

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS)  
CONTRA *Leishmania* spp.**



**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

Trabajo de Fin de Maestría Titulado:

**“ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -  
CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.”**

Realizado por:

**ORFA HIPATIA CRIOLLO FIGUEROA**

Tutores del proyecto:

**LINO ARISQUETA HERRANZ, PhD.**

**MARBEL TORRES ARIAS, PhD.**

Como requisito para la obtención del título de:

**MÁSTER EN BIOMEDICINA**

Quito, 26 de septiembre de 2021

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS)  
CONTRA *Leishmania* spp.**

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA IN VITRO DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS)  
CONTRA *Leishmania* spp.**

**DECLARACION JURAMENTADA**

Yo, ORFA HIPATIA CRIOLLO FIGUEROA, con cédula de identidad Nro. 110449486-7, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



---

**Orfa Hipatia Criollo Figueroa**

110449486-7

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS)  
CONTRA *Leishmania* spp.**

**DECLARATORIA**

El presente trabajo de investigación titulado:

**“ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -  
CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.”**

Realizado por:

**ORFA HIPATIA CRIOLLO FIGUEROA**

como Requisito para la Obtención del Título de:

**MÁSTER EN BIOMEDICINA**

ha sido dirigido por los profesores:

**LINO ARISQUETA HERRANZ, PhD.**

**MARBEL TORRES ARIAS, PhD**

Quiénes consideran que constituye un trabajo original de su autor



**Lino Arisqueta, PhD.**

**Marbel Torres, PhD.**

1802949154

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS)  
CONTRA *Leishmania* spp.**

**LOS PROFESORES INFORMANTES**

Los Profesores Informantes:

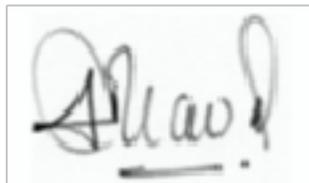
**JUAN CARLOS NAVARRO, PhD.**

**JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ, PhD.**

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral ante el

tribunal examinador



**JUAN CARLOS NAVARRO, PhD.**

**REVISOR**



**JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ, PhD**

**REVISOR**

Quito, 26 de septiembre 2021

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS)  
CONTRA *Leishmania* spp.**

**DEDICATORIA**

El presente trabajo lo dedico:

A mis hijos y a mi esposo, por todo su amor, comprensión y apoyo en esta linda etapa  
universitaria.

A mis padres y hermanos, por acompañarme y apoyarme a cumplir esta y otras metas tan  
anheladas.

A mis amigos y profesores de la maestría en Biomedicina, en especial al Dr. Lino y la  
Dra. Marbel y sus equipos de trabajo, por toda la paciencia, respaldo, apoyo y tutoría para el  
desarrollo de la presente investigación.

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS)  
CONTRA *Leishmania* spp.**

**AGRADECIMIENTO**

Quiero agradecer infinitamente a mi familia, a mis amigos, a mis compañeros, tutores y profesores de la maestría en Biomedicina de la UISEK, por recibir toda su ayuda, apoyo, orientación y paciencia para el desarrollo del presente trabajo de investigación y permitirme culminar esta meta académica.

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS)  
CONTRA *Leishmania* spp.**

To be submitted:

Para ser enviado:

**Actividad Antiparasitaria *in vitro* de *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ - carbolinas) contra *Leishmania*  
*spp.*”**

Hipatia Criollo<sup>1\*</sup>, Marbel Torres<sup>1,2</sup>, Lino Arisqueta<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidad Internacional SEK, Maestría en Biomedicina, Facultad de Ciencias de la Salud,  
Quito, Ecuador

<sup>2</sup>Universidad de las Fuerzas Armadas “ESPE”, Departamento de Ciencias de la Vida y  
Agricultura, Laboratorio de Inmunología y Virología, Sangolquí, Ecuador

Ecuador. 24//09/2021

**\*AUTOR DE CORRESPONDENCIA:** Lino Arisqueta, PhD.

Universidad Internacional SEK, Facultad de Ciencias de la Salud, Quito, Ecuador.

Teléfono: 0983104230; email: [lino.arisqueta@uisek.edu.ec](mailto:lino.arisqueta@uisek.edu.ec)

Titulo corto ó Running title: Actividad leishmanicida de *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ - carbolinas)

## ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.

### **Resumen:**

La Leishmaniasis es una enfermedad endémica en más de 98 países en el mundo, incluido el Ecuador. Esta enfermedad es causada por protozoarios del género *Leishmania* y transmitidos por insectos flebótomos. Se puede tratar con medicamentos que incluyen principalmente los antimoniales, aunque estas drogas causan muchos efectos adversos y resistencia. *Banisteriopsis caapi* es una planta tradicional de la Amazonia que contiene  $\beta$ -carbolinas. Esta planta es conocida por sus propiedades psicoactivas y su uso en rituales religiosos por comunidades indígenas. Estudios previos han demostrado que las  $\beta$ -carbolinas presentan actividad anti-trypanosomal, sin embargo existe limitada información de la actividad antiparasitaria de las  $\beta$ -carbolinas de *B. caapi*. En ese contexto, el objetivo de este trabajo fue determinar la actividad leishmanicida de las  $\beta$ -carbolinas de *B. caapi in vitro* contra dos especies de *Leishmania*, *L. mexicana* y *L. infantum*.

Para ello, se determinó la concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) del extracto de *B. caapi* en promastigotes de *Leishmania* spp. usando el método colorimétrico MTT. La concentración citotóxica media ( $CC_{50}$ ) se analizó en macrófagos J774.A1 utilizando la misma metodología y a partir de esos datos se obtuvo el índice de selectividad (IS). Además, se evaluó la fragmentación del ADN, mecanismo propuesto para las  $\beta$  – carbolinas, mediante ensayo cometa y la inducción de apoptosis mediante tinción diferencial naranja de acridina / bromuro de etidio.

Los resultados mostraron que el extracto tiene un efecto inhibitorio *in vitro* sobre el crecimiento de promastigotes de *L. mexicana* ( $IC_{50} = 39.7 \mu M$ ) y *L. infantum* ( $IC_{50} = 155.5 \mu M$ ), pero también afecta el crecimiento de los macrófagos murinos J774.A1 ( $CC_{50} = 14.75 \mu M$ ), mostrando un bajo IS. Asimismo, se determinó que el extracto de *B. caapi*, ocasiona daño en el

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS)  
CONTRA *Leishmania* spp.**

ADN e induce la vía de apoptosis. En conclusión, el extracto de *B. caapi* inhibe el crecimiento de promastigotes de *Leishmania* spp. *in vitro*.

**Palabras clave:** leishmaniasis, *Banisteriopsis caapi*, IC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub>, apoptosis.

## ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.

### *Abstract*

Leishmaniasis is an endemic disease in more than 98 countries in the world, including Ecuador. This disease is caused by protozoa of the genus *Leishmania* and transmitted by sandfly. It can be treated with drugs like antimonials, but these cause adverse effects and resistance. *Banisteriopsis caapi* is an Amazonian plant that contains  $\beta$ -carbolines. This plant is known for its psychoactive properties and used by indigenous communities in ritual ceremonies. Studies have shown that  $\beta$ -carbolines have anti-trypanosomal activity; however there is limited information about the antiparasitic activity of  $\beta$ -carbolines from *B. caapi*. In this context, the goal of this work was to determine the *in vitro* leishmanicidal activity of *B. caapi* against two *Leishmania* species, *L. mexicana* and *L. Infantum*.

In this study, the 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of *B. caapi* extract in promastigotes of *Leishmania* spp. was obtained by the colorimetric MTT assay. The 50% cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) was analyzed in *macrophage* cell Line J774.A1 using the same assay. The selectivity index (SI) was obtained from these data. Furthermore, the DNA fragmentation, a mechanism of  $\beta$ -carbolines, was evaluated by comet assay and the apoptosis induction by acridine orange / ethidium bromide differential staining.

These results indicated that *B. caapi* extract has an inhibitory *in vitro* effect on the growth of promastigotes of *L. mexicana* (IC<sub>50</sub> = 39.7  $\mu$ M) and *L. infantum* (IC<sub>50</sub> = 155.5  $\mu$ M), but also it affects the growth of J774.A1 (CC<sub>50</sub> = 14.75  $\mu$ M), getting a low SI. In addition, we found that *B. caapi* extract causes DNA damage and induces the apoptosis pathway. In conclusion, *B. caapi* extract inhibits the *in vitro* growth of promastigotes of *Leishmania* spp.

**Keywords:** leishmaniasis, *Banisteriopsis caapi*, IC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub>, apoptosis.

# ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.

## 1. INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis, comúnmente conocida como sarna brava, es una enfermedad endémica en más de 98 países en el mundo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha incluido a la leishmaniasis dentro del grupo de enfermedades tropicales desatendidas (OPS/OMS, 2019). Según el informe epidemiológico de las Américas del 2019, la leishmaniasis cutánea (LC) y mucosa (LM) se reportó en 17 países endémicos del continente americano. En Ecuador, en el año 2018, se reportaron 1232 casos de leishmaniasis cutánea (OPS/OMS, 2019) a nivel nacional.

Los protozoarios intracelulares del género *Leishmania*, causantes de la leishmaniasis, son transmitidos por moscas del género *Lutzomyia* en América (Arrivillaga-Henríquez et al., 2017). En el Ecuador, las especies identificadas como agentes causales de leishmaniasis cutánea y mucocutánea humana, incluyen: *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* (Kato et al., 2016). *L. infantum*, está asociada a leishmaniasis visceral y es muy prevalente en perros, por lo que supone un riesgo para los humanos en contacto con los mismos, aunque no ha sido reportada en Ecuador.

Este parásito se clasifica dentro de la familia Trypanosomatidae, clase Kinetoplastea, reino Protista. Su ciclo de vida involucra a un insecto vector, y a un huésped mamífero; y presenta dos morfologías celulares principales, promastigote y la amastigote. La forma extracelular presente en el vector corresponde a la morfología promastigote, que se caracteriza por la forma alargada y un flagelo móvil largo. Mientras que la forma amastigote se diferencia por poseer un cuerpo celular más pequeño y esférico con un flagelo corto e inmóvil, y se multiplica dentro de macrófagos y células del sistema retículo endotelial en el huésped (Sunter & Gull, 2017).

## **ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

En Ecuador se han identificado 13 especies como vectores o vectores potenciales de leishmaniasis. La transmisión es zoonótica conociéndose alrededor de 70 especies animales como reservorios parasitarios, con preferencia alimentaria por la sangre derivada de aves y de mamíferos (Arrivillaga-Henríquez et al., 2017). Los flebótomos se infectan al ingerir sangre que contiene macrófagos infectados con amastigotes de *Leishmania* de un huésped mamífero infectado. Factores como la especie de *Leishmania*, el huésped, entre otros, afectan al tipo de leishmaniasis (CDC, 2020; Sunter & Gull, 2017).

Esta enfermedad se clasifica clínicamente en tres formas significativas que incluyen: leishmaniasis visceral (LV), leishmaniasis mucocutánea (LM) y leishmaniasis cutánea (LC). La LC se desarrolla lentamente a las pocas semanas de la inoculación del parásito como lesiones cutáneas singulares que pueden curarse espontáneamente, así como lesiones múltiples dispersas por el cuerpo (Elmahallawy et al., 2014). La LV constituye la forma más grave de la enfermedad, pudiendo ser mortal si no se trata y está asociada a la especie *L. donovani*. Además, la leishmaniasis dérmica postkala-azar (PKDL) es una complicación del LV. La forma mucocutánea se da cuando el protozooario se extiende a las membranas mucosas nasales, desencadenando una reacción inflamatoria excesiva que destruye los tejidos, lo que provoca una mutilación parcial o total de las membranas mucosas de la nariz, la boca y la garganta (Elmahallawy et al., 2014; von Stebut, 2017).

El diagnóstico de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea se realiza microscópicamente mediante la identificación directa de amastigotes de *Leishmania* spp. de frotis de lesiones teñidos con Giemsa. La sensibilidad de ésta puede incrementarse a 85% con la combinación del cultivo de las muestras (Elmahallawy et al., 2014). La detección de anticuerpos antileishmania es un método poco usual en el diagnóstico debido a que los anticuerpos presentan bajos títulos dado la

## **ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

pobre respuesta humoral (Elmahallawy et al., 2014). En el caso del diagnóstico de leishmaniasis visceral, las pruebas de laboratorio incluyen las mencionadas anteriormente pero la obtención de la muestra es diferente. Para microscopía y cultivo, las muestras utilizadas son aspirados esplénicos o de médula ósea, además de biopsias de hígado y ganglios linfáticos, y capas leucocíticas de sangre periférica. En este tipo de leishmaniasis existe respuesta humoral, por lo que las pruebas serológicas pueden emplearse en el diagnóstico. Para los tres tipos de leishmaniasis los métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son las principales técnicas de diagnóstico debido a su alta sensibilidad y especificidad, sin embargo debido a su costo no son utilizadas en el diagnóstico de rutina en países en desarrollo (Galluzzi, Ceccarelli, Diotallevi, Menotta, & Magnani, 2018)

El tratamiento de la leishmaniasis se puede realizar tanto a nivel local como sistémico, dependiendo del estado inmunológico del paciente, de los hallazgos locales, y de la especie de *Leishmania* causante. Los estudios indican que existe poca evidencia confiable para la mayoría de los procedimientos locales (terapia de calor o terapia fotodinámica) (von Stebut, 2017). Los antimoniales pentavalentes son las drogas de elección para el tratamiento sistémico de las leishmaniasis cutánea y mucosa (OPS, n.d.). Otras opciones para la terapia de esta enfermedad incluyen isotionato de pentamidina, la miltefosina, la anfotericina B y la anfotericina B liposomal (OPS, n.d.). A pesar que se han diseñado varias vacunas para la leishmaniasis, éstas no han tenido eficacia notable (Ghorbani & Farhoudi, 2018), por lo que actualmente no existen vacunas disponibles para el control y prevención de esta enfermedad (OPS, n.d.).

Sin embargo, los medicamentos sistémicos presentan graves efectos adversos como pérdida de apetito, dolor abdominal, fatiga, náuseas, entre otros y no son recomendados en personas con problemas hepáticos, cardíacos o insuficiencia renal (Rottini et al., 2019). Por otro

## **ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

lado, hay investigaciones que demuestran que actualmente en poblaciones de la India existe resistencia a los medicamentos antimoniales (Ponte-Sucre et al., 2017).

Los productos naturales de plantas han sido tradicionalmente utilizados como drogas o en el desarrollo de medicamentos (Kimani, Matasyoh, Kaiser, Brun, & Schmidt, 2017). La planta *Banisteriopsis caapi*, conocida comúnmente como yajé, es una planta tradicional de la Amazonia conocida por sus propiedades psicoactivas siendo utilizada por los chamanes indígenas, en las ceremonias de ayahuasca, con fines de comunicación espiritual, experiencias mágicas, sanación y rituales religiosos en países de América del Sur. La corteza de esta planta contiene betacarbolinas que son alcaloides indólicos tricíclicos. Estos compuestos representan del 0.05% al 1.95% del peso seco de la planta de *B. caapi* y se encuentra en mayor concentración en semillas y raíces que en tallos y hojas (Hamill, Hallak, Dursun, & Baker, 2019).

Los estudios de la planta *B. caapi* se han centrado principalmente en su potencial uso terapéutico. Las  $\beta$ -carbolicinas presentes en esta planta han mostrado estimular la neurogénesis *in vitro* y la modulación de la plasticidad del cerebro (Santos et al., 2020). No se han encontrado investigaciones que estudien la actividad anti-*Leishmania* de las  $\beta$ -carbolicinas presentes en la planta *B. caapi*. Sin embargo, existen varios estudios sobre estos compuestos, obtenidos mediante síntesis química, donde se demuestra su actividad leishmanicida contra promastigotes y amastigotes de *L. infantum* en ensayos *in vitro* (Ashok, Chander, Smith, & Sankaranarayanan, 2018) (Ashok, Chander, Tejería, García-calvo, & Bala, 2016). Por otro lado, un estudio de las  $\beta$ -carbolicinas obtenidas de otra especie de planta, *Geissospermum vellosii*, mostró que el alcaloide es más selectivo que la anfotericina B y que presenta mayor actividad anti-*Leishmania* (Patrick et al., 2019).

## **ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

Por todo lo anteriormente expuesto, el presente trabajo se planteó evaluar la actividad antiparasitaria del extracto de *B. caapi* sobre dos cepas de *Leishmania*, *L. mexicana* y *L. infantum*. Se analizó el efecto del extracto sobre la viabilidad de promastigotes de ambas especies, mediante el método de MTT. También se evaluó el efecto del extracto sobre las células diana de los parásitos empleando la línea murina de macrófagos J774.1 sin infectar e infectados por amastigotes de *Leishmania*. A partir de estos análisis se calculó la IC<sub>50</sub> para promastigotes y la CC<sub>50</sub> para macrófagos, pudiendo estimar el índice de selectividad (IS) de nuestro extracto. Además, se evaluó el daño al ADN provocado por el extracto mediante ensayo cometa así como la apoptosis inducida por el extracto rico en  $\beta$  – carbolinas.

### **HIPÓTESIS**

El extracto de *B. caapi* rico en  $\beta$  – carbolinas posee efectos leishmanicidas e induce daño al ADN provocando apoptosis.

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la actividad antiparasitaria de las  $\beta$ -carbolinas de *Banisteriopsis caapi* contra *Leishmania* spp. a nivel *in vitro*.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Calcular el índice de selectividad (IS) de las  $\beta$ -carbolinas obtenidas de la planta *B. caapi*, mediante la relación de la concentración citotóxica y la inhibitoria media (CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>).
2. Evaluar el daño de ADN en células expuestas al compuesto  $\beta$ -carbolinas a nivel *in vitro* mediante el ensayo cometa.

## ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.

- Determinar apoptosis por microscopía de fluorescencia de células expuestas a las  $\beta$ -carbolicas.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

Todos los equipos, los materiales fungibles y no fungibles, así como los reactivos y medios de cultivo fueron suministrados por la Universidad Internacional SEK (UISEK) y el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE:

**Tablas 1, 2, 3 y 4.**

**Tabla 1.** Equipos

<b>Equipo</b>	<b>Modelo</b>	<b>Marca</b>
Cabina de flujo laminar	Miniflow 120	Instrulab Q
Cabina de Bioseguridad II	AC2 - 452	ESCO
Microscopio binocular	CX-21	Olympus
Microscopio Invertido	MCX51	Micros Austria
Microscopio de fluorescencia	IX53	Olympus
Centrífuga	XC-2450	Premiere
PHmetro	ORION STAR A111	ThermoScientific
Balanza analítica	BAS31PLUS	Boeco
Bomba al vacío	R-300	BOECO
Lector de microplacas	Multiskan Sky / Go	ThermoScientific
Cámara de electroforesis horizontal		Bio-Rad
Refrigeradora	2015KLXB	Durex
Ultracongelador vertical -80 °C	MDF	Panasonic

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA IN VITRO DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS)  
CONTRA *Leishmania* spp.**

Ultracongelador vertical -20 °C	WUF-80	WISD
Autoclave	25X-1	All American
Incubadora		Memmert
Incubadora CO2	MCO-18AC	Panasonic

**Tabla 2.** Reactivos

Nombre	Fórmula	Casa Comercial
Metanol	CH <sub>4</sub> O	Fermont
Hidróxido de sodio 100%	NaOH	Merck
Ácido clorhídrico 2%	HCl	Merck
Cloruro de sodio 10%	NaCl	J. T. Baker
Bicarbonato de sodio 99.7%	NaHCO <sub>3</sub>	
Cloruro de calcio dihidratado 99.0%	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	
Ampicilina 100 mg/ml	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S	
Dimetilsulfóxido (DMSO) 99.9%	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> SO	
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) sal disódica dihidrato $\geq 99.5$	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ·2H <sub>2</sub> O	
Tris base $\geq 99.9\%$	NH <sub>2</sub> C(CH <sub>2</sub> OH) <sub>3</sub>	
Triton X-100	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>n</sub> (n=9-10)	
Bromuro de Etidio	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> BrN <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich
Naranja de Acridina	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> ·HCl	
Suero fetal bobino inactivado	--	Eurobio scientific (CVFSVF06-01)
Agarosa LE grado analítico	--	Promega (V3121)
Agarosa de punto bajo de fusión (LMP)	--	Promega (V283A)
SYBER Green 10.000 X	--	Invitrogen (S7563)
Anfotericina B	--	Sigma-Aldrich (A2942)

## ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.

**Tabla 3.** Medios de cultivo.

Medio de Cultivo	Casa comercial
Medio de cultivo de insectos Schneider's <i>Drosophila</i>	Sigma Aldrich, S9895
Medio Dulbecco's Modified Eagle – DMEM	Gibco, 12100046

**Tabla 4.** Soluciones

Soluciones	Composición
Solución de lisis	2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10mM Tris, 0.6% DMSO, 0.5% Tritón X-100, NaOH, pH 10
Solución de Electroforesis	1 mM EDTA, 0,3 M NaOH, pH>13
Solución de neutralización	0,4 M Tris, pH 7.5
Tampón fosfato salino (PBS)	0.138 M NaCl, 3 mM KCl, 8.1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH = 7.4
Tampón TBE (Tris – borato – EDTA) 10X	108 g de Tris, 55 g de ácido bórico, 9.3 g de Na <sub>2</sub> EDTA, 1 litro de agua destilada

## 2.2. MÉTODOS

### 2.2.1. El extracto y la planta

El material vegetal fue proporcionado por la empresa BIOX colaboradora de este trabajo. El extracto objeto de estudio fue obtenido y caracterizado por estudiantes de la Universidad Internacional SEK según lo descrito por Perez-Marvit & Arisqueta (2020). Brevemente, los tallos previamente secos y molidos de *B. caapi* se maceraron en metanol seguido de una acidificación y basificación con sus respectivos filtrados, extracción líquido – líquido con cloroformo y concentración mediante rotavapor. El extracto, en un volumen final de metanol

## **ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

apropiado, se almacenó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis y evaluación biológica. La presencia / ausencia de harmina, así como su cuantificación se realizó mediante HPLC de fase reversa tal y como describen Wang et al. (2010) empleando una recta patrón de harmina comercial. Este alcaloide presentó una concentración de 47.5 mM.

### **2.2.2. Cultivo de *Leishmania* spp.**

#### **2.2.2.1. Multiplicación y mantenimiento de las células**

Las especies de *Leishmania*, *L. mexicana* y *L. infantum*, fueron donadas por el Centro Internacional de Zoonosis (CIZ) de la Universidad Central del Ecuador. Los promastigotes fueron mantenidos en frascos de cultivo celular de  $25\text{ cm}^2$  conteniendo 10 mL de medio *Schneider's Drosophila*, suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (FBS) más 100 ug/mL de ampicilina (Duque, Corredor, Montilla, & Peláez, 1992; Koutsoni, Karampetsou, & Dotsika, 2019). La temperatura de cultivo fue de  $26\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Andrade et al., 2016; Nacional et al., 2017; Nasr, 2020). Los parásitos se subcultivaron en medio fresco al tercer ó cuarto día de cultivo. La dosis de inóculo para los subcultivos de promastigotes de *Leishmania* spp. fue de aproximadamente  $2.0 \times 10^6$  parásitos/mL.

#### **2.2.2.2. Curva de crecimiento de *Leishmania* spp.**

*L. mexicana* y *L. infantum* se cultivaron en tubos cónicos estériles de 50 mL conteniendo 10 mL de medio *Schneider's Drosophila* suplementado con 15% de FBS inactivado más 100 ug/mL de ampicilina. El número de promastigotes de *Leishmania* spp. por mililitro (mL) se determinó utilizando una cámara Neubauer en un microscopio óptico. En ambas especies se realizaron diluciones apropiadas de los cultivos y se fijaron con formalina al 2% (v/v) antes del conteo. Este procedimiento se realizó por 5 días cada 24 horas. El cálculo del número de

## ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.

promastigotes se realizó empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración (Parásitos/ml)} = \frac{\# \text{ parásitos} \times 10.000 \times \text{factor dilución}}{4}$$

### 2.2.3. Evaluación *in vitro* del efecto del extracto de *B. caapi* sobre la viabilidad de *Leishmania* spp. mediante MTT

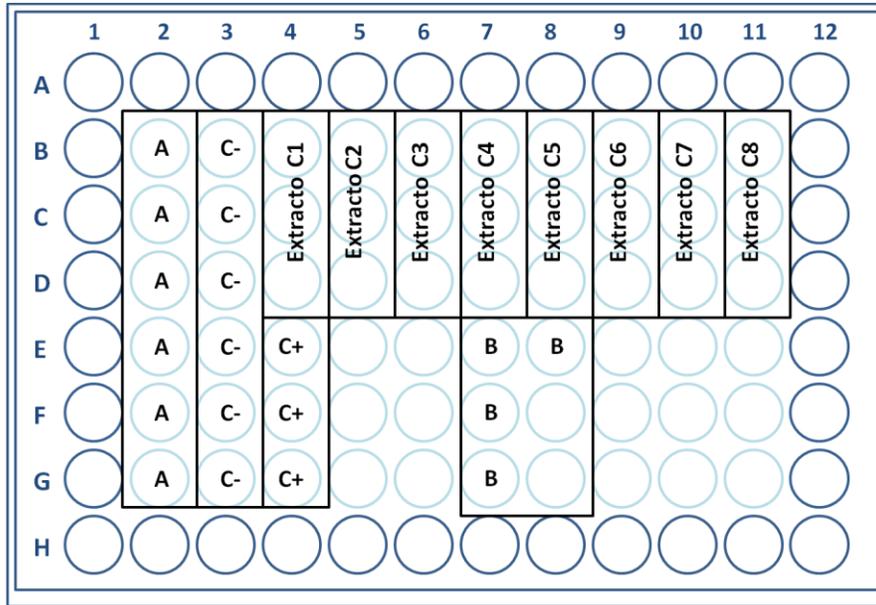
Los promastigotes de *L. mexicana* y *L. infantum* se cultivaron en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> conteniendo 10 mL de medio medio *Schneider's Drosophila* suplementado con 10 % de FBS inactivado y 100 ug/mL de ampicilina a 26 °C. Los parásitos en fase de crecimiento-estacionaria (tercer al cuarto día) se cuantificaron utilizando una cámara Neubauer, tal y como se describe más arriba.

En una placa estéril de 96 pocillos de fondo plano se cultivaron  $1 \times 10^6$  y  $1.35 \times 10^6$  promastigotes por pocillo de *L. mexicana* y *L. infantum*, respectivamente, en un volumen final de 80  $\mu$ L de medio *Schneider's Drosophila* suplementado. El extracto de *B. caapi* en concentraciones crecientes se añadió a los pocillos, disueltos en el propio medio suplementado más metanol, en un volumen de 20  $\mu$ L. Así cada pocillo contenía 100  $\mu$ L incluyendo el número apropiado de células, 2% metanol y concentraciones crecientes del extracto. Cada punto de concentración fue evaluado por triplicado en tres experimentos independientes. Tomando la harmina como referencia, único alcaloide cuantificado en los extractos, las concentraciones evaluadas fueron de 23.8 a 180  $\mu$ M de este compuesto para *L. mexicana* y de 23.8 a 356.3  $\mu$ M para *L. infantum*.

Siguiendo el esquema de la **Figura 1**, como control positivo (C+) se utilizó anfotericina B, 5.0  $\mu$ g/mL y 2.0  $\mu$ g/mL por pocillo, para *L. mexicana* y *L. infantum*, respectivamente. Se

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA IN VITRO DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

incluyeron dos controles negativos, promastigotes cultivados solo en medio *Schneider's Drosophila* (A) y promastigotes cultivados en medio *Schneider's Drosophila* con metanol al 2% sin extracto (C-). Adicionalmente, se introdujo un cuadruplicado de solo medio suplementado sin parásitos para ser utilizado como blanco (B).



**Figura 1. Diseño de placa para ensayo MTT del extracto de *B. caapi* en promastigotes de *Leishmania* spp.** A: control negativo sin metanol; C-: control negativo con 2% de metanol; C+: control positivo (anfotericina B); Extracto C1- C8: concentraciones crecientes del extracto de *B. caapi*; B: blanco (medio de cultivo sin parásitos).

Las placas se incubaron a 26 °C durante 72 horas (Alves et al., 2017; Nasr, 2020). Tras la incubación, se añadieron 10  $\mu$ L de una disolución 5 mg/mL de MTT (bromuro de 3- (4, 5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolio) y la placa se incubó durante tres horas a 26 °C (Dutta, Bandyopadhyay, Mandal, & Chatterjee, 2005). Los cristales de formazan formados por las células viables se disolvieron en 100  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO). La lectura se realizó en un espectrofotómetro de placas Multiskan Thermo Fisher a 570 nm y 630 nm. Cuantas más células viables hay en el pocillo mayor es el valor de absorbancia a 570 nm. Por tanto, los valores

## **ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

promedio de las absorbancias de los controles negativos representaron el máximo crecimiento (100%) y 0% de inhibición. Con ese dato como referencia, se pudo determinar el porcentaje de crecimiento e inhibición para cada concentración del extracto analizada (Koutsoni et al., 2019) y, a partir de ahí, determinar la IC<sub>50</sub> como la concentración en la que se produce una inhibición del 50% del crecimiento.

### **2.2.4. Evaluación *in vitro* del efecto del extracto de *B. caapi* sobre la viabilidad de macrófagos J774.A1 mediante ensayo MTT**

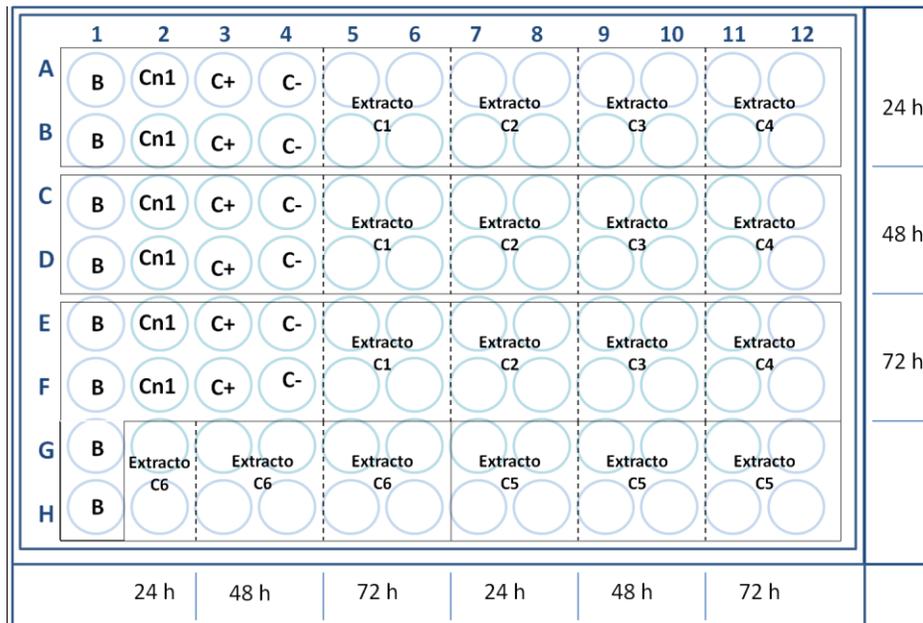
El efecto del extracto de *B. caapi* sobre el crecimiento y la viabilidad de los macrófagos, las células diana de *Leishmania*, se evaluó *in vitro* mediante el ensayo MTT, en la línea murina J774.A1 (ATCC, TIB-67<sup>TM</sup>), de manera similar a como se hizo para los promastigotes de *Leishmania* spp. Estos procedimientos se realizaron en los Laboratorios de Inmunología y Virología de la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE), siguiendo los protocolos establecidos.

Los macrófagos J774.A1. se cultivaron en un frasco de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 10% de FBS a 37 °C a 5.0% de CO<sub>2</sub>. Se incubaron hasta que las células alcanzaron una confluencia mayor al 90%. Las células se lavaron dos veces con PBS y se levantaron utilizando un raspador de células. El conteo de células viables se realizó en una cámara Neubauer por exclusión de azul de tripán.

En placas de 96 pocillos estériles, se cultivaron 5000 células J774.A1 por pocillo, en un volumen final de 100 uL de medio DMEM suplementado con suero fetal bobino. Se incubaron por 24 horas a 37 °C en atmósfera de 5.0% de CO<sub>2</sub>. Se removió el medio y se añadieron concentraciones crecientes del extracto de *B. caapi* disuelto en DMEM fresco suplementado con 10 % de FBS y metanol al 2%. Tomando como referencia la harmina, único alcaloide

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA IN VITRO DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

cuantificado, el extracto se añadió a concentraciones de 1.5 a 356.3  $\mu$ M de este compuesto. Como control positivo (C+) se utilizó cloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ) a 400  $\mu$ M. Se incluyeron dos controles negativos, células solo en medio (Cn1) y células en medio con metanol al 2% (C-). También se incorporaron pocillos con medio sin presencia de células para ser utilizado como blanco (B), como se indica en la **Figura 2**.



**Figura 2.** Diseño de placa para ensayo MTT del extracto de *B. caapi* sobre macrófagos J774.A1 durante 24, 48 y 72 horas. B: blanco (medio sin células); Cn1: control negativo sin metanol; C+: control positivo (Cloruro de cobalto 400  $\mu$ M); C-: control negativo más 2% de metanol; Extracto C1- C6: concentraciones crecientes del extracto de *B. caapi*. h: horas.

Las placas se incubaron a 37 °C, atmósfera al 5.0% de  $\text{CO}_2$ , durante 24, 48 y 72 horas. Tras cada periodo de incubación, la viabilidad se determinó mediante el ensayo colorimétrico de MTT. Se añadieron 10  $\mu$ L de MTT (5mg/mL) y la placa se incubó por cuatro horas a 37°C en 5.0% de  $\text{CO}_2$ . Los cristales de formazan se disolvieron en 100  $\mu$ L de una solución de 0.1M de ácido clorhídrico y 10% (w/v) de dodecilsulfato sódico (SDS). La lectura se realizó a 570 nm y

## **ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

630 nm, en un espectrofotómetro de placas Multiskan Thermo Fisher.

Al igual que en los promastigotes de *Leishmania* spp., el valor de absorbancia a 570 nm permite determinar la viabilidad celular en cada pocillo: mientras más células viables existen mayor es el valor de absorbancia. Por tanto, los valores promedio de las densidades ópticas de los controles negativos representaron el 100% de crecimiento y con ese dato como referencia, se determinaron los porcentajes de viabilidad para cada concentración del extracto analizada.

### **2.2.5. Ensayo Cometa**

La metodología del ensayo cometa se basó en los protocolos descritos por Morillo & Torres, Speit & Hartmann y Boutet-Robinet et al. con modificaciones (Boutet-Robinet, Trouche, & Canitrot, 2013; Morillo Balcázar & Torres Arias, 2020; Speit & Hartmann, 2006).

#### **Preparación de portaobjetos**

Los portaobjetos, previamente desengrasados, se sumergieron en una solución al 0.6% de agarosa NMP (punto normal de fusión) en PBS durante 1 a 2 minutos. Se retiró el exceso de agarosa y se dejó secar a temperatura ambiente durante toda la noche. Siguiendo el proceso antes descrito, se colocó una segunda capa de agarosa NMP (0.6%) en los portaobjetos, con la diferencia de que el tiempo de secado fue de 30 minutos.

#### **Preparación de las células**

En una placa de cultivo de 6 pocillos (P6) se sembraron 250.000 macrófagos J774.A1 por pocillo en medio DMEM con 10% de FBS y se incubó por 24 horas a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub>. Después, los macrófagos J774.A1 se infectaron con 500.000 promastigotes de *L. mexicana* en fase estacionaria temprana (Koutsoni et al., 2019). Para determinar el efecto del extracto de *B. caapi*, éste se añadió en una concentración final de 40  $\mu$ M (tomando la harmina como referencia)

## ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.

por pocillo, tanto para los macrófagos infectados como para los macrófagos sin infección, como se indica en la **Tabla 5**. El control consistió en macrófagos J774.A1, infectados / no infectados, cultivados sólo en medio DMEM suplementado. La placa se incubó por 48 horas a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

**Tabla 5.** Descripción de las muestras analizadas mediante el ensayo cometa.

Nro.	Muestra	Descripción
1	Macrófagos no infectados (control)	Células en medio DMEM
2	Macrófagos no infectados + tratamiento	Células en medio DMEM con 40 $\mu$ M de extracto de <i>B. caapi</i>
3	Macrófagos infectados (control)	Células infectadas con <i>L. mexicana</i> en medio DMEM
4	Macrófagos infectados + tratamiento	Células infectadas en medio DMEM con 40 $\mu$ M de extracto de <i>B. caapi</i>

Luego, se retiró el medio de cultivo y se despegaron cuidadosamente los macrófagos utilizando un raspador de células, y se re-suspendieron en medio DMEM con 10% de FBS.

Se mezclaron 20  $\mu$ L de cada muestra con 160  $\mu$ L de una solución de agarosa LMP (punto bajo de fusión) al 0.5% en PBS mantenida a 37 °C. De esta mezcla, se tomaron 80  $\mu$ L y se colocaron en el portaobjetos previamente tratado (como se explica más arriba). Este portaobjetos se cubrió con un cubreobjetos y se mantuvo a 4 °C por 20 minutos. Se retiró cuidadosamente el cubreobjetos y se adicionaron 80  $\mu$ L de agarosa LMP sobre las células. Se volvió a colocar un cubreobjetos, dejándose solidificar a 4 °C por 20 minutos.

### Lisis y electroforesis

Los pasos subsiguientes se realizaron en un cuarto oscuro con luz roja. Se retiraron los

## **ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

cubreobjetos de las placas y se colocaron en una solución de lisis (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10mM Tris, 0.6% DMSO, 0.5% Tritón X-100, NaOH, pH 10) durante 1 hora a 4 °C en oscuridad.

En seguida, los portaobjetos se lavaron suavemente tres veces con tampón de electroforesis (1 mM EDTA, 0,3 M NaOH, pH>13) y se colocaron en una cámara de electroforesis que se llenó con el mismo tampón. Las condiciones de corrida fueron 25 V y 300 mA durante 30 minutos.

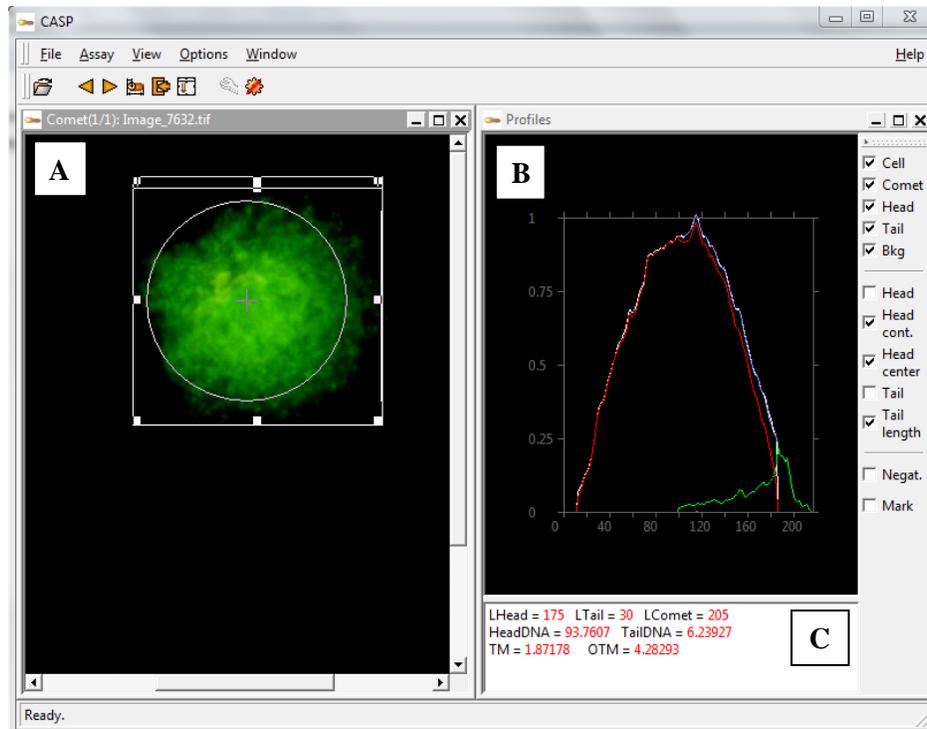
### **Neutralización y tinción**

Los portaobjetos se retiraron de la cámara y se lavaron suavemente tres veces con un buffer de neutralización (0,4 M Tris, pH 7.5). La tinción se realizó colocando 50  $\mu$ l de SYBR Green 20X disuelto en TBE por portaobjetos y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

### **Observación y análisis**

Se observaron entre 18 a 22 células por muestra en un microscopio de fluorescencia Olympus IX53, de exposición 454.5 ms, en lente objetivo de 40X. Las fotografías fueron analizadas en el programa libre CaspLab, versión *casp\_1.2.3b1*. En la **Figura 3**, se indica la interfaz de usuario de este programa, que consta de tres ventanas para el análisis de las imágenes: vista de imagen, perfil de intensidad y adquisición de datos. Para realizar las mediciones en el software, primero se carga la imagen en formato TIFF (**Fig. 3a**). Luego, se dibuja un marco de medición donde se ajusta al tamaño del cometa en la celda. El programa genera una imagen de la intensidad con los parámetros de medición (**Fig. 3b**), y también una ventana con los valores de la cuantificación (**Fig. 3c**) (Lu, Liu, & Yang, 2017).

## ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.



**Figura 3.** Imagen del análisis de un macrófago J774.A1 usando el programa CaspLab para el ensayo cometa. El programa consta de tres ventanas: A) vista de imagen; B) perfil de intensidad; y C) adquisición de datos.

### 2.2.6. Determinación de Apoptosis por Microscopía

Para evaluar la apoptosis se utilizó la tinción diferencial con naranja de acridina / bromuro de etidio (AO / EB). En una placa de cultivo P6, se colocó un cubreobjetos en el fondo de cada pocillo y se sembraron 250.000 macrófagos J774.A1 en medio DMEM con 10% de FBS por 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después, cuatro pocillos se infectaron con 500000 promastigotes de *L. mexicana*, y solo dos de ellos se trataron con extracto a una concentración de harmina de 40  $\mu$ M. La placa se incubó por 48 horas a 37 °C en 5% de CO<sub>2</sub>. De esta manera se establecieron tres condiciones por duplicado, como se describe en la **Tabla 6**.

## ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.

**Tabla 6.** Descripción de las muestras analizadas mediante tinción diferencial de AO / EB

Nro.	Pocillo	Descripción
1	Macrófagos J774.A1 (control)	Células cultivadas solo en medio DMEM suplementado.
2	Macrófagos J774.A1 Infectados	Células infectadas con <i>L. mexicana</i> cultivadas en medio DMEM suplementado
3	Macrófagos J774.A1 infectados + extracto <i>B. caapi</i>	Células infectadas cultivadas en medio DMEM con 40 $\mu$ M del extracto de <i>B. caapi</i>

Los macrófagos, así como los macrófagos infectados (tratados con / sin extracto) se tiñeron utilizando una solución de bromuro de etidio (5  $\mu$ M) y naranja de acridina (5  $\mu$ M) en PBS. Por último, se observaron en un microscopio de fluorescencia marca Olympus IX53 a 384,6 ms de exposición en lente de 20X.

Las células apoptóticas se identificaron mediante tinción diferencial AO/EB que nos permite distinguir entre células viables y no viables basándose en la integridad de la membrana. AO penetra en células viables y no viables y se une al ADN emitiendo fluorescencia verde, mientras que EB solo puede penetrar en células que han perdido integridad de membrana y no son viables. De esta manera se pueden distinguir cuatro tipos de células: células viables con un núcleo bien definido y verde; células en apoptosis temprana con un núcleo desorganizado verde donde se evidencian cúmulos por la condensación de cromatina; células en apoptosis tardía con un núcleo verde con rastros de naranja y alto grado de fragmentación de ADN; y células necróticas con núcleo uniformemente naranja rojizo (García-Rodríguez *et al.*, 2013).

### 2.2.7. Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los experimentos se expresan como media aritmética  $\pm$

## **ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA IN VITRO DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

desviación estándar (SD). Para analizar la significación estadística de las diferencias observadas se realizaron distintos test en función de los grupos de resultados que se comparaban. Para la comparación entre dos grupos se realizó el test de la t de Student. Para la comparación de más de un grupo (análisis del efecto de las  $\beta$  – carbolinas en función de la concentración) se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de una vía seguido de un test de Dunnet comparando cada punto de concentración con el control negativo. En estos test estadísticos, se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando la probabilidad de la hipótesis nula (P) fue 0.05 o menor. Los valores de P para las ANOVAs se reflejan numéricamente en las tablas o figuras. Para el análisis estadístico se empleó el programa informático GraphPad Prism, de la casa comercial GraphPad Software (EEUU).

### **Cálculo de IC<sub>50</sub> y CC<sub>50</sub>**

Los valores de IC<sub>50</sub> y CC<sub>50</sub> se obtuvieron de los valores de porcentaje de inhibición en los parásitos y de viabilidad en los macrófagos, respectivamente. Utilizando el programa estadístico se generó una tabla en formato XY, donde los valores del eje X corresponden a los logaritmos de las concentraciones crecientes del extracto de *B. caapi* y los valores del eje Y, a los porcentajes de inhibición / viabilidad de las células. Utilizando estos puntos, en el programa se realizó una regresión no lineal, permitiendo el cálculo de los valores de IC<sub>50</sub> y CC<sub>50</sub>. El índice de selectividad (IS), se calculó mediante la relación entre la concentración citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>) de los macrófagos J774.A1 y la concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de *Leishmania* spp., de acuerdo a la siguiente fórmula:

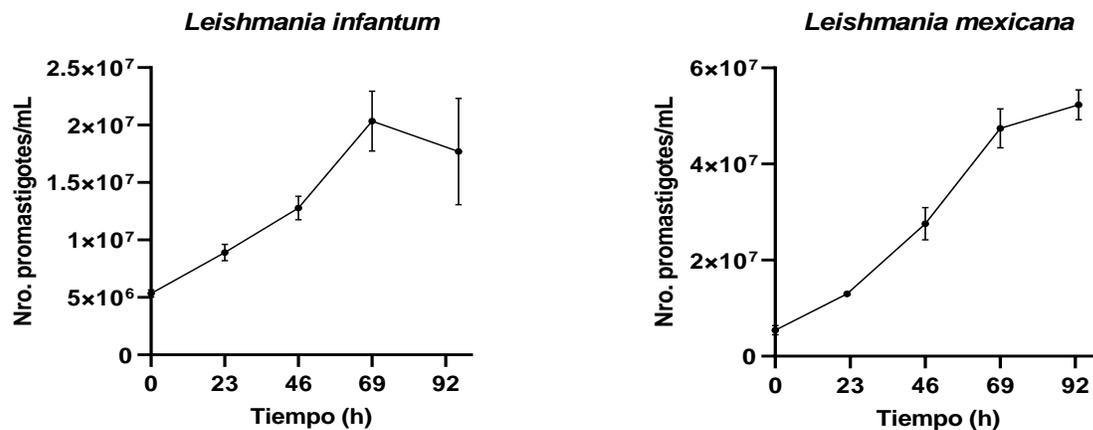
$$IS = \frac{CC_{50}}{IC_{50}}$$

# ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Crecimiento de *Leishmania* spp.

En la **Figura 4** se muestran las curvas de crecimiento de *L. mexicana* y *L. infantum*, en base al número medio de células por mL en función del tiempo de cultivo, de tres experimentos independientes realizados por triplicado. Tal y como se puede observar, en *L. infantum* la fase estacionaria se alcanza más rápido, a partir del cuarto día, mientras que *L. mexicana* parece alcanzar esta fase a partir del quinto día. El crecimiento, sin embargo, fue mayor en esta última, alcanzando el triple de parásitos por mL.



**Figura 4.** Curva de crecimiento de *Leishmania* spp. durante 5 días de cultivo en medio Schneider's Drosophila - 10% de FBS más 100  $\mu$ g/mL de ampicilina. A) *L. infantum*; B) *L. mexicana*

En vista de los resultados, para la realización de los ensayos MTT y otros, se decidió recoger los promastigotes al cuarto día de cultivo en ambas especies. En ese tiempo, ambas cepas se encuentran en fase de crecimiento - estacionaria, y esa es precisamente la fase recomendada para la evaluación del efecto leishmanicida *in vitro* (Koutsoni et al., 2019). En el caso de los ensayos donde se realizó infección de macrófagos, se utilizaron promastigotes de *L. mexicana* del quinto día de cultivo, parásitos en fase estacionaria temprana, tal como lo indica Koutsoni et al. (2019).

## ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.

### 3.2. El extracto de *B. caapi* tiene un potente efecto inhibitorio sobre el crecimiento de promastigotes de *L. mexicana* y *L. infantum* *in vitro*

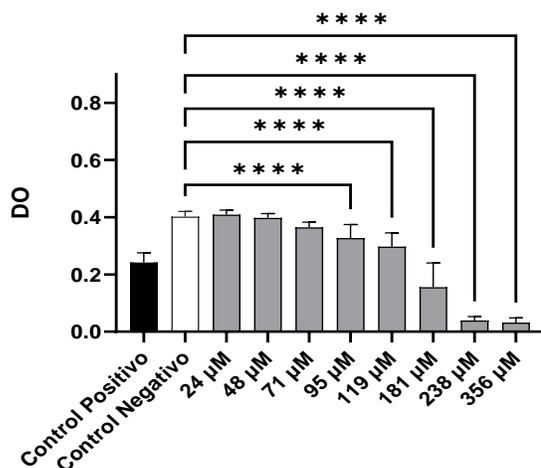
Para analizar el efecto inhibitorio del extracto de *B. caapi* sobre el crecimiento de *Leishmania* spp. *in vitro* se realizó el ensayo MTT en el que se testaron concentraciones crecientes de extracto y su efecto sobre la viabilidad celular de los promastigotes tras 72 horas. La **Figura 5** nos muestra los valores promedio de tres ensayos independientes realizados por triplicado. Los rangos de concentraciones del extracto se expresan en función de la concentración de harmina, ya que es el único alcaloide que se cuantificó, pero es importante comprender que no se puede descartar la presencia de otras  $\beta$  – carbolinas. En el caso de *L. infantum* el rango de concentraciones fue de 24 a 356  $\mu$ M y en *L. mexicana* de 24 a 181  $\mu$ M.

En ambas especies, el control positivo corresponde a promastigotes cultivados en presencia de anfotericina B, y el control negativo a parásitos cultivados en medio de cultivo más metanol (2%), porcentaje que se mantuvo para todas las concentraciones de extracto. Para determinar la concentración apropiada de anfotericina B se realizaron varios ensayos y se optó por una concentración que provocara una inhibición del 50% o mayor sobre el crecimiento de los promastigotes en comparación con el control negativo, siendo de 2  $\mu$ g/mL y 5  $\mu$ g/mL para *L. infantum* y *L. mexicana*, respectivamente.

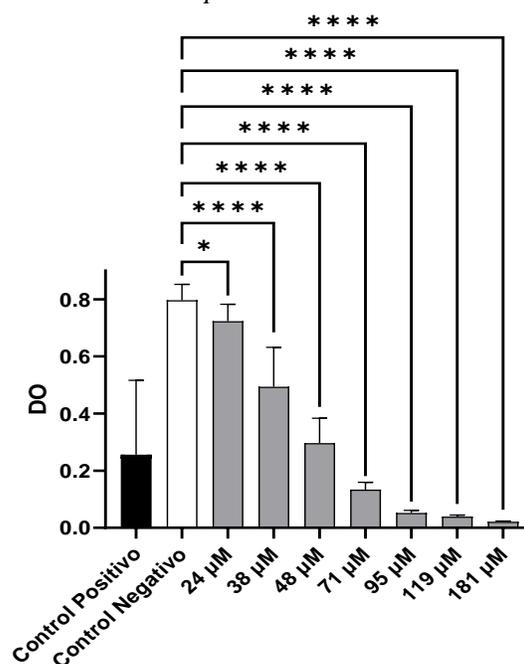
Tal y como puede observarse en la mencionada **Figura 5**, el extracto redujo de manera extremadamente significativa (ANOVA  $P < 0.0001$ ) el crecimiento de ambas especies de parásitos. En el caso de *L. infantum*, los efectos fueron significativos a partir de 95  $\mu$ M, mientras que todas las concentraciones testadas en *L. mexicana* tuvieron efectos significativos. Los efectos alcanzaron y superaron los de la anfotericina B en ambas especies, especialmente en el caso de *L. mexicana*, la especie aparentemente más sensible de las dos.

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA IN VITRO DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

**A)A) *L. infantum***  
ANOVA  $p < 0.0001$



**B)B) *L. mexicana***  
ANOVA  $p < 0.0001$



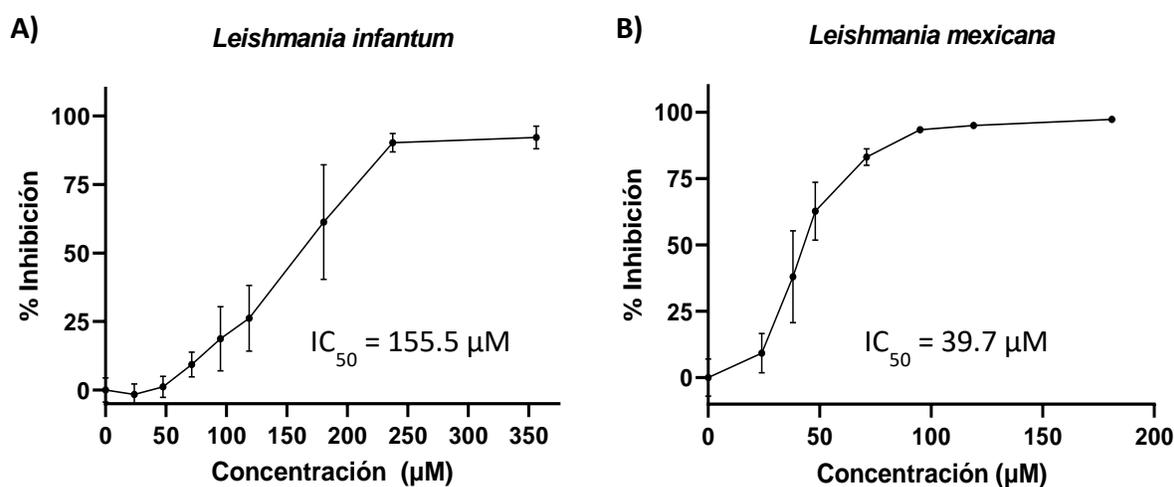
**Figura 5. Efecto del extracto de *B. caapi* sobre la viabilidad de *Leishmania* spp.** Tras 72 horas de cultivo y ensayo de MTT. En ambas especies el ANOVA  $p$ -value  $< 0.0001$ . Comparaciones entre grupos: A) *L. Infantum*: \*\*\*\* =  $p$ -value  $< 0.0001$ ; B) *L. mexicana*: \*\*\*\* =  $p$ -value  $< 0.0001$ , \* =  $p$ -value 0.0440.

A partir de estos valores de DO, se obtuvieron los porcentajes de inhibición (en relación al control negativo) en función de la concentración y se plasmaron en la **Figura 6** que, al igual que la figura anterior, muestra los valores promedio de tres experimentos independientes realizados por triplicado. De las curvas así obtenidas se calculó la  $IC_{50}$  para ambos parásitos, tomando siempre la concentración de harmina como referencia. Para este cálculo, se empleó una regresión no lineal del logaritmo de la concentración del compuesto versus los porcentajes de inhibición, como se describe en la sección de análisis estadístico de la metodología.

Tal y como se puede observar, la eficacia del extracto fue similar en ambos casos, aunque ligeramente superior para *L. mexicana* ya que se alcanzó una inhibición máxima de aproximadamente el 97% frente al 92% para *L. infantum*. Sin embargo, los efectos fueron mucho

## ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.

más potentes para *L. mexicana*, como se desprende de los valores de  $IC_{50}$ , es decir, la concentración que provoca una inhibición de crecimiento del 50%. Para este parásito, se obtuvo un valor de  $IC_{50}$  (media de los tres experimentos, **Tabla 7**) de  $39.7 \mu\text{M}$  frente al obtenido en *L. infantum* que fue de  $155.5 \mu\text{M}$ . Como se ve, el extracto fue casi cuatro veces más potente para *L. mexicana*, y los mismos valores de inhibición se obtuvieron con mucha menor concentración de extracto.



**Figura 6.** Actividad anti-leishmanial del extracto de *B. caapi*. Gráfica del porcentaje de inhibición del crecimiento de los promastigotes en función de la concentración del extracto. Izquierda: *L. infantum*, derecha: *L. mexicana*.

**Tabla 7.** Valores de las  $IC_{50}$  del extracto de *B. caapi* en *L. infantum* y *L. mexicana*.

Especie	<i>L. infantum</i>			<i>L. mexicana</i>		
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
<b>Valores de mejor ajuste</b>						
IC50	116.2	178.2	172.2	43.23	37.77	37.97
<b>CI 95%</b>						
IC50	110.2 a	171.0 a	163.8 a	41.48 a	35.35 a	46.12 a
	122.7	185.6	180.8	45.01	40.33	49.93
<b>Bondad de Ajuste</b>						
R <sup>2</sup>	0.9781	0.9815	0.9757	0.9821	0.9447	0.9917

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

**3.3. El extracto de *B. caapi* también tiene un potente efecto inhibitorio sobre el crecimiento de macrófagos J774.A1 *in vitro***

Para analizar el efecto del extracto de *B. caapi* sobre el crecimiento *in vitro* de los macrófagos J774.A1, se efectuó el ensayo MTT después de 24, 48 y 72 horas de cultivo. Como antes se mencionó, los valores de absorbancia se relacionan directamente con la viabilidad celular.

En la **Tabla 8** se observan los valores promedios ( $\pm$  DS) de las absorbancias a 570 nm. El control positivo corresponde a células cultivadas en presencia de cloruro de cobalto, y el control negativo a células sembradas en medio de cultivo más metanol (2%) que, al igual que en los parásitos, es el mismo porcentaje que se mantuvo para todas las concentraciones de extracto. Adicionalmente se incluyó un control de células cultivadas sólo en medio suplementado. El rango de concentraciones del extracto fue de 25 a 290  $\mu$ M, concentraciones que se expresaron en función de la harmina, único alcaloide cuantificado del extracto.

**Tabla 8.** Viabilidad de los macrófagos J774.A1 (absorbancia) cultivados a concentraciones crecientes del extracto de *B. caapi* (25 a 290  $\mu$ M) después de 24, 48 y 72 horas.

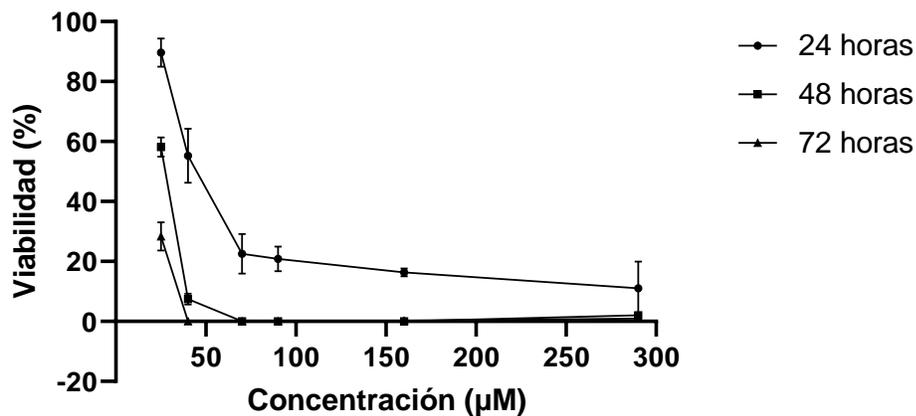
<b>Absorbancia (Media <math>\pm</math> DS)</b>			
	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>
Células	0.324 $\pm$ 0.033	0.544 $\pm$ 0.035	0.691 $\pm$ 0.004
Control Positivo	0.000 $\pm$ 0.000	0.000 $\pm$ 0.000	0.000 $\pm$ 0.000
Control Negativo	0.322 $\pm$ 0.004	0.432 $\pm$ 0.004	0.704 $\pm$ 0.018
<b>Harmina</b>			
25 $\mu$ M	0.289 $\pm$ 0.015 <sup>ns</sup>	0.251 $\pm$ 0.014 <sup>****</sup>	0.200 $\pm$ 0.033 <sup>****</sup>
40 $\mu$ M	0.178 $\pm$ 0.029 <sup>****</sup>	0.032 $\pm$ 0.008 <sup>****</sup>	0.000 $\pm$ 0.000 <sup>****</sup>
70 $\mu$ M	0.073 $\pm$ 0.021 <sup>****</sup>	0.000 $\pm$ 0.000 <sup>****</sup>	0.000 $\pm$ 0.000 <sup>****</sup>
90 $\mu$ M	0.067 $\pm$ 0.013 <sup>****</sup>	0.000 $\pm$ 0.000 <sup>****</sup>	0.000 $\pm$ 0.000 <sup>****</sup>
160 $\mu$ M	0.053 $\pm$ 0.004 <sup>****</sup>	0.000 $\pm$ 0.000 <sup>****</sup>	0.002 $\pm$ 0.003 <sup>****</sup>
290 $\mu$ M	0.036 $\pm$ 0.029 <sup>****</sup>	0.009 $\pm$ 0.003 <sup>****</sup>	0.007 $\pm$ 0.002 <sup>****</sup>

24 horas, 48 horas y 72 horas: ANOVA *p*-value < 0.0001; <sup>\*\*\*\*</sup> = *p* value < 0.0001; <sup>ns</sup> = no diferencia estadística. Los controles se analizaron por duplicado y las concentraciones del extracto (harmina) por cuadruplicado.

## ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.

El análisis de la varianza mostró que el extracto reduce de manera extremadamente significativa (ANOVA  $P < 0.0001$ ) el crecimiento de los macrófagos J774.A1 tras 24, 48 y 72 horas de cultivo. En la misma **Tabla 8** se indica mediante asteriscos la significancia estadística del post test de Dunnet. Como puede observarse, a 48 y 72 h todas las concentraciones ensayadas tuvieron efectos extremadamente significativos, mientras que a 24 h solo el punto de menor concentración (25  $\mu\text{M}$ ) careció de significancia estadística.

Los porcentajes de viabilidad de los macrófagos, calculados a partir de los valores de absorbancia, se graficaron en función de las concentraciones del extracto de *B. caapi* a las 24, 48 y 72 horas, como se observa en la **Figura 7**.



**Figura 7.** Viabilidad de macrófagos J774.A1 en función de la concentración del extracto de *B. caapi* a las 24, 48 y 72 horas de cultivo

Para el cálculo de la  $CC_{50}$ , se empleó una regresión no lineal del logaritmo de la concentración del extracto versus los valores de porcentaje de viabilidad de los macrófagos antes obtenidos. A partir de la ecuación de la curva generada por el programa, se obtuvieron los valores de concentración del extracto en los que la viabilidad celular es del 50% ( $CC_{50}$ ), como se

## ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.

indica en la **Tabla 9**. Los valores de  $CC_{50}$  a las 24 horas y 48 horas fueron 47.21  $\mu$ M y 26.39  $\mu$ M, respectivamente. A 72 h la viabilidad fue de 0% para todos los puntos de concentración menos el primero, por lo que no pudo construirse una curva ni realizar la regresión no lineal indicada más arriba y, por tanto, calcular  $CC_{50}$ . Por tal razón, se realizó un segundo ensayo, pero empleando menores concentraciones de extracto de *B. caapi*, 1.5 a 40.0  $\mu$ M.

**Tabla 9.**  $CC_{50}$  del extracto de *B. caapi* en los macrófagos J774.A1.

	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>
<b>Valores de mejor ajuste</b>		
$CC_{50}$	47.21	26.39
<b>CI 95%</b>		
$CC_{50}$	42.37 a 52.59	26.10 a 26.69
<b>Bondad de Ajuste</b>		
$R^2$	0.9028	0.9944

Los valores de las absorbancias obtenidos se indican en la **Tabla 10** y la curva con los valores de viabilidad a partir de éstos en la **Figura 8**. El extracto de *B. caapi* también redujo de manera significativa el crecimiento de los macrófagos a las concentraciones de 1.5 a 40.0  $\mu$ M (ANOVA  $P < 0.0001$ ). En este caso sí se logró una curva con buen ajuste para las 72 h de incubación (**Figura 8**), lo que permitió realizar la regresión no lineal y el cálculo de la  $CC_{50}$  (**Tabla 11**).

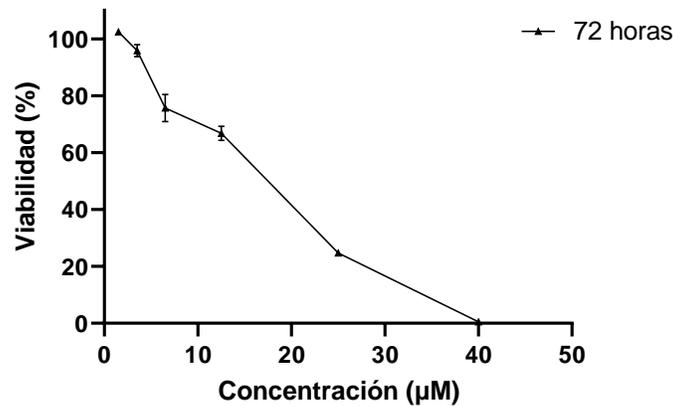
En definitiva, los valores de  $CC_{50}$  fueron de 46.2, 26.4 y 14.75 para 24, 48 y 72 h respectivamente. Lógicamente, a mayor tiempo de incubación más potencia del extracto, es decir, menor  $CC_{50}$ .

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA IN VITRO DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

**Tabla 10.** Viabilidad de macrófagos J774.A1 cultivados a concentraciones crecientes del extracto de *B. caapi* (1.5 a 40  $\mu$ M) tras de 72 horas.

	<b>Absorbancia</b> (media $\pm$ DS), 72 horas
Células	0.803 $\pm$ 0.028
Control positivo	0.000 $\pm$ 0.001
Control negativo	0.788 $\pm$ 0.002
<b>Harmina</b>	
1.5 $\mu$ M	0.808 $\pm$ 0.007 <sup>ns</sup>
3.5 $\mu$ M	0.756 $\pm$ 0.017 <sup>ns</sup>
6.5 $\mu$ M	0.597 $\pm$ 0.038 <sup>****</sup>
12.5 $\mu$ M	0.527 $\pm$ 0.020 <sup>****</sup>
25 $\mu$ M	0.195 $\pm$ 0.007 <sup>****</sup>
40 $\mu$ M	0.000 $\pm$ 0.011 <sup>****</sup>

ANOVA  $p$ -value < 0.0001; \*\*\*\*  $p$  < 0.0001; <sup>ns</sup> = no diferencia estadística. Los controles se analizaron por duplicado y el extracto de *B. caapi* por cuadruplicado.



**Figura 8.** Viabilidad en macrófagos J774.A1 cultivados a concentraciones de 1.5 a 40  $\mu$ M del extracto de *B. caapi*, 72 horas.

**Tabla 11.** CC<sub>50</sub> del extracto de *B. caapi* en macrófagos J774.A1 a 72 horas de cultivo.

	<b>72 horas</b>
<b>Valores de mejor ajuste</b>	
CC50	14.75
<b>CI 95%</b>	
CC50	13.29 a 16.33
<b>Bondad de Ajuste</b>	
R <sup>2</sup>	0.9642



## **ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

Éstas imágenes corresponden a los mismos pocillos de la placa de 96 en la que se realizó el ensayo de MTT, antes de añadir el reactivo. Las concentraciones de extracto de las micrografías se indican en la **Figura 9**.

Nótese que a partir de la concentración de 12.5  $\mu$ M (**Fig. 9f**), se observa la formación de grandes vacuolas en los macrófagos, indicativo de cambios morfológicos según Petricevich y colaboradores (Petricevich, Reynaud, Cruz, & Possani, 2008). Mientras que a concentraciones iguales o mayores a 25  $\mu$ M, el crecimiento de los macrófagos se afectó drásticamente, pudiendo observarse muy pocas células, restos celulares y ciertas células con grandes vacuolas. Estos resultados confirmaron lo observado por MTT.

### **3.4. El extracto de *B. caapi* presenta una citotoxicidad *in vitro* mayor para los macrófagos que para los promastigotes de *Leishmania* spp.**

El índice de selectividad está definido como el cociente entre la concentración citotóxica 50 (CC<sub>50</sub>) de los macrófagos J774.A1 y la concentración inhibitoria 50 (IC<sub>50</sub>) de amastigotes de *Leishmania* spp. (CC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub>). Para demostrar potencial en el tratamiento contra la leishmaniasis esta relación debe ser mayor a uno (SI > 1) (Koutsoni et al., 2019). Estudios adicionales también relacionan el valor de la IC<sub>50</sub> de promastigotes de *Leishmania* spp. (Makwali, Wanjala, Ingonga, & Anjili, 2015). El presente trabajo, basó el cálculo del SI en el estudio citado, y se determinó a partir de la IC<sub>50</sub> de promastigotes de *Leishmania* spp. a las 72 horas de cultivo y de la CC<sub>50</sub> de macrófagos J774.A1 al mismo tiempo de cultivo. Como puede verse en la **Tabla 12**, los valores de SI, en ambas especies, fueron menores a uno, lo que sugiere que el extracto presenta una citotoxicidad *in vitro* mayor para los macrófagos J774.A1, que para los promastigotes de *L. mexicana* y *L. infantum*. Por tal motivo, en estudios posteriores se estudiará el SI a partir de la IC<sub>50</sub> del extracto en amastigotes intracelulares de *Leishmania* spp.

## ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.

**Tabla 12.** IS del extracto de *B. caapi* a las 72 horas de cultivo.

	CC <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	SI
Macrófagos J774.A1	14,75	-	-
<i>L. infantum</i>	-	155.53	0.09
<i>L. mexicana</i>	-	39.66	0.37

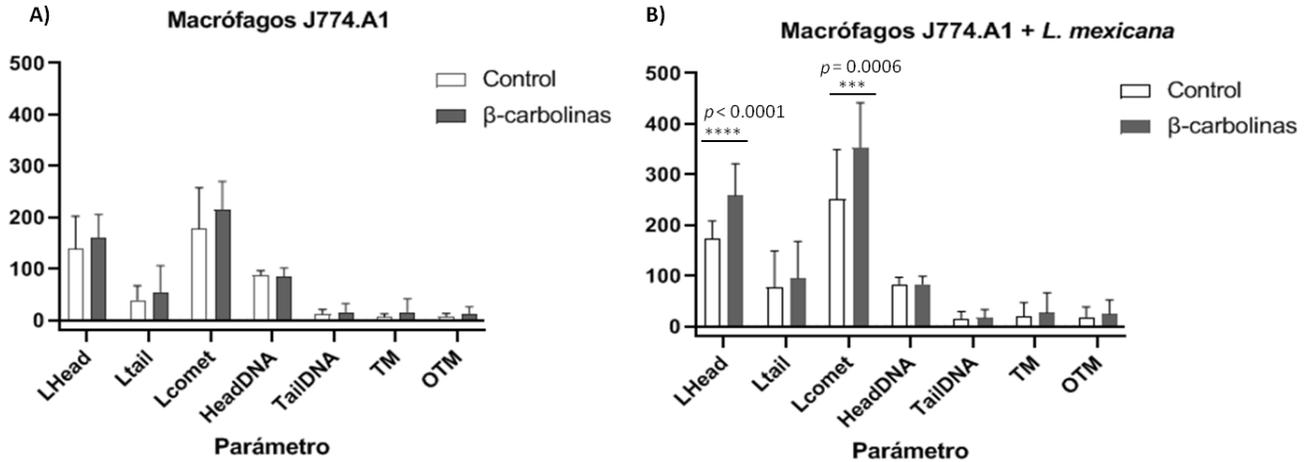
### 3.5. El extracto de *B. caapi* mostró un incremento en la longitud del cometa en macrófagos infectados

Hay estudios que indican que la muerte celular ocasionada por las  $\beta$  – carbolinas podría también atribuirse a la fragmentación del ADN (Mendes et al., 2016). Para comprobar que nuestro extracto actúa de esa manera, se realizaron ensayos cometa en macrófagos y macrófagos infectados con *L. mexicana* a las 48 horas de cultivo y una concentración de extracto de 40  $\mu$ M.

Mediante el programa libre CaspLab se realizó el análisis de las imágenes del ensayo cometa. Los parámetros que se evaluaron incluyen: longitud de cabeza, longitud de cola, longitud de cometa, porcentaje de ADN de la cola, porcentaje de ADN de la cabeza, momento de la cola (TM) y momento de la cola de oliva (OTM). En la **Figura 10** se indican los valores promedios ( $\pm$  DS) de los parámetros analizados para los macrófagos J774.A1 sanos e infectados tratados y sus controles. El número de células analizadas fueron: macrófagos tratados (18) y controles (20); y en macrófagos infectados tratados (22) y controles (23).

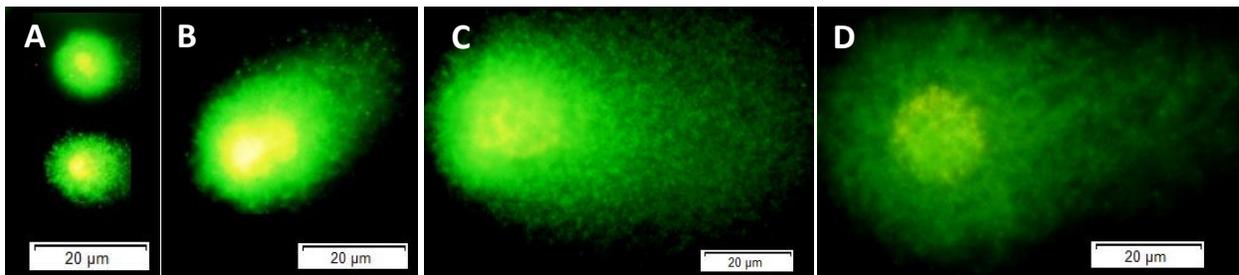
En el grupo de macrófagos infectados, el tratamiento con el extracto provocó un incremento significativo en la longitud de cabeza ( $p < 0.0001$ ) y la longitud del cometa ( $p = 0.0006$ ) En el grupo de macrófagos sanos, en cambio, no hubo ningún efecto significativo del extracto.

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA IN VITRO DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**



**Figura 10.** Parámetros analizados en el ensayo cometa en macrófagos J774.A1, sanos e infectados, incubados a 40  $\mu$ M de extracto por 48 horas. A) Macrófagos J774.A1 no infectados, control y tratados; B) Macrófagos J774.A1 infectados con *L. mexicana*, control y tratados. La comparación entre los dos grupos se realizó mediante el test de la t de Student: \*\*\*\* =  $p < 0.0001$ ; \*\*\* =  $p = 0.0006$ .

La **Figura 11** muestra microfografías representativas del ensayo cometa realizado en macrófagos sanos (a y b) y en macrófagos infectados con *L. mexicana* (c y d). Como puede observarse, los macrófagos sanos mostraron una morfología redondeada y con escasa presencia de cola que aumentó ligeramente con el tratamiento (**Fig. 11b**).



**Figura 11.** Fotografías del ensayo cometa de macrófagos J774.A1, 48 h de cultivo. Observados en un microscopio de fluorescencia Olympus IX53 a 454.5 nm, en lente de 40X. Macrófagos J774.A1 no infectados: A) control, y B) tratadas con el extracto de *B. caapi* 40  $\mu$ M; macrófagos J774.A1 infectados: C) control, y D) tratadas con el extracto.

En los macrófagos infectados la presencia de cola fue evidente en los controles (**Fig. 11c**) y aumentó ligeramente con el tratamiento (**Fig. 11d**). Es importante recalcar, que al tiempo de

## **ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

incubación (48 h) y la concentración ensayada (40  $\mu$ M) apenas se encontraron células viables y casi todo eran restos celulares. Probablemente, a menores concentraciones o tiempos de incubación más cortos, encontraríamos más células en las que evaluar la fragmentación de ADN mejorando los resultados.

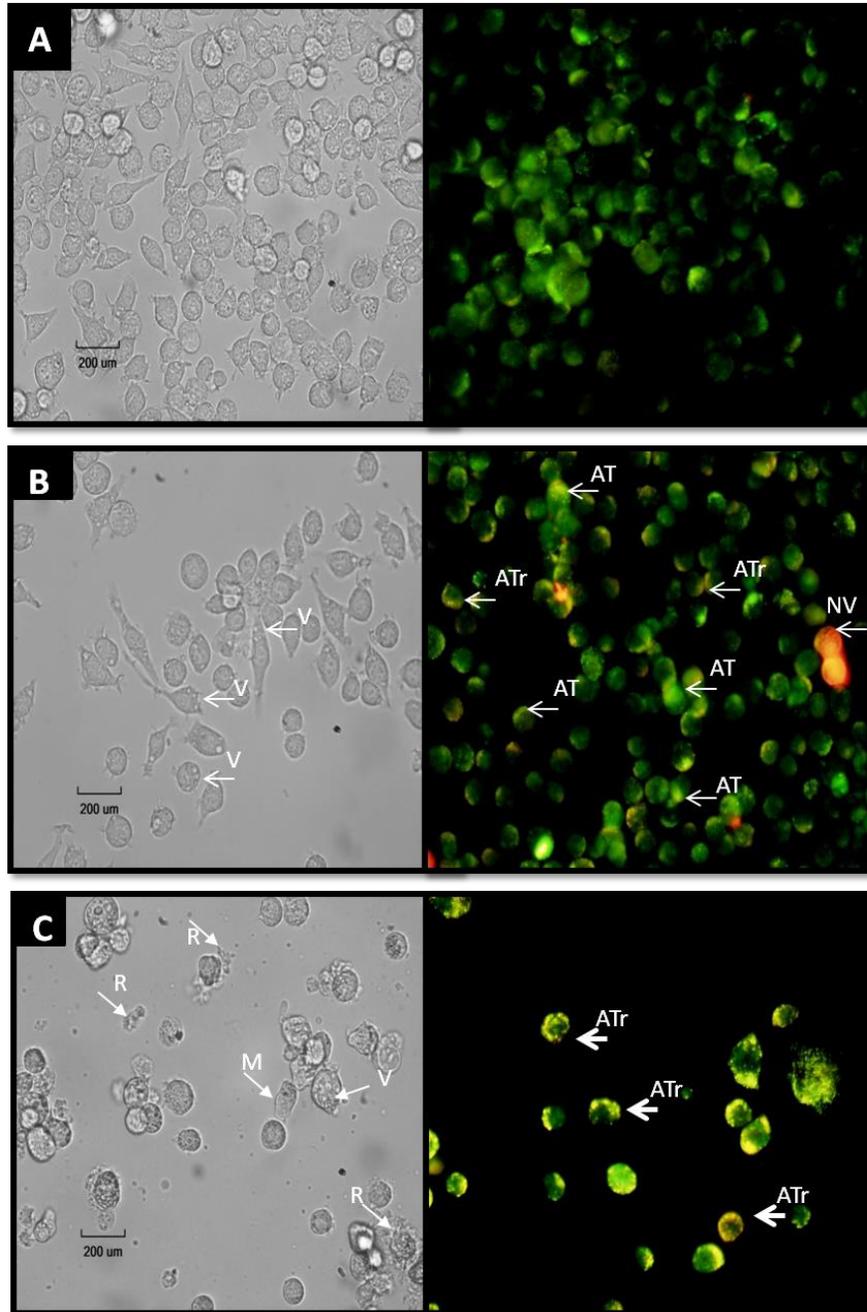
### **3.6. El extracto de *B. caapi* causa apoptosis en macrófagos J774.A1 a las 48 horas de cultivo**

El análisis mediante microscopía convencional del efecto citotóxico del extracto de *B. caapi* en los macrófagos J774.A1 a las 72 horas de cultivo (antes de añadir el reactivo MTT) mostró que a concentraciones iguales o mayores a 25  $\mu$ M, la viabilidad de los macrófagos se afectó drásticamente, pudiendo observarse muy pocas células, restos celulares y ciertas células con grandes vacuolas. Estudios en macrófagos y monocitos han demostrado que entre los mecanismos de muerte celular se incluyen la apoptosis y piroptosis (Taabazuing, Okondo, & Bachovchin, 2017).

Por tal motivo se decidió realizar la tinción diferencial de naranja de acridina / bromuro de etidio, ya que permite identificar células apoptóticas. En la **Figura 12** se muestran micrografías representativas de tres condiciones: macrófagos control (sin tratar), macrófagos infectados control y macrófagos infectados tratados con extracto de *B. caapi*.

Los macrófagos sin tratamiento (control) presentaron un núcleo uniforme de color verde, indicativo de células viables, lo que se corroboró mediante microscopía convencional (**Fig. 12a**). Los macrófagos infectados control, presentaron eventos de apoptosis temprana (AT) y tardía (ATr), sin afectar mucho al número de células vivas, aunque se observa alguna célula necrótica (NV). En los macrófagos infectados tratados con el extracto, apenas se observan células, y todas presentan apoptosis tardía.

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA IN VITRO DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**



**Figura 122. Macrófagos J774.A1 cultivados a confluencia en un cubreobjetos con DMEM-10% FBS.** Se observaron en: un microscopio invertido a 40 X (*izquierda*), y en un microscopio de fluorescencia Olympus IX53 a 384,6 de exposición y lente de 20 X con tinción diferencial de EB/AO (*derecha*). **A) macrófagos control**, *Izq.*: las células no presentan alteraciones; *Der.*: coloración verde uniforme (integridad de la membrana celular). **B) Macrófagos infectados con *L. mexicana* control**, *Izq.*: las células presentan vacuolas en el citoplasma; *Der.*: células en apoptosis temprana (condensación del material genético, coloración amarillo verdoso), células en apoptosis tardía (alteraciones en el citoplasma y membrana, color verde anaranjado) y células no viables (color naranja). **C) Macrófagos Infectados con *L. mexicana* y tratadas con extracto de *B. caapi* (40 $\mu$ M)**: *Izq.*: células con deformación de membrana y formación de vacuolas en el citoplasma, presencia de restos celulares; *Der.*: células en apoptosis tardía e hiperchromía del citoplasma. V: vacuolas en el citoplasma, AT: apoptosis temprana, ATr: apoptosis tardía, NV: no viables, R: restos celulares, M: deformación de membrana.

## ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.

### 4. DISCUSIÓN

*B. caapi* es una planta tradicional de la Amazonia, rica en  $\beta$ -carbolinas. Hay estudios indican que estos compuestos presentan actividad anti-*Leishmania* (Alonso et al., 2021), convirtiéndose en una alternativa potencial para el tratamiento de esta enfermedad. En la presente investigación se evidenció que el extracto de *B. caapi* provoca una notable inhibición en el crecimiento de promastigotes de *L. infantum* y *L. mexicana*. Además, provoca también la inhibición del crecimiento de la línea celular murina de macrófagos J774.A1. Por otro lado, el ensayo cometa mostró alteraciones en las células infectadas que fueron tratadas con el extracto de *B. caapi*. Además, los estudios de microscopía evidencian que la activación de la apoptosis es, al menos en parte, responsable de la disminución de la viabilidad celular observada en macrófagos infectados con *L. mexicana* y tratados con el extracto de *B. caapi*.

Esta planta es utilizada tradicionalmente en la preparación de la bebida Ayahuasca para rituales religiosos. Hamill y colaboradores indican que las principales  $\beta$ -carbolinas encontradas en *B. caapi* son: harmina, harmalina y tetrahydroharmina (Hamill et al., 2019); alcaloides a los que se les atribuyen los efectos psicotrópicos y fisiológicos. En el presente estudio, se identificó la presencia de harmina y se cuantificó en el extracto de *B. caapi*, pero no se descarta la presencia de otros alcaloides, pudiendo el efecto inhibitorio / citotóxico deberse tanto a la harmina, como a las otras  $\beta$ -carbolinas no caracterizadas, o a sinergias entre las mismas. En estudios previos de nuestro laboratorio (Perez-Marvit & Arisqueta, 2020), se identificó también la presencia de tetrahydroharmina, pero no pudo cuantificarse debido a la falta de disponibilidad del estándar comercial de esta  $\beta$  – carbolina.

La actividad anti-trypanosomal de las  $\beta$ -carbolinas se ha observado en especies como *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* spp. (Alonso et al., 2021; Di Giorgio et al., 2004; Valdez et al.,

## **ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

2009). Actualmente existen escasas investigaciones publicadas que estudien esta actividad a partir mezclas naturales de  $\beta$ -carbolinas obtenidas de plantas, debido a que la mayoría de estudios se centran en moléculas individuales, e incluso en alcaloides obtenidos a partir de síntesis o modificación química. Al ser *B. caapi* una planta tradicional, conocer su aplicación a nivel *in vitro* para enfermedades como leishmaniasis es muy importante, porque los medicamentos actualmente utilizados para esta parasitosis provocan fuertes efectos adversos, como también resistencia (Ponte-Sucre et al., 2017).

El estudio del extracto de *B. caapi* mostró actividad inhibitoria en el crecimiento de promastigotes de *Leishmania*, siendo la  $IC_{50}$  de 155.5  $\mu$ M en *L. infantum* y de 39.66  $\mu$ M en *L. mexicana*, tomando como referencia la concentración del único alcaloide cuantificado, la harmina. *L. mexicana*, por tanto, fue más sensible al extracto ya que la  $IC_{50}$  para este parásito fue notablemente inferior. El estudio realizado por Di Giorgio et al. (2004) analizó el efecto de la harmina sola, obteniendo que en promastigotes de *L. infantum* la  $IC_{50}$  fue de 3.7  $\mu$ M. Por otro lado, investigaciones en promastigotes de *L. amazonensis* utilizando derivados sintéticos de las  $\beta$ -carbolinas, han obtenido  $IC_{50}$  de 5.3 - 9.9  $\mu$ M (Alonso et al., 2021). Si bien las  $IC_{50}$  del extracto de *B. caapi* parecen ser mayores en ambas especies, comparado con las concentraciones obtenidas en otros estudios, hay que tener en cuenta factores como: cepa de *Leishmania* spp., metodología empleada para evaluar la viabilidad, vehículo para administrar las  $\beta$  - carbolinas y, tal vez lo más importante, una composición compleja en cuanto a alcaloides presentes que, del mismo modo en que podrían provocar sinergias, aumentando los efectos individuales, podrían generar también antagonismos apantallando estos efectos.

La inhibición en el crecimiento también se presentó en la línea celular de macrófagos J774.A1 cuando se expusieron al extracto de *B. caapi* a las 24, 48 y 72 horas, obteniendo las

## **ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

CC<sub>50</sub> de 47, 26 y 14.8  $\mu$ M, respectivamente. Estudios similares mostraron que solo la harmina, a las 72 horas de cultivo en macrófagos obtuvo una CC<sub>50</sub> de 17.5  $\mu$ M (Di Giorgio et al., 2004), mientras que en otras moléculas derivadas de las  $\beta$ -carbolinas mostraron CC<sub>50</sub> entre 33 - 42  $\mu$ M, a las 24 horas de exposición (Alonso et al., 2021). Los valores obtenidos en el presente estudio se acercan a los obtenidos por otros investigadores. En el estudio realizado por Di Giorgio y colaboradores (2004), en el que emplean monocitos humanos, la citotoxicidad en éstos mostró ser dependiente del tipo de  $\beta$ -carbolina. Así, a las 72 horas de cultivo, los alcaloides harmame, harmina y harmalina presentaron CC<sub>50</sub> de 22.1, 17.5 y >200  $\mu$ M. Como se expuso antes, hay investigaciones que reportan la presencia de varias  $\beta$ -carbolinas en la planta de *B. caapi* (harmina, harmalina y tetrahydroharmina mayoritariamente), motivo por lo que este efecto citotóxico en los macrófagos puede ser por acción de la harmina, o por efecto de la mezcla de alcaloides.

Los índices de selectividad en nuestro estudio fueron valores menores a uno en ambas especies de *Leishmania* spp. (0.09 en *L. infantum* y 0.36 en *L. mexicana*), lo que sugiere que nuestro extracto no tiene tanto potencial en el uso terapéutico contra la leishmaniasis. Sin embargo, éste se calculó a partir de la IC<sub>50</sub> del extracto en promastigotes y otros autores han demostrado mayor sensibilidad cuando se analizan los efectos en amastigotes (Ashok et al., 2016; Di Giorgio et al., 2004). Esto arrojaría un mejor índice de selectividad, y un mayor potencial terapéutico. Por eso, recomendamos estudios adicionales en los que también se evalúe la inhibición del crecimiento en amastigotes. Además, la forma intracelular del parásito en la leishmaniasis es el amastigote.

Estudios en *Leishmania* spp. demuestran que los mecanismos de acción de las  $\beta$ -carbolinas y sus derivados incluyen: disminución en el volumen celular, despolarización de la

## **ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

membrana mitocondrial, acumulación de cuerpos lipídicos, cambios en el ciclo celular y producción de especies reactivas de oxígeno (Alonso et al., 2021). Otros investigadores indican que la muerte celular podría también atribuirse a necrosis debido al daño de la membrana (Lala, Pramanick, Mukhopadhyay, Bandyopadhyay, & Basu, 2004), fragmentación del ADN, lipoperoxidación, acumulación de orgánulos vesiculares ácidos y formación de compartimentos autofágicos (Mendes et al., 2016).

En este contexto, en el presente estudio se realizó el ensayo cometa, además de la tinción diferencial con naranja de acridina / bromuro de etidio, para conocer si las  $\beta$ -carbolicas del extracto de *B. caapi* tienen como mecanismo de acción la fragmentación del ADN y/o la apoptosis celular. El ensayo cometa mostró que en los macrófagos infectados que recibieron tratamiento con el extracto (harmina, 40 $\mu$ M), tanto el parámetro “longitud del cometa” como el parámetro “longitud de cabeza”, fueron estadísticamente mayores que en sus controles, lo que sugiere que el extracto de *B. caapi*, sí provoca alteraciones tras 48h. Sin embargo, según Luna-González et al. (2018), los parámetros relevantes para la evaluación del daño al ADN son el “porcentaje de ADN en la cola”, el “momento de cola” y el “momento Olive”, que no mostraron cambios estadísticamente significativos. En los macrófagos J774.A1 no infectados, y que recibieron el tratamiento con el extracto, no se presentaron diferencias estadísticas con el grupo control en los parámetros evaluados. De todos modos, o bien la concentración fue demasiado elevada, o el tiempo de incubación demasiado prolongado, porque fue muy difícil encontrar células en las que evaluar la fragmentación debido a extensa lisis y muerte celular.

En cuanto a la tinción diferencial de naranja de acridina / bromuro de etidio, ésta nos permitió identificar células apoptóticas en los tratamientos evaluados. La sola infección de los macrófagos, sin ningún tratamiento, provocó eventos de apoptosis temprana, apoptosis tardía,

## **ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

células no viables y la formación de grandes vacuolas. Con el tratamiento con el extracto de *B. caapi*, sólo se observó apoptosis tardía con deformación de la membrana celular y una disminución muy notable del número de células viables, con abundantes restos celulares. No pudieron identificarse eventos apoptóticos tempranos, probablemente debido a una concentración excesiva y/o incubación demasiado larga. De esta manera, para el momento de realizar las imágenes, ya las células habían sufrido muerte celular, y pocas estaban pasando en ese momento por el proceso. Esto podría evitarse con una incubación de 24h en lugar de una de 48h, o también ajustando las concentraciones del extracto a la  $CC_{50}$  a 48h en los macrófagos (26  $\mu$ M) que fue aproximadamente la mitad de la empleada (40  $\mu$ M).

En definitiva, el presente estudio ha mostrado la actividad inhibitoria del extracto de *B. caapi* en promastigotes de *Leishmania*, siendo la especie *L. mexicana* más sensible a este compuesto. El IS del extracto fue inferior a 1 en ambas especies de *Leishmania*, lo que sugiere un pobre potencial terapéutico. Sin embargo el cálculo del mismo no se realizó con amastigotes ( $CC_{50}$ macrófagos /  $IC_{50}$ amastigotes), sino empleando la  $IC_{50}$ promastigotes, que son estructuras celulares más resistentes al efecto de las  $\beta$  – carbolinas y, por tanto, muestran  $IC_{50}$  superiores. Por otro lado, el ensayo cometa determinó que el extracto afectó las células J774.A1 infectadas, a pesar de que los parámetros no fueron los considerados como buenos indicadores, por lo que se sugieren más estudios, con tiempos más cortos y concentraciones menores. Finalmente, la tinción diferencial de naranja de acridina / bromuro de etidio, como la microscopía convencional, demostró que el efecto del extracto sobre la viabilidad celular está mediado por la apoptosis.

## **5. CONCLUSIONES**

El extracto de *B. caapi* posee una notable actividad inhibitoria sobre el crecimiento de

## **ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

*Leishmania* spp. y macrófagos J774.A1, promoviendo la apoptosis y posiblemente el daño celular.

El potencial terapéutico del extracto es limitado debido a su potente efecto sobre las células hospedadoras de amastigotes de *Leishmania* spp. (bajos IS).

### **6. RECOMENDACIONES**

- Caracterizar completamente el extracto mediante cromatografía de gases cuantificando todos los alcaloides relevantes.
- Reevaluar la apoptosis y la fragmentación del ADN en tiempo más cortos y a concentraciones más bajas para no perder los eventos más tempranos.
- Realizar estudio *in vivo* en ratones, para demostrar el potencial terapéutico del extracto en condiciones más fisiológicas.
- Determinar el IS empleando la  $IC_{50}$  en amastigotes de *Leishmania* para obtener valores de IS más elevados (y confiables).
- Se recomienda realizar estudios para desentrañar los mecanismos moleculares subyacentes mediante estrategias que combinen transcriptómica y bioinformática.

### **7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Alonso, L., de Paula, J. C., Baréa, P., Sarragiotto, M. H., Ueda-Nakamura, T., Alonso, A., ... Nakamura, C. V. (2021). Membrane dynamics in *Leishmania amazonensis* and antileishmanial activities of  $\beta$ -carboline derivatives. *Biochimica et Biophysica Acta* -

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA IN VITRO DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

*Biomembranes*, 1863(1), 183473. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183473>

Alves, D. M., Val, L., Gomes, L., Oliveira, D. C., Brito, L. M., Mu, M., ... Arcanjo, R. (2017).

*In Vitro Effects of the Neolignan 2 , 3-Dihydrobenzofuran Against Leishmania Amazonensis*. 52–58. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12639>

Andrade, M. A., Azevedo, C. dos S., Motta, F. N., Santos, M. L. dos, Silva, C. L., Santana, J. M.

de, & Bastos, I. M. D. (2016). Essential oils: In vitro activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1401-9>

Arrivillaga-Henríquez, J., Enríquez, S., Romero, V., Echeverría, G., Pérez-Barrera, J., Poveda,

A., ... Benítez, W. (2017). Aspectos eco-epidemiológicos, detección natural e identificación molecular de *Leishmania* spp. en *Lutzomyia reburra*, *Lutzomyia barrettoii* mayuscula y *Lutzomyia trapidoi*. *Biomedica*, 37, 1–46. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3536>

Ashok, P., Chander, S., Smith, T. K., & Sankaranarayanan, M. (2018). Design, synthesis and

biological evaluation of piperaziny- $\beta$ -carboline derivatives as anti-leishmanial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 150, 559–566. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.022>

Ashok, P., Chander, S., Tejería, A., García-calvo, L., & Bala, R. (2016). *tetrahydro-1 H - b -*

*carboline derivatives against Leishmania infantum*. 123, 814–821. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.08.014>

Boutet-Robinet, E., Trouche, D., & Canitrot, Y. (2013). Neutral Comet Assay. *Bio-Protocol*, 3,

16–21. Retrieved from <http://www.bio-protocol.org/e915> Vol 3, Iss 18, Sep 20, 2013

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA IN VITRO DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

CDC, C. para el C. y prevención de E. (2020). Parasites - Leishmaniasis. Retrieved from <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>

Di Giorgio, C., Delmas, F., Ollivier, E., Elias, R., Balansard, G., & Timon-David, P. (2004). In vitro activity of the  $\beta$ -carboline alkaloids harmame, harmine, and harmaline toward parasites of the species *Leishmania infantum*. *Experimental Parasitology*, *106*(3–4), 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2004.04.002>

Duque, S., Corredor, A., Montilla, M., & Peláez, D. (1992). EVALUACION DEL EFECTO DEL ACIDO NALIDIXICO, AMPICILINA, KANAMICINA, PENICILINA G Y POLIMIXINA B EN LOS CULTIVOS DE PROMASTIGOTES DE LEISHMANIA. *Biomédica*, (2), 68–79.

Dutta, A., Bandyopadhyay, S., Mandal, C., & Chatterjee, M. (2005). *Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis*. *54*, 119–122. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.01.001>

Elmahallawy, E. K., Sampedro Martínez, A., Rodriguez-Granger, J., Hoyos-Mallecot, Y., Agil, A., Navarro Mari, J. M., & Gutierrez Fernández, J. (2014). Diagnosis of leishmaniasis. *Journal of Infection in Developing Countries*, *8*(8), 961–972. <https://doi.org/10.3855/jidc.4310>

Galluzzi, L., Ceccarelli, M., Diotallevi, A., Menotta, M., & Magnani, M. (2018). Real-time PCR applications for diagnosis of leishmaniasis. *Parasites and Vectors*, *11*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2859-8>

Ghorbani, M., & Farhoudi, R. (2018). Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy? *Drug Design, Development and Therapy*, *12*, 25–40. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S146521>

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA IN VITRO DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

- Hamill, J., Hallak, J., Dursun, S. M., & Baker, G. (2019). *Ayahuasca: Psychological and Physiologic Effects, Pharmacology and Potential Uses in Addiction and Mental Illness*. 108–128. <https://doi.org/10.2174/1570159X16666180125095902>
- Kato, H., Gomez, E. A., Martini-Robles, L., Muzzio, J., Velez, L., Calvopiña, M., ... Hashiguchi, Y. (2016). Geographic Distribution of *Leishmania* Species in Ecuador Based on the Cytochrome B Gene Sequence Analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(7), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004844>
- Kimani, N. M., Matasyoh, J. C., Kaiser, M., Brun, R., & Schmidt, T. J. (2017). Anti-trypanosomatid elemanolide sesquiterpene lactones from *Vernonia lasiopus* O. Hoffm. *Molecules*, 22(4), 3–11. <https://doi.org/10.3390/molecules22040597>
- Koutsoni, O., Karampetsou, K., & Dotsika, E. (2019). In vitro Screening of Antileishmanial Activity of Natural Product Compounds: Determination of IC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> and SI Values. *Bio-Protocol*, 9(21), 1–17. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.3410>
- Lala, S., Pramanick, S., Mukhopadhyay, S., Bandyopadhyay, S., & Basu, M. K. (2004). Harmine: Evaluation of its antileishmanial properties in various vesicular delivery systems. *Journal of Drug Targeting*, 12(3), 165–175. <https://doi.org/10.1080/10611860410001712696>
- Lu, Y., Liu, Y., & Yang, C. (2017). Evaluating in vitro DNA damage using comet assay. *Journal of Visualized Experiments*, 2017(128), 2–7. <https://doi.org/10.3791/56450>
- Luna-gonzalez, J., Martin-gonzalez, A., Brito-loeza, C., & Espinosa-romero, A. (2018). *Introducción a Técnicas de Segmentación de Células del Ensayo Cometa Introduction to Segmentation Techniques of Comet Assay Cells*. 22(3).

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA IN VITRO DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

- Makwali, J. A., Wanjala, F. M. E., Ingonga, J., & Anjili, C. O. (2015). In vitro studies on the antileishmanial activity of herbicides and plant extracts against leishmania major parasites. *Research Journal of Medicinal Plant*, 9(3), 90–104. <https://doi.org/10.3923/rjmp.2015.90.104>
- Mendes, E. A., Desoti, V. C., Silva, S. de O., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B. P., Yamada-Ogatta, S. F., ... Nakamura, C. V. (2016). C5 induces different cell death pathways in promastigotes of *Leishmania amazonensis*. *Chemico-Biological Interactions*, 256, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.06.018>
- Morillo Balcázar, A., & Torres Arias, M. (2020). Estandarización de los protocolos para determinar las características cariotípicas y daño al ADN en células de cáncer de tiroides mediante cariotipaje y ensayo cometa. Retrieved from <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/23152/1/T-ESPE-044091.pdf>
- Nacional, P., Plan, A., Luis, D. S., Casco, C., Tomas, D. S., México, C. P. C. De, ... México, E. De. (2017). *In vivo and in vitro antileishmanial effects of methanolic extract from bark of bursera aptera*. 14, 188–197. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i2.20>
- Nasr, I. Al. (2020). In Vitro Anti - Leishmanial Assessment of Some Medicinal Plants Collected from Al Qassim , Saudi Arabia. *Acta Parasitologica*, (0123456789), 1–8. <https://doi.org/10.2478/s11686-020-00205-2>
- OPS/OMS, O. P. de la S. (2019). Leishmaniasis Informe Epidemiológico de las Américas. *Informe Leishmaniasis*, 4, 3–7.
- OPS, O. P. de la S. (n.d.). Leishmaniasis cutánea y mucosa. Retrieved from [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=6417:2012-](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=6417:2012-)

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA IN VITRO DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

leishmaniasis-cutanea-mucosa&Itemid=39345&lang=es#:~:text=Los medicamentos más comúnmente utilizados,glucamina y estibogluconato de sodio.

Patrick, H., Brigido, C., Cristina, K., Albuquerque, O. De, Carvalho, J. M., Reis, J. F., ... Maria, F. (2019). *Geissospermum vellosii* — Presents Leishmanicidal Activity In Vitro. <https://doi.org/10.3390/molecules24040785>

Perez-Marvit, M. J., & Arisqueta, L. (2020). *Optimización del método de extracción de  $\beta$ -carbolinas a partir de *B. caapi* y caracterización del extracto para su posterior aplicación en modelos celulares con fines terapéuticos.*

Petricevich, V. L., Reynaud, E., Cruz, A. H., & Possani, L. D. (2008). Macrophage activation, phagocytosis and intracellular calcium oscillations induced by scorpion toxins from *Tityus serrulatus*. *Clinical and Experimental Immunology*, 154(3), 415–423. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03754.x>

Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J. C., Barrett, M. P., López-Vélez, R., García-Hernández, R., ... Papadopoulou, B. (2017). Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(12), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>

Rottini, M. M., Amaral, A. C. F., Ferreira, J. L. P., Oliveira, E. S. C., de Andrade Silva, J. R., Taniwaki, N. N., ... da Silva Calabrese, K. (2019). *Endlicheria bracteolata* (Meisn.) Essential Oil as a Weapon against *Leishmania amazonensis*: In vitro assay. *Molecules*, 24(14), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules24142525>

Santos, B. W. L., de Oliveira, R. C., Sonsin-Oliveira, J., Fagg, C. W., Barbosa, J. B. F., & Caldas, E. D. (2020). Biodiversity of  $\beta$ -carboline profile of *Banisteriopsis caapi* and

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA IN VITRO DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

- ayahuasca, a plant and a brew with neuropharmacological potential. *Plants*, 9(7), 1–14.  
<https://doi.org/10.3390/plants9070870>
- Speit, G., & Hartmann, A. (2006). The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 314, 275–286. <https://doi.org/10.1385/1-59259-973-7:275>
- Sunter, J., & Gull, K. (2017). Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biology*, 7(9).  
<https://doi.org/10.1098/rsob.170165>
- Taabazuing, C. Y., Okondo, M. C., & Bachovchin, D. A. (2017). Pyroptosis and Apoptosis Pathways Engage in Bidirectional Crosstalk in Monocytes and Macrophages. *Cell Chemical Biology*, 24(4), 507-514.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.03.009>
- Valdez, R. H., Tonin, L. T. D., Ueda-Nakamura, T., Filho, B. P. D., Morgado-Diaz, J. A., Sarragiotto, M. H., & Nakamura, C. V. (2009). Biological activity of 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxamides against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 110(1), 7–14.  
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.11.008>
- von Stebut, E. (2017). Leishmaniasis: Diagnostik und Therapie. *Hautarzt*, 68(7), 548–552.  
<https://doi.org/10.1007/s00105-017-4001-9>
- Wang, Y. H., Samoylenko, V., Tekwani, B. L., Khan, I. A., Miller, L. S., Chaurasiya, N. D., ... Muhammad, I. (2010). Composition, Standardization and Chemical Profiling of *Banisteriopsis caapi*, a Plant for the Treatment of Neurodegenerative Disorders Relevant to Parkinson's Disease. *Journal of Ethnopharmacology*, 23(1), 1–7.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.02.013> Composition

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA IN VITRO DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS)  
CONTRA *Leishmania* spp.**

**8. ÍNDICE DE FIGURAS**

**Figura 13.** Diseño de placa para ensayo MTT del extracto de *B. caapi* en promastigotes de *Leishmania* spp..... 15

**Figura 14.** Diseño de placa para ensayo MTT del extracto de *B. caapi* sobre macrófagos J774.A1 durante 24, 48 y 72 horas..... 17

**Figura 3.** Imagen del análisis de un macrófago J774.A1 usando el programa CaspLab para el ensayo cometa. .... 21

**Figura 15.** Curva de crecimiento de *Leishmania* spp. durante 5 días de cultivo. .... 24

**Figura 5.** Efecto del extracto de *B. caapi* sobre la viabilidad de *Leishmania* spp. .... 26

**Figura 6.** Actividad anti-leishmanial del extracto de *B. caapi*. .... 27

**Figura 16.** Viabilidad de macrófagos J774.A1 en función de la concentración del extracto de *B. caapi* a las 24, 48 y 72 horas de cultivo. .... 29

**Figura 8.** Viabilidad celular en macrófagos J774.A1 cultivados a concentraciones de 1.5 a 40  $\mu$ M del extracto de *B. caapi*, 72 horas. .... 31

**Figura 9.** Efecto del extracto de *B. caapi* en macrófagos J774.A1 cultivados en DMEM-10% FBS, 5% de CO<sub>2</sub>, 72 horas. .... 32

**Figura 17.** Parámetros analizados en el ensayo cometa en macrófagos J774.A1, sanos e infectados, incubado a 40  $\mu$ M de extracto por 48 horas..... 35

**Figura 11.** Fotografías del ensayo cometa de macrófagos J774.A1, 48 h de cultivo. .... 35

**Figura 12.** Macrófagos J774.A1 cultivados a confluencia en cubreobjetos con DMEM-10% FBS. .... 37

# ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.

## 9. ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Equipos.....	10
<b>Tabla 2.</b> Reactivos .....	11
<b>Tabla 3.</b> Medios de cultivo.....	12
<b>Tabla 4.</b> Soluciones .....	12
<b>Tabla 5.</b> Descripción de las muestras analizadas mediante el ensayo cometa.....	19
<b>Tabla 6.</b> Descripción de las muestras analizadas mediante tinción diferencial de AO / EB ..	22
<b>Tabla 7.</b> Valores de las IC <sub>50</sub> del extracto de <i>B. caaapi</i> en <i>L. infantum</i> y <i>L. mexicana</i> .....	27
<b>Tabla 8.</b> Viabilidad de los macrófagos J774.A1 (absorbancia) cultivados a concentraciones crecientes del extracto de <i>B. caapi</i> (25 a 290 $\mu$ M) después de 24, 48 y 72 horas. ....	28
<b>Tabla 9.</b> CC <sub>50</sub> del extracto de <i>B. caapi</i> en los macrófagos J774.A1. ....	30
<b>Tabla 10.</b> Viabilidad de macrófagos J774.A1 cultivados a concentraciones crecientes del extracto de <i>B. caapi</i> (1.5 a 40 $\mu$ M) tras de 72 horas.....	31
<b>Tabla 11.</b> CC <sub>50</sub> del extracto de <i>B. caapi</i> en macrófagos J774.A1 a 72 horas de cultivo. ....	31
<b>Tabla 12.</b> IS del extracto de <i>B. caapi</i> a las 72 horas de cultivo. ....	34

## 10. ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO A.</b> Tabla:. Número de promastigotes de <i>Leishmania</i> spp. por mL de cultivos <i>in vitro</i> durante 5 días de incubación.....	53
<b>ANEXO B.</b> Tabla: Efecto inhibitorio del extracto de <i>B. caapi</i> (harmina) sobre el crecimiento de promastigotes de <i>Leishmania</i> spp., cuadro resumen de DO (ensayo MTT).....	54
<b>ANEXO C.</b> Tabla: Inhibición del extracto de <i>B. caapi</i> (harmina) sobre <i>Leishmania</i> spp....	55
<b>ANEXO D. Tabla 1:</b> Viabilidad (%) de macrófagos J774.A1 cultivados en presencia de 25 a	

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS)  
CONTRA *Leishmania* spp.**

290 $\mu$ M del extracto de *B. caapi* (harmina) a las 24, 48 y 72 horas..... 56

**ANEXO D.** Tabla 2: Viabilidad (%) de macrófagos J774.A1 cultivados en presencia de 1.5 a 40 $\mu$ M del extracto de *B. caapi* (harmina) a las 24, 48 y 72 horas. .... 56

**ANEXO E.** Tabla: Resultados del ensayo cometa en macrófagos J774.A1 (infectados y no infectados), tratados con el extracto de *B. caapi*..... 57

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS)  
CONTRA *Leishmania* spp.**

**11. ANEXOS**

**ANEXO A**

**Tabla:** Número de promastigotes de *Leishmania* spp. por mL de cultivos *in vitro* durante 5 días de incubación.

<i>Leishmania infantum</i>				
Tiempo (horas)	Nro. promastigotes/mL			Media $\pm$ DS
	Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3	
0	5.05E+06	5.30E+06	5.68E+06	5.34E+06 $\pm$ 318997
23	8.10E+06	9.43E+06	9.20E+06	8.91E+06 $\pm$ 712065
46	1.37E+07	1.30E+07	1.16E+07	1.28E+07 $\pm$ 1033980
69	2.34E+07	1.88E+07	1.87E+07	2.03E+07 $\pm$ 2670362
96	2.29E+07	1.37E+07	1.62E+07	1.76E+07 $\pm$ 4778848
<i>Leishmania mexicana</i>				
Tiempo (horas)	Nro. promastigotes/mL			Media $\pm$ DS
	Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3	
0	4.48E+06	6.43E+06	5.30E+06	5.40E+06 $\pm$ 974905
22	1.26E+07	1.32E+07	1.29E+07	1.29E+07 $\pm$ 189189
46	2.37E+07	2.96 E+07	2.95 E+07	2.76E+07 $\pm$ 3358153
69	4.71 E+07	5.17 E+07	4.35 E+07	4.74E+07 $\pm$ 4090636
93	4.88E+07	5.49E+07	5.32E+07	5.23E+07 $\pm$ 3131752

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA IN VITRO DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS)  
CONTRA *Leishmania* spp.**

**ANEXO B**

**Tabla:** Efecto inhibitorio del extracto de *B. caapi* (harmina) sobre el crecimiento de promastigotes de *Leishmania* spp., cuadro resumen de DO (ensayo MTT).

<i>Leishmania infantum</i>						
	Ensayo 1		Ensayo 2		Ensayo 3	
	Media $\pm$ DS	<i>n</i>	Media $\pm$ DS	<i>n</i>	Media $\pm$ DS	<i>N</i>
Control Positivo	0.201 $\pm$ 0.019	3	0.260 $\pm$ 0.017	3	0.265 $\pm$ 0.007	3
Control Negativo	0.408 $\pm$ 0.017	5	0.387 $\pm$ 0.013	5	0.413 $\pm$ 0.013	5
<b>Harmina</b>						
356 $\mu$ M	0.009 $\pm$ 0.003	3	0.041 $\pm$ 0.004	3	0.044 $\pm$ 0.002	3
238 $\mu$ M	0.022 $\pm$ 0.002	3	0.049 $\pm$ 0.004	3	0.047 $\pm$ 0.005	3
181 $\mu$ M	0.045 $\pm$ 0.014	3	0.212 $\pm$ 0.013	3	0.210 $\pm$ 0.021	3
119 $\mu$ M	0.226 $\pm$ 0.047	2	0.330 $\pm$ 0.003	3	0.312 $\pm$ 0.005	3
95 $\mu$ M	0.274 $\pm$ 0.049	3	0.350 $\pm$ 0.006	3	0.357 $\pm$ 0.013	3
71 $\mu$ M	0.345 $\pm$ 0.014	3	0.378 $\pm$ 0.005	3	0.373 $\pm$ 0.011	3
48 $\mu$ M	0.380 $\pm$ 0.011	3	0.405 $\pm$ 0.009	3	0.409 $\pm$ 0.003	3
24 $\mu$ M	0.403 $\pm$ 0.019	3	0.421 $\pm$ 0.016	3	0.404 $\pm$ 0.007	3
<i>Leishmania mexicana</i>						
	Ensayo 1		Ensayo 2		Ensayo 3	
	Media $\pm$ DS	<i>n</i>	Media $\pm$ DS	<i>n</i>	Media $\pm$ DS	<i>n</i>
Control Negativo	0.827 $\pm$ 0.046	6	0.757 $\pm$ 0.040	6	0.808 $\pm$ 0.062	5
Control Positivo	0.081 $\pm$ 0.056	3	0.094 $\pm$ 0.078	3	0.593 $\pm$ 0.082	3
<b>Harmina</b>						
181 $\mu$ M	0.024 $\pm$ 0.001	3	0.021 $\pm$ 0.003	3	0.019 $\pm$ 0.002	3
119 $\mu$ M	0.037 $\pm$ 0.003	3	0.036 $\pm$ 0.000	3	0.046 $\pm$ 0.005	3
95 $\mu$ M	0.057 $\pm$ 0.003	3	0.058 $\pm$ 0.005	3	0.041 $\pm$ 0.008	3
71 $\mu$ M	0.155 $\pm$ 0.019	3	0.123 $\pm$ 0.035	3	0.123 $\pm$ 0.003	3
48 $\mu$ M	0.301 $\pm$ 0.061	3	0.202 $\pm$ 0.011	3	0.386 $\pm$ 0.030	3
38 $\mu$ M	0.537 $\pm$ 0.034	3	0.329 $\pm$ 0.080	3	0.615 $\pm$ 0.059	3
24 Mm	0.709 $\pm$ 0.026	3	0.708 $\pm$ 0.062	3	0.753 $\pm$ 0.086	3

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA *IN VITRO* DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS)  
CONTRA *Leishmania* spp.**

**ANEXO C**

*Tabla:* Inhibición del extracto de *B. caapi* (harmina) sobre *Leishmania* spp.

<b>Inhibición (%)</b>					
<i>L. infantum</i>			<i>L. mexicana</i>		
<b>Harmina (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Media <math>\pm</math> DS</b>	<b><i>n</i></b>	<b>Harmina (<math>\mu</math>M)</b>	<b>Media <math>\pm</math> DS</b>	<b><i>n</i></b>
356	92.2 $\pm$ 4	9	181	97.4 $\pm$ 0	9
238	90.2 $\pm$ 3	9	119	95.0 $\pm$ 1	9
181	61.3 $\pm$ 21	9	95	93.5 $\pm$ 1	9
119	26.2 $\pm$ 12	8	71	83.2 $\pm$ 3	9
95	18.8 $\pm$ 12	9	48	62.8 $\pm$ 11	9
71	9.3 $\pm$ 4	9	38	38.0 $\pm$ 17	9
48	1.2 $\pm$ 4	9	24	9.2 $\pm$ 7	9
24	0.0 $\pm$ 4	9	0	0.0 $\pm$ 7	17
0	0.0 $\pm$ 4	15			

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA IN VITRO DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS) CONTRA *Leishmania* spp.**

**ANEXO D**

**Tabla 1:** Viabilidad (%) de macrófagos J774.A1 cultivados en presencia de 25 a 290 $\mu$ M del extracto de *B. caapi* (*harmina*) a las 24, 48 y 72 horas.

<b>Macrófagos J774.A1</b>						
	<b>24 horas</b>		<b>48 horas</b>		<b>72 horas</b>	
	<b>Media <math>\pm</math> DS</b>	<b>n</b>	<b>Media <math>\pm</math> DS</b>	<b>n</b>	<b>Media <math>\pm</math> DS</b>	<b>n</b>
Células	100.5 $\pm$ 10.3	2	126.0 $\pm$ 8.0	2	98.1 $\pm$ 0.5	2
Control Positivo	0.0 $\pm$ 0.0	2	0.0 $\pm$ 0.0	2	0.0 $\pm$ 0.0	2
Control Negativo	100.0 $\pm$ 1.4	2	100.0 $\pm$ 0.7	2	100.0 $\pm$ 2.5	2
<b>Harmina</b>						
25 $\mu$ M	89.7 $\pm$ 4.7	4	58.1 $\pm$ 3.2	4	28.4 $\pm$ 4.7	4
40 $\mu$ M	55.3 $\pm$ 9.0	4	7.4 $\pm$ 1.8	4	0.0 $\pm$ 0.0	4
70 $\mu$ M	22.5 $\pm$ 6.6	4	0.0 $\pm$ 0.0	4	0.0 $\pm$ 0.0	4
90 $\mu$ M	20.8 $\pm$ 4.1	4	0.0 $\pm$ 0.0	4	0.0 $\pm$ 0.0	4
160 $\mu$ M	16.3 $\pm$ 1.3	4	0.0 $\pm$ 0.0	4	0.3 $\pm$ 0.4	4
290 $\mu$ M	11.1 $\pm$ 8.9	2	2.0 $\pm$ 0.7	4	1.0 $\pm$ 0.4	4

**Tabla 2:** Viabilidad (%) de macrófagos J774.A1 cultivados en presencia de 1.5 a 40 $\mu$ M del extracto de *B. caapi* (*harmina*) a las 24, 48 y 72 horas.

<b>Macrófagos J774.A1</b>						
	<b>24 horas</b>		<b>48 horas</b>		<b>72 horas</b>	
	<b>Media <math>\pm</math> DS</b>	<b>n</b>	<b>Media <math>\pm</math> DS</b>	<b>n</b>	<b>Media <math>\pm</math> DS</b>	<b>n</b>
Células	112.7 $\pm$ 0.5	2	121.6 $\pm$ 10.7	2	101.9 $\pm$ 3.6	2
Control positivo	0.0 $\pm$ 0.0	2	0.0 $\pm$ 0.0	2	0.0 $\pm$ 0.0	2
Control negativo	100.0 $\pm$ 3.7	2	100.0 $\pm$ 10.4	2	100.0 $\pm$ 0.2	2
<b>Harmina</b>						
1.5 $\mu$ M	87.3 $\pm$ 5.2	2	91.0 $\pm$ 7.4	4	102.5 $\pm$ 0.9	4
3.5 $\mu$ M	72.5 $\pm$ 1.6	4	63.2 $\pm$ 8.3	4	95.9 $\pm$ 2.1	4
6.5 $\mu$ M	80.9 $\pm$ 6.3	4	65.3 $\pm$ 11.6	4	75.7 $\pm$ 4.8	4
12.5 $\mu$ M	83.4 $\pm$ 1.3	4	69.1 $\pm$ 4.9	4	66.8 $\pm$ 2.5	4
25 $\mu$ M	82.4 $\pm$ 0.9	4	62.7 $\pm$ 3.6	4	24.7 $\pm$ 0.9	4
40 $\mu$ M	70.9 $\pm$ 6.6	4	18.7 $\pm$ 1.0	4	0.5 $\pm$ 0.9	4

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA IN VITRO DE *Banisteriopsis caapi* ( $\beta$ -CARBOLINAS)  
CONTRA *Leishmania* spp.**

**ANEXO E**

**Tabla:** Resultados del ensayo cometa de macrófagos J774.A1 (infectados y no infectados), tratados con el extracto de *B. caapi*.

<b>Ensayo Cometa (Media <math>\pm</math> SD)</b>				
<b>Parámetro</b>	<b>J774.A1</b>		<b>J774.A1 + <i>L. mexicana</i></b>	
	<b>Control <sup>a</sup></b>	<b>40 <math>\mu</math>M <math>\beta</math>-carbolinas<sup>b</sup></b>	<b>Control <sup>c</sup></b>	<b>40 <math>\mu</math>M <math>\beta</math>-carbolinas<sup>d</sup></b>
Longitud cabeza	138.7 $\pm$ 63.7	159.7 $\pm$ 46.3	173.5 $\pm$ 34.7	260.4 $\pm$ 63.6
Longitud cola	39.7 $\pm$ 27.5	55.4 $\pm$ 51.1	78.4 $\pm$ 71.0	92.6 $\pm$ 73.3
Longitud cometa	178.4 $\pm$ 79.0	215.1 $\pm$ 54.9	251.8 $\pm$ 97.5	353.0 $\pm$ 89.9
% ADN en cabeza	87.7 $\pm$ 8.9	84.1 $\pm$ 17.3	83.8 $\pm$ 13.2	83.9 $\pm$ 16.0
% ADN en cola	12.3 $\pm$ 8.9	16.0 $\pm$ 17.3	16.2 $\pm$ 13.2	16.1 $\pm$ 16.0
TM	6.6 $\pm$ 6.2	16.2 $\pm$ 25.8	20.7 $\pm$ 26.9	25.3 $\pm$ 39.7
OTM	7.4 $\pm$ 5.8	12.0 $\pm$ 14.4	18.8 $\pm$ 19.9	23.6 $\pm$ 27.2

<sup>a</sup>  $n = 20$ ; <sup>b</sup>  $n = 18$ ; <sup>c</sup>  $n = 22$ ; <sup>d</sup>  $n = 23$ .