



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE
LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIA SOBRE
Leishmania infantum* DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE *Solanum
americanum* Y *Solanum sisymbriifolium

ELIANA ANDREA ALVARENGA TORRES

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Mayo, 2021



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE
LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIA SOBRE
Leishmania infantum* DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE *Solanum
americanum* Y *Solanum sisymbriifolium

ELIANA ANDREA ALVARENGA TORRES

Tutor: PROF. DR. NELSON LUIS ALVARENGA SOSA

Cotutora: PROF. MSc. GLORIA YALUFF MIRANDA

Tesis presentada para obtener el Título de Magíster en Ciencias Biomédicas

San Lorenzo – Paraguay

Mayo, 2021

Alvarenga Torres, Eliana Andrea

Evaluación de la actividad antiprotozoaria sobre *Leishmania infantum* de extractos metanólicos de *Solanum americanum* y *Solanum sisymbriifolium* / Eliana Andrea Alvarenga Torres; Tutor: Nelson Luis Alvarenga Sosa; Co tutor: Gloria Yaluff Miranda. -- San Lorenzo : UNA, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, 2021.

xx, 94 p; il.

Tesis (Magíster en Ciencias Biomédicas). -- UNA, IICS, FCQ; 2021

1. Fitoterapia 2. Extractos vegetales 3. Leishmaniasis visceral. I. Título.

CDD (ed.18ª.) 616.96
Al86e



Con el apoyo de:



“La Maestría en Ciencias Biomédicas, POSG17-59, es cofinanciada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - CONACYT, con recursos del FEEI”.

Institución ejecutora del programa: Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud-Universidad Nacional de Asunción.

“La presente tesis ha sido elaborada con el apoyo del CONACYT. El contenido de la misma es responsabilidad exclusiva de los autores y en ningún caso se debe considerar que refleja la opinión del CONACYT”.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD



EL **PROF. DR. NELSON LUIS ALVARENGA SOSA**, DOCENTE INVESTIGADOR DEL DEPARTAMENTO DE FITOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “**Evaluación de la actividad antiprotozoaria sobre *Leishmania infantum* de extractos metanólicos de *Solanum americanum* y *Solanum sisymbriifolium***” constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **Eliana Andrea Alvarenga Torres** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los 21 días del mes de mayo de 2021.

Tutor: Prof. Dr. Nelson Alvarenga Sosa



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD



LA PROF. MSc. GLORIA YALUFF MIRANDA DOCENTE INVESTIGADORA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “**Evaluación de la actividad antiprotozoaria sobre *Leishmania infantum* de extractos metanólicos de *Solanum americanum* y *Solanum sisymbriifolium***”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **Eliana Andrea Alvarenga Torres** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas, y ha sido realizado bajo su dirección.

Considerando que la tesis reúne los requisitos necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en la ciudad de San Lorenzo, a los 21 días del mes de mayo de 2021.

Cotutora: Prof. MSc. Gloria Yaluff



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD



LA B.C. PAMELA ESTHER MONGELÓS DACUNTE, MSc, COORDINADORA DEL PROGRAMA DE POSTGRADO, DEPENDIENTE DE LA UNIDAD DE DOCENCIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN Y DE LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.

INFORMA: Que el presente documento, titulado “**Evaluación de la actividad antiprotozoaria sobre *Leishmania infantum* de extractos metanólicos de *Solanum americanum* y *Solanum sisymbriifolium***”, constituye la Memoria del Trabajo de Tesis que presenta la estudiante **Eliana Andrea Alvarenga Torres** para optar al Título de Magíster en Ciencias Biomédicas bajo la dirección del docente investigador **PROF. DR. Nelson Alvarenga Sosa** considerando que el trabajo de tesis reúne los requisitos de formato necesarios para ser presentada ante el tribunal constituido a tal efecto y para que conste, se expide y firma el presente informe en San Lorenzo, a los 21 días del mes de mayo de 2021.

B.C. Pamela Esther Mongelós Dacunte, MSc.

Coordinadora de la Maestría en Ciencias Biomédicas



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN
CIENCIAS DE LA SALUD



**“Evaluación de la actividad antiprotozoaria sobre *Leishmania infantum*
de extractos metanólicos de *Solanum americanum* y *Solanum*
sisymbriifolium”**

Trabajo de tesis para optar el título de Magíster en Ciencias Biomédicas.

Eliana Andrea Alvarenga Torres

Aprobado el _____ de 2021

Tribunal examinador:

María Luisa Kennedy Rolón, Facultad de Ciencias Químicas, San Lorenzo,
Paraguay

Gladys Antonieta Rojas de Arias, Centro para el Desarrollo de la
Investigación Científica, Asunción, Paraguay

Patricia Elena Langjahr Penayo, Facultad de Ciencias Químicas, San
Lorenzo, Paraguay

María del Carmen Hellión, Facultad de Ciencias Químicas, San Lorenzo,
Paraguay

Nelson Luis Alvarenga Sosa
Tutor

Prof. Lic. Laura Joy, MSc.
Directora de Postgrado FCQ

DEDICATORIA

“Ser más para servir mejor” - San Ignacio de Loyola. -

A mis padres, familia y docentes

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar esta etapa quisiera agradecer ante todo a Dios, quien puso en mi camino personas que, con su amor; paciencia; experiencia y por, sobre todo, vocación me ayudaron a transitar este proceso de capacitación constante.

A mis padres, quienes siempre me inculcaron el estudio como forma de crecimiento y progreso, dándome todas las herramientas y oportunidades a su alcance y aún más. En este momento, no puedo dejar de hacer una mención especial a mi madre Elodia Torres, quien con su ejemplo me demostró que las mujeres podemos y debemos tener un papel protagónico en la ciencia y la investigación. A mis hermanos por su constante apoyo y alegría, a mi novio por ayudarme, aportar y sobre todo dar el impulso en el momento oportuno, a mis amigos y a todos los compañeros de la maestría quisiera darles las gracias por los buenos momentos que hemos compartido.

A mis tutores, Dr. Nelson Alvarenga y MSc. Gloria Yaluff, quienes con su vocación; guía; apoyo; motivación y paciencia encomiable me fueron guiando y corrigiendo para poder alcanzar los objetivos propuestos.

Al Dpto. de Medicina Tropical del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, en las personas de la Dra. Ninfa Vera y la MSc. Gloria Yaluff quienes muy amablemente me abrieron las puertas de su laboratorio para poder realizar mis ensayos y pruebas, especialmente a la Lic. Nilda Portillo quién, sin tener ninguna obligación, me acompañó y supervisó en dichos procesos con mucha paciencia y camaradería.

Al laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNA, por abrirme las puertas de su laboratorio para llevar adelante mis ensayos.

A las biólogas Fátima Benítez y Eugenia Laterza, y a la Dra. Elsa López quienes me ayudaron incondicionalmente en los ensayos realizados. Al Lic. Elvio Gayozo, quien despejó mis dudas y me hizo recomendaciones en el área estadística. A la Dra. Patricia Langjahr y al Dpto. de Biotecnología de la FCQ por su ayuda y colaboración en los ensayos.

A la coordinación de la maestría en Ciencias Biomédicas por su constante colaboración, orientación y ayuda brindada.

Finalmente, a la Universidad Nacional de Asunción y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por esta oportunidad única de poder capacitarnos en nuestro propio país. ¡Gracias por apostar a la ciencia y especialmente a los jóvenes!

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPROTOZOARIA SOBRE
Leishmania infantum DE EXTRACTOS METANÓLICOS DE *Solanum
americanum* Y *Solanum sisymbriifolium***

Eliana Andrea Alvarenga Torres*, Nelson Alvarenga Sosa, Gloria Yaluff
Miranda*****

*Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

**Departamento de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

***Departamento de Medicina Tropical, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción

RESUMEN

La leishmaniasis visceral, causada por *Leishmania infantum*, es una enfermedad que afecta a millones de personas en todo el mundo. La OMS considera que la leishmaniasis es una de las enfermedades parasitarias más graves en términos de prevalencia y distribución geográfica. Para los países subdesarrollados, la falta de tratamientos accesibles y económicos representa un problema, el desarrollo de nuevos fármacos antileishmania es una gran prioridad. En ese contexto, se busca sumar alternativas sostenibles y de fácil acceso a esta problemática. En el presente trabajo se evaluó la actividad antileishmania de extractos metanólicos de *S. sisymbriifolium* y *S. americanum* sobre formas promastigotes de *L. infantum*, la actividad citotóxica de estos extractos en macrófagos extraídos de ratones, se identificaron los compuestos del extracto metanólico de *S. americanum* mediante cromatografía acoplado a un espectrómetro de masas y se evaluó la actividad antiparasitaria del extracto metanólico de *S. americanum* sobre amastigotes de *L. infantum*, infectando líneas celulares THP-1. En la evaluación antileishmania sobre las formas promastigotes del parásito y el ensayo de citotoxicidad, *S. americanum* presentó IC₅₀ de 21,1 µg/mL y CC₅₀ de 98,2 µg/mL, con IS de 4,6 (más selectivo por el parásito que por la célula huésped) y *S. sisymbriifolium* presentó IC₅₀ de 76,0 µg/mL y CC₅₀ de 58,4 µg/mL, con IS de 0,7, lo que da indicios de que *S. americanum* presenta una interesante actividad antileishmania. Por otro lado, dos de las fracciones de *S. americanum*, de cloroformo y acetato de etilo, presentaron actividad antiparasitaria sobre las formas promastigotes del parásito de *L. infantum* con IC₅₀ de 54.6 µg/mL y 66.8 µg/mL, respectivamente. Los compuestos identificados en el extracto metanólico de *S. americanum* y sus fracciones fueron flavonoides, alcaloides, triterpenos, fitoesteres. Para el estudio de evaluación de actividad antiparasitaria sobre formas amastigotes en células THP-1, el extracto de *S. americanum* presentó IC₅₀ de 10,8 µg/mL e IS de 9,1. Estos datos muestran que el extracto de *S. americanum* presenta actividad antileishmania y representa un potencial candidato a fármaco para el tratamiento de la leishmaniasis.

Palabras clave: *Solanum americanum*, *Solanum sisymbriifolium*, leishmaniasis, THP-1.

EVALUATION OF THE ANTIPROTOZOAL ACTIVITY ON *Leishmania infantum* OF METHANOLIC EXTRACTS OF *Solanum americanum* AND *Solanum sisymbriifolium*

Eliana Andrea Alvarenga Torres*, Nelson Alvarenga Sosa, Gloria Yaluff Miranda*****

*Estudiante de la Maestría en Ciencias Biomédicas, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

**Departamento de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción

***Departamento de Medicina Tropical, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis, caused by *Leishmania infantum*, is a disease that affects millions of people around the world. WHO considers leishmaniasis to be one of the most serious parasitic diseases in terms of prevalence and geographical distribution. For underdeveloped countries, the lack of affordable and accessible treatments represents a problem, the development of new antileishmanial drugs is a high priority. In this context, it seeks to add sustainable and easily accessible alternatives to this problem. In this work the antileishmanial activity of methanolic extracts of *S. sisymbriifolium* and *S. americanum* was evaluated on promastigote forms of *L. infantum*, the cytotoxic activity of these extracts in macrophages extracted from mice, the compounds of the methanolic extract of *S. americanum* were identified by chromatography coupled to a mass spectrometer and the antiparasitic activity of the methanolic extract of *S. americanum* on amastigotes of *L. infantum* was evaluated, infecting THP-1 cell lines. In the antileishmanial evaluation on the promastigote forms of the parasite and the cytotoxicity test, *S. americanum* presented CI_{50} of 21.1 $\mu\text{g/mL}$ and CC_{50} of 98.2 $\mu\text{g/mL}$, with an SI of 4.6 (more selective for the parasite than by the host cell) and *S. sisymbriifolium* presented CI_{50} of 76.0 $\mu\text{g/mL}$ and CC_{50} of 58.4 $\mu\text{g/mL}$, with SI of 0.7, which indicates that *S. americanum* has an interesting antileishmanial activity. On the other hand, two of the *S. americanum* fractions, of chloroform and ethyl acetate, showed antiparasitic activity on the promastigote forms of the *L. infantum* parasite with CI_{50} of 54.6 $\mu\text{g/mL}$ and 66.8 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The compounds identified in the methanolic extract of *S. americanum* and their fractions were flavonoids, alkaloids, triterpenes, and phytosterols. For the evaluation study on THP-1 cells with the amastigote forms of the parasite, the *S. americanum* methanolic extract presented CI_{50} of 10.8 $\mu\text{g/mL}$ and SI of 9.1. These data show, *S. americanum* extract exhibit antileishmanial activity and represents a potential drug candidate for the treatment of leishmaniasis.

Keywords: *Solanum americanum*, *Solanum sisymbriifolium*, antileishmanial, fractions, THP- 1.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO	1
1.1 LEISHMANIASIS.....	4
1.1.1 Generalidades de la enfermedad	4
1.1.2 Agente etiológico y ciclo de vida.....	6
1.1.3 Situación a nivel mundial de la enfermedad	7
1.1.4 Estrategias de control y prevención de la leishmaniasis	10
1.1.5 Tratamiento de la Leishmaniasis.....	11
1.2 PLANTAS MEDICINALES.....	12
1.2.1 Antecedentes del género <i>Solanum</i>	13
1.2.2 Metabolitos secundarios en general del género <i>Solanum</i>	13
1.2.3 Descripción botánica y distribución de las especies	15
1.3 MACRÓFAGOS EXTRAÍDOS DE RATONES PARA ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD	18
1.4 EL MODELO DE LA LÍNEA CELULAR THP-1 EN EL ESTUDIO DE LA INFECCIÓN CAUSADA POR PARÁSITOS DE <i>L. INFANTUM</i>.....	19
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	21
2.1 Objetivo General	22
2.2 Objetivos específicos	22
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA.....	23
3.1 Diseño del estudio.	24
3.1.1 Preparación de extractos	24
3.2 Obtención de material vegetal.....	25

3.2.2	Obtención de fracciones del extracto metanólico de <i>Solanum americanum</i>	25
3.3	Metodología fase I	27
3.3.1	Población y muestra.	27
3.3.2	Asuntos Éticos.....	30
3.4	Metodología fase II	30
3.4.1	Obtención de la cepa referencial de <i>Leishmania infantum</i>	30
3.4.2	Evaluación de la actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> de los extractos metanólicos de <i>Solanum americanum</i> y <i>Solanum sisymbriifolium</i> sobre <i>L. infantum</i>	30
3.4.3	Evaluación de la actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> de las fracciones de <i>Solanum americanum</i>	32
3.5	Metodología fase III	32
3.5.1	Cultivo y diferenciación de THP- 1	32
3.5.2	Cultivo de amastigotes axénicos	33
3.5.3	Evaluación de actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> sobre amastigotes de <i>L. infantum</i> del extracto metanólico de <i>Solanum americanum</i>	33
3.5.4	Declaración de Ética	35
CAPÍTULO 4: RESULTADOS		36
4.1	FASE I: Ensayo de citotoxicidad en macrófagos extraídos de ratones.	37
4.3	FASE II: Evaluación de la actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> de los extractos metanólicos de <i>Solanum americanum</i> y <i>Solanum sisymbriifolium</i> sobre <i>L. infantum</i>.	40
4.3.1	Evaluación de la actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> de las fracciones de <i>Solanum americanum</i>	43
4.3.2	Perfil cromatográfico y metabolitos secundarios identificados en el extracto de <i>Solanum americanum</i> y las fracciones de cloroformo y acetato de etilo.....	45

4.4 FASE III: Evaluación de actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> sobre amastigotes axénicos de <i>L. infantum</i> del extracto metanólico de <i>Solanum americanum</i>	51
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES	62
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
8. ANEXOS	71
8.1 Anexo 1.	71
8.2 Anexo 2.	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama representativo del ciclo de vida de parásitos del género <i>Leishmania</i> .	7
Figura 2. Distribución mundial de la leishmaniasis visceral.	9
Figura 3. Distribución mundial de la leishmaniasis cutánea.	9
Figura 4. <i>Solanum americanum</i> Mill.	16
Figura 5. <i>Solanum sisymbriifolium</i> Lam	18
Figura 6. Flujograma de la preparación de extractos para su estudio biológico	24
Figura 7. Observación de macrófagos en microscopio óptico con aumento de 40x.	30
Figura 8. Flujograma de evaluación antileishmania con extractos fraccionados.	32
Figura 9. Fotografía microscópica de células THP-1 infectadas experimentalmente con <i>Leishmania infantum</i> aumento de 40x	34
Figura 11. Citotoxicidad de macrófagos extraídos de ratón. Porcentaje de viabilidad celular a las 48 horas de exposición al extracto metanólico de <i>Solanum americanum</i>	38
Figura 12. Citotoxicidad de macrófagos extraídos de ratón. Porcentaje de viabilidad celular a las 48 horas de exposición al extracto metanólico de <i>Solanum sisymbriifolium</i> .	39
Figura 13. Efecto <i>in vitro</i> del extracto metanólico de <i>S. americanum</i> y <i>S. sisymbriifolium</i> sobre promastigotes de <i>L. infantum</i> .	41
Figura 14. Efecto <i>in vitro</i> de las fracciones del extracto metanólico de <i>S. americanum</i> sobre promastigotes de <i>L. infantum</i>	44
Figura 15. Cromatograma del extracto metanólico de <i>Solanum americanum</i> .	46
Figura 16. Estructura de compuestos identificados del extracto metanólico de <i>Solanum americanum</i> .	47
Figura 17. Cromatograma de la fracción de cloroformo del extracto de <i>Solanum americanum</i> .	48

Figura 18. Estructura de compuestos identificados de la fracción de cloroformo de <i>Solanum americanum</i>	49
Figura 19. Cromatograma de la fracción de acetato de etilo del extracto de <i>Solanum americanum</i>	50
Figura 20. Estructura de compuestos identificados de la fracción de acetato de etilo de <i>Solanum americanum</i>	51
Figura 21. Efecto in vitro del extracto metanólico de <i>S. americanum</i> sobre amastigotes de <i>L. infantum</i>	53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Especies de <i>Leishmania</i> causantes de diferentes formas de la enfermedad...	5
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Solanum americanum</i> Mill	15
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>Solanum sisymbriifolium</i> Lam.....	17
Tabla 4. Peso en gramos del material vegetal pulverizado	25
Tabla 5. Porcentaje de viabilidad celular de los macrófagos expuestos a las diferentes concentraciones de los extractos metanólicos en un tiempo de 48 h.	38
Tabla 6. Concentración citotóxica de extractos metanólicos de <i>Solanum americanum</i> y <i>Solanum sisymbriifolium</i> sobre macrófagos.....	39
Tabla 7. Porcentaje de mortalidad de las formas promastigotes de <i>L. infantum</i> expuestos a diferentes dosis de los extractos metanólicos, en un tiempo de 72 h.	41
Tabla 8. ANOVA de dos factores. Nivel de significancia del 95%.....	42
Tabla 9. Prueba Pos Hoc de Tukey, para determinar diferencias intragrupos entre las especies vegetales utilizadas y el control.	42
Tabla 10. Concentración inhibitoria semimáxima, concentración citotóxica e índice de selectividad del extracto metanólico de <i>S. americanum</i> , <i>S. sisymbriifolium</i> y Anfotericina B.....	42
Tabla 11. ANOVA de dos factores. Nivel de significancia del 95%.....	44
Tabla 12. Prueba Pos Hoc de Tukey, para determinar diferencias intragrupos entre los extractos utilizados y el control.....	45
Tabla 13. Concentración inhibitoria mínima (IC ₅₀) de las fracciones del extracto metanólico de <i>S. americanum</i>	45
Tabla 14. Porcentaje de reducción de la infección con el extracto metanólico de <i>S. americanum</i>	52
Tabla 15. Concentración inhibitoria semimáxima (IC ₅₀) e índice de selectividad del extracto metanólico de <i>S. americanum</i> y de Anfotericina B.....	53

ABREVIATURAS

µg/mL	Microgramo por mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
AmpB	Anfotericina B
ANOVA	Análisis de varianza
CC ₅₀	Concentración citotóxica semimáxima
CL	Leishmaniasis cutánea
CO ₂	Dióxido de Carbono
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
DE	Desviación estándar
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESI	Ionización por electrospray
ETD	Enfermedades tropicales desatendidas
g	gramos
h	horas
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria semimáxima
IC ₅₀ -AMA	Concentración Inhibitoria semimáxima sobre amastigotes
IC ₅₀ -PRO	Concentración Inhibitoria semimáxima sobre promastigotes
IICS	Instituto de Investigaciones en Ciencias de la salud
IS	Índice de selectividad
L	Litros
<i>L. amazonensis</i>	<i>Leishmania amazonensis</i>
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania infantum</i>
LV	Leishmaniasis visceral
mm	Milímetros
mM	milimolar

m/z	Masa- carga
MeOH	Metanol
min	minutos
mL	Mililitro
ND	No determinado
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Forbol 12-miristato-13-acetato (del inglés Phorbol myristate acetate)
PMA	Phorbol-12-myristate 13-acetate
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
s	segundos
<i>S. americanum</i>	<i>Solanum americanum</i>
<i>S. sisymbriifolium</i>	<i>Solanum sisymbriifolium</i>

CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO

Las enfermedades tropicales desatendidas (ETD) son causadas por varios agentes infecciosos y son responsables de altas tasas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo (1). La leishmaniasis es una enfermedad tropical y subtropical desatendida que causa considerable morbilidad y mortalidad por el alto número de personas afectadas y en riesgo de adquirirlas a pesar de los grandes esfuerzos realizados para su control. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que la leishmaniasis es una de las enfermedades parasitarias más graves en términos de prevalencia y distribución geográfica, es una de las siete enfermedades tropicales más importantes y representa un grave problema de salud mundial que presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas con un resultado potencialmente fatal (2).

La leishmaniasis comprende un grupo complejo de enfermedades causadas por protozoarios eucariotas unicelulares e intracelulares estrictos del género *Leishmania* (3). Estos microorganismos se transmiten por insectos hematófagos del género *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, y esta transmisión puede ser zoonótica o antroponótica (4). El ciclo de vida de *Leishmania* sp. implica la transmisión del parásito entre un invertebrado y un huésped mamífero, los promastigotes extracelulares móviles de *Leishmania* sp. proliferan en el intestino de la mosca de la arena y luego se transmiten al huésped mamífero a través de la picadura del vector (5).

Las diferentes formas clínicas de la leishmaniasis son el resultado de la infección por diferentes especies del parásito. La leishmaniasis visceral (LV), mortal si no se trata, suele ser causada por *Leishmania infantum*. Esta enfermedad es una zoonosis en la cual los perros son los principales reservorios. Esta forma de leishmaniasis se presenta en individuos de todas las edades, pero circunstancias como la malnutrición o la inmunosupresión predisponen a la enfermedad (6).

La leishmaniasis cutánea (CL) es causada por *Leishmania amazonensis*, y puede manifestarse como una erupción cutánea difusa o como una úlcera, éstas tienden a volverse necróticas en el centro y están elevadas a los lados. El principal vector de mosca de arena de *L. amazonensis* es *Lutzomyia flaviscutellata* (7).

Se estima que en todo el mundo hay alrededor de 350 millones de personas que se encuentran en riesgo de contraer leishmaniasis, con una incidencia aproximada de 2 millones de casos nuevos por año. En los últimos 10 años ha habido un aumento en el registro de los casos de LV en el Paraguay por el aumento propio de la endemia y por

el creciente reconocimiento de los casos por parte de los médicos. En el Paraguay, más del 90% de los casos provienen del distrito de Asunción y de los departamentos Central, Paraguarí y Cordillera, en donde convergen una alta proporción de perros infectados y flebótomos vectores, además de un crecimiento urbano desordenado de la población (8). Todos los casos confirmados de LV deben ser tratados con antimonio pentavalente, como fármaco de primera elección. En el caso de una respuesta no satisfactoria al tratamiento o en caso de falla terapéutica, efectos adversos severos, se deben utilizar los fármacos de segunda elección. La anfotericina B desoxicolato es el fármaco de segunda elección recomendada. En el Paraguay, la anfotericina B desoxicolato presenta un costo elevado y la principal dificultad para el tratamiento es su discontinuidad y las dificultades económicas de la población (9).

Para los países subdesarrollados, donde la LV es una enfermedad desatendida y mortal si no se trata, donde la falta de acceso al tratamiento y el desinterés de las grandes empresas farmacéuticas debido al mercado no rentable representa un problema, el desarrollo de nuevos fármacos leishmanicidas es una gran prioridad. El Paraguay cuenta con una gran diversidad en especies vegetales, que constituyen una fuente de productos naturales que podrían ser utilizados para el tratamiento de enfermedades parasitarias como la leishmaniasis. A través de estudios anteriores en los cuales se ha visto que *Solanum sisymbriifolium* y *Solanum americanum* son plantas con interés farmacéutico, ya que contienen compuestos bioactivos que pueden actuar como antiparasitarios; la obtención de los extractos de estas plantas podrían ser utilizados como medicamentos naturales para que en un futuro las personas afectadas por esta enfermedad puedan tener un tratamiento que no presente efectos adversos y que pueda estar disponible como tratamiento para toda la sociedad. Este estudio preclínico podría contribuir al hallazgo de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de la leishmaniasis.

Con el fin de alcanzar dichos objetivos, el presente trabajo contempló el desarrollo de las actividades experimentales en tres fases de estudio, planteándose: I) El ensayo *in vitro*, dirigido a la evaluación de la actividad citotóxica en macrófagos extraídos de ratones, II) El ensayo dirigido a la evaluación de la actividad antiparasitaria de extractos metanólicos de *S. sisymbriifolium* y *S. americanum* sobre *Leishmania infantum*, y III) El ensayo *in vitro* para evaluar la actividad leishmanicida del extracto

metanólico de *Solanum americanum* sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania infantum*, infectando líneas celulares THP-1.

1.1 LEISHMANIASIS

1.1.1 Generalidades de la enfermedad

La leishmaniasis es una enfermedad causada por un parásito protozoario intracelular de más de 20 especies de *Leishmania*, que se transmiten por la picadura de las moscas de arena flebotomina. Existen 3 formas principales de la enfermedad dependiendo de la especie del parásito: La leishmaniasis visceral (LV), también conocida como kala-azar, afecta a varios órganos, en más del 95% de los casos es fatal si no se trata. Se caracteriza por episodios irregulares de fiebre, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia y recuento sanguíneos bajos. La leishmaniasis cutánea (CL), es la forma más común de leishmaniasis y causa lesiones cutáneas, llagas en la piel, estas llagas cambian de tamaño o apariencia con el tiempo y pueden terminar como úlceras, en partes expuestas del cuerpo, dejando cicatrices de por vida y discapacidad o estigma graves. La leishmaniasis mucosa o mucocutánea, ciertos tipos de parásitos pueden extenderse y de esta manera causar llagas que conducen a la destrucción parcial o total de las membranas mucosas de la nariz, la boca y la garganta. Las diferentes especies son morfológicamente indistinguibles, pero pueden diferenciarse mediante análisis de isoenzimas, métodos moleculares o anticuerpos monoclonales, estas especies se caracterizan por presentar una distribución geográfica particular, lo que también permite diferenciarlas y catalogarlas en especies que causan la leishmaniasis en el Viejo Mundo y en el Nuevo Mundo (10). Dependiendo de la especie estas pueden causar distintas enfermedades (Tabla 1).

Tabla 1. Especies de *Leishmania* causantes de diferentes formas de la enfermedad.

Especies	Forma clínica de la enfermedad	Distribución geográfica
<i>L. donovani</i>	Leishmaniasis visceral	Viejo mundo (África, Asia)
<i>L. infantum</i>		Nuevo mundo (América del Sur)
<i>L. chagasi</i>		
<i>L. tropica</i> *		Viejo mundo (África, Asia)
<i>L. amazonensis</i> *		Nuevo mundo (América del Sur)
<i>L. major</i>	Leishmaniasis cutánea	Viejo mundo (África, Asia)
<i>L. tropica</i>		
<i>L. arabica</i>		
<i>L. aethiopica</i>		
<i>L. mexicana</i>		Nuevo mundo (Centroamérica y del Sur)
<i>L. panamensis</i>		
<i>L. peruviana</i>		
<i>L. guyanensis</i>		
<i>L. amazonensis</i>		
<i>L. venezuelensis</i>		
<i>L. braziliensis</i>		
<i>L. panamensis</i>	Leishmaniasis mucocutánea	Nuevo mundo (América del Sur)
<i>L. braziliensis</i>		
<i>L. guyanensis</i>		
<i>L. amazonensis</i>		

(* Ocasionalmente relacionada a la leishmaniasis visceral)

La leishmaniasis visceral es causada principalmente por *L. donovani* en el Viejo Mundo y *L. infantum* y *L. chagasi* en el Nuevo Mundo, mientras que las especies *L. tropica* y *L. major* son causantes de la leishmaniasis cutánea en el Viejo Mundo, *L. mexicana*, *L. panamensis*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* en el Nuevo Mundo (11).

1.1.2 Agente etiológico y ciclo de vida

La leishmaniasis es una enfermedad causada por protozoos intracelulares obligados del género *Leishmania*, familia Trypanosomatidae, orden Trypanosomatida y clase Kinetoplastea, transmitida por moscas de arena que actúan como vectores, 98 especies de los géneros *Phlebotomus* (Viejo Mundo) y *Lutzomyia* (Nuevo Mundo) se han descrito como vectores comprobados o sospechosos de leishmaniasis humana, la distribución temporal y espacial de los flebotomos depende de factores geográficos y climáticos locales. Las moscas de arena pueden reproducirse en grietas, paredes o entre rocas, madrigueras de animales, cuevas, hojarasca húmeda en bosques, agujeros en el suelo, pisos estables, gallineros y termiteros. Tanto las moscas de arena flebotominas machos como las hembras se alimentan de azúcar y jugos de plantas, pero las hembras también se alimentan de sangre (12). Los parásitos de *Leishmania*, en su huésped mamífero viven y se multiplican intracelularmente en células fagocíticas dentro de los llamados fagolisosomas. En la leishmaniasis cutánea, los parásitos infectan a los macrófagos residentes en la piel. Cuando la célula huésped está llena de parásitos, estalla y los amastigotes liberados infectarán a los macrófagos vecinos. En leishmaniasis visceral, los amastigotes liberados se propagan por la circulación sanguínea e infectan las células del sistema de fagocitos mononucleares (sistema reticuloendotelial) del hígado, el bazo, la médula ósea, los ganglios linfáticos y el intestino (13). *Leishmania* tiene un ciclo de vida digenético, su forma de promastigote que involucra una etapa móvil extracelular que parasita el tracto alimentario de un vector de mosca de arena y formas de amastigotes no móviles que pueden persistir como parásitos intracelulares.

El ciclo de vida de los parásitos de *Leishmania* comienza cuando el hospedero mamífero recibe la picadura de un insecto vector infectado. Este insecto vector presenta la forma flagelar denominada promastigote metacíclico de *Leishmania*, una vez que los parásitos son inoculados en la piel y fagocitados por macrófagos, la forma intracelular sin flagelo externo del parásito (amastigote) se replica. La ruptura de los macrófagos infectados propaga la enfermedad. Cuando un nuevo insecto ingiere sangre de un hospedero mamífero infectado, los amastigotes se diferencian a su forma de promastigotes procíclicos y madurarán hasta alcanzar de nuevo su forma infectiva (promastigotes metacíclicos), en el intestino medio del insecto y migran a su cavidad

bucal para ser inoculados nuevamente a otro hospedero mamífero para completar el ciclo de la enfermedad. El pH juega un papel central en el cambio de desarrollo entre las etapas de promastigote y amastigote, y los amastigotes son metabólicamente más activos cuando su ambiente es ácido (14). (Figura 1).

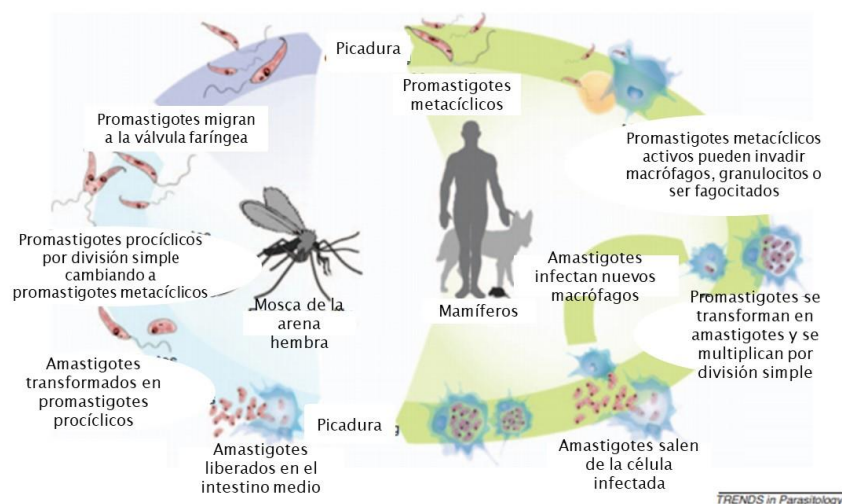


Figura 1. Diagrama representativo del ciclo de vida de parásitos del género *Leishmania*. Ilustración tomada de Harhay, M (15).

La leishmaniasis se puede presentar en reservorios silvestres y domésticos, los hospederos mamíferos incluyen roedores, marsupiales, caninos, primates. Los humanos y otros animales tales como caballos, cerdos y conejos son considerados hospederos accidentales. En el caso de la leishmaniosis visceral causada por *Leishmania infantum*, el perro es el hospedero más importante (14, 15).

1.1.3 Situación a nivel mundial de la enfermedad

Las leishmaniasis representan un grupo de enfermedades extremadamente diversas, tanto clínica como epidemiológicamente. La epidemiología es extremadamente diversa, y existen dos entidades epidemiológicas principales: 1- zoonótica que incluye a los huéspedes de reservorios animales en el ciclo de transmisión y 2- antroponótica en la cual el hombre es la única fuente de infección para el vector (16). La Leishmaniasis afecta en gran parte a los más pobres, principalmente a los países en desarrollo; 350 millones de personas se considera que corren el riesgo de contraer leishmaniasis y unos 2 millones de casos nuevos ocurren anualmente (17).

Más del 90% de los casos de LV ocurren en el subcontinente indio, África Oriental y Brasil, sin embargo, ha habido una expansión geográfica en Argentina, Colombia, Paraguay y Venezuela y se destaca que el número de muertes por esta enfermedad ha aumentado desde 2012 (18). El número de casos de leishmaniasis visceral ha aumentado en países de Europa occidental, se asocia esta tendencia al desplazamiento de la población, la actividad ecoturística, las operaciones militares y la inmigración, además, esta enfermedad está asociada con la desnutrición, las viviendas deficientes, el sistema inmunitario débil y la falta de recursos. Esta forma de la enfermedad es causada mayormente por *Leishmania infantum* (19). Las epidemias recurrentes de leishmaniasis visceral en África Oriental (Etiopía, Kenia, Sudán del Sur y Sudán) han causado una alta morbilidad y mortalidad en las comunidades afectadas (Figura 2) (20).

En lo que refiere a las Américas, de acuerdo con estudios epidemiológicos, Colombia y Venezuela siguen con transmisión estable o controlable, aunque es posible ver un incremento de los casos en Venezuela desde el 2013. En Argentina y Paraguay, a pesar de la reducción de casos, la LV se sigue expandiendo para áreas anteriormente sin transmisión. En 2018 fueron registrados 3.562 casos nuevos de LV, presentando una disminución de cerca de 16% de los casos reportados en las Américas en comparación al 2017. La reducción ocurrió en Brasil, Colombia, Argentina y Paraguay, mientras El Salvador, Guatemala y Venezuela tuvieron un incremento en los casos de LV (Figura 2) (21).

Se informan también casos de CL elevados en varios países de América Latina, el sur del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia central (18). En la Región Europea de la OMS, Israel, Turquía, Turkmenistán y Uzbekistán son actualmente los países más afectados por esta forma de la enfermedad, que representa casi el 80% del número total de casos notificados en la Región. La enfermedad es causada principalmente por *L. major*, *L. amazonensis*, *L. tropica* y *L. infantum* (Figura 3) (22).

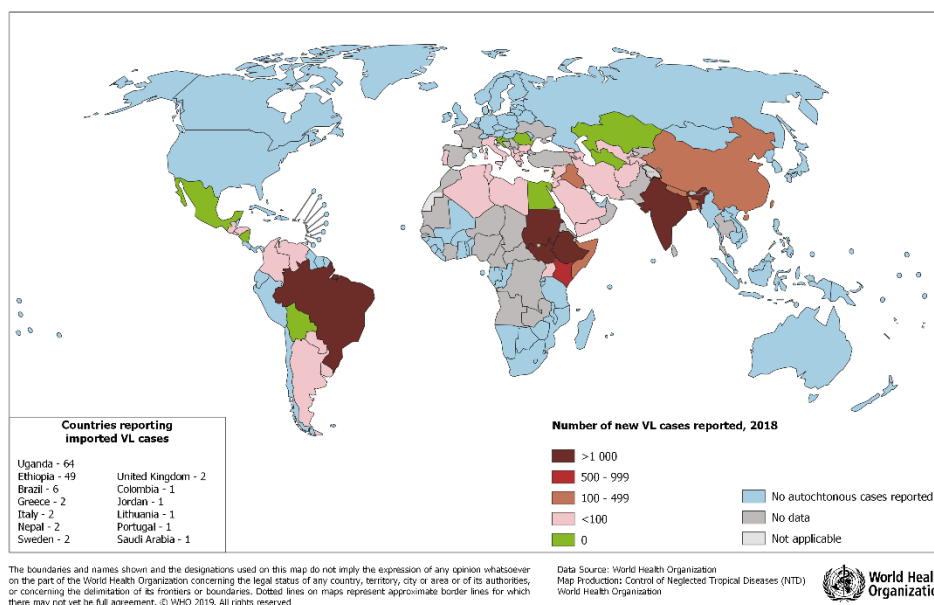


Figura 2. Distribución mundial de la leishmaniasis visceral. Corresponde a la distribución geográfica de los focos principales de presentación de la leishmaniasis visceral en el nuevo y viejo mundo. Tomado de OMS 2018 (20).

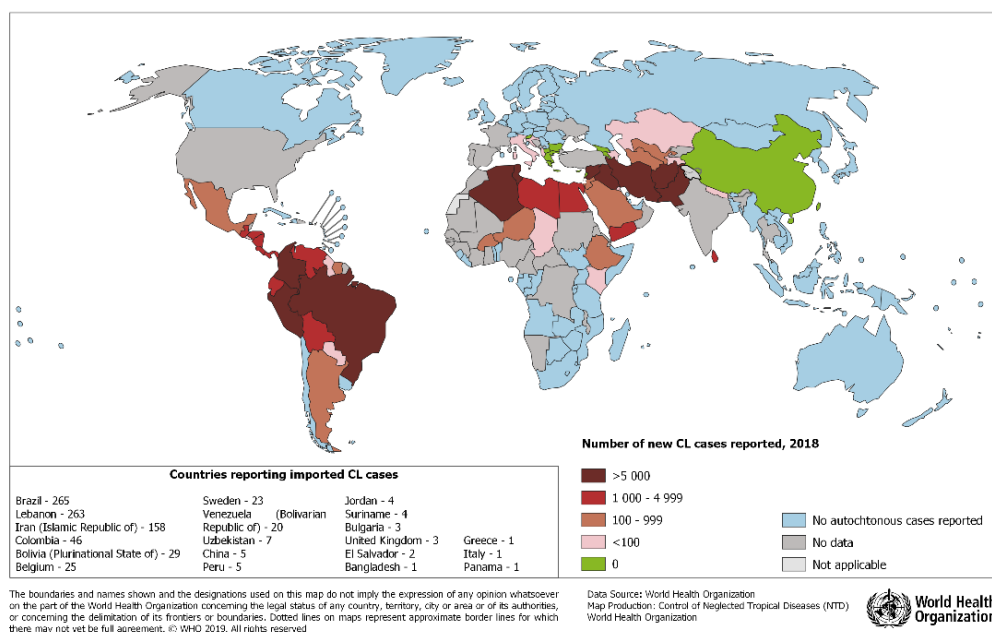


Figura 3. Distribución mundial de la leishmaniasis cutánea. Corresponde a la distribución geográfica de la leishmaniasis cutánea en el nuevo y viejo mundo. Tomado de OMS 2018 (20).

1.1.4 Estrategias de control y prevención de la leishmaniasis

Para el control de la leishmaniasis, se tienen en cuenta varios puntos para trabajar contra esta problemática, entre ellos están: i) el control del vector, ii) el control de los reservorios animales, iii) desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas, iv) encontrar herramientas para el diagnóstico temprano, v) acceso al tratamiento para la población afectada. Para el control de los vectores los métodos de elección son la pulverización residual en interiores para moscas de arena endofílicas, el DDT sigue siendo el insecticida de elección para el control de la leishmaniasis. El uso de redes insecticidas duraderas o tratadas con insecticida recomendadas por la OMS, la gestión ambiental, incluido el saneamiento local y la mejora de la vivienda. Se puede explorar el potencial de la ropa tratada con piretroides, cortinas y collares para perros (23- 24). Para el control de los reservorios animales, los métodos utilizados para controlar el reservorio (huésped) de la leishmaniasis zoonótica dependen de qué animales actúen como reservorios, aunque el sacrificio de perros a veces se discute como una forma potencial de reducir la leishmaniasis visceral, esto no se ha probado en ensayos que miden la enfermedad clínica (25). Lo que se refiere a la vigilancia eficaz de la enfermedad, el informe y la investigación de casos y brotes de leishmaniasis no se realizan de manera oportuna en las Américas, por lo que se desarrollan metodologías estandarizadas para evaluar intervenciones y programas de leishmaniasis, así como para generar información para los procesos de toma de decisiones y orientación de acciones (26). En áreas endémicas, el diagnóstico temprano debe hacerse para evitar las complicaciones de la enfermedad crónica. La escasez de apoyo financiero, infraestructura de laboratorio y personas capacitadas son los principales obstáculos en esta realidad. Las pruebas de diagnóstico tradicionales como el análisis de frotis de sangre, el cultivo y la histopatología de la biopsia de piel no siempre son concluyentes en pacientes con diagnóstico clínico de leishmaniasis cutánea. El uso de pruebas serológicas en infecciones experimentales por *Leishmania* es altamente efectivo para la detección de IgG 2 anti- *Leishmania* y el uso de esta prueba para el diagnóstico de enfermedades puede ser útil en pacientes que albergan parásitos (27).

Por otro lado, a pesar de las distintas alternativas terapéuticas que en la actualidad existen para el control de la enfermedad, medicamentos de primera línea que incluyen el antimonio pentavalente, y medicamentos de segunda línea, como la pentamidina y

la anfotericina, estos medicamentos han demostrado ser limitados debido a su alto costo, toxicidad y el aumento de la resistencia al medicamento. Además, algunos estudios han demostrado que la resistencia a los medicamentos es una causa de recaída de infecciones en pacientes con leishmaniasis (28).

1.1.5 Tratamiento de la Leishmaniasis

El tratamiento clásico de la leishmaniasis requiere frecuentemente la administración de fármacos tóxicos y que no son bien tolerados. Los antimoniales pentavalentes, antimoniato de meglumina (Glucantime) y estibogluconato de sodio (Pentostam), son los compuestos de primera línea que se usan para tratar la leishmaniasis. Otros fármacos que pueden usarse incluyen pentamidina y anfotericina B. Sin embargo, la resistencia de los parásitos reduce en gran medida la eficacia de los medicamentos convencionales. En los últimos 15 años, la mala aplicación clínica de medicamentos ha permitido el desarrollo de una resistencia generalizada a estos agentes, además, no existen vacunas eficaces para prevenir la leishmaniasis (29).

Arsenal terapéutico

- **Antimoniales pentavalentes:** se desarrollaron en 1945 y siguen siendo el tratamiento de primera elección para la leishmaniasis visceral y cutánea en la mayor parte del mundo. La elección del tratamiento depende de la especie de *Leishmania* causante, muchos pacientes no respondieron a la medicación con antimoniales pentavalentes, aparte de esto, el hecho de ser muy tóxico y no bien tolerado hace que se busquen nuevas alternativas (30).
- **Anfotericina B:** fármaco antileishmania de segunda línea, aunque requieren ciclos prolongados de administración parenteral, es mucho menos tóxico que los antimoniales pentavalentes pero el alto costo impide su uso generalizado en los países en desarrollo (31).
- **Miltefosina:** se utiliza como agente anticancerígeno, se registró para el tratamiento de VL y CL, la eficacia oral y el corto tratamiento fueron las principales ventajas de este medicamento. Sin embargo, tiene limitaciones importantes en el tratamiento de la leishmaniasis debido a sus efectos teratogénicos y a su larga vida útil, lo que podría favorecer la promoción de la resistencia a los medicamentos

Teniendo en cuenta estos factores, la terapia con medicamentos no ha sido eficaz para erradicar esta enfermedad (32).

1.2 PLANTAS MEDICINALES

El uso de plantas medicinales es tan antiguo como la humanidad misma. El conocimiento del uso de plantas medicinales es el resultado de los muchos años de luchas contra las enfermedades debido a que el hombre aprendió a buscar fármacos en las hojas, corteza, semillas, cuerpos frutales y otras partes de las plantas. La ciencia contemporánea ha reconocido su acción activa, y ha incluido en la farmacoterapia moderna una gama de medicamentos de origen vegetal, conocidos por civilizaciones antiguas y utilizados a lo largo de milenios (33). Una planta medicinal es cualquier planta que, en uno o más de sus órganos, contenga sustancias que puedan utilizarse con fines terapéuticos o que sean precursoras para la síntesis de fármacos útiles. Esta descripción permite distinguir entre plantas medicinales cuyas propiedades terapéuticas y constituyentes se han establecido científicamente, y plantas que se consideran medicinales pero que aún no han sido sometidas a un estudio científico exhaustivo (34).

Se han identificado actividades antiprotozoaria en varios productos vegetales y esto está ganando popularidad en todo el mundo. Un número creciente de ellos ahora está demostrando su valor terapéutico universalmente. La aceptabilidad de los productos vegetales como alternativas depende en gran medida de su validación científica. Una gran cantidad de estudios en la India y en otros lugares han proporcionado evidencia de la presencia de componentes bioactivos a través de la detección *in vitro* e *in vivo* (35).

Puntualmente para el caso de la leishmaniasis, compuestos provenientes de plantas nativas de diversas zonas geográficas donde la enfermedad es endémica han sido estudiados a nivel de sus propiedades anti protozoarias, evaluándose distintas fracciones de extractos con el fin de determinar su potencial actividad leishmanicida, y hallando algunos resultados promisorios en algunos casos. Sin embargo, en este sentido es necesario resaltar que muchos de los tamizajes iniciales llevados a cabo en muchos de los estudios, ha sido sobre la forma flagelar del patógeno, la cual, a pesar de ser el estadio más fácil de manejar *in vitro*, no corresponde al estadio responsable

de la enfermedad, por lo cual la extrapolación de la actividad observada en muchos de los casos sobre la forma intracelular (amastigotes) no se conserva (36).

1.2.1 Antecedentes del género *Solanum*

El género *Solanum*, está representado por aproximadamente 2.000 especies distribuidas en regiones tropicales y templadas del mundo. Muchas especies de la familia de Solanáceas se utilizan ampliamente en la medicina popular o como vegetales. La química de los miembros de la familia Solanaceae son de gran interés debido a la variedad de propiedades biológicas que presenta. Se ha informado que algunas especies de *Solanum* tienen propiedades antiinflamatorias, sedantes, antiespasmódicas, antiepilépticas (37), hipoglucémico, anti-obesidad, reductor del colesterol (36- 37) actividades leishmanicidas y tripanosomales (40). Además, otros estudios demostraron actividad anticancerígena contra células de hepatoma (Hep3B) y células tumorales de líneas pulmonares (H441, H520, H661 y H69) (41).

1.2.2 Metabolitos secundarios en general del género *Solanum*

Los metabolitos secundarios de plantas solanáceas incluyen varios tipos de ácidos fenólicos, alcaloides, flavonoides, taninos, estilbenos, curcuminoides, cumarinas, lignanos, quininas, flavonoles (quercetina-3-rutinósido, quercetina-3-galactósido, quercetina-3-glucósido y quercetina-3-ramnosido), flavonoides (catequina y epicatequina) y antocianinas), terpenoides.

- Alcaloides: son compuestos cíclicos de origen biológico con un átomo de nitrógeno unido a al menos dos átomos de carbono. La presencia del alcaloide solasodina, que es una característica de las plantas *Solanum*, es una materia prima importante para las posibles hormonas esteroides sintéticas. Solasodina y sus formas glicosiladas, como solamargina, solasonina y otros compuestos tienen potencial valor terapéutico. Las especies de *Solanum* se utilizan ampliamente en los sistemas de atención de la salud y representan una fuente de diversos fitoquímicos, incluidos los alcaloides. Desde décadas, los alcaloides de *Solanum* han sido un tema de interés en estudios farmacológicos y terapéuticos debido a la amplia gama de actividades biológicas tales como antimicrobianos, antivirales, antiparasitarios, antirreumáticos, anticonvulsivos,

antiinflamatorios, antioxidantes y anticancerígenos. Tanto *Solanum americanum* como *Solanum sisymbriifolium* están compuestos por alcaloides (42).

- Flavonoides: Químicamente, estas sustancias son de naturaleza fenólica y se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono. Ellos son muy importantes para el desarrollo y buen funcionamiento de las plantas, ya que actúan como atrayentes de animales en la oviposición, como agentes protectores contra la luz UV o contra la infección por organismos fitopatógenos; además, estos compuestos presentan propiedades relacionadas con la salud humana, lo cual está basado en su actividad antioxidante (43). Los flavonoides están presentes en *S. americanum* y *S. sisymbriifolium*, y es un compuesto relacionado con la actividad antimicrobiana (44). Antecedentes de la especie *Solanum paludosum*, la cual presenta flavonoides como metabolito secundario, exhiben que los flavonoides inducen la muerte celular de parásitos de *Leishmania* (45).

Especies del género *Solanum* tradicionalmente se han empleado en otros países para tratar algunas enfermedades. *Solanum incanum* Linn, *S. nigrum*, y *Solanum violaceum* Linn, son usadas como antibacterianas, en procesos inflamatorios, diabetes y desórdenes bucales. *Solanum americanum*, o sombra nocturna de bayas negras en inglés se han utilizado como remedio a base de hierbas para curar diversas dolencias del hígado, trastornos estomacales, asma, tos ferina (46).

1.2.3 Descripción botánica y distribución de las especies

1.2.3.1 Clasificación taxonómica de *Solanum americanum* Mill

a- **Tabla 2.** Clasificación taxonómica de *Solanum americanum* Mill.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Subdivisión	Spermatophyta
Clase	Magnoliopsida (Dicotiledónea)
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Solanum</i>
Especie	<i>Solanum americanum</i>
Nombre Científico	<i>Solanum americanum</i>

b- Descripción botánica

Solanum americanum tiene los lóbulos del cáliz reflejos cuando los frutos son maduros, y tiene anteras cortas de 1-2 mm de largo; en *Solanum nigrescens* los lóbulos del cáliz son más o menos pegados al fruto en la madurez y sus anteras son de 2-4 mm de largo (47).

- Hábito y forma de vida: Planta herbácea, erecta o rastrera.
- Tamaño: Hasta de 1 (1.5) m de alto.
- Tallo: Ramificado, con pelos encorvados hacia arriba o casi sin pelos.
- Hojas: A menudo en pares, siendo una más grande que la otra, sobre pedicelos hasta de 3 cm de largo, lámina lanceolada a ovada, hasta de 8 (15) cm de largo y 4 (5.5) cm de ancho, aguda a acuminada en el ápice, entera a sinuado dentada en el margen, cuneada en la base, con pelos contra la superficie en ambas caras o sin pelos.
- Flores: Con cáliz de 1 a 2 mm de largo, sus lóbulos 5, más o menos del mismo largo que el tubo, ovados a oblongos, doblados hacia abajo en fruto; corola morada o blanca, de 4 a 7.5 mm de largo, sus lóbulos triangulares, mucho más largos que el tubo, pubescentes por fuera; anteras de 1 a 2 mm de largo,

filamentos de menos de 0.5 mm de largo; ovario sin pelos, estilo pubescente en su mitad inferior, por lo general más largo que los estambres.

- Frutos y semillas: Fruto globoso, de 4 a 8 mm de diámetro, negro en la madurez; semillas lenticulares, de más o menos 1 mm de diámetro (48).



Figura 4. *Solanum americanum* Mill. Foto: T. Low © T. Low

c- Distribución geográfica

Una maleza cosmopolita variable en regiones tropicales y templadas cálidas. Por lo general, crece en hábitats alterados asociados con actividades humanas. Se encuentra en Alto Paraná, Alto Paraguay, Amambay, Caazapá, Canindeyú, Central, Cordillera, Guairá, Itapúa, Ñeembucú, Paraguarí, Presidente Hayes, San Pedro (49).

1.2.3.2 Clasificación taxonómica de *Solanum sisymbriifolium* Lam

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Solanum sisymbriifolium* Lam

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Subdivisión	Spermatophyta
Clase	Magnoliopsida (Dicotiledónea)
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Solanum</i>
Especie	<i>Solanum sisymbriifolium</i>
Nombre Científico	<i>Solanum sisymbriifolium</i>

a- Descripción botánica

Solanum sisymbriifolium es una hierba perenne, sufruticosa, con raíz gruesa y tortuosa y tallos erectos, ramificados, lignificados en la base, angulosos, cubierto por una pubescencia de pelos simples y glanduloso y pelos estrellados y con aguijones anaranjados o rojizos de hasta 1.5 cm de largo. Hojas alternas, pecioladas, con pecíolo de 2 a 6 cm de largo, cubiertos de aguijones; lámina de contorno ovado, profundamente pinnatipartida o pinnatisecta, con 4 a 7 lóbulos a cada lado, ovado-triangulares, irregularmente dentados, con aguijones sobre los nervios, de 5 a 10 cm de largo y 3 a 6 cm de ancho. Flores en cimas corimbiformes terminales con los pedúnculos cubiertos por pelos glandulosos, rígidos; cáliz acampanado, 5-secto, con lóbulos agudos, glandulosos y con aguijones en el dorso; corola rotácea, blanca o azulada, de 2 a 2.5 cm de diámetro. Bayas esféricas, anaranjadas o rojizas, de 10 a 12 mm de diámetro (50).



Figura 5. *Solanum sisymbriifolium* Lam. Foto: C. T. Johansson

b- Distribución geográfica

Se encuentra en casi todo el Paraguay: Alto Paraguay, Boquerón, Caaguazú, Central, Cordillera, Guairá, Itapúa, Ñeembucú, Paraguari, Presidente Hayes, San Pedro.

1.3 MACRÓFAGOS EXTRAÍDOS DE RATONES PARA ESTUDIOS DE CITOTOXICIDAD

El ensayo de citotoxicidad *in vitro* determina si un producto o compuesto tendrá efectos tóxicos sobre células vivas, se emplean diferentes métodos de tinción celular con el fin de estimar de manera indirecta el número de células viables presentes después de un tratamiento. Los ensayos de citotoxicidad son típicamente el primer paso a realizar para la identificación y caracterización de los riesgos asociados a algún compuesto en particular, la función de este ensayo es determinar si la actividad de dichos compuestos es específica para los parásitos e inocua para las células de mamíferos o ésta posee una citotoxicidad inespecífica, es decir que su toxicidad no es dirigida únicamente al parásito (51). Los macrófagos son un fenotipo diverso de células fagocíticas profesionales derivadas de precursores de la médula ósea y monocitos parentales en la sangre periférica. Son esenciales para el mantenimiento y la defensa de los tejidos del huésped, ya que detectan y absorben las partículas y, cuando es necesario, inician una respuesta proinflamatoria (52). Los macrófagos están involucrados en todas las etapas de la respuesta inmune y están armados con varios mecanismos para destruir microorganismos dentro de los fagosomas, que incluyen limitación de nutrientes, intermedios tóxicos de oxígeno y nitrógeno, acidificación del

compartimento y fusión de fagosomas con lisosomas que son ricos en enzimas hidrolíticas (53).

La cavidad peritoneal proporciona un sitio de fácil acceso para la recolección de un número moderado de macrófagos residentes no manipulados. Por lo general, el número de macrófagos presentes en el peritoneo es insuficiente para estudios bioquímicos extensos. Para aumentar el rendimiento de macrófagos, se pueden inyectar en la cavidad peritoneal agentes estimulantes estériles, como caldo de tioglicolato de Brewer o peptona de proteosa, o almidón, para la estimulación de producción de macrófagos, en la cavidad peritoneal antes de la recolección de células. Estos agentes aumentan la migración de monocitos hacia el peritoneo y, por lo tanto, aumentan el rendimiento de macrófagos. Sin embargo, tal estimulación podría alterar las características fisiológicas de las células recolectadas. De acuerdo con lo mencionado anteriormente, los ratones BALB/c o ratones albinos son utilizados en este tipo de ensayos, para ello, los ratones libres de patógenos específicos se compran a proveedores comerciales autorizados, estos deben criarse y alojarse en un entorno limpio y libre de patógenos. Es importante utilizar ratones limpios, libres de estrés y no infectados (54).

1.4 EL MODELO DE LA LÍNEA CELULAR THP-1 EN EL ESTUDIO DE LA INFECCIÓN CAUSADA POR PARÁSITOS DE *L. INFANTUM*

THP-1 designa una línea celular similar a monocitos inmortalizada espontáneamente, derivada de la sangre periférica de un caso infantil de leucemia monocítica aguda (subtipo M5). Las células THP-1, incluidos sus derivados modificados genéticamente, representan herramientas valiosas para investigar la estructura y función de los monocitos tanto en la salud como en la enfermedad. Los monocitos circulantes tienen el potencial de diferenciarse en macrófagos tisulares, contribuyendo así a la reserva de macrófagos de origen embrionario y proporcionando ayuda en la fagocitosis de patógenos invasores (55). Las células THP-1 activadas se han utilizado durante mucho tiempo como un sistema modelo versátil para estudiar las respuestas inflamatorias, la apoptosis de la célula huésped y el comportamiento de la autofagia en respuesta a patógenos intracelulares. Se ha descubierto que la línea celular promielocítica humana THP-1 apoya el crecimiento de los parásitos *Leishmania* (56).

En la leishmaniasis visceral, los macrófagos juegan un papel fundamental; son las células residentes primarias y son permisivas para la proliferación de estos parásitos (57). Sin embargo, también se consideran las células efectoras más relevantes, ya que son responsables de la eliminación de *Leishmania* a través de la activación de las vías de señalización inflamatoria y el estallido oxidativo (58). Después de la internalización inicial de promastigotes por macrófagos, se espera la fusión de fagosomas y lisosomas. Sin embargo, *Leishmania* se encuentra entre los pocos parásitos que no solo pueden sobrevivir sino también multiplicarse en este entorno tan inhóspito (59). Para ello, estos parásitos desarrollaron estrategias de gran éxito para manipular el sistema inmunológico. Por tanto, el establecimiento de la infección depende de la eficacia del huésped para inducir la respuesta inmunitaria efectora y de la eficacia del parásito para subvertir la respuesta inmunitaria del huésped (60).

Los ensayos con modelos de macrófagos-amastigotes se consideran los más cercanos a las condiciones fisiopatológicas de la leishmaniasis y, por lo tanto, son los más apropiados para el cribado *in vitro*. Las células de leucemia monocítica aguda humana diferenciadas que no se dividen (THP-1) (hacen una alternativa atractiva) a los macrófagos primarios aislados y pueden usarse para ensayar la actividad antileishmania de diferentes compuestos contra amastigotes intracelulares. Acorde a lo anterior, el trabajo desarrollado por Surendra K, et al. reportaron que el número de parásitos a ser empleados en el inóculo podría ser 2.5×10^6 parásitos de *L. infantum*/ml (para células THP1: proporción de parásitos = 1:10). El uso de líneas celulares humanas proporciona resultados interesantes y distintos, que cuando se trabaja con células de animales, las observaciones experimentales generadas en ratones no se conservan necesariamente en humanos, lo que puede obstaculizar la investigación traslacional. (61).

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Evaluar la actividad antiprotozoaria sobre *Leishmania infantum* de extractos metanólicos de *Solanum americanum* y *Solanum sisymbriifolium*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la actividad citotóxica de extractos metanólicos derivados de *Solanum americanum* y *Solanum sisymbriifolium* sobre macrófagos intra- peritoneales extraídos de ratones.
- Determinar la actividad leishmanicida *in vitro* de los extractos metanólicos de *Solanum americanum* y *Solanum sisymbriifolium* sobre promastigotes de *Leishmania infantum*.
- Determinar la actividad leishmanicida *in vitro* de los extractos fraccionados de *Solanum americanum* sobre promastigotes de *Leishmania infantum*.
- Identificar los metabolitos secundarios del extracto metanólico de *Solanum americanum*.
- Determinar la actividad leishmanicida del extracto metanólico de *Solanum americanum* sobre amastigotes intracelulares de *Leishmania infantum* infectando experimentalmente la línea celular THP-1.

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1 Diseño del estudio: Experimental de fase pre- clínica.

ETAPA	PROCEDIMIENTO
FASE I	Evaluación de la citotoxicidad en macrófagos extraídos de ratones.
FASE II	Evaluación de actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> sobre promastigotes de <i>L. infantum</i>
FASE III	Evaluación de actividad antiparasitaria <i>in vitro</i> sobre amastigotes de <i>L. infantum</i>

3.1.1 Preparación de extractos

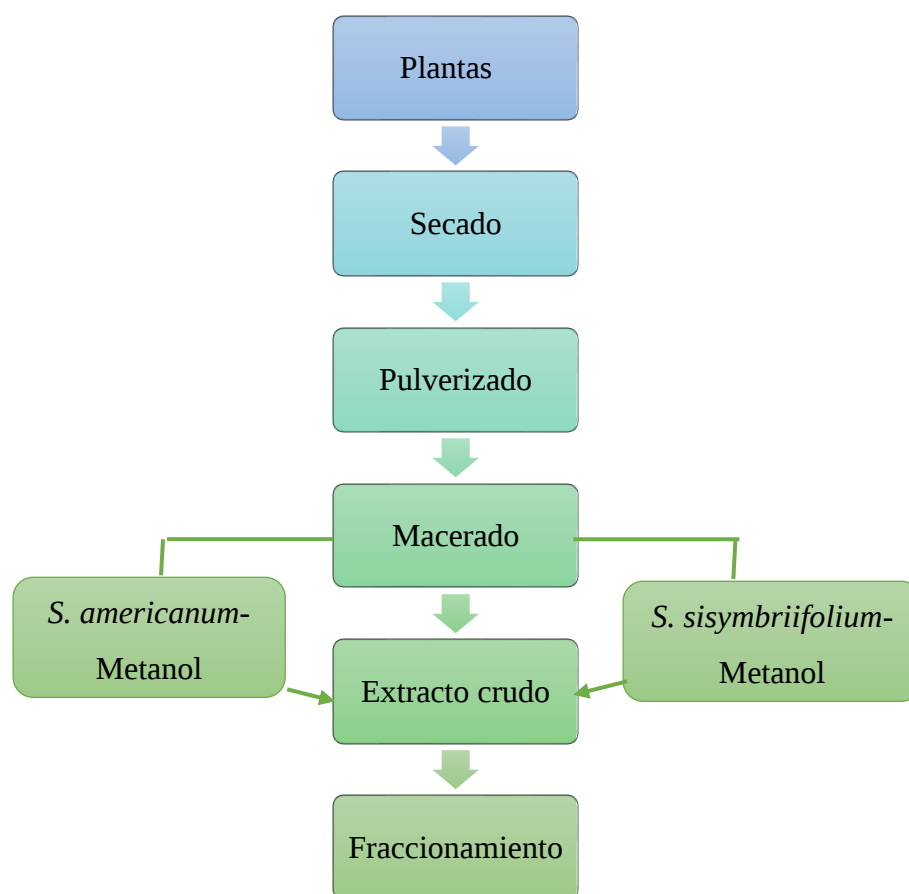


Figura 6. Flujograma de la preparación de extractos para su estudio biológico

3.2 Obtención de material vegetal: Para el desarrollo experimental del presente trabajo, el 27 de marzo del año 2019, se colectaron plantas de la especie *Solanum sisymbriifolium* y *Solanum americanum* en Villa Hayes, Barrio San Jorge, las coordenadas de ésta área son -25.089063,-57.545395, dejando un ejemplar de estas especies vegetales en el Herbario del departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción, bajo los códigos 57486 y 57488, respectivamente (Anexo 1).

En detalle, las plantas *Solanum sisymbriifolium* y *Solanum americanum* se dejaron secar durante 72 horas a la sombra y temperatura ambiente. Luego de que se encontraban secas, fueron pulverizadas con ayuda de un molino y se pesó el material pulverizado. El peso de cada planta se observa en la tabla 4.

Tabla 4. Peso en gramos del material vegetal pulverizado

Planta	Peso
<i>Solanum americanum</i>	78 g
<i>Solanum sisymbriifolium</i>	146 g

Una vez molido y pesado, al material vegetal se le adicionó metanol, 500 mL para *Solanum americanum* y 600 mL para *Solanum sisymbriifolium*, cada material vegetal se sonicó y se filtró por filtración al vacío, este proceso se repitió tres veces, posteriormente el extracto metanólico recolectado se concentró en un evaporador rotatorio a 40°C bajo presión reducida, hasta obtener masas consistentes que posteriormente fueron preservadas en frascos de color ámbar. Se obtuvo 15 g de extracto metanólico crudo de *S. americanum* y 23 g de extracto crudo de *S. sisymbriifolium*. Se almacenaron a temperatura ambiente para su posterior uso.

3.2.2 Obtención de fracciones del extracto metanólico de *Solanum americanum*

El extracto metanólico de *Solanum americanum* se fraccionó con los solventes: hexano (C₆H₁₄), cloroformo (CHCl₃), acetato de etilo (CH₃-COO-CH₂-CH₃) y butanol (H₃C-(CH₂)₃-OH). Se pesó 6 mg del extracto metanólico de *Solanum americanum* y se le adicionó 100 mL de agua destilada, se llevó a un embudo de decantación y se agregó 50 mL de hexano, se separó de su fase acuosa y se filtró por filtración al vacío, se le añadió 1 cucharada de sulfato de sodio para eliminar el exceso de agua, este proceso se repitió tres veces, posteriormente el fraccionamiento con hexano recolectado se

concentró en un evaporador rotatorio a 40°C bajo presión reducida, hasta obtener una masa consistente que posteriormente fue preservada en un frasco de color ámbar. Se procedió igualmente con los solventes cloroformo, acetato de etilo y butanol.

A partir de 78 g de la planta de *S. americanum* se obtuvo 15 g de extracto crudo que representa un rendimiento del 19,3% y un rendimiento de 10% para *S. sisymbriifolium*.

A partir del extracto metanólico de *S. americanum*, se obtuvo 1,08 g de fracción de hexano, 0,7 g de fracción de cloroformo, 0,4 de acetato de etilo y 0,4 de butanol con rendimientos de 2%, 1.98%, 1,3% y 1% respectivamente.

Perfiles cromatográficos de extractos metanólicos de origen vegetal con actividad antileishmania

Se seleccionaron las plantas que presentaban actividad antileishmania y se determinó la presencia de metabolitos secundarios. Para ello, se utilizó el método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

Las muestras se disolvieron en acetonitrilo grado LC/MS (Merck KGaA, acetonitrilo grado LCMS®, Alemania) a una concentración de 10 mg / mL y se filtraron con filtro de nailon para muestras de 0,22 µ de diámetro de poro (Microclar®, Argentina).

Posteriormente se inyectaron en un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas en tándem (Xevo-TQD, Waters Corporation, EE. UU.) con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y en las siguientes condiciones: Para la separación de los compuestos, se utilizó una columna Phenomenex KINETEX core-shell EVO-C18 (2,1 mm x 100 mm, 1,7 µm). La temperatura de la columna se mantuvo a 40 ° C. La fase móvil era MeOH (fase A) y agua (Fase B) (grado LC-MS, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), ambos conteniendo ácido fórmico al 0,1% y formato de amonio 10 mM. La elución se realizó a una velocidad de flujo de 0,3 ml/min en modo de gradiente, como sigue: 0–0,7 min, 80%–80% A; 0,7-3,2 min, 80% -60% A; 3,2–7,6 min, 60% –20% A; 7,6–8,3 min, 20% –0% A; 8,3–10,4 min, 0% –80% A, 10,4–13 min, 80% –80% A. El extracto metanólico y sus fracciones se disolvieron en MeOH LC-MS, se filtraron a través de filtros de jeringa de nailon de 0,22 µm y se inyectaron a 5 mg/ml.

Los espectros de MS se adquirieron utilizando el modo de barrido completo (m/z 80-800, a una velocidad de 2000 m/z por segundo) con ESI como fuente de ionización en los modos de ionización negativa y positiva. Los análisis MS/MS se llevaron a cabo en modo de iones secundarios (tiempo de exploración 0,1 s), seleccionando los compuestos principales para la fragmentación. El gas de colisión fue argón. El gas nebulizador y el gas de secado fueron nitrógeno. Las condiciones de MS fueron las siguientes: el voltaje capilar de electropulverización fue de 2,5 kV, la temperatura de la fuente fue de 150 °C, la temperatura de desolvatación fue de 350 °C, el flujo de gas de cono fue de 80 L/h y el flujo de gas de desolvatación fue de 900 L/h.

Teniendo en cuenta el trabajo hecho anteriormente, la descripción de la metodología utilizada para alcanzar los objetivos del presente trabajo, así como los resultados obtenidos en cada trabajo experimental, se presentarán en este escrito de acuerdo con las fases mencionadas.

3.3 Metodología fase I

3.3.1 Población y muestra.

- **Población animal:** Ratones albinos.
- **Muestra animal:** 4 ratones albinos proveídos por el Bioterio del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS, UNA).

Criterios de inclusión.

- Ratones con buen estado nutricional.
- Ratones sin malformaciones u otras enfermedades.
- Ratones de entre 18 a 20 gramos de peso.
- Ratones con 12 horas de ayuno.

Criterios de exclusión.

- Ratones hembra.
- Ratones que no tengan adecuado peso antes y durante el período experimental.

Método de sacrificio de los ratones

Los ratones fueron sacrificados utilizando el método de eutanasia por agente químico inhalatorio, cuya especie química es el dióxido de carbono (CO₂). El CO₂ es 1,5 veces más pesado que el oxígeno (O₂), no es combustible, es incoloro e indoloro. Aunque hasta la actualidad se han utilizado agentes volátiles para la eutanasia de animales pequeños, la UFAW recomienda el CO₂ como el agente químico más adecuado tanto para el animal, como para el trabajador.

Evaluación de la actividad citotóxica en macrófagos extraídos de ratones

La toxicidad de los extractos metanólicos de *Solanum americanum* y *Solanum sisymbriifolium* fue evaluada utilizando el método de azul tripán que nos permite distinguir las células no viables de las viables expresando en función del porcentaje de estas últimas su viabilidad. Su fundamento consiste en que las células vivas, con membrana citoplasmática íntegra, excluyen el colorante y no se tiñen; en cambio atraviesa en las muertas con lesión de la membrana celular lo que hace que se vean de color azul (62) .

Los macrófagos que se extrajeron de los ratones fueron cultivados en presencia de distintas concentraciones de las soluciones a analizar y transcurridas 48 h de exposición se determinó el porcentaje de células viables presentes.

En detalle, se sacrificaron utilizando el método de eutanasia por agente químico inhalatorio, cuya especie química es el dióxido de carbono (CO₂) 4 ratones sanos obtenidos del bioterio del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud y en ayunas de 12 horas aproximadamente, se desinfectó el abdomen de cada animal con alcohol de 70°. Se despellejó la parte ventral de cada animal, hasta que quede a la vista el peritoneo, con la ayuda de dos pinzas y un bisturí y se inoculó 6 ml de PBS frío en el abdomen y se mezcló dentro del mismo. Se extrajo inmediatamente el contenido con una jeringa y se guardó en un tubo estéril hasta su uso (para estimular y obtener mayor número de macrófagos se inoculó por vía intraperitoneal una solución de almidón al 2 % en solución salina fría 4 días antes del sacrificio). Se centrifugó a 1200 rpm durante 10 min. Se resuspendió en medio RPMI y se contó en cámara de Neubauer (Boeco, Germany), ($2,7 \cdot 10^6$ macrófagos/ ml). (Figura 5).

Se utilizaron macroplacas de 24 pocillos a los cuales se le colocaron laminillas de forma circular previamente sumergidas en ácido nítrico al 3% para mejor adherencia de los macrófagos. Para el conteo se preparó una dilución 1/10 (3500 μ l de RPMI con 10 % de Suero Fetal Bovino + 500 μ l de la solución con células). Se colocaron 100 μ l del medio RPMI conteniendo los macrófagos ($1 \cdot 10^5$ macrófagos /cubre) en cada pozo y se incubaron a 37°C –5% CO₂ durante 3 horas. Se prepararon los extractos a testear: se pesaron 2 mg de cada extracto y se disolvieron con 15 μ L de DMSO y 980 μ L de RPMI. Se realizaron diluciones a concentraciones de producto de 100, 50, 25 y 12,5 μ g. Una vez pasadas las tres horas de incubación se realizó un lavado de los pocillos con medio RPMI de manera que se eliminan los macrófagos que no se adhirieron a las laminillas, se puso en contacto con las diferentes diluciones de los extractos, se tuvo un control negativo de macrófagos con medio RPMI, sin producto a testear. Luego se incubaron nuevamente en estufa a 37°C- 5% CO₂ durante 48 horas. Para la evaluación se utilizó un microscopio invertido y la lectura se realizó con azul tripán al 0.4%. Se contaron 100 macrófagos y se determinó la frecuencia de vivos y muertos. Se comparó con el control positivo. Cada ensayo fue realizado por triplicado en tres (3) experimentos independientes.

Contando con los datos de porcentajes de viabilidad de las células, se procedió a la determinación de la concentración citotóxica 50 (CC₅₀- la concentración citotóxica de los extractos para causar la muerte del 50% de las células viables en el huésped). Se utilizó la prueba de bondad de ajuste de Pearson para determinar si el modelo Probit se ajusta adecuadamente a los datos proporcionados por los experimentos. La CC50 y el límite de confianza del 95% correspondiente se determinaron a partir de una línea de regresión de mortalidad Probit de dosis logarítmica.

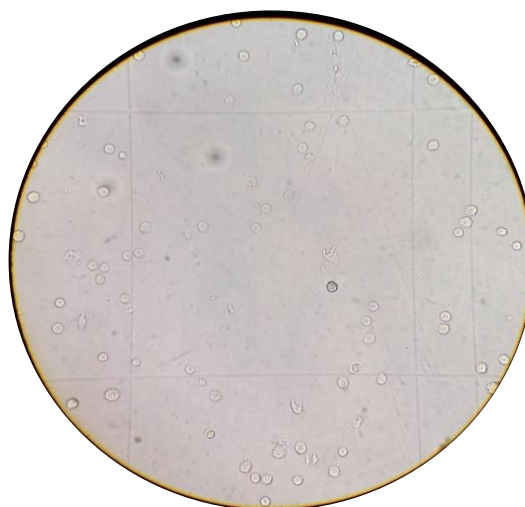


Figura 7. Observación de macrófagos en microscopio óptico con aumento de 40x.

3.3.2 Asuntos Éticos

Todos los procedimientos en los que estuvieron implicados animales fueron realizados en conformidad con los Principios Internacionales, Guías de la Investigación Biomédica que utiliza animales, elaborados por el Consejo de Organizaciones Internacionales de Ciencias Médicas (CIOMS). Este trabajo de tesis fue aprobado por el comité de ética en la investigación de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción, bajo el código CEI 473/19 (Anexo 2). Se utilizó la menor cantidad de ratones posibles y se tomaron las precauciones necesarias para evitar sufrimientos innecesarios de los mismos. Los animales fueron mantenidos en ambiente con temperatura controlada y cantidades adecuadas de alimento y agua.

3.4 Metodología fase II

3.4.1 Obtención de la cepa referencial de *Leishmania infantum*

La cepa MHOM/FR/LEM 75 de *Leishmania infantum* que fue utilizada, corresponde al departamento de Medicina Tropical del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud (IICS). San Lorenzo- Paraguay.

3.4.2 Evaluación de la actividad antiparasitaria *in vitro* de los extractos metanólicos de *Solanum americanum* y *Solanum sisymbriifolium* sobre *L. infantum*.

El efecto antileishmania *in vitro* sobre la forma extracelular flagelar (promastigote) del parásito se evaluó a través del cultivo de promastigotes de *L. infantum* en presencia de diferentes concentraciones de los extractos ya mencionados.

Se utilizó la cepa MHOM/FR/LEM 75 de *Leishmania infantum* referenciales, obtenidas del Departamento de Medicina Tropical del IICS. Se pesaron 20 mg de ambos extractos y se disolvieron en 1000 μ L de DMSO (Dimetil sulfóxido), la cual sería la solución madre. Se tomó 10 μ L de la solución madre y se llevó a 1000 μ L con medio Schneider (Sigma) en un tubo estéril (Deltalab), se obtuvo de esta manera la dilución con DMSO al 0,01%, y se utilizó como control 10 μ L de DMSO disuelto en 1000 μ L de medio Schneider.

Se utilizaron microplacas de 96 pocillos en los cuales se colocó el cultivo de parásitos a una concentración aproximada de 1×10^7 parásitos/ 4 mL de medio Schneider, en cada pocillo se agregó 100 μ L de medio Schneider excepto en la primera concentración del extracto a testear, luego se realizaron diferentes diluciones del extracto de *S. sisymbriifolium* y *S. americanum*: 100 μ g/mL, 50 μ g/mL, 25 μ g/mL, 12,5 μ g/mL, 6,25 μ g/mL y 3,125 μ g/mL. Se incubó en estufa (SANYO) a 28°C durante 72 h y se observaron los parásitos utilizando un microscopio óptico con aumento de 40x. Para cada producto se prepararon por triplicado y utilizando la cepa MHOM/FR/LEM 75 de *Leishmania infantum*, para el control se utilizó el mismo cultivo de parásitos en medio Schneider's también por triplicado. La evaluación se realizó contando el número de parásitos en una cámara de Neubauer, observando lisis de los parásitos y se halló el porcentaje de lisis de parásitos como se describe en la ec. (1). Cada ensayo fue realizado por triplicado en tres (3) experimentos independientes. Los resultados fueron comparados con Anfotericina B descrita en el protocolo.

$$\% \text{ mortalidad: } \frac{\bar{x} \text{ Parásitos muertos}}{\bar{x} \text{ control}} \times 20000 \quad (1)$$

Contando con estos datos se procedió a la determinación de la concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀- es una medida cuantitativa que indica la cantidad de una sustancia que se necesita para inhibir, *in vitro*, un proceso biológico dado o componente biológico en un 50%). Se utilizó la prueba de bondad de ajuste de Pearson para determinar si el modelo Probit se ajusta adecuadamente a los datos proporcionados por los experimentos.

IC₅₀ y el límite de confianza del 95% correspondiente se determinaron a partir de una curva de regresión de mortalidad, usando el método de análisis de Probit. Para la comparación entre grupos se utilizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA)

seguido de la prueba de múltiples comparaciones de Tukey, esto se realizó utilizando el software estadístico GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando los valores de p eran ≤ 0.05 .

Se calculó el índice de selectividad: El índice de selectividad fue calculado con base a la relación de la concentración citotóxica al 50% y la concentración inhibitoria al 50% (CC50/CI50). El extracto que mejor actividad e índice de selectividad frente a promastigotes presentaba, fue fraccionado y utilizado para realizar el perfil cromatográfico y para realizar la fase III.

3.4.3 Evaluación de la actividad antiparasitaria *in vitro* de las fracciones de *Solanum americanum*

Para el ensayo con las fracciones de *Solanum americanum* se procedió de la misma manera descrita anteriormente para los extractos.

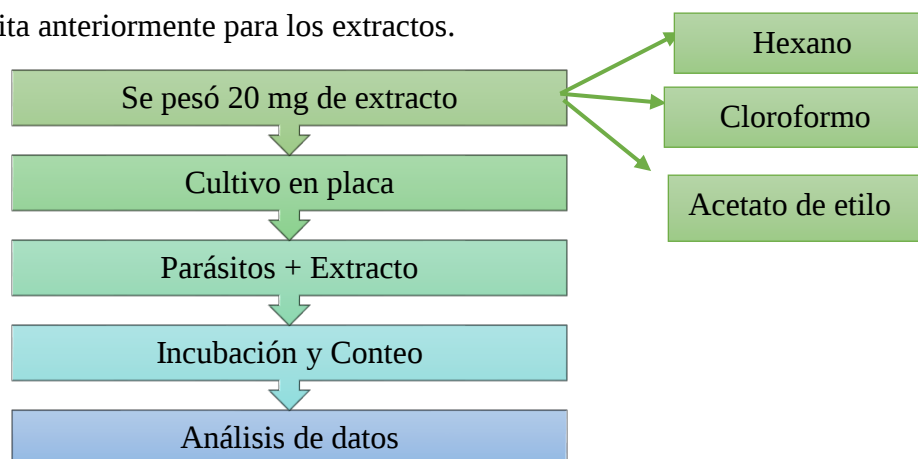


Figura 8. Flujograma de evaluación antileishmania con extractos fraccionados.

3.5 Metodología fase III

3.5.1 Cultivo y diferenciación de THP- 1

La diferenciación de las células THP-1 tipo monocito, fue realizada en el departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas. San Lorenzo- Paraguay.

Se cultivaron en frascos de cultivo estériles de 25 cm², en un medio que contiene medio RPMI-1640 (Central American Merch. Corp) complementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado. Las células THP-1 se sembraron en una placa de cultivo de 24 pocillos a una concentración de 1×10^5 células / mL en medio completo, se trató con 20

μL (0,5 mg/mL) de 4 α -forbol 12-miristato 13-acetato — PMA se incubó durante 48 horas a 37 °C y 5% de CO₂ antes de la infección. PMA fue utilizado para inducir la diferenciación de células THP-1 en células similares a macrófagos y para aumentar sus propiedades fagocíticas.

3.5.2 Cultivo de amastigotes axénicos

Se cultivaron formas promastigotes de la cepa MHOM/FR/LEM 75 de *Leishmania infantum* en la fase exponencial tardía o fase de crecimiento estacionario; se lavó una vez en PBS pH 7,4 y se centrifugó a 2.000 rpm por 10 minutos, se ajustó la concentración a $5,0 \times 10^6$ promastigotes/ mL en medio Schneider suplementado con PBS al 10%, pH 6,3, en un frasco de cultivo celular de 25 cm² mantenido a 34 °C sin CO₂ y se mantuvo los parásitos en estas condiciones durante 24-48 h, o hasta que más del 90% de las formas estén redondeadas.

3.5.3 Evaluación de actividad antiparasitaria *in vitro* sobre amastigotes de *L. infantum* del extracto metanólico de *Solanum americanum*

Para evaluar el efecto de las drogas sobre los amastigotes se determinaron los siguientes parámetros: Porcentaje de reducción de infección e IC₅₀.

Se colocaron los macrófagos axénicos y amastigotes (10 parásitos: célula) en contacto, en una macroplaca de 24 pocillos, a la concentración de 10^5 células: 10^6 parásitos por mL, en medio RPMI-1640 suplementado con PBS al 10%. Se incubaron los parásitos y las células a 34 °C, sin CO₂, durante 16 horas con agitación suave, para permitir la interacción y la infección.

Luego se incubó la placa durante 4 horas a 37 °C en presencia de CO₂ al 5% para la adhesión celular y se añadió 1 mL de medio RPMI-1640 al 20% SBF a cada pocillo después de este período. Se utilizó monocapas de células sin infectar como control positivo, monocapa de células infectadas sin tratar como control negativo, y un control DMSO al 1%. Cada control y compuesto fue analizado por triplicado.

Se pesó 20 mg del extracto de *S. americanum* y se añadió 1000 μL de DMSO. Se tomó 10 μL de la solución madre y se llevó a 1000 μL con medio RPMI- 1640, se realizaron diluciones seriadas para obtener las concentraciones: 100, 50, 25 y 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Se monitoreó hasta 72 horas después de la infección, usando un microscopio óptico y una vez finalizado el experimento, se retiró el medio de cultivo, se fijó los cubreobjetos

con metanol y se tiñó con Giemsa, en la figura 9 se puede observar el resultado de la tinción con Giemsa.

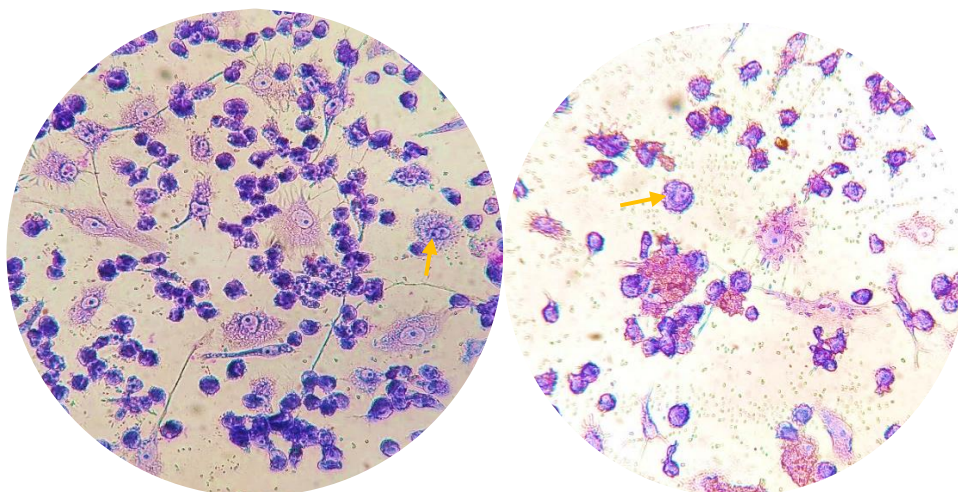


Figura 9. Fotografía microscópica de células THP-1 infectadas experimentalmente con *Leishmania infantum* con aumento de 40x. Células representativas de la infección son mostradas en dónde la flecha amarilla indica la posición del amastigote.

Después del secado, se montó los cubreobjetos en un portaobjetos de vidrio especial. Para analizar el análisis de la variable dependiente (% de reducción de la infección) se aplicó la siguiente fórmula (ec. 2):

$$\text{Porcentaje de reducción de la infección} = 100 - \left(\frac{\bar{x} \text{ infección con tratamiento}}{\bar{x} \text{ control negativo}} * 100 \right) \quad (2)$$

se determinó la tasa de infección mediante un análisis aleatorio de 200 células, evaluando el porcentaje de células infectadas y el número medio de parásitos intracelulares como se visualiza en la ec. 3.

$$\text{Índice de infección} = \frac{\bar{x} \text{ de células infectadas con tratamiento}}{\bar{x} \text{ control negativo}} * 100 \quad (3)$$

Contando con estos datos se procedió a la determinación de la concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀AMA- concentración obtenida sobre amastigotes). Se utilizó la prueba de bondad de ajuste de Pearson para determinar si el modelo Probit se ajusta adecuadamente a los datos proporcionados por los experimentos.

IC₅₀ y el límite de confianza del 95% correspondiente se determinaron a partir de una curva de regresión de mortalidad, usando el método de análisis de Probit. Para la comparación entre grupos se utilizó ANOVA seguido de la prueba de múltiples comparaciones de Tukey, esto se realizó utilizando el software estadístico GraphPad Prism versión 8.0.0 para Windows. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando los valores de p eran ≤ 0.05 .

Se calculó el índice de selectividad: El índice de selectividad fue calculado con base a la relación de la concentración citotóxica al 50% y la concentración inhibitoria al 50% (CC₅₀/IC₅₀).

3.5.4 Declaración de Ética

Una línea celular comercial, línea celular monocítica de leucemia humana (THP-1), obtenida del departamento de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas de la UNA, fue utilizada en este estudio. En este trabajo no se utilizará como sujeto de estudio a humanos, por ende, no precisa de consentimiento alguno. Se trabajará con líneas celulares comerciales, de las cuales se tendrá sus datos de procedencia.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4.1 FASE I: Ensayo de citotoxicidad en macrófagos extraídos de ratones.

La actividad citotóxica inducida por los extractos metanólicos de *Solanum americanum* y *Solanum sisymbriifolium* sobre las células de macrófagos extraídos de ratones albinos fue determinada mediante el método de tinción con azul de tripán.

En el presente trabajo se evidenciaron los niveles de toxicidad y se comparó las CC₅₀ determinadas para cada extracto metanólico. La evaluación de la citotoxicidad de ambos extractos se realizó en células macrófagos extraídas de ratones, cuyos resultados pueden observarse en la tabla 5.

En la figura 11 se muestran las curvas entre las concentraciones del extracto metanólico de *Solanum americanum* y el porcentaje de viabilidad celular de los macrófagos extraídos de ratones, después de 48 horas de exposición, comparándose con el control negativo que consistía en células macrófagos sin tratamiento. El análisis de Pearson mostró una correlación negativa significativa en las células macrófagos evaluadas entre las concentraciones del extracto metanólico de *Solanum americanum* ($r = -0,9475$, $p < 0,05$) y de *Solanum sisymbriifolium* ($r = -0,9364$, $p < 0,05$), y la viabilidad celular en un tiempo prolongado de exposición.

Así mismo, la viabilidad celular, al exponer las células al extracto de *Solanum americanum*, fue de 60% cuando los macrófagos se expusieron a la dosis de 50 µg/mL y 55% cuando se expusieron a la dosis de 100 µg/mL, lo que indica que cuando se aumenta la concentración del extracto metanólico de *Solanum americanum*, la viabilidad celular se ve afectada, pero no de manera significativa. Un porcentaje elevado de viabilidad celular obtenido frente a la exposición de un extracto vegetal o compuesto químico, es indicativo de la baja citotoxicidad que presenta dicho compuesto, lo deseable para cualquier molécula candidata a nuevo fármaco.

De igual forma, lo que corresponde al extracto de metanólico de *Solanum sisymbriifolium*, la viabilidad celular fue de 40% cuando los macrófagos fueron expuestos a la dosis de 50 µg/mL y un 30% con la dosis de 100 µg/mL (Figura 12).

La concentración citotóxica semimáxima o CC₅₀ fue de 98,2 µg/mL para el extracto metanólico de *S. americanum* y de 58,4 µg/mL para el extracto de *S. sisymbriifolium* (Tabla 6).

Tabla 5. Porcentaje de viabilidad celular de los macrófagos expuestos a las diferentes concentraciones de los extractos metanólicos en un tiempo de 48 h.

Extracto	Concentraciones (µg/mL)				
	Control	100	50	25	12,5
<i>S. americanum</i>	92	55	57,8	68	85
<i>S. sisymbriifolium</i>	94,5	25	38	59	69

* Los valores se expresan como (%) de células viables

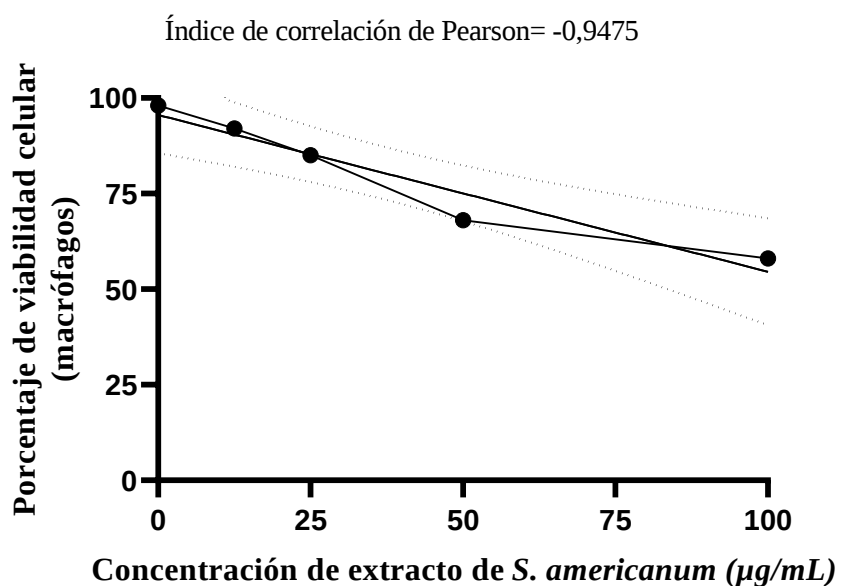


Figura 11. Citotoxicidad de macrófagos extraídos de ratón. Porcentaje de viabilidad celular a las 48 horas de exposición al extracto metanólico de *Solanum americanum*.

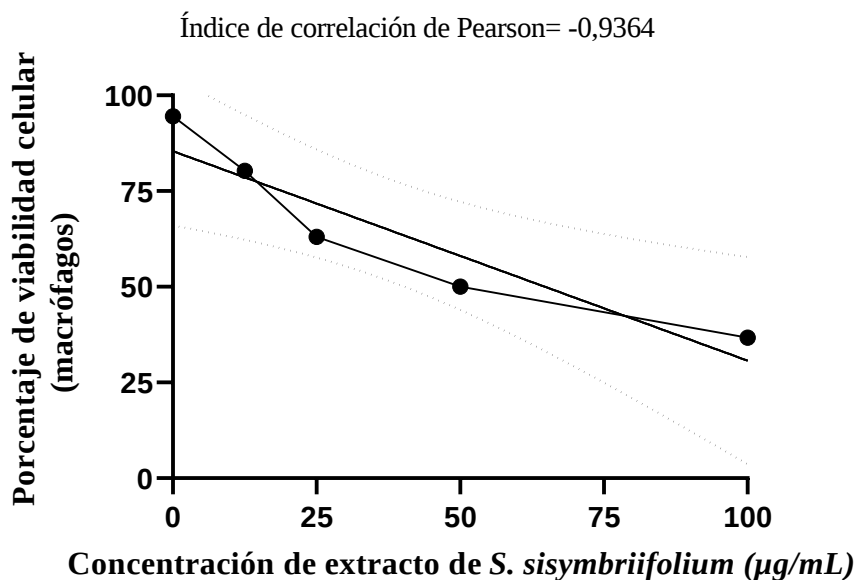


Figura 12. Citotoxicidad de macrófagos extraídos de ratón. Porcentaje de viabilidad celular a las 48 horas de exposición al extracto metanólico de *Solanum sisymbriifolium*.

Tabla 6. Concentración citotóxica de extractos metanólicos de *Solanum americanum* y *Solanum sisymbriifolium* sobre macrófagos.

Compuesto	CC ₅₀ (µg/mL)	Intervalo de confianza (µg/mL)	
<i>S. americanum</i>	98,2	79,56	119,43
<i>S. sisymbriifolium</i>	58,4	44,04	74,98
Anfotericina B	21,3	-	-

La tabla resume los hallazgos obtenidos en los ensayos de evaluación de la actividad citotóxica sobre macrófagos, mostrando la media de los tres (3) experimentos independientes y su correspondiente intervalo de confianza.

4.3 FASE II: Evaluación de la actividad antiparasitaria *in vitro* de los extractos metanólicos de *Solanum americanum* y *Solanum sisymbriifolium* sobre *L. infantum*.

Con relación a la actividad antileishmania sobre la forma promastigote del parásito de *L. infantum*, esto se realizó por conteo con cámara de Neubauer, exponiendo de este modo una cantidad constante de parásitos durante 72 h a diferentes concentraciones de cada uno de los extractos, y controles mencionados anteriormente.

En la tabla 7 se puede observar la actividad antileishmania de los extractos metanólicos, los parásitos estuvieron sometidos a diferentes dosis de los extractos, el porcentaje de mortalidad de parásitos fue estadísticamente significativo con ambos extractos metanólicos, comparando con el control negativo, $p < 0,05$. El control DMSO no sobrepasó el 1%, por lo que no presentó mortalidad de parásitos. (Figura 13).

Para verificar la existencia de diferencias significativas entre la concentración de extracto necesaria para lograr una mortalidad de más de 50% de parásitos, se realizó un análisis ANOVA de dos vías, donde los factores fueron las dosis de extracto utilizadas y los extractos metanólicos y controles utilizados. Los datos obtenidos se muestran en la tabla 8, tanto para las dosis utilizadas, como las especies de plantas de las cuales se obtuvieron los extractos y el control utilizado, existe diferencia significativa en la mortalidad de parásitos ($p < 0,05$). Para el análisis de las diferencias intra grupos, se muestran los resultados de la prueba pos-hoc de Tukey (Tabla 9), que ha demostrado que existe diferencia entre el porcentaje de mortalidad de parásitos con el extracto de *Solanum americanum* y *Solanum sisymbriifolium*, existe también diferencia entre la mortalidad de parásitos con *Solanum americanum* y el control negativo ($p < 0,05$). Existe diferencia estadísticamente significativa entre el control negativo y el extracto metanólico de *S. sisymbriifolium* ($p < 0,05$).

La concentración inhibitoria semimáxima (IC_{50}) fue de 32,1 $\mu\text{g/mL}$ para el extracto de *Solanum americanum* y 76,0 $\mu\text{g/mL}$ para *S. sisymbriifolium*, esto se comparó con la IC_{50} de anfotericina B, descrita en protocolo (Tabla 10). El índice de selectividad (CC_{50}/IC_{50}) obtenido para el extracto metanólico de *S. americanum* fue de 4,7 y para *S. sisymbriifolium* fue de 0,7.

Tabla 7. Porcentaje de mortalidad de las formas promastigotes de *L. infantum* expuestos a diferentes dosis de los extractos metanólicos, en un tiempo de 72 h.

Extracto	Concentraciones ($\mu\text{g/mL}$)						
	C. DMSO	100	50	25	12,5	6,25	3,125
<i>S. americanum</i>	-	90,14	66,70	49,98	9,80	ND	ND
<i>S. sisymbriifolium</i>	-	55,8	25,50	7,75	ND	ND	ND

Control DMSO, ND: No determinado. * Los valores se expresan como (%) de mortalidad de parásitos.

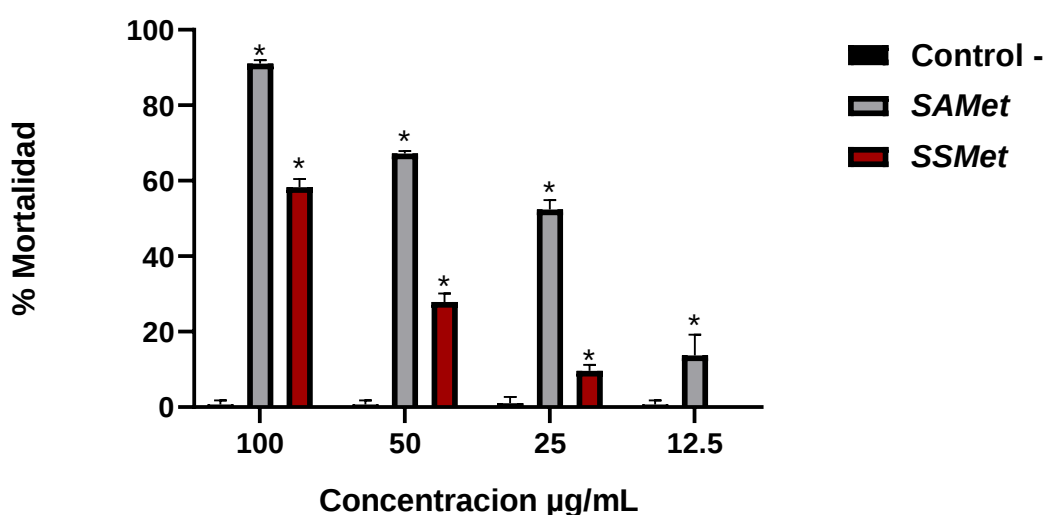


Figura 13. Efecto *in vitro* del extracto metanólico de *S. americanum* y *S. sisymbriifolium* sobre promastigotes de *L. infantum*. El porcentaje de mortalidad se calculó después de 72 h de tratamiento con diferentes diluciones de cada compuesto. El control negativo son promastigotes de *L. infantum* sin tratar. Los datos se expresan como promedios más las desviaciones estándar (DE) para tres experimentos independientes. *: Diferencia significativa en relación con el control negativo de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$). SSMet: Extracto metanólico de *S. sisymbriifolium*; SAMet: Extracto metanólico de *S. americanum*.

Tabla 8. ANOVA de dos factores. Nivel de significancia del 95%.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	5652	6	942,0	252,2	0,000
Extractos	9746	3	3249	467,8	0,000
Dosis	18523	2	9262	24,79	0,000
Residuos	115,3	24	4,805		
Total	34036,3	35			

Tabla 9. Prueba Pos Hoc de Tukey, para determinar diferencias intragrupos entre las especies vegetales utilizadas y el control.

	Diferencia medias	de	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
				Límite inferior	Límite superior
Control – vs. SAMet	-55,32		0,000	-78,30	-32,34
Control – vs. SSMet	-23,17		0,014	-41,36	-4,984
SAMet vs. SS Met	32,15		0,000	22,76	41,54

Tabla 10. Concentración inhibitoria semimáxima, concentración citotóxica e índice de selectividad del extracto metanólico de *S. americanum*, *S. sisymbriifolium* y Anfotericina B.

Compuesto	IC ₅₀ -PRO (µg/mL)	SI	CC ₅₀ (µg/mL)
Extracto <i>S. americanum</i>	21,1 ± 5,68	4,7	98,2 ± 58,8
Extracto <i>S. sisymbriifolium</i>	76,0 ± 28,22	0,7	58,4 ± 31,1
Anfotericina B	0,8 ± 0,01	26,2	21,3 ± 2,5

Concentración IC₅₀ que provocó una disminución del 50% en la viabilidad del parásito, toxicidad en células de mamíferos (concentración del fármaco CC₅₀ que corresponde al 50% de inhibición del crecimiento celular) e índices selectivos (SI= CC₅₀-macrófagos/ IC₅₀-*Leishmania*). Los datos se expresan como promedios más las desviaciones estándar (DE) para tres experimentos independientes.

4.3.1 Evaluación de la actividad antiparasitaria *in vitro* de las fracciones de *Solanum americanum*

Como *Solanum americanum* presentó mejor IC₅₀ y CC₅₀, se fraccionó y a cada una de las fracciones obtenidas se les realizaron evaluaciones biológicas *in vitro* contra promastigotes de la cepa MHOM/FR/LEM 75 de *Leishmania infantum*, con el fin de determinar cuál de estos extractos orgánicos presenta actividad antiparasitaria.

La fracción de cloroformo presentó 85% de mortalidad de parásitos con la dosis de 100 µg/mL, lo cual fue significativo comparando con el control negativo. La fracción de acetato de etilo presentó 75% de mortalidad de parásitos, ambas fracciones no presentaron mortalidad de parásitos con la dosis de 12,5 µg/mL, la fracción de hexano no presentó reducción de parásitos cuando se expusieron a los mismos a las diferentes dosis (Figura 14). Se observó diferencia estadísticamente significativa entre cada fracción de extracto y las dosis utilizadas (Tabla 11). La actividad antiparasitaria de la fracción de butanol no fue determinada por contaminación del extracto, el porcentaje de mortalidad de parásitos fue estadísticamente significativo con las fracciones de cloroformo y acetato de etilo, comparando con el control negativo ($p < 0,05$), no así para la fracción de hexano ($p > 0,05$) (Tabla 12). La concentración inhibitoria semimáxima (IC₅₀) fue determinada para cada fracción, la IC₅₀ de la fracción de cloroformo es de 54,63 µg/mL y la IC₅₀ de la fracción de acetato de etilo es de 66,8 µg/mL, se presentan en la tabla 13 sus valores con las correspondientes desviaciones estándar.

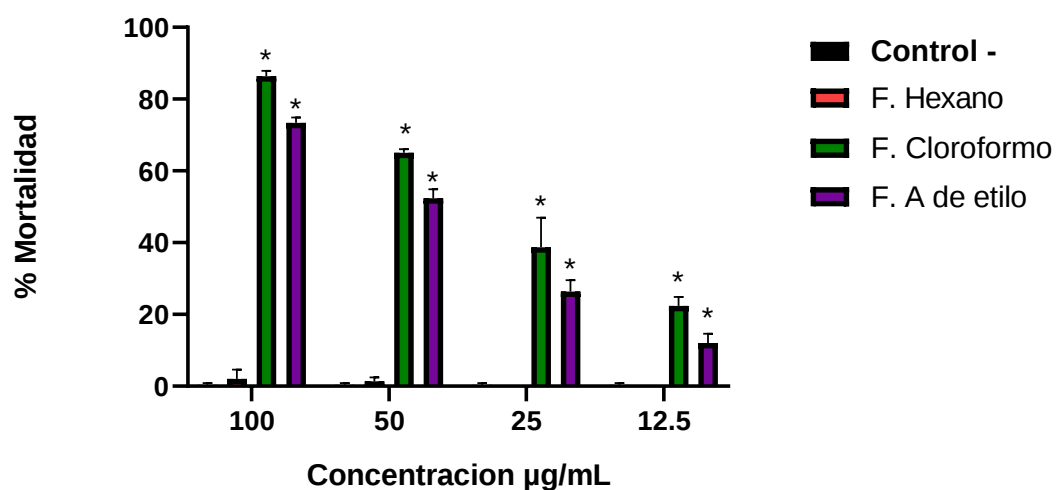


Figura 14. Efecto *in vitro* de las fracciones del extracto metanólico de *S. americanum* sobre promastigotes de *L. infantum*. El porcentaje de mortalidad se calculó después de 72 h de tratamiento con diferentes diluciones de cada compuesto. El control negativo son promastigotes de *L. infantum* sin tratar. Los datos se expresan como promedios más las desviaciones estándar (DE) para tres experimentos independientes. *: diferencia significativa en relación con el control negativo de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Tabla 11. ANOVA de dos factores. Nivel de significancia del 95%.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	6713	9	745,9	104,1	0,000
Extractos	7189	3	2396	334,4	0,000
Dosis	26778	3	8926	1245	0,000
Residuos	229,3	32	7,167		
Total	40909,3	47			

Tabla 12. Prueba Pos Hoc de Tukey, para determinar diferencias intragrupos entre los extractos utilizados y el control.

	Diferencia de medias	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
			Límite inferior	Límite superior
Control – vs. F. Hexano	-0,500	0,9677	-3,461	2,461
Control – vs. F. cloroformo	-52,75	0,000	-55,71	-49,79
Control – vs. F. acetato de etilo	-40,67	0,000	-43,63	-37,71

Tabla 13. Concentración inhibitoria mínima (IC₅₀) de las fracciones del extracto metanólico de *S. americanum*.

Compuesto	IC ₅₀ (µg/mL)
Fracción de Hexano	ND
Fracción de cloroformo	54,63 ± 12,11
Fracción de acetato de etilo	66,8 ± 15,42
Fracción de butanol	ND
Anfotericina B	0,8 ± 0,01

Concentración inhibitoria mínima (IC₅₀) que provocó una disminución del 50% en la viabilidad del parásito. Los datos se expresan como promedios más las desviaciones estándar (DE) para tres experimentos independientes.

4.3.2 Perfil cromatográfico y metabolitos secundarios identificados en el extracto de *Solanum americanum* y las fracciones de cloroformo y acetato de etilo

Posterior a los ensayos de evaluación de actividad antileishmania sobre promastigotes de *L. infantum*, se seleccionaron a los tres extractos que presentaron actividad leishmanicida. El perfil cromatográfico realizado por cromatografía líquida de alta resolución acoplado a un espectrómetro de masas brinda un cromatograma del extracto metanólico de *Solanum americanum* (Figura 15), la identificación de los siguientes compuestos: los flavonoides, Quercetina e Isorhamnetina-3-O-glucósido y los alcaloides solasodina y tomatidinol, la estructura de cada compuesto se observa en la figura 16.

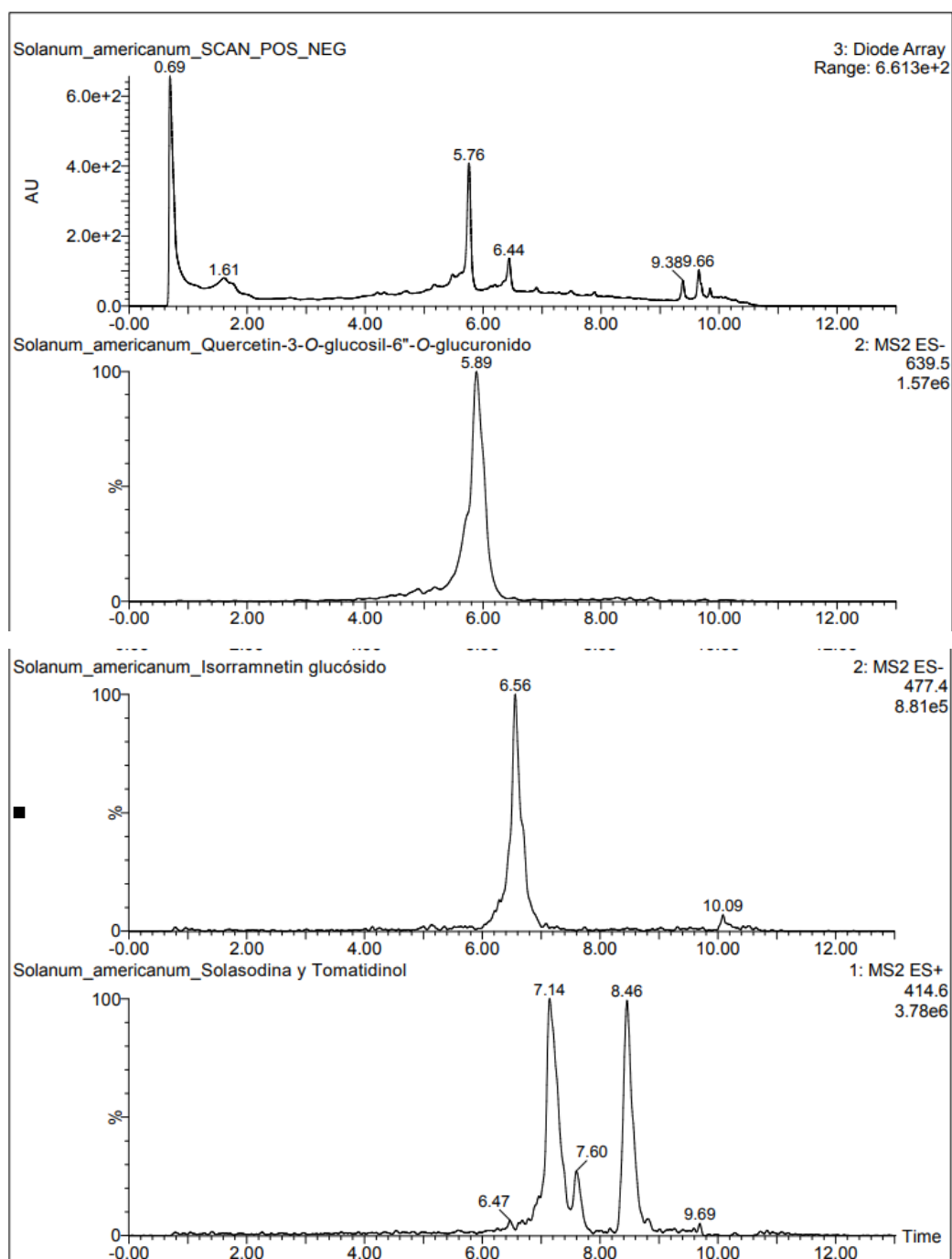
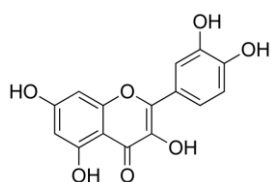


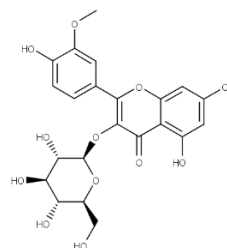
Figura 15. Cromatogramas del extracto metanólico de *Solanum americanum* Quercetina (5,89 min), Isorhamnetina-3-O-glucósido (6,56 min), solasodina (7,14 min) y tomatidinol (8,46 min).

Quercetin 3-O- glucosil- 6''- O- glucurónido

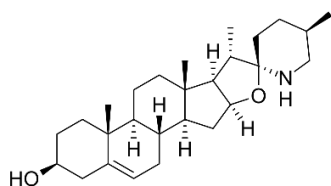


Quercetina

Isoramnetin-3-O-glucósido



Solasodina



Tomatidinol

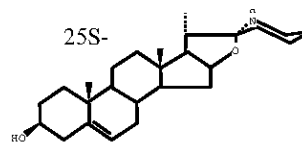


Figura 16. Estructura de compuestos identificados del extracto metanólico de *Solanum americanum*.

En la figura 17 se observan los cromatogramas de la fracción clorofórmica en la cual fueron identificados el triterpenoide ácido betulínico, el éster 2-hidroximetilen-3-metil pentanodioato de 1-metil -5-(3,4,5-trihidroxi6-fenetiloxi-tetrahidropiran-2-il metil) y el compuesto fenólico, lignano, 1- Acetoxi-pinoresinol. La estructura de cada compuesto se observa en la figura 18.

En la figura 19 se observa el cromatograma de la fracción de acetato de etilo en donde se identifican los flavonoides Isoramnetina, Kaempferol y el fitoesterol Beta-sitosterol. Para el caso del Beta- sitosterol, no se pudo diferenciar por el peso si corresponde a este compuesto, o a un isómero. La estructura de cada compuesto se observa en la figura 20.

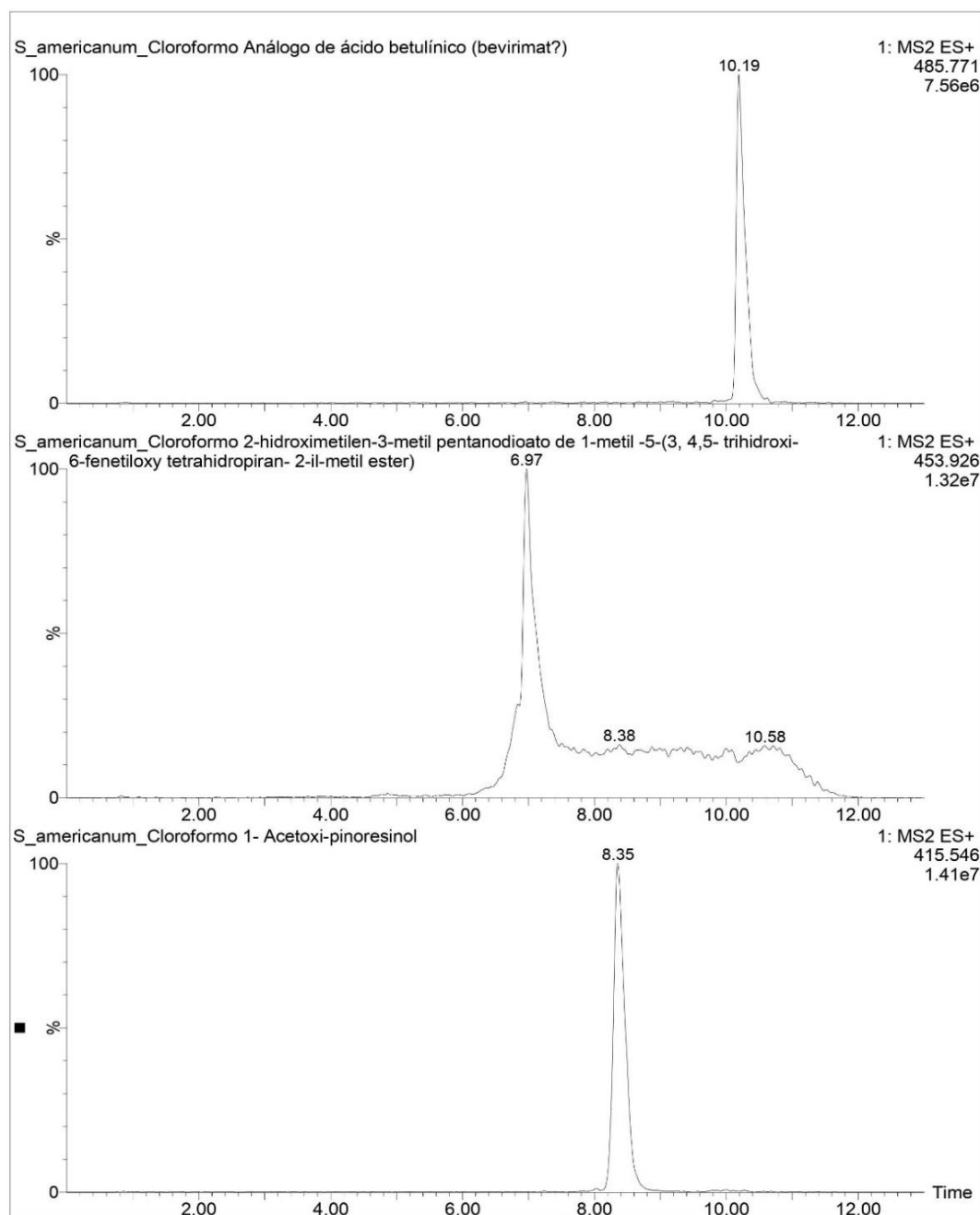
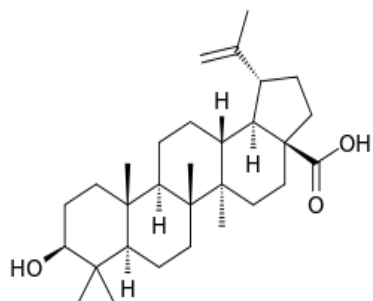


Figura 17. Cromatogramas de la fracción de cloroformo del extracto de *Solanum americanum*. Ácido betulínico (10,19 min), 2-hidroximetilen-3-metil pentanodioato de 1-metil -5-(3,4,5-trihidroxi-6-fenitiloxy-tetrahidropiran-2-il metil) (6,97 min), 1-Acetoxi-pinoresinol (8,35 min).

Ácido betulínico



1- Acetoxi-pinoresinol

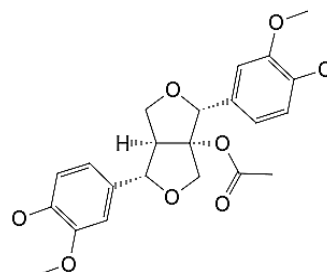


Figura 18. Estructura de compuestos identificados de la fracción de cloroformo de *Solanum americanum*.

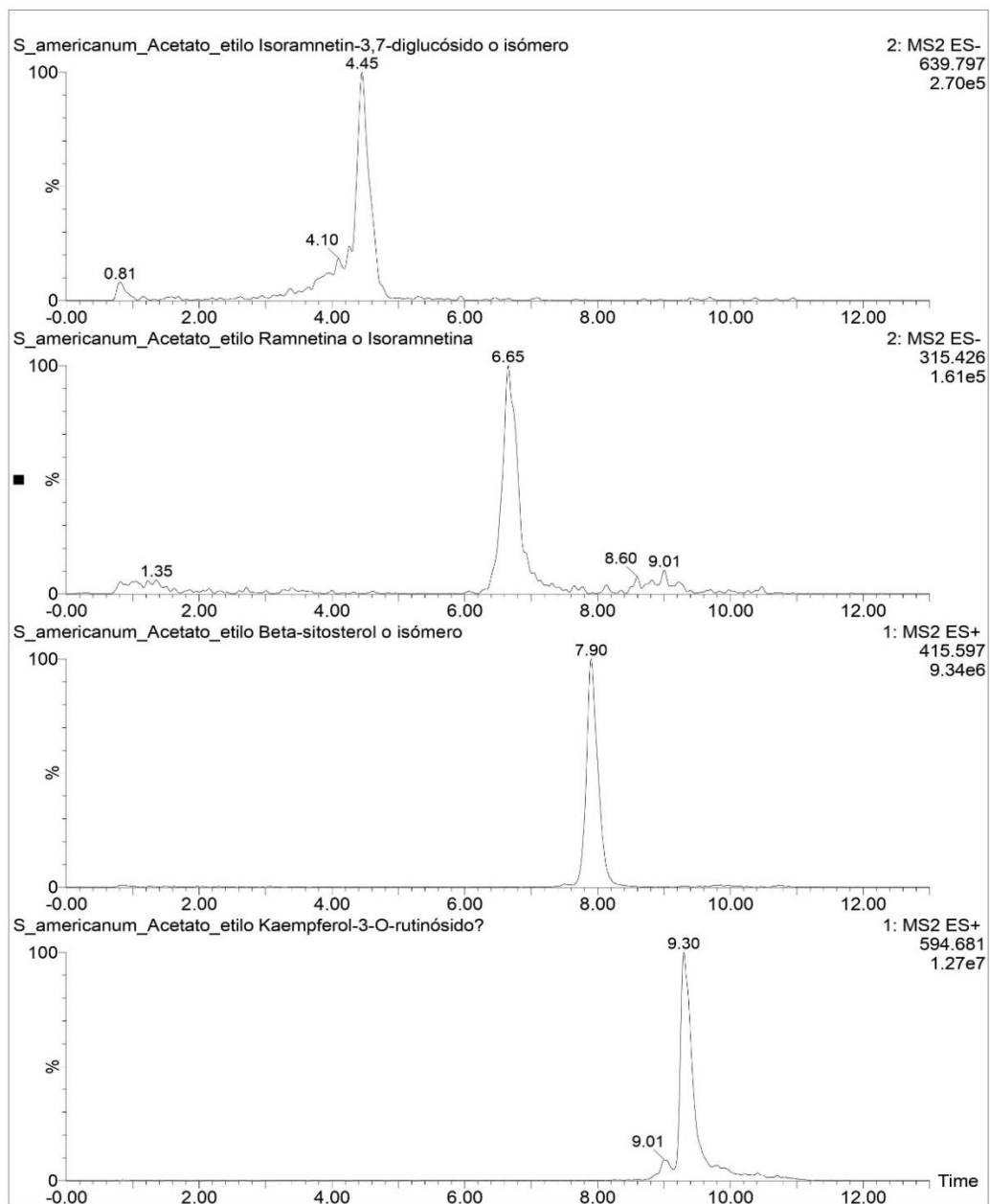
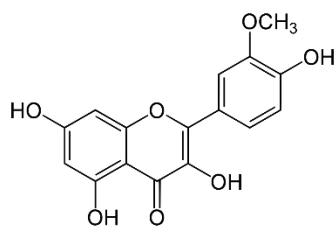
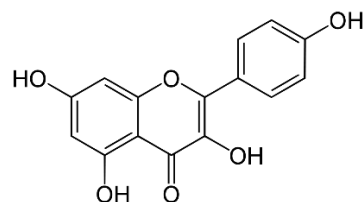


Figura 19. Cromatograma de la fracción de acetato de etilo del extracto de *Solanum americanum*. Isoramnetina (6,65 min), Beta- sitosterol (7,90 min), Kaempferol (9,30 min).

Isorhamnetina



Kaempferol



Beta- sitosterol

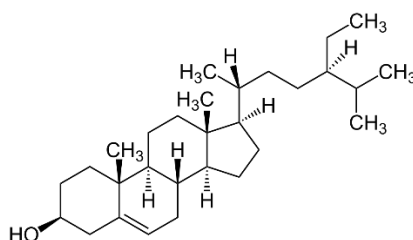


Figura 20. Estructura de compuestos identificados de la fracción de acetato de etilo de *Solanum americanum*.

4.4 FASE III: Evaluación de actividad antiparasitaria *in vitro* sobre amastigotes axénicos de *L. infantum* del extracto metanólico de *Solanum americanum*.

Una vez realizada la infección y el tratamiento, transcurrido el tiempo de incubación se realizó la tinción sobre las laminillas presentes en la placa de 24 pocillos.

El método de microscopía consistió en contabilizar el número de células totales, número de células infectadas y número de células no infectadas, y se realizó una tabla en Excel con los datos obtenidos.

En la tabla 14 se observa el porcentaje de células infectadas con *L. infantum* tratadas con las diferentes concentraciones del extracto metanólico de *S. americanum* y el porcentaje de reducción de la infección.

Se compararon las dosis del extracto metanólico de *S. americanum* con el control negativo. En la figura 21 se observa que no hubo diferencia significativa entre el porcentaje de índice de infección del control negativo vs. control DMSO y el control negativo vs. la dosis de 25 µg/mL, pero si hubo diferencias estadísticamente significativas entre el control negativo y las concentraciones de 100, 50 y 25 µg/mL ($p < 0,05$).

En la tabla 15 se observa la concentración citotóxica semimáxima, la concentración inhibitoria semimáxima y el índice de selectividad del extracto de *S. americanum* y Anfotericina B sobre amastigotes de *L. infantum*, el extracto metanólico presentó una IC₅₀ de 10,8 µg/mL e IS de 9,1.

Tabla 14. Porcentaje de reducción de la infección con el extracto metanólico de *S. americanum*

Concentraciones (µg/mL)	1	2	3	Promedio	% de reducción
Control -	161	180	153	165	-
Control DMSO	135	152	177	154,6	6,3
100	16	55	60	43,6	73,4
50	63	62	63	63	62
25	69	121	70	86,6	41,2
12,5	148	147	130	141,6	14,1

Control -: Control negativo (células infectadas con amastigotes de *L. infantum* sin tratar)

Utilizando la fórmula de la ec. 2 de la página 55, en la figura 20 se puede observar el índice de infección.

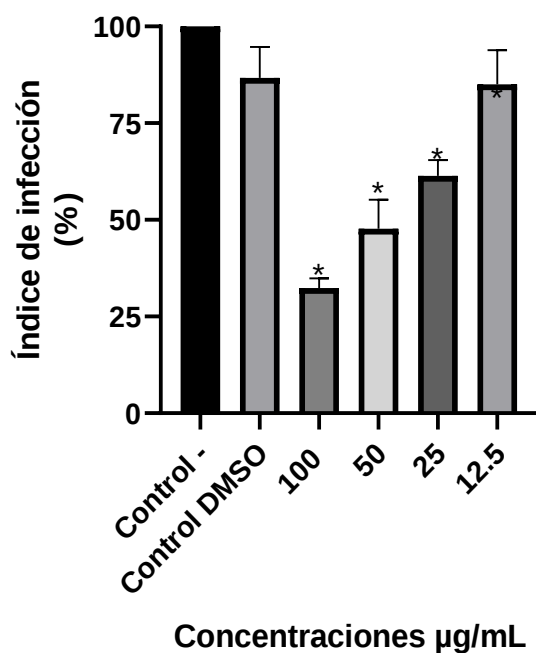


Figura 21. Efecto *in vitro* del extracto metanólico de *S. americanum* sobre amastigotes de *L. infantum*. El índice de infección (nro. de células infectadas/ nro. de células infectadas sin tratar) se calculó después de 72 h de tratamiento. El control negativo son amastigotes de *L. infantum* sin tratar. Los datos se expresan como promedios más las desviaciones estándar (DE) para dos experimentos independientes. *: diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo.

Tabla 15. Concentración inhibitoria semimáxima (IC₅₀) e índice de selectividad del extracto metanólico de *S. americanum* y de Anfotericina B.

Compuesto	IC ₅₀ -AMA (µg/mL)	SI	CC ₅₀ (µg/mL)
Extracto <i>S. americanum</i>	10,8 ± 5,26	9,1	98,2 ± 58,8
Anfotericina B	0,8 ± 0,01	26,2	21,4 ± 2,5

Concentración IC₅₀ que provocó una disminución del 50% en la viabilidad del parásito, concentración CC₅₀ del fármaco que corresponde al 50% de inhibición del crecimiento celular e índices selectivos (SI = CC₅₀-macrófagos / IC₅₀-Leishmania). Los datos se expresan como promedios más las desviaciones estándar (DE) para tres experimentos independientes.

CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

Leishmania infantum es el agente causante de la leishmaniasis visceral, una enfermedad tropical desatendida. Esta enfermedad provoca problemas de salud sustanciales y la muerte de hasta 400.000 personas por año. Estos parásitos generalmente se transmiten entre hospederos vertebrados por la picadura de moscas flebotominas hembra (63).

Los principales fármacos disponibles para el tratamiento de la LV son el antimonio pentavalente, la anfotericina B y la miltefosina, pero, considerando la baja eficacia de estos fármacos disponibles para el tratamiento, la toxicidad que causa y la resistencia desarrollada por parásitos; la investigación de productos naturales, principalmente debido a las propiedades de los compuestos bioactivos que se encuentran en los extractos crudos de plantas medicinales, puede conducir al descubrimiento de nuevas terapias con alta eficiencia que serían seguros y a los cuales tendrían fácil acceso los pacientes (64). Existen plantas medicinales que son alternativas en el desarrollo de nuevos agentes antileishmaniales. Se ha indicado que estos materiales que se encuentran en la naturaleza exhiben una acción selectiva contra los parásitos sin reducir la viabilidad de la célula huésped. También están más disponibles para poblaciones aisladas en comparación con la farmacoterapia tradicional (65).

En este estudio se determinó la actividad antiparasitaria *in vitro* de los extractos metanólicos de *S. americanum* y *S. sisymbriifolium* y las fracciones de *S. americanum*, así como también se evaluó la citotoxicidad que presentan estos extractos y el perfil cromatográfico para identificar los compuestos presentes en estos. El metanol se eligió debido a que uno de los solventes mayormente utilizado en el monitoreo de plantas con actividad antimicrobiana o antiparasitaria, por su excelente capacidad para extraer sustancias tanto lipídicas como hidrosolubles.

Las IC₅₀, CC₅₀ e índice de selectividad de los extractos metanólicos de *S. americanum* y *S. sisymbriifolium* se evaluaron con el fin de determinar su actividad antileishmania. En la fase I, los resultados obtenidos, el extracto metanólico de *S. americanum* con un rendimiento del 19,3%, presentó una CC₅₀ de 98.2 µg/mL, presentando alta viabilidad de macrófagos, aún con la dosis más alta que fue de 100 µg/mL, en comparación con

el extracto metanólico de *S. sisymbriifolium* con rendimiento del 15,8% que presentó CC_{50} de 58.4 $\mu\text{g/mL}$, es decir, a esa dosis, se observaba un número reducido de células vivas. En la tabla 5 se puede observar que, a la dosis más alta, el extracto metanólico de *S. sisymbriifolium* presentó un 70% de reducción de células vivas comparando con el extracto de *S. americanum* en el cual, a la dosis más alta, la viabilidad celular sólo se redujo un 40%.

En las figuras 11 y 12, el análisis de Pearson mostró una correlación negativa significativa en los macrófagos evaluados entre las concentraciones del extracto metanólico de *Solanum americanum* ($r = -0,975$, $p < 0,05$) y de *Solanum sisymbriifolium* ($r = -0,9364$, $p < 0,05$), lo cual significa que ambos extractos presentaron un buen ajuste, la correlación es menor a cero, es decir, las variables se relacionan inversamente, existe un incremento en la tasa de muerte celular al aumentar la dosis en un tiempo constante y prolongado de exposición. La disminución en la viabilidad celular, evaluada con azul de tripán, puede ser causada por la inducción de daños estructurales o alteraciones en las funciones básicas celulares que conducen a la muerte celular por apoptosis o necrosis.

En estudios realizados anteriormente, se observó una mayor citotoxicidad al aumentar las concentraciones de extracto de *Solanum americanum* y se observó que el valor de la concentración citotóxica del 50% del extracto de metanol es el más bajo, en comparación con otros solventes (66). *S. sisymbriifolium* podría presentar mayor nivel de citotoxicidad debido a que fue utilizada la planta en su totalidad, autores sugieren que las hojas de *S. sisymbriifolium* presentan alta toxicidad (67).

La anfotericina B tiene una tasa de curación de 97% para leishmaniasis visceral, es decir, proporciona una actividad leishmanicida significativa, y su uso produce menos fracasos y recaídas del tratamiento. Sin embargo, los importantes efectos secundarios, principalmente la nefrotoxicidad, que produce este fármaco cuando se administra a dosis terapéuticas, han llevado a menudo a su rechazo como tratamiento de primera elección (68). En la tabla 6 los valores de CC_{50} de los extractos metanólicos son menores al comparar con el valor de la CC_{50} de Anfotericina B, fármaco de elección en el tratamiento de la leishmaniasis altamente tóxico dependiendo de las dosis

administradas. Recién a dosis altas del extracto metanólico de *Solanum americanum* se observa una disminución de células vivas.

En la fase II, el ensayo de evaluación de la actividad antiparasitaria se puede observar en la tabla 7, que el extracto metanólico de *S. americanum* produjo un 90% de mortalidad de parásitos con la dosis más alta estudiada en este trabajo comparando con el control negativo, *S. sisymbriifolium* presentó una reducción del 55% de parásitos de *L. infantum* a altas dosis, y ya no presentaba actividad antileishmania a la dosis de 12.5 µg/mL. *S. americanum* presentó actividad antileishmania con las dosis de 100, 50, 25 y 12,5 µg/mL, como $p < 0.05$ para ambos extractos, se evidencia claramente que existe diferencia significativa con el control (Figura 13).

La actividad mostrada por el extracto metanólico de *S. americanum* se podría atribuir a que posiblemente, ante la exposición al compuesto, el material genético del parásito presenta sensibilidad. Aún no se conoce el mecanismo de acción antiparasitaria del extracto, pero puede deberse a su estructura química, a los metabolitos secundarios que presenta esta planta (69). El índice de selectividad (SI) es un gran indicador de la actividad de un compuesto herbal. El IS de un compuesto de hierbas es un parámetro ampliamente aceptado que se utiliza para expresar la eficacia *in vitro* de un compuesto en la inhibición de la multiplicación del parásito (70).

En la tabla 10 se puede observar que al utilizar las mismas dosis del extracto metanólico de *S. sisymbriifolium* en el ensayo de citotoxicidad y el ensayo de evaluación antiparasitaria *in vitro* sobre *L. infantum*, con CC_{50} de 58,4 µg/mL y una IC_{50} de 76,0 µg/mL, presenta un índice de selectividad de 0,7, es decir, tiene selectividad por la célula y no por el parásito; por el contrario, *S. americanum*, presenta una diferencia significativa en las dosis utilizadas en ambos ensayos, la CC_{50} de 98,2 y la IC_{50} de 21.1, se puede observar un índice de selectividad de 4,7, esto demuestra que es selectivo por el parásito de *L. infantum* y no por el huésped. El volumen de DMSO utilizado en todos los ensayos no superaba el 1%, lo cual indica que no influyó en la viabilidad celular y mortalidad de parásitos.

Si bien el índice de selectividad de anfotericina B es 21,6, la alta toxicidad que presenta es lo que evidencia que el extracto metanólico de *S. americanum* puede ser un prometedor agente leishmanicida. Además la determinación del valor de significancia de los índices de selectividad es arbitrario, y muchos grupos de investigación lo consideran como promisorio cuando es superior a 10, otros grupos sostienen que índices de selectividad significativos están representados por cualquier valor, equivalente a, por lo menos, dos veces menor a la concentración letal o inhibitoria 50 (71).

Es importante tener en cuenta que por tratarse de extractos metanólicos, variables como la proporción de los compuestos que sean responsables de la actividad leishmanicida y la presencia de antagonistas, pueden ser trascendentales para vislumbrar su verdadero potencial antileishmania (72) y podrían ser los responsables de la actividad observada en este extracto; no obstante, sus acciones pueden estar limitadas por la presencia de antagonistas.

Las concentraciones utilizadas para el ensayo de citotoxicidad y para el ensayo *in vitro* con las formas promastigotes de *L. infantum*, pudo haber ocasionado un IS menor a 10, ya que se ha visto que en estudios anteriores el extracto metanólico de *S. americanum* presentaba buen índice de selectividad y buena actividad leishmanicida (73). También se ha reportado, para el caso de extractos y/o compuestos con potencial leishmanicida, IS arbitrarios, considerándose un valor ≥ 2 como eventualmente significativo, dado que dicho valor corresponderá a la necesidad de requerirse 2 o más cantidad de producto para tener un efecto sobre el parásito antes de inducir efectos deletéreos sobre la célula hospedera, efectividad/seguridad, respectivamente (74).}

De las fracciones obtenidas del extracto de *Solanum americanum*, las fracciones que presentaron actividad leishmanicida fueron la de cloroformo con una IC_{50} de 54.638 $\mu\text{g/mL}$ y la de acetato de etilo con IC_{50} de 66.793 $\mu\text{g/mL}$ (tabla 13), en la figura 14 se observa que el porcentaje de mortalidad de parásitos de *L. infantum* de ambas fracciones es alto, comparando con el fármaco de referencia Anfotericina B (IC_{50} 0.8 $\mu\text{g/mL}$), es estadísticamente significativo el porcentaje de mortalidad. El DMSO

0,01% no influyó en los resultados obtenidos. Con la fracción de hexano no se observó mortalidad de parásitos de *L. infantum*.

En la Figura 15 se identifican los compuestos presentes en el extracto de *S. americanum*, el cual presentó mejor actividad antileishmania y de viabilidad celular en el estudio de citotoxicidad. En la figura 16 se observan las estructuras de los compuestos presentes en el extracto metanólico de *Solanum americanum*.

Los metabolitos secundarios de las especies vegetales con actividad antileishmaniásica incluyen flavonoides. Se ha demostrado que dos biflavonas de *Podocalyx loranthoides* fueron moderadamente activas contra promastigotes de *Leishmania sp*, y se han reportado otros flavonoides, además de alcaloides y triterpenos, con capacidad leishmanicida. En estudios previos se ha visto que la solasodina, el alcaloide presente en *S. lycocarpum*, presentó actividad *in vitro* sobre amastigotes de especies de *Leishmania* (75). *Solanum americanum* también está constituido por el alcaloide solasodina, este compuesto podría ser —en parte—, el responsable de la actividad antileishmania sobre amastigotes de *L. infantum*, pero para confirmar se requeriría aislar el compuesto y evaluar su actividad leishmanicida.

En la figura 17 se observa el cromatograma de la fracción clorofórmica de *S. americanum* y en la figura 18 la estructura de estos compuestos, el triterpenoide ácido betulínico, el compuesto fenólico: 1- Acetoxi-pinoresinol. Los metabolitos identificados para la fracción clorofórmica son similares a los encontrados en la fracción de diclorometano, debido a que presentan polaridad similar. En estudios anteriores se ha visto que la fracción clorofórmica de *S. americanum* presenta actividad antiinflamatoria, esto puede deberse a los flavonoides presentes en la fracción (76). También se ha visto que el triterpenoide ácido betulínico presenta actividad antileishmania sobre *L. amazonensis* y presenta también actividad tripanocida (77). El 1-acetoxipinoresinol es un lignano, se atribuyen a los lignanos efectos antioxidantes que ayudan a combatir los efectos de los dañinos radicales libres.

En la figura 19 se observa el cromatograma de la fracción de acetato de etilo de *S. americanum* y en la figura 20 las estructuras de estos compuestos. Estudios anteriores

han demostrado que la fracción de acetato de etilo de *S. ovalifolium*, la cual contiene flavonoides presenta actividad antileishmania sobre parásitos de *L. infantum*, la fracción de acetato de etilo de *S. americanum* también está constituido por flavonoides: Isorhamnetina y Kaempferol.

En la fase III, la evaluación antiparasitaria del extracto metanólico de *S. americanum* sobre amastigotes de *L. infantum*, en la tabla 14 se describen los valores obtenidos del método de conteo en microscopio, se evidencia que, a medida que aumenta la concentración del extracto, es más alto el porcentaje de reducción de parásitos; con la concentración de 100 µg/mL, hay un 71% de reducción de células THP-1 infectadas con amastigotes y disminuye a medida que se reduce la concentración del extracto. En la figura 20, se evidencia que existe diferencia estadísticamente significativa entre las distintas concentraciones, comparando con el control negativo (células infectadas sin tratamiento). En la tabla 15, el valor de IC₅₀ es de 10,8 µg/mL, comparando con la IC₅₀ que se obtuvo con la forma promastigote, se puede observar que se obtuvo un valor menor de IC₅₀ con la forma amastigote, y un índice de selectividad de 9,1.

Estos resultados son prometedores al tratarse de un extracto, ya que comparando con Anfotericina B, el fármaco de referencia contra la leishmaniasis, el extracto de *S. americanum* presentó alta actividad leishmanicida.

La actividad antileishmania observada podría atribuirse —en parte— a los alcaloides, que representan los componentes principales de las especies de *Solanum*. El importante efecto antileishmania de la solamargina y la solasodina, los principales alcaloides presentes en *S. lycocarpum* mostraron actividad *in vitro* hacia amastigotes de *L. amazonensis* (78). Como en este estudio se identificó, *S. americanum* también está constituido por el alcaloide solasodina.

Este estudio estableció resultados satisfactorios en la eliminación del parásito de *Leishmania infantum* tanto sobre la forma promastigote como sobre la forma amastigote. Por lo tanto, el extracto metanólico de *S. americanum* puede considerarse un compuesto de hierbas eficaz e inofensivo para matar el parásito sin toxicidad para los macrófagos del huésped. También teniendo en cuenta estos resultados, las

fracciones de cloroformo y acetato de etilo mostraban una actividad antileishmania prometedora, por lo que se sugiere realizar más estudios sobre su actividad aislando los metabolitos secundarios identificados en este estudio.

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

En función al análisis efectuado se concluye que:

FASE I: Tanto el extracto metanólico de *S. americanum* (CC₅₀ de 98,2 µg/mL), así como el extracto metanólico de *S. sisymbriifolium* (CC₅₀ de 58,4 µg/mL), no presentan actividad citotóxica sobre macrófagos, comparando con Anfotericina B.

FASE II (Evaluación antiparasitaria): El extracto metanólico de *S. americanum* presenta actividad antileishmania sobre promastigotes de *L. infantum* a distintas concentraciones (100, 50, 25, 12,5 µg/mL) con una IC₅₀ de 21,1 µg/mL. El extracto metanólico de *S. sisymbriifolium* presenta IC₅₀ de 76,0 µg/mL, mostrando solo a dosis altas actividad antileishmania.

El extracto metanólico de *S. americanum* presentó un índice de selectividad (IS) de 4,7, lo que indica que tiene mayor selectividad por el parásito que por la célula.

FASE II (Fraccionamiento y cromatografía): Tanto la fracción clorofórmica como la fracción de acetato de etilo presentaron actividad antileishmania con IC₅₀ de 54,6 y 66,8 µg/mL, respectivamente. Por otro lado, el perfil cromatográfico del extracto metanólico de *S. americanum* y las fracciones de cloroformo y acetato de etilo demostró que cuentan con alcaloides como solasodina y tomatidinol, flavonoides como Quercetina e Isorhamnetina, también fitoesteroles, compuestos bioactivos con actividad antiparasitaria. Por lo tanto, se sugiere que estos compuestos identificados en el trabajo puedan considerarse, una vez aislados y realizados los ensayos de rigor, como cabezas de series para el diseño de fármacos en el tratamiento de la leishmaniasis.

FASE III: Los datos en esta fase sugieren que el extracto metanólico de *S. americanum* presentó actividad antileishmania contra las formas amastigotes de *L. infantum*, las formas más relevantes de Leishmaniasis visceral, con IC₅₀ de 10,8 µg/mL. El índice de selectividad (IS) obtenido fue de 9,1, mayor al obtenido en el ensayo de evaluación sobre promastigotes, lo cual reafirma que *S. americanum* es un candidato prometedor para potenciales fármacos en el tratamiento de la leishmaniasis.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yaluff G, Maldonado M, Ferreira ME, Benítez B, López T, Vera N. Actividad antiparasitaria in vitro de extractos etanólicos de *Erythrina crista-galii* L., *Erythrina falcata* Benth y *Erythrina dominguezii* Hassl. *Memorias del Inst Investig en Ciencias la Salud*. 2015;13(2):60–066.
2. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Research*. 2017;6:750.
3. Kasper. D.Hauser, L. Jameson. J, Fauci. A, Longo. D, Loscalzo J. Principios de Medicina Interna. Harrinson Principios de Medicina Interna. 2015. 1387–1394 p.
4. CENAPRECE. Manual para el diagnostico, tratamiento y control de la leishmaniasis. Centro Nacional de vigilancia epidemiologica y control de enfermedades. 2015.
5. Chow C, Cloutier S, Dumas C, Chou M-N, Papadopoulou B. Promastigote to amastigote differentiation of *Leishmania* is markedly delayed in the absence of PERK eIF2alpha kinase-dependent eIF2alpha phosphorylation. *Cell Microbiol*. 2011;13(7):1059–77.
6. Barrio A, Parodi CM, Locatelli F, Mora MC, Basombrío MA, Korenaga M, et al. *Leishmania infantum* and human visceral leishmaniasis, Argentina. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(2):354–5.
7. Martinez PA, Petersen CA. Chronic infection by *Leishmania amazonensis* mediated through MAPK ERK mechanisms. *Immunol Res*. 2014;59(1–3):153–65.
8. Ministerio de Salud Pública. Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2018.
9. Giménez Ayala A, Ruoti M, González-Brítez N, Torales M, Rojas de Arias A. Situación epidemiológica de las leishmaniosis y percepción de actores claves en el departamento de Alto Paraná, Paraguay. *Mem Inst Investig Cienc Salud*. 2017;15(2):85–96
10. Kloos H, Zein ZA. The ecology of health and disease in Ethiopia. 1st ed. London, England: Routledge; 2019.

11. Pereira Á, Pérez M. Leishmaniosis. *Offarm*. 2002;21(9):116–24.
12. CDC - Centers for Disease Control and Prevention; CDC - Leishmaniasis. *Parasites - Leishmaniasis*. 2018.
13. Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasit Vectors*. 2020;10(1):82.
14. Burchmore RJS, Barrett MP. Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *Int J Parasitol*. 2001;31(12):1311–20.
15. Harhay MO, Oliaro PL, Costa DL, Costa CHN. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. *Trends Parasitol*. 2011 Sep;27(9):403–9.
16. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004;27(5):305–18.
17. WHO. Control of the leishmaniasis. 2010. 1–46 p.
18. Pan American Health Organization. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas, December 2020.
19. Di Muccio T, Scalone A, Bruno A, Marangi M, Grande R, Armignacco O, et al. Epidemiology of Imported Leishmaniasis in Italy: Implications for a European Endemic Country. *Rafati S, editor*. 2015;10(6):418.
20. WHO. Epidemiological situation. WHO. 2020.
21. WHO-PAHO. Leishmaniasis Informe Epidemiológico de las Américas 2019. *Inf Leishmaniasis*. 2019.
22. WHO. Leishmaniasis in the WHO european region. *World Heal Organ*. 2014.
23. WHO. Vector control. WHO. 2018.
24. Kishore K, Kumar V, Kesari S, Dinesh DS, Kumar AJ, Das P, et al. Vector control in leishmaniasis. *Indian J Med Res*. 2006;123(3):467–72.25
25. González U, Pinart M, Sinclair D, Firooz A, Enk C, Vélez ID, et al. Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis. *Cochrane database Syst Rev*. 2015;5(8):736.
26. WHO-PAHO. PLAN OF ACTION TO STRENGTHEN THE SURVEILLANCE AND CONTROL OF LEISHMANIASIS IN THE AMERICAS. 2017.
27. Espir TT, Guerreiro TS, Naiff M de F, Figueira L de P, Soares FV, da Silva SS, et al. Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Amazon. *Exp Parasitol*. 2016;167: 1–628.

28. Ghorbani M, Farhodi R. Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy?. *Drug Design, Development and Therapy*. Dove Medical Press Ltd. 2018;12(4):25–40.
29. Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, Nakamura C V. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int J Infect Dis*. 2011;15(8):525–32.
30. Arevalo J, Ramirez L, Adaui V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, et al. Influence of *Leishmania* (Viannia) Species on the Response to Antimonial Treatment in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2007;195(12):1846–51.
31. Ordóñez-Gutiérrez L, Espada-Fernández R, Dea-Ayuela MA, Torrado JJ, Bolás-Fernandez F, Alunda JM. In vitro effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;30(4):325–9.
32. Carnielli JBT, Monti-Rocha R, Costa DL, Sesana AM, Pansini LNN, Segatto M, et al. Natural resistance of *leishmania infantum* to miltefosine contributes to the low efficacy in the treatment of visceral leishmaniasis in Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2019.
33. Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews*. Wolters Kluwer Medknow Publications. 2012;6(8):1–5.
34. Sofowora A, Ogunbodede E, Onayade A. The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. *African J Tradit Complement Altern Med AJTCAM*. 2013;10(5):210–29.
35. Chhabra MB, Pathak KML, Muraleedharan K. Medicinal plants as alternative for control of livestock parasites. *Protozoa*. *Indian J Anim Sci*. 2014;84(6):599–608.
36. Rocha LG, Almeida JRGS, Macêdo RO, Barbosa-Filho JM. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*. 2005 Jun;12(6–7):514–35.
37. Vieira G, Ferreira PM, Matos LG, Ferreira EC, Rodovalho W, Ferri PH, et al. Anti-inflammatory effect of *Solanum lycocarpum* fruits. *Phyther Res*. 2003 Sep;17(8):892–6.
38. Dall'Agnol R, Lino von Poser G. The use of complex polysaccharides in the

- management of metabolic diseases: the case of *Solanum lycocarpum* fruits. *J Ethnopharmacol.* 2000 Jul;71(1–2):337–41.
39. Oliveira ACP, Endringer DC, Araújo RJP, Brandão MGL, Coelho MM. The starch from *Solanum lycocarpum* St. Hill. fruit is not a hypoglycemic agent. *Brazilian J Med Biol Res.* 2003;
 40. Abreumiranda M, Tiossi RFJ, Dasilva MR, Rodrigues KC, Kuehn CC, Rodriguesoliveira LG, et al. *In vitro* leishmanicidal and cytotoxic activities of the glycoalkaloids from *Solanum lycocarpum* (solanaceae) fruits. *Chem Biodivers.* 2013.
 41. Liang C-H, Shiu L-Y, Chang L-C, Sheu H-M, Tsai E-M, Kuo K-W. Solamargine Enhances HER2 Expression and Increases the Susceptibility of Human Lung Cancer H661 and H69 Cells to Trastuzumab and Epirubicin. *Chem Res Toxicol.* 2008 Feb;21(2):393–9.
 42. K M. Solanum Alkaloids and their Pharmaceutical Roles: A Review. *J Anal Pharm Res.* 2015;3(6).
 43. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultiv Trop.* 2001.
 44. Kaunda JS, Zhang Y-J. The Genus Solanum: An Ethnopharmacological, Phytochemical and Biological Properties Review. *Nat Products Bioprospect.* 2019;9: 77–137.
 45. Araújo M V., Queiroz AC, Silva JFM, Silva AE, Silva JKS, Silva GR, et al. Flavonoids induce cell death in *Leishmania amazonensis*: in vitro characterization by flow cytometry and Raman spectroscopy. *Analyst.* 2019;144(17):5232–44.
 46. Sunitha J. Antimicrobial Effect of Leaves of *Phyllanthus niruri* and *Solanum nigrum* on Caries Causing Bacteria: An In vitro Study. *J Clin DIAGNOSTIC Res.* 2017;11(6):4-1.
 47. Vibrans H. Malezas de México. *Tagetes filifolia* Lag. Anís de monte. 2021.
 48. Calderón G, Rzedowski J. Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, A.C. 2001.
 49. Mentz LA, Oliveira PL. *Solanum* (Solanaceae) Na Regiao Sul Do Brasil. *Pesqui Botânica.* 2004.
 50. Carlos I, Milicevic M, Agr I, José O, Losardo M. Instituto Nacional de

Tecnología Agropecuaria. Minist Agroind. 2016.

51. Rolón M, Vega C, Escario JA, Gómez-Barrio A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol.* 2006;99(2):103–7.
52. Murray PJ. Macrophage Polarization. *Annual Review of Physiology.* 2017;79:541-566.
53. Sengupta M, Sharma GD, Chakraborty B. Effect of aqueous extract of *Tinospora cordifolia* on functions of peritoneal macrophages isolated from CCl4 intoxicated male albino mice. *BMC Complement Altern Med.* 2011;28(11):102.
54. Zhang X, Goncalves R, Mosser DM. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. *Curr Protoc Immunol.* 2008;83(1).
55. Bosshart H, Heinzelmann M. THP-1 cells as a model for human monocytes. *Annals of Translational Medicine.* 2016;4(21):438.
56. Rose SJ, Bermudez LE. *Mycobacterium avium* biofilm attenuates mononuclear phagocyte function by triggering hyperstimulation and apoptosis during early infection. *Infect Immun.* 2014; 82(1):405-12.
57. Murray HW, Nathan CF. Macrophage Microbicidal Mechanisms In Vivo: Reactive Nitrogen versus Oxygen Intermediates in the Killing of Intracellular Visceral *Leishmania donovani*. *J Exp Med.* 1999;189(4):741–6.
58. Liu D, Uzonna JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in cellular and infection microbiology.* 2012;2:83.
59. Okuda K, Tong M, Dempsey B, Moore KJ, Gazzinelli RT, Silverman N. *Leishmania amazonensis* Engages CD36 to Drive Parasitophorous Vacuole Maturation. Zamboni DS, editor. 2016;12(6):669.
60. Saha A, Basu M, Ukil A. Recent advances in understanding *Leishmania donovani* infection: The importance of diverse host regulatory pathways. *IUBMB Life.* 2018;70(7):593–601.
61. Jain SK, Sahu R, Walker LA, Tekwani BL. A Parasite Rescue and Transformation Assay for Antileishmanial Screening Against Intracellular *Leishmania donovani* Amastigotes in THP1 Human Acute Monocytic

- Leukemia Cell Line. J Vis Exp. 2012;(70).
62. Serna ME, Maldonado M, Torres S, Schinini A, Peixoto de Abreu Lima A, Pandolfi E, et al. Finding of leishmanicidal activity of 14-hydroxylunularin in mice experimentally infected with *Leishmania infantum*. Parasitol Int. 2015;64(5):295–8.
 63. Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. Clin Epidemiol. 2014;6:147-54.
 64. Serafim TD, Iniguez E, Oliveira F. *Leishmania infantum*. Trends in Parasitology. 2020.
 65. Fürst R, Zündorf I. Plant-Derived Anti-Inflammatory Compounds: Hopes and Disappointments regarding the Translation of Preclinical Knowledge into Clinical Progress. Mediators Inflamm. 2014;5:1–9.
 66. Gabrani R, Jain R, Sharma A, Sarethy I, Dang S, Gupta S. Antiproliferative effect of *Solanum nigrum* on human leukemic cell lines. Indian J Pharm Sci. 2012;74(5):451.
 67. Apu AS, Bhuyan SH, Matin M, Hossain F, Khatun F, Taiab A. Analgesic, neuropharmacological, anti-diarrheal, and cytotoxic activities of the extract of *Solanum sisymbriifolium* (Lam.) leaves. Avicenna J phytomedicine. 2013.
 68. Otsubo T, Maesaki S, Hossain MA, Yamamoto Y, Tomono K, Tashiro T, et al. In Vitro and In Vivo Activities of NS-718, a New Lipid Nanosphere Incorporating Amphotericin B, against *Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43(3):471–5.
 69. Mutoro CN, Kinyua JK, Ng'Ang'A JK, Kariuki DW, Ingonga JM, Anjili CO. In vitro study of the efficacy of *solanum nigrum* against *leishmania major*. F1000Research. 2018;7:1329.
 70. Ramírez-Macías I, Maldonado CR, Marín C, Olmo F, Gutiérrez-Sánchez R, Rosales MJ, et al. In vitro anti-leishmania evaluation of nickel complexes with a triazolopyrimidine derivative against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis*. J Inorg Biochem. 2012;112:1–9.
 71. Sánchez-Suárez J, Albarracín D, Rojas M, Rincón J, Robledo S, Muñoz DL, et al. Evaluación de la actividad citotóxica y leishmanicida de extractos y fracciones de *Piper cumense* y *Piper holtonii*. Rev Colomb Ciencias Químico

- Farm. 2010;39(1):21–9.
72. Srivastava A, Chandra D. Alkaloids and *Leishmania donovani* UDP-Galactopyranosemutase: A Novel Approach in Drug Designing Against Visceral Leishmaniasis. *Infect Disord - Drug Targets*. 2018 May;18(2):145–55.
 73. Mutoro CN. Efficacy of the combination of crude extracts of *Solanum nigrum* and *Plumbago capensis* on *Leishmania major*. *F1000Research*. 2018;7:1556.
 74. Badisa RB, Darling-Reed SF, Joseph P, Cooperwood JS, Latinwo LM, Goodman CB. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. *Anticancer Res*. 2009;29(8):2993–6.
 75. Mothana RA, Al-Musayeb NM, Al-Ajmi MF, Cos P, Maes L. Evaluation of the In Vitro Antiplasmodial, Antileishmanial, and Antitrypanosomal Activity of Medicinal Plants Used in Saudi and Yemeni Traditional Medicine. *Evidence-Based Complement Altern Med*. 2014;2014:1–7.
 76. Kang H, Jeong H-D, Choi H-Y. The Chloroform Fraction of *Solanum nigrum* Suppresses Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor- α in LPS-Stimulated Mouse Peritoneal Macrophages Through Inhibition of p38, JNK and ERK1/2. *Am J Chin Med*. 2011;39(6):1261–73.
 77. Domínguez-Carmona DB, Escalante-Erosa F, García-Sosa K, Ruiz-Pinell G, Gutierrez-Yapu D, Chan-Bacab MJ, et al. Antiprotozoal activity of Betulinic acid derivatives. *Phytomedicine*. 2010.
 78. Mans DRA, Beerens T, Magali I, Soekhoe RC, Schoone GJ, Oedairadjsingh K, et al. In vitro evaluation of traditionally used Surinamese medicinal plants for their potential anti-leishmanial efficacy. *J Ethnopharmacol*. 2016 Mar;180:70–7.

8. ANEXOS

8.1 Anexo 1. Plantas identificadas en el departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Químicas. A: *Solanum americanum*. B: *Solanum sisymbriifolium*.

A: *Solanum americanum*



B: *Solanum sisymbriifolium*



8.2 Anexo 2. Informe del comité de ética en la investigación de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Asunción, bajo el código CEI 473/19.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN.
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS.
COMITÉ DE ÉTICA EN LA INVESTIGACIÓN.

Informe de evaluación de protocolo de investigación

Título de la investigación: Evaluación de la actividad antiprotozoaria sobre *Leishmania infantum* de extractos metanólicos de *Solanum sisymbriifolium* y *Solanum americanum*

Protocolo de investigación:

Nombre de la institución y sede de la investigación: FCQ-UNA y el IICS.

Responsable de la investigación: Ellana Andrea Alvarenga Torres.

Fecha: 24.07.19

Código: CEI 473/19

X	Protocolo Aprobado
	Protocolo Rechazado
	Solicitud de enmienda (no se aprueba hasta una modificación del protocolo o el CI)
	Protocolo Aprobado con Recomendación
	Aprobación con condicionamiento (Falta de documentación requerida)

Sugerencia del CEI: Protocolo Aprobado.

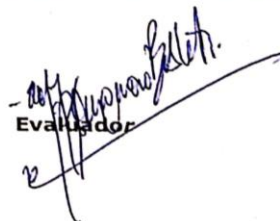
Especificar con mayor claridad que el grupo control negativo será tratado con solvente.

En el caso de una decisión positiva el investigador deberá:

Notificar al CEI sobre enmiendas al protocolo, al material de reclutamiento, a la información para los potenciales participantes en la investigación o al formato de CI. Reportar eventos adversos inesperados relacionados con la conducción del estudio. Informar al CEI la terminación del estudio si esta fuera anticipada y las razones por las que se lo hizo y toda circunstancia no esperada o decisiones significativas.


Presidente

Prof. B.C. Nathalia
P. Navarro T.


Evaluador