UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

Actividad leishmanicida del aceite esencial de *Plumbago scandens* L. en promastigotes de *Leishmania major like*

Tesis previa a la obtención del título de Licenciado de Laboratorio Clínico

Autor:

Jorge David Puchaicela Quirola

Director:

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.

Loja-Ecuador

2018

Certificación

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg. Sc.

DIRECTOR DE TESIS

CERTIFICO:

Que he revisado y orientado todo el proceso de la elaboración del trabajo investigativo titulado: **"Actividad leishmanicida del aceite esencial de *Plumbago scandens* L. en promastigotes de *Leishmania major like*"**, de autoría del Sr. **Jorge David Puchaicela Quirola**, previo a la obtención del título de Licenciado en Laboratorio Clínico, cumpliendo los requerimientos en el marco del Reglamento del Régimen Académico de la Universidad Nacional de Loja vigente, faculto al autor para su presentación, disertación y defensa.

Loja, 24 de agosto 2018

Atentamente:

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg.Sc.

Director de tesis

Autoría

Yo, **Jorge David Puchiacela Quirola** con **Cl. 1104751449,** declaro ser autor del presente trabajo de investigación, y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos de posibles reclamos o acciones legales por el contenido de la misma.

Adicionalmente, acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja la publicación del presente trabajo en el Repositorio Institucional de la Biblioteca Virtual.

Autor: **Jorge David Puchaicela Quirola**

Firma: _____

Cédula. 1104751449

Loja, 24 de agosto 2018

Carta de autorización

Yo, Jorge David Puchaicela Quirola, declaro ser autor dela tesis titulada: **"Actividad leishmanicida del aceite esencial de *Plumbago scandens* L. en promastigotes de *Leishmania major like*"**, como requisito para optar al grado de: **"Licenciado en Laboratorio Clínico;** autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestre al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad completa del contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional.

Los usuarios podrán consultar el contenido de este proyecto de investigación en el RDI, en las redes de información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad Nacional de Loja.

La Universidad Nacional de Loja no se responsabiliza por el plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja a los 24 días del mes de agosto del dos mil dieciocho, firma el autor.

Firma:

Autor: Jorge David Puchaicela Quirola

Cédula de Identidad: 1104751449

Correo Electrónico: david-14-m@hotmail.com

Celular: 0991106787

Datos complementarios:

Director de tesis: Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg.Sc.

Tribunal de tesis:

Presidente: Dra. Elsa Cumanda Ramírez Sanmartín, Mg. Sc.

Vocal: Dra. Diana Alexandra Montaño Peralta, Mg. Sc.

Vocal: Lic. María del Cisne Loján González, Mg. Sc.

Dedicatoria

Al finalizar una más de las metas planteadas en mi vida, fruto de mi esfuerzo, sacrificio y paciencia, quiero dedicar el presente primeramente a DIOS porque ha estado conmigo en cada paso que doy, cuidándome, guiándome y dándome fortaleza para continuar. A toda mi familia, a mi padre Jaime que supo apoyarme en todo lo que necesite y gracias a él pude realizar otra meta más; a mi abuelita Eva que es lo más importante en vida y que con su apoyo y consejos supo ser padre y madre para mi desde mi infancia para así guiarme por el buen camino, motivándome para seguir superándome profesionalmente y no decaer por más difícil que sea la vida; quienes además a lo largo de mi carrera han velado por mi bienestar y educación; a mis primos Ángel, Roger, Gaby y todos mis amigos con mucho amor y cariño de quienes recibí absoluto apoyo.

Pues es a ellos a quienes les debo por su apoyo incondicional y mi infinita gratitud.

Agradecimiento

Primeramente, expreso mi agradecimiento a la Universidad Nacional de Loja, Facultad de la Salud Humana y en particular a la carrera de Laboratorio Clínico donde me forme profesionalmente, a mis docentes que, con dedicación, profesionalismo y ética, supieron impartirme sus conocimientos y enseñanzas que significaron un ejemplo de superación ayudándome así a la formación de mi vida profesional

Al Dr. Luis Morocho docente de la carrera y director de mi proyecto de tesis un agradecimiento muy especial que gracias por su bondad, esfuerzo, dedicación, motivación, consejos y paciencia, supo guiarme para la culminación exitosa de mis estudios, por ello una infinita gratitud.

ÍNDICE

Carátula i
Certificación ii
Autoría iii
Carta de autorización iv
Dedicatoria v
Agradecimiento vi
1. Título 1
2. Resumen 2
Summary 3
3. Introducción 4
4. Revisión literaria 8
4.1 Leishmaniasis 8
4.2 Agentes Etiológicos 8
4.3 Ciclo de vida 9
4.4 Aspectos epidemiológicos 10
4.5 Leishmania Visceral 11
4.5.1. Patología y patogenia. 11
4.5.2 Sintomatología 12
4.5.3 Diagnóstico. 13
4.6 Leishmaniasis tegumentaria americana (LTA) 15
4.6.1 Patología y patogénesis. 15
4.6.2 Sintomatología 16
4.6.3 Enfermedad cutánea. 16
4.6.4 Enfermedad mucosa. 17
4.7 Leishmania difusa 18
4.7.1 Diagnóstico. 18
4.8 Principales factores de riesgo 20
4.8.1 Condiciones socioeconómicas. 20
4.8.2 Malnutrición. 21
4.8.3 Movilidad de la población. 21
4.8.4 Cambios ambientales. 21
4.8.5 Cambio climático 21

4.9 Plumbago 22
4.9.1 Clasificación botánica. 22
4.9.2 Características generales. 23
4.9.3 Plumbago scandens 23
4.10 Quinonas y naftoquinonas 24
4.11 Plumbagina 25
4.12 Métodos de evaluación de actividad leishmanicida 26
4.12.1 Técnica de Resazurina 27
4.12.2 Técnica de XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida) 27
5. Materiales y métodos 29
5.1 Tipo de estudio 29
5.2 Área de estudio 29
5.3 Grupo de estudio 29
5.4 Muestra que se utilizó en el ensayo 29
5.5 Criterios de inclusión 29
5.6 Criterios de exclusión 29
5.7 Métodos, técnicas y procedimientos 30
6. Resultados 36
7. Discusión 39
8. Conclusiones 41
9. Recomendaciones 42
10. Bibliografía 43
11. Anexos 48
Anexo 1.- Protocolo para la preparación de medio de cultivo Novy, Nicolle y McNeal (NNN). 48
Anexo 2.- Protocolo para la preparación de medio de cultivo Drosophila 50
Anexo 3.- Protocolo de extracción de aceite esencial 52
Anexo 4.- Protocolo para la preparación de medio de cultivo RPMI (sin rojo fenol, ni glutamina) 54
Anexo 5.- Protocolo para el recuento de parásitos en cámara de Neubauer 56
Anexo 6.- Medios de cultivo, soluciones, reactivos y fármaco de referencia. 58

Anexo 7.- Protocolo para el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) 59
Anexo 8.- Cálculos de inhibición parasitaria 62
Anexo 9.- Absorbancias del ensayo del MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) por el espectrofotómetro 64
Anexo 10.- Difusión de resultados 65
Anexo 11.- Registro de asistencia de la difusión de resultados 66
Anexo 12.- Evidencias fotográficas 69

1. Título

Actividad leishmanicida del aceite esencial de *Plumbago scandens* L. sobre promastigotes de *Leishmania major like.*

2. Resumen

La Leishmaniasis cutánea y mucocutánea es una enfermedad producida por varias especies del género Leishmania y trasmitida por la picadura de diversas especies hematófagos del genero *Lutzomia*. Para su tratamiento se utilizan fármacos antimoniales pentavalentes como la N-metilglucamina (Glucantime) que son de primera elección. Alternativamente, en la medicina tradicional se usan empíricamente plantas medicinales para tratar esta enfermedad, sin un entero conocimiento sobre sus beneficios y mecanismo de acción, siendo una de ellas *Plumbago scandens* L*(Plumbaguinaceae).* El presente estudio se planteó evaluar la actividad leishmanicida del aceite esencial de la planta *Plumbago scandens* L. el cual fue extraído de las partes aéreas (tallos y hojas), por medio de la técnica de arrastre de vapor, y se evaluó sobre promastigotes axénicos de *L. major like*, mediante la determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento de los parásitos. La determinación del porcentaje de inhibición se basó en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por acción de la succinato-deshidrogenasa mitocondrial a un compuesto coloreado de color azul-violeta con absorbancia máxima a 570 nm. El fármaco de referencia usado fue la anfotericina B. Los resultados mostraron que el aceite esencial inhibe en un 85% el desarrollo del parásito a concentraciones de 15-30 µg/ml, provocando la lisis de éstos e inhibiendo su reproducción y motilidad, al tiempo que la anfotericina solo causó la inhibición de su división; los resultados obtenidos en la investigación fueron socializados a estudiantes y Docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico.

Palabras clave: *Leishmania major like*, leishmanicida, Leishmania, aceite esencial, *Plumbago scandens* L, MTT**.**

Summary

Cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis is a disease caused by several species of the genus *Leishmania* and transmitted by the bite of various hematophagous species of the genus *Lutzomia*. For its treatment, pentavalent antimonial drugs such as N-methylglucamine (Glucantime) are used, which are the first choice. Alternatively, in traditional medicine empirical medicinal plants are used to treat this disease, without an entire knowledge about its benefits and mechanism of action, being one of them *Plumbago scandens* L. (*Plumbaguinaceae*). The present study was designed to evaluate the leishmanicidal activity of the essential oil of Plumbago *scandens* L. which was extracted from the aerial parts (stems and leaves) by steam distillation and was evaluated its activity on axenic promastigotes of *L. major like* and the percentage of growth inhibition of the parasites determinated. The determination of the inhibition percentage was based on the metabolic reduction of 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazole bromide (MTT) by mitochondrial succinate-dehydrogenase to a blue-violet colored compound, with maximum absorbance at 570 nm. The reference drug used was amphotericin B. The results showed that the essential oil inhibits in 85% the development of the parasite at concentrations of 15-30 µg/ml, causing the lysis of these and inhibiting their reproduction and motility, at the same time, amphotericin alone caused the inhibition of its division; the results obtained in the research were socialized to Students and Teachers of the Clinical Laboratory Career of National University of Loja.

Keywords: *Leishmania major like*, leishmanicide, Leishmania, essential oil, *Plumbago scandens* L, MTT

3. Introducción

La *Leishmaniasis* es una enfermedad que es producida por parásitos del orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae* y género *Leishmania*. La morfología del parásito consta de dos formas: los amastigotes que viven en vacuolas en el interior de células del hospedero, principalmente monocitos y macrófagos, y los promastigotes que se forman en el interior del vector (tubo digestivo) de hematófagos de los géneros *Phlebotomus* (Viejo Mundo) *y Lutzomyia* (Nuevo Mundo), los cuales inoculan promastigotes al huésped para transformarse en promastigotes metacíclicos y dar origen a los amastigotes nuevamente formando su ciclo de vida (Botero & Restrepo, 2012).

La enfermedad es producida por al menos 20 especies de protozoos del género *Leishmania* y se manifiesta en tres formas clínicas principales que son la forma cutánea, mucocutánea y visceral.

La *Leishmaniasis* es endémica en más de sesenta países incluyendo América Central, América del Sur, India, el Oriente Medio, el Norte de África y el Sur de Europa; sin embargo, el 90 % de los casos de *Leishmaniasis* cutánea se presenta en 8 países: Afganistán, Pakistán, Siria, Arabia Saudita, Argelia, Irán, Brasil y Perú. Por otra parte, el mayor número de casos de *Leishmaniasis* visceral se encuentra en la India, Bangladesh, Nepal, Sudán y Brasil (Ríos, y otros, 2008).

Se calcula que cada año se producen en el mundo entre 0,6 millones y 1 millón de casos nuevos de *Leishmaniasis* mucocutánea, que causa la destrucción parcial o completa de las membranas mucosas de la nariz, boca y garganta. Más del 90% de los casos de *Leishmaniasis* mucocutánea se producen en Brasil, Bolivia, Etiopía y Perú (OMS, 2017).

En el Ecuador se han notificado 1668 casos de *Leishmaniasis* en el año 2017, siendo la región Costa que reporta el mayor número de casos (988), la Amazonia con 421

casos, la región Sierra con 236 casos y región Insular con 23 casos. Las provincias con el mayor número de casos son Los Ríos (432), El Oro (228), Pastaza (199), Manabí (180), Santa Elena (134), representando el 70,32% del total de los casos del año 2017. El grupo de edad más afectado es de 20 a 49años. En cuanto a la provincia de Loja solo se han notificado 19 casos (1,13%) (Granda, 2018).

En Ecuador, la *Leishmaniasis* es un importante problema de salud pública reportado en 21 de las 24 provincias del país, y se han identificado nueve especies como agentes causantes de *Leishmaniasis* cutánea humana (CL) y *Leishmaniasis* mucocutánea (MCL), *Leishmania (Leishmania) mexicana, L. (L.) amazonensis, L. (L.) major-like, L. (Viannia) guyanensis, L. (V.) panamensis, L. (V.) braziliensis, L. (V.) naiffi,* y *L. (V.) lainsoni*, *Leishmania shawi*. Especies de parásitos causantes de CL se han identificado como *L. (V.) guyanensis, L. (V.) panamensis, L. (V.) braziliensis,* y *L. (L.) amazonensis* en zonas de la costa del pacifico, *L. (L.) mexicana y L. (L.) major-like* en áreas del altiplano andino, y *L. (V.) guyanensis, L. (V.) braziliensis, L. (V.) naiffi,* y *L. (V). lainsoni* en áreas amazónicas (Kato, 2016).

Los tratamientos para los casos de Leishmaniasis no son fáciles de establecer, ya que no todos los medicamentos son eficaces contra este parásito, debido a su variabilidad en sus cepas. Otro problema frecuente es lo doloroso de los tratamientos, aunque en nuestro país el medicamento es gratuito en otros países el costo es un problema agudo.

El medicamento de elección para el tratamiento es el antimoniato de meglumina (Glucantime®), a pesar de presentar inconvenientes como toxicidad moderada, administración a altas dosis y esquemas prolongados, se continúa utilizando como medicamento de primera línea. Sin embargo, la diferente sensibilidad de las especies de *Leishmania* infectante y la aparición de resistencia en el parásito al antimonio pentavalente

inciden, además, en la respuesta clínica al tratamiento. Se cree que en algunos casos el parásito no ha sido eliminado totalmente del cuerpo (OMS, 2017). Pero ¿por qué la *Leishmania* es tan difícil de tratar? La respuesta probablemente está en las complejas interacciones que se dan entre el parásito y el sistema inmune del ser humano (Ríos & Sousa, 2011).

Es por ello, que se han propuesto diversas alternativas en el control de la enfermedad, siendo una de ellas la utilización de metabolitos secundarios obtenidos de las plantas; ya sea puros o en extractos crudos, se puede extraer varios compuestos de una planta en diferentes estados como extractos o aceites esenciales. Es así, como en los últimos 25 años, de 1010 nuevas sustancias aprobadas para el manejo clínico de diferentes enfermedades, 490 (48,5%) son de origen natural (Ríos, y otros, 2008).

La plumbagina, una naftoquinona, y su derivado, 2-metoxi-1,4-naftoquinona, han demostrado acción contra *Leishmania* mediante la inhibición de la enzima tripanotiona reductasa (Tryr) (Cantú, Palomo, Flores, López, & Barajas, 2012).

Los compuestos químicos naturales y sus derivados se han propuesto como una alternativa, y se ha reportado una menor incidencia de reacciones adversas de éstos en comparación con los fármacos sintéticos, además de ser más económicos (Cantú, Palomo, Flores, López, & Barajas, 2012).

En estudios similares utilizan compuestos leishmanicidas de origen natural para su posible terapia contra esta enfermedad, se utiliza el compuesto plumbagina que posee diversas propiedades, una de ellas es la actividad leishmanicida que ha sido comprobada en diferentes cepas de Leishmania como *L. donovani, L. amazonenzis y L. brazilencis* (Chouhan, Ozbak, Hemeg, & Afrin, 2015)

En el presente proyecto de tesis tuvo como objetivos: 1) Evaluar la actividad leishmanicida del aceite esencial de la planta *Plumbago scandens* L. sobre promastigotes de *Leishmania major like,* cultivados de forma in vitro; 2) Extaer el aceite esencial de las partes aéreas (tallo y hojas) por medio de la técnica de arrastre de vapor; 3) Determinar la actividad leishmanicida del aceite esencial por medio de la técnica del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), ensayo colorimétrico que se basa en la reducción de este compuesto por acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, mostrando un cambio en la coloración de amarillo a azul-violeta, la cual indica la viabilidad del microorganismo al metabolizar el MTT, los resultados obtenidos fueron efectivos al mostrar una actividad leishmanicida elevada del 85% en concentraciones de 15-30 µg/ml que inhibieron y provocaron la lisis del parásito; 4) Culminado el proyecto la investigación se hizo la difusión de los resultados en presencia de los estudiantes y docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico.

4. Revisión literaria

4.1 Leishmaniasis

La *Leishmaniasis* pertenece al grupo de enfermedades causadas por protozoos del género *Leishmania.* La infección corresponde a una antropozoonosis que llega al hombre por la picadura de insectos infectados.

La Leishmania, desde su reservorio natural constituido por roedores salvajes y cánidos, entre otros, son transmitidos por flebótomos al hombre produciéndole una infección cutánea local (botón de oriente). En ciertas ocasiones desde la puerta de entrada cutánea los protozoos son trasladados por los macrófagos a órganos ricos en tejido retículo endotelial como la medula ósea, hígado, bazo y ganglios linfáticos produciendo un cuadro de *Leishmaniasis* visceral caracterizado por hepato esplenomegalia, anemia, leucopenia e hiper gammaglobulinemia afectando el estado general y fiebre (Prats, 2007).

4.2 Agentes Etiológicos

Los protozoos causantes de infección en el hombre pertenecen a la familia *Trypasomatidae* y género *Leishmania*, que tiene numerosas especies y subespecies, con igual morfología, pero difieren en su ubicación geográfica, comportamiento biológico, molecular e inmunológico y características clínicas de la enfermedad (Jimenez, 2015).

El género *Leishmania* se divide en dos subgéneros *Leishmania (L.)* y *Viannia (V.)* de acuerdo con el sitio de desarrollo en el intestino del díptero transmisor. El subgénero *Leishmania* se ubica en el área suprapilorica (próxima a la probóscide), del insecto; mientras que el subgénero *Viannia* se ubica en el intestino medio y posterior (Becerril, 2014).

Las características morfológicas corresponden a dos formas parasitarias las cuales adoptan según su ciclo de vida: los amastigotes son formas intracelulares ovaladas o redondeadas con una longitud de 2µ a 5µ, no poseen flagelo y se encuentran localizados en los macrófagos de los huéspedes vertebrados. Al momento de teñir los amastigotes se observa un citoplasma azul claro y un núcleo de gran tamaño de color rojo o purpura con cariosoma central, un cinetoplasto en forma de barra y un rudimento de flagelo que no sale al exterior.

Los promastigotes se encuentra en el huésped invertebrado el cual es inoculado por el invertebrado, tienen una longitud entre 10µ y 15µ. Mediante tinción con Giemsa, se observa que el núcleo se encuentra en la parte media del cuerpo del parásito, el cinetoplasto se ubica en el extremo anterior y en la parte terminal se encuentra el flagelo que tiene la misma longitud del parásito el cual le confiere motilidad (Morelos, 2015).

4.3 Ciclo de vida

Todos los géneros *Leishmania* poseen un ciclo de vida similar, que incluye a insectos de la familia *Psychodidae,* en el nuevo mundo los vectores pertenecen al género *Lutzomyia* y *Phlebotomus* en el viejo mundo.

El vector hembra se infecta al picar un vertebrado y succionar sangre con amastigotes y macrófagos infectados. Su reproducción es por medio de división binaria en diferentes partes del tubo digestivo del vector y se los clasifica en *Hypopiloria* o parte superior, *Suprapyloria* o anterior y *Peripyloria* en ambas partes. En cualquiera de éstas, los amastigotes se alargan y desarrollan un flagelo dando origen a los promastigotes, el vector ya infectado pica a un nuevo vertebrado donde son regurgitados promastigotes metacíclicos, que son los parásitos infectantes. El tiempo que le toma al vector para

volverse infectante es de 10 días. En la naturaleza la infección es baja por lo que tienen que picar varias veces para así poder inocular de 10 a 200 parásitos (Chan & Peña, 2001).

Al momento que penetran los promastigotes en la piel estos son englobados por las células de Langerhans y otros macrófagos, dentro de los fagosomas se transforman en amastigotes, dentro de estos se reproducen intracelularmente por división binaria hasta que rompen la célula e invaden a nuevas células hasta causar lesiones ulcerativas por destrucción de tejido (Becerril, 2014).

4.4 Aspectos epidemiológicos

La transmisión de la *Leishmaniasis* depende mucho de la ecología y, por consiguiente, de las circunstancias en que el hombre resulta infectado y varían considerablemente, según el momento y el lugar. La intervención del hombre en un ciclo selvático, ejemplo que es frecuente en el Nuevo Mundo, puede dar lugar a una mayor exposición al flebótomo que forma parte de ese ciclo selvático y por lo tanto a mayor riesgo de infección. En el Viejo Mundo la mayor parte de las *Leishmaniasis* se contraen en zonas rurales áridas o en la periferia de ciertas ciudades, la transmisión puede ser doméstica o peri doméstica (Sánchez, Saens, Garces, & Reggis, 2004).

La *Leishmania* en la actualidad se agrupan en especies y sub especies:

- *Leishmania braziliensis* con las subespecies*: Leishmania braziliensis braziliensis; Leishmania braziliensis major like; Leishmania braziliensis panamensis.*
- *Leishmania mexicana, con las subespecies Leishmania mexicana mexicana, Leishmania mexicana amazonensis; Leishmania mexicana garnhami.*
- *Leishmania mexicana venezuelense.*
- *Leishmania peruviana.*

- *Leishmania trópica.*
- *Leishmania mayor.*
- *Leishmania aethiopica.*
- *Leishmania donovani, con las subespecies: Leishmania donovani infantum, Leishmania donovani chagasi* (Sánchez, Saens, Garces, & Reggis, 2004).

4.5 Leishmania Visceral

Se denomina también kala-azar (que significa "fiebre negra"). Se han descrito seis especies como agentes de LV; las más importantes pertenecen al complejo *L. donovani*: *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* y *L. (L.) chagasi*, estas dos últimás indistinguibles entre sí. Ocasionalmente se han descrito casos de LV causadas por *L. (L.) tropica* en el Viejo Mundo; *L. (L.) mexicana* y *L. (L.) amazonensis* en el Nuevo Mundo. *L. (L.) donovani* es el agente más importante en Asia y Africa, y *L. (L.) infantum* predomina en el Mediterráneo europeo, en tanto que *L. (L.) chagasi* en las Américas (Becerril, 2014).

4.5.1. Patología y patogenia.

El kala-azar es una enfermedad que compromete el sistema fagocítico mononuclear (SFM), por lo que afecta de manera preferente el bazo, hígado, medula ósea y ganglios. El bazo, que por lo general esta considerablemente aumentado de tamaño, es nodular y en los casos crónicos, hay fibrosis. En el hígado con frecuencia hay infiltrado linfomonocitario de los espacios porta. En la medula ósea hay presencia de amastigotes intracelulares y depresión de la serie roja y blanca. Los ganglios mesentéricos son los más comprometidos (Botero & Restrepo, 2012).

4.5.2 Sintomatología.

Las personas que se infectan por cualquiera de los parásitos que causan kala-azar, en las áreas endémicas, pasan por tres fases: i) estadio asintomático; estudios poblacionales en Brasil muestran que entre 80-88% de los infectados son asintomáticos; ii) estadio subclínico, con frecuencias que varían de 12 a 19% de los afectados; iii) estadio clínico, que son una minoría, entre 1.1 y 1.3%. El periodo de incubación promedio es de 2 a 4 meses (rango entre tres semanas a más de dos años). En la forma asintomática las personas no desarrollan síntomas ni hay evidencia de visceromegalia o hipergammaglobulinemia; sin embargo, la prueba de leishmanina es positiva, así como títulos bajos de anticuerpos específicos (Botero & Restrepo, 2012).

Los pacientes con formas subclínicas desarrollan fiebre baja, leve adinamia, anemia (~70%) y visceromegalia (~50% hepatomegalia y ~30% esplenomegalia), pero sin pérdida de peso, ni signos de hemorragia. Lo relevante en los exámenes de laboratorio son títulos altos de anticuerpos específicos e hipergammaglobulinemia (>60%); la leishmanina puede ser positiva o negativa y en 30% se puede detectar el parásito en exámenes de medula ósea. En aquellos que desarrollan enfermedad clínica, se pueden diferenciar tres periodos que tienen implicancias diferentes en el pronóstico: i) fase aguda, es el periodo inicial, en donde los pacientes desarrollan fiebre, moderada adinamia, pérdida de peso, hepatosplenomegalia, y signos moderados de sangrado (Sánchez, Saens, Garces, & Reggis, 2004).

Los signos clínicos más relevantes son: fiebre, palidez y esplenomegalia (firme y de superficie lisa). En el laboratorio se evidencia anemia moderada (usualmente normocrómica y normocítica), leve trombocitopenia, moderada hipergammaglobulinemia, altos títulos de anticuerpos y el examen de la medula ósea usualmente es positivo; en

cambio, la prueba de leishmanina se torna negativa, ii) fase de estado (también se conoce como la forma “clásica”), en donde el cuadro clínico se desarrolla plenamente; los síntomas, signos y hallazgos laboratoriales son similares a la fase aguda, pero más marcados; así, la fiebre es alta (38-39°C, pero puede alcanzar 40-41°C) con diferentes patrones (continua, ondulante y remitente), severa adinamia, visceromegalia muy acentuada; los signos de sangrado son frecuentes y a los hallazgos de laboratorio ya descritos se agrega neutropenia (Sánchez, Saens, Garces, & Reggis, 2004).

4.5.3 Diagnóstico.

El principio básico en el diagnóstico de LV es tratar de demostrar el parásito, ya sea en los ganglios linfáticos, bazo o la medula ósea. La aspiración de los ganglios linfáticos es el procedimiento más sencillo, pero el de menor positividad (<55%); la aspiración de la medula ósea es más dolorosa, requiere experiencia y su sensibilidad varía entre 70-90%. La punción esplénica tiene una alta sensibilidad, mayor a 95%, pero requiere de un clínico entrenado, debe realizarse con el paciente hospitalizado y existe el riesgo de rotura del bazo; además, los pacientes deben tener un mínimo de 40 000 plaquetas/mm3 y tiempo de protrombina normal (Becerril, 2014).

Para confirmar si la enfermedad se dispone de varias pruebas que ayudan al diagnóstico, los métodos de laboratorio utilizados son:

a) ***Búsqueda del parásito.*** Con el material obtenido por punción esplénica o de medula ósea, se hacen extendidos para buscar formas de amastigotes dentro del sistema retículo-endotelial, la presencia de núcleo y cinetoplasto es la característica que distingue a los amastigotes de la *Leishmania.* Los amastigotes se visualizan mediante la coloración con Giemsa, Wright o hematoxilina-eosina (Werner, 2013).

b) ***Cultivos.*** El material obtenido por el aspirado, además de la búsqueda directa del parásito (coloración de Giemsa), se puede utilizar para cultivos *in vitro,* ya sea en medios NNN, Schneider o RPMI, los que tienen una sensibilidad superior a la búsqueda directa (Werner, 2013).

c) ***Prueba de la PCR.*** Es la más sensible y especifica. El diagnostico parásitológico tiene mayores limitaciones en los pacientes con óligoparásitosis, también se debe hacer la diferenciación con la malaria ya que estas pueden coexistir entre ellas. Se usa con efectividad en las pruebas de co-infección con SIDA.

d) ***Pruebas serológicas***

- *Prueba de ELISA.* presenta una sensibilidad mayor del 90%. Se ha empleado la proteína recombinante rK39 como antígeno tiene una especificidad del 98% y sensibilidad mayor del 95%.
- *Inmunofluorescencia indirecta (IFI).* Presenta una sensibilidad del 90%, pero es menos especifica por la reacción cruzada con *Tripanosoma cruzi.*
- *Prueba de aglutinación directa(DAT).* La prueba positiva es equivalente al diagnóstico de extendidos de ganglio linfático o medula ósea y tiene una sensibilidad del 91%.
- *Hemaglutinación indirecta.* Mediante esta prueba se ha obtenido una especificad del 100%
- *Reacción de hipersensibilidad tardía.* La Prueba de Montenegro indica en contacto previo del paciente con el parásito (Werner, 2013).

4.6 *Leishmaniasis* tegumentaria americana (LTA)

La *Leishmaniasis* tegumentaria en las Américas se conoce desde la época precolombina, documentada por la existencia de huacos antropomórficos representando lesiones cutáneas y mucosas.

La enfermedad puede manifestarse de tres formas clínicas diferentes: cutánea (LC), mucocutánea (LCM) y cutánea difusa (LCD). En algunos países la *Leishmaniasis* recibe nombres populares, como úlcera de los chicleros en México, pian bois en las Guayanas, uta en Perú para las formas cutáneas y espundia para las formas cutáneo-mucosas en Perú y Bolivia (Werner, 2013).

4.6.1 Patología y patogénesis.

La lesión correspondiente a la entrada del parásito corresponde a una reacción inflamatoria en el tejido conectivo formándose una pápula y al desarrollarse la inmunidad se produce necrosis de la dermis y ulceración. Los parásitos se diferencian de otros microorganismos por la presencia de núcleo y cinetoplasto. El infiltrado está conformado por plasmocitos, linfocitos y células gigantes. Existe atrofia cutánea y desaparición de la epidermis. Si los parásitos son fagocitados por neutrófilos, se destruyen en los fagolisosomas, pero no los que entran a los macrófagos (Becerril, 2014).

En la invasión mucocutánea además de las lesiones ulcerativas, se presentan cordones epiteliales que entran profundamente en la dermis. La mucosa muestra una reacción infiltrativa y ulcerativa. En las formas enérgicas o difusas no hay necrosis, ni granulomas y los parásitos se multiplican en gran cantidad en los histiocitos o macrófagos (Becerril, 2014).

4.6.2 Sintomatología.

La forma clínica de la enfermedad dependerá de las características biológicas de especie o subespecie de *Leishmania*, pero la localización de las lesiones cutáneas dependerá, principalmente, de las características de comportamiento del vector y del hospedero (Becerril, 2014).

4.6.3 Enfermedad cutánea.

La lesión cutánea típica es la ulcera, que suele tener un fondo granuloso grueso, con bordes bien delimitados, de tinte violáceo, más de 80% de los pacientes la desarrollan. Al inicio, en el sitio de la picadura e inoculación del parásito, aparece un eritema pruriginoso que evoluciona a pápula y vesícula pustulosa de base indurada, que luego se abre como una pequeña ulcera, la que se cubre de una costra. La lesión inicial puede ser única (~60-70% de los casos) o múltiple y, en ocasiones, las lesiones pueden confluir; las ulceras por lo general tienen bordes netos y edematosos con un color violáceo, son indoloras y cuando se retira la costra que las cubre, se aprecia un fondo granulomatoso grueso, hiperémico y sangrante (Botero & Restrepo, 2012).

Si la lesión se ha infectado, lo cual es frecuente, se aprecia un exudado blanco amarillento que en ocasiones puede tener mal olor, con dolor local y desarrollo de linfangitis y aumento de los ganglios regionales. Desde el punto de vista morfológico, es muy difícil distinguir las lesiones causadas por las diferentes especies de *Leishmania*; sin embargo, se acepta que *L. (V.) braziliensis* es la más agresiva. Las zonas de la piel más afectadas son las descubiertas, principalmente cara, miembros superiores e inferiores. Es raro observar lesiones en la palma de las manos, planta de pies o cuero cabelludo. Otras formas morfológicas son lesiones infiltrativas en placas, nódulos subcutáneos o formaciones vegetantes (Werner, 2013).

4.6.4 Enfermedad mucosa.

Se observan tres patrones en el compromiso mucoso: 1) el intermedio, que ocurre en más de 80% de los casos, en donde las lesiones mucosas se desarrollan en un lapso mayor a dos años posteriores a la cicatrización de las lesiones cutáneas. La enfermedad se inicia en el tabique nasal y progresivamente (meses a años) compromete las otras mucosas, en ausencia de tratamiento específico; 2) patrón lento, ocurre en menos de 10% de los pacientes con *Leishmaniasis* mucosa (LM), en donde la lesión queda restringida a la cavidad nasal (tabique y cornetes) y permanece casi estacionaria por años(inclusive >30 años), y 3) patrón rápido, en menos de 10% de los pacientes con LM, en donde múltiples mucosas son comprometidas en menos de seis meses, y con frecuencia la lesión cutánea está activa (Becerril, 2014).

En alrededor de 99% de los casos las lesiones mucosas se inician en el tabique (tercio inferior y medio) y cornetes nasales; después se extienden por contigüidad hacia la rinofaringe, cavidad oral (principalmente úvula y paladar blando), epiglotis y cuerdas vocales.

En el compromiso nasal, al inicio se aprecian lesiones inflamatorias, hiperémicas, infiltrativas, con escaso tejido granulomatoso, poco doloroso y escaso sangrado. Cuando se compromete la mucosa del paladar blando, las lesiones tienden a ser proliferativas, granulosas, que en casos muy severos puede dar una imagen de cruz, denominada la Cruz de Escomel; estas lesiones tienden a ulcerarse (Becerril, 2014).

En casos avanzados, se puede observar amputaciones del tabique nasal (que produce lo que se ha denominado nariz de tapir o huanucoide), cornetes o parte de las alas de la nariz. El compromiso de la epiglotis, cuerdas vocales y la tráquea conlleva a la pérdida de voz (disfonía), dolor a la deglución de los alimentos (disfagia) y dificultad respiratoria (disnea).

Los pacientes con compromiso severo y crónico están propensos a infecciones respiratorias intercurrentes (usualmente aspirativas) y representa riesgo de muerte (Becerril, 2014).

4.7 Leishmania difusa

La enfermedad evoluciona hacia una forma impetiginosa o infiltrativa, no ulcerada, en la que se encuentra alteración del sistema inmunitario, con intradermorreacción negativa y abundantes parásitos en las lesiones, se asocia generalmente a *L. mexicana* y *L. amazonensis* (Botero & Restrepo, 2012).

4.7.1 Diagnóstico.

El diagnostico presuntivo se basa, en primer lugar, en las características clínicas de la enfermedad, las más importantes de las cuales son lesión ulcerativa, no dolorosa, con un fondo granulomatoso grueso, con bordes indurados, violáceos y con una duración mayor a cuatro semanas. El segundo aspecto importante es el antecedente epidemiológico (Botero & Restrepo, 2012).

El diagnóstico definitivo requiere la demostración del parásito, el cual puede ser por diferentes métodos:

a) ***Demostración de los amastigotes en el frotis y/o biopsia.*** El frotis es el método más común, y hay diferentes procedimientos para tomar la muestra, entre ellos, por raspado con hoja de bisturí, espátula, por aspiración con una aguja hipodérmica o micropipeta. La mejor muestra es aquella rica en linfa y sin sangre, gérmenes o *mucus* que impiden una buena observación. El método de coloración es el Piensa y debe observarse con objetivo de inmersión por 30 minutos (Botero & Restrepo, 2012).

Los parásitos se encuentran libres o en el interior de los macrófagos. En las lesiones recientes y no tratadas, el hallazgo de los amastigotes es más frecuente, lo que no

ocurre en lesiones contaminadas o crónicas. Se trata de un método barato, pero de baja sensibilidad porque es afectado por tratamientos previos o sobreinfección bacteriana y requiere de personal entrenado para su lectura.

b) ***Los cultivos in vitro.*** El material se obtiene por aspiración o biopsia, el cual debe triturarse antes de la inoculación al medio de cultivo. La obtención de la muestra es más complicada en lesiones nasales. El más usado es el NNN suplementando con sangre desfibrinada de conejo (15%), otros medios son el RPMI o M199. Los cultivos deben mantenerse a 23°C y se tornan positivos entre 3-30 días, siendo lo usual de 7 a 15 días. La sensibilidad es alrededor de 60-70%, pero las desventajas son que se requiere tener sistemas de incubación con temperatura controlada y microscopios invertidos, infraestructura limitada en las áreas endémicas. Este material también se puede usar para la determinación de la especie de *Leishmania*, mediante la hibridación de K-DNA y el uso de los anticuerpos monoclonales (Werner, 2013).

c) ***PCR (reacción en cadena de la polimerasa).*** Es el método más sensible (>90%); sin embargo, su uso requiere de equipos sofisticados y personal altamente entrenado, por lo que se restringe aun en laboratorios especializados. Además del PCR clásico, se dispone RT-PCR (PCR en tiempo real), PCR-RLFP.

d) ***Biopsia.*** Técnica que además de ser utilizada en el diagnostico parásitológico, permite el estudio histológico. El diagnóstico de *Leishmaniasis recidivans* cutis es difícil con los métodos parásitológicos usuales porque el número de parásitos es escaso, sin embargo, con el PCR la sensibilidad se incrementa de manera significativa. El diagnostico inmunológico se refiere a la detección de una respuesta inmune mediada por células o de anticuerpos específicos para leishmanina (Becerril, 2014).

e) ***Prueba intradérmica de Montenegro.*** Prueba que consiste en la inoculación intra epidérmica de un extracto proteico (concentración 30 mg/ml) de un lisado de

promastigotes de *Leishmania* procedentes de un cultivo en masa. La aparición de una macula-pápula en el punto de inoculación a partir de las 48 horas se considera positiva (diámetro igual o mayor a 5 mm). Es útil cuando no se puede hacer diagnostico parásitológico porque su correlación con la clínica es buena (la sensibilidad varía entre 85-95% y la especificidad entre 88-93%, dependiendo de la forma clínica); sin embargo, su limitación es la falta de estandarización. Existe reacción cruzada con la enfermedad de Chagas. (Becerril, 2014).

f) ***Pruebas serológicas.*** La inmunofluorescencia indirecta y ELISA son los métodos más usados para la detección de anticuerpos. Dan reacción cruzada, principalmente con enfermedad de Chagas y kala-azar. Teniendo en cuenta que las diferentes especies de *Leishmania* varían en forma considerable en cuanto a su capacidad para inducir anticuerpos detectables, en *Leishmaniasis* tegumentaria estas pruebas son poco usadas por limitaciones en la sensibilidad y especificidad (Botero & Restrepo, 2012).

4.8 Principales factores de riesgo

4.8.1 Condiciones socioeconómicas.

La pobreza aumenta el riesgo de *Leishmaniasis*. Las malas condiciones de vivienda y las deficiencias de saneamiento de los hogares (por ejemplo, la ausencia de sistemas de gestión de residuos, alcantarillado abierto) pueden promover el desarrollo de los lugares de cría y reposo de los flebótomos y aumentar su acceso a la población humana. Los flebótomos se ven atraídos por el hacinamiento, ya que constituye una buena fuente de ingesta de sangre (López, Tartaglino, Steinhorst, Salomón, & D., 2016).

Las pautas de comportamiento humano (por ejemplo, dormir a la intemperie o en el suelo) también es probable que aumenten el riesgo. El uso de mosquiteros tratados con insecticida reduce el riesgo.

4.8.2 Malnutrición.

Las dietas bajas en proteínas, hierro, vitamina A y cinc aumentan el riesgo de que la infección progrese hacia el kala-azar.

4.8.3 Movilidad de la población.

Las epidemias de las dos formas principales de *Leishmaniasis* a menudo se asocian con la migración y el desplazamiento de personas no inmunizadas a zonas donde ya existen ciclos de transmisión. La exposición en el trabajo y el aumento de la deforestación siguen siendo factores importantes. Por ejemplo, asentarse en zonas previamente boscosas significa acercarse al hábitat del flebótomo, lo que puede llevar a un aumento rápido del número de casos (OMS, 2017).

4.8.4 Cambios ambientales.

Los cambios ambientales que pueden influir en la incidencia de la *Leishmaniasis* son, entre otros, la urbanización, la integración del ciclo de transmisión en el hábitat humano y la incursión de las explotaciones agrícolas y los asentamientos en las zonas boscosas (OMS, 2017).

4.8.5 Cambio climático

La *Leishmaniasis* es sensible a las condiciones climáticas, y los cambios en las precipitaciones, la temperatura y la humedad influyen en gran medida en la enfermedad. El calentamiento de la Tierra y la degradación del suelo afectan en muchos aspectos a la epidemiología de la *Leishmaniasis*:

- Los cambios de temperatura, precipitaciones y humedad pueden tener efectos importantes en los vectores y los reservorios animales, al alterar su distribución e influir en las tasas de supervivencia y el tamaño de la población;

- Pequeñas fluctuaciones en la temperatura pueden tener un acusado efecto en el ciclo de desarrollo de los promastigotes de *Leishmania* en los flebótomos, y permitir que el parásito se transmita en zonas donde la enfermedad no era previamente endémica;
- Las sequías, las hambrunas y las inundaciones que se producen como consecuencia del cambio climático pueden llevar a desplazamientos masivos y la migración de personas hacia zonas de transmisión de la *Leishmaniasis*, y la desnutrición puede debilitar la inmunidad de las poblaciones afectadas (OMS, 2017).

4.9 Plumbago

El género Plumbago está constituido por unas 20 especies de arbustos y herbáceas perennes, más raramente anuales, que habitan en las regiones cálidas del mundo. El nombre genérico, debido a Tournefort y consagrado por Linneo, deriva del vocablo latino plumbum con el significado de plomo que, parece ser se utilizaba para designar a ciertas plantas no bien definidas, a las que se suponía remedios eficaces contra los envenenamientos producidos por este metal. El epíteto especifico deriva de la voz latina Scando, trepar y alude al hábito trepador de esta planta (Judd, Campbell, Kellogg, & Donoghue, 2007).

4.9.1 Clasificación botánica.

- **Reino**: *Plantae*
- **División**: *Magnoliophyta*
- **Clase**: *Magnoliophyta*
- **Orden**: *Plumbaginales*
- **Familia**: *Plumbaginaceae*
- **Género**: *Plumbago* (Saji, 2015)

4.9.2 Características generales.

El género *Plumbago* pertenece a la familia *Plumbaginaceae* y comprende plantas originarias de las regiones de clima templado y tropical (Ulloa, 2015). En el Ecuador se encuentra distribuido por diferentes lugares como: Galápagos, Guayaquil, Tungurahua, Loja, Catacocha, Manabí y Esmeraldas (Croat, Carlsen, & Levin, 2007).

Se trata de plantas anuales o perennes de porte arbustivo y trepador, de aspecto muy variado por su crecimiento muy desordenado con tallos que llegan a desarrollarse hasta 4,5 m en las plantas espontáneas, pero si se cultiva oportunamente organizada sobre tutores, se pueden tener plantas muy decorativas y más contenidas. Las flores, asociadas en inflorescencias en espiga de 20 a 30 cm de largas, son de color azul o rojo según la especie y la variedad y están constituidas por una parte tubular de unos 4 cm de largo que se abre en una corola formada por 5 pétalos y de unos 2,5 cm de ancho (Elicriso, 2016).

4.9.3 Plumbago scandens

a) ***Nombre científico.*** *Plumbago scandens* L.

b) ***Sinonimia:*** *P. zeylanica.*

c) ***Sinonimia popular.*** Cola de iguana, estreñiría, hierba del alacrán, hierba del pescado, hierba de culebra,

d) ***Botánica y ecología.*** Es una planta arbustiva de 1 a 2m de altura. Las hojas son más anchas que largas. Las flores son de color blanquecinas, parecen trompetitas y algunas veces, cuando están secas se ponen rojizas, están agrupadas formando unos ramilletes muy vistosos (Encalada, 2018).

Originaria de indias occidentales. Nativa de regiones templadas cálidas a tropicales del mundo. Planta silvestre, crece a orilla de caminos, en bosque tropical caducifolio (perdida de follaje) y matorral xerófilo (semidesierto) (Lasser, 1974).

e) ***Etnobotánica y antropología.*** Se aplica también contra las verrugas, pitiriasis alba, el dolor de articulaciones, heridas, picaduras y raspaduras. Sus diferentes partes se pueden utilizar como cremas, pastas, extractos e infusiones para su uso.

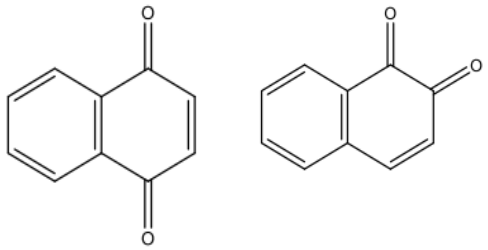
f) ***Química.*** De las ramas de *Plumbago_scandens* se han aislado los quinoides plumbagín (también presentes en hoja y raíz), iso shimanolona y el esterol beta-sitosterol. En los pétalos de las flores se ha identificado el flavonoide azaletín-3-ramnósido (UNAN, 2009).

4.10 Quinonas y naftoquinonas

Las quinonas son compuestos orgánicos que se derivan de compuestos aromáticos mediante el intercambio de un número par de electrones hacia grupos carbonilo o cualquier reordenamiento necesario de dobles enlaces; resultando una estructura cíclica diona completamente conjugada. Estas actúan como agentes alquilantes y por ello resultan altamente tóxicas, se sabe que interactúan con flavoproteínas para generar especies reactivas de oxígeno (ROS) las cuales pueden inducir lesiones biológicas (Leyva, Carrillo, López, Avellaneda, & Navarro, 2016).

Un subgrupo importante dentro de la familia de las quinonas son las naftoquinonas, estas forman parte de un grupo de metabolitos secundarios, los cuales, son frecuentemente utilizados como pigmentos naturales, de estos se han evidenciado propiedades citotóxicas basadas en su habilidad para generar especies reactivas de oxígeno e interferir con los procesos de respiración celular, tienen como característica estructural dos grupos carbonilo en las posiciones 1,4 y con menor frecuencia en 1,2 o 1,3 en el anillo del naftaleno(figura N°1); en la naturaleza se presentan con grupos hidroxilo y/o metilo como sustituyentes (Rosales, 2016).

Figura N°1



1,4- naftoquinona **1,2-naftoquinona**

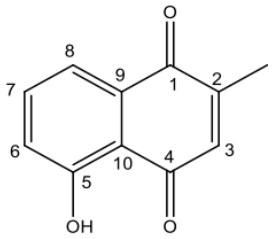
Estructuras de naftoquinonas (Ahuga, 2016).

Las 1,4-naftoquinonas son una de las clases químicas con mayor importancia biológica dentro de la familia quinona y se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, al igual que varias quinonas, éstas pueden generar especies reactivas de oxígeno, así como superóxidos y radicales hidroxilo, además se ha descrito que la porción quinona puede actuar como un electrófilo y reaccionar con diferentes blancos biológicos en varias especies de mamíferos incluyendo a los humanos(Ahuga, 2016).

4.11 Plumbagina

Plumbagina o 5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona (figura N°2) se extrajo por primera vez de la raíz de *Plumbago zeilanica* L., también conocida como “Chitrak”. Este metabolito está presente en plantas de las familias *Plumbaginaceae*, *Droseraceae*, *Ebenacea*, *Ancestrocladaceae* y *Dioncophyllaceae*, presenta una estructura química común naftoquinona, un hidroxilo y un metilo en las posiciones C-5 y C-2, respectivamente (Araujo, y otros, 2014).

Figura N° 2



Plumbagina

Estructura química de plumbagina (Ahuga, 2016).

Las propiedades citotóxicas de plumbagina están relacionadas con su núcleo de quinona el cual contribuye a su actividad terapéutica, este permite la conducción de electrones de un donador de dos electrones a un aceptor de un electrón en la cadena respiratoria, tanto en células eucariontes como procariontes formando así un generador

superóxido. Debido a su grupo hidroxilo, la plumbagina es capaz de formar quelatos muy estables con varios metales de importancia biológica, y se ha pensado que estas interacciones pueden ser algunos de los posibles mecanismos para sus actividades biológicas. Se sugiere que el grupo hidroxilo de plumbagina es necesario para la inhibición de la actividad acetiltransferasa y que el grupo metilo puede producir un efecto inductivo positivo a la fracción quinoide haciendo a plumbagina un anticancerígeno más potente (Ahuga, 2016).

La plumbagina se ha utilizado durante siglos en la medicina india y china, se conoce su uso como tinte para el cabello, colorante de la piel, también se ha utilizado en el tratamiento del acné, tiña, hongos, enfermedades inflamatorias, infecciones bacterianas, parasitarias y virales. Además de sus propiedades anticancerígenas, se ha informado que plumbagina presenta varias actividades biológicas como, antimicrobiano, antibacteriano, antiaterosclerótico, radiosensibilizante, inhibidor de la topoisomerasa II, antinflamatorio e inmunosupresor (Ahuga, 2016).

4.12 Métodos de evaluación de actividad leishmanicida

La reducción inherente de las células o microorganismos vivos sirve como un indicador de actividad metabólica y, por lo tanto, de viabilidad celular; cuando se mide el potencial de reducción celular en una población, la señal es proporcional al número de células vivas. El indicador redox en nuestros ensayos de viabilidad de células de alamarBlue y PrestoBlue (resazurin) se convierte en resorufinas de moléculas indicadoras fluorescentes y colorimétricas en células metabólicamente activas, y sirve como un indicador de viabilidad / citotoxicidad muy confiable y sensible. Los ensayos que involucran a MTT o XTT usan la reducción para generar un resultado fuertemente coloreado denominado formazán (Escobar, Rivera, & Aristizábalo, 2010).

4.12.1 Técnica de Resazurina

La resazurina fue introducida como indicador de viabilidad celular no tóxica, útil para monitorear la proliferación celular y la citotoxicidad. En particular, este colorante (azul no fluorescente) se reduce en dos pasos, irreversiblemente a resorufina (rosado altamente fluorescente), y en una segunda etapa reversible, a dihidroresorufina, compuesto incoloro y no fluorescente, procesos que se asocian principalmente con la mitocondria de células viables. La resorufina es difundida al medio permitiendo el continuo monitoreo de la proliferación y/o muerte celular (citotoxicidad) asociada al tratamiento con xenobióticos sobre células humanas, animales, bacterias, parásitos e incluso hongos (Escobar, Rivera, & Aristizábalo, 2010).

4.12.2 Técnica de XTT (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida)

La técnica XTT, una prueba específica utilizada frecuentemente para estudios de crecimiento e inhibición celulares, puede, en ciertos casos, necesitar mayor especificidad, para lo que requiere el perfeccionamiento apropiado que le permita superar los problemas de medición que se pudieran presentar. Esta técnica detecta las células vivas en crecimiento o su inhibición por la presencia (o ausencia) de actividad de enzimas mitocondriales que reducen las sales de tetrazolium a compuestos de formazán, enzimas que dejan de emitirse cuando la célula muere (Fukusaki, y otros, 2015).

4.12.3 Técnica de MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. Al

reducirse, el MTT se convierte en un compuesto de la familia formazános, de color violeta e insoluble en agua. Para cuantificarlo se suele disolver en un disolvente orgánico, como DMSO (dimetilsulfóxido) o SDS (dodecil-sulfato sódico) y se mide su color mediante la absorbancia de 570nm (Escobar, L; Aristizabal, F, 2010).

En el presente estudio se utilizó la técnica del MTT, la cual se desarrolló mediante el uso de promastigotes de *Leishmania major like* cultivados en medio RPMI 1640, el aceite esencial de la planta *Plumbago scandens* L. se extrajo por medio de la técnica de arrastre de vapor y se prepararon ocho diluciones seriadas con diferentes concentraciones: dilución 1:2 (120µg/ml), 1:4 (60µg/ml), 1:8 (30µg/ml), 1:16 (15µg/ml), 1:32 (7,5µg/ml), 1:64 (3,75µg/ml), 1:128 (1,87µg/ml), 1:256 (0,9µg/ml) y su acción fue evaluada por medio del reactivo del MTT; el ensayo se distribuyó en placas de 96 pocillos, teniendo en cuenta las muestras problemas, que contiene el medio de cultivo con parásitos y el aceite esencial; controles, que contiene medio de cultivo con parásitos sin aceite esencial; blancos, que contiene medio de cultivo sin parásitos; las pruebas se realizan por cuadriplicado. El fármaco de referencia se lo distribuye de igual manera que el aceite esencial.

La placa del ensayo que contiene a los parásitos con el aceite esencial se deja incubar a 28 °C por 24 horas, cumplido el tiempo de incubación se coloca el reactivo del MTT y se incuba a 35°C por 4 horas más, una vez cumplido el tiempo de incubación anterior se dispensa el SDS (Dodecil sulfato sódico) para disolver los cristales de formazán, que se forman por la reacción del parásito con el MTT. Finalizado el ensayo se realizan las lecturas en el Espectrofotómetro a una longitud de onda de 570nm, obteniendo las absorbancias del ensayo para su posterior cálculo del porcentaje de inhibición parasitario, es decir el porcentaje de inhibición que tuvo cada una de las diluciones seriadas del aceite esencial sobre los promastigotes *Leishmania major like.*

5. Materiales y métodos

5.1 Tipo de estudio

El estudio es experimental, prospectivo.

5.2 Área de estudio

El proyecto se lo desarrolló en el Laboratorio de Análisis Químico, adscrito a la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Loja, ubicado en el sector La Argelia, en la ciudad de Loja – Ecuador.

5.3 Grupo de estudio

Estuvo constituido por medios de cultivo con promastigotes de *Leishmania major like*. El número de medios de cultivo utilizados en el proyecto de tesis fueron de 38.

5.4 Muestra que se utilizó en el ensayo

Constituido por promastigotes de *Leishmania major like*, cultivados en medio de cultivo RPMI 1640 sin rojo fenol y glutamina. La cantidad usada en cada ensayo es de 6.4 ml/placa, es decir 80µl/pocillo que contienen alrededor de $4x10^6$ promastigotes. El número de ensayos realizados fueron de 18 placas de 96 pocillos, es decir 1440 pruebas.

5.5 Criterios de inclusión

- Promastigotes de *Leishmania major like*, en fase logarítmica de reproducción.
- Parásitos cultivados *in-vitro* viables y sin contaminación microbiológica.

5.6 Criterios de exclusión

- Contaminación en fase analítica.
- Cambios morfológicos del promastigote.

5.7 Métodos, técnicas y procedimientos

Fase Pre analítica

Materia prima

Colecta de planta

La planta *Plumbago scandens* L, se recolectó en septiembre de 2017, en el cantón Palanda, provincia de Zamora Chinchipe (Ecuador), a 115Km de la ciudad de Loja (4°38′59″S 79°07′56″O). Se recolecto las partes aéreas de la planta: tallos y hojas para su procesamiento, una muestra se preservó para su identificación taxonómica. La identificación de la planta se la realizó en el Herbario Reinaldo Espinoza de la Universidad Nacional de Loja por el taxónomo Bolívar Merino, que por las características y componentes de la planta se pudo identificar que se trataba de *Plumbago scandens* L.; la planta se encuentra registrado en el herbario con baucher EC14-069, código con el cual se puede encontrar registrada a la planta.

El material fresco fue desinfectado con solución de hipoclorito de sodio al 0,5 %, se escurrió el exceso de agua y se conservó a 8 ºC hasta su procesamiento.

Parásitos

Promastigotes de Leishmania major like

La cepa de *Leishmania major like*, fue provista por el Instituto Oswaldo Cruz, con el código 10CL2021 y conservados en medio NNN (Novy, Nicolle y McNeal), que consiste en agar BHI (brain-heart-infution) suplementado con un antibiótico (gentamicina), sangre de conejo desfibrinada y medio Schneider's Drosophila (GIBCO ®), los parásitos fueron incubados a una temperatura de 28°C y se realizaron pases o resiembras cada siete días en cultivos frescos. Ver anexo 1

El medio Schneider Drosophila, se usó como suplemento para los medios de cultivo NNN, convirtiéndolo en un medio bifásico, el medio Drosophila se lo preparó con suero fetal bovino inactivado (SFBi), gentamicina o anfotericina. Ver anexo 2

Fase Analítica

Obtención del aceite esencial (AE) de *Plumbago scandens* L.

El aceite esencial (AE) se obtuvo por arrastre de vapor en un equipo de destilación, donde se usó tallos y hojas. La extracción inicia armando el equipo de destilación: que consta de un balón con agua calentado con una estufa calefactora, un refrigerante unido al balón de tres bocas que contiene el material vegetal, que al igual que el primer balón es calentado con una estufa calefactora, por último, con el otro refrigerante se conecta el matraz colector. Los destilados de color amarillo intenso y olor penetrante fueron colectados en un balón en baño de hielo. Posteriormente fueron lavados varias veces con hexano en un embudo de separación hasta que el solvente no presentó color amarillo. Ver anexo 3

Para evaluar la pureza del AE se realizó una Cromatografía en capa fina (TLC, Silicagel 60 $F_{254,}$ MERCK®) usando como eluyente una mezcla de hexano: acetato de etilo 80/20 ml y en la cual se evidenció la presencia de varias franjas visibles con luz ultravioleta de 254 nm, indicando la presencia de varias sustancias. La purificación por cromatografía de columna se realizó usando silicagel 60 (0,063-0,200mm, MERCK®) y como eluyente una mezcla de hexano: dietil éter 5/0,4 ml. Una cromatografía final en capa fina (TLC) indicó la presencia de un solo componente, en este caso es de la plumbagina que presenta un color amarillo. El producto obtenido se conservó en un matraz de vidrio, en refrigeración y al amparo de la luz.

Para el ensayo de actividad leishmanicida se prepararon ocho concentraciones con factor de dilución 1:2, partiendo de 120 µg/ml que es la primera concentración hasta la

última de 0,9 µg/ml; el aceite esencial se disolvió con DMSO (dimetil sulfóxido) ya que es un solvente que no afecta a la estructura del parásito.

Preparación de medio de cultivo RPMI 1640

Para el cultivo axénico de promastigotes de Leishmania se utilizó medio RPMI 1640 (GIBCO ®), sin rojo fenol y glutamina, suplementado con 20% de suero fetal bovino inactivado (SFBi), 0,03 % glutamina, gentamicina 200 µg/ml y 2 % de orina estéril de hombre adulto, su incubación se la realiza a una temperatura de 28°C y al cuarto día de incubación estará listo para el ensayo de actividad leishmanicida. Ver anexo 4

Cuantificación de parásitos en cámara de Neubauer

El recuento de parásitos de *Leishmania major like* se lo realiza antes de iniciar el ensayo de actividad leishmanicida, esto para corroborar el crecimiento y el número de parásitos que deben ir en cada pocillo del ensayo, los recuentos se llevaron a cabo desde el día 0 al día 8 de crecimiento en cámara de Neubauer, para ello se tomó diez microlitros de cultivo original de los parásitos, se realizó un factor de dilución de 1/10 con agua ultra pura, se tomaron 10µl de la dilución y 1µl de azul de toluidina para evidenciar viabilidad. La dilución se colocó en cada retículo para realizar el conteo de parásitos en los 5 cuadrantes que son los 4 cuadrados externos (L1, L2, L3, L4) y el cuadrado central (A, B, C, D, E) de cada retículo (2), dentro y sobre las líneas de la cámara. Si se presentaban rosetas estas fueron contadas como un parásito. que son los 4 cuadrados externos (L1, L2, L3, L4) y el cuadrado central (A, B, C, D, E) de cada retículo (2). Ver anexo 5

Preparación de soluciones, reactivos y fármaco de referencia

Se preparó la solución de PBS (solución salina fosfatada) utilizada para disolver el reactivo del MTT que se utiliza para el ensayo, la preparación del reactivo del azul de

toluidina se utilizó para el conteo de los parásitos en la cámara de Neubauer; el fármaco de referencia que este caso se usó la anfotericina, se prepararon ocho diluciones seriadas iniciando con la dilución 1:2 (2µg/ml) hasta la dilución de 1:256 (0,01µg/ml). Ver anexo 6

Técnica de MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)

El ensayo colorimétrico de actividad antiparasitaria, expresada en porcentaje de inhibición, se lo realizo con el MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, el cual es reducido por la succinato-deshidrogenasa mitocondrial presente en microorganismos vivo, y origina un compuesto de color violeta, el formazán, el cual se solubiliza con Dodecil sulfato sódico (SDS) o dimetil sulfóxido (DMSO) y se mide la absorbancia a 570 nm. Él ensayo se lo realizó en promastigotes de *Leishmania major like*. Ver anexo 7

Ensayo de actividad antiparasitaria

El ensayo realizado sobre *Leishmania major like* permite determinar la capacidad citotóxica de un producto, comparando el crecimiento del parásito en fase exponencial en un medio de cultivo sin tratar, con otro que se le añadirá el producto a ensayar.

Para esto se aplicará la técnica de reducción de MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) que determinará la densidad de los parásitos en cada pocillo por medio de la absorbancia a 570nm, esto permitirá realizar el cálculo de la actividad anti-parasitaria (AP). Como fármaco de referencia se utilizó anfotericina B.

$$\%AP=100-[(Ap-Ab)/(Ac-Ab)\ x100]$$

Ap: absorbancia del problema
Ab: absorbancia del blanco
Ac: absorbancia del control

Ensayo de actividad frente a *Leishmania major like*

El ensayo se realizó preparando un cultivo en masa con un inoculo de $4x10^6$ promastigotes/ml a partir de un cultivo en fase de crecimiento exponencial (cuarto día de cultivo), en un volumen final de 15 ml.

El ensayo se lo realizó al tercer día de la preparación del cultivo en masa, se lo hizo en condiciones estériles en una placa de 96 pocillos, se coloca 80 µl/pocillo de medio con parásitos, se añadió el producto a ensayar a razón de 10µl/pocillo y se incubo durante 24horas a 28°C. Se tuvo en cuenta la siguiente distribución de pocillos:

- **Blancos:** medio de cultivo sin parásitos.
- **Controles:** cultivo con parásitos en masa sin el producto.
- **Ensayo:** cultivo con parásitos en masa más el producto

Pasado el tiempo de incubación se observó en el microscopio invertido que no haya contaminación alguna y así controlar que el ensayo se está realizando de la manera correcta.

Completadas las 24 horas de incubación, se añadió 10µl/pocillo de MTT y se incubo a 35°C por 4 horas más para que haya la reacción; una vez transcurrido el tiempo de incubación se agregó 100µl/pocillo de SDS para disolver los cristales de formazán producidos por la reacción del MTT. Acabada nuevamente la incubación con el SDS se procedió a la lectura en el espectrofotómetro a 570nm. La anfotericina B que es el fármaco de referencia se ensayó a ocho concentraciones empezando de 2 µg/ml y realizando diluciones seriadas 1:2.

Fase post analítica

Cálculos de porcentaje de inhibición parasitaria

Se realizaron los cálculos de la inhibición parasitaria, en la cual se utilizó las absorbancias problema (Ap), blancos(Ab) y controles (Ac). La absorbancia del blanco se resta del control y de la prueba, se divide y luego se multiplica por 100 que nos dará como resultado su viabilidad, y al final se resta para 100 que es el porcentaje de inhibición del parásito; se utilizó una hoja de cálculo de Excel (Microsoft Excel ®). Ver anexo 8

$$\%\,Inhibición = 100 - \left[\frac{Ap - Ab}{Ac - Ab}\,100\right]$$

Cálculos del recuento de parásitos en Cámara de Neubauer

Los cálculos del recuento de la cámara de Neubauer son los siguientes:

1. Recuento del retículo superior (5 cuadrados) **+** Recuento del retículo inferior (5 cuadrados) **=** recuento total de parásitos por 10 cuadrados, que son los 4 cuadrados externos (L1, L2, L3, L4) y el cuadrado central (A, B, C, D, E) de cada retículo (2).
2. Recuento total de parásitos en los 10 cuadrados de los 2 retículos **/2 =** Recuento promedio de la cámara de Neubauer.
3. Recuento promedio de la cámara de Neubauer *10,000($4x10^4$) *____ factor de dilución = Numero de parásitos/ml.
4. El número total de parásitos en el medio original es: _____ parásitos/ml * _____ (ml volumen de cultivo) = _____ Total de parásitos en el medio de cultivo.

6. Resultados

Ensayo de la actividad antiparasitaria del aceite esencial de *Plumbago scandens* L

Tabla 1

Actividad leishmanicida del aceite esencial contra Leishmania major like expresada como porcentaje de inhibición.

	% inhibición del crecimiento de parásitos							
Diluciones seriadas	**1** (1:2)	**2** (1:4)	**3** (1:8)	**4** (1:16)	**5** (1:32)	**6** (1:64)	**7** (1:128)	**8** (1:256)
Concentraciones µg/ml	120	60	30	15	7,5	3,75	1,87	0,9
Porcentaje de inhibición (%)	19,4	58,5	80,7	85,1	72,1	72,9	73,1	75,1

Interpretación

Se prepararon diluciones seriadas con factor de dilución 1:2. En la tabla se presenta cada dilución con su concentración respectiva.

En la primera (120 µg/ml) y segunda (60 µg/ml) diluciones, si bien los porcentajes son de 19,4 y 58,5 % que indican una baja inhibición del crecimiento del parásito, la confirmación microscópica demostró lo contrario, al observar la eliminación total de los parásitos en estas dos diluciones, esto debido a que la oxidación que existe entre el aceite esencial y el medio de cultivo con parásitos dan una coloración intensa que interfiere al momento de la lectura dando un falso negativo en el ensayo con la concentración de las dos diluciones a probar. En la tercera (30 µg/ml) y cuarta (15 µg/ml) diluciones, el porcentaje de parásitos muertos es del 80,7 y 85,1% siendo las concentraciones más efectivas detectadas por la absorbancia contra el parásito, mientras tanto las diluciones siguientes desde la quinta (7,5 µg/ml) hasta la octava (0,9 µg/ml) guardan una correlación del 72,1–75,1% en cuanto a la inhibición del crecimiento del parásito.

Tabla 2

Actividad leishmanicida del aceite esencial contra Leishmania major like expresada como porcentaje de inhibición.

		Microscopía							
Diluciones seriadas		**1 (1:2)**	**2 (1:4)**	**3 (1:8)**	**4 (1:16)**	**5 (1:32)**	**6 (1:64)**	**7 (1:128)**	**8 (1:256)**
Concentraciones (µg/ml)		120	60	30	15	7,5	3,75	1,87	0,9
Microscopia	**PV**	**-**	**-**	**+**	**+**	**++**	**++**	**++**	**++**
	PM	**++++**	**++++**	**+++**	**+++**	**++**	**++**	**++**	**++**

Nota: PV, promastigotes vivos; PM, promastigotes muertos; -, Negativo; +, 10-20 p/c(parásitos por campo); ++, 20-40 p/c; +++, 40-60 p/c; ++++, >60 p/c.

Interpretación

Para corroborar las lecturas hechas por espectrofotómetro a una longitud de onda de 570nm, se realizó la microscopia de la placa con un microscopio invertido antes y después del ensayo, para verificar si hay contaminación y contrastar las absorbancias con la actividad de cada concentración.

Como se mencionó en la tabla anterior en la primera (120 µg/ml) y segunda (60 µg/ml) diluciones, si bien el porcentaje de inhibición es bajo (19,4 y 58,5 %), en la microscopia observamos la muerte total de parásitos es decir más de 60 parásitos/campo (++++); en la tercera (30 µg/ml) y cuarta (15 µg/ml) diluciones, la observación de parásitos muertos(PM) es de +++ (40-60 p/c) y parásitos vivos (PV) es de + (10-20 p/c); mientras que desde la

quinta (7,5 µg/ml) hasta la octava (0,9 µg/ml) diluciones, la observación de parásitos muertos (PM) es de ++ (20-40 p/c) y parásitos vivos (PV) es de ++ (20-40 p/c).

La técnica utilizada para evidenciar la actividad leishmanicida fue la del MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), la cual que por acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa metabolizan este compuesto dando como resultado un compuesto coloreado azul-violeta (formazán), para la lectura del ensayo de actividad leishmanicida se utilizó un espectrofotómetro con una longitud de onda de 570nm; los resultados obtenidos por medio de la técnica son satisfactorios en cuanto a la demostración de la actividad leishmanicida del aceite esencial sobre promastigotes de *Leishmania major like*; en tanto que el fármaco de referencia no tuvo una buena acción al inhibir o eliminar el parásito. Para el ensayo del MTT se usó un blanco de aceite esencial de *Plumbago scandens* L. más el medio de cultivo RPMI 1640 sin parásitos, esto por la oxidación que se da en las concentraciones utilizadas en el ensayo, este blanco se restará de la muestra problema al realizar los cálculos correspondientes. Ver anexo 9

La técnica que se utilizó para la extracción del aceite esencial de la planta *Plumbago scandens* L. fue por arrastre de vapor, la cual consiste en un equipo de destilación en donde el vapor de agua va a arrastrar a las partículas de aceite generadas por el calentamiento de tallos y hojas de la planta, de 8.7 Kg de la planta (tallos y hojas) se obtuvieron 830 mg de aceite esencial puro en forma de cristales, que contiene la plumbagina, principio activo usado para ensayo de actividad leishmanicida.

Los resultados obtenidos del proyecto de tesis fueron difundidos a docentes y estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico. Ver anexo 10 y 11

7. Discusión

En los últimos años se ha demostrado actividad de diversas plantas sobre parásitos del género *Leishmania*, entre los cuales se menciona *Kalanchoe pinnata*, *Plumbago scandens*, *Physalis angulata*, *Piper aduncum*, *Tabernaemontana australis* e *Phyllanthus amarus* (Silva & Oliveira, 2016).

Según Gutiérrez (2017), la plumbagina y 8,8´0- biplumbagina resultó activa contra promastigotes y amastigotes intracelulares de *Leishmania donovani*, mostrando una actividad leishmanicida eficaz con una Concentración Inhibitoria (IC 50) de 0,21µM y *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* con un IC90= 5µg/ml (Gutierrez, Drier, & M., 2017). Además, un segundo estudio señala que la plumbagina es conocida por interrumpir la actividad de la tripanotiona reductasa (tryr), enzima esencial para la supervivencia del parásito cuando este presenta un estrés oxidativo (Chouhan, Ozbak, Hemeg, & Afrin, 2015). En comparación con el primer y segundo estudio, los resultados obtenidos en el presente estudio, indica que la plumbagina presenta actividad leishmanicida en un 80,7% en la concentración de 30 µg/ml de aceite esencial de la planta *Plumbago scandens* L. y 85,1% con una concentración de 15 µg/ml de aceite esencial en promastigotes de *Leishmania major like*, siendo una especie diferente a las antes mencionadas; probando que actúa en la inhibición de la enzima tripanotioma reductasa.

Un tercer estudio realizado en la India (2017) en donde la plumbagina extraída de las raíces de *Plumbago auriculata Lam* se usó para determinar la actividad leishmanicida contra *Leishmania major*, la falta de citotoxicidad indicó resultados bajos (Saji, 2015). En mención al estudio anterior, investigadores Kenianos (2017) mezclan extractos acuosos y metanólicos de *Plumbago capensis y Aloe secundiflora*, para demostrar que la combinación acuosa tiene un efecto sinérgico/complementario mayor que inhibió el

crecimiento del parásito (IC 50 de 118.57µg/ml) de *L. major*. (Ndungu, Ingonga, Gicheru, & Anjili, 2017). La presente investigación guarda una correlación en referencia a los estudios mencionados, en el cual, el uso de la plumbagina extraída de la planta *Plumbago scandens* L. en forma de aceite esencial, actúa sobre promastigotes de *Leishmania major like*; cabe recalcar que hay diferencias entre el tercer y cuarto estudio, ya que se usó el aceite esencial de la planta *Plumbago scandens* L. extraído de hojas y tallos obteniendo un producto puro, y no por extractos acuosos o metanólicos que se extraen de raíces y hojas de otra especie, demostrándonos la actividad leishmanicida del aceite esencial.

Los resultados obtenidos en el presente proyecto de tesis son satisfactorios, ya que se podría incorporar a la planta *Plumbago scandens* L. dentro de las plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de *Leishmaniasis*, en este caso sobre la cepa de *Leishmania major like*. Esta planta podría servir para la síntesis de nuevos medicamentos como alternativa para el tratamiento de la *Leishmaniasis.*

En base a los resultados *in vitro* del proyecto de tesis realizado, este servirá como un inicio para la continua investigación del aceite esencial de la planta *Plumbago scandens* L. hasta la realización de pruebas in vivo, en donde se demostrará si hay o no toxicidad para su uso como fármaco en personas con *Leishmaniasis.*

8. Conclusiones

- Los resultados obtenidos nos sugieren que la presencia del principio activo de la plumbagina, compuesto extraído de la planta *Plumbago scandens* L en forma de aceite esencial, tiene un efecto leishmanicida sobre promastigotes de *Leishmania major like*, con más precisión siendo las concentraciones de 30 y 15 µg/ml que muestran acción leishmanicida sobre del 80% de los parásitos; en tanto que las concentraciones de 120 y 60 µg/ml aunque su porcentaje en los resultados es bajo, la confirmación por microscopia nos dio como resultado la muerte total de parásitos, esto a razón de la intensidad del aceite en las concentraciones mencionadas y a su vez por la oxidación del mismo por los parásitos.
- El ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) utilizado, es el adecuado para la medición de viabilidad celular, con ciertas modificaciones en si para la medición exacta del ensayo. Otro ensayo que puede ser utilizado es el de la resazurina que por medio de la fluorescencia se mide la viabilidad celular al igual que el MTT.
- El aceite extraído de hojas y tallo pertenecientes a la planta *Plumbago scandens* L demostró una importante actividad leishmanicida frente a promastigotes axénicos de *Leishmania major like* en las diferentes concentraciones preparadas, al inhibir su multiplicación y eliminar el parásito.
- Se realizó la difusión de los resultados obtenidos de la investigación a los estudiantes y docentes de la carrera de Laboratorio Clínico.

9. Recomendaciones

- En el caso del ensayo del MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) que generalmente se utiliza una concentración de 5mg/ml, se usó una concentración elevada que fue de 20mg/ml para que pueda demostrase colorimétricamente la reacción del desdoblamiento del bromuro por la enzima mitocondrial del parásito, ya que el desdoblamiento de este compuesto por parte de los parásitos es muy lento.
- Se cambiaron y validaron algunas variables en la técnica durante el desarrollo de las pruebas 20 placasx96, como es el caso de la incubación que se hace generalmente a 25°C en la mayoría de las cepas de *Leishmania*, la cepa utilizada se incubo a 28°C por su desarrollo y estabilidad desde el inicio de la prueba hasta la finalización de la misma, ya para la prueba con el MTT se incubó a 35°C por 4 horas y con el SDS 4 horas más. Cabe recalcar que se usó un kit de MTT (Vibrant MTT Cell Proliferation Assay Kit).
- Teniendo en cuenta la alta reactividad del MTT con microorganismos que puedan metabolizarlo, se sugiere tener el espacio y material adecuado para trabajar únicamente en el ensayo.

10.Bibliografía

Ahuga, A. (Enero de 2016). *Sintesis de derivados de Plumbagina y evaluacion de su actividad antiproliferativa.* Obtenido de https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/46863/AhujaCasarinAna.pdf;jsessionid=7F15181AEFDC6052FF8DE42240B55B43?sequence=2

Araujo, M. (2016). Investigacion Leishmanicida de prototipos de origen natural y sinteticos. *RENORBIO*, 48-49.

Araujo, M., Souza, P., Queiroz, A., Matta, C., Leite, A., Da Silva, A., . . . Moreira, M. (2014). Synthesis, Leishmanicidal Activity and Theoretical Evaluations of a Series of Substituided bis-2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinones. *Molecules*, 15183-15184.

ASOCAE. (2010). *Naturaeduca*. Obtenido de Plumbago- Belesade caribe: https://natureduca.com/botanica-flores-ornamentales-belesa-del-caribe.php

Becerril, M. (2014). Parásitología Médica. En *Leishmaniasis* (págs. 86-92). México D.F: Mc Graw Hill Education.

Bejarano., C. (2014). *Cuantificacion de la carga parasitaria en Leishmaniasis cutanea por PCR en tiempo real.* Obtenido de https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/15452/MendezBejaranoClaudiaPatricia2014.pdf?sequence=1

Botero, D., & Restrepo, M. (2012). Parásitosis Humana. En *Leishmaniasis* (págs. 315-335). Medellin-Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas.

Cantú, R., Palomo, L., Flores, S., López, L., & Barajas, L. (2012). Naftoquinonas: de simples pigmentos a moléculas terapéuticas. *Biológicas*, 1-3.

Chan, M., & Peña, L. (2001). Plant natural producta with leishmanicidal activity. *NPR*, 677-678.

Chouhan, G., Ozbak, H., Hemeg, H., & Afrin, F. (2015). Leishmanicidal compounds of natural origin: their prospective mantle in anti*Leishmania*l therapy. *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*, 175-176.

Croat, T., Carlsen, M., & Levin, D. (15 de Octubre de 2007). *INABIO*. Obtenido de Biodiversidad: http://biodiversidad.gob.ec:222/ufl/collections/list.php?db=9&type=1&reset=1&taxa=Plumbaginaceae

Elicriso. (Octubre de 2016). *Como cultivar Plumbago*. Obtenido de Plumbago: http://www.elicriso.it/es/como_cultivar/plumbago/

Encalada, M. (2018). *Evaluación morfológica de polen en especies vegetales de bosque seco al sur del Ecuador*. Obtenido de DSPACE: http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/20.500.11962/21558/3/Encalada%20Carrera%20Mayra%20Hernestina.pdf

Escobar, L., Rivera, A., & Aristizábalo, F. (2010). Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en lineas celulares tumorales . *Researchgate*, 69.

Escobar, L; Aristizabal, F. (2010). Aplicación de un método fluorométrico para evaluar la proliferacion celular en líneas celulares tumorales. *Vitae*, 174.

Fukusaki, A., Perez, J., Enciso, N., Marcelo, A., Altamirano, C., Amiel, R., . . . Enciso, J. (2015). Técnica XTT: Pigmentos Interferentes en fracciones de extracto metanólico de bidens pilosa. *Científica*, 182-184.

Granda, J. (2018). *Ministerio de Salud Publica del Ecuador*. Obtenido de Dirección de Vigilancia Epidemiológica MSP,1994-2017: https://public.tableau.com/profile/vvicentee80#!/vizhome/EnfermeddaesdelaPiel-2014/ANUARIO

Gutierrez, G., Drier, S., & M., J. (2017). Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. *ELSEVIER*, *10*(12), 1108.

Hernandez, J., Tenorio, J., Rojas, C., & Vallejo, G. (2005). Evaluación de la actividad leishmanicida de los extractos etanólicos de Rollinia rufinervis sobre *Leishmania* chagasi. *VITAE*, 38-40.

Jimenez, D. (2015). *Leishmania*sis. *Revista medica de Costa Rica y centroamerica*, *73*(129), 129-133.

Judd, W., Campbell, C., Kellogg, E., & Donoghue, M. (2007). *Sistematica de la planta : Un acercamiento filogénico.* Massachusetts, USA: Sinauer Associates.

Kato, H. G.-R. (2016). Geographic Distribution of *Leishmania* Species in Ecuador Based on the Cytochrome B Gene Sequence Analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4943627/#pntd.0004844.ref005.

Lasser, T. A. (1974). Catalogo de las plantas que crecen en el jardin botánico del ministerio de agriculturay cria, Caracas. *JSTOR*, 32. Obtenido de http://www.jstor.org/stable/41740621

Leyva, E., Carrillo, S., López, L., Avellaneda, E., & Navarro, G. (2016). Imnportancia química y biológica de naftoquinnonas. Revision bibliografica. *AFINIDAD LXXIV*, 37-38.

López, K., Tartaglino, C., Steinhorst, M., Salomón, & D. (2016). Factores de riesgo, representaciones y practicas asociadas con *Leishmania*sis viceral humana en un focoemergente en Posadas, Argentina. *Biomedica, 36*(1), 51-63.

Morelos, J. (2015). *Subsecretaria de prevención y promoción de la Salud.* Obtenido de Manual para el diagnóstico, tratamiento y control de *Leishmania*sis : http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/Manual*Leishmania*sis2015.pdf

Ndungu, P., Ingonga, M., Gicheru, M., & Anjili, C. (2017). Efficacy of a Combination of Plumbago Capensis and Aloe Secundiflora Aqueous and Methanolic Plant Extracts in the Treatment of *Leishmania* Major in Balb/C Mice. *Annals of Applied Microbiology & Biotechnology Journal, 1*(1), 1001.

Oliveira, L. (2015). Phytotherapy: an innovative perspectivein *Leishmania*sis treatment. *Herbals & Natural Remedies*, 10.

OMS. (2016). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de Efermedades Transmitidas por Vectores: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/es/

OMS. (2017). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de *Leishmania*sis: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/

OMS. (2017). *Organización Mundial de la Salud.* Obtenido de Medicamentos esenciales y productos de salud: http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2924s/2.4.1.html

Oryan, A. (2015). Plant-derived compounds in treatment of *Leishmania*sis. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 13.

Paiva, S. R. (2002). Perfil cromatográfico de duas espécies de Plumbaginaceae: Plumbago scandens L. E Plumbago auriculata. *Scielo*, 717-721.

Perez, F. (2007). Actividad antileishmaniásica in vitro del extracto metanólico de las flores de Tessaria integrifolia R. et P. (Asteraceae). *Research Gate*, 101-108.

Prats, G. (2007). Microbiología Clínica. En G. Prats, *Parásitología* (pág. 133). Buenos Aires: Panamericana.

Rajabi, O., & Sazgarnia, A. (2015). La actividad del aceite de oliva ozonizado contra los promastigotes principales de *Leishmania*. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* , 916-917.

Ríos, J., & Sousa, O. (2011). Inmunología en la infección por *Leishmania*: conceptos actuales. *Revista Médico Científica*, 2-3.

Ríos, Y., Otero, A., Muñoz, D., Echeverry, M., Robledo, S., & Yepes, M. (2008). Actividad citotóxica y leishmanicida in vitro. *Revista Colombiana de Ciencias Quimico-Farmaceuticas*.

Rosales, M. (2016). Estudio Químico-Biológico de Derivados de Naftoquinonas con Potencial Actividad Tripanocida. *Universidad de Chile-Facultad de Ciencias y Farmacéuticas*, 16-21.

Saji, A. (2015). Plumbago auriculata Lam. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, *33*(2), 281-284.

Salamanca, E., Ruiz, G., Ticona, J., & Gimenez, A. (2008). Método colorimétrico-XTT: como evaluacion de añto rendimiento de sustancias con actividad leishmanicida. *BIOFARBO*, 22-23.

Sánchez, E., Saens, E., Garces, N., & Reggis, R. (2004). *Leishmania*sis. *Dermatologia Peruana*, 88-97.

Silva, T., & Oliveira, A. (2016). Plantas leishmanicidas de la amazonia Brasileña. *FITOS, 10*(3), 345.

Subsecretaria de Vigilancia de la Salud Pública. (2015). *Ministerios de Salud Pública-Ecuador* . Obtenido de Gaceta Epidemiológica Ecuador SIVE-ALERTA: http://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2013/02/Gaceta-10-def.pdf

Torres-Santos, E. &. (1997). The leishmanicidal activity of ethanolic extracts from leaves and stalks of Plumbage scanden. *Research Gate*, 13-15. .

Ulloa, C. M. (2015). *eFLORAS.* Obtenido de Arboles y arbustos de los andes del Ecuador : http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=201&taxon_id=126108

UNAN. (2009). *Bilioteca digital de la medicina tradicional mexicana*. Obtenido de Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana: http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7932

Werner, L. (2013). Parásitología Humana. En L. Werner, *Leishmaniasis* (págs. 298-308). Mexico D.F: Mc Graw Hill Education.

Xenón, M., Gonzalez, D., Fuentes, J., Campos, J, Franco, M., . . . Mendoza, A. (2005). Evaluación de drogas en *Leishmania* sp.: Estudios geneticosy mooleculares de nuevos blancos. Estudios in vitro e in vivo de la resistensia a drogas. *Instituto de Biología Experimental*, 117.

11.Anexos

Anexo 1.- Protocolo para la preparación de medio de cultivo Novy, Nicolle y McNeal (NNN).

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Laboratorio de Análisis Químico	**Protocolo para la preparación de medios de NNN**	**Código: LFQ-P-001**	
		Revisión: 6 mayo 2018	**Edición: V.3**
		Fecha: 4 junio 2018	

Objetivo. Permitir el crecimiento adecuado del parásito.

Alcance:

Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes

Fundamento: Son una mezcla de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos.

Materiales y reactivos:

- **Material biológico:** 20ml sangre de conejo
- Agar base: BHI(Brain-Heart-Infution)
- Gentamicina
- Lámpara de alcohol
- Tubos plásticos cónicos con tapa rosca (estériles)
- Matraz de 100 mL
- Perlas de vidrio
- Agua destilada
- Pipeta serológica
- Pro-pipeta

Equipos:

- Autoclave
- Cámara de bioseguridad
- Estufa
- Balanza analítica

Procedimiento

- Realizar la asepsia de nuestras manos
- Colocarse el equipo de bioseguridad (guantes, mascarilla, traje protector, mandil)
- Preparar el material con el que se va a trabajar.
- Pesar la cantidad de 5,2g de agar base que se va a utilizar,
- Disolver el agar pesado en 84 ml de agua destilada y calentar hasta que hierva, se sella y se autoclava por 15 minutos a 121°C.
- Dejar enfriar hasta que se encuentre tibio, colocar 15 ml de sangre de conejo recién extraída, la cual se la desfibrina en un matraz con perlas de vidrio y se inactiva (56°C por 30 minutos).
- Agregamos 100ug/ml de Gentamicina o Estreptomicina, o los dos juntos.
- Mezclar y dispensar en los tubos a medida de 4cm.
- Dejar enfriar los medios para que se solidifiquen inclinados (pico de flauta).

Anexo 2.- Protocolo para la preparación de medio de cultivo Drosophila

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA **Laboratorio de Análisis Químico**	**Protocolo para la preparación de medio de cultivo Drosophila**	**Código: LFQ-P-003**	
		Revisión: 4 abril 2018	**Edición: V.2**
		Fecha: 4 mayo 2018	

Objetivo. Permitir el crecimiento adecuado del parásito.

Alcance:

Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes

Fundamento: Son una mezcla de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos.

Materiales y reactivos:

- Medio Schneider Drosophila
- SFBi
- Gentamicina
- Tubos plásticos cónicos con tapa rosca (estériles)
- Lámpara de alcohol
- Probetas 50 mL
- Vaso de precipitación 50 mL
- Filtros 0,22 µm

Equipos:

- Autoclave
- Cámara de bioseguridad
- Estufa

- Balanza analítica

Procedimiento

- Realizar la asepsia de nuestras manos
- Colocarse el equipo de bioseguridad (guantes, mascarilla, traje protector, mandil)
- Preparar el material con el que se va a trabajar.
- En una probeta colocamos 10 ml de suero fetal bovino inactivado (56°C por 1 hora).
- Colocamos 1ml de una solución de 200 ug/ml de gentamicina, 2 ml de orina estéril.
- Colocamos el medio Schneider Drosophila (GIBCO®) hasta llegar a la marca de 50ml de la probeta.
- Para esterilizar el medio de cultivo por filtración, lo colocamos en un vaso de precipitación, aspiramos con la jeringuilla todo el medio, colocamos el filtro y dispensamos en los tubos o frascos de cultivo.
- Una vez distribuido el medio se lo somete a un control de calidad dejándolo incubar a 37°C por 24 horas.
- Refrigerar hasta el momento de su uso.

Anexo 3.- Protocolo de extracción de aceite esencial

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Laboratorio de Análisis Químico	**Protocolo para la extracción de aceite esencial**	**Código: LFQ-AE**	
		Revisión: 12 sept/2017	**Edición: V.1**
		Fecha: 14 octubre 2017	

Objetivo: Obtener el aceite esencial de la planta por medio del arrastre de vapor.

Alcance:

Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes

Fundamento: Técnica mediante la cual se obtiene una sustancia que forma parte de la planta por medio de arrastre de vapor. El cual consistirá que por medio de vapor se extraiga el aceite en estado de vapor que una vez pase por el refrigerante se condensará de forma líquida.

Materiales

- **Material biológico:** Planta Plumbago Scandens: hojas y tallo.
- 2 estufas de calentamiento.
- 3 balones de boca esmerilada de diferente medida
- 1 balón de tres bocas
- 2 matraces
- 6 tapones esmerilados
- 4 soportes universales
- 6 pinzas noble nuez.
- 1 termómetro
- 1 refrigerante

Equipos:

- 1 equipo de refrigeración automático

Procedimiento:

- Separar las partes aéreas de la planta, lavar y deja secar.
- Introducir las hojas y tallos en el balón de tres bocas.
- Armar el equipo de destilación: colocar cada balón en un soporte universal y debajo de este, colocar una estufa calefactora, conectar entre sí con el refrigerante, por último, con el otro refrigerante conectar el matraz colector.
- Introducir en el primer balón de agua y encender la estufa calefactora.
- Encender la estufa que se encuentra debajo del balón de tres bocas.
- Encender el equipo de refrigeración que está conectado en el segundo refrigerante.
- Esperar hasta que empiece a salir el aceite.
- Una vez terminado se procede a concentrar el aceite en el rotavapor.

Anexo 4.- Protocolo para la preparación de medio de cultivo RPMI (sin rojo fenol, ni glutamina)

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA Laboratorio de Análisis Químico	**Protocolo para la preparación del medios de RPMI**	**Código: LFQ-P-005**	
		Revisión: 14 mayo/2018	**Edición: v.2**
		Fecha: 5 junio 2018	

Objetivo. Permitir el crecimiento adecuado del parásito.

Alcance:

Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes

Fundamento: Son una mezcla de nutrientes que, en concentraciones adecuadas y en condiciones físicas óptimas, permiten el crecimiento de los microorganismos.

Materiales y reactivos:

- Medio RPMI 1640(sin rojo fenol y glutamina
- Glutamina
- Orina estéril
- Suero fetal bovino inactivado
- Gentamicina
- Lámpara de alcohol
- Tubos plásticos cónicos con tapa rosca (estériles)
- Frascos de cultivo 50 mL
- Probetas 50 mL
- Vaso de precipitación 50 mL
- Filtros 0,22 µm
- Jeringuillas 60 ml

Equipos:

- Autoclave
- Cámara de bioseguridad
- Estufa
- Balanza analítica

Procedimiento

- Realizar la asepsia de nuestras manos
- Colocarse el equipo de bioseguridad (guantes, mascarilla, traje protector, mandil)
- Preparar el material con el que se va a trabajar.
- En una probeta colocamos 10 ml de suero fetal bovino inactivado (56°C por 1 hora).
- Colocamos 1ml de una solución de 100 ug/ml de gentamicina, 1ml de orina estéril, 1ml de una solución de 15mg/ml de glutamina.
- Colocamos el medio RPMI 1640 hasta llegar a la marca de 50ml de la probeta.
- Para esterilizar el medio de cultivo por filtración, lo colocamos en un vaso de precipitación, aspiramos con la jeringuilla todo el medio, colocamos el filtro y dispensamos en los tubos o frascos de cultivo.
- Una vez distribuido el medio se lo somete a un control de calidad dejándolo incubar a 37°C por 24 horas.
- Refrigerar hasta el momento de su uso.

Anexo 5.- Protocolo para el recuento de parásitos en cámara de Neubauer

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA **Laboratorio de Análisis Químico**	**Protocolo para el recuento de parásitos en cámara de Neubauer**	**Código: LFQ-O-001**	
		Revisión: 10 junio 2018	**Edición: V.1**
		Fecha: 10 junio 2018	

Objetivo. Realizar el recuento de parásitos y ver su viabilidad en el cultivo.

Alcance:

Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes

Fundamento: el recuento manual se lo efectúa para saber el número de parásitos que se encuentran aproximadamente en el medio de cultivo.

Materiales:

- **Material biológico:** Promastigotes de *Leishmania* cultivados en medio líquido (RPMI + SBF)
- Azul de toluidina
- Puntas 10-100 µl
- Pipetas de 10-100 µl
- Cámara de Neubauer
- Cubre objetos

Equipos

- Cámara de Bioseguridad
- Microscopio

Procedimiento:

- Coloque el objetivo 10 x en el trayecto óptico del microscopio en campo iluminado.

- Estime el volumen de la suspensión celular de la cual se toma la alícuota para evaluar.
- Se toma 10 µl del cultivo original, se realiza una dilución de 1:10 con agua ultra pura.
- De la dilución hecha tomamos 10 µl y 1 µl de azul de toluidina para evidenciar la viabilidad. Homogenizar bien.
- Mezclar la suspensión con azul de toluidina de 5 a 8 veces.
- Se coloca la dilución en cada retículo de la cámara para realizar el conteo en los 5 cuadrantes (4 externos y 1 central), dentro y sobre las líneas de la cámara.
- Coloque el hemocitómetro en el microscopio y enfoque con el objetivo de 40x
- Cuente por separado los parásitos vivos(refringentes) y los muertos(azules) que sean observadas en cada uno de los cuadros por considerar.
- Calcule sus resultados.

Los cálculos del recuento de la cámara de Neubauer son los siguientes:

1. Recuento del retículo superior (5 cuadrados) **+** Recuento del retículo inferior (5 cuadrados) **=** recuento total de parásitos por 10 cuadrados, que son los 4 cuadrados externos (L1, L2, L3, L4) y el cuadrado central (A, B, C, D, E) de cada retículo (2).

2. Recuento total de parásitos en los 10 cuadrados de los 2 retículos **/2 =** Recuento promedio de la cámara de Neubauer.

3. Recuento promedio de la cámara de Neubauer *10,000($4x10^4$) *____ factor de dilución = Numero de parásitos/ml.

4. El número total de parásitos en el medio original es: _____ parásitos/ml * _____ (ml volumen de cultivo) = _____ Total de parásitos en el medio de cultivo.

Anexo 6.- Medios de cultivo, soluciones, reactivos y fármaco de referencia.

- **Soluciones y reactivos.**

PBS (solución salina fosfatada)

ClNa……...8 g

PO_4HNa_2 ….....1,21g

PO_4H_2K…..... 0,34 g

Agua destilada …….1000 ml

Solución de MTT (Vybrant MTT Cell Proliferation Assay Kit)

MTT 20 mg + 1ml PBS

SDS 1g + 10 ml HCl 0,01 N

Azul de toluidina

Azul de toluidina……1mg

Agua destilada……10 ml

Fármaco de referencia

Para el ensayo de actividad leishmanicida se utilizó la Anfotericina B, es un antifúngico con actividad parasitaria, presenta variación en función de la especie. Se prepararon ocho diluciones seriadas comenzando con la dilución 1:2 (2µg/ml), 1:4 (1µg/ml), 1:8 (0,5µg/ml), 1:16 (0,25µg/ml), 1:32 (0,125µg/ml), 1:64 (0,06µg/ml), 1:128 (0,03µg/ml) y la dilución de 1:256 (0,01µg/ml), como solvente se usó Dimetil sulfóxido (DMSO)

Anexo 7.- Protocolo para el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA **Laboratorio de Análisis Químico**	**Protocolo para el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol)**	**Código: LQF-MTT**	
		Revisión: 24 Junio	**Edición: V-5**
		Fecha: 3 Julio	

Objetivo: El ensayo del MTT se lo utiliza para determinarla viabilidad o supervivencia de células ante el posible efecto citotóxico de un agente.

Alcance:

Personal encargado, técnico, estudiantes y docentes

Fundamento:

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

Materiales

Material vivo: promastigotes de *Leishmania*

Sustancia a probar: Aceite esencial de *Plumbago Scandens*

Soluciones y reactivos:

- **Kit de MTT** (Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5- difenil tetrazol)

  MTT (Sigma) 20 mg

  PBS 1ml (Tampón fosfato salino (phosphate buffer saline).)

- SDS (Dodecil sulfato sódico)

- HCl 0.01 M
- Pipetas automáticas 1-100µl
- Puntas
- Micropocillos

Equipos:

- Microscopio invertido
- Espectrofotómetro
- Incubadora
- Cabina de flujo laminar

Procedimiento

1) Los promastigotes a utilizar se encuentran en medio de RPMI suplementado con SFB, glutamina, orina estéril y gentamicina.

2) Realizar la preparación de soluciones:

- MTT 20mg/ml + 1ml de solución salina fosfatada (PBS)
- SDS 1g + 10ml de HCl 0.01 M

3) Se prepara un cultivo en masa con un inóculo de 4 x 10^6 promastigotes/ml a partir de un cultivo en fase de crecimiento exponencial (día cuatro de cultivo), en un volumen final de 15 ml.

4) Al tercer día el cultivo en masa está listo para el ensayo de actividad.

5) En condiciones estériles, se reparte en una placa de 96 pocillos, a razón de 80 µl/pocillo, teniendo en cuenta tres tipos de pocillo:

- **Blancos**, que contienen medio de cultivo sin parásitos
- **Controles**, que contienen el cultivo en masa sin producto
- **Problema**, que contienen cultivo en masa y producto a ensayar.

6) Terminada la distribución de pocillos se añade el aceite esencial de *Plumbago scandens* a razón de 10 µl/pocillo y se incuba durante 24 horas a 28 ºC.

7) Pasadas 24 horas de incubación, se observa al microscopio invertido, controlando que el ensayo se desarrolla adecuadamente y no existe contaminación.

8) Seguido al tiempo de incubación se añaden 10 µl de MTT a cada pocillo.

9) Se incuba 4 horas a 35°C, para que tenga lugar la reacción de reducción del MTT.

10) Transcurrido ese tiempo se añade 100 µl de SDS para disolver los cristales de formazán obtenidos como consecuencia de la reducción del MTT.

11) Se incuba nuevamente a 35°C por 4 horas.

12) Una vez que se han disuelto los cristales se procede a la lectura en espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm.

Anexo 8.- Cálculos de inhibición parasitaria

Tabla 3

Lecturas de absorbancia y cálculos de inhibición según la fórmula:

$$\%\ Inhibición = 100 - \left[\frac{Ap - Ab}{Ac - Ab}\ 100\right]$$

Concentraciones/Absorbancias	Repeticiones	Ap	Ab	Ac	% Inhibición
Concentración 1	R_1	0,657	0,222	0,935	38,9
	R_2	0,856	0,223	0,887	4,6
	R_3	0,771	0,225	0,873	15,7
	R_4	0,843	0,236	0,965	16,7
Concentración 2	R_1	0,524	0,222	0,935	57,6
	R_2	0,532	0,223	0,887	53,4
	R_3	0,476	0,225	0,873	61,2
	R_4	0,516	0,236	0,965	61,5
Concentración 3	R_1	0,323	0,222	0,935	85,8
	R_2	0,361	0,223	0,887	79,2
	R_3	0,39	0,225	0,873	74,5
	R_4	0,362	0,236	0,965	82,7
Concentración 4	R_1	0,298	0,222	0,935	89,3
	R_2	0,306	0,223	0,887	87,5
	R_3	0,325	0,225	0,873	84,5
	R_4	0,387	0,236	0,965	79,1
Concentración 5	R_1	0,367	0,222	0,935	79,6
	R_2	0,407	0,223	0,887	72,2
	R_3	0,444	0,225	0,873	66,2
	R_4	0,456	0,236	0,965	69,8
Concentración 6	R_1	0,309	0,222	0,935	87,7
	R_2	0,376	0,223	0,887	76,9
	R_3	0,509	0,225	0,873	56,1
	R_4	0,458	0,236	0,965	69,5
Concentración 7	R_1	0,354	0,222	0,935	81,4
	R_2	0,414	0,223	0,887	71,2
	R_3	0,45	0,225	0,873	65,2
	R_4	0,429	0,236	0,965	73,5
Concentración 8	R_1	0,386	0,222	0,935	76,9
	R_2	0,37	0,223	0,887	77,8
	R_3	0,432	0,225	0,873	68,05
	R_4	0,402	0,236	0,965	77,2

Nota. R_1-R_2, repeticiones; Ap, absorbancia problema; Ab, absorbancia blanco; Ac, Absorbancia control.

Tabla 4

Promedio de Absorbancias y porcentaje de inhibición

Concentraciones µg/ml	Ap	Ab	Ac	% Inhibición
120	0,7817	0,2265	0,9150	19,30
60	0,512	0,2265	0,9150	58,50
30	0,359	0,2265	0,9150	80,70
15	0,329	0,2265	0,9150	85,10
7,5	0,4185	0,2265	0,9150	72,10
3,75	0,413	0,2265	0,9150	72,90
1,87	0,4117	0,2265	0,9150	73,00
0,9	0,3975	0,2265	0,9150	75,10

Nota. Ap, absorbancia problema; Ab, absorbancia blanco; Ac, Absorbancia control.

Anexo 9.- Absorbancias del ensayo del MTT (bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) por el espectrofotómetro

Longitud de onda: 570nm.

Tabla 5

Absorbancias del ensayo de actividad leishmanicida realizadas en el espectrofotómetro EPOCH2 (Biotek).

Repetición	Blanco 1	Blanco 2	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	Control 1	Control 2	Muestra
R1	0,236	0,222	0,811	0,641	0,414	0,363	0,424	0,36	0,404	0,436	0,836	0,829	Aceite esencial *P. Scandens* L
R2	0,281	0,223	1,01	0,649	0,452	0,371	0,464	0,427	0,464	0,42	0,887	0,857	
R3	0,261	0,225	0,925	0,593	0,481	0,39	0,6	0,56	0,5	0,482	0,873	0,843	
R4	0,26	0,278	0,997	0,633	0,453	0,452	0,546	0,509	0,479	0,452	0,965	0,853	
R1	0,283	0,259	0,528	0,487	0,435	0,475	0,513	0,502	0,478	0,421	0,935	0,879	Anfotericina B
R2	0,247	0,307	0,52	0,464	0,474	0,454	0,508	0,421	0,507	0,44	0,729	0,773	
R3	0,265	0,375	0,473	0,447	0,467	0,426	0,531	0,491	0,49	0,419	0,839	0,75	
Blanco Aceite	0,23	0,254	0,154	0,117	0,091	0,065	0,057	0,051	0,05	0,05	0,735	0,701	

Nota.R1-R2, repeticiones; C1-C2, concentraciones µg/mL del aceite esencial + ensayo del MTT; Blanco 1-Blanco 2, medio de cultivo RPMI sin parásitos; Control 1-Control 2, medio de cultivo RPMI con parásitos; Blanco del aceite, AE + RPMI sin MTT.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

Anexo 10.- Difusión de resultados

Descripción: Socialización de resultados en el Aula Magna Dr. Edmundo Granda U. de la Facultad de la Salud Humana, el 24 de julio de 2018. Asisten estudiantes y Docentes de la Carrera de Laboratorio Clínico.

Anexo 11.- Registro de asistencia de la difusión de resultados

UNIVERSDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

TEMA: Difusión de resultados de Actividad leishmanicida del aceite esencial de *Plumbago scandens* L. sobre promastigotes de *Leishmania major like.*

FECHA:

REGISTRO DE ASISTENCIA: ESTUDIANTES

NOMBRES Y APELLIDOS	CICLO	CÉDULA	FIRMA
Camila Aguirre Medina	IV	1104461403	
Mishell Alejandra Silva	IV	1105583585	
Monserrath Zambrano Guakán	IV	1150311759	
Camila Stephanie Alvarado Arias	IV	1105371676	
Andrea Zulay Montaño Villavicencio	IV	1900636489	
Claudia Judith Malacatus Bravo	IV	1150173944	
Betsaida Corazón Vera Bermeo	III	1600475410	
María Gabriela Pérez Illescas	III	1150694204	
Evelyn Mendoza	III	1104110042	
Daniel Camacho	IV	1102779861	
Miriam Sánchez	IV	1106079903	
Leonela Melissa Sáez Maza	III	1105504854	
Cecibel Espinoza	III	1150007605	
Anahy Gaona G	III	1105609737	
Laura Gallegos S.	III	1105815268	

María Esther Arredondo C.	III	1105456543	
Anni Narváez	III	1150171682	
Gladys Germania Guamán	III	1105130551	
Lilibeth Macas Jaramillo	III	1900873520	
Patricio David Condoy Ramón	III	1150248888-6	
Yadira Lapo Paredes	Egresado	1150012332	
Janeth Ochoa Romero	Egresado	1900613397	
Andrea Argamarca	Egresado	1104133721	
Gina Jaramillo	Egresada	1105535668	
Armando Guaña	III	1150209248	
Lisu Towry	III	1150095063	

UNIVERSDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLINICO

TEMA: Difusión de resultados de Actividad leishmanicida del aceite esencial de *Plumbago scandens* L. sobre promastigotes de *Leishmania major like.*

FECHA:

REGISTRO DE ASISTENCIA: DOCENTES

NOMBRES Y APELLIDOS	CICLO	CÉDULA	FIRMA
Marlon Rolando Piraco Bonilla	Docente Laboratorio Clinico	1104806797	
Alicia Villavicencio Obando	Docente Laboratorio Clinico	1104723067	
Daniel Aguilar Reyes	Docente Laboratorio Clinico	1103670988	
Sandra Freire Costa	Docente. Lab. clinico	1103402549	

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

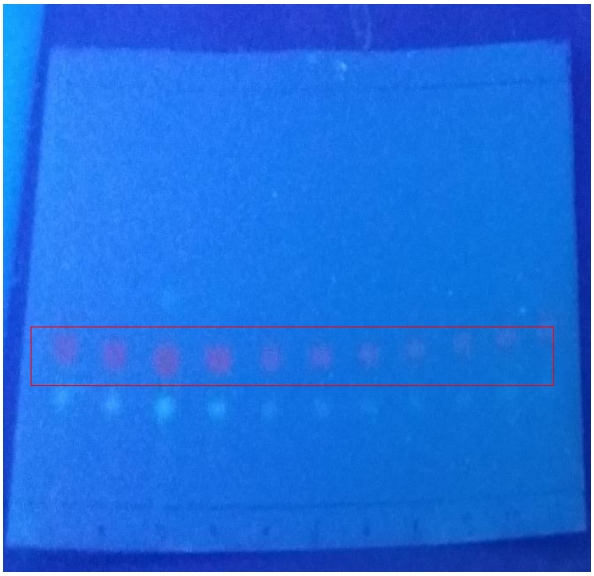
FACULTAD DE LA SALUD HUMANA

CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

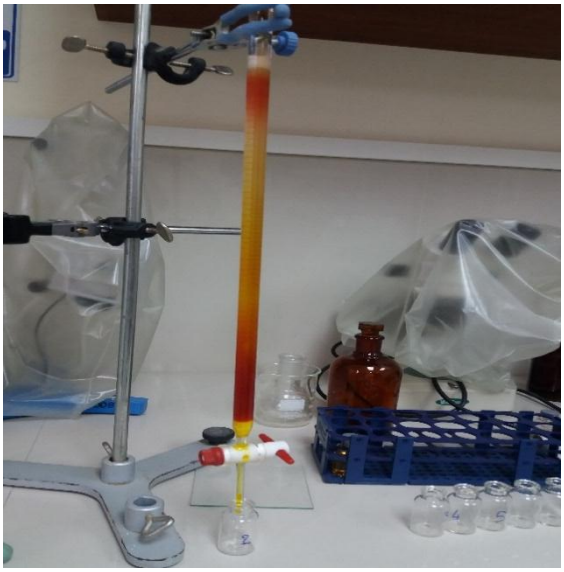
Anexo 12.- Evidencias fotográficas

Descripción: Planta *Plumbago scandens* L

Descripción: Planta *Plumbago scandens* L



Descripción: TLC, Plumbagina. En el recuadro el AE.



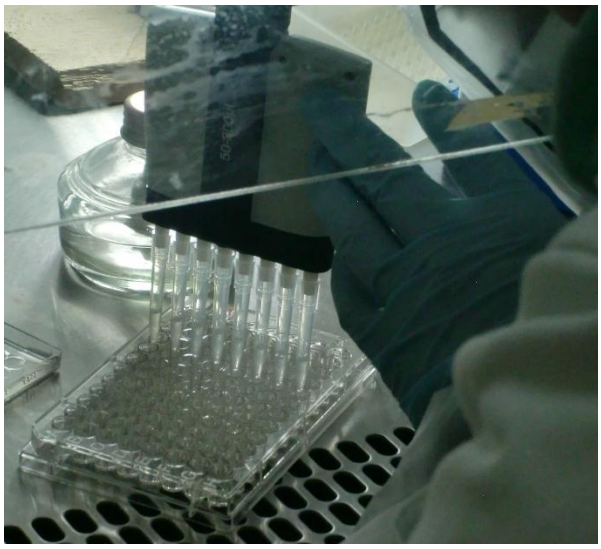
Descripción: Cromatografía de columna.

Preparación de medios de cultivos

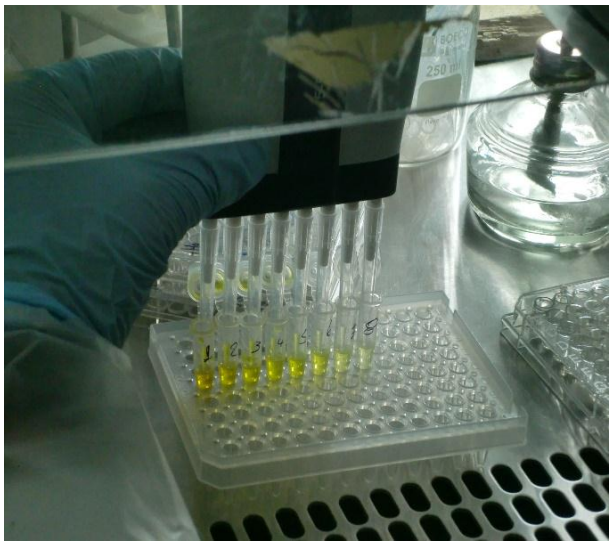
Descripción: Preparación del medio NNN

Descripción: Preparación del medio RPMI

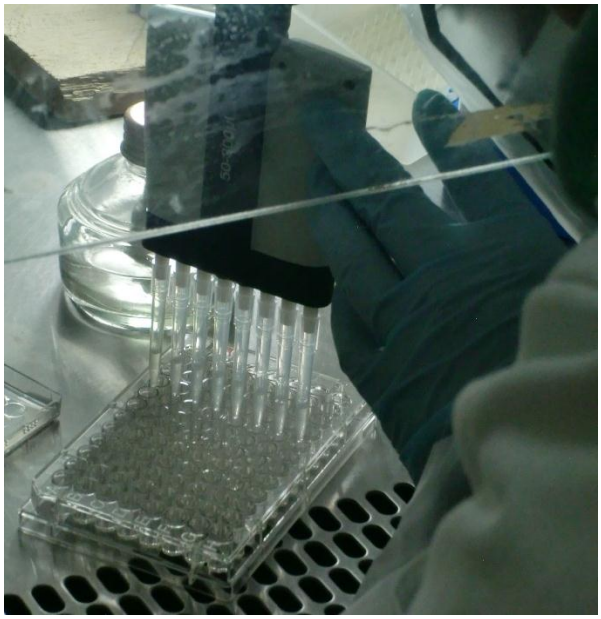
Ensayo de MTT



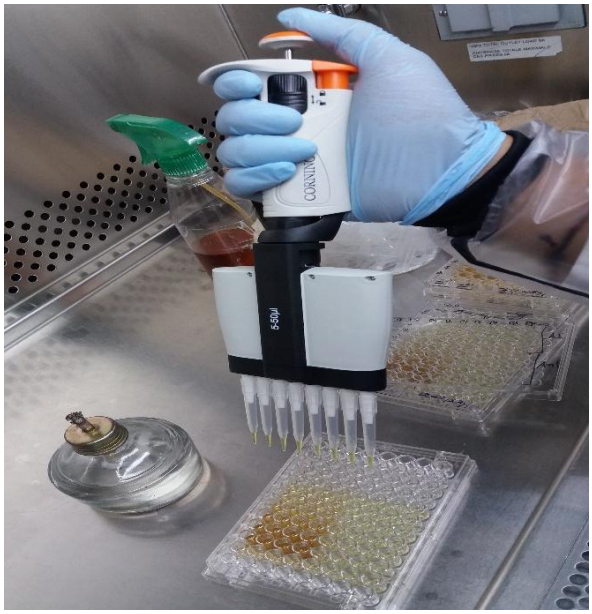
Descripción: Distribución de medios de cultivo, blancos y controles.



Descripción: Distribución de AE.

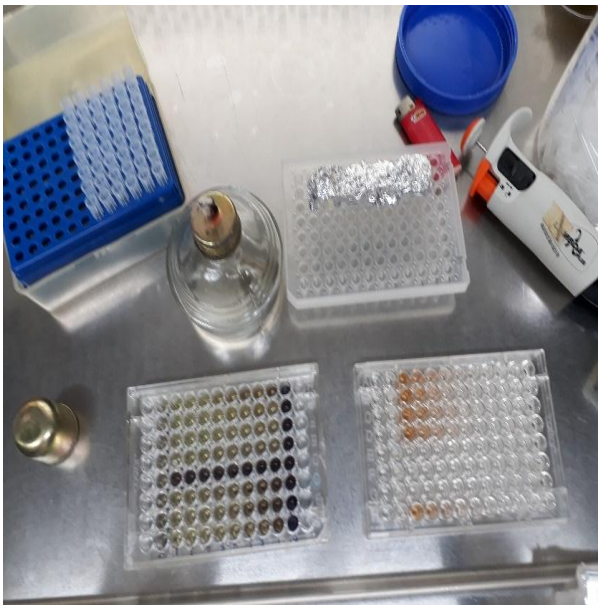


Descripción: Distribución de medios de cultivo, blancos y controles.

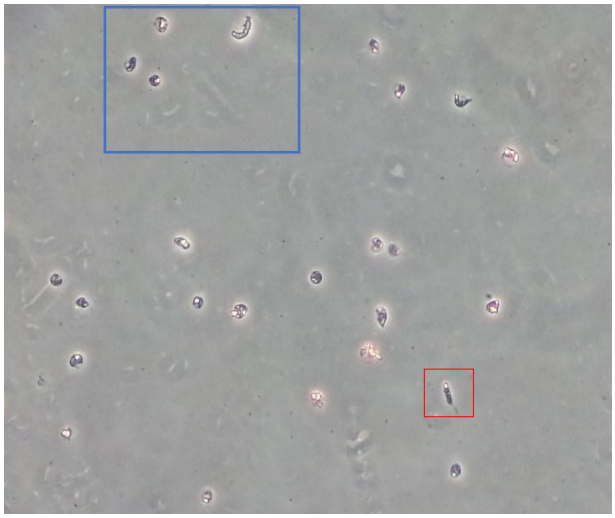


Descripción: Distribución del MTT.

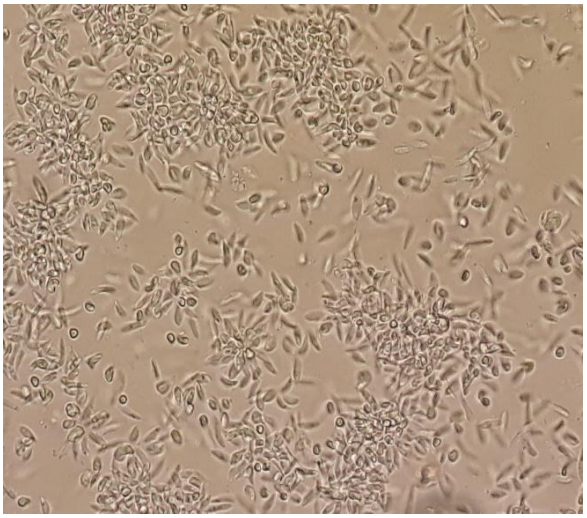
Descripción: Lectura del ensayo de MTT en espectrofotómetro Epoch2.



Descripción: Ensayo de MTT. Placas de ensayo después (izquierda) y antes (derecha) de la lectura en el espectrofotómetro.



Descripción: Promastigotes muertos (azul) por efecto del AE de *P. scandens* L. En el recuadro rojo, promastigote vivo.



Descripción: **Descripción:** Promastigotes de *L. major like* en medio NNN

Anexo 13: Certificación de traducción

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana

Docente de la Carrera de laboratorio Clínico de la Universidad Nacional de Loja,

CERTIFICA

Haber revisado la traducción al inglés del resumen de la Tesis, titulada **"Actividad leishmanicida del aceite esencial de *Plumbago scandens* L. en promastigotes de *Leishmania major like*"**, el cual es correcto y hace referencia al contenido del citado trabajo.

Loja, 24de agosto de 2018

Dr. Luis Alberto Morocho Yaguana, Mg.Cs.
Docente Carrera Laboratorio Clínico