



UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

“DETERMINACION DE MECANISMOS MOLECULARES RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA IN VITRO DE *Banisteriopsis caapi* (β -carbolicinas) CONTRA *Leishmania spp.*”

Realizado por:

BYRON ALEJANDRO BONIFAZ PERALTA

Director del Proyecto:

Dr. Lino Arisqueta Herranz, Ph.D.

Como requisito para la obtención del título de:

MÁSTER EN BIOMEDICINA

Quito, 10 de Abril de 2023

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, BYRON ALEJANDRO BONIFAZ PERALTA, con cédula de identidad 1723250492, 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.



Byron Alejandro Bonifaz Peralta

C.I. 1723250492

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

“DETERMINACION DE MECANISMOS MOLECULARES RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA IN VITRO DE *Banisteriopsis caapi* (β -carbolicinas) CONTRA *Leishmania spp.*”

Realizado por:

BYRON ALEJANDRO BONIFAZ PERALTA

como Requisito para la Obtención del Título de:

MÁSTER EN BIOMEDICINA

ha sido dirigido por el profesor

LINO ARISQUETA HERRANZ

quien considera que constituye un trabajo original de su autor



PhD. Lino Arisqueta Herranz

DIRECTOR

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los profesores informantes:

JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ

JUAN CARLOS NAVARRO CASTRO

Después de revisar el trabajo presentado,
lo han calificado como apto para su defensa oral ante
el tribunal examinador



PhD. José Rubén Ramírez

REVISOR



PhD. Juan Carlos Navarro

REVISOR

Quito, 05 de Abril de 2023

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento por su apoyo y aliento durante mi trayectoria académica en la maestría. Sin su constante respaldo, este logro no hubiera sido posible.

A mis Padres, les agradezco por inculcarme valores de perseverancia y dedicación en cada paso de mi vida. Su amor y apoyo incondicional me han dado la fuerza necesaria para enfrentar los desafíos y seguir adelante. Gracias por ser mi fuente de inspiración y motivación constante. A mis hermanos, les agradezco por ser mis amigos, confidentes y apoyo incondicional. Gracias por estar siempre ahí para escuchar mis preocupaciones y brindarme palabras de aliento cuando más lo necesitaba. A mi novia, quiero agradecerle por ser mi apoyo emocional, mi lugar seguro y mi mejor amiga. Gracias por motivarme a seguir adelante, por entender mis sacrificios y por estar siempre a mi lado en cada paso de esta aventura académica. A mis amigos, les agradezco por su amistad, compañía y apoyo durante mi camino en la maestría. Su compañía, su tiempo y su esfuerzo han sido invaluable en mi formación como estudiante y como persona. A Montebello Academy por el constante respaldo que ha sido fundamental para alcanzar mis objetivos planteados y culminar exitosamente mi proyecto académico.

En conjunto, su amor, amistad y apoyo han sido fundamentales en este proceso, gracias por creer en mí, por darme la oportunidad de perseguir mis sueños y por ser mi motivación constante. Les agradezco de corazón por ser parte de este logro.

El presente Trabajo de Fin de Carrera ha sido realizado dentro del Programa de Investigación de la Universidad Internacional SEK denominado:

BIODIVERSIDAD Y RECURSOS NATURALES APLICADOS A LA GESTIÓN AMBIENTAL Y LA BIOTECNOLOGÍA

Proyecto:

“Determinación De Mecanismos Moleculares Responsables De La Actividad Antiparasitaria In Vitro De *Banisteriopsis Caapi* (B-Carbolinas) Contra *Leishmania Spp*”

Pertenece a la Facultad de Ciencias de la Salud.

Artículo de tesis

DETERMINACION DE MECANISMOS MOLECULARES RESPONSABLES DE LA ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA IN VITRO DE *Banisteriopsis caapi* (β -carbolinas) CONTRA *Leishmania spp.*

Alejandro Bonifaz¹, Lino Arisqueta Herranz^{2*}

¹ Universidad Internacional SEK; byron.bonifaz@uisek.edu.ec

² Universidad Internacional SEK; lino.arisqueta@uisek.edu.ec

* Autor de Correspondencia: lino.arisqueta@uisek.edu.ec

Resumen:

La leishmaniasis es una enfermedad tropical causada por protozoos del género *Leishmania* y transmitida por vectores a humanos y animales. La enfermedad se presenta en tres formas clínicas: visceral, mucosa y cutánea. En Ecuador, la leishmaniasis cutánea es endémica con 1,084 casos reportados en 2019. A pesar de la existencia de vacunas, la quimioterapia es el tratamiento actual con efectos secundarios y resistencia a los parásitos. Por esta razón, la medicina tradicional está siendo cada vez más utilizada como una alternativa o complemento al tratamiento convencional. Existe un creciente interés en el uso de plantas medicinales y sus biomoléculas para el tratamiento de la leishmaniasis. La bebida sagrada de los pueblos indígenas de la Amazonia, conocida como ayahuasca, ha sido objeto de estudio debido a su capacidad psicoactiva que proviene de la mezcla de dos plantas: *Banisteriopsis caapi* y *Psychotria viridis*. Estudios recientes han descubierto que las β -carbolinas, biomolécula presente en extractos de *B. caapi*, poseen múltiples aplicaciones biológicas y farmacológicas, incluyendo actividad anti-leishmanial convirtiéndose así en una alternativa para el

tratamiento de la leishmaniasis. El estudio previo llevado a cabo por Criollo et al. (2021) demostró que el extracto de *B. caapi* disminuye la viabilidad celular en los macrófagos infectados con *L. mexicana*. El estudio sugiere que esta disminución se debe a la activación de la vía apoptótica. El propósito de esta investigación es examinar los mecanismos moleculares que se activan en cultivos de *Leishmania* que han sido tratados con extractos de *B. caapi*. Se analizó la expresión del gen EndoG produce una endonucleasa en la mitocondria que degrada el ADN al trasladarse al núcleo durante la apoptosis independiente de caspasas. Además, se investigó la expresión del gen GSK-3 que codifica una proteína esencial en procesos celulares como diferenciación, ciclo celular, y varias cascadas de señalización, algunas de las cuales conducen a la apoptosis. Nuestros resultados sugieren la activación de la apoptosis independiente de caspasas, vía activación de la expresión de EndoG, aunque no se descartan mecanismos adicionales participando sinérgicamente. En base a estos hallazgos, se podría proponer a *B. caapi* como una alternativa de bajo costo y efectiva para tratar a la población ecuatoriana afectada por la leishmaniasis.

Palabras clave: Leishmaniasis, *Banisteriopsis caapi*, Ecuador, medicina alternativa, ayahuasca, β -carbolinas, GSK-3, endonucleasa G, apoptosis, ciclo celular, qPCR.

Abstract:

Leishmaniasis is a tropical disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* and transmitted by vectors to humans and animals. The disease presents in three clinical forms: visceral, mucosal, and cutaneous. In Ecuador, cutaneous leishmaniasis is endemic with 1,084 cases reported in 2019. Despite the existence of vaccines, chemotherapy is the current treatment with side effects and resistance to parasites. For this reason, traditional medicine is increasingly being used as an alternative or complement to conventional treatment. There is a growing interest in the use of medicinal plants and their biomolecules for the treatment of leishmaniasis. The sacred drink of indigenous peoples of the Amazon, known as ayahuasca, has been studied due to its psychoactive capacity that comes from the mixture of two plants: *Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*. Recent studies have discovered that β -carbolines, a biomolecule present in *B. caapi* extracts, have multiple biological and pharmacological applications, including anti-leishmanial activity, thus becoming an alternative for the treatment of leishmaniasis. The previous study carried out by Criollo et al. (2021) showed that the *B. caapi* extract decreases cell viability in macrophages infected with *L. mexicana*. The study suggests that this decrease is due to the activation of the apoptotic pathway. The purpose of this research is to examine the molecular mechanisms activated in *Leishmania* cultures that have been treated with *B. caapi* extracts. The study analyzed the expression of the EndoG gene, which produces an endonuclease in the mitochondria that degrades DNA when it moves to the nucleus during caspase-independent apoptosis. In addition, the expression of the GSK-3 gene, which codes for an essential protein in cellular processes such as differentiation, the cell cycle, and several signaling cascades, some of which lead to apoptosis, was investigated. Our results suggest the activation of caspase-independent

apoptosis, through the activation of the EndoG expression, although additional mechanisms participating synergistically cannot be ruled out. Based on these findings, *B. caapi* could be proposed as a low-cost and effective alternative for treating the Ecuadorian population affected by leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis, *Banisteriopsis caapi*, Ecuador, alternative medicine, ayahuasca, β -carboline, GSK-3, endonuclease G, apoptosis, cell cycle, qPCR.

1. Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad catalogada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como parte del grupo de enfermedades tropicales desatendidas (OPS/OMS, 2022). Esta enfermedad es causada por protozoos del género *Leishmania* y es transmitida de manera vectorial hacia animales y personas. Existen tres formas clínicas de la leishmaniasis: visceral, mucosa y cutánea. En el Informe Epidemiológico de las Américas del 2022 la OMS notificó que en 17 países de la región se han reportado 1.505.545 casos de leishmaniasis cutánea y mucosa en los últimos 20 años (OPS/OMS, 2022). En Ecuador, en 2019, se reportaron 1.237 casos de leishmaniasis de los cuales la mayor cantidad fueron atribuidos a leishmaniasis cutánea por lo que se ha considerado esta enfermedad como endémica dentro de del territorio (OPS/OMS, 2019).

La leishmaniasis ha sido relacionada a factores climáticos, ambientales y sociales tales como la pobreza, entre otros, por lo que es considerada un problema de salud pública. A pesar de la existencia de vacunas contra la leishmaniasis, ésta no ha demostrado ser una herramienta eficaz para controlar la enfermedad ni para la prevención de la misma (OPS/OMS, 2022). En la actualidad esta enfermedad es tratada con intervenciones quimioterapéuticas como antimonio de meglumina o anfotericina B. Sin embargo, existen varios problemas asociados a los medicamentos como la presentación de efectos secundarios, elevados costos y el desarrollo de resistencia en los

parásitos (Demarchi et al., 2015). Como una respuesta a los problemas mencionados, existe un incremento en el número de pacientes que recurren a la medicina tradicional ya sea como una alternativa o como un complemento a sus tratamientos recurrentes debido a su fácil acceso, reducido número de efectos secundarios y su bajo costo (OMS, 2013).

En Latinoamérica la medicina tradicional es extensamente practicada por pueblos indígenas donde personas como shamanes o curanderos, y limpiadores, son los encargados de usar y transmitir saberes ancestrales basados en plantas con beneficios medicinales los cuales han sido posteriormente trasladados a la medicina basada en evidencia que se practica en los países más desarrollados. La OMS ha reportado que más del 70% de la población chilena y el 30% de la colombiana ha recurrido al uso de medicina tradicional, mostrando así su importancia sobre la medicina occidental en países en vía de desarrollo (Bussmann et al., 2010; Chen et al., 2020; de Melo et al., 2011; George et al., 2010; Umthong et al., 2011). Los conocimientos ancestrales de plantas se han usado para tratar males de origen sobrenatural conocidos como “mal de ojo”, “mal aire”, “susto” o “espanto” y “mal prójimo”. Sin embargo, las razones biológicas y fisiológicas detrás de los beneficios de las plantas para tratar estos males aún son desconocidas en muchos casos (Bussmann & Sharon, 2006; Cavender & Albán, 2009).

Ecuador se caracteriza por ser uno de los puntos de mayor biodiversidad en el mundo y por lo tanto uno de los lugares con mayor potencial para desarrollar la medicina tradicional. La región amazónica ecuatoriana es una zona en la que habitan una gran variedad de pueblos indígenas donde, a través de estudios etnobotánicos, se ha investigado el uso de plantas y sus efectos estimulantes, contraceptivos, antimicóticos, tóxicos, y alucinógenos entre otros (Intriago et al., 2015; Maria Lalama Aguirre et al., 2016; Tene et al., 2007). En este contexto, se ha demostrado que varios grupos de metabolitos como alcaloides, chalconas, triterpenoides, naftoquinonas, quinonas, terpenos, esteroides, lignanos, saponinas y flavonoides, los cuales se encuentran en una gran variedad de plantas medicinales, presentan actividad anti-leishmanial en ensayos *in vivo* e *in vitro*

tanto en la forma celular de promastigote como de amastigote (Oryan, 2015). Sin embargo, los mecanismos moleculares detrás de estas actividades antiparasitaria aun necesitan ser elucidados en muchos de los casos.

La ayahuasca es una bebida psicoactiva utilizada por los pueblos indígenas de la Amazonía, obtenida a partir de la combinación de dos plantas: *Banisteriopsis caapi* y *Psychotria viridis* (Davidov, 2010; Frecska et al., 2016). La *P. viridis* contiene N,N-dimetiltriptamina (DMT), un alcaloide psicodélico que no puede producir su efecto psicotrópico al ser ingerido por vía oral ya que es rápidamente degradado por monoaminoxidasas (MAOs) que se expresan en intestino y hígado. Sin embargo, la *B. caapi* contiene β -carbolinas, inhibidores de MAO, que permiten al DMT llegar al sistema nervioso central. La sinergia entre las β -carbolinas y el DMT en la ayahuasca produce un efecto psicotrópico potente. Varios estudios han analizado los efectos de la ayahuasca en el cuerpo humano y se ha demostrado que puede tener beneficios terapéuticos para tratar ciertas condiciones médicas y psicológicas (Brito-da-costa et al., 2020; Kaasik et al., 2021; Palhano-Fontes et al., 2019).

Por ejemplo, diversas investigaciones han enfocado sus estudios en los efectos de las β -carbolinas en el sistema nervioso central mostrando una afinidad por receptores de benzodiazepina, 5-hidroxitriptamina, dopamina y serotonina. Sin embargo, estudios recientes han descubierto que tanto los derivados naturales como los sintéticos de las β -carbolinas, al tener una estructura de anillo tricíclico (9H – pirido[3,4-b]indol), poseen actividad anti-inflamatoria, anti-depresiva, anti-VIH, anti-bacterial, anti-tripanosoma, anti-tumoral y anti-leishmania (Cao et al., 2008; Panice et al., 2019; Shankaraiah et al., 2014; Venkataramana Reddy et al., 2018; Zhou et al., 2016). Las β -carbolinas poseen una cadena lateral de alquilamina en la posición 3 de su estructura de anillo que le permite intercalarse en el ADN, causando alteraciones en la replicación celular y la reparación de ADN, que podría explicar sus efectos citotóxicos (Cao et al., 2007, 2008).

Las especies de *Leishmania* son transmitidas a los mamíferos a través de la mordida del vector conocido como la mosca de arena. Al momento que la mosca se alimenta de la sangre del mamífero, la forma promastigote de la *Leishmania* entra en el organismo del mamífero e infectan a los macrófagos donde adquieren su forma no flagelada de amastigote y se multiplican. Estos parásitos protozoarios tripanosomátidos poseen un complejo control sobre su ciclo celular y su proceso de diferenciación ya que, al tener insectos y mamíferos como hospedadores, las *Leishmanias* requieren adaptaciones únicas en su biología celular (Raina & Kaur, 2012; Xingi et al., 2009a). Por lo tanto, el estudio de la transición entre el ciclo celular en mamíferos e insectos de *Leishmania* podría contribuir a la identificación de moléculas y mecanismos esenciales que regulan el ciclo celular y puedan ser usados como objetivos de futuros tratamientos contra la leishmaniasis (Xingi et al., 2009a).

Criollo et al. (2021) previamente demostraron que el extracto de *B. caapi* tiene un notable efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los promastigotes de *L. infantum* y *L. mexicana*, así como sobre la línea celular murina de macrófagos J774.A1 infectada con amastigotes. Los estudios de microscopía fluorescente indicaron que la activación de la apoptosis es, al menos en parte, responsable de la disminución en la viabilidad celular observada en los macrófagos infectados con *L. mexicana* y tratados con el extracto de *B. caapi* (Criollo et al., 2021). Existen genes relacionados a la regulación del ciclo celular y la apoptosis como la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3s) y la endonucleasa G respectivamente que se han identificado como posibles objetivos para el estudio y desarrollo de terapias contra la leishmaniasis (Xingi et al., 2009a; Yang et al., 2006). El gen glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK-3) es responsable de regular la producción de glucógeno, así como la permeabilidad de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo c, lo que puede inducir la apoptosis intrínseca (Lin et al., 2020). Se ha demostrado que la inhibición de la actividad de GSK-3 puede detener el ciclo celular en la fase G1 (Efstathiou & Smirlis, 2021). Por ende en *Leishmania* spp, GSK-3 tiene un papel importante en la respuesta al estrés, la capacidad del

parasito para infectar los macrófagos del hospedador y la supervivencia dentro del mismo (Martínez de Iturrate et al., 2020). Por otro lado, la endonucleasa G, también codificada por el gen *EndoG*, es una proteína que juega un papel importante en procesos celulares como la apoptosis independiente de caspasas a través de la ruptura de secuencias de ADN alrededor de las posiciones de guanina (Azami et al., 2018). Este estudio pretende analizar los mecanismos moleculares activados en cultivos de *Leishmania* tratadas con extractos de *B. caapi*. Esto nos permitirá correlacionar la actividad citotóxica de las β -carbolinas en *Leishmania* con la activación de procesos de muerte celular así como con la desregulación del control del ciclo celular brindando evidencia a nivel molecular sobre el potencial anti-leishmanial de las β -carbolinas y proponer a *B. caapi* como una alternativa efectiva, de bajo costo y de calidad para la población ecuatoriana.

HIPÓTESIS

Los efectos leishmanicidas de las β -carbolinas en el extracto de *B. caapi* provocan la desregulación del ciclo celular y activan la apoptosis en el parasito.

OBJETIVO GENERAL

Analizar los mecanismos moleculares responsables de los efectos leishmanicidas de las β -carbolinas de *B. caapi* sobre promastigotes de *Leishmania mexicana*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Operativos

1. Optimizar el protocolo de extracción de ARN de cultivos de promastigotes de *L. mexicana*
2. Evaluar la utilidad del gen 18S como normalizador de la expresión genética tras el tratamiento con el extracto de *B. caapi*.

Científicos

3. Analizar la implicación del proceso apoptótico en los efectos leishmanicidas observados tras el tratamiento con el extracto de *B. caapi*, mediante el análisis de la expresión de genes implicados en el mismo
4. Analizar los efectos del extracto de *B. caapi* sobre la regulación del ciclo celular de *L. mexicana*, mediante el análisis de la expresión de genes implicados en la misma.

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 (**Tablas S1, S2, S3, S4 y S5 del Anexo I**).

2.2. MÉTODOS

2.2.1. El extracto y la planta

La empresa colaboradora BIOX proporcionó la materia vegetal utilizada en este estudio. Los estudiantes de la Universidad Internacional SEK obtuvieron y caracterizaron el extracto objeto de estudio, siguiendo los procedimientos descritos por Perez-Marvit & Arisqueta (2020). En resumen, se llevó a cabo un proceso que incluyó la maceración de tallos secos y triturados de *B. caapi* en metanol, seguido de una acidificación y basificación con filtrados, extracción líquido - líquido con

cloroformo y concentración con un rotavapor. El extracto se almacenó a -80 °C hasta su uso, en un volumen de metanol adecuado. La cuantificación de harmina se realizó mediante HPLC de fase reversa, siguiendo los métodos descritos por Wang et al. (2010) y utilizando una curva patrón de harmina comercial. La concentración de este alcaloide resultó ser de 47.5 mM en nuestro extracto.

2.2.2. Cultivo de *Leishmania mexicana*

El Centro Internacional de Zoonosis (CIZ) de la Universidad Central del Ecuador donó los promastigotes de *L. mexicana*. Estos promastigotes fueron cultivados en frascos de 25 cm² con 5 mL de medio Schneider's Drosophila complementado con suero fetal bovino (FBS) inactivado al 10% y 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina. El cultivo fue incubado a una temperatura de 26°C. Cada 3 o 4 días, los promastigotes fueron transferidos a medio fresco, empleando 500 µL de cultivo (que conteía aproximadamente 4.0 x 10⁶ parásitos/mL) como inóculo.

2.2.3. Conteo de promastigotes de *L. mexicana*

La cantidad de promastigotes de *L. mexicana* por mililitro se midió con una cámara Neubauer en un microscopio óptico. Se tomaron muestras de 10 µL de *L. mexicana* en una solución diluida 1/100 con PBS 1x y se fijaron con formalina al 1% antes de ser contadas. El número de promastigotes se determinó aplicando la siguiente fórmula:

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

Para analizar la viabilidad de los parásitos, se empleó el método de exclusión de azul de tripán, empleando una tinción compuesta de 25 µL de azul de tripán y 75 µL de la solución anteriormente mencionada. La viabilidad de los parásitos se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de células viables} = \frac{\# \text{ total de células viables}}{\# \text{ total de células}} * 100$$

2.2.4. Tratamiento IC₅₀

Para el tratamiento de los parásitos, se requería que éstos estuvieran en fase estacionaria, es decir, después del cuarto día. La concentración de extracto empleada para el tratamiento de *L. mexicana* corresponde a la IC₅₀ calculada por Criollo et al. (2021), es decir, 47,5 µM. Ya que el extracto estaba disuelto en metanol, los tubos correspondientes a los controles (n = 4) contenían 2% de metanol, la misma que los tubos destinados al tratamiento (n = 4).

El tratamiento se realizó en tubos Eppendorf de 1,5 mL. Por cada tubo se cultivaron 2x10⁶ células en un volumen final de 1 mL de medio Schneider's *Drosophila* fresco suplementado con FBS al 10%, 1 µg/µL de penicilina/anfotericina, y conteniendo 2% metanol (controles) o la concentración IC₅₀ de extracto más arriba descrita (47,5 µM) con el mismo % de metanol (tratados).

2.2.5. Extracción de ARN y análisis de integridad

Las muestras de ARN se extrajeron de promastigotes usando PureLink® RNA Mini Kit (Invitrogen) empleando una solución de buffer de lisis a base de DTT (2 M) según las instrucciones del fabricante. Además, se utilizó el kit DNA-free™ para eliminar ADN contaminante. La integridad del ARN se determinó utilizando electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio.

2.2.6. Cuantificación de ARN

La concentración de ARN se determinó usando el kit Qubit™ RNA High Sensitivity (HS) según las instrucciones del fabricante.

2.2.7. Síntesis de ADNc

Se comprobó que el ARN extraído del cultivo de *Leishmania* tenía una óptima calidad y se procedió a la síntesis de ADN complementario. Se definió el protocolo de preparación de las reacciones de retrotranscripción, el cual consistía en añadir 4 µL de 5x iScript mix, 1 µL de iScript

Transcriptasa Reversa, 100 fg a 1 µg de ARN molde, y un volumen variable de agua libre de nucleasas para completar la reacción. Se prepararon las 8 reacciones de retrotranscripción en base a este protocolo. Una vez que las reacciones de retrotranscripción estuvieron listas, se aseguró que todos los componentes de la reacción se encontraran en la parte inferior del tubo eppendorf realizando una centrifugación corta de unos pocos segundos en la microcentrífuga a temperatura ambiente. Luego, se colocaron los tubos eppendorf dentro del termociclador y se registró en el equipo un programa de ciclos que constaba de 5 minutos de Priming a 25°C, 20 minutos de transcripción reversa a 46°C, 1 minuto de inactivación de la transcriptasa a 95°C y 4°C por tiempo indefinido. Una vez que concluyó la retrotranscripción, se retiraron los tubos del termociclador y se almacenaron en la congeladora a una temperatura de -20°C.

2.2.8. PCR cuantitativa (RT-PCR)

En este experimento, se realizó la PCR de un grupo de 3 genes, incluyendo GSK-3, endonucleasa G y 18S, en una placa de 96 pocillos usando el equipo CFX96™ Real time system (BioRad). Los *primers* empleados se indican en la tabla 6.

Tabla 6. Primers.

Primer	Anotación	Primers (5' - 3')
EndoG	Endonucleasa G	F- 5' GCAACCGCAGCAACTTCTAC 3' R- 5' TCACCTCCTTGCTCAGCTTG 3'
HKG1*	ARNr 18S ¹	F- 5' GGGAAACCCCGGAATCACAT 3' R- 5' GGTGAACTTTCGGGCGGATA 3'
GSK-3s	Glucógeno Sintasa Kinasa ²	F- 5' ACCGCCATGACATGTCGCTCAACGCTGC 3' R- 5' CCCCTCGAGCTGCTTGCGAACTAGCTT 3'

*Gen normalizador. F forward. R reverse. *Primers* obtenidos de fuentes bibliográficas: ¹ PMID - 28708893. ² PMID - 19445946

Para realizar las rectas patrón se generó un pool de todos los ADNc, del que luego se harían diluciones seriadas. Se preparó una dilución 1:5 de ADNc agregando 4 µL de ADNc de cada control (n=3), 4 µL de ADNc de cada tratamiento (n=3) y 96 µL de agua MiliQ para obtener un volumen final de 120 µL. Para la recta patrón del gen 18S, se prepararon diluciones seriadas 1:500, 1:5000, 1:50000 y 1:500000. Para GSK-3 y para EndoG se prepararon diluciones seriadas 1:5, 1:10, 1:100 y 1:1000. Las muestras problema para los genes GSK-3 y endonucleasa G (control n=3; tratamiento n=3) se prepararon usando una dilución 1:10 empleando 10 µL de ADNc y 90 µL de agua MiliQ. Para el análisis de la expresión de 18S, a partir de la dilución 1:10 de las muestras problema de los genes GSK-3 y endonucleasa G, se realizó una dilución 1:500 con 10 µL de la dilución 1:10 mencionada y 490 µL de agua MiliQ.

Finalmente, se preparó cada reacción de 20 μL por triplicado agregando 14 μL de una solución stock que contenía 10 μL de iTaq Universal SYBR® Green Supermix, 2 μL de primer forward, 2 μL de primer reverse y 6 μL de ADNc en la dilución apropiada (estándar o muestra problema).

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: las muestras se mantuvieron a una temperatura de 50 °C durante 2 minutos, seguido de una temperatura de 95 °C durante 10 minutos. Después, se realizaron 40 ciclos de RT-qPCR, en cada uno de los cuales las muestras se mantuvieron a una temperatura de 95 °C durante 15 segundos para separar las hebras de ADN, y luego se mantuvieron a una temperatura de 60 °C durante 1 minuto.

Los *ng* fueron diseñados utilizando los parámetros estándar del software bioinformático Primer3Plus, así como la búsqueda de conjuntos previamente diseñados en la literatura científica. Los oligonucleótidos mencionados en la tabla 6 fueron sintetizados por la empresa MacroGen.

2.2.9. Análisis Estadístico

Los valores de expresión genética se muestran como la media del porcentaje de expresión de los promastigotes tratados respecto de la media de los controles \pm el error estándar. Para el análisis de la significancia de las diferencias entre dos grupos se empleó el test t de student de dos colas empleando el programa informático GraphPad Prism 9.5.1. Se consideraron significativas aquellas diferencias estadísticas entre grupos que presentaron valores de $P < 0.05$.

3. Resultados

3.1. Análisis de calidad y cuantificación de ARN

A pesar de que el método de TRIzol ofrece concentraciones de ARN un poco superiores al buffer de lisis proporcionado por el fabricante del kit de extracción de ARN (Invitrogen), el TRIzol se había agotado, por lo que se empleó el buffer de lisis del kit suplementado con DTT.

La **tabla 7** muestra la concentración de ARN extraído de los grupos control y tratamiento de *L. mexicana*. Tal como se puede observar, la concentración de los grupos control se ubica entre los 0.08 y 0.12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Por otro lado, la concentración de los grupos tratamiento oscila entre los 0.9 a 0.12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Tabla 7. Concentración de ARN extraído de *L. mexicana*

Muestras	Concentración de ARN
Control 1	0.088
Control 2	0.092
Control 3	0.114
Control 4	0.102
Tratamiento 1	0.1
Tratamiento 2	0.108
Tratamiento 3	0.098
Tratamiento 4	0.091

Antes de proceder con la retrotranscripción para obtener el ADNc, hubo que comprobar la integridad y pureza del ARN extraído mediante electroforesis en gel de agarosa. Tal y como muestra

la **figura 1** se observa bastante contaminación de ADN genómico (recuadro blanco), por lo que hubo que emplear un kit adicional para la purificación del ARN y eliminación del ADN genómico.

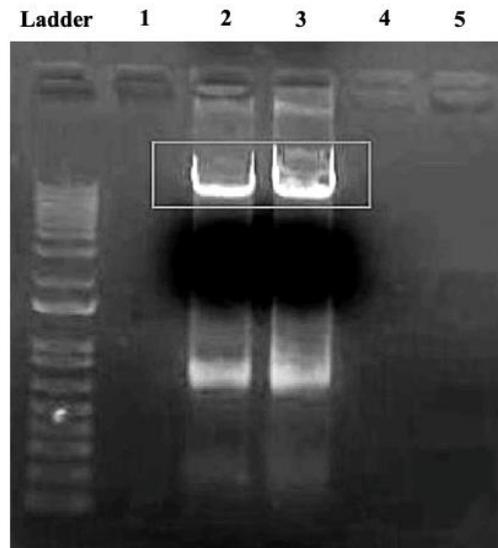


Figura 1. Análisis de la integridad y pureza del ARN extraído de promastigotes de *Leishmania*. El recuadro blanco indica la presencia de contaminantes de ADN genómico.

La **figura 2** muestra como el paso de purificación eliminó el ADN genómico manteniendo una buena integridad del ARN. Esto se evidenció mediante la presencia de bandas de alta definición correspondientes a los ARNr 28S y 18S. Además, no se detectaron bandas adicionales que pudieran corresponder a contaminantes presentes en la muestra, ni se vio un degradado que indicara ARN en mal estado.

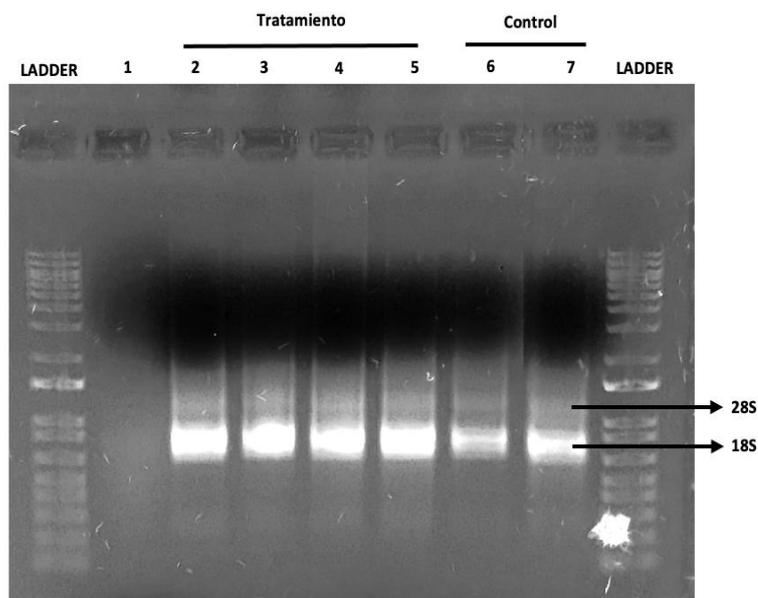


Figura 2. Resultado de la electroforesis en gel de agarosa del ARN extraído de *L. mexicana*. Las muestras 2, 3, 4 y 5 corresponden al ARN extraído de *L. mexicana* tratada con extracto *B. caapi* y 2% de metanol por 24 horas. Las muestras 6 y 7 corresponden a los ARN control extraídos de *L. mexicana* expuestos a medio suplementado y 2% de metanol. Se observaron las bandas de ARN ribosomal 28S y 18S claramente en todas las muestras, indicando una alta integridad del ARN. Se utilizó el marcador de

3.2. Análisis de expresión genética.

Antes de llevar a cabo los ensayos de genes funcionales, se realizó una evaluación de las curvas de *melting* para analizar la dinámica de disociación de los productos obtenidos en la qPCR para los genes 18S ARNr, EndoG y GSK-3. El análisis de las curvas de *melting* permitió identificar cualquier posible replicación de fragmentos inespecíficos, lo que podría interferir con la amplificación y medición precisa de los genes de interés. Los gráficos resultantes se obtuvieron mediante el software Bio-Rad CFX Manager 2.2. En la **figura 3 a, b y c** se puede observar la formación de un solo pico lo cual indica que los *primers* fueron específicos para 18S y EndoG y GSK-3. Sin embargo, la formación de un pico de menor definición muestra que el gen GSK-3s estaba muy poco expresado (**Fig. 3c**). De hecho, en muchos de los pocillos nunca se alcanzó el umbral mínimo de fluorescencia (**Fig. 5c**).

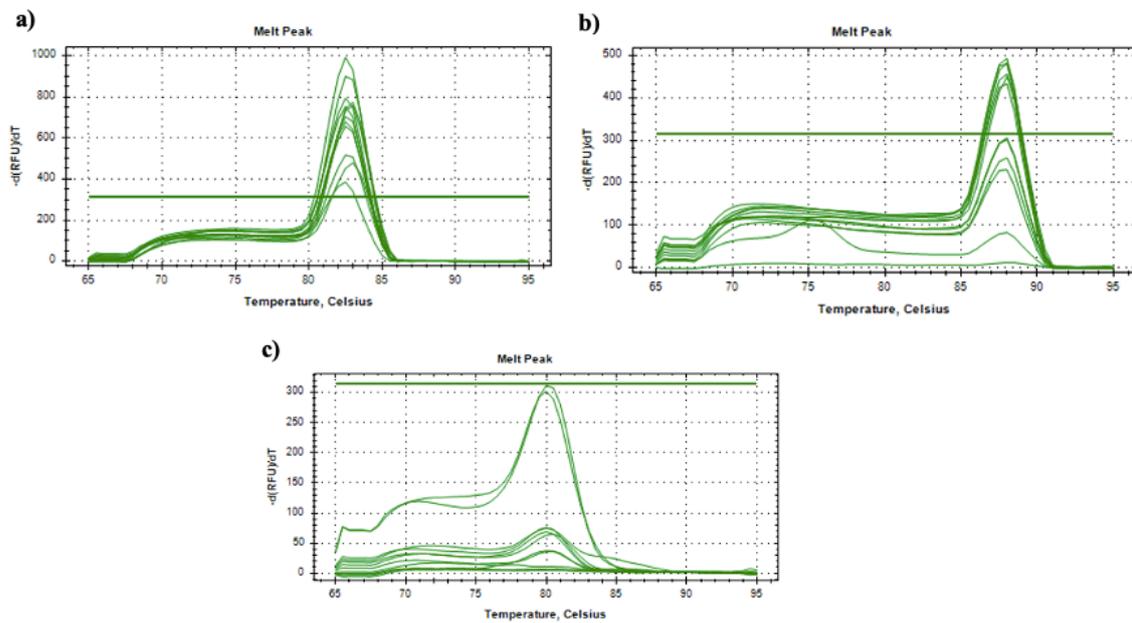


Figura 3: (a) Curva de *melting* para el gen 18S ARNr; (b) Curva de *melting* para el gen EndoG; (c) Curva de *melting* para el gen GSK-3s

Las curvas de amplificación se emplearon para visualizar el número de ciclos necesarios para alcanzar un umbral específico en la RT-PCR. Los resultados muestran que el gen 18S requiere de un rango de 25 a 35 ciclos siendo estos el número adecuado de ciclos (**Fig. 4a**), mientras que el gen EndoG necesitó de más ciclos de amplificación (**Fig. 4b**). En el caso de GSK-3, como se comentó más arriba, hay pocillos en los que ni siquiera se alcanza el umbral de fluorescencia, no pudiendo obtenerse datos de expresión para esas muestras (**Fig. 4c**).

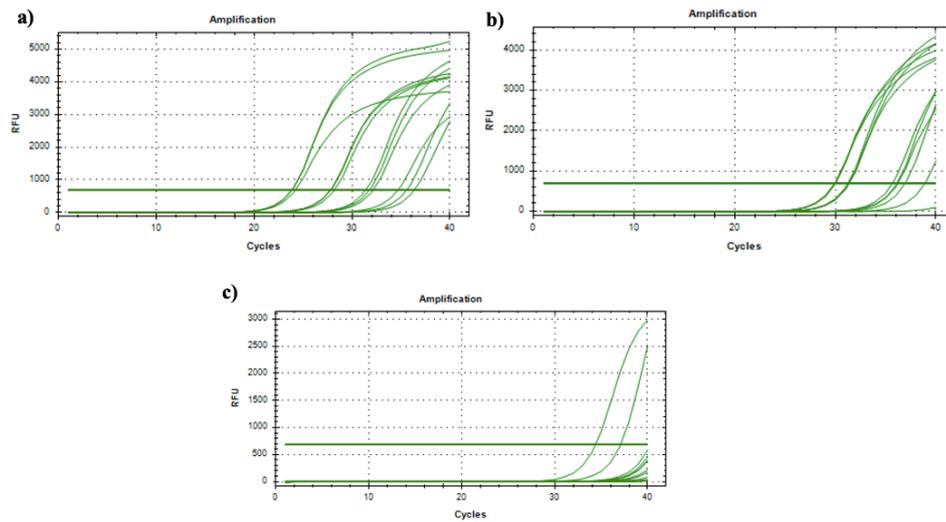


Figura 4: (a) Curva de amplificación para el gen 18S ARNr; (b) Curva de amplificación para el gen EndoG ; (c) Curva de amplificación para el gen GSK-3

Para evaluar la eficiencia de la amplificación, representaron los valores de Ct promedio frente el logaritmo de las concentraciones iniciales de ADNc. Los resultados obtenidos se utilizaron para construir la recta estándar mediante un diagrama de regresión lineal, tal como se describe en la **figura 5**. Debido a la baja expresión de GSK-3, solo se pudieron construir para los genes 18S ARNr y EndoG y, por consiguiente, solo se pudo analizar la expresión de estos dos genes.

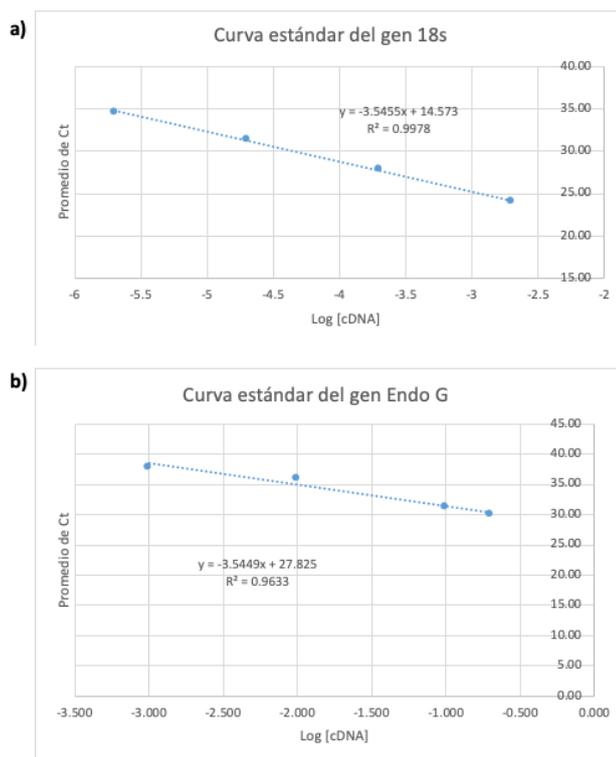


Figura 5: a) Curva estándar del gen 18S ARNr representada mediante una regresión lineal; b) Curva estándar del gen EndoG representada mediante una regresión lineal

Utilizando la ecuación de la recta, se logró determinar la eficiencia de amplificación para los genes 18S ARNr y EndoG, considerando tanto la pendiente (m) como el coeficiente de correlación (R^2), los cuales están específicamente detallados en la **tabla 8**. Como se puede observar, la pendiente se encuentra muy cercana al valor ideal de -3,3 por lo que se puede considerar a la reacción como suficientemente eficiente.

Tabla 8: Datos del valor de la pendiente, coeficiente de correlación y porcentaje de eficiencia de reaccion.

Gen	Pendiente	R ²	% Eficiencia
18S ARNr	-3,546	0,9978	91,43%
EndoG	-3,545	0,9633	91,46%

3.3. Efecto del tratamiento con el extracto de *B. caapi* sobre la expresión genética de 18S y EndoG

El gen 18S se seleccionó como normalizador para la expresión de los demás. Antes de evaluar su factibilidad como normalizador, hubo que demostrar que su expresión no variaba de manera significativa con el tratamiento con el extracto de *B. caapi*. Como se muestra en la **figura 6a**, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de 18S entre promastigotes controles y tratados, por lo que este gen se empleó como normalizador de la expresión de EndoG.

El tratamiento con el extracto provocó un aumento de la expresión de EndoG en los promastigotes de *L. mexicana* de hasta cuatro veces la de los controles, sugiriendo la activación de esta vía apoptótica independiente de caspasas. Aunque la variación en el nivel de expresión fue grande, el efecto no llegó por poco a la significancia estadística. Se requieren análisis adicionales para confirmar esto.

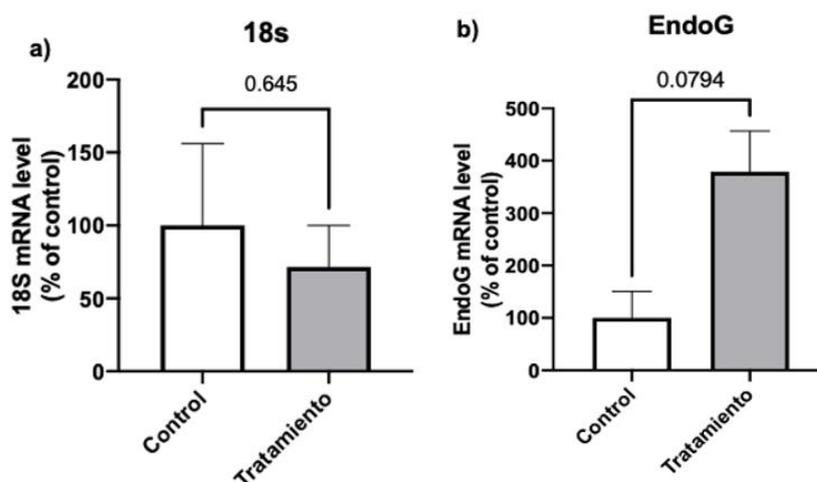


Figura 6: a) Nivel de expresión del gen 18S del grupo control en comparación con el tratamiento; b) Nivel de expresión normalizada del gen EndoG del grupo control en comparación con el tratamiento.

4. Discusión

La planta *B. caapi*, originaria de la Amazonia, contiene una alta concentración de β -carbolinas. Varias investigaciones han demostrado que estos componentes poseen efectos anti-leishmania (Cao et al., 2007; Sen & Chatterjee, 2011), lo que sugiere que puede ser una opción prometedora para tratar esta enfermedad. En un estudio previo, Criollo et al. (2021) demostraron que la exposición de *L. mexicana* y *L. infatum* a extractos de *B. caapi* ocasionó daño en el ADN y la activación de la vía apoptótica y consiguiente muerte de los parásitos.

El proceso de apoptosis en *Leishmania* ha sido objeto de numerosos estudios y se ha determinado que puede ser activado por diferentes factores que causan la muerte celular, como la ausencia de medio adecuado, la presencia de estrés oxidativo, el daño al ADN, la exposición a choques térmicos o el tratamiento con fármacos, entre otros (Rico et al., 2009). Existen genes tales como los de la familia de los Bcl-2 y las caspasas que se activan durante la apoptosis en organismos eucariotas, sin embargo, varios análisis del genoma de *Leishmania* no han encontrado genes similares (Gannavaram et al., 2008; Rico et al., 2009). Durante la ejecución de los procesos de muerte celular programada, se desencadenan mecanismos que impactan en la estructura de las células, no obstante, diversos estudios han señalado que la rápida descomposición del ADN del núcleo celular es uno de los mecanismos más frecuentes (Kaczanowski et al., 2011). En ese sentido, el gen EndoG codifica una nucleasa $\beta\beta\alpha$ - *Me - finger* no específica de ADN/ARN. Esta se localiza en la mitocondria y degrada la cromatina cuando migra al núcleo durante la apoptosis.

En el presente trabajo, el tratamiento con el extracto rico en β -carbolinas de *B. caapi* provocó un aumento de casi el 400% en el ARNm de EndoG, sugiriendo la activación de la apoptosis dependiente de esta nucleasa. Los resultados concuerdan con investigaciones previas las cuales muestran que la sobre expresión de EndoG promovió la apoptosis en parásitos tripanosomátidos de manera drástica e, inversamente, la inhibición del gen confirió una fuerte resistencia a la

apoptosis inducida por diferentes tipos de estrés (Gannavaram et al., 2008). Se ha descubierto que el gen EndoG está involucrado en la vía de señalización Bax/AIF/Endo G. A diferencia de otras cascadas apoptóticas conocidas, esta vía no depende de las caspasas. Durante este proceso, la sobreexpresión de las proteínas Bax y Bak induce una permeabilización de la membrana mitocondrial, lo que provoca la liberación de AIF y Endo G desde las mitocondrias hacia el citosol y el núcleo. Posteriormente, se produce una condensación de la cromatina y la muerte celular (Ishitsuka et al., 2005; Yang et al., 2006).

Además, esta investigación pretendió evaluar el nivel de expresión del gen glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3s). La enzima GSK-3 es una quinasa de serina/treonina multifuncional presente en todos los eucariotas y clasificada dentro de la familia CMGC de quinasas, estando relacionada con la familia de las quinasas dependientes de ciclina (CDKs). En eucariotas superiores, GSK-3 desempeña un papel crucial en múltiples procesos celulares fundamentales, como la señalización Wnt, el ciclo celular, la diferenciación celular, la apoptosis y las funciones neuronales (Xingi et al., 2009b). En particular, GSK-3 en tripanosomatidos ha sido objeto de validación tanto farmacológica como genética. Varios estudios en los cuales se inhibió químicamente la expresión de GSK-3 resultaron en la alteración del ciclo celular de los parásitos, provocando un arresto en la fase G1 y una muerte similar a la apoptosis (Efstathiou & Smirlis, 2021). En ese sentido, la inhibición de la expresión de GSK-3 por el extracto de *B. caapi* podría explicar la muerte celular observada por Criollo et al. (2021).

Por otro lado, GSK-3 tiene un rol dual en la regulación de la apoptosis: promueve la apoptosis intrínseca e inhiben la extrínseca dependiente de receptor de muerte. Los ratones *knockout* para este gen, murieron durante el desarrollo embrionario por apoptosis masiva en el hígado. Además, el uso de inhibidores específicos de esta proteína indujo apoptosis vía sobreexpresión de receptores de muerte. Por otro lado, la sobreexpresión de GSK-3 fue suficiente para provocar la apoptosis

intrínseca en células Rat-1 y PC12, y se ha observado que esta proteína participa en la apoptosis intrínseca activada por diversas señales como daño al ADN, estrés oxidativo, hipoxia, y otros (Beurel & Jope, 2006). En este caso, y en vista de que las β -carbolinas provocan daño al ADN gracias a sus propiedades intercalantes, se daría el caso contrario, en que el extracto de *B. caapi* provocaría la sobreexpresión GSK-3 que, como hemos señalado, promueve la vía de apoptosis intrínseca aguas arriba de la liberación de citocromo c y la formación del apoptosoma.

Desgraciadamente ninguna de las dos hipótesis ha podido ser comprobada debido a que no se pudo cuantificar la expresión de GSK-3. Además, como posee un rol dual activando e inhibiendo la apoptosis, habría que analizar la participación de otras proteínas que actúan aguas arriba (PI3K/Akt) y abajo (Bax, p53) de GSK-3.

En definitiva, nuestros datos, junto a los obtenidos por Criollo et al. (2021), sugieren la activación de la apoptosis independiente de caspasas, vía EndoG, en respuesta a daños al ADN provocados por el extracto de *B. caapi*, aunque no pueden descartarse otros mecanismos actuando sinérgicamente.

5. Conclusiones.

1. 18S es un gen normalizador viable en las presentes condiciones experimentales
2. El tratamiento con el extracto de *B. caapi* provoca la sobreexpresión de EndoG, lo que sugiere la activación de la apoptosis independiente de caspasas.

6. Recomendaciones

1. Aumentar la n experimental para disminuir la variabilidad en los resultados y robustecer el análisis estadístico y la significancia de los efectos observados.
2. Obtener más ARN (más alícuotas) de cada condición experimental de tal manera que no haya que diluir las muestras y se pueda cuantificar la expresión de genes poco expresados.

3. Examinar el papel de otras proteínas como PI3K/Akt en la cascada de señalización que ocurre previo a la acción de GSK-3, así como el papel de proteínas como Bax y p53 que actúan después de su actividad.

7. REFERENCIAS.

- Azami, M., Ranjkesh Adermanabadi, V., Khanahmad, H., Mohaghegh, M. A., Zaherinejad, E., Aghaei, M., Jalali, A., & Hejazi, S. H. (2018). Immunology and Genetic of *Leishmania infantum*: The Role of Endonuclease G in the Apoptosis. *Journal of Research in Medical Sciences*, 23(1), 36. https://doi.org/10.4103/JRMS.JRMS_705_17
- Beurel, E., & Jope, R. S. (2006). The Paradoxical Pro- and Anti-apoptotic Actions of GSK3 in the Intrinsic and Extrinsic Apoptosis Signaling Pathways. *Progress in Neurobiology*, 79(4), 173. <https://doi.org/10.1016/J.PNEURO-BIO.2006.07.006>
- Brito-da-costa, A. M., Dias-da-silva, D., Gomes, N. G. M., Dinis-oliveira, R. J., & Madureira-carvalho, Á. (2020). Toxicokinetics and Toxicodynamics of Ayahuasca Alkaloids N,N-Dimethyltryptamine (DMT), Harmine, Harmaline and Tetrahydroharmine: Clinical and Forensic Impact. *Pharmaceuticals* 2020, Vol. 13, Page 334, 13(11), 334. <https://doi.org/10.3390/PH13110334>
- Bussmann, R. W., Malca-García, G., Glenn, A., Sharon, D., Chait, G., Díaz, D., Pourmand, K., Jonat, B., Somogy, S., Guardado, G., Aguirre, C., Chan, R., Meyer, K., Kuhlman, A., Townesmith, A., Effio-Carbajal, J., Frías-Fernandez, F., & Benito, M. (2010). Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 132(1), 101–108. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2010.07.048>
- Bussmann, R. W., & Sharon, D. (2006). Traditional medicinal plant use in Loja province, Southern Ecuador. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-2-44/TABLES/6>
- Cao, R., Peng, W., Wang, Z., & Xu, A. (2007). beta-Carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. *Current Medicinal Chemistry*, 14(4), 479–500. <https://doi.org/10.2174/092986707779940998>
- Cao, R., Yi, W., Wu, Q., Guan, X., Feng, M., Ma, C., Chen, Z., Song, H., & Peng, W. (2008). Synthesis and cytotoxic activities of 1-benzylidene substituted β -carboline derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 18(24), 6558–6561. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2008.10.043>
- Cavender, A. P., & Albán, M. (2009). The use of magical plants by curanderos in the Ecuador highlands. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 5, 3. <https://doi.org/10.1186/1746-4269-5-3>
- Chen, Q., Di, L., Zhang, Y., & Li, N. (2020). Chemical constituents with cytotoxic and anti-inflammatory activity in *Hypericum sampsonii* and the antitumor potential under the view of cancer-related inflammation. *Journal of Ethnopharmacology*, 259, 112948. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2020.112948>
- Davidov, V. M. (2010). Shamans and Shams: The Discursive Effects of Ethnotourism in Ecuador. *The Journal of Latin American and Caribbean Anthropology*, 15(2), 387–410. <https://doi.org/10.1111/J.1935-4940.2010.01091.X>
- de Melo, J. G., Santos, A. G., de Amorim, E. L. C., Nascimento, S. C. do, & de Albuquerque, U. P. (2011). Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: An ethnobotanical approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/365359>
- Demarchi, I. G., Thomazella, M. V., de Souza Terron, M., Lopes, L., Gazim, Z. C., Cortez, D. A. G., Donatti, L., Aristides, S. M. A., Silveira, T. G. V., & Lonardoni, M. V. C. (2015). Antileishmanial activity of essential oil

- and 6,7-dehydroroyleanone isolated from *Tetradenia riparia*. *Experimental Parasitology*, 157, 128–137. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2015.06.014>
- Efstathiou, A., & Smirlis, D. (2021). Leishmania Protein Kinases: Important Regulators of the Parasite Life Cycle and Molecular Targets for Treating Leishmaniasis. *Microorganisms* 2021, Vol. 9, Page 691, 9(4), 691. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9040691>
- Frecska, E., Bokor, P., & Winkelman, M. (2016). The therapeutic potentials of ayahuasca: Possible effects against various diseases of civilization. *Frontiers in Pharmacology*, 7(MAR), 35. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2016.00035/BIBTEX>
- Gannavaram, S., Vedvyas, C., & Debrabant, A. (2008). Conservation of the pro-apoptotic nuclease activity of endonuclease G in unicellular trypanosomatid parasites. *Journal of Cell Science*, 121(1), 99–109. <https://doi.org/10.1242/JCS.014050>
- George, S., Bhalerao, S. v., Lidstone, E. A., Ahmad, I. S., Abbasi, A., Cunningham, B. T., & Watkin, K. L. (2010). Cytotoxicity screening of Bangladeshi medicinal plant extracts on pancreatic cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10, 52. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-10-52>
- Intriago, L. F. Z., Allauca, M. P. B., Rodríguez, N. J. M., & Romero, E. J. (2015). Estudio etnobotánico de plantas medicinales utilizadas por los habitantes del área rural de la Parroquia San Carlos, Quevedo, Ecuador. *Universidad y Salud*, 17(1), 97–111. <https://doi.org/10.1186/1746-4269->
- Ishitsuka, K., Hideshima, T., Hamasaki, M., Raje, N., Kumar, S., Podar, K., Le Gouill, S., Shiraishi, N., Yasui, H., Roccaro, A. M., Tai, Y. Z., Chauhan, D., Fram, R., Tamura, K., Jain, J., & Anderson, K. C. (2005). Novel inosine monophosphate dehydrogenase inhibitor VX-944 induces apoptosis in multiple myeloma cells primarily via caspase-independent AIF/Endo G pathway. *Oncogene* 2005 24:38, 24(38), 5888–5896. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208739>
- Kaasik, H., Souza, R. C. Z., Zandonadi, F. S., Tófoli, L. F., & Sussulini, A. (2021). Chemical Composition of Traditional and Analog Ayahuasca. *Journal of Psychoactive Drugs*, 53(1), 65–75. <https://doi.org/10.1080/02791072.2020.1815911>
- Kaczanowski, S., Sajid, M., & Reece, S. E. (2011). Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. *Parasites and Vectors*, 4(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-44/FIGURES/1>
- Lin, J., Song, T., Li, C., & Mao, W. (2020). GSK-3 β in DNA repair, apoptosis, and resistance of chemotherapy, radiotherapy of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1867(5), 118659. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2020.118659>
- Maria Lalama Aguirre, J., Beatriz Montes Cruz, S., & Antonio Zaldumbide Verdezoto, M. (2016). Etnobotánica de plantas medicinales en el cantón Tena, para contribuir al conocimiento, conservación y valoración de la diversidad vegetal de la región Amazónica. *Dominio de Las Ciencias, ISSN-e 2477-8818, Vol. 2, N° Extra 2, 2016 (Ejemplar Dedicado a: Número Especial 2), Págs. 26-52, 2(2), 26–52*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5761575&info=resumen&idioma=SPA>
- Martínez de Iturrate, P., Sebastián-Pérez, V., Nacher-Vázquez, M., Tremper, C. S., Smirlis, D., Martín, J., Martínez, A., Campillo, N. E., Rivas, L., & Gil, C. (2020). Towards discovery of new leishmanicidal scaffolds able to inhibit Leishmania GSK-3. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 199–210. https://doi.org/10.1080/14756366.2019.1693704/SUPPL_FILE/IENZ_A_1693704_SM6011.PDF
- Organización Mundial de la Salud. (2013). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023*.
- Oryan, A. (2015). Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 16(1), 1. [/pmc/articles/PMC4789233/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2789233/)

- Palhano-Fontes, F., Barreto, D., Onias, H., Andrade, K. C., Novaes, M. M., Pessoa, J. A., Mota-Rolim, S. A., Osório, F. L., Sanches, R., dos Santos, R. G., Tófoli, L. F., de Oliveira Silveira, G., Yonamine, M., Riba, J., Santos, F. R., Silva-Junior, A. A., Alchieri, J. C., Galvão-Coelho, N. L., Lobão-Soares, B., ... Araújo, D. B. (2019). Rapid antidepressant effects of the psychedelic ayahuasca in treatment-resistant depression: a randomized placebo-controlled trial. *Psychological Medicine*, 49(4), 655. <https://doi.org/10.1017/S0033291718001356>
- Panice, M. R., Lopes, S. M. M., Figueiredo, M. C., Goes Ruiz, A. L. T., Foglio, M. A., Nazari Formagio, A. S., Sarra-giotto, M. H., & Pinho e Melo, T. M. V. D. (2019). New 3-tetrazolyl- β -carboline and β -carboline-3-carboxylates with anti-cancer activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 179, 123–132. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2019.05.085>
- Raina, P., & Kaur, S. (2012). Knockdown of LdMC1 and Hsp70 by antisense oligonucleotides causes cell-cycle defects and programmed cell death in *Leishmania donovani*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 359(1–2), 135–149. <https://doi.org/10.1007/S11010-011-1007-Y>
- Rico, E., Alzate, J. F., Arias, A. A., Moreno, D., Clos, J., Gago, F., Moreno, I., Domínguez, M., & Jiménez-Ruiz, A. (2009). *Leishmania infantum* expresses a mitochondrial nuclease homologous to EndoG that migrates to the nucleus in response to an apoptotic stimulus. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 163(1), 28–38. <https://doi.org/10.1016/J.MOLBIOPARA.2008.09.007>
- Salud, O. P. de la. (2019). Leishmaniasis. Informe Epidemiológico de las Américas, diciembre 2019. *Informe de Leishmaniasis*;8. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51739>
- Salud, O. P. de la. (2022). Leishmaniasis: Informe epidemiológico de las Américas. Núm. 11 (Diciembre del 2022). *Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas*; <https://iris.paho.org/handle/10665.2/56833>
- Sen, R., & Chatterjee, M. (2011). Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. *Phytomedicine*, 18(12), 1056–1069. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2011.03.004>
- Shankaraiah, N., Nekkanti, S., Chudasama, K. J., Senwar, K. R., Sharma, P., Jeengar, M. K., Naidu, V. G. M., Srinivasulu, V., Srinivasulu, G., & Kamal, A. (2014). Design, synthesis and anticancer evaluation of tetrahydro- β -carboline-hydantoin hybrids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24(23), 5413–5417. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2014.10.038>
- Tene, V., Malagón, O., Finzi, P. V., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), 63–81. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2006.10.032>
- Umthong, S., Phuwapraisirisan, P., Puthong, S., & Chanchao, C. (2011). In vitro antiproliferative activity of partially purified *Trigona laeviceps* propolis from Thailand on human cancer cell lines. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-37/FIGURES/3>
- Venkataramana Reddy, P. O., Hridhay, M., Nikhil, K., Khan, S., Jha, P. N., Shah, K., & Kumar, D. (2018). Synthesis and investigations into the anticancer and antibacterial activity studies of β -carboline chalcones and their bromide salts. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28(8), 1278–1282. <https://doi.org/10.1016/J.BMCL.2018.03.033>
- Xingi, E., Smirlis, D., Myrianthopoulos, V., Magiatis, P., Grant, K. M., Meijer, L., Mikros, E., Skaltsounis, A. L., & Soteriadou, K. (2009a). 6-Br-5methylindirubin-3'-oxime (5-Me-6-BIO) targeting the leishmanial glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) short form affects cell-cycle progression and induces apoptosis-like death: Exploitation of GSK-3 for treating leishmaniasis. *International Journal for Parasitology*, 39(12), 1289–1303. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2009.04.005>

- Xingi, E., Smirlis, D., Myrianthopoulos, V., Magiatis, P., Grant, K. M., Meijer, L., Mikros, E., Skaltsounis, A. L., & Soteriadou, K. (2009b). 6-Br-5methylindirubin-3'oxime (5-Me-6-BIO) targeting the leishmanial glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) short form affects cell-cycle progression and induces apoptosis-like death: Exploitation of GSK-3 for treating leishmaniasis. *International Journal for Parasitology*, 39(12), 1289–1303. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2009.04.005>
- Yang, S. H., Chien, C. M., Lu, M. C., Lin, Y. H., Hu, X. W., & Lin, S. R. (2006). Up-regulation of Bax and endonuclease G, and down-modulation of Bcl-XL involved in cardiotoxin III-induced apoptosis in K562 cells. *Experimental & Molecular Medicine* 2006 38:4, 38(4), 435–444. <https://doi.org/10.1038/emm.2006.51>
- Zhou, B., Liu, Z. F., Deng, G. G., Chen, W., Li, M. Y., Yang, L. J., Li, Y., Yang, X. D., & Zhang, H. bin. (2016). Synthesis and antitumor activity of novel N-substituted tetrahydro- β -carboline-imidazolium salt derivatives. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 14(39), 9423–9430. <https://doi.org/10.1039/C6OB01495J>

Contribución de los Autores:

Financiamiento/Fondos:

Agradecimientos:

Conflictos de Interés

Referencias citadas

Anexo 1

Tabla 1. Equipos

Equipo	Modelo	Marca
Cabina de flujo laminar	Miniflow 120	Instrulab Q
Cabina de Bioseguridad II	AC2 - 452	ESCO
Microscopio binocular	CX-21	Olympus
Centrífuga	XC-2450	Premiere

PHmetro	ORION STAR A111	ThermoScientific
Balanza analítica	BAS31PLUS	Boeco
Bomba al vacío	R-300	BOECO
Cámara de electrofo- resis horizontal		Bio-Rad
Refrigeradora	2015KLXB	Durex
Autoclave	25X-1	All American
Incubadora		Memmert
Termociclador	CFX96	Bio-Rad

Tabla 2. Reactivos

Nombre	Fórmula	Casa Comercial
Metanol	CH ₄ O	Fermont
Hidróxido de so- dio 100%	NaOH	Merck

Ácido clorhídrico 2%	HCl	Merck
Cloruro de sodio 10%	NaCl	J. T. Baker
Bicarbonato de so- dio 99.7%	NaHCO ₃	
Cloruro de calcio dihidratado 99.0%	CaCl ₂ ·2H ₂ O	
Bromuro de Etidio	C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃	Sigma-Aldrich
Suero fetal bobino inactivado	--	Eurobio scientific (CVFSVF06-01)
Agarosa LE grado analítico	--	Promega (V3121)
SYBER Green 10.000 X	--	Invitrogen (S7563)
Anfotericina B	--	Sigma-Aldrich (A2942)
1,4-ditiotreitol (DTT)	--	Roche

Marcador de pesos moleculares (1 kb)	--	Roche
Buffer de carga Cyan	--	

Tabla 3. Medios de cultivo.

Medio de cultivo	Casa comercial
Medio de cultivo de insectos Schneider's Drosophila	Sigma Aldrich, S9895

Tabla 4. Soluciones

Soluciones	Composición
Solución de Electroforesis	1 mM EDTA, 0,3 M NaOH, pH>13
Tampón fosfato salino (PBS)	0.138 M NaCl, 3 mM KCl, 8.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.5 mM KH ₂ PO ₄ , pH = 7.4

Tabla 5. Kits comerciales.

Kit	Casa comercial
PureLink® RNA Mini Kit	Invitrogen
iTaq™ Universal SYBR® Green Super-mix	Bio-Rad
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio- Rad
DNA-free™ Kit	Invitrogen
Qubit™ RNA High Sensitivity (HS)	Invitrogen

Anexo 2