar compuestos que son tóxicos para los parásitos pero no para las células huésped, en infecciones intracelulares (leishmaniasis y el mal de Chagas), en una etapa temprana del complejo proceso de selección de candidatos para el descubrimiento de nuevos fármacos (WHO, 2015).

En este trabajo se seleccionaron extractos de plantas medicinales de la cultura tacana que previamente presentaron diversos niveles de actividad biológica ( $IC_{50}$ ) frente a parásitos de *Leishmania amazonensis* y *Trypanosoma cruzi*, para evaluar su citotoxicidad, frente a células RAW 264.7, utilizando el método fluorométrico de la resazurina, con el fin de calcular sus respectivos Índices de Selectividad.

## MATERIALES Y MÉTODO

### Materiales y equipos

Cabina de Seguridad Biológica (SECURIPLUS PSM Classe II, Francia); Centrifuga (Jouan CR3i, Thermo Fisher Scientific, USA); Estufa (Midi 40 CO<sub>2</sub> Incubator, Thermo Fisher Scientific, USA); Frascos de Cultivo Tisular de 50mL (25cm<sup>2</sup>, Fisher Scientific, USA); Lector de Microplacas (BioTek Synergy HT: Multi-Mode Microplate Reader, USA. software Gen 5 versión 2.09); Microscopio de Fluorescencia (EVOS FL Cell Imaging System, Life Technologies, USA); Microscopio Óptico (Leitz Aristoplan, Alemania); Microscopio Óptico Invertido (Axiovert 25, Zeiss, Alemania) y Placas de 96 Pozos, Fondo Plano (Thermo Scientific, USA).

### Reactivos

Bicarbonato de Sodio (NaHCO<sub>3</sub>, Cicarelli, Argentina); Gentamicina (VWR, USA). Sigma-Aldrich: Dimetilsulfóxido (DMSO); Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI, 1640-HEPES); Piruvato de Sodio; Sal Sódica de Resazurina; Penicilina; Estreptomina y Suero Bovino Fetal (SFB)

### Drogas control y extractos vegetales (concentraciones de evaluación)

Alcaloides totales de la corteza de *Galipea longiflora* Krause (CAT, 50.0–6.3µg/mL) y 2-fenilquinolina (2FQ, 100.0–12.6µg/mL) (Giménez *et al.*, 2005); Anfotericina-B (Cipla Ltd, Goa, India, AmB, 50.0–6.2µg/mL); Benznidazol (Lafepe, Brasil, Benz, 400.0–50.0µg/mL); Doxorrubicina Clorhidrato (Doxocris<sup>®</sup>, LKM Bolivia S.A, donada por Ricardo Amaru-Unidad de Biología Celular-Facultad Medicina-UMSA, Dox, 1.5–0.2µg/mL); Miltefosina (Impavido<sup>®</sup>, Paladin, Canadá, 50.0–6.2µg/mL); Nifurtimox (Lampit<sup>®</sup> Bayer, Alemania, 50.0–6.2µg/mL). Extractos de plantas medicinales en DMSO (100–0.8µg/mL).

### Material biológico

Células RAW 264.7 (Donadas por el Instituto Sahlgrenska, Universidad de Gotemburgo, Suecia) fueron cultivadas en frascos de cultivo (50mL), a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad en 3mL de Medio DMEM completo (17.3g/L de DMEM, 110.0mg/L de Piruvato de Sodio, 1.5g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 1%v/v de Penicilina-Estreptomina, pH 7.4, 10%v/v de SBF desactivado por calor) (ATCC, 2017); Medio DMEM sin piruvato (17.3g/L de DMEM, 1.5g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 1%v/v de Penicilina-Estreptomina, pH 7.4, 10%v/v de SBF desactivado por calor) y Medio RPMI (60.0mg/L de Gentamicina, 2.13g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 15.89g/L de RPMI 1640-HEPES, pH 7.4, 10%v/v de SBF desactivado por calor). El cambio de medio se realizó cada 72hrs previo desprendimiento mecánico.

### Curva de crecimiento

El pellet de células, RAW 264.7, obtenido de la suspensión celular centrifugada (2000rpm, 10min), fue resuspendido en el medio de cultivo correspondiente (2mL): DMEM completo, DMEM sin piruvato y RPMI. Se realizó el re-

cuento en cámara de Neubauer, para ajustar la población a  $2 \times 10^4$  células/mL (con los medios correspondientes) y 10%v/v de SBF. Se incubó como indicado y se realizaron lecturas diarias por 5 días, para el trazo de las curvas. El procedimiento se realizó por triplicado en tres repeticiones y la media se graficó.

### **Elección de población óptima de trabajo y tiempo de revelado**

Poblaciones ajustadas a:  $1.25 \times 10^4$ ;  $2.5 \times 10^4$ ;  $5.0 \times 10^4$ ;  $1.0 \times 10^5$  y  $2.0 \times 10^5$  células/mL, fueron incubadas por 96hrs a  $37^\circ\text{C}$ , con 5% de  $\text{CO}_2$  y 100% de humedad. Luego de la adición del reactivo revelador (resazurina) se realizó la lectura del incremento de población (540nm excitación y 590nm emisión) cada hora durante 5 horas. El procedimiento se realizó por triplicado en tres repeticiones y la media se graficó.

### **Material vegetal y obtención de extractos crudos**

Las plantas fueron colectadas por el personal del Área de Química Farmacéutica (AQF-IIFB) alrededor de las comunidades Buena Vista (S  $14^\circ 21' 969''$  y O  $67^\circ 33' 764''$ , elevación 205 m.s.n.m), San Silvestre (S  $14^\circ 04' 412''$  y O  $67^\circ 51' 837''$ , elevación 222 m.s.n.m) y San Miguel (S  $14^\circ 30.524''$  y O  $67^\circ 29.547''$ , elevación 276 m.s.n.m), provincia Abel Iturralde del departamento de La Paz-Bolivia. Las muestras Voucher fueron depositadas e identificadas en el Herbario Nacional de Bolivia (LPB). Los extractos crudos fueron preparados por maceración etanólica por 72hr, a temperatura ambiente, filtrados y llevados a sequedad en rota-evaporador y secados al vacío hasta peso constante o por fluido súper crítico con  $\text{CO}_2$  a 2000psi y  $37^\circ\text{C}$ , por 10hrs, en el AQF-IIFB.

### **Evaluación de citotoxicidad sobre RAW 264.7**

En una placa de cultivo de 96 pozos, los pozos de la periferie fueron llenados con  $200\mu\text{L}$  de agua destilada autoclavada. En cada uno de los pozos restantes se dispensaron  $100\mu\text{L}$  de células ( $5 \times 10^4$  células/mL). A las 24hrs de incubación se añadieron  $100\mu\text{L}$  por pozo de las diferentes concentraciones de drogas control, controles naturales y muestras. Los pozos "Blanco" y el "Control Positivo de Crecimiento" contenían  $200\mu\text{L}$  de medio de cultivo y  $200\mu\text{L}$  de células respectivamente. Se incubó como indicado por 72hrs. Cada muestra fue evaluada por triplicado, obteniendo un valor promedio y desviación estándar.

### **Obtención de $\text{DL}_{50}$**

Para el revelado, se empleó resazurina (2mM) disuelta en PBS (2.86g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.31g/L de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4) y depositada en la placa ( $10\mu\text{L}$ /pozo). Tras 3hrs de incubación se realizó la lectura de fluorescencia utilizando una longitud de onda de excitación de 540nm y una longitud de onda de emisión de 590nm en el programa Gen5 (Promega, 2016). Los valores de fluorescencia fueron transformados en porcentaje de inhibición, donde el 100% correspondía a la absorbancia del "Blanco". La conversión del porcentaje de inhibición a su correspondiente valor de  $\text{CI}_{50}$  se realizó en Microsoft Excel por función de tendencia lineal ( $y$ =porcentaje de inhibición;  $x$ =concentración en  $\mu\text{g/mL}$ ).

## Obtención de los índices de selectividad (IS)

El IS se obtiene dividiendo la  $DL_{50}$  (RAW 264.7) entre la  $CI_{50}$  (parásito):  
 $IS = DL_{50} / CI_{50}$

$$TIS = DL_{50} \text{ RAW 264.7} / CI_{50} \text{ T. cruzi}$$

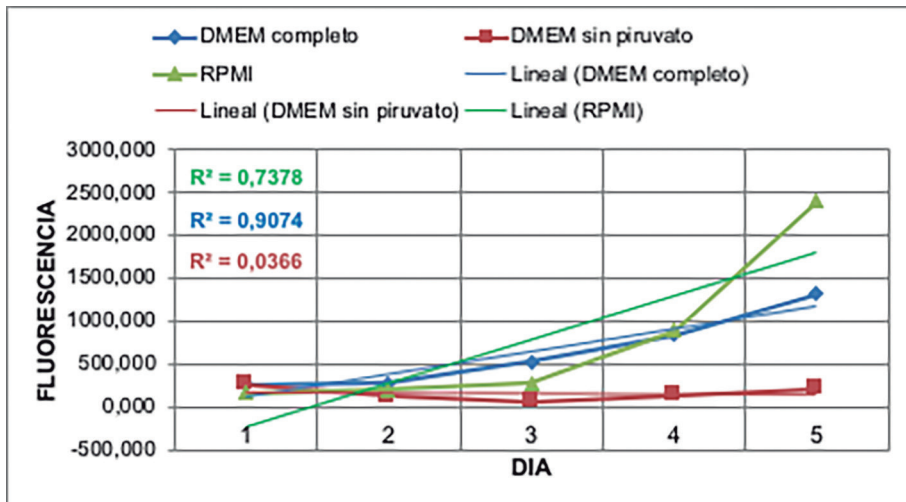
$$LIS = DL_{50} \text{ RAW 264.7} / CI_{50} \text{ L. amazonensis}$$

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### Curva de crecimiento

El medio DMEM completo resultó ser el mejor para el cultivo de células RAW 264.7, ya que su coeficiente de correlación lineal  $R^2$  (0.9074) resultó ser el más elevado de los tres medios evaluados (Gráfico N°1). En este medio de cultivo, la fluorescencia fue aumentando día a día, demostrando la actividad metabólica de las células. El día 4 la población celular se duplicó, lo que indica que es el momento ideal para realizar la medida de  $DL_{50}$ . El medio RPMI permitió el crecimiento de las células RAW 264.7, pero podría considerarse que la fase de adaptación (lag) dura un día más que con el DMEM completo. Finalmente, el medio DMEM sin piruvato no dio lugar a un crecimiento exponencial, a lo largo del experimento.

**Gráfico N°1. Fluorescencia medida durante 5 días de cultivo de células RAW 264.7**



En condiciones aeróbicas, el piruvato formado en el último paso de la glicólisis se oxida a acetil-CoA, por la PDH (piruvato deshidrogenasa) que en el ciclo del ácido cítrico, se oxida a  $CO_2$  y  $H_2O$  y el equilibrio redox se reestablece tras la transferencia de electrones del  $NADH^+$  al  $O_2$  durante la respiración mitocondrial. La acetil-CoA puede modular negativamente la PDH, inhibien-

do el ciclo del ácido cítrico y promoviendo la gluconeogénesis por modulación positiva de la piruvato carboxilasa. El piruvato participa en reacciones anapleróticas que reponen intermediarios del ciclo del ácido cítrico (malato y oxalacetato), lo cual sostiene la actividad de este ciclo (Heart *et al.*, 2009). Por estas razones metabólicas es que el piruvato es necesario para el crecimiento de las células en estudio.

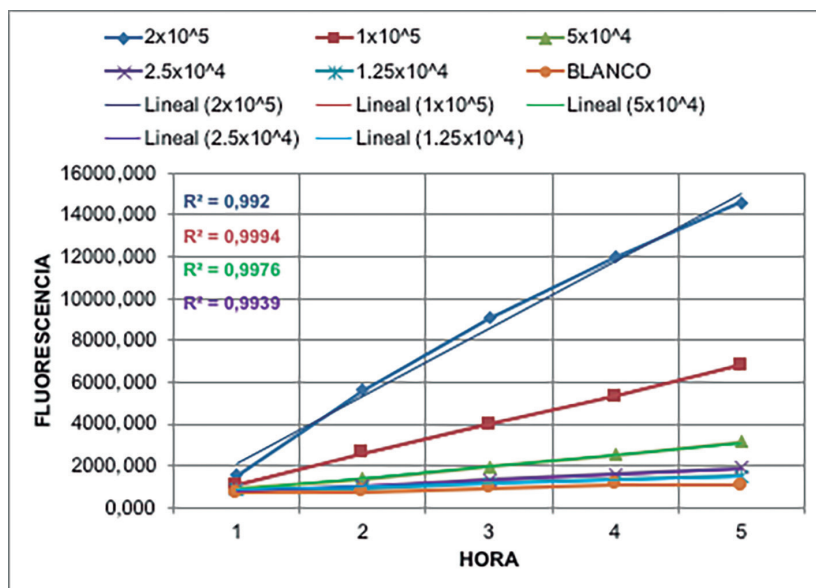
## Elección de población óptima de trabajo y tiempo de revelado

Los valores de coeficiente de correlación lineal demuestran que las poblaciones  $1 \times 10^5$  y  $5 \times 10^4$  tuvieron el comportamiento más lineal en medio DMEM completo (Tabla N°1 y Gráfico N°2). Con  $5 \times 10^4$  de población se obtuvieron valores de fluorescencia equivalentes a más del doble del blanco, a las 3 horas de incubación con resazurina, lo cual se considera suficiente para ser detectable respecto al blanco. Se recomienda no realizar la lectura más allá de las 3 horas, ya que la fluorescencia del blanco va disminuyendo pasadas las 4 horas.

**Tabla N°1: Fluorescencia según población y tiempo de revelado con resazurina**

Horas	Población						
	2x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>4</sup>	2.5x10 <sup>4</sup>	1.25x10 <sup>4</sup>	BLANCO	5x10 <sup>4</sup> BLANCO
1	1.553.167	1.077.167	906.667	853.333	860.667	712.000	1.273
2	5.614.167	2.599.667	1.361.500	1.032.167	958.000	765.667	1.778
3	9.054.000	4.007.167	1.953.167	1.336.833	1.168.833	957.667	2.039
4	11.979.833	5.320.667	2.527.333	1.615.667	1.339.333	1.103.000	2.291
5	14.589.500	6.828.667	3.134.500	1.900.500	1.496.333	1.055.333	2.970

**Gráfico N°2: Fluorescencia según población y tiempo de revelado con resazurina**



Los resultados de la puesta a punto del método fluorométrico de la resazurina para RAW 264.7, nos muestran que lo ideal es trabajar dentro de los primeros 5 días, tiempo en el cual las células mantienen el crecimiento logarítmico, sembrando una población inicial de  $5 \times 10^4$  células (día 0) e incubar por 24 horas antes de añadir las muestras a evaluar (día 1), continuar con la incubación por 72 horas y revelar con resazurina (día 4) incubando por 3 horas adicionales

## Evaluación de la citotoxicidad

Un total de 15 extractos de plantas medicinales utilizadas por la etnia Tacana fueron seleccionados y sometidos a evaluaciones de citotoxicidad por el método fluorométrico. Entre éstas, 11 presentaron actividad anti-kinetoplastidos (*T. cruzi* y *L. amazonensis*), 1 extracto activo sobre *T. cruzi*, 1 extracto con actividad leishmanicida, y 2 extractos sin actividad antiparasitaria (Programa UMSA-ASDI, 2019). De los 15 extractos evaluados, un total de 3 (Ejije bid'u, Id'ene eidhue y Kuabadhu) presentaron actividad selectiva, mientras que los 12 restantes fueron no selectivos y/o citotóxicos, siendo el más citotóxico el extracto de Cosumailo.

Ejije bid'u ( $DL_{50} = 65.5 \pm 25.3$ ,  $CI_{50} T. cruzi = 9.1 \pm 1.5$ ,  $CI_{50} Lma = 16.9 \pm 2.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $TIS=7.6$  y  $LIS=4.3$ ) e Id'ene eidhue ( $DL_{50} = 14.7 \pm 5.3$ ,  $CI_{50} T. cruzi = 10.8 \pm 1.1$ ,  $CI_{50} Lma = 10.4 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $TIS=1.4$  y  $LIS=1.4$ ), fueron activos frente a los dos parásitos con valores de IS iguales o superiores a la droga control 2FQ. Sin embargo el último extracto (Id'ene eidhue) presentó un valor de TIS inferior al control natural 2FQ ( $TIS = 2.9$ ), por lo que solo pudo ser considerado como leishmanicida selectivo con un valor de LIS igual al de la 2FQ ( $LIS = 1.4$ ). El extracto de Ejije bid'u fue el único considerado como anti-kinetoplastido selectivo, aunque nueve veces menos activo que el Nifurtimox ( $CI_{50} T. cruzi = 1.2 \pm 0.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), presentó un TIS similar a este ( $TIS=7.7$ ), fue casi dos veces más leishmanicida que CAT ( $Lma = 29.1 \pm 9.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) y presentó un valor de LIS casi el doble que el de la Miltefosina ( $LIS=2.5$ ).

Adicionalmente, el extracto de Kuabadhu, inactivo frente a *T. cruzi*, resultó más activo y selectivo para Lma ( $CI_{50}=18.2 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $LIS=2.6$ ) que la 2FQ ( $CI_{50}=24.1 \pm 3.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $LIS=1.4$ ). Mientras que 2 de los extractos sin actividad antiparasitaria (Tse Buke Ina y Cayu) presentaron una elevada citotoxicidad ( $TIS$  y  $LIS < 0.7$ ) y la planta Cosmailu presentó valores de TIS (0.1) inferiores a la Doxorubicina ( $TIS 0.3$ ) y fue el extracto más citotóxico.

El método fluorométrico de la resazurina nos permitió identificar productos naturales con actividad trypanocida y leishmanicida selectiva y disminuyó drásticamente, el número inicial de extractos con actividad antiparasitaria, demostrando las dificultades de encontrar, en el laboratorio, productos naturales eficaces y seguros, que permitan la obtención y desarrollo de nuevos agentes antiparasitarios. Al mismo tiempo, este nuevo protocolo nos permite ampliar el conocimiento sobre los metabolitos secundarios que hacen a nuestra biodiversidad facilitando la selección de especies con actividad citotóxica.



**Tabla N°3: Actividad anti-kinetoplastidos y citotóxica de extractos crudos de plantas Tacana**

Especie Botánica	Nombre Tacana	RAW 264.7				<i>T. cruzi</i>				Lma	
		DL <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub>	TIS	CI <sub>50</sub>	DL <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub>	TIS	CI <sub>50</sub>		
1 <i>Capsicum spp</i>	Ejje bid'u	69.5±25.3	9.1±1.5	7.6	16.0±2.3					LIS	4.3
2 <i>Cedrela spp</i>	Kuabadhu	46.6±1.6	>50.0	<0.9	18.2±0.3					LIS	2.6
3 <i>Tessaria integrifolia</i>	Cawuara	38.2±0.6	23.1±0.5	1.7	45.2±4.5					LIS	0.8
4 <i>Piper umbellatum</i>	Sipu sipu	13.7±1.2	8.9±1.7	1.5	11.9±0.4					LIS	1.2
5 <i>Hyptis brevipes</i>	Id'ene eidhue	14.7±5.3	10.8±1.1	1.4	10.4±0.2					LIS	1.4
6 <i>Philodendron undulatum</i>	Uembe	29.4±8.1	21.6±2.1	1.4	35.8±7.1					LIS	0.8
7 <i>Physalis angulata</i>	Tomatillo	11.9±0.6	11.6±0.5	1.0	21.0±0.1					LIS	0.6
8 <i>Jacaranda glabra</i>	Cheperequi	19.4±0.7	20.1±1.7	1.0	16.8±4.4					LIS	1.2
9 <i>Physalis spp</i>	Tumati waichidhi	20.3±1.5	25.5±8.8	0.8	43.9±8.4					LIS	0.5
10 <i>Lantana cf trifolia</i>	Aqui djawa	18.0±2.0	25.1±0.5	0.7	>50.0					LIS	<0.4
11 <i>Hyptis mutabilis</i>	Tapacha ina	9.3±0.1	14.5±4.0	0.6	23.2±8.6					LIS	0.4
12 <i>Scoparia dulcis</i>	Bacua etse	15±5.6	24.1±0.6	0.6	30.2±0.3					LIS	0.5
13 <i>Physalis pubescens</i>	Cosmailu	3.3±1.0	31.9±1.1	0.1	42.2±2.7					LIS	0.1
14 <i>Aphelandra cf. aurantica</i>	Tse buke ina	30.0±7.5	>50.0	<0.6	>50.0					LIS	<0.6
15 <i>Anacardium occidentale</i>	Cayu	36.2±1.3	>50.0	<0.7	>50.0					LIS	<0.7
	CAT	16.2±2.5	11.6±2.9	1.4	29.1±9.0					LIS	0.6
	2-Fenilquinolina	32.9±8.5	11.2±1.1	2.9	24.1±3.4					LIS	1.4
	Benznidazol	74.7±9.1	7.0±2.6	10.7	-					LIS	-
	Nifurtimox	9.2±2.1	1.2±0.3	7.7	-					LIS	-
	Anfotericina-B	13.8±3.7	-	-	0.3±0.1					LIS	46.0
	Miltefosina	25.3±8.1	1.2±0.7	21.2	10.2±4.4					LIS	2.5
	Doxorrubicina	0.3±0.1	0.9±0.2	0.3	10.4±6.5					LIS	0.03

LIS = Índice de selectividad para Leishmania

TIS = Índice de selectividad para Trypanosoma

## AGRADECIMIENTOS

A los proyectos UMSA-ASDI: Bioprospección Tacana y Biomoléculas de Interés Medicinal e Industrial (75000553), por el apoyo financiero. Al CIPTA y CIMTA, por la planificación de los trabajos de campo en las comunidades Tacana. Al Instituto Sahlgrenska-Universidad de Gotemburgo-Suecia, por la donación de las células RAW 264.7. Uno de los co-autores (PTCI), fue becario de Maestría del programa de fortalecimiento institucional UMSA-ASDI.

## REFERENCIAS

- ATCC. (2017). RAW 264.7 ATCC® TIB-71TM. Recuperado de <https://www.atcc.org/products/all/TIB-71.aspx>
- Aykul, S., Martínez-Hackert, E. (2016). Determination of Half-Maximal Inhibitory Concentration Using Biosensor-Based Protein Interaction Analysis. *Analytical Biochemistry*, 508, 97–103.
- Biotium: Glowing Products for Science. (2015). Resazurin Cell Viability Assay Kit. Recuperado de <https://biotium.com/wp-content/uploads/2013/05/PI-30025.pdf>
- Carneiro-Borra, R., Andrade-Lotufo, M., Gaglioti, M., de Mesquita-Barros, F., & Andrade, P. M. (2009). A Simple Method To Measure Cell Viability In Proliferation And Cytotoxicity Assays: Histology. *Brazilian Oral Research*, 23(3), 255–262. Recuperado de <http://www.scielo.br/pdf/bor/v23n3/06.pdf>
- Coalición Chagas. (2017). Chagas en el Mundo. Recuperado de [https://coalicionchagas.carto.com/viz/0858263a-4298-11e5-82ab-0e8dde98a187/public\\_map](https://coalicionchagas.carto.com/viz/0858263a-4298-11e5-82ab-0e8dde98a187/public_map)
- Giménez, A., Avila, J. A., Ruiz, G., Paz, M., Udaeta, E., Ticona, J. C., Bascope, M. (2005). Estudios Químicos, Biológicos Y Farmacológicos De *Galipea Longiflora*, Krause. *Revista Boliviana de Química*, 22(1), 94–107.
- Habtemariam, S. (1997). Cytotoxicity and Immunosuppressive Activity of Withanolides from *Discopodium penninerivium*. *Planta Medica*, 63(1), 15–17.
- Heart, E., Cline, G. W., Collis, L. P., Pongratz, R. L., Gray, J. P., & Smith, P. J. S. (2009). Role for malic enzyme, pyruvate carboxylation, and mitochondrial malate import in glucose-stimulated insulin secretion. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 6(296), 1354–1362.
- Kolodziej, H., & Albrecht, K. (2005). Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitised RAW 264.7 cells. *Phytochemistry*, 66(17), 2056–2071.
- Martinez, E., Mollinedo, S., Torrez, M., Muñoz, M., Bañuls, AL., Le Pont, F. (2002). Co-infection by *Leishmania amazonensis* and *L. infantum chagasi* in a case of diffuse cutaneous leishmaniasis in Bolivia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 96, 529–532.
- Muller, P. Y., & Milton, M. N. (2012). The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(10), 751–761.
- OMS. (2015). Enfermedad de Chagas. Recuperado de [https://www.who.int/topics/chagas\\_disease/es/](https://www.who.int/topics/chagas_disease/es/)
- Programa UMSA-ASDI. (2019). Informes de Proyecto Biomoléculas de interés medicinal e industrial (antiparasitarios), DIP-GIS-UMSA
- Promega. (2016). CellTiter-Blue® Cell Viability Assay. Recuperado de <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/cell-titer-ble-cell-viability-assay-protocol.pdf>
- WHO. (1995). WHO Model Prescribing Information: Drugs Used in Parasitic Diseases (2a ed.). Hong Kong. Recuperado de <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2924s/2.11.2.html>
- WHO. (2015). Cytotoxicity: In vitro determination. Recuperado de [http://www.who.int/tdr/grants/workplans/en/cytotoxicity\\_invitro.pdf](http://www.who.int/tdr/grants/workplans/en/cytotoxicity_invitro.pdf)
- WHO. (2018). Chagas disease (American trypanosomiasis): Key Facts. Recuperado de [http://www.who.int/es/newsroom/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/es/newsroom/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))