

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL ÁCIDO ÚSNICO EN CÉLULAS BHK-21, HEp-2, MDCK Y EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA

Postulante:
Univ. Cecilia Alejandra Ríos Terán

(Tesina para obtener el grado de Licenciatura en Bioquímica)

LA PAZ – BOLIVIA
2009

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL ÁCIDO ÚSNICO EN CÉLULAS BHK-21, HEp-2, MDCK Y EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA

Postulante:
Univ. Cecilia Alejandra Ríos Terán

Asesores: Dr. Juan Antonio Ávila
Dra. Grace Ruiz Pinell
Dra. Patricia Mollinedo

LA PAZ – BOLIVIA
2009

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

SUMMARY

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	ANTECEDENTES	2
	2.1 La naturaleza como fuente de nuevas sustancias	2
	2.2 Familia de líquenes	4
	2.2.1 Estructura de los líquenes	5
	2.2.1.1 Líquenes crustosos	5
	2.2.1.2 Líquenes foliosos	6
	2.2.1.3 Líquenes fruticosos	6
	2.2.2 Morfología	6
	2.2.3 Ecología de los líquenes	7
	2.2.4 Utilidad de los líquenes	7
	2.2.5 Bioquímica de los líquenes	8
	2.2.6 Sustancias liquénicas	8
	2.2.7 Formación de las sustancias liquénicas	9
	2.2.8 Funciones de las sustancias liquénicas	9
	2.2.9 Acción citotóxica de especies de la familia de líquenes	10
	2.3 Conceptos generales del género <i>Usnea</i> spp.	12
	2.3.1 <i>Usnea</i> spp.	12
	2.3.2 Uso medicinal de algunas especies del género <i>Usnea</i>	13
	2.3.3 Efectos del género <i>Usnea</i>	13
	2.3.4 <i>Usnea</i> Patagónica	13
	2.3.5 Ácido úsnico	14
3.	JUSTIFICACIÓN	16
4.	MARCO TEÓRICO	17
	4.1 Evolución de los cultivos celulares	17
	4.2 Historia de los cultivos celulares	18
	4.3 Biología del cultivo celular	20
	4.4 Tipos de cultivo celular	22

4.4.1	Cultivos en monocapa	22
4.4.2	Cultivos en suspensión	22
4.4.3	Cultivos primarios	23
4.4.4	Líneas celulares	23
4.4.4.1	Células BHK-21	24
4.4.4.2	Células MDCK	24
4.4.4.3	Células HEp-2	25
4.4.5	Glóbulos rojos humanos	26
4.4.6	Linfocitos humanos	28
4.5	Marco conceptual	28
5.	OBJETIVOS	29
5.1	Objetivo general	29
5.2	Objetivos específicos	29
6.	MATERIALES Y MÉTODO	30
6.1	Diseño experimental	30
6.2	Diseño metodológico	31
6.3	Descripción de las técnicas desarrolladas	33
6.3.1	Material vegetal	33
6.3.2	Ensayos biológicos	33
6.3.2.1	Cultivo in Vitro de Líneas celulares BHK-21, HEp-2 y MDCK	33
6.3.2.1.1	Descongelación de las líneas celulares	33
6.3.2.1.2	Adaptación de las células al medio de cultivo	34
6.3.2.1.3	Manutención	34
6.3.2.1.3.1	Técnica de Tripsinización	35
6.3.2.1.3.2	Congelación de las líneas celulares BHK-21, HEp-2 y MDCK	35
6.3.2.1.3.3	Decomplementación de Suero Bovino Fetal	36
6.3.2.1.4	Curva de crecimiento	36
6.3.2.1.5	Evaluación de citotoxicidad del ácido úsnico en líneas celulares BHK-21, HEp-2 y MDCK	37
6.3.2.1.6	Preparación de las Soluciones XTT y PMS	38
6.3.2.2	Obtención de eritrocitos y linfocitos de sangre periférica humana	39

6.3.2.2.1	Toma de muestra de sangre	39
6.3.2.2.2	Técnica para la obtención de eritrocitos y linfocitos en cultivo	39
6.3.2.2.3	Evaluación de citotoxicidad del ácido úsnico en eritrocitos	40
6.3.2.2.4	Evaluación de citotoxicidad del ácido úsnico en linfocitos	40
6.3.2.3	Técnica de viabilidad con el colorante de exclusión Azul Tripán	41
7.	RESULTADOS	42
7.1	Condiciones de cultivo continuo en monocapa de las líneas celulares BHK-21, HEp-2 y MDCK	42
7.2	Condiciones de las células obtenidas de sangre periférica humana: eritrocitos y linfocitos	42
7.3	Viabilidad de eritrocitos, linfocitos y de las tres líneas celulares BHK-21, HEp-2 y MDCK	42
7.4	Curva de crecimiento	42
7.5	Citotoxicidad del ácido úsnico en células BHK-21, HEp-2 y MDCK	43
7.6	Citotoxicidad del ácido úsnico en eritrocitos humanos	44
7.7	Citotoxicidad del ácido úsnico en linfocitos humanos	45
7.8	Análisis morfológico	45
8.	DISCUSIÓN	48
9.	CONCLUSIONES	49
10.	RECOMENDACIONES	50
11.	BIBLIOGRAFÍA	51
12.	ANEXOS	

ÍNDICE DE FOTOS

1. Líquenes Crustosos	5
2. Líquenes Foliosos	6
3. Líquenes Fruticosos	6
4. Usnea spp.	12
5. Usnea patagónica	13
6. Cajas petri con los cultivos celulares para la curva de crecimiento.	37
7. Recuento de las células de las cajas petri con el colorante Azul Tripán	37
8. Lector de ELISA	39
9. Recuento de eritrocitos con el colorante Azul Tripán	40
10. Células BHK-21 no tratadas	46
11. Cultivo de células BHK-21 tratadas con ácido usnico	46
12. Cultivo de células BHK-21 tratadas con anfotericina B	46
13. Células HEp-2 no tratadas	46
14. Cultivo de células Hep -2 tratadas con ácido úsnico	47
15. Células HEp-2 con anfotericina B 250ug/mL	47
16. Células MDCK no tratadas	47
17. Cultivo de células MDCK tratadas con ácido úsnico	47
18. Cultivo de células MDCK tratadas con anfotericina B	48

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1. Curva de crecimiento de células BHK-21, HEp-2 y MDCK	43
Gráfico N° 2. Evaluación citotóxica <i>in vitro</i> del ácido úsnico vs. anfotericina B sobre líneas celulares BHK-21, HEp-2 y MDCK.	44
Gráfico N° 3. Evaluación citotóxica <i>in vitro</i> del ácido úsnico vs. anfotericina B sobre eritrocitos humanos.	44
Gráfico N° 4. Evaluación citotóxica <i>in vitro</i> del ácido úsnico vs. anfotericina B sobre linfocitos humanos.	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ácido úsnico	14
Figura 2. Esquema de la estructura de la membrana del eritrocito	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones de cultivo continuo en monocapa de las líneas celulares	41
--	----

ANEXOS

ANEXO 1. Preparación del material biológico- Medio RPMI 1640

ANEXO 2. Preparación de la solución de Tripsina/EDTA

ANEXO 3. Preparación de la solución de congelamiento (DMSO al 20%/PBS)

ANEXO 4. Microscopio invertido

ANEXO 5. Placa de BHK-21, placa de HEp-2 y placa de MDCK

ANEXO 6. Incubación en estufa a 37°C y atmósfera con 5% de CO₂

*A mis papás, hermanos y a mi abuelita Betty,
avec l'amour...*

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, Dra. Grace Ruiz Pinell y Dr. Juan Antonio Ávila, por su orientación, enseñanzas y amistad.

Al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas que me abrió sus puertas, a todos mis amigos y docentes de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas por estos cinco años de constante aprendizaje de esta hermosa profesión y de la vida.

A la Dra. Patricia Mollinedo y al Dr. José Vila del Instituto de Investigaciones Químicas de la Facultad de Ciencias Puras por proporcionar el material vegetal.

A la Dra. Aleida Nina (INLASA) y al Dr. Fernando Sosa (SELADIS) por proporcionar las Líneas Celulares.

A los donadores eventuales de sangre.

Y especialmente a quienes va dedicado este trabajo, mi familia, por todo su apoyo, paciencia y cariño.

Remercier tous!

Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto,
y pensar lo que nadie más ha pensado.
Albert Szent-Györgi (1893-1986)
Bioquímico húngaro-estadounidense.

RESUMEN

Se determinó la actividad citotóxica *in vitro* del ácido úsnico (AU) ($C_{18}H_{16}O_7$) metabolito secundario potencialmente leishmanicida, extraído de un líquen *Usnea patagónica* colectada en la localidad de Pazña (Oruro- Bolivia), sobre 3 líneas celulares BHK-21, HEp-2 y MDCK, como también en linfocitos y eritrocitos de sangre periférica humana a concentraciones por debajo de 250 $\mu\text{g/mL}$.

Para determinar la actividad citotóxica *in vitro* del AU se mantuvieron cultivos continuos en monocapa de las tres líneas celulares en medio RPMI 1640 a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF). La evaluación se realizó utilizando el método colorimétrico cuantitativo XTT utilizado para medir la viabilidad celular, basado en la reducción de la sal de tetrazolium a una forma soluble en agua, formazán, con fenasin metosulfato (PMS) como acopladores de electrones, con lecturas a 492 nm de longitud de onda a las 4 horas de incubación. La técnica que se utilizó para la obtención de eritrocitos y linfocitos fue el gradiente de densidad con Ficoll-Hipaque y para evaluación de la citotoxicidad se realizó un recuento con el colorante de exclusión Azul Tripán. El efecto citotóxico mostró ser menor para las células BHK-21 (CC_{50} 92.2 $\mu\text{g/mL}$), HEp-2 (CC_{50} 156.75 $\mu\text{g/mL}$) y MDCK (CC_{50} 107.39 $\mu\text{g/mL}$), con relación a la anfotericina B producto potencialmente tóxico para células MDCK (CC_{50} 27.2 $\mu\text{g/mL}$), células HEp-2 (CC_{50} 37.2 $\mu\text{g/mL}$) y células BHK-21 (CC_{50} 34.3 $\mu\text{g/mL}$). Respecto a los eritrocitos el efecto citotóxico fue mucho menor (CC_{50} 68.8 $\mu\text{g/mL}$) a las 24 horas, (CC_{50} 79.58 $\mu\text{g/mL}$) a las 48 horas y linfocitos (CC_{50} 97.8 $\mu\text{g/mL}$) a las 24 horas, (CC_{50} 83.7 $\mu\text{g/mL}$) a las 48 horas en comparación a la anfotericina B (CC_{50} 12.75 $\mu\text{g/mL}$) a las 24 horas, (CC_{50} 10.4 $\mu\text{g/mL}$) a las 48 horas para eritrocitos y (CC_{50} 11.2 $\mu\text{g/mL}$) a las 24 horas, (CC_{50} 20.6 $\mu\text{g/mL}$) a las 48 horas para linfocitos. Estos resultados aportan bases para sugerir que el ácido úsnico tiene un alto potencial para el desarrollo de medicamentos contra la *Leishmania* por su baja toxicidad, lo cual debe ser validada en modelos *in vivo* en animales.

ABSTRACT

Was determined the cytotoxic activity *in vitro* of usnic acid (AU) (C₁₈H₁₆O₇) secondary metabolite potentially leishmanicidal, extracted from a lichen *Usnea patagónica* collected in Pazña (Oruro- Bolivia), over 3 cell lines BHK-21, HEp-2 and MDCK, as well as in lymphocytes and human peripheral blood erythrocytes at concentrations below 250 mg/mL.

To determine the *in vitro* cytotoxic activity of AU remained constant in monolayer cultures of three cell lines in RPMI 1640 at 37°C in a humid atmosphere with 5% CO₂ and supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). The study was performed using quantitative colorimetric method XTT used to measure cell viability, based on the reduction of tetrazolium salt to a water-soluble form, formazan, with fenasin Methosulfate (PMS) as electron couplings, with readings at 492 nm wavelength at 4 hours of incubation. The technique used for the production of erythrocytes and lymphocytes was the density gradient with Ficoll-Hipaque and cytotoxicity evaluation of the count with trypan blue dye exclusion. The cytotoxic effect was shown to be lower for BHK-21 (CC₅₀ 92.2 ug/mL), HEp-2 (CC₅₀ 156.75 ug/mL) and MDCK (CC₅₀ 107.39 ug/mL) compared with amphotericin B for potentially toxic product MDCK cells (CC₅₀ 27.2 ug/mL), HEp-2 (CC₅₀ 37.2 ug/mL) and BHK-21 (CC₅₀ 34.3 ug/mL). With regard to erythrocytes the effect was much less cytotoxic (CC₅₀ 68.8 ug/mL) at 24 hours (CC₅₀ 79.58 ug/mL) at 48 hours and lymphocytes (CC₅₀ 97.8 ug/mL) at 24 hours (CC₅₀ 83.7 ug/mL) at 48 hours compared to amphotericin B (CC₅₀ 12.75 ug/mL) at 24 hours (CC₅₀ 10.4 ug/mL) at 48 hours to erythrocytes and (CC₅₀ 11.2 ug/mL) at 24 hours, (CC₅₀ 20.6 ug/mL) at 48 hours for lymphocytes. These results provide grounds to suggest that usnic acid has a high potential for development of drugs against Leishmania by its low toxicity, which must be validated *in vivo* animal models.

1. INTRODUCCIÓN

En el Laboratorio de Quimioterapia Experimental del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (I.I.F.B.) se evaluó la actividad citotóxica del ácido úsnico sobre tres líneas celulares: BHK-21, HEp-2 y MDCK provenientes de animales y humanos, como también sobre eritrocitos y linfocitos de sangre periférica humana.

El ácido úsnico es un metabolito secundario obtenido de un líquen, *Usnea patagónica* con un alto potencial leishmanicida *in vitro* (CI_{50} 10.3ug/mL) según investigaciones del I.I.F.B. y según reportes se le atribuye una variedad de usos medicinales como antibacteriano y antifúngico utilizado por la medicina natural, sin embargo se cuentan tan sólo con datos preliminares de este interesante compuesto. El ácido úsnico es el metabolito más conocido y más frecuente en líquenes, pigmento que se acumula en la corteza superior del tallo ejerciendo la función de una pantalla que limita la penetración de las radiaciones luminosas al estrato algal, absorbiéndolas o dispersándolas.

Tomando en cuenta los datos emergentes epidemiológicos de Leishmaniasis en Bolivia y la posibilidad de encontrar compuestos potencialmente activos para el desarrollo de nuevos fármacos en vista de la alta resistencia a medicamentos utilizados en la terapia de esta enfermedad, se determinó la citotoxicidad del ácido úsnico mediante el método XTT, técnica basada en la formación de una sal de formazán, que sólo puede ser hecha por células metabólicamente activas, método rápido y cuantitativo para conocer las condiciones en las que podrían ser o no nocivo este producto para las líneas celulares.

Se obtuvieron eritrocitos y linfocitos por la técnica de gradiente de densidad con Ficoll-Hipaque, que utilizando las características físicas como la densidad celular, permitió contar con células con un alto grado de pureza. Se evaluó la citotoxicidad del ácido úsnico en estas células de sangre periférica con el colorante de exclusión Azul Tripán que permite diferenciar células vivas de las que han sufrido un daño y no son viables.

De esta forma el aporte será el conocimiento sobre la toxicidad y la concentración de la misma para posibles formulaciones farmacéuticas que no dañen las células y sean una nueva alternativa de tratamiento.

2. ANTECEDENTES

2.1 La naturaleza fuente de nuevas sustancias

La principal fuente de sustancias se encuentra en la naturaleza, el hombre ha aprendido a utilizar sus componentes químicos para su beneficio. Las plantas, las bacterias y los hongos al igual que el hombre, tienen células que guardan en su interior gran diversidad de sustancias que se vuelven objetos de estudio en la producción de medicamentos nuevos en busca de soluciones para la cura de enfermedades, ésta fue la primera motivación para la búsqueda de aquellas especies vegetales y microorganismos que podrían provocar alguna reacción sobre el cuerpo humano ¹.

Varios son los ejemplos que a lo largo de la historia se traducen en algunas de las drogas más representativas; por ejemplo, la flor de la amapola (*Papaver somniferum*) contiene un jugo conocido como opio, que ha sido utilizado desde la antigüedad (hay registros escritos en Sumeria y Oriente Medio que datan del año 4000 a. C.), tanto con fines medicinales como psicotrópicos. En Grecia, los pacientes eran sometidos, como primera fase de todo tratamiento, a un sueño sanador con opio, que era considerado capaz de calmar cualquier dolor. Los estudios actuales permitieron conocer la composición de este jugo y descubrir que su componente activo (el que produce el efecto analgésico e hipnótico) es la sustancia denominada morfina (de Morfeo, dios griego del sueño).

Los compuestos químicos que esconden las plantas también fueron utilizados para mejorar la caza y la pesca, como lo describe Mark J. Plotkin en su libro aprendizaje de chamán. Antes de salir de pesca, los indios del Amazonas van en busca de una liana específica que cortan en pedazos de treinta centímetros, aproximadamente, para después machacarla y obtener la pulpa amarilla que la compone. Este compuesto liberado se llama rotenona; es un vasoconstrictor que penetra en las branquias de los peces cierra los capilares responsables de la toma de oxígeno, se asfixian, y se acercan a la superficie ².

De otros organismos vivos como bacterias y hongos también se obtienen sustancias activas como la penicilina, por ejemplo, el antibiótico más representativo, que es extraída de un hongo.

El reino vegetal, los organismos vivos como bacterias y hongos son un depósito importante de compuestos con actividad biológica. El estudio de la composición química y

la forma en que se puede extraer de éstos los productos de interés es un pilar fundamental en la búsqueda de nuevas sustancias, pero estas investigaciones no parten de cero, la medicina tradicional da importantes pautas para establecer principios activos útiles para los medicamentos actuales³.

En los países en desarrollo, 80% de la población se trata con remedios tradicionales extraídos en su mayoría de plantas.

En la investigación terapéutica, la necesidad de descubrir nuevos tratamientos es imperiosa. Además de combatir las enfermedades emergentes y recientes como el sida, es necesario vencer las resistencias a los tratamientos actuales contra el cáncer, el paludismo, la leishmaniasis, el chagas y las infecciones bacterianas.

De ahí el interés de buscar ideas en las combinaciones moleculares naturales, fruto de una evolución de 4.500 millones de años.

Algunos éxitos recientes han confirmado el valor del medio natural. El descubrimiento de la ciclosporina en una seta del suelo noruego constituyó un progreso decisivo para evitar el rechazo en casos de trasplante de órganos.

No obstante, en la práctica el camino que lleva de la planta al medicamento sigue siendo largo e implica muchos estudios. Todo comienza con la recolección en bosques primarios que son los países de la zona intertropical, continente africano, americano, asiático o de la región del Pacífico. El saber tradicional de los curanderos locales orienta la búsqueda. Luego, el enfoque quimiotaxonómico, permite explorar las especies de una familia ya conocida por contener sustancias útiles. Sigue la extracción y purificación la materia bruta a fin de recoger compuestos químicos mezclados o puros. Después, se someten a prueba los extractos para detectar una actividad biológica. En esa etapa, la selección es estricta. Por lo general, de 100.000 compuestos analizados se valida una sola molécula. En total, se espera 15 a 20 años entre la recolección en el bosque y el lanzamiento al mercado. Esto motiva la investigación en la que trabajan muchas personas con un mismo objetivo, encontrar nuevos medicamentos que resuelvan los problemas en el área de la salud⁴.

Plantas, insectos y bacterias despiertan renovado interés en la industria farmacéutica. Pero, entre la naturaleza y los ensayos clínicos, queda un largo camino por recorrer.

2.2 Familia de líquenes

Los líquenes son plantas criptógamas. Organismos constituidos por la simbiosis entre un hongo llamado micosimbionte y un alga o cianobacteria llamada fotosimbionte. Lo que predomina en ellos es un hongo, que forma la masa principal del líquen, pero examinado al microscopio se ve un segundo componente, un alga, de células de color verde, con quien está asociado⁵. La asociación de estos dos organismos puede ser muy variada pudiéndose diferenciar varios tipos estructurales muy diferentes desde el más simple, donde hongo y alga se asocian de forma casual al más complejo donde micosimbionte y fotosimbionte se organizan en un talo de morfología muy diferente a los dos organismos que los constituyen y donde el alga o cianobacteria se encuentra formando una capa bajo la protección del hongo.

Desde el punto de vista de la taxonomía, los líquenes no constituyen un grupo natural sino biológico; y se los clasifica dentro del reino Fungi. En efecto, las algas que componen los líquenes son de dos tipos: cianófitas o algas azules y clorófitos, o algas verdes. El hongo es generalmente un ascomiceto.

Esta unión da origen a este grupo de organismos vegetales que tienen algunas particularidades únicas dentro del Reino Vegetal; por ejemplo son excepcionalmente resistentes a las condiciones ambientales adversas y capaces, por tanto, de colonizar muy diversos ecosistemas. La protección frente a la desecación y la radiación solar que aporta el hongo y la capacidad de fotosíntesis del alga confieren al simbiote características únicas frente a otros organismos. La producción de centenares de compuestos químicos que sólo son conocidos en el Reino Vegetal en este grupo de plantas, las llamadas sustancias liquénicas permiten un mejor aprovechamiento de agua, luz y la eliminación de sustancias perjudiciales. Están tan íntimamente relacionados entre sí que se comportan y reproducen como una planta única e independiente. El hongo se encarga de proteger al alga de las radiaciones directas del sol, brindarle agua y sales minerales. El alga a su vez realiza fotosíntesis y proporciona al hongo alimento y vitaminas⁶. Son los seres vivos más longevos que se conocen llegando a vivir hasta 4500 + 500 años⁷.

Actualmente más de 720 productos secundarios de líquenes son conocidos por todo el mundo incluyendo dépsidos, depsidonas, dibenzofuranos, antraquinonas, naftoquinonas, xantonas, terpenoides, carotenoides, defeniléteres y ácidos alifáticos⁸.

Los líquenes se distribuyen mundialmente, habitan en terrenos que están a la altura del mar hasta otros por encima de los 6.000 metros. Algunas especies están incluso en el nevado del Sajama (6.542 metros sobre el nivel del mar)⁹. Se encuentran desde los círculos polares hasta las áreas desérticas, y desde las costas marinas hasta las selvas y bosques húmedos, muchos géneros se encuentran en los trópicos. Son varios los factores que afectan su distribución, entre ellos; el agua, la temperatura y la luz.

En Bolivia varios líquenes fueron utilizados en la medicina tradicional, principalmente de la región de los Andes (género *Usnea*, *Candelaria* y *Thamnolia*). Se sabe poco sobre los líquenes en Bolivia y en el mundo se tuvo que esperar hasta 1870 para determinar que un líquen está formado por un alga y un hongo¹⁰.

2.2.1 Estructura de los líquenes

2.2.1.1 Líquenes crustosos



Foto 1. Líquenes crustosos

Viven íntimamente unidos a la superficie de las rocas o de las cortezas. El tallo es muy delgado y estrechamente unido al sustrato a manera de costra, por medio de hifas inferiores que actúan como hifas rígidas. (Foto 1)

2.2.1.2 Líquenes foliosos



Foto 2. Líquenes foliosos

De forma aplanada y lobulada, se fijan al sustrato por medio de unos cordones especiales de hifas llamadas rizinas. Se parecen mucho a los costrosos, aplanados y posturados, pueden ser fácilmente desprendido del sustrato, no están unidas a este. Se ubican preferentemente en áreas umbrófilas. Ello se debe probablemente a la mayor humedad relativa del aire en estos sitios. Se diferencian por tener ambas caras de diferentes colores. (Foto 2)

2.2.1.3 Líquenes fruticosos



Foto 3. Líquenes fruticosos

Se encuentran con mayor frecuencia en áreas más soleadas, donde los líquenes foliosos están ausentes. Crecen erguidos en el sustrato, pueden tener el aspecto de pequeños arbustos. (Foto 3)

2.2.2 Morfología

El talo o aparato vegetativo de los líquenes está formado por hifas entrelazadas que rodean y protegen al alga. Los líquenes sintetizan unas sustancias químicas únicas que les confieren su color, y su tamaño oscila entre menos de 1 milímetro y más de 3 metros de ancho.

Los líquenes presentan dos tipos de reproducción: sexual y asexual. La reproducción asexual tiene lugar por la fragmentación del talo. La pérdida de agua por desecación hace que el talo se vuelva frágil, rompiéndose por el viento, facilitando la dispersión de los fragmentos. Cada fragmento puede originar un nuevo talo en otro lugar¹¹.

2.2.3 Ecología de los líquenes

La naturaleza del sustrato determina la distribución y crecimiento de los líquenes. Crecen sobre cualquier superficie bien iluminada, como las rocas, las cortezas de los árboles o el suelo. Aunque no son exigentes con la humedad y la temperatura sí son muy específicos del sustrato en que se desarrollan. Los líquenes que crecen sobre los árboles no son los mismos que viven sobre las rocas y aún son distintos aquellos que crecen sobre rocas silíceas o sobre rocas calcáreas.

La capacidad de absorber y acumular diversas sustancias presentes en el ambiente ocasiona que la mayoría de los líquenes no toleren la contaminación. La acumulación de estas sustancias y su imposibilidad de excretarlas, retardan su crecimiento, dificultan su reproducción y pueden provocarles su muerte. De esta forma los líquenes se consideran indicadores naturales o bioindicadores de la contaminación atmosférica (Durán, 1997)

2.2.4 Utilidad de los líquenes

Los beneficios que hasta hoy día ha obtenido el hombre de los líquenes son limitados. En algunos países nórdicos se consume como alimento y fuente de vitamina C, el musgo de Islandia (*Cetracia islandica*). En los países subpolares, el líquen de los renos, *Cladonia rangiferina* sirve de alimento a los renos. La utilidad más conocida de los líquenes es quizás su uso como fuente de colorantes. La primera tintura de tornasol usada en química para la determinación de pH fue obtenida a partir de los líquenes. Recientemente se ha descubierto propiedades antibióticas en ciertas sustancias encontradas en los líquenes. Se han preparado también pomadas para evitar infecciones en heridas superficiales y quemaduras. Algunos líquenes se utilizan en cosméticos y perfumería, suministrando aceites esenciales.

Algunos son importantes ya que fijan el nitrógeno de la atmósfera y lo proporcionan al suelo, formando parte del ciclo del nitrógeno en los ecosistemas. Actualmente algunas especies se utilizan como expectorante y como remedio para estimular el apetito. Algunos

poseen sustancias, que son efectivas en el tratamiento de quemaduras externas y heridas superficiales.

Las sustancias liquénicas también han sido investigadas como antibióticos en la patología de plantas, por ejemplo contra el cáncer del tomate y el mosaico del tabaco¹².

2.2.5 Bioquímica de los líquenes

Sustancias excretadas al exterior producidas por el hongo

- Oxalato cálcico, en forma de minúsculos cristales, principalmente en la médula, más raramente en el exterior del córtex, frecuentemente en el epitelio del himenio, más abundante en los líquenes crustáceos y calcícolas se considera como una sustancia de desecho.
- Lípidos.
- Sustancias liquénicas.

2.2.6 Sustancias liquénicas

- Representan un conjunto muy heterogéneo de sustancias específicas de los líquenes.
- Muchas de ellas dan una reacción ácida y son denominadas ácidos liquénicos.
- Se conocen unos 200 tipos, pero cada vez aparecen más.
- Se presentan bajo la forma de minúsculos cristales y granulaciones dispuestas en la superficie de las hifas.
- Su concentración varía entre 0,15-10% en peso seco.
- Son insolubles en agua, pero solubles en alcohol, éter, acetona y cloroformo y cristalizan por evaporación del solvente.

Clasificación

- a) Sustancias de la serie alifática. Sustancias ácidas que no dan reacciones coloreadas.

b) Sustancias de la serie alicíclica, triterpenoides. Compuestos cíclicos, saturados neutros, no dan reacciones coloreadas, los más importantes son: ácido ursólico, en varias especies de *Cladonia*; ácido zeórico, en *Lecanora*.

c) Sustancias de la serie aromática.

Derivados del ácido pulvínico, amarillos o anaranjados, no se colorean con reactivos de la liquenología, ejemplo: ácido vulpínico en *Lethraria vulpina*

Derivados de la antraquinona, amarillos, anaranjados o rojos, coloreables de púrpura con la potasa, ejemplo: parietina en *Xanthoria parietina*.

Derivados del benzo-furano, con propiedades antibióticas. Ejemplo: **ácido úsnico** en *Usnea*, estrepsilina en *Cladonia strepsilis*, se colorea de azul-verdoso con el hipoclorito.

Dépsidos y depsidonas, agrupan a la mayoría de las sustancias liquénicas, y presentan una gran especificidad.

2.2.7 Formación de las sustancias liquénicas

- Síntesis no ligada rigurosamente a la simbiosis liquénica.
- Pueden aparecer en cultivos aislados de los hongos liquénicos, pero están muy favorecidas por la presencia del alga.
- El reparto de las sustancias liquénicas está estrictamente ligado a la especie.
- Cada especie contiene una o varias sustancias y en proporciones determinadas.
- Con frecuencia el reparto de estas sustancias liquénicas es utilizado como criterio

para crear subespecies y variedades.

2.2.8 Funciones de las sustancias liquénicas

- Su función no está totalmente aclarada.
- Protección contra la ingestión por animales, ya que son en su mayoría sustancias tóxicas.
- Actuación como antibióticos contra bacterias, musgos y otros hongos.
- Aumento de la absorción del agua.

- Aumento de la permeabilidad de las algas, para facilitar el intercambio de nutrientes (glucosa).
- Papel de sensibilizador óptico, análogo a los pigmentos fotosintéticos accesorios.
- Productos de desecho, como el oxalato cálcico ¹³.

2.2.9 Acción citotóxica de especies de la familia de líquenes

Se define como citotoxicidad a la capacidad que poseen ciertos compuestos de dañar o matar estructuras celulares *in vivo* o *in vitro*¹⁴. Dado que una cuantificación de la citotoxicidad es necesaria para la posterior implementación de otros tipos de ensayos como por ejemplo actividad antiviral, existen diversos métodos y estrategias para obtenerla. Entre los métodos para cuantificar la citotoxicidad de un compuesto se ubican, por un lado los que miden actividad metabólica celular y por otro los que se basan en el principio de exclusión celular. En los de exclusión se utilizan sustancias capaces de atravesar la membrana plasmática y teñir las células. Luego, en el conteo celular se distinguen las células vivas de aquellas que no lo están porque las primeras tienen la capacidad de excluir el colorante activamente de sus citoplasmas. Dos de los reactivos más usados son Violeta de Genciana y Azul de Tripán.

No existen datos específicos de la acción citotóxica del ácido úsnico sobre líneas celulares, pero este compuesto ha sido estudiado por sus antecedentes antibacterianos de la medicina tradicional en diferentes partes del mundo, por ejemplo en Uruguay el líquen es conocido popularmente como “Yerba de la piedra” sus usos figuran en trabajos de Mariano Berro en 1899 y en la Argentina en los de J. Hieronymus del año 1882. Entre los diversos componentes se destaca por su abundancia el ácido úsnico y sus derivados, que de acuerdo a trabajos recientes de autores japoneses, tiene *in vitro* actividad inhibitoria del desarrollo de células tumorales malignas y también demuestran que el ácido úsnico tiene acción sobre los procesos de activación de algunos tipos de virus^{15 16}.

En 1946 Bargellini y colaboradores dieron cuenta de que la sal potásica del ácido úsnico es activa frente a *Staph. aureus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *B. antracis* y *B. megatherium*¹⁷ e inactiva frente a diversas bacterias Gram negativas. En 1947, Marshak llamó la atención sobre la gran actividad anti-*Mycobacterium* del ácido úsnico que había obtenido de la *Ramalina reticulata*^{18 19}. En ese mismo año Stoll y colaboradores señalaron

la gran actividad anti-*Mycobacterium* de los ácidos úsnicos en su forma dextro, levo y racémica²⁰. También a fines del 1947 Barry y colaboradores dieron cuenta de la gran actividad del ácido úsnico frente al *Mycobacterium tuberculosis*²¹.

En 1948, Florencio Bustinza en colaboración con el Dr. Arturo Caballero López publicaron sus investigaciones con el ácido dextro-úsnico²², y señalaron su gran actividad anti-*Mycobacterium* más intensa frente a las estirpes virulentas de *Mycobacterium tuberculosis hominis*, que frente al *Mycobacterium tuberculosis avium*. También prepararon una mezcla de usnatos (usnato de estreptomocina) que resultó activo *in vitro* frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus mycoides*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium tuberculosis hominis* (estirpe virulenta H37Rv) y *Mycobacterium tuberculosis avium*.

Al mismo tiempo, investigadores japoneses Shibata, Ukita, Tamura y Miura, en abril de 1948 publicaron un trabajo sobre la actividad antibacteriana de los ácidos dextro y levoúsnicos, y también del racémico, así como también sobre la actividad antibacteriana de algunos de sus derivados, entre ellos el ácido 1-diacetilúsnico, el d-diacetilúsnico, el 1-dihidroúsnico y el d-diacetildihidroúsnico, y señalaron que la acetilación de los dos grupos oxhidrílicos reduce su actividad anti-*Mycobacterium* a la mitad o a la cuarta parte, y que también se reduce a la cuarta parte la actividad anti-*Mycobacterium* del ácido úsnico al incorporarle dos átomos de hidrógeno en el doble enlace, y que cuando se acetila al ácido dihidroúsnico entonces la actividad originaria del ácido úsnico se reduce a una décimosextava parte, por lo que, según los autores japoneses, gran parte de la actividad del ácido úsnico se debe a los grupos O H y al doble enlace²³.

El mismo año (1948) Klosa, en Alemania, estudió la actividad antibacteriana de una sustancia a la que él designó con el nombre de Evosin, y que era una mezcla de los ácidos úsnico y evérnico y de otras dos sustancias no identificadas¹⁸. El investigador finlandés Vartia, en un trabajo que se publicó en los comienzos del 1949, indicó haber obtenido el ácido 1-úsnico de *Cladonia alpestris*, y ensayó y comprobó su actividad en forma de sal sódica frente a dos estirpes de bacilo tuberculoso¹⁹. Vartia, en otro trabajo que publicó en 1950, demostró la actividad del ácido 1-úsnico obtenido de *Cladonia uncialis* en forma de sal sódica frente a diversas bacterias Gram positivas²⁴.

También Vartia, en su tesis doctoral (1950), dio cuenta de la acción del ácido 1-úsrico frente a *Candida tropicalis* y *Tricophyton interdigitalis*²⁵. En la Facultad de Medicina de Lausana en 1949, Florencio Bustinza remarcó la gran actividad anti-*Mycobacterium in Vitro* del ácido úsnico y de sus sales de sodio, de cobalto, de cobre, de oro y de níquel y de los derivados úsnico-estreptomicina y úsnico-dihidroestreptomicina. Fueron publicados entonces los resultados por la Dra. Mme. Tanner, en el número de «Farmacia Nueva» correspondiente al mes de abril de 1949, y en la cual confirmaba la gran actividad anti-*Mycobacterium* de los derivados del ácido dextro-úsrico.

Los últimos trabajos realizados en el campo de la bioquímica aplicada a las sustancias líquénicas han puesto de manifiesto una posible acción antiviral de estos compuestos. En 1989 Hirabayashi presentó sus investigaciones sobre la acción inhibitoria del polisacárido GE-3-S sobre en Virus de la Inmunosuficiencia humana en cultivos *in vitro*.

2.3 Conceptos generales del género *Usnea* spp

2.3.1 *Usnea* spp.

Nombre: *Usneas* pp. (Foto 4)

Familia: *Usneaceae*

Nombre Comun: Barba de viejo



Foto 4. *Usnea* spp

Existen diferentes especies del género *Usnea* utilizadas en medicina, éstas incluyen: *U. hirta*, *U. barbata*, *U. florida*, *U. longissima*, *U. dasypoga*, *U. bayle* y *U. lobata*.

Botánica: *Usnea*, es un líquen (parte hongo y parte alga) que vive en zonas frías y montañosas.

Tiene tendencia a acumular metales pesados del aire por lo cual es preferible utilizar este líquen sólo si está lejos de las fuentes de contaminación. La planta tiene un color verde grisáceo y crece como un tapiz tupido de pocas pulgadas a dos o tres pies de largo, colgado de los troncos y ramas. Es seco y áspero al tacto. Algunas especies tienen un centro o corazón de material blanco posiblemente expuesto al extremo del filamento. La capa exterior provee fuerza de tensión a la hebra y también una fuente de alimento por su composición de polisacáridos. Las especies con corazón blanco son consideradas las de mayor valor medicinal.

2.3.2 Uso medicinal de algunas especies del género *Usnea*

Fue utilizado como medicina en el Antiguo Egipto, Roma, Grecia y China antes de Cristo. Se estima que el 50% de los líquenes tiene propiedades antibióticas.

Usnea hirta: antibiótico, contiene ácido úsnico.

Usnea barbata: barbatolic, usnic, lobaric, tartaric acids, utilizado para el dolor de cabeza e insolación.

Usnea florida: usnic, stictinic & lobaric acids, antibiótico y antituberculoso.

Usnea longissima: usnic & evernic acids, expectorante.

Algunos constituyentes de *Usnea spp.* han sido atribuidos con un efecto inmunomodulador sobre el sistema de protección de los leucocitos, pero esto aún no está clínicamente evaluado.

2.3.3 Efectos del género *Usnea*

Antifúngico. - Efectivo contra infecciones de hongos en el pie y contra *Candida albicans*.

Antiparasitario- efectivo contra *Trichomonas* y *Chlamydia* en infecciones vaginales.

Antibacterial - efectivo contra bacterias gram positivas en infecciones locales o sistémicas.

En la medicina tradicional se utiliza en polvo directamente sobre la herida infectada, en decocciones y tintura en alcohol. También es usado como ungüento, donde la grasa es empleada como solvente de los ácidos liquénicos.

2.3.4 *Usnea patagónica*

Son líquenes (organismos formados por la asociación de un alga con un hongo) del género *Usnea* (Foto 5); viven sobre ramas y troncos de los árboles, utilizándolos únicamente como soporte. Se desarrolla mejor en lugares más expuestos al sol. Se consideran indicadores de abundancia de oxígeno (por tanto, poca contaminación en el ambiente).



Foto 5. *Usnea patagónica*

Si bien hay mucha información respecto a la cultura y costumbres de las tribus de la Provincia de Tierra del Fuego, no existe la misma información con referencia al empleo de plantas con uso alimentario y medicinal. Posiblemente en esto influya la escasa biodiversidad, la falta de documentación y la ausencia de interés por parte de investigadores que han considerado a esta región no desarrollada en relación a otras²⁶.

2.3.5 Ácido Úsnico

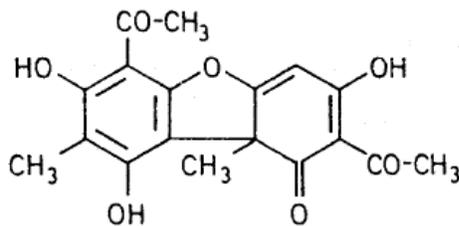


Figura 1. Ácido úsnico.

El ácido úsnico (Fig. 1) es el metabolito más conocido y más frecuente en líquenes, un antibiótico natural extraído en particular de *Usnea patagónica*. Es un pigmento que se acumula en la corteza superior del tallo ejerciendo la función de una pantalla que limita la penetración de las radiaciones luminosas al estrato algal, absorbiéndolas o dispersándolas. Algunos autores postulan que aumentaría la permeabilidad de las células algales; también tiene importancia como reserva lipídica en períodos de déficit²⁷.

Se ha utilizado durante siglos en la Medicina natural para combatir infecciones, resfriados e incluso el cáncer, si bien todas estas no están documentadas científicamente.

El ácido úsnico, un agente antimicrobiano natural ya conocido, se ha demostrado que es extremadamente efectivo contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, algunas especies anaeróbicas (*Bacteroides* y *Clostridium*). Incluyendo cepas resistentes a las beta-lactamasas, hongos y levaduras en concentraciones inhibitorias mínimas tan bajas como 10 ppm, para ciertas especies²⁸.

Asociado al sulfato de zinc, el ácido úsnico administrado intravaginalmente ha demostrado favorecer la re-epitelación después del tratamiento radioquirúrgico de las lesiones vaginales producidas por el Papilomavirus Humano y reducir el número de recaídas.

El ácido úsnico (en forma de extracto de líquenes) se ha utilizado en una amplia gama de productos de herboristería como el té de *Kombucha* (simbiosis de tres microorganismos benéficos: la bacteria del ácido acético (*Acetobácter xylinum*) y dos levaduras especiales: la *Zygosaccharomyces rouxii* y la *Candida sp.* Viven en una solución nutritiva de té azucarado, en el que se multiplican constantemente por medio de la germinación, cosméticos y productos de perfumería. Como sustancia pura, ha sido formulado en cremas medicinales, pasta de dientes, enjuague bucal, desodorantes y protectores solares, a veces como principio activo y otras veces como preservativo ²⁹.

Recientemente, se ha sugerido que el ácido úsnico pertenecería a la clase de productos denominados "agentes desacopladores". Estos productos actuarían sobre la respiración mitocondrial (evitando la formación de ATP y la fosforilación oxidativa) disminuyendo su eficacia energética, o en otras palabras, consumiendo más calorías de lo normal para realizar una función fisiológica determinada. Estos desacopladores están siendo objeto de un gran interés por parte de los investigadores, ya que de los tres mecanismos conocidos de termogénesis (ciclos fútiles, actividad de Na/K-ATPasa y cascada mitocondrial), la cascada mitocondrial es la más eficaz en la termogénesis basal. Las células humanas son menos permeables al ácido úsnico que las bacterias y por esto no son afectadas ³⁰.

En este sentido, el ácido úsnico actuaría al igual que las proteínas desacopladoras humanas UPC2 y UPC3, cuya expresión está aumentada en la obesidad. El hecho de que estas proteínas, en particular la UPC3 estén presentes en los músculos esqueléticos de forma inversamente proporcional a la masa corporal en los indios Pima (una población particularmente obesa) indicaría que los desacopladores juegan un papel determinante en la eficiencia metabólica. Sin embargo, no existen publicaciones fiables que apoyen la eficacia y seguridad del ácido úsnico en el tratamiento de la obesidad. No existe ni un sólo estudio clínico controlado que avale el mecanismo de acción de este producto como agente desacoplador ³¹.

No se han publicado estudios sobre la farmacocinética del ácido úsnico en el ser humano, si bien existen algunos datos después de su administración intravenosa en el conejo en dosis de 5 mg/kg y oral en dosis de 5 y 20 mg/kg. Estudios *in vitro* indican que el producto se une en un 98% a las proteínas plasmáticas humanas y bovinas.

Algunas informaciones no contrastadas indican que la semi-vida del ácido úsnico en sangre es de 6-8 horas y que su biodisponibilidad es del 78% después de dosis orales ³².

Como suplemento alimentario, los fabricantes recomiendan unas dosis de 250 mg a 500 mg/día, pero no existe una base sobre la cual se apoyan tales dosis. En Holanda, se comercializan comprimidos de 50 mg de ácido úsnico y se recomienda entre 50 y 10 mg/día, pero tampoco se cita información fiable sobre la que se apoyan tales dosis ³³.

Por vía intravaginal, uno o dos óvulos diarios se utilizan como antiséptico y antiflogístico vaginal, pero no se dispone de información fiable al igual que por vía tópica donde actúa como antibacteriano y antipruriginoso.

No se dispone de ninguna información respecto a posibles interacciones. Sin embargo, dado que el mecanismo de la acción antibacteriana del ácido úsnico difiere de la de otros antibióticos, es posible que ejerza un efecto sinérgico. Tal aspecto podría ser interesante, en particular ante la presencia de cepas multi-resistentes ³⁴.

3. JUSTIFICACIÓN

Las plantas son una fuente de drogas medicinales que podrían ser aprovechadas en uso clínico para atacar muchas de las enfermedades que no tienen o tienen escasas opciones de tratamiento, en Bolivia urge la necesidad de encontrar recursos naturales inocuos de plantas medicinales como fuente de principios con actividad biológica y una alternativa a las estrategias de diseño de fármacos para el tratamiento de enfermedades emergentes como la leishmaniasis.

En respuesta a esta necesidad se plantea el estudio de la evaluación de la actividad citotóxica del ácido úsnico en células BHK-21, HEp-2, MDCK y en células de sangre periférica humana como eritrocitos y linfocitos.

El ácido úsnico, extraído de un líquen llamado *Usnea patagónica*, se evaluó por encontrar actividad leishmanicida con un valor de CI_{50} 10.3 ug/mL en *Leishmania braziliensis*, frente a una droga control Anfotericina CI_{50} 0.2 ug/mL.

Al no existir trabajos sobre el ácido úsnico como un potente Leishmanicida es necesario conocer su posible toxicidad en líneas celulares y células de sangre periférica humana para establecer si estos hallazgos son útiles para estudios posteriores y su uso como droga ante esta enfermedad.

Al ácido úsnico se le atribuye propiedades antibacterianas y antifúngicas. La valoración preliminar de la potencial actividad citotóxica de este producto servirá para aportar datos específicos sobre la acción farmacológica y para la generación de beneficios sociales y económicos para la comunidad a través del acercamiento a nuevas alternativas para el tratamiento de la leishmaniasis que pueden ser aplicadas en el país.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Evolución de los cultivos celulares

El cultivo celular o cultivo de tejidos tiene su origen en el siglo XIX, cuando se comenzaron a estudiar con cierto detalle los tejidos y órganos en vasos de vidrio, como un método para el estudio del comportamiento de las células animales libres de las variaciones sistémicas ocurridas dentro del organismo durante su normal homeostasis y bajo el estrés de un experimento, cómo crecen, qué necesitan para su crecimiento, cómo y cuándo dejan de crecer. Estas técnicas iniciaron con el cultivo de fragmentos no disgregados de tejidos, los cuales restringían la mitosis de las células cultivadas y por tanto su crecimiento. Después se realizaron cultivos con fragmentos disgregados de tejidos, los cuales aumentaban el crecimiento celular en cultivo ya que se utilizaban células dispersas; esto fue un gran avance y provocó una explosiva expansión en esta área desde los años 50s (Morgan, 1995).

El cultivo de células tiene el objetivo de mantener vivas, fuera de su organismo de origen, células animales para estudiar su comportamiento sin el control normal ejercido por el organismo vivo; para observarlas, bajo un ambiente experimental controlable. Freshney (2000). Este tipo de estudios todavía tiene hoy un gran interés científico, por ejemplo, en relación con investigaciones sobre el ciclo celular y el control del crecimiento de células tumorales. Morgan y Darling (1995)

Una serie de innovaciones como el desarrollo de medios de cultivo, el uso de antibióticos, las técnicas de tripsinización para el pasaje de células (Moscona y Moscona, 1952) y la suplementación del medio con suero fetal bovino, permitieron el desarrollo y aplicabilidad de los cultivos de células tumorales procedentes de muestras de tejidos malignos tanto de hombre como de animales.

El cultivo de células, es la mejor manera de establecer nuevas líneas celulares en cultivo para estudiar la morfología celular y para comparar el efecto de diferentes agentes o diferentes concentraciones de un agente sobre el crecimiento y metabolismo³⁵.

4.2 Historia de los cultivos celulares

El cultivo de células tuvo su origen en el siglo XIX. Von Recklinghausen en 1866, mantuvo vivas células sanguíneas de anfibio por más de treinta días, pero fue la utilización de bloques de agar con plasma coagulado (soporte y alimento) el inicio del cultivo de células *in Vitro*. (Freshney, 1987).

El desarrollo del cultivo de células de vertebrados se inició con las observaciones de Wilhem Roux (1885) en cultivos de células de embrión de pollo; luego el zoólogo americano R.G. Harrison (1907) cultivó tejido nervioso de rana el cual más adelante fue reemplazada por plasma de pollo. (Burrows, 1910) Harrison es considerado el iniciador de los cultivos de tejidos animales; posteriormente, se aplicó esta técnica para el estudio en animales de sangre caliente (Carrel, 1912). Burrows y Carrel realizaron los primeros intentos de establecer cultivos de células de mamífero, y consiguieron mantener explantes obtenidos a partir de perros, gatos y conejos de indias, así como en el crecimiento de tumores sólidos. Demostraron que la vida del cultivo se puede prolongar mediante subcultivo. Los medios empleados fueron plasma suplementado con extractos de embrión.

Rous y Jones (1916) emplearon por vez primera extractos enriquecidos en tripsina para disociar las células de embriones de pollo, estableciendo el primer cultivo celular. Uno de los mayores problemas que describen para el establecimiento de los cultivos celulares es la aparición de múltiples contaminaciones, por lo que desarrollaron numerosos métodos de manipulación en condiciones de asepsia.

En 1913 Carrel demostró la posibilidad de mantener en cultivo células extraídas de un animal, embrión de pollo, durante un periodo de tiempo superior al de la vida de éste. Mantuvo en cultivo células de pollo durante 34 años (Sharp, 1977). Gran parte del éxito en el mantenimiento de los cultivos se debió al desarrollo del denominado frasco de Carrel.

Entre los años 1920 y 1940 se desarrollaron diferentes estrategias de obtención de cultivos y de mantenimiento de las condiciones estériles, pero sin grandes avances. A partir de los años 40, con el aislamiento de los primeros antibióticos, se desarrollaron numerosas aplicaciones. En 1948 Earle y col. (Sanford, Earle and Likely, 1948) demostraron que para que una célula llegue a dividirse necesita ser alimentada con los nutrientes correctos. Gry y col. En 1959 (Grey, Coffman y Kubicek, 1952) establecen la primera línea celular continua, las células HeLa. El medio empleado era extremadamente complejo y poco definido: plasma de pollo, extracto de embrión bovino y suero de cordón umbilical humano.

En 1954, Rita Levi-Montalcini y col. establecen que el factor de crecimiento nervioso estimula el crecimiento de los axones en tejidos en cultivo (Levi-Montalcini y Calissano, 1979). Este trabajo supuso el Premio Nobel para Levi-Montalcini en 1986.

En 1955, Eagle (Eagle, 1955) realiza la primera investigación sistemática de los requerimientos nutritivos de las células en cultivo. Describe que las necesidades del cultivo de soluciones corporales complejas (sueros) pueden ser satisfechas por tan poco como el 1% de suero de caballo dializado en un medio definido de pequeñas moléculas (aminoácidos o azúcares).

Hayflick y Morread, 1961, usaron por primera vez antibióticos para prevenir la contaminación de los cultivos de fibroblastos. Pudieron mantener estos cultivos durante unos 12 pases, pero no consiguieron establecer líneas estables.

En 1965, Ham introduce el primer medio definido libre de suero capaz de mantener algunas células de mamífero en cultivo indefinidamente (Ham, 1965). Cuatro años después Augusti-Tocco y Sato establecen la primera línea celular estable de neuroblastoma aislando clones que establecían procesos nerviosos y que eran eléctricamente excitables (Augusti-Tocco y Sato, 1969). Se empiezan a establecer las primeras líneas celulares diferenciadas.

En 1975, Kohler y Milstein establecen la primera línea celular productora de anticuerpos monoclonales (Koebler y Milstein, 1975). En año siguiente Sato y col. publicaron sus trabajos en los que demuestran que las diferentes líneas celulares requieren mezclas distintas de hormonas y factores de crecimiento para crecer en medios libres de suero. (Sato y col., 1982)³⁶.

4.3 Biología del cultivo celular

La validez de un cultivo celular como modelo de función fisiológica *in vivo* ha sido criticado, ya que se presentan problemas de caracterización por la alteración del desarrollo celular; la proliferación *in vitro* no se presenta de igual manera a la de *in vivo*, debido a la reducción de la relación célula-célula y la interacción matriz-célula por la no presencia de la heterogeneidad y la estructura tridimensional de las células hallada *in vivo*, además porque el medio hormonal y nutricional se ve alterado. Esto crea un ambiente que favorece la difusión, migración y proliferación de células no especializadas, pero no a la expresión de funciones diferenciadas. La provisión de un ambiente apropiado, nutriente, hormonas y sustratos son fundamentales para la expresión de funciones especializadas (Brand, *et al.*, 1997).

En un cultivo celular la mayoría de las células crecidas a partir de un tejido sólido disgregado o de un subcultivo tienen la capacidad de adherirse en monocapa, transformarse o anclarse independientemente. Esta adherencia celular es mediada por receptores celulares específicos de superficie en la matriz extracelular y la dispersión celular podría ser precedida por la secreción de proteínas de matriz extracelular y proteoglicanos por parte de la célula. Las células se pueden anclar y difundir en el vidrio donde se cultivan por medio de ligeras cargas negativas y al plástico, como el poliestireno, si tienen una propiedad o tratamiento con descargas eléctricas o con radiación ionizante de alta energía. El cultivo en vidrio o plástico provee condiciones favorables para el crecimiento y anclaje celular (Freshney, 1995).

El crecimiento de las células en un cultivo celular primario depende de la supervivencia de éstas a las diferentes técnicas de disgregación y a la capacidad de adherirse al sustrato o de sobrevivir en suspensión. Si el cultivo primario es mantenido por pocas horas podría ocurrir un paso de selección futuro. Las células capaces de proliferar podrían aumentar, otros tipos de células podrían sobrevivir pero no aumentar y otras podrían ser capaces de

sobrevivir en condiciones especiales. Además el crecimiento celular va ligado al espacio del cultivo, ya que unas células detienen su crecimiento, mientras que otras lo incrementan (Freshney, 1995).

Se cultivan células de plantas, animales y humanos en un caldo de cultivo en el laboratorio. Las células de humanos y tejidos se pueden obtener de biopsias, *post-mortem*, placentas o de procedimientos quirúrgicos. Se pueden cultivar una amplia variedad de cultivos de células, así como células de cáncer y sangre humanas para investigar cómo los virus provocan infecciones; las células de la placenta humana se pueden utilizar para probar si los medicamentos pueden atravesar la placenta, o células de las articulaciones humanas para estudiar medicamentos contra el reuma.

Los cultivos de células y tejidos pueden ser altamente sensibles a las sustancias químicas y permitir a los investigadores estudiar partes del cuerpo específicamente identificadas. Se han utilizado cultivos de células en investigaciones para el cáncer, el Parkinson, SIDA, desarrollo de medicamentos, toxicidad y Alzheimer.

Los cultivos de células animales se han clasificado de acuerdo a su capacidad de anclaje (adherencia), y así han sido aisladas recientemente de un órgano determinado o si provienen de células que han sufrido modificación.

De acuerdo a su capacidad de adherencia o no a una superficie determinada pueden crecer formando monocapa o en suspensión respectivamente, lo que está muy asociado con el tipo de célula de la cual derivan: por lo general las células provenientes de órganos, crecen en monocapa; igualmente existen células que pueden crecer indistintamente tanto en monocapa como en suspensión, ejemplo son las células HeLa que son células transformadas derivadas de cultivos en monocapa.

Cuando el cultivo proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original tomado de un órgano de un animal recién sacrificado, reciben el nombre de Cultivo Primario; cuando éste cultivo primario es sometido a procesos de transformación que le confiere capacidad ilimitada de multiplicación, reciben el nombre de Líneas Celulares. Cuando de un cultivo primario genera otro tipo de células que se pueden separar recibe el nombre de Cultivos Secundarios. Cuando en el cultivo coexisten dos tipos de células de linajes diferentes que se pueden separar recibe el nombre de Cocultivo.

4.4 Tipos de cultivo celular

4.4.1 Cultivos en monocapa

Las células se inhiben cuando establecen contacto entre sí (quiescencia), permitiendo la formación de una monocapa que cubrirá la superficie de crecimiento (confluencia). Las células provenientes de cultivos primarios son las que mejor crecen en ésta condición, dada su estabilidad genética y su naturaleza diploide normal.

Las ventajas de la utilización de sistemas en monocapa son la flexibilidad para desarrollar cultivos primarios o de líneas heteroploides, la facilidad para la remoción del medio gastado antes de infectar las células y la alta concentración que se obtiene del producto.

Los recipientes para el cultivo de células estacionarias son cajas de Petri, frascos para el cultivo de tejido (Roux), entre otros, que pueden ser de material de plástico o de vidrio previamente tratado y su desprendimiento para transferirlas a superficies mayores se realizan con agentes proteolíticos como la tripsina.

4.4.2 Cultivos en suspensión

Las Líneas celulares que provienen de cultivos primarios con requerimiento de anclaje a superficies, tienen la propiedad de crecer de manera estacionaria o en suspensión después de un período de adaptación.

Los sistemas en suspensión también requieren de matrices que son macromoléculas, que sirven de protectores a la superficie celular; estas macromoléculas se encuentran en el suero, el cual contribuye igualmente con el medio de cultivo, proporcionando un sistema balanceado de nutrientes.

Aunque el cultivo estacionario es ideal cuando se busca la elaboración de productos extracelulares, el cultivo en suspensión es deseable cuando los productos son intracelulares o cuando se presentan problemas con la capacidad de anclaje de un determinado tipo de célula. El proceso de cultivo continuo ofrece factores económicos decisivos (utilización de mejores equipos, reducida manipulación) cuando se trata de producir cultivos a una mayor escala de operación.

4.4.3 Cultivos primarios

Los cultivos primarios tienen características especiales que los diferencian de las líneas celulares: conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, sus cromosomas tienen un número diploide ($2n$), su crecimiento *in vitro* es limitado y hay inhibición por contacto.

El estar más cercanas a las células que las originaron, se ve reflejado en una mejor actividad y funcionalidad similar a su ambiente natural, por lo que en aislamientos primarios de cepas virales éstas tienen mayor sensibilidad que una línea celular ya establecida. Igualmente para la producción de vacunas los cultivos primarios son recomendables por tener una baja probabilidad de que se transformen en malignos.

Dentro de las desventajas está la de una mayor probabilidad de presentar virus adventicios o latentes, lo que implica el desarrollo de la adecuada tecnología para el control de calidad.

4.4.4 Líneas celulares

Se originan de un cultivo primario (cultivo iniciado a partir de células, tejidos u órganos tomados directamente de un organismo) y se establece a partir del primer subcultivo exitoso. Están formadas por células que se diferencian genética y morfológicamente de las células de las cuales se originaron. Pueden provenir de células que se derivan de tumores o de un proceso de transformación de un cultivo primario mediante transfección con oncogenes o con tratamiento con carcinogénicos, lo que les confiere un nuevo fenotipo. Una transformación puede inducirse fisiológicamente (interacción celular, polaridad) a través de hormonas como la hidrocortizona o utilizando inductores no fisiológicos como el DMS. Este tipo de cultivo tiene la característica de no tener inhibición por contacto.

En general, este tipo de cultivos tienen la capacidad proliferativa limitada y luego fenecen (Línea Celular Finita LCF). Sin embargo mediante la generación de mutaciones espontáneas o inducidas estables, algunos de estos cultivos adquieren un potencial proliferativo virtualmente infinito transformándose en líneas celulares continuas LCC cuya manipulación es mucho más fácil respecto a la LCF y al cultivo primario. Este proceso se

denomina Transformación o Inmortalización *in vitro*. Son LCC HEp-2, MDCK Vero, HeLa³⁷.

4.4.4.1 Células BHK- 21 (Baby Hamster Kidney)

La línea original se derivó de fibroblastos de los riñones de cinco hámsters bebés de un día de nacidos de sexo no determinado, en 1961³⁸; tiene vida infinita y posee las características beneficiosas de la mayoría de las líneas de células continuas: rápido crecimiento, pases ilimitados y alta eficiencia de plaqueo³⁹.

Son altamente susceptibles y permiten la replicación *in vitro* de muchos virus, entre ellos virus aftoso y virus rábico. El clon 13 de células de riñón de hámster sirio recién nacido (BHK-21 C13) ha sido utilizado en la producción de vacunas para uso veterinario, ya que el mismo posee los requerimientos que exigen los organismos internacionales para este tipo de producto. La utilización de estas células para diferentes estudios y producciones data de la década de los 60^{40 41}. Con el empleo de esta línea se han producido millones de dosis de vacuna contra la fiebre aftosa en cultivos en suspensión y de vacuna antirrábica para uso veterinario⁴².

En el método de cultivo de células BHK se utiliza suero bovino fetal, previamente analizado, irradiado y filtrado antes de su uso para eliminar las posibles contaminaciones bacteriales, virales y fúngicas⁴³.

Esta línea celular tiene la característica de crecer en suspensión y en monocapa anclada a un sustrato. Ambos sistemas de cultivo ofrecen distintas ventajas. Los cultivos en suspensión son muy fáciles de disminuir la concentración celular y no es necesario desprenderlos para realizar un subcultivo o para la manutención de la línea celular. La principal dificultad es el cambio que sufre por la adaptación al sistema. El metabolismo celular es también afectado por la morfología de la célula.

4.4.4.2 Células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney Cells)

Deriva del riñón aparentemente normal de un adulto hembra de cocker spaniel en septiembre de 1958 por S. H. Madin y N. B. Darby, las células MDCK son estables en un medio con 5% de suero bovino fetal. Las células iniciales fueron removidas del cultivo seis

veces en aproximadamente siete días por tripsinización parcial con una solución de tripsina-versene. El resultado fue el establecimiento de una línea celular epitelial, la cual aunque bastante resistente a la acción de la tripsina, es posible realizar el pase sin dificultad. La línea celular MDCK es utilizada para replicar *in vitro* el virus de exantema vesicular, estomatitis vesicular, hepatitis infecciosa canina, adenovirus y reovirus⁴⁴.

Una característica de esta línea celular es la organización de los tejidos con una estrecha interacción estructural y funcional de constituyentes celulares que incluye a las uniones estrechas y los desmosomas. La línea celular MDCK es una de las más caracterizadas, como un modelo funcional característico de un epitelio simple que se adhieren fuertemente entre sí⁴⁵. Para realizar la manutención de esta línea celular se requieren dos lavados previos con PBS antes de exponer las células a la solución de Tripsina EDTA con una concentración recomendada de Tripsina/EDTA de 0.25%. El medio de cultivo para MDCK es EMEM (medio Eagle mínimo esencial) suplementado con 2mM L-Glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales y 10% de Suero Bovino Fetal.

Las células MDCK tienen la capacidad de regenerar estructuras de los túbulos renales cuando son inyectadas en ratones. Crecen en cultivos de tejido o en ratones bebés, tienen las propiedades morfológicas de las células de los túmulos distales.

Utilizando técnicas genéticas se modificaron las propiedades de las células, obteniendo como resultado una línea celular que conserva las propiedades de las células epiteliales de riñón de origen. La célula aislada se apodera del receptor, transmisión y sistemas enzimáticos necesarios para la regulación de sus funciones como el transporte de fluidos.

4.4.4.3 Células HEp-2 (Epidermoid carcinoma, larynx, human)

La línea continua HEp-2 se obtuvo en 1952 a partir de un carcinoma epidermoide de laringe humano por A. E. Moore, L. Sabachewsky, and H. W. Toolan (1955)⁴⁶. Es resistente a la temperatura, cambios ambientales y nutricionales. Es utilizada para estudios experimentales de producciones de tumores en ratas, hámsteres, ratones, huevos embrionados y pacientes terminales voluntarios con cáncer^{47 48 49}.

Requiere para su cultivo 10% de suero bovino fetal inactivado. Se puede infectar con Adenovirus, virus del Herpes simple, Poliovirus, Virus Sincitial Respiratorio^{50 51}. Es necesario en su cultivo no llegar a más del 80% de confluencia, debido a que dejan de proliferar y no se desprenden del sustrato. Luego de varios pases pueden presentar vacuolas y el cultivo debe ser descartado.

4.4.5 Glóbulos rojos humanos

Los glóbulos rojos, también llamados eritrocitos o hematíes, son los elementos formes cuantitativamente más numerosos de la sangre, son las células sanguíneas especializadas en el transporte de oxígeno y dióxido de carbono unidos a hemoglobina. Se forman en la médula roja de los huesos y subsisten durante cuatro meses. Su principal característica morfológica es que no poseen un núcleo organizado, que al pasar a la sangre ya ha desaparecido. La célula ha perdido su RNA residual y sus mitocondrias, así como algunas enzimas importantes; por tanto es incapaz de sintetizar nuevas proteínas o lípidos⁵². El eritrocito es un disco bicóncavo de más o menos 7 a 7.5 μm de diámetro y de 80 a 100 fL de volumen.

Tienen forma de disco engrosado por el borde y en cada milímetro cúbico de sangre existen de 4,5 a 5,5 millones de ellos, que constituyen el 45% del volumen sanguíneo.

Debido a su sencillez como célula se ha empleado tradicionalmente como modelo celular para estudiar la membrana plasmática por lo que su membrana es la más estudiada y mejor caracterizada. La mayoría de las características encontradas en ella se han generalizado al resto de membranas celulares. El citoesqueleto del eritrocito es muy importante ya que le proporciona su forma bicóncava que le permite al eritrocito tener una gran superficie en relación a su volumen y le permite soportar las grandes tensiones mecánicas a las que se ve sometido durante su paso por los finos capilares.

La flexibilidad del eritrocito se debe a una extensa red de de proteínas de membrana asociadas con el citoesqueleto bajo la membrana plasmática. Están involucradas en el control de la forma del eritrocito, uniones con otras células y con el sustrato, así como en la organización de dominios especializados de la membrana.

El componente de mayor masa molecular en el citoesqueleto de la membrana del eritrocito es la espectrina. Tetrámeros de espectrinas están unidos con la membrana por una proteína llamada ankirina, la cual está conectada a la banda 3. El objetivo de la banda 4.2 es estabilizar la unión entre la ankirina y el intercambiador aniónico banda 3. La espectrina se une también con la glicoforina C mediante la banda 4.1; este entramado es anclado en múltiples sitios de la membrana. La banda 4.1, así como la aducina, estabilizan la asociación de la espectrina con la actina. Subunidades de la actina forman microfilamentos con la tropomiosina, a los que se asocia la proteína tropomodulina. La banda 4.9, conocida también como dematina, produce el entrecruzamiento de estos microfilamentos de actina. La estructura de la doble capa lipídica es fundamental en la organización del citoesqueleto^{53 54 55}. (Fig. 2)

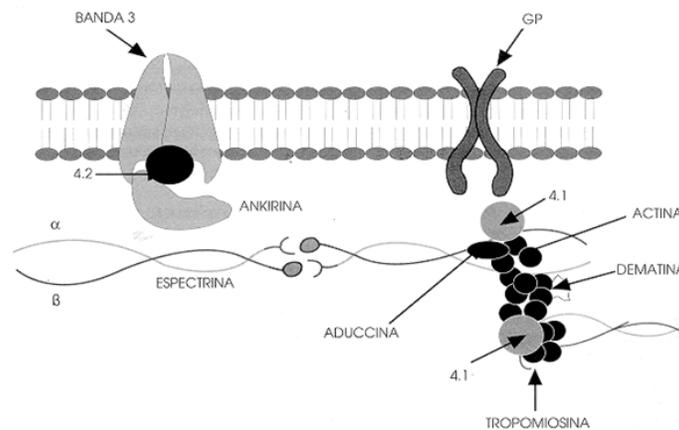


Figura 2. Esquema de la estructura de la membrana del eritrocito

El eritrocito procede del progenitor mieloide común que a su vez deriva de las células madre hematopoyéticas. Del progenitor mieloide común se originan los eritrocitos, los leucocitos y las plaquetas. En el caso de eritrocito, del progenitor mieloide común se forman las células formadoras rápidas de eritrocitos (BFC-E: Burst-Forming Cells - Erythrocyte), que son estimuladas por la interleuquina 3 (IL-3) para dar colonias de células formadoras de colonias de eritrocitos (CFC-E: Colony-Forming Cells- Erythrocyte). Estas dan colonias de eritroblastos, cada uno de los cuales, por medio de varios pasos estimulados por la eritropoyetina (EPO), van a expulsar el núcleo, abandonar la médula ósea roja y se van a dirigir hacia el torrente circulatorio. Ya en el torrente circulatorio eliminan el resto de orgánulos para dar lugar a un eritrocito maduro. Cada segundo se producen de 2 a 3 millones de eritrocitos, con una vida media de 120 días⁵⁶.

4.4.6 Linfocitos humanos

Tienen el tamaño de un glóbulo rojo, y su núcleo es esférico y bastante grande, con una concavidad en uno de sus lados. Constituyen del 23 al 35% de todos glóbulos blancos y se forman en la médula ósea roja. Sin embargo cuando salen de ella sufren un proceso de maduración por el cual se forman dos tipos: los linfocitos B, que pasan a los ganglios linfáticos, se diferencian en el hígado y bazo fetal, y en la médula ósea del adulto, y los linfocitos T, que se albergan en el timo. Todos ellos viven unos cien días y se encargan del sistema de defensa específico, también llamado inmunitario, por el cual el linfocito distingue las sustancias que debe destruir de las que son propias del cuerpo. Para ello los linfocitos deben tener un cierto tipo de memoria que les permita pasar sus conocimientos de una generación a la siguiente.

La sustancia atacante recibe el nombre de antígeno, y la que producen los linfocitos para neutralizarla son los anticuerpos. Los anticuerpos se unen a los antígenos de forma que éstos se hacen inofensivos, y todo el complejo es después eliminado por los eosinófilos.

Los linfocitos B son los encargados de producir los anticuerpos y células de memoria. Éstas, una vez que han madurado y aprendido sobre un cierto antígeno, se dividen formando una estirpe, que puede durar varios años o toda la vida del individuo. Constituyen un 30 % del total de linfocitos.

Los linfocitos T son los responsables de coordinar la respuesta inmune celular segregando proteínas o citoquinas. También se ocupan de realizar la cooperación para desarrollar todas las formas de respuestas inmunes, como la producción de anticuerpos por los linfocitos B ⁵⁷.

4.5 Marco conceptual

Cultivo celular: Conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, reproduciendo las condiciones existentes *in vivo*, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas.

Citotoxicidad: Es la cualidad de ser tóxico a células. Pueden ser agentes tóxicos una sustancia química o una célula inmune.

CC₅₀ : Se define como la concentración de los extractos y fracciones que redujo la viabilidad de las células tratadas al 50% respecto a las células no tratadas.

Líneas celulares: Son células humanas o animales, derivadas de un cultivo primario que se utilizan para estudiar sus propiedades y respuestas a estímulos. Cuando se pueden propagar de forma indefinida en subcultivos *in vitro*, se denominan líneas establecidas.

BKH-21: Línea celular proveniente de riñones de hámsters bebés.

HEp-2: Línea celular proveniente de un carcinoma epidermoide de laringe humano.

MDCK: Línea celular proveniente del riñón de perro cocker spaniel.

Ácido úsnico: El ácido úsnico es un metabolito secundario que se encuentra exclusivamente en los líquenes. Se ha utilizado en la medicina tradicional como antibacteriano y antifúngico.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Determinar la actividad citotóxica del ácido úsnico *in vitro* en células BHK-21, HEp-2, MDCK y en células de sangre periférica humana.

5.2 Objetivos Específicos

- Optimizar las condiciones de cultivo continuo en monocapa de las líneas celulares: BHK-21, HEp-2 y MDCK.

- Optimizar las condiciones de obtención de las células de sangre periférica humana: eritrocitos y linfocitos mediante la técnica de gradiente de densidad Ficoll-Hipaque.

- Determinar el porcentaje de viabilidad de eritrocitos, linfocitos y las tres líneas celulares: BHK-21, HEp-2 y MDCK por el método de exclusión del colorante Azul Tripán.

- Determinar la curva de crecimiento de las tres líneas celulares: BHK-21, HEp-2 y MDCK con el método de exclusión del colorante Azul Tripán.

- Determinar la concentración citotóxica del 50% (CC₅₀) del ácido úsnico en las líneas celulares: BHK-21, HEp-2 y MDCK utilizando el método colorimétrico cuantitativo XTT.

- Determinar la concentración citotóxica del 50% (CC_{50}) del ácido úsnico en eritrocitos humanos de sangre periférica utilizando el método de exclusión del colorante Azul Tripán.
- Determinar la concentración citotóxica del 50% (CC_{50}) de la del ácido úsnico en linfocitos humanos de sangre periférica utilizando el método de exclusión del colorante Azul Tripán.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño experimental

El tipo de investigación es experimental.

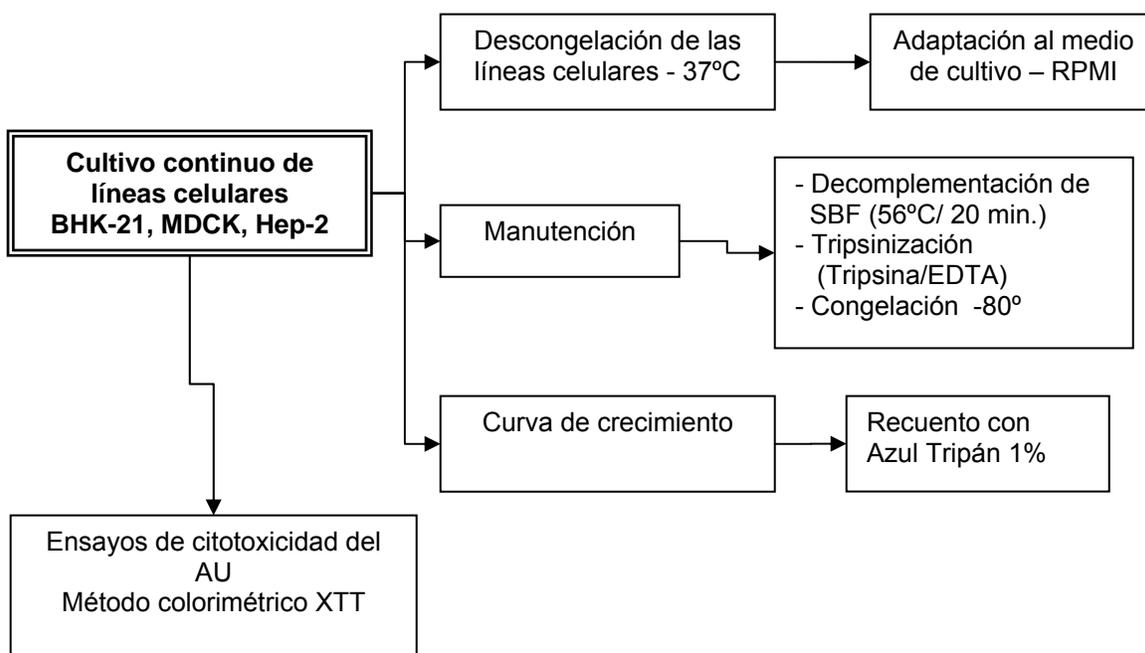
El análisis estadístico se realizó mediante análisis de regresión lineal y desviación estándar en el programa Microsoft Excel (% de Inhibición Vs. Log de la concentración del extracto del AU).

Los criterios de inclusión para el cultivo continuo en monocapa son:

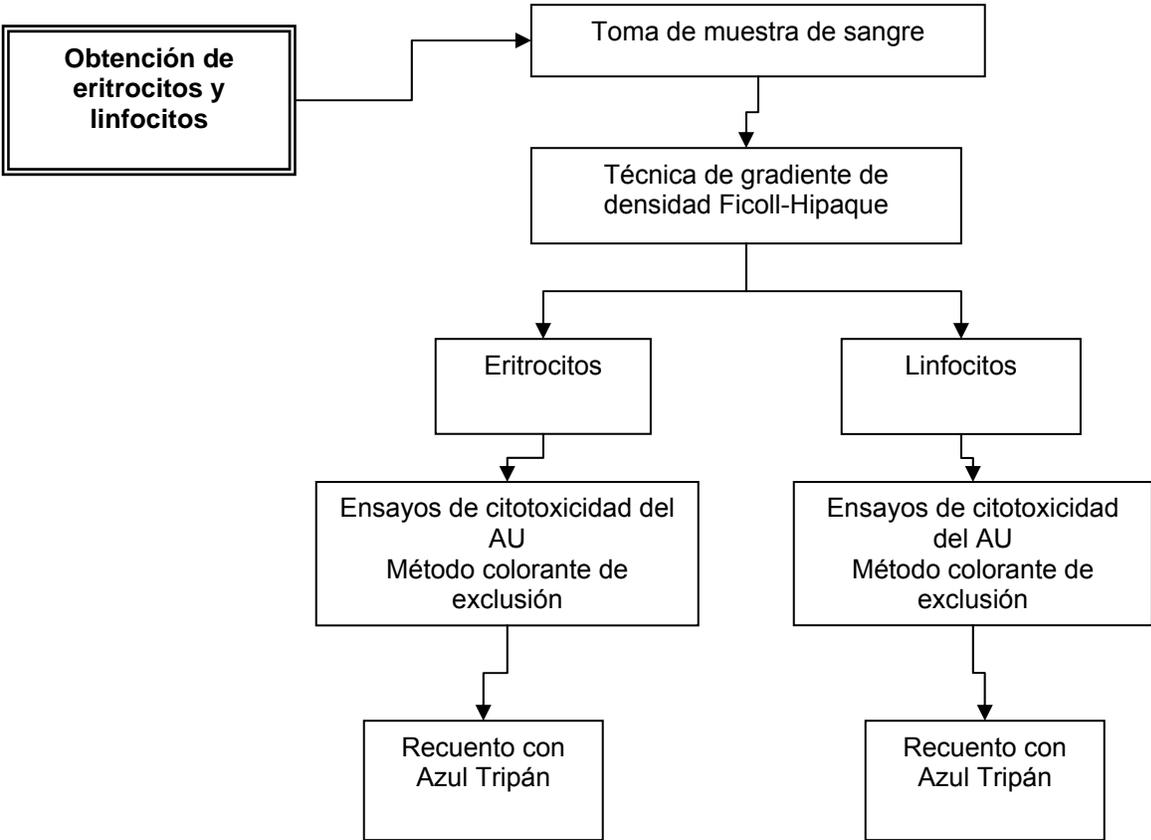
- Cultivos celulares no contaminados
- Población celular mayor de 1×10^6 células
- Viabilidad celular mayor a 95%

6.2 Diseño metodológico

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DEL ÁCIDO ÚSNICO EN CÉLULAS BHK-21, HEp-2, MDCK



EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA EN CÉLULAS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA



6.3 Descripción de las técnicas desarrolladas

6.3.1 Material Vegetal

El líquen *Usnea patagónica* fue colectado en el altiplano Boliviano en Pazña – Oruro (18 - 19 °S y 77°W, a 3800 metros sobre el nivel del mar). La clasificación taxonómica del líquen fue realizada por el Herbario Nacional de Bolivia.

Fueron pulverizados 61.0g del material seco y tratados con acetona a temperatura ambiente por 72 horas, para luego concentrar el extracto al vacío hasta obtener un extracto crudo (12.8 g). Posteriormente se lavó varias veces con CH₂Cl₂. El extracto CH₂Cl₂ proporcionó un producto sólido amarillo, denominado ácido úsnico.

Material proporcionado por la Dra. Patricia Mollinedo del Instituto de Investigaciones Químicas (IIQ) de la Facultad de Ciencias Puras- UMSA.

6.3.2 Ensayos biológicos

Los ensayos biológicos se realizaron en el Laboratorio de Quimioterapia Experimental del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas de la Facultad de Cs. Farmacéuticas y Bioquímicas- UMSA.

6.3.2.1 Cultivo *in vitro* de Líneas celulares BHK-21, HEp-2, MDCK

Se utilizaron líneas celulares neoplásicas HEp-2 y MDCK proporcionadas por la Dra. Aleida Nina del Instituto Nacional de Laboratorio en Salud (INLASA) y células BHK-21 proporcionadas por el Dr. Fernando Sosa del Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud (SELADIS).

6.3.2.1.1 Descongelación de las líneas celulares BHK-21, HEp-2, MDCK

La descongelación debe ser muy rápida para prevenir la formación de cristales en el momento en que la temperatura baja de -80°C a 0°C , si el proceso se lleva a cabo lentamente causa daño celular y pérdida de viabilidad.

Para descongelar las células se necesita trasladar los tubos criopreservados de -80°C a baño termoregulado a 37°C . Agitar suavemente el tubo hasta que descongele totalmente el contenido. El siguiente paso es la adaptación de las células en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich código R4130) (Anexo 1) con 10% de suero bovino fetal (SBF) (Sigma-Aldrich código F4135) con gentamicina (Sigma Aldrich código G1264) en una botella de cultivo, incubada a 37°C con 5% de CO_2 .

6.3.2.1.2 Adaptación de las células al medio de cultivo

Una vez descongelados realizar dos lavados con el mismo medio a 1500 rpm por 5 minutos, resuspender el sedimento en 5 mL de medio RPMI suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal. Todo este procedimiento se realiza sobre una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad. La viabilidad de las células se examinó a través del colorante de exclusión Azul Tripán al 1%. Una vez verificada la viabilidad se traslada a cajas de cultivo de 25 cm^3 y se cultiva en una estufa de cultivo en una atmósfera húmeda con 5% de CO_2 a 37°C . Las células BHK-21, HEp-2 y MDCK tienen la capacidad de adherirse a la superficie de las cajas de cultivo en poco tiempo.

6.3.2.1.3 Manutención

La manutención es la transferencia o trasplante de células, con o sin dilución, de un recipiente de cultivo a otro. Este término es sinónimo de subcultivo. El número de veces que las células en cultivo han sido subcultivadas es el repique.

Según la curva de crecimiento realizada, se determinó el tiempo óptimo para realizar la manutención de las células cada 48 horas.

De manera previa se observa las células al microscopio invertido para verificar posibles contaminaciones y la morfología adecuada de las células.

Se elimina el medio que contiene las células y se lava dos veces la superficie con PBS estéril con el fin de eliminarlas células no adheridas o células muertas. Posteriormente se añade una solución de Tripsina/EDTA (Sigma-Aldrich código T4799) (Anexo 2) y se incuba por 5 minutos a 37°C con la finalidad de desprender las células en el caso de las BHK-21 y HEp-2 y por 10 minutos para MDCK a la misma temperatura. Una vez desprendidas se detiene la reacción con medio RPMI y se lleva a centrifugación por 5 min a 1500 rpm con el fin de retirar la tripsina del medio ya que esta sustancia resulta ser tóxica para las células si se tienen mucho tiempo de exposición. El sedimento es resuspendido y diluido de forma apropiada según la cantidad de células para colocarlas nuevamente en frascos de cultivo con medio fresco RPMI con 10% de SBF e incuba a una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37°C.

6.3.2.1.3.1 Técnica de Tripsinización

Esta técnica permite separar las células de su soporte mediante una enzima proteolítica, la tripsina, que rompe las uniones de las células al soporte, así como las uniones entre las células. Este proceso debe realizarse con cuidado ya que la tripsina también es capaz de destruir las células por digestión total. Cuando las células se separan se añade a la placa un medio con suero. En el suero hay moléculas que inhiben a la tripsina, parando la reacción impidiendo así la destrucción de las células.

La tripsina y el ácido etilenoaminotetraacético EDTA se utiliza comúnmente en la preparación de suspensiones celulares a partir de monocapas. La tripsina rompe las proteínas de la superficie que une a las células entre ellas, mientras que el EDTA es un agente quelante de cationes divalentes necesarios para la adhesión de las células a la superficie de vidrio o plástico.

6.3.2.1.3.2 Congelación de las líneas celulares BHK-21, HEp-2, MDCK

Una vez desprendidas las células por tripsinización, se centrifuga a 1500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Decantar el sobrenadante y realizar un lavado con medio RPMI, posteriormente resuspender el sedimento en medio RPMI fresco con 10% de SBF. Repartir bajo campana de flujo laminar previamente, 4 mL de células en tubos de crio-preservación previamente identificados con el nombre de la línea celular y la fecha de congelación. Añadir gota a gota 4 mL de la solución crio- protectora (Anexo 3). Tapar los

tubos y proceder a la congelación. Cuando se congelan células, el choque osmótico y los cristales intracelulares que se forman invariablemente matan las células desprotegidas. El dimetilsulfóxido, que contiene la solución de congelación, previene la muerte durante la congelación. Además de utilizar el crioprotector, las células deben congelarse muy lentamente.

La congelación debe ser de manera gradual, -20°C durante 3 horas y luego se lleva a -80°C . Para una buena conservación, las líneas celulares deberán congelarse en fase exponencial de su desarrollo para conservar las características genéticas originales de las células y para evitar usar las envejecidas con cambios fenotípicos indeseados que ocurren con cada pasaje celular.

6.3.2.1.3.3 Decomplementación de Suero Bovino Fetal

Se realizó la decomplementación del suero bovino fetal con la ayuda de un baño termostático a 56°C durante 20 minutos para destruir la actividad biológica del complemento, lo cual es muy importante porque algunos productos del metabolismo celular pueden activar la cascada del complemento y destruir la monocapa celular. Este procedimiento también se utiliza para inactivar algunos agentes infecciosos que pueden estar presentes en el suero. Se puede conservar luego a -20°C .

6.3.2.1.4 Curva de crecimiento

Se obtuvo la cinética de crecimiento de las 3 líneas celulares: BHK-21, HEp-2 y MDCK. Se observó a través de microscopio invertido las características de desarrollo peculiar que presentan cada línea celular en crecimiento en medio de cultivo.

Una vez que las células se adaptaron al medio de cultivo, se realizó la curva de crecimiento. Del cultivo madre se tomó 3×10^4 células previo conteo en cámara Newbauer en cantidad suficiente para 70 mL suplementado con 10% de SBF para 14 cajas petri Falcon para cada línea celular (Foto 6). Durante siete días se contaron dos cajas por cada tipo de célula con la técnica del colorante de exclusión Azul Tripán (Foto 7), desprendiendo primero con la solución de Tripsina/EDTA, incrementando el tiempo de

exposición de esta solución cada vez y a 37°C. Así se obtuvieron datos que permitieron la construcción de la curva de crecimiento para cada línea celular.



Foto Nº 6. Cajas petri con los cultivos celulares para la curva de crecimiento.

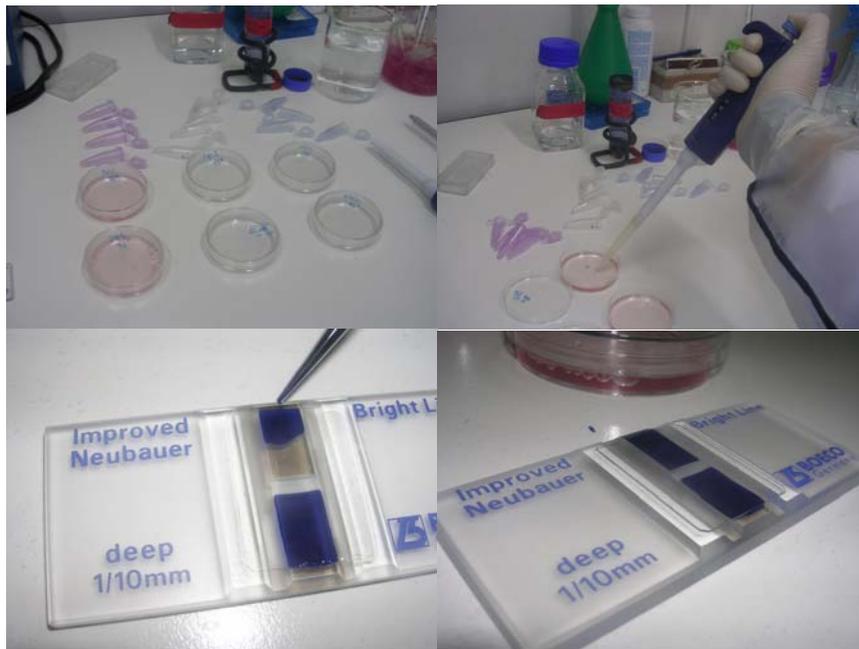


Foto Nº 7. Recuento de las células de las cajas petri con el colorante Azul Tripán.

6.3.2.1.5 Evaluación de citotoxicidad del ácido úsnico en líneas celulares BHK-21, HEp-2, MDCK

Se determinó la citotoxicidad mediante un ensayo colorimétrico XTT, que emplea sales de tetrazolio, técnica basada en la transformación mediante una deshidrogenada mitocondrial (succinato-deshidrogenasa) del compuesto tetrazolio (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5[(phenylamino)carbonyl]-2H) tetrazolium hydroxide) en una sal de

formazán, esta conversión sólo puede ser hecha por células metabólicamente activas obteniendo un producto naranja soluble en agua, el cual es medido directamente por absorción a 492 nm. La cantidad de formazán producido es proporcional al número de células presentes⁵⁸.

Para probar la citotoxicidad se siguió el método empleado por López et al. (2002). Se utilizaron cajas de 96 alvéolos (Nunc) para el cultivo de células con medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de SBF. Las líneas celulares fueron resuspendidas en medio de cultivo (100 000 células por pozo) en 100 µl. Las placas se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ por 24 horas, tiempo para la formación de la monocapa de células. Después de la formación de la monocapa se retiró el medio de cultivo conjuntamente con las células que no se llegaron a adherir y posibles células muertas. Posteriormente se añadió 100 µl de cada una de diluciones del extracto a concentraciones definidas (250, 125, 62.5, 31.2, 15.6 y 7.8 µg/extracto/100 µl de medio).

Como testigo se utilizaron células no tratadas por el producto y células tratadas con anfotericina B (Sigma–Aldrich código A2411).

Cada concentración del extracto se realizó por triplicado, Se incubaron por 24 horas, tiempo necesario para que las células puedan incorporar las sustancias. Pasado este período de tiempo se añadió a cada pozo 50 µl de XTT (Sigma–Aldrich código X4251), las cajas se incubaron por tres horas a 37°C. Pasadas las tres horas se retiraron los 150 µl del medio RPMI/producto y XTT y se trasvasaron en otra placa de 96 alvéolos nueva para evitar cualquier interferencia en la lectura. A continuación se leyó la absorbancia en un lector ELISA (Model 2100 series-Plate Reader) a una longitud de onda de 492 nm.

Los cambios citológicos se detectaron observando los cultivos en un microscopio invertido (Anexo 4).

6.3.2.1.6 Preparación de las soluciones XTT y PMS

Las soluciones fueron preparadas previo a su uso, se preparó una solución de XTT 1mg/mL disuelto en buffer fosfato salino pH 7.0 incubado durante 10 minutos a 37°C, se añadió fenasa metosulfato (PMS, Sigma-Aldrich, código P5812) 0.06mg/mL suspendido

en buffer fosfato Salino pH 7.0^{59 60 61}. A cada pozo se colocó 50 µL de esta solución. Luego de tres horas se trasvasan en el mismo orden los pozos en una nueva placa de 96 pozos, se leen las absorbancias a 492 nm en el lector ELISA (Foto 8).

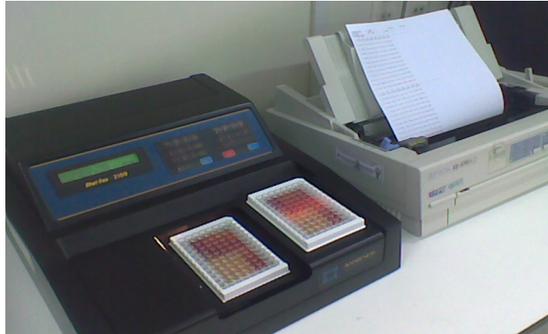


Foto Nº 8. Lector de ELISA

6.3.2.2 Obtención de eritrocitos y linfocitos de sangre periférica humana

6.3.2.2.1 Toma de muestra de sangre

Se obtuvieron las muestras de sangre heparinizada de pacientes sanos mayores de edad previo consentimiento informado, los mismos no se encontraban en ayunas. De cada paciente se obtuvo un volumen aproximado de 40 mL.

6.3.2.2.2 Técnica para la obtención de eritrocitos y linfocitos en cultivo

Diversos métodos se han descrito para lograr obtener eritrocitos con un alto grado de pureza debido a que la presencia de granulocitos puede implicar la liberación de sustancias tóxicas y por lo tanto entregar resultados errados de la investigación.

Las características físicas como la densidad celular permiten el aislamiento por métodos como simple sedimentación, cromatografía de exclusión molecular, aislamiento por lana de nylon o Ficoll-Hipaque. En nuestro caso se utilizó el Ficoll-Hipaque (Hystopaque-1077 Sigma-Aldrich, código H8889) que se basa en la diferencia de densidades que existe entre los diferentes elementos de la sangre. El Ficoll es un polisacárido que produce la aglutinación de los eritrocitos, logrando que estos sedimenten más rápidamente y el

Hipaque es una sustancia densa que, diluida apropiadamente, confiere a la mezcla la densidad requerida para el aislamiento.

Los eritrocitos y granulocitos poseen una densidad mayor a 1.077g/mL, que luego de una centrifugación se ubican por debajo de la capa del gradiente de esa densidad. Los monocitos, linfocitos y plaquetas al ser menos densos flotarán por encima.

6.3.2.2.3 Evaluación de citotoxicidad del ácido úsnico en eritrocitos

Se aislaron eritrocitos humanos de sangre periférica humana heparinizada de individuos sanos previo consentimiento informado, mediante gradiente de densidades con Ficoll-Hypaque (Hystopaque-1077 SIGMA) por centrifugación a 1500 rpm por 5 min a temperatura ambiente, fueron recogidos con sumo cuidado para evitar riesgo de hemólisis los cuales se resuspendieron en solución salina glucosada y centrifugados a 1600 rpm por 10 min. Para las pruebas de citotoxicidad se utilizaron 5×10^5 eritrocitos por pozo contenidas en un volumen de 100 μ L en medio RPMI 1640 y 100 μ L de las diferentes concentraciones del AU en medio RPMI suplementado con SBF al 10%, se sembraron por triplicado más los controles, eritrocitos sin tratar y eritrocitos tratados con anfotericina B en placa de 96 alvéolos de fondo plano e incubados por 24 y 48 horas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂. La citotoxicidad se evaluó mediante el método de exclusión con Azul Tripán (Foto 9).



Foto N° 9. Recuento de eritrocitos con el colorante Azul Tripán

6.3.2.2.4 Evaluación de citotoxicidad del ácido úsnico en linfocitos

Se utilizaron linfocitos aislados de sangre periférica humana heparinizada inmediatamente después de ser aislados de individuos sanos previo consentimiento informado, mediante

gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (Hystopaque-1077 Sigma-Aldrich código H8889) por centrifugación a 1500 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Después de dos lavados con RPMI 1640 a 1500 rpm durante 10 min se determinó la viabilidad inicial de las células mediante el método de exclusión con Azul Tripán. Para las pruebas de citotoxicidad se utilizaron 1×10^6 linfocitos por pozo contenidas en un volumen de 100 μ L, se sembraron por triplicado en placas de 96 alvéolos mas los controles, linfocitos sin tratar y linfocitos tratados con anfotericina B. Los ensayos de citotoxicidad se realizaron a las 24 y a las 48 horas a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ con las diferentes concentraciones del ácido úsnico en medio RPMI 1640 con suplemento de 10% de suero bovino fetal. La citotoxicidad se evaluó mediante el método de exclusión con Azul Tripán a través del conteo en la cámara de Neubauer. Las pruebas se realizaron por triplicado en tres repeticiones.

6.3.2.3 Técnica de viabilidad con el colorante de exclusión Azul Tripán

Para determinar el número de células viables en una suspensión celular, se utiliza la técnica de exclusión de un colorante. De manera que las células vivas que poseen membranas celulares intactas pueden excluir ciertos colorantes como el Azul Tripán preparado al 1%. Por el contrario, las células muertas presentan la membrana dañada y permiten la penetración del colorante y se tiñen.

Se utiliza un hemocitómetro para determinar concentración celular y para la viabilidad celular se utiliza el colorante Azul Tripán contando células vivas y muertas.

Se mezcla 50 μ L de la suspensión de células con el mismo volumen de Azul Tripán al 1%. Después se multiplica por la dilución realizada y el factor de la cámara:

$$N^{\circ}/\text{cel}/\text{cuadrantes} \times 2 \times 50 \times 1000 = \text{número de células/mL}$$

Donde: N°/cel (número de células contadas en los 5 cuadrantes) x 2 (por la dilución con el Azul Tripán) x 50 (factor de la cámara) x1000 (resultado por mL)

7. RESULTADOS

7.1 Condiciones de cultivo continuo en monocapa de las líneas celulares: BHK-21, HEp-2 y MDCK

Después de la adaptación de las líneas celulares al medio, se establecieron las condiciones de cultivo óptimas para el crecimiento. Tabla N° 1.

Condiciones	
Cantidad de medio RPMI 1640	5 mL por frasco de cultivo de 25 cm ³
Cantidad de SBF	10%
Temperatura	37°C
CO ₂	5%
pH	7.4

Tabla 1. Condiciones de cultivo continuo en monocapa de las líneas celulares: BHK-21, HEp-2 y MDCK

7.1 Condiciones de las células obtenidas de sangre periférica humana: eritrocitos y linfocitos.

Después de obtener eritrocitos y linfocitos se realizaron las evaluaciones de citotoxicidad de manera inmediata, por lo que la incubación se dio en los pozos de cultivo junto con el ácido úsnico en diferentes concentraciones. Las condiciones fueron similares a las condiciones de las líneas celulares.

7.2 Viabilidad de eritrocitos, linfocitos y las tres líneas celulares: BHK-21, HEp-2 y MDCK

Según la técnica con el colorante de exclusión Azul Tripán, se pudo determinar la viabilidad de cada tipo de células antes de realizar la evaluación de citotoxicidad en la placa de 96 pozos, dando un resultado de 95 a 100% de viabilidad.

7.4 Curva de crecimiento

Los recuentos celulares obtenidos se graficaron: N° de células viables/mL Vs. tiempo (horas), calculándose la fase de reposo (Lag), el tiempo de duplicación (TD) y la cantidad de células viables para las distintas líneas celulares (figura 2). La Cantidad de células a las 120 horas pico máximo de crecimiento de las tres líneas celulares, fue superior en las células HEp-2 (151×10^4 células) con relación a las dos otras líneas celulares (BHK-21 7.7×10^4 células. y MDCK 132×10^4 células). Después de este periodo de tiempo las tres líneas celulares presentaron una disminución en la población muy notable hasta las 168 horas.

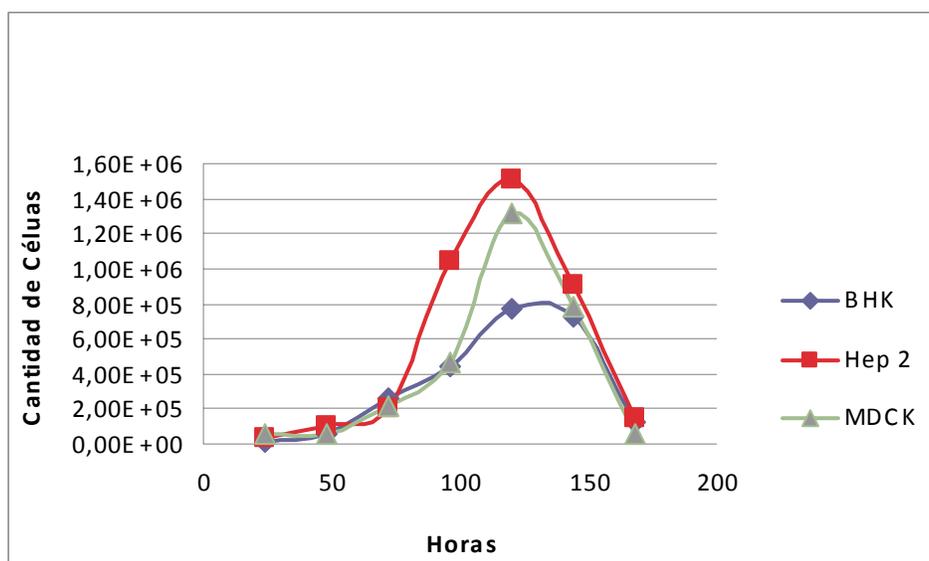


Gráfico N° 1. Curva de crecimiento de células BHK-21, HEp-2 y MDCK

7.5 Citotoxicidad del ácido úsnico en células BHK-21, HEp-2 y MDCK

La concentración inhibitoria del 50 % se determinó incubando monocapas de las tres líneas celulares con diluciones seriadas del compuesto (Anexo 5). La viabilidad celular se determinó a través de la observación de la morfología celular al microscopio óptico y a través del ensayo colorimétrico XTT antes descrito. Las concentraciones elegidas fueron diluciones seriadas al medio a partir de 250 $\mu\text{g/mL}$, concentraciones que resultaron tóxicas por encima 107.30 $\mu\text{g/mL}$ en el caso de las células MDCK, 156.7 $\mu\text{g/mL}$ en células Hep2 y 92.2 $\mu\text{g/mL}$ en células BHK en relación a la anfotericina B producto potencialmente tóxico cuya concentración toxica en promedio esta por encima de los 33 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 2)

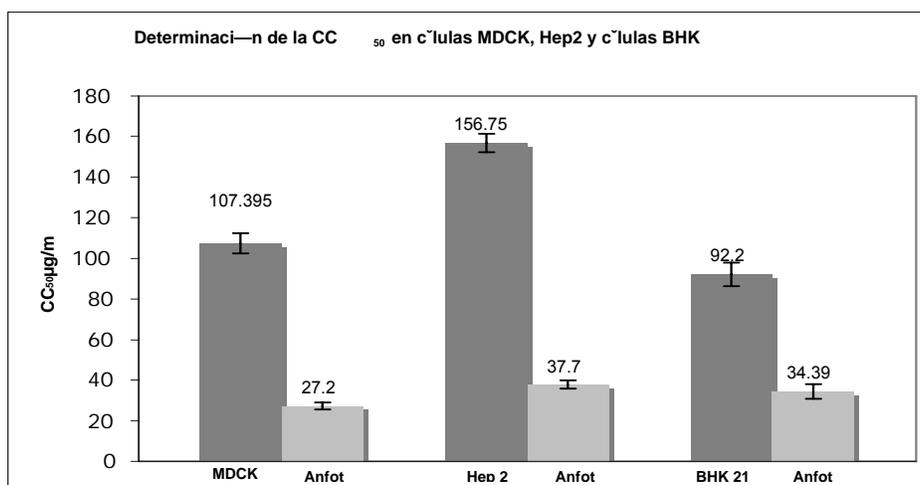


Gráfico Nº 2. Evaluación citotóxica *in vitro* del ácido úsnico vs. anfotericina B sobre líneas celulares BHK-21, HEp-2 y MDCK. Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar de las experiencias realizadas. La evaluación de la citotoxicidad a cada concentración se realizó por triplicado.

7.6 Citotoxicidad del ácido úsnico en eritrocitos humanos.

La evaluación de la citotoxicidad mediante el método de exclusión con azul tripano mostró una CC_{50} de 69.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 horas de exposición, mientras que para la anfotericina B en el mismo periodo de tiempo fue de 12.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A las 48 horas de exposición el ácido úsnico mostró un CC_{50} de 79.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la anfotericina 10.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esto revela que la concentración del ácido úsnico requerida para causar mortalidad del 50% de los eritrocitos fue casi 50 veces mas baja que la anfotericina B. (Gráfico 3)

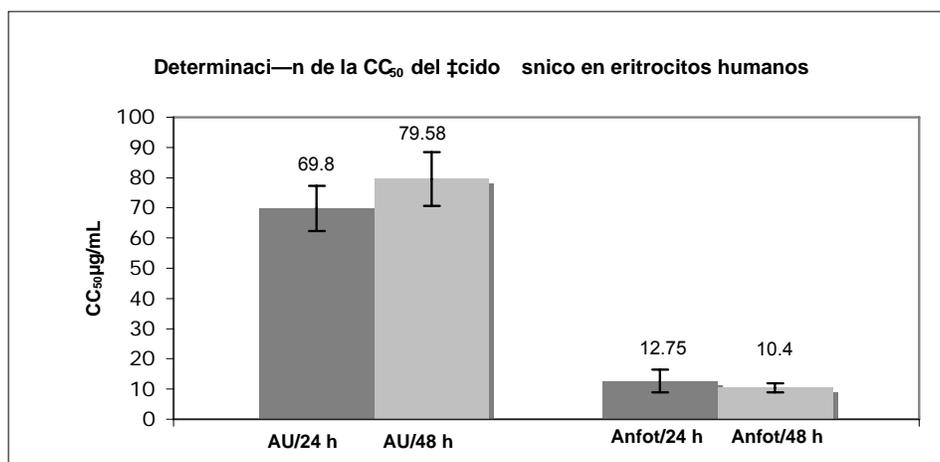


Gráfico Nº 3. Evaluación citotóxica *in vitro* del ácido úsnico vs. anfotericina B sobre eritrocitos humanos. Los valores representan el promedio \pm la desviación

estándar de las experiencias realizadas. La evaluación de la citotoxicidad a cada concentración se realizó por triplicado.

7.7 Citotoxicidad del ácido úsnico en linfocitos humanos.

La evaluación de la citotoxicidad en linfocitos mostró que la CC_{50} a las 24 horas de exposición fue de 97.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, mientras que para la anfotericina B fue de 11.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el mismo período de tiempo. A las 48 horas de exposición el AU mostró un CC_{50} de 79.58 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la anfotericina CC_{50} 10.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esto revela que la concentración requerida del AU para causar mortalidad al 50% de los linfocitos fue casi 70 veces más baja que la anfotericina B.

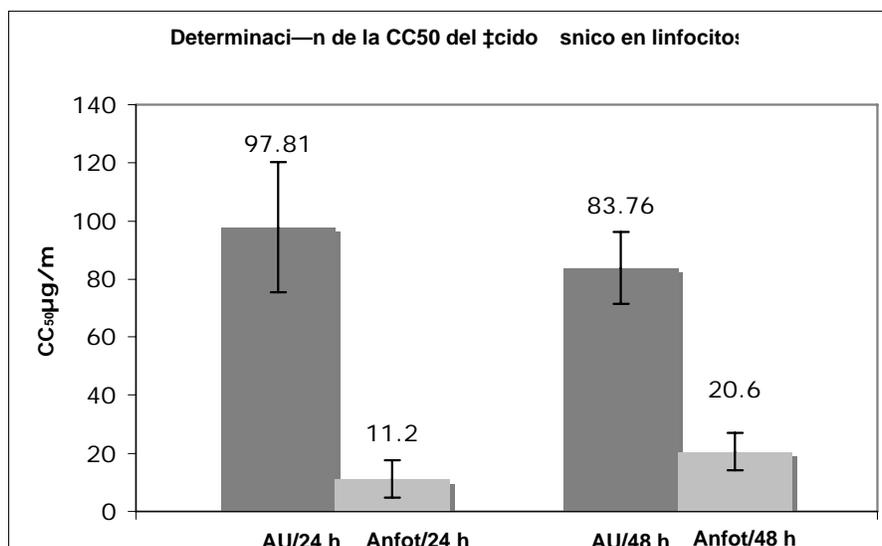


Gráfico N° 4. Evaluación citotóxica *in vitro* del ácido úsnico vs. anfotericina B sobre linfocitos humanos. Los valores representan el promedio \pm la desviación estándar de las experiencias realizadas. La evaluación de la citotoxicidad a cada concentración se realizó por triplicado.

7.8 Análisis morfológico

Las células BHK-21, HEp-2 y MDCK no tratadas mostraron un crecimiento homogéneo en el cultivo, exhibiendo una forma poligonal con bordes definidos y contenido celular ligeramente granulado (Fotos 10, 13 y 16 respectivamente). El efecto citotóxico fue observado a las 24 horas de incubación (Anexo 6) de las líneas celulares con diferentes concentraciones del ácido úsnico detectándose cambios morfológicos a la concentración mas alta (Fotos 11, 14 y 17) con relación a la anfotericina B droga control que si se

observa un efecto citotóxico muy marcado desde la concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$ hasta la concentración de 31.2 $\mu\text{g/mL}$ (Fotos 12, 15 y 18), con una marcada disminución de la viabilidad celular, células dañadas, redondeamiento característico y desprendimiento de células al sobrenadante de los cultivos con el aumento de las concentraciones.

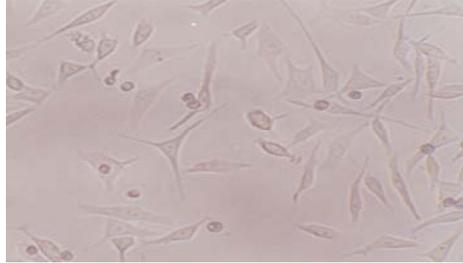


Foto 10. Células BKH-21 no tratadas

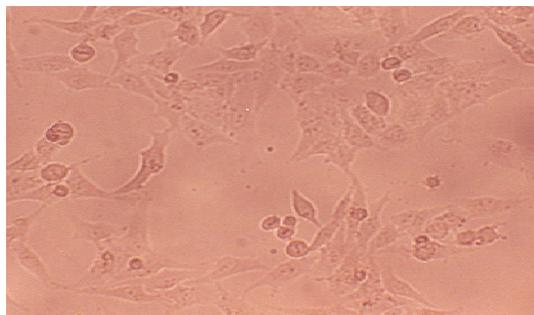
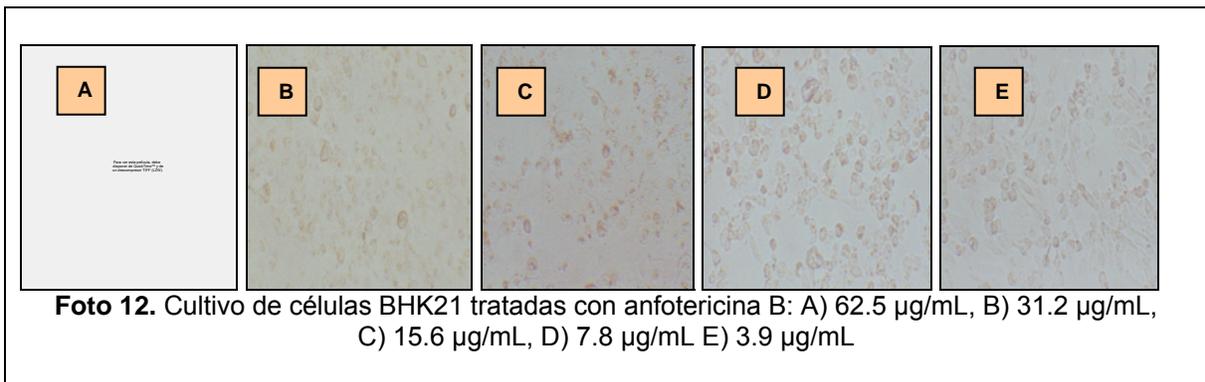
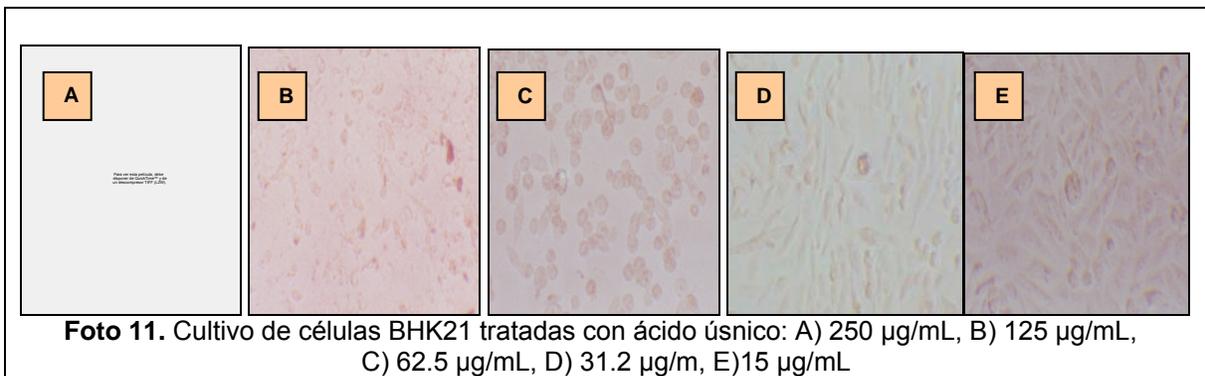


Foto 13. Células HEp-2 no tratadas

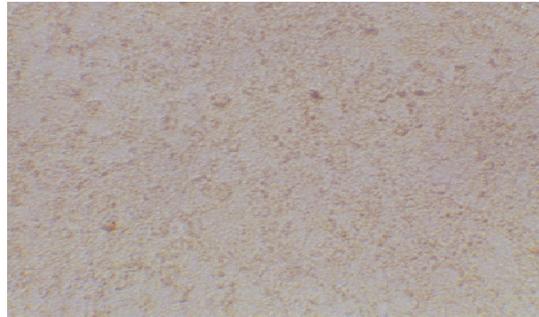
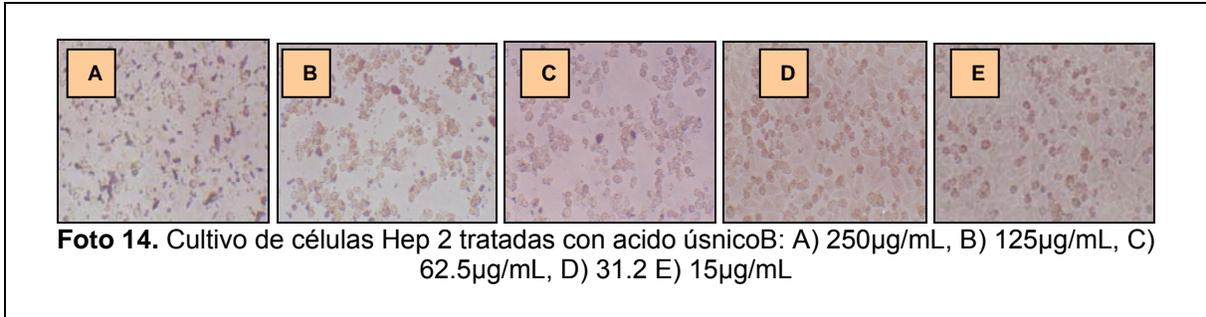


Foto 15. Células HEp-2 con Anfotericina B, droga control, con un efecto citotóxico muy marcado desde la concentración de 250 µg/mL hasta la de 31.2 µg/mL

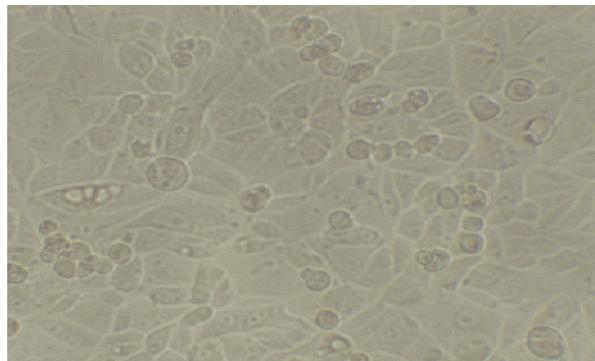


Foto 16. Células MDCK no tratadas

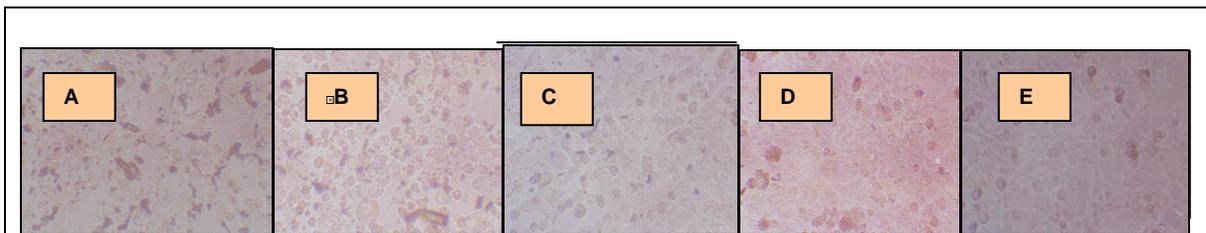


Foto 17. Cultivo de células MDCK tratadas con ácido úsnico: A) 250µg/mL, B) 125µg/mL, C) 62.5µg/mL, D) 31.2 E) 15µg/mL

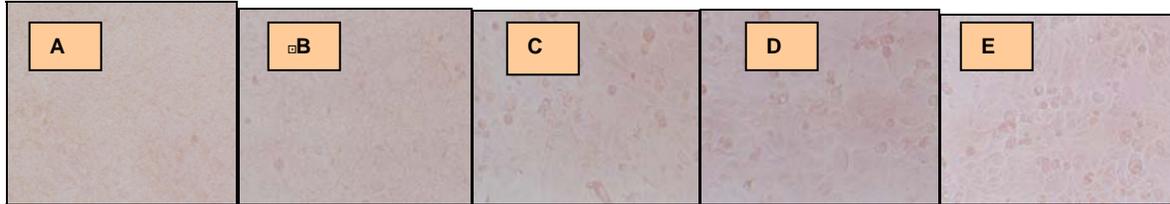


Foto 18. Cultivo de células MDCK tratadas con Anfotericina B: A) 62.5µg/mL, B) 31.2µg/mL, C) 15µg/mL, D) 7 E) 3.5µg/mL

8. DISCUSIÓN

La curva de crecimiento permitió caracterizar el desarrollo de las células bajo condiciones rigurosamente controladas brindando una valiosa información sobre la frecuencia de subcultivos, el número de células viables en un determinado tiempo, el tiempo de duplicación y la fase de reposo, entre otros parámetros. La cuantificación de las células es importante para decir el momento óptimo del subcultivo y determinar el momento de realizar un ensayo de citotoxicidad.

Según este estudio *in vitro* sobre eritrocitos y linfocitos el ácido úsnico mostró una toxicidad muy baja. Aunque los mecanismos específicos se desconocen, éstos bien pudieran involucrar cambios en la permeabilidad de las membranas lo que puede ocasionar lisis de los eritrocitos o en la actividad de enzimas mitocondriales que conducirían a la muerte celular.

Los resultados encontrados muestran un efecto no citotóxico respecto a las células BHK-21, HEp-2 y MDCK, lo cual abre la posibilidad de una potencial aplicación farmacológica.

Todos estos resultados apoyan la búsqueda de compuestos leishmanicidas derivados de plantas. Nuestro trabajo aporta resultados en cuanto al efecto de este producto sobre promastigotes y líneas celulares sugiriendo que el ácido úsnico sería un posible candidato a ser evaluado en futuras investigaciones utilizando ensayos *in vivo*, para valorar su utilidad en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea producida por *L. braziliensis*.

9. CONCLUSIONES

Fueron optimizadas las condiciones de cultivo continuo en monocapa de las líneas celulares: BHK-21, HEp-2 y MDCK al realizar la manutención: (Cantidad de medio de cultivo RPMI/frasco de 25cm³/5mL; 10% de SBF; 37°C de incubación; atmósfera 5% de CO₂ y pH 7.4)

Fueron optimizadas las condiciones de las células obtenidas de sangre periférica humana: eritrocitos y linfocitos.

Se determinó antes de cada evaluación el porcentaje de viabilidad de eritrocitos, linfocitos y las tres líneas celulares: HEp-2, BHK-21 y MDCK por el método de exclusión del colorante Azul Tripán, lo cual resultó ser del 95 al 100%.

Fue determinada la curva de crecimiento de las tres líneas celulares: HEp-2, BHK-21 y MDCK con el método de exclusión del colorante Azul Tripán. La Cantidad de células a las 120 horas pico máximo de crecimiento de las tres líneas celulares, fue superior en las células HEp-2 (151×10^4 células) con relación a las dos otras líneas celulares (BHK-21 7.7×10^4 células. y MDCK 132×10^4 células). Después de este periodo de tiempo las tres líneas celulares presentaron una disminución en la población muy notable hasta las 168 horas.

Se determinó la concentración citotóxica del 50% (CC₅₀) del ácido úsnico en las líneas celulares: HEp-2, BHK-21 y MDCK utilizando el método colorimétrico cuantitativo XTT. El efecto citotóxico mostró ser menor para las células BHK-21 (CC₅₀ 92.2 µg/mL), HEp-2 (CC₅₀ 156.75 µg/mL) y MDCK (CC₅₀ 107.39 µg/mL), con relación a la anfotericina B producto potencialmente tóxico para células MDCK (CC₅₀ 27.2 µg/mL), células HEp-2 (CC₅₀ 37.2 µg/mL) y células BHK-21 (CC₅₀ 34.3 µg/mL).

Se determinó la concentración citotóxica del 50% (CC₅₀) del ácido úsnico en eritrocitos humanos de sangre periférica utilizando el método de exclusión del colorante Azul Tripán.

El efecto citotóxico fue mucho menor (CC_{50} 68.8 $\mu\text{g/mL}$) a las 24 horas, (CC_{50} 79.58 $\mu\text{g/mL}$) a las 48 horas.

Se determinó la concentración citotóxica del 50% (CC_{50}) de la del ácido úsnico en linfocitos humanos de sangre periférica utilizando el método de exclusión del colorante Azul Tripán. El efecto citotóxico fue de (CC_{50} 97.8 $\mu\text{g/mL}$) a las 24 horas, (CC_{50} 83.7 $\mu\text{g/mL}$) a las 48 horas en comparación a la anfotericina B (CC_{50} 12.75 $\mu\text{g/mL}$) a las 24 horas, (CC_{50} 10.4 $\mu\text{g/mL}$) a las 48 horas para eritrocitos y (CC_{50} 11.2 $\mu\text{g/mL}$) a las 24 horas, (CC_{50} 20.6 $\mu\text{g/mL}$) a las 48 horas para linfocitos.

10. RECOMENDACIONES

Al encontrar resultados favorables de un compuesto poco estudiado, en un área de la salud importante en el país como la Parasitología con la enfermedad de Leishmaniasis, es necesario continuar con estos estudios para ampliar la posibilidad de realizar nuevas formulaciones farmacéuticas en beneficio de la población afectada, que permita un fácil acceso al medicamento y una apropiada curación sin efectos secundarios.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. ESCOHOTADO, Antonio, Historia elemental de las drogas, Anagrama, Barcelona, 1996.
2. PLOTKIN, Mark J., Aprendiz de chamán, Emecé, Buenos Aires, 1997.
3. Correo del Maestro Núm.102, noviembre 2004. La búsqueda de nuevas sustancias (Ignacio Carrera Garese)
4. http://www.unesco.org/courier/2000_05/sp/doss24.htm. Un bosque de medicamentos
Cécile Guérin, periodista científica francesa
5. <http://gorseddjaguar.own0.com/estudio-de-la-naturaleza-f31/plantas-de-la-zona-t186.htm>
6. W. Quilhot, G. Leighton, E. Flores, E. Fernandez, W. Peña y G. Guzmán. Factores Exógenos y Endógenos determinantes de la Acumulación de Acido Usnico en Líquenes. *Acta Farm. Bonaerense*; 1987 6 (1): 15-22
7. Héctor Osorio. Documentos de divulgación, Museo Nacional de Historia Natural y Antropología. Algunos Líquenes interesantes de Uruguay. 2008
8. David Guzmán, Pamela Rodríguez. Planeta **Líquenes** Simbiosis que detecta la contaminación Revista Escape. 2008
9. <http://biologiavegetalupel.blogspot.com/LuisannyMirandaBiologíaVegetal>. en [21:07](#) jueves 10 de julio de 2008 HONGOS MACROSCÓPICOS Y LÍQUENES.
10. <http://gorseddjaguar.own0.com/estudio-de-la-naturaleza-f31/plantas-de-la-zont186.htm>
11. Héctor Osorio. DOCUMENTOS DE DIVULGACION, MUSEO NACIONAL DE HISTORIA NATURAL Y ANTROPOLOGIA Algunos Líquenes interesantes de Uruguay II. 2008
12. W. Quilhot, G. Leighton, E. Flores, E. Fernandez, W. Peña y G. Guzmán. Factores Exógenos y Endógenos determinantes de la Acumulación de Acido Usnico en Líquenes. *Acta Farm. Bonaerense* 1987, 6 (1): 15-22
13. <http://www.unex.es/polen/LHB/liquenes/liquen2.htm>
14. Patterson Jr., M. K. 1979, *Methods Enzymol*, 58, 141)
15. Héctor Osorio G. Bargellini, E. del Pianio e G. B. Martini-Bettólo. DOCUMENTOS DE DIVULGACION MUSEO NACIONAL DE HISTORIA NATURAL Y ANTROPOLOGIA Algunos Líquenes interesantes de Uruguay: SuU'attività antibatterica di due acidi lichcnici: acido usnico ed acido vulpinico. «Atti della Accademia Nazionale dei Lincei». vol. I, fase. 1988. 12, págs. 1252-1265.

16. A. Marshak, G. T. Barry and L. C. Craig : Aititibiotic compound isolatcd from the Lichen Ramalina reticulata. «Science», 1996, vol. 101, págs. 594-395.
17. A. Stoll, A. Brack and J. Renz: Die antibakterielle Wirkung der Usninsaure auf Mykobaktcrien nnd anderc Mikroorgaiñsmcn. «Experientia». 1987. Volumen III/8. pág. 115
18. V. C. Barry, L. O. Rourke ancj D. Twomey. Antitubercular activity of diphcnyl ether and related compounds. «Nature», 1987. vol. 160. pág. 800.
19. F. Bustinza y A. Caballero. Contribución al estudio de las propiedades antibacterianas y antifungicas del ácido úsnico y de algunos de sus derivados. Contribución al estudio de los antibióticos procedentes de líquenes. Anales del Jardín Botánico de Madrid, 1998. tomo VII, págs. 511-548.
20. Sh. Shibata, T. Ukita, T. Tamura and Y. Miura: Relation between chemical constitutions and antibacterial effects of usnic acid and its derivatives. «Jap. Med. J.», 1998, 2, págs. 132-154 ().
21. J. Klosa: Antibiótico, in Flechten. «Die Naturwisstnschaften», 1998. 9-288
22. K. O. Vartia: Antibiotics in Lichen. I. «Alíñales Medicinae Expeiimentalis et Biologiae Fenniae», 1999. vol. 27, fase. I, págs. 4B-54.
23. K. O. Vartia :.4niiSio/íff in Lichens. II. «Antilles Medicinae Experimentalis et Biologiae Fenniae», 1990. vol. 28 fase. I, págs. 7-19.
24. K. O. Vartia: On antibiotic Effects of Lichens and lichen substanccs. Supplement No. 7 (1H50) to «Anuales Medicinae Experimentalis et Biologiae Fenniae». 1987
25. <http://www.connmed.com.ar/sociedades/sama.org.ar/com/5.htm>
26. W. Quilhot, G. Leighton, E. Flores, E. Fernandez, W. Peña y G. Guzmán. Factores Exógenos y Endógenos determinantes de la Acumulación de Ácido Úsnico en Líquenes * *Acta Farm. Bonaerense*. 1987.6 (1): 15-22.
27. Lauterwein M , Oethinger M , Belsner K , Peters T , Marre R. In vitro activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid, and (-)-usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother* 1995 Nov 39:11 2541-3
28. Scirpa P , Scambia G , Masciullo V , Battaglia F , Foti E , Lopez R , Villa P , Malecore M , Mancuso S. A zinc sulfate and usnic acid preparation used as post-surgical adjuvant therapy in genital lesions by Human Papillomavirus. *Minerva Ginecol* 1999 Jun 51:6 255-60
29. Rafanelli S , Bacchilega R , Stanganelli I , Rafanelli A. Contact dermatitis from usnic acid in vaginal ovules. *Contact Dermatitis* 1995 Oct 33:4 271-2
30. Mitchell JC. Allergy to lichens. Allergic contact dermatitis from usnic acid produced by lichenized fungi. *Arch Dermatol* 1965 Aug 92:2 142-6

31. Cocchietto M , Skert N , Nimis PL , Sava G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften* 2002 Apr 89:4 137-46
32. <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/u006.htm>
33. M. Fontana, G. Proserpio, Riv. Ital. Essenze, Profumi, Piante O., Aromi, Saponi, Cosmetici, Aerosol (RIPOAM), 1974,56,315-336.
34. Sandra I. Castro Diaz. Evaluación de la Actividad citotóxica d extractos y fracciones de *Iserir laevis* empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. Tesis (2006). Bogota, Colombia.
- 35 http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?P=Aplicacion_Cultivos_Celulares&opc=introd.
36. Informe de ensayo de citotoxicidad Abril 2007.
37. Macpherson I. Stocker, M. Polyoma transformation of hámster cell clones- an investiagation of genetic factor affecting cell competence. *Virology*. 1962; 16:147-151
38. Macpherson I. Stocker, M. Polyoma transformation of hámster cell clones- an investiagation of genetic factor affecting cell competence. *Virology*. 1962; 16:147-151
39. Wiktor TJ, Sokol F, Kuwert E y Koprowski H. *Proc Soc Exp. Biol.* (N.Y.) 1969; 131:799
40. Bieniasz PD, Erlwein O, Aguzzi A, Rethwilm A, McClure MO. Gene transfer using replication-defective human foamy virus vectors. *Virology*. 1997; 235(1):65-72
41. Sureau P. Rabies vaccine production in animal cell culture. *Advances in biochemical engineering and biotechnology*. 1987; 34:11-128.
42. Ensayo in vivo para determinar agentes extraños en células BHK-21 empleadas en la obtención de biológicos Georgina Pardo, Ernesto Almora, Odalys Fidalgo, Arelys Zamora, Niurka Rodríguez y Ela María Pérez. Instituto Finlay, Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.)
43. (<http://www.viomed.com/services/product/mdck.htm>)
44. <http://www.percell.se/112.pdf>
45. A. E. Moore, L. Sabachewsky, and H. W. Toolan (Cancer Res. 15: 598, 1955)
46. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 76: 497, 1958.
47. Luis Morier, Lissette Pérez, Reynel Cancio, Clara Savón Zoila Gonzales, Angel Goyenechea. Comparación de la línea NCI-H292 con otras líneas continuas para la multiplicación de virus respiratorios. *REV CUBANA MED TROP* 48(3): 171-173, septiembre-diciembre, 1996 Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"
48. http://bvs.sld.cu/revistas/mtr/vol48_3_96/mtr08396.htm

49. <http://www.viomed.com/services/product/hep2.htm>
50. <http://www.ub.es/biocel/wbc/images/cultivo/grafica.jpg>
51. Tratado de Fisiología Médica; Autor: Dr. Arthur C. Guyton. ISBN 0-7216-4394-9
52. Michaely P, Bennett V. The ANK repeats of erythrocyte ankyrin form two distinct but cooperative binding sites for the erythrocyte anion exchanger. J Biol Chem 1995;270:22050-7.
53. Chang SH, Low PS. Regulation of the glycophorin C-protein 4.1 membrane-to-skeleton bridge and evaluation of its contribution to erythrocyte membrane stability. J Biol Chem 2001;276:22223-30.
54. http://bvs.sld.cu/revistas/hih/vol21_3_05/hih01305.htm
55. <http://www.medmol.es/termino.cfm?id=90>
56. http://www.portalplanetasedna.com.ar/la_sangre.htm
57. (<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/classical-media-salts/rpmi-media.html>)
58. <http://www.bioind.com/HTMLs/article.aspx?C2004=12557&BSP=12410>. Technical Resources Tissue Culture > [Cell Proliferation Kit \(XTT\)](#)
59. Giménez A, Gupta M Deharo E, Editores. Manual de Técnicas de laboratorio para la Evaluación de Sustancias Tripanocidas y Leishmanicidas. 2005;p.89-90
60. CornellyWillians, Espinosa Omar, Montenegro Hector, Cubila Luis, Capson Tood, Ortega-Barria Eduardo, Romero Luz..Hydrosoluble formazan XTT:Its application to natural products drug discovery for Leishmania.Journal of Microbiological Methods. 2003;55:813-816
61. Goodwin C J, Holt S J, Downes S, Marshall N J. Microculture tetrazolium assays: a comparison between two new tetrazolium salts,XTT and MTS.Journal of Immunological Methods.1995;179:95-103.

12. ANEXOS

ANEXO 1

Medio RPMI 1640

Se preparó el Medio RPMI-1640 (Sigma – Aldrich) para 250 mL, pesando (Balanza – AND-HR-200) los siguientes compuestos:

	Cantidad a pesar
Medio RPMI 1640	3.97 g
NaHCO ₃	525 mg
Gentamicina	15 mg

Pesar 3.97g de Medio RPMI-1640 y diluir el producto en 200 mL de agua destilada. Añadir 525 mg de NaHCO₃ y disolver totalmente los productos. Añadir 15 mg de Gentamicina y completar el volumen a 250 mL. Filtrar la solución por filtros de 0.22 µM en condiciones estériles y distribuir la solución en pequeños volúmenes para evitar contaminación. Antes del uso se añade suero bovino fetal de complementado (20 min. a 56°C) a una concentración de 10 %.

ANEXO 2

Preparación de la solución de Tripsina/EDTA

	Concentración	Volumen
Tripsina	0.25 %	50 mL
EDTA	2 %	2.5 mL
PBS		197.5 mL

Preparar las tres soluciones según la concentración indicada, medir los volúmenes y mezclar. Esta solución debe ser filtrada con filtros millipore de 0.22 μ M en condiciones estériles en campana de flujo laminar.

ANEXO 3

Preparación de la solución de congelación (DMSO al 20%/PBS)

	Volumen
DMSO	10 mL
PBS	40 mL

Esta solución se prepara en campana de flujo laminar.

ANEXO 4

Microscopio invertido

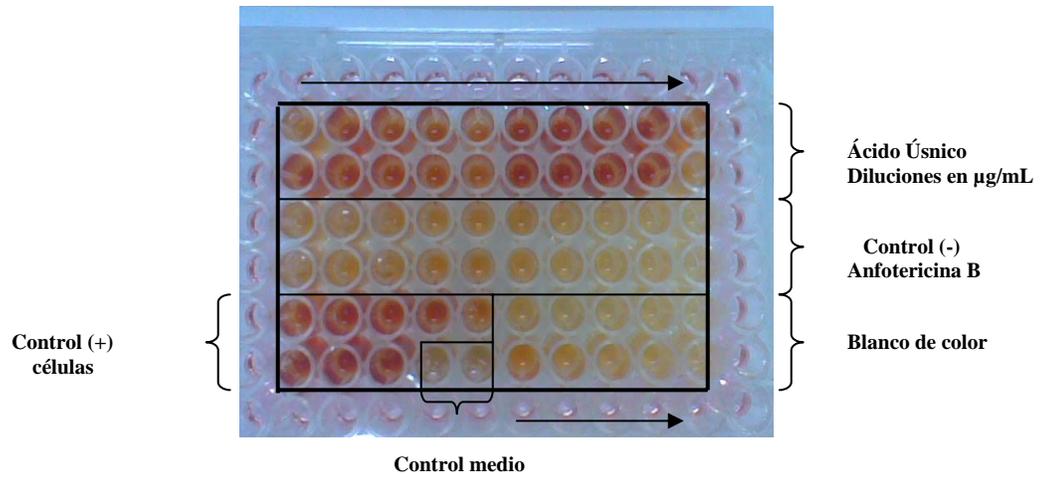


Microscopio invertido donde se observa el estado de las células en cultivo

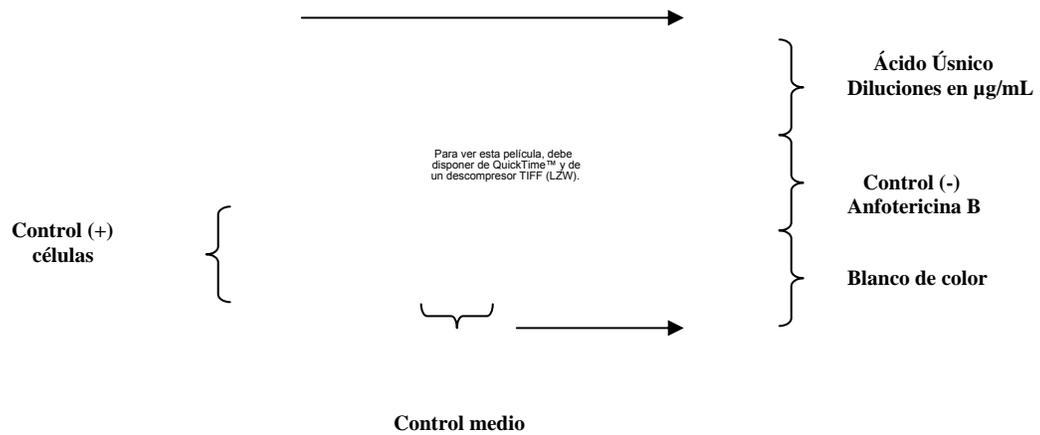
ANEXO 5

Diseño del bioensayo colorimétrico XTT para líneas celulares

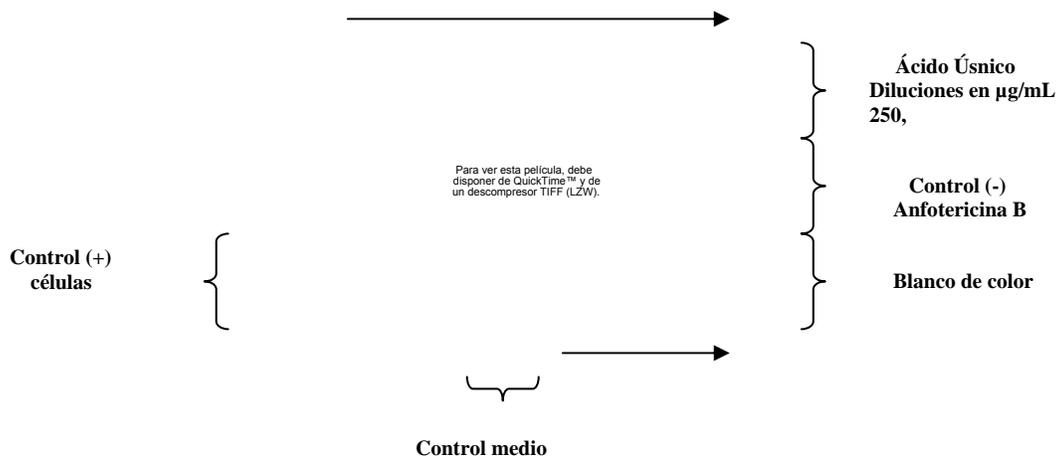
Placa de BHK-21



Placa de MDCK



Placa de Hep - 2



ANEXO 6

Incubación en estufa a 37°C y atmósfera con 5% de CO₂

