

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE SERVICIOS DE LABORATORIO EN DIAGNOSTICOS
E INVESTIGACION EN SALUD
“SELADIS”**



**EVALUACION DEL EFECTO DEL EXTRACTO DE
ALCALOIDES DE EVANTA SOBRE LAS CELULAS
NATURAL KILLER HUMANAS**

(Tesis para la obtención del Grado de Especialidad)

ELABORADO POR:

Lic. LIZ WENDY VILLARREAL WAIWA

ASESORA:

MSc., PhD. JACQUELINE CALLA DE MAGARIÑOS

CO-ASESOR:

Dr. TEDDY QUISPE SOTO

**LA PAZ-BOLIVIA
2014**

*Dios no te hubiera dado la capacidad de soñar
sin darte también la posibilidad de convertir
tus sueños en realidad.*

Héctor Tassinari

Dedicatoria

A Diosito y la Virgencita que siempre me bendicen diariamente con grandes y pequeño regalos.

A mi mamá por ser mi angelito de la guarda y mi mejor amiga, por su apoyo, su amor e inmenso ejemplo de vida.

A mis hermanitos por acompañarme en la vida y en cada paso que doy.

Agradecimientos

A Diosito por ser mi luz en el camino, por brindarme siempre tantos regalos y lecciones, por enseñarme que el amor más grande es dar la vida por los amigos y por darme la oportunidad de conocerlo y amarlo.

A la Virgencita, mi mamá del cielo, que con su protección, amor incondicional e intercesión me enseña a ser como ella, una mujer fuerte, sencilla, digna y bondadosa.

A mi mamá Rinita, mi angelito de la guarda y mejor amiga por todo el apoyo incansable que siempre me da, por amarme aun con mis defectos y por su compañía bella día a día.

A mis hermanitos y mis sobrinos por ser el regalo y la bendición que me dio Dios, por compartir cada una de sus vidas conmigo y por su granito de arena en este trabajo.

A mis angelitos desde el cielo, mi papito Eduardo, mi abuelita Haydee y mi abuelito Pedro, por su ejemplo y amor en esta tierra, y sus oraciones desde arriba.

A mi tutora no solo de la tesis sino de la vida, la Dra. Jacqueline Calla porque con el ejemplo de persona, profesional, mamá, mujer y amiga ha logrado brindarme todo ese cariño y amor que siempre tendré en el corazón.

A toda la familia del laboratorio de Inmunología de Seladis: Dra. Calla, Dr. Walter Magariños, Gladys Pérez, Carlita Díaz, Silvana Limache, Marianela Patzi, Karina Delgado, Teddy Quispe, Dennis Castro y Fabiola Montes por todas las experiencias, lecciones y bendiciones que como familia hemos recibido y vivido.

A mis queridos amigos: Elito, Paulo, Angelito, Fede, Paula, Paola R, Isita, Sandra V, Cintya, Gret, Conny, Estela, Noemí, a todos los del ballet Tradición Chaqueña y a todos por sus imborrables huellas en el corazón.

INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
I. Introducción	1
II. Marco Teórico.....	3
1. Aspectos Generales del Sistema Inmune.....	3
2. Órganos linfáticos.....	3
2.1 Órganos linfáticos Primarios.....	4
2.2 Órganos Linfáticos Secundarios.....	5
3. Inmunidad Innata.....	8
3.1 Componentes del Sistema Inmune Innato.....	8
3.1.1 Barreras Epiteliales.....	9
3.1.2 Células Fagocíticas.....	9
3.1.2.1 Neutrófilos.....	9
3.1.2.2 Monocitos y Macrófagos.....	10
3.1.2.3 Células Dendríticas.....	11
3.1.2.4 Células Natural Killer (NK).....	11
a) Citocinas que regulan a las Celulas NK.....	13
b) Citotoxicidad natural de las células NK.....	13
c) Citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) de las células NK.....	14

d)	Mecanismos de citotoxicidad de las células NK.....	15
e)	Granzimas.....	16
f)	El papel de las células NK en la leishmaniasis.....	16
3.1.3	Proteínas Plasmáticas.....	18
3.1.3.1	Complemento.....	18
3.1.3.2	Pentraxinas.....	18
3.1.3.3	Colectinas y Ficolinas.....	19
3.1.4	Citocinas de la Inmunidad Innata.....	19
3.1.5	Características del reconocimiento en la Inmunidad Innata.	20
4.	Inmunidad Adaptativa.....	20
4.1	Componentes del Sistema Inmune Adaptativo.....	21
4.1.1	Linfocitos.....	21
a)	Linfocitos B.....	22
b)	Linfocitos T.....	22
4.1.2	Células Presentadoras de Antígeno (CPA).....	25
5.	Apoptosis.....	25
5.1	Etapas de la Apoptosis.....	25
6.	Tamoxifeno: Un inductor químico de la apoptosis.....	27

7.	Medicina Tradicional.....	27
7.1	<i>Galipea longiflora Krause Kallunki</i> (Evanta).....	28
III.	Antecedentes.....	30
IV.	Planteamiento del Problema	35
V.	Justificación.....	36
VI.	Objetivos.....	38
1.	Objetivo General.....	38
2.	Objetivos Específicos.....	38
VII.	Diseño de la Investigación.....	39
1.	Población en estudio.....	39
2.	Criterios de Inclusión.....	39
3.	Criterios de Exclusión.....	39
4.	Contexto y Lugar.....	39
5.	Aspectos Éticos.....	39
VIII.	Diseño del Estudio.....	40
a.	Tipo de Diseño.....	40
b.	Material y Métodos.....	40
2.1	Materiales.....	40
2.2	Reactivos.....	40

2.3	Equipos.....	41
c.	Procedimientos.....	41
3.1	Aislamiento de Células NK.....	41
3.2	Inmunofluorescencia Indirecta de células NK con Anti Granzima A y Anti Granzima B.....	43
3.3	Tinción con anexina-PE y 7AAD de células mononucleares en apoptosis y necrosis.....	44
3.4	Tinción con anexina-PE y 7AAD de células NK en apoptosis y necrosis	46
d.	Fuente de financiamiento.....	46
e.	Análisis Estadístico.....	46
IX.	Resultados.....	47
a.	Análisis de la pureza de las células NK separadas por el método de enriquecimiento de células NK con perlas magnéticas.....	47
b.	Polarización de células NK.....	48
c.	Efecto de EAE sobre la polarización de células NK humanas con Anti Granzima A.....	49
d.	Efecto de EAE sobre la polarización de células NK humanas con Anti Granzima B.....	50
e.	Optimización del método de tinción de células en apoptosis con anexina-PE y 7AAD.....	51

f.	Efecto del EAE sobre la inducción a apoptosis.....	53
6.1	Efecto del EAE sobre la inducción a apoptosis temprana	53
6.2	Efecto del EAE sobre la inducción a apoptosis tardía/necrosis.....	55
6.3	Análisis por citometria de flujo de la detección de apoptosis en células NK por la tinción con anexina-PE y 7AAD.....	56
X.	Discusión.....	57
XI.	Conclusiones.....	62
XII.	Recomendaciones.....	63
XIII.	Bibliografía.....	64
XIV.	Anexos.....	65

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Célula NK	11
Figura 2 Funciones de las células NK.....	12
Figura 3 Apoptosis por mecanismo membranolítico.....	15
Figura 4 Características generales de las interacciones entre células NK y parásito de <i>Leishmania</i>	17
Figura 5 Fundamento del método de enriquecimiento de células NK.....	43
Figura 6 Fundamento del método de tinción de células en apoptosis con anexina-PE y 7AAD.....	45
Figura 7 Pureza de células NK por método de enriquecimiento con perlas magnéticas con Anti CD16 y Anti CD-56.....	47
Figura 8 Pureza de células NK por método de enriquecimiento con perlas magnéticas con Anti Granzima A y Anti Granzima B.....	48
Figura 9 Polarización de las células NK.....	48
Figura 10 Efecto del EAE sobre el porcentaje de polarización de células NK con Anti Granzima A.....	49
Figura 11 Efecto del EAE sobre el porcentaje de polarización de células NK con Anti Granzima B.....	50
Figura 12 Resultados del análisis por citometria de flujo de la corrida de controles y de células en presencia de EAE para optimizar tinción con anexina-PE y 7AAD de células apoptóticas.....	52
Figura 13 Efecto del EAE sobre el porcentaje de inducción a apoptosis temprana en células mononucleares por detección con el método de tinción de anexina.....	53
Figura 14 Efecto del EAE sobre el porcentaje de inducción a apoptosis tardía/necrosis en células mononucleares por el método de tinción de anexina-PE y 7AAD.....	55
Figura 15 Resultados del análisis por citometria de flujo de células NK de la detección de apoptosis por tinción con anexina-PE y 7AAD.....	56

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Características de la Respuesta Inmune Innata y Adaptativa.....	3
Tabla 2 Funciones principales de los componentes del Sistema Inmune Innato.....	8
Tabla 3 Citocinas que regulan a las células.....	13
Tabla 4 Propiedades generales de las células NK humanas.....	14
Tabla 5 Citocinas de la Inmunidad Innata.....	20
Tabla 6 Clasificación taxonómica de <i>Galipea longiflora</i>	29
Tabla 7 Valores obtenidos en células mononucleares en corrida de prueba.....	51

INDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1 Certificado de Aval ético del Proyecto de Enfermedades infecciosas.....	69
Anexo 2 Consentimiento Informado proporcionado a los sujetos en estudio	70

RESUMEN

La medicina tradicional en Bolivia ha sido un importante instrumento para curar muchas enfermedades. Dentro de las plantas utilizadas está la especie *Galipea longiflora* o Evanta, con importante actividad leishmanicida *in vivo* como *in vitro*, producto natural, de baja toxicidad, económicamente accesible y con un modo de administración práctico y ambulatorio. A pesar de que se ha logrado una contribución valiosa de información respecto a los efectos del extracto de alcaloides de Evanta (EAE), aun se está trabajando en su validación científica para considerarla un tratamiento que se constituiría en oportunidad de cura para la leishmaniasis, por lo que este estudio que pretende evaluar el efecto del EAE sobre las células natural killer (NK) colaborará con la perspectiva de nuevos alcances de dicho tratamiento.

En el presente estudio se evaluó los parámetros: Polarización de células NK con Anti Granzima A y Anti Granzima B; detección de apoptosis y necrosis en células mononucleares y NK por tinción con Anexina-PE y 7AAD. Se observó que la actividad de las células NK evaluada por el porcentaje de polarización de las mismas con Anti Granzima A y Anti Granzima B no mostró ninguna diferencia. En la inducción a apoptosis y necrosis se observó una diferencia en presencia de EAE de la apoptosis temprana en células mononucleares. Las células no tratadas muestran menor apoptosis temprana; en células no tratadas se determinó un promedio de 13,34%, en células tratadas 10,79% ($p < 0,05$). En células NK se logró observar una diferencia en presencia de EAE en la apoptosis temprana. Las células no tratadas muestran mayor apoptosis temprana, con un 3,0% más respecto a las tratadas. No se observó diferencia alguna en presencia del EAE en las células mononucleares y células NK en la apoptosis tardía/necrosis. Se podría sugerir que el EAE disminuye la inducción de la apoptosis en su etapa temprana con un efecto aparentemente protector en células NK y células mononucleares.

I. Introducción

La medicina tradicional en Bolivia ha sido un importante instrumento para curar las enfermedades desde hace cientos de años. Actualmente alrededor de un 80% de la población acude a la práctica de esta usando plantas y procedimientos iniciados por pueblos indígenas, por su disponibilidad y accesibilidad económica, en especial para la población de escasos recursos ⁽¹⁾.

Dentro de las plantas utilizadas por la medicina tradicional esta la planta de especie *Galipea longiflora*, comúnmente llamada Evanta, que tiene importante actividad leishmanicida tanto *in vivo* como *in vitro* ⁽²⁾. Se ha encontrado en diversos estudios que los extractos de las hojas y tallo de esta planta son activos *in vitro* contra *Leishmania spp* y *Trypanosoma cruzi* por lo que es utilizada por los mosetenes y tacanas para el tratamiento de leishmaniasis y chagas ⁽³⁾. La Evanta por ser un producto natural, de baja toxicidad, económicamente accesible y además con un modo de administración bastante práctico, ambulatorio permitiendo que el paciente pueda desarrollar su vida normalmente promete ser un tratamiento alternativo para el paciente con leishmaniasis ⁽⁴⁾.

Ahora, la leishmaniasis es una enfermedad que ha sido “olvidada” por lo que no se toman las medidas adecuadas en nuestro país para poder erradicarla, además no discrimina edades y disminuye la inserción social de niños y jóvenes. Por otro lado el tratamiento utilizado es tóxico, disminuye la calidad de vida y trabajo, es de alto costo lo que reduce el aporte económico familiar ⁽¹⁾.

Se han realizado trabajos sobre los efectos del Extracto de Alcaloides de la Evanta (EAE) en la respuesta inmune sobre células dendríticas (CD), macrófagos, linfocitos y neutrófilos. Las células natural killer (NK) son una población de linfocitos, parte de la respuesta inmune innata, importantes porque que desempeñan funciones de citotoxicidad y secreción de

citoquinas ⁽⁵⁾. Además se ha podido hallar en estudios que las células NK son fundamentales en el control de infección por *Leishmania* porque se activan directamente por el parásito o por citoquinas, al ocurrir esto estimulan la actividad citotóxica de otras células y controlan indirectamente la replicación de los microorganismos patógenos ⁽⁶⁾. Por lo que es importante investigar el papel de las células NK en la respuesta inmune frente a la infección por *Leishmania* en presencia de EAE.

Por todo esto se pretende determinar el efecto del EAE sobre la actividad de las células NK humanas.

II. Marco Teórico

1. Aspectos Generales del Sistema Inmune

El Sistema inmune está conformado por una serie de órganos, tejidos y células distribuidos de manera amplia por todo el cuerpo ⁽⁷⁾. La respuesta inmune puede ser de dos tipos: Innata o Inespecífica y Adaptativa o Específica ⁽⁸⁾.

	Innata	Adaptativa
Características		
Especificidad	Frente a las estructuras compartidas por grupos de microbios afines	Para los antígenos microbianos o no
Diversidad	Limitada; codificada por la línea germinal	Muy amplia; los receptores se producen por la recombinación somática de segmentos génicos
Memoria	Nula	Sí
Falta de reactividad frente a uno mismo	Sí	Sí
Componentes		
Barreras celulares y químicas	Piel, epitelios mucosos; productos químicos antimicrobianos	Linfocitos presentes en los epitelios; anticuerpos segregados en las superficies epiteliales
Proteínas sanguíneas	Complemento, otras	Anticuerpos
Células	Fagocitos (macrófagos, neutrófilos), linfocitos citotóxicos naturales	Linfocitos

Esta tabla recoge las características y los componentes principales de las respuestas inmunitarias innata y adaptativa. La inmunidad innata se explica con más detalle en capítulo, 2.

Tabla 1. Características de la Respuesta Inmune Innata y Adaptativa Fuente: Abbas; 2008

2. Órganos linfáticos

Los órganos linfoides contienen linfocitos en diferentes estados de maduración y se clasifican en primarios que incluyen la médula y el timo y en secundarios que corresponden principalmente el bazo, ganglios linfáticos y tejido linfoideo asociado a mucosas ⁽⁷⁾.

2.1 Órganos linfáticos Primarios

a) Medula Ósea

En la médula ósea se inicia el proceso de maduración de todas las células del sistema inmune. En mamíferos adultos, incluyendo al hombre, los linfocitos B maduran enteramente en la médula ósea mientras que los linfocitos T maduran en el timo. En estos órganos linfoides adquieren sus receptores antigénicos específicos, y también aprenden a discriminar entre autoantígenos, que serán tolerados y antígenos extraños en cuya destrucción colaboran. En la médula se albergan una gran cantidad de células madre que es de donde se origina el resto de las células de la sangre y entre ellas todas las que tienen función inmune y que se conocen como leucocitos o glóbulos blancos. Este proceso se conoce como hematopoyesis, que culmina con la formación de diferentes tipos celulares ya en su forma madura ⁽⁷⁾.

b) Timo

El timo es un órgano situado en la parte superior del mediastino anterior y es donde maduran los linfocitos T. El timo presenta su máximo desarrollo en el feto y en el niño adolescente, mientras que a partir de los 15 años comienza un proceso atrófico y degenerativo ⁽⁷⁾.

El timo es un órgano linfoepitelial de forma bilobulada que deriva de un esbozo epitelial formado a partir de la tercera y cuarta bolsas faríngeas, de aparición muy temprana en el embrión. El parénquima tímico está constituido por una malla de células epiteliales rellena de células linfoides (denominadas timocitos) y se organiza formando lobulillos tabicados por trabéculas conjuntivas ⁽⁷⁾.

Dentro de cada lobulillo se puede distinguir una zona externa o corteza, que contiene la gran mayoría de los timocitos, y una zona interna o medular que es pobre en timocitos. El estroma del timo está constituido fundamentalmente por la malla de células epiteliales que adoptan diferentes formas ⁽⁷⁾.

Las células epiteliales del timo, tanto de la corteza como de la médula, expresan una gran riqueza en moléculas del MHC (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) clase II, imprescindibles para el reconocimiento de autoantígenos por los linfocitos T, por lo que en el timo llegan las células en forma de precursores procedentes de la médula y allí se produce su proceso madurativo de los linfocitos T ⁽⁷⁾.

2.2 Órganos Linfáticos Secundarios

Una vez que los linfocitos B y T abandonan los órganos primarios donde han madurado, pasan al torrente circulatorio, a través del cual se mueven por todos los tejidos del organismo y alcanzan ganglios linfáticos, bazo y otros. Cuando estas células se extravasan, llegan a los tejidos y son recogidos por los vasos periféricos del sistema linfático a través del cual pueden llegar a los ganglios linfáticos o alcanzar de nuevo la circulación sanguínea general y así, llegar vía sanguínea, a los distintos ganglios linfoides o bien al bazo, donde pueden de nuevo volver a la sangre y a los diferentes tejidos ⁽⁷⁾.

Los órganos linfoides secundarios que incluyen el bazo, los ganglios linfáticos y MALT (mucosal associated lymphoid tissue) (amígdalas, placas de Peyer del intestino y acúmulos linfoides del tracto urogenital), proporcionan el medio idóneo en el que las células del sistema inmune (macrófagos, células presentadoras de antígeno

(CPA), linfocitos T y B) pueden interactuar entre sí y con el antígeno ⁽⁷⁾.

a) El Bazo

Se trata de un órgano situado en el hipocondrio izquierdo, detrás del estómago y cerca del diafragma. Su superficie externa se compone de una cápsula fibrosa con algunas fibras musculares lisas y penetra profundamente en el parénquima del órgano. Básicamente, en el bazo se distingue la pulpa roja que es un reservorio vascular para hematíes y la pulpa blanca que contiene el tejido linfoide, el cual se dispone alrededor de una arteriola central, presentando áreas T y B.

Las células T se disponen más próximas y alrededor de la arteriola central, mientras las células B se disponen exteriores a la misma. También son frecuentes las células reticulares dendríticas y macrófagos en el centro germinal, así como macrófagos especializados en la zona marginal (área que rodea a los folículos linfoides) que junto a las células foliculares dendríticas de los folículos primarios (folículos no estimulados sin centro claro germinal) se ocupan de la presentación del antígeno al linfocito B ⁽⁷⁾.

b) Ganglios linfáticos

Los ganglios linfáticos conforman, junto a los vasos linfáticos, una compleja red corporal cuya función es filtrar los antígenos procedentes del espacio extracelular y la linfa durante su circulación desde la periferia hasta el conducto torácico. Los ganglios linfáticos, en el humano, son redondeados u ovoides y presentan un hilio donde los vasos sanguíneos entran y salen respectivamente ⁽⁷⁾.

Básicamente, se distingue un área B denominada córtex, un área T denominada paracórtex y un área medular central. La corteza contiene agregados de linfocitos B dispuestos formando folículos primarios y secundarios, según que posean centros germinales o no en función de que hayan recibido estímulos antigénicos. La paracorteza, contiene linfocitos T y abundantes CPA (CD) quienes presentan abundantes antígenos MHC clase II en superficie. La zona medular presenta algunos cordones linfoides separados por espacios vasculares (senos medulares) que contienen la mayor parte de las células plasmáticas y los macrófagos sinusales de los ganglios linfáticos ⁽⁷⁾.

c) Tejido linfoide asociado a mucosas (MALT)

Son acúmulos dispersos de tejido linfoide no encapsulado, se observan frecuentemente en diversos órganos, particularmente en áreas submucosas gastrointestinales, respiratorias y urogenitales ⁽⁷⁾.

Los elementos linfoides se encuentran formando agregados difusos u organizados formando folículos con centro claro germinal. En el tracto intestinal, se observan elementos linfoides difusos en la submucosa del órgano, y formando folículos linfoides con centro germinal en las denominadas placas de Peyer. El epitelio que reviste las placas de Peyer transporta el antígeno y en sentido inverso, la IgA secretora producida por las células plasmáticas muy abundantes en el epitelio. En el hombre, además se encuentra abundante tejido linfoide con centros germinales en las amígdalas faríngeas y también en paredes bronquiales y a lo largo del tracto urogenital ⁽⁷⁾.

3. Inmunidad Innata

La inmunidad innata también llamada natural o espontánea aporta la primera línea de defensa frente a los microorganismos, de una forma inespecífica con principio de reconocimiento de los ajeno o extraño, está constituida por mecanismos de defensa celulares y bioquímicos instaurados antes de contraer la primera infección para responder con rapidez, eficacia y cada vez con igual intensidad, con esto logra impedir, controlar o eliminar la infección en el huésped. Por otro lado la respuesta innata estimula a la respuesta inmunitaria adaptativa y puede influir en su naturaleza para lograr eficacia óptima en la defensa contra todos tipos de microorganismos ⁽⁸⁾ ⁽⁹⁾.

3.1 Componentes del Sistema Inmune Innato

Este sistema inmune está conformado por: Barreras epiteliales, células circulantes y tisulares y proteínas plasmáticas ⁽⁸⁾.

Componentes	Funciones principales
Barreras	
Capas epiteliales	Impedir la entrada de los microbios
Defensinas/catelicidina	Destrucción de los microbios
Linfocitos intraepiteliales	Destrucción de los microbios
Células efectoras circulantes	
Neutrófilos	Fagocitosis y destrucción inicial de los microbios
Macrófagos	Fagocitosis y destrucción eficiente de los microbios, secreción de citocinas que estimulan la inflamación
Linfocitos NK	Lisis de las células infectadas, activación de los macrófagos
Proteínas efectoras circulantes	
Complemento	Destrucción de los microbios, opsonización de los microbios, activación de los leucocitos
Lectina de unión a la manosa (colectina)	Opsonización de los microbios, activación del complemento (vía de la lectina)
Proteína C reactiva (pentaxina)	Opsonización de los microbios, activación del complemento

Tabla 2. Funciones principales de los componentes del Sistema Inmune Innato. Fuente: Abbas, 2008

3.1.1 Barreras Epiteliales

Las superficies intactas de los epitelios forman una barrera física entre los microbios del medio externo y el tejido del huésped. Los tres principales elementos de separación son: la piel, las superficies mucosas de los aparatos: digestivos y respiratorio ⁽⁸⁾.

Al igual que algunos leucocitos, los epitelios producen péptidos antimicrobianos; como son las defensinas y catelicidinas ⁽⁸⁾.

Estas barreras junto a las cavidades serosas contienen ciertos tipos de linfocitos como los linfocitos T intraepiteliales y linfocitos B-1 ⁽⁷⁾.

Además de linfocitos se encuentran también mastocitos, células que responden directamente a los productos microbianos mediante la secreción de citocinas y mediadores lipídicos para favorecer la inflamación ⁽⁷⁾.

3.1.2 Células Fagocíticas

Las células efectoras más abundantes del sistema innato son las células fagocíticas circulantes y que emigran a los tejidos; entre ellos están los neutrófilos, los monocitos, macrófagos y las CD ⁽⁸⁾.

3.1.2.1 Neutrófilos

Estas células que pertenecen al grupo de leucocitos polimorfonucleares, se encuentran en continua renovación debido a que su vida media es menor de 48 horas. Son células de gran tamaño cuya característica más llamativa es la segmentación del núcleo en varios lóbulos y gran cantidad de gránulos en su

citoplasma con enzimas líticas para destruir microorganismos. Su función principal es la fagocitosis y destrucción de patógenos. En la sangre se encuentran en período de tránsito hacia los tejidos donde ejercen su función. Representan del 40-70% de todos los leucocitos en sangre ⁽⁷⁾.

3.1.2.2 Monocitos y Macrófagos

Con el término de monocitos se engloban a células con características funciones similares, presentes en la sangre y también distribuidas en varios lugares del organismo. Los monocitos son células grandes con un solo núcleo, un aparato de Golgi muy desarrollado, gran cantidad de lisosomas y muy ricos en enzimas de diferentes tipos, entre los que destacan proteasas, peroxidasas y lipasas. Cuando los monocitos se encuentran en los tejidos, sufren ciertas modificaciones ligeras y se le conoce como macrófagos.

Tanto los monocitos como los macrófagos poseen, además de la capacidad fagocítica ya indicada, capacidad de adherencia a los tejidos, al vidrio y al plástico, así como una gran movilidad en estas superficies (quimiotaxia). Los macrófagos tienen una vida media de varios meses. Poseen también gran actividad metabólica, sobre todo en lo que se refiere a síntesis de proteínas, incluso cuando se encuentran en reposo. La función principal de los macrófagos es la de fagocitar todos los cuerpos extraños que se introducen en el organismo como las bacterias y sustancias de desecho de los tejidos así como en ciertas circunstancias actuar como CPA y la de producir las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 e IL-6 cuando son activados adecuadamente ⁽⁷⁾.

3.1.2.3 Células Dendríticas (CD)

Cumplen un cometido importante en la respuesta inmune innata y su vez la vinculación con la respuesta inmune adaptativa, tiene prolongaciones membranas largas y propiedades fagocíticas; además se distribuyen ampliamente por los tejidos linfáticos, epitelio de mucosas y parénquima de órganos. Las CD capturan los antígenos microbianos y los presentan a los linfocitos T por lo que son las CPA más potentes ⁽⁷⁾ ⁽⁸⁾.

3.1.2.4 Células Natural Killer (NK)

Las células NK o asesinas naturales son una población de linfocitos, diferentes a los linfocitos B y linfocitos T, pertenecen al sistema inmune innato. Proviene de la médula ósea y se encuentran en la sangre y tejidos linfáticos, especialmente el bazo; representan aproximadamente el 10% de las células mononucleares de sangre ⁽⁷⁾.

Se cree que el proceso de maduración de las células NK se efectúa en parte dentro del timo y en parte fuera del mismo en órganos linfoides periféricos, desconociéndose los procesos requeridos para que esta diferenciación se produzca. Esto explica que no se afecten sustancialmente los niveles de células NK en animales atímicos y en inmunodeficiencia severa combinada observada tanto en animales como el hombre.

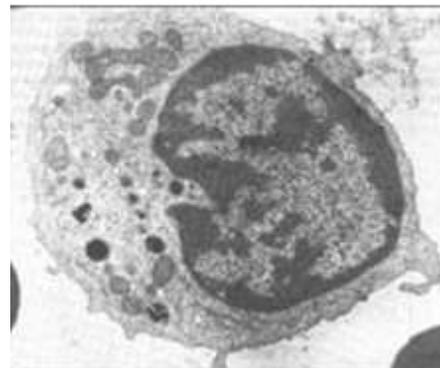


Fig.1 Célula NK Fuente: Peña, 2010

Se caracterizan morfológicamente por ser mayoritariamente linfocitos grandes con gránulos citoplasmáticos con fenotipo característico TCR^- , BCR^- , $CD3^-$, $CD16^+$, $CD56^+$ ⁽⁷⁾⁽⁸⁾.

Poseen además en su superficie celular receptores tipo KIRs (Killer immunoglobulins- like receptors) y NCRs (Natural cytotoxicity receptors). Según los niveles de expresión de CD56 se pueden diferenciar dos poblaciones NK, NKdim y NKbright ⁽⁷⁾.

Sus principales funciones son la citotoxicidad y la secreción de citoquinas; la primera le permite actuar frente a células agredidas, envejecidas o tumorales impidiendo su expansión y la formación de metástasis así como contribuyen a la defensa frente a células infectadas por virus. Su capacidad destructora puede ser directa o bien mediada por anticuerpos (ADCC) gracias a la presencia en su superficie del receptor CD16. También participan activando los macrófagos para que supriman los microbios fagocitados ⁽⁸⁾.

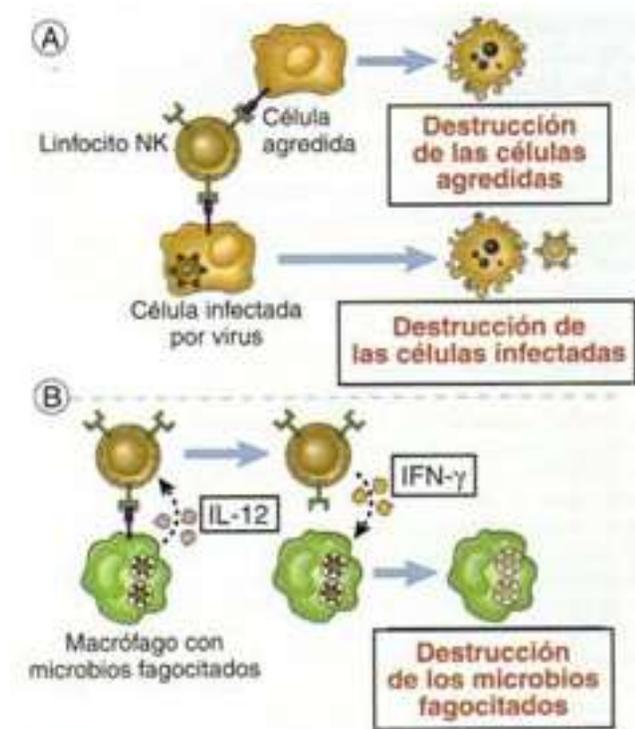


Fig.2 Funciones de las células NK. Fuente: Abbas,2008

También juegan un papel fundamental en el paso de una respuesta innata a una adquirida, ya que intervienen regulando otras poblaciones de células inmunocompetentes así como en la maduración de las CD ⁽⁷⁾.

g) Citocinas que regulan a las Celulas NK

IL-2	Estimula citotoxicidad, proliferación y producción de citoquinas
IL-12	Estimula citotoxicidad, proliferación y producción de citoquinas
IL-15	Estimula citotoxicidad, proliferación y producción de citoquinas
IFN- γ	Estimula citotoxicidad
IFN- α/β	Estimula citotoxicidad
IL-10	Inhibe produccion de citocinas

Tabla 3. Citocinas que regulan a las células NK Fuente: Prieto, 2012

h) Citotoxicidad natural de las células NK

La ejercen sobre células a través de un reconocimiento aún no del todo comprendido, pero que es espontáneo y no requiere activación previa. Este tipo de citotoxicidad, es además independiente del reconocimiento antigénico mediado por los receptores específicos del antígeno presentes en los linfocitos T y B, y de las (MHC) presentes en las CPA ⁽⁷⁾ ⁽⁸⁾.

i) Citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC) de las células NK

Que ha sido la más estudiada y es dependiente del receptor Fc de baja afinidad de inmunoglobulinas de tipo G, RFcg o CD16, el cual funciona reconociendo la fracción Fc de los anticuerpos que recubren a la célula blanco lo que les permite activarse y lisar a la célula blanco. La molécula CD56, es una molécula de adhesión cuyos ligandos o bien anticuerpos anti-CD56 no provocan la activación de éstas células ^{(7) (8)}.

<i>Receptores que interactúan con la célula blanco.</i>	
Receptores de Activación CD2, CD16, CD26, CD27, CD28, CD44, CD69, LFA-1.	Receptores de Inhibición NKG2A, C, D, E; KIR 2-D, KIR 3-D.
<i>Función Citotóxica</i>	
Citotoxicidad natural: frente a células tumorales, transformadas por virus, infectadas por patógenos intracelulares.	
Citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC): utiliza anticuerpos como puente (IgG), receptor FcγIII (CD16).	
<i>Función Secretora</i>	
Secreción de citoquinas: IFN-γ, IL-10, TNF-α, GM-CSF (Células NK1); IL -5, IL-13, TNF-α, GM-CSF (Células NK2).	
<i>Mecanismos de citotoxicidad</i>	
Citotoxicidad natural y ADCC:	
Mecanismo membranolítico: secreción de agentes citotóxicos: perforina, granzimas.	
Apoptosis: mediada a través de la interacción Fas-FasL (CD95 - CD95L)	
<i>Modulación de la citotoxicidad por mediadores endógenos.</i>	
Activación IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, TNF-α, IFN-αβγ.	Inhibición TGF-β, PDGF, PG-E, catecolaminas.
<i>Fenotipo</i>	
En reposo: TCR ⁻ , BCR ⁻ , CD3 ⁻ , CD16 ⁺ , CD56 ⁺	
Activado: CD25 ⁺ , CD69 ⁺ , CD28 ⁺ , CD95L ⁺ , CD95 ⁺	

Abreviaturas de la Tabla : CD: Antígenos de grupo de diferenciación. LFA-1; Antígeno funcional de los leucocitos de tipo 1. KIR: Receptor de inhibición de la citotoxicidad. IFN-α,β,γ Interferón de tipo α, β, o γ. TNF-α: Factor de necrosis tumoral tipo α. GM-CSF: Factor estimulador de colonias granulocito-macrófago. IL- 1, 2, etc.: Interleuquina 1, 2 etc. FasL: Ligando de Fas. TGF-β: Factor de crecimiento transformante tipo β. PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas. PG-E: Prostaglandina tipo E. TCR: Receptor de células T. BCR: Receptor de células B.

Tabla 4. Propiedades generales de las células NK humanas. Fuente: Castellanos, 2000

j) Mecanismos de citotoxicidad de las células NK

Se ha propuesto dos mecanismos para la destrucción de células dañadas, infectadas y mutantes. Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes y es bastante probable que sean complementarios ⁽⁹⁾.

Mecanismo Apoptótico: Es el mecanismo descrito más recientemente, se basa en la interacción principalmente de la proteína FasL, (CD95L), inducida post-contacto con la célula blanco y Fas (CD95) que la debe expresar la célula blanco. La activación de Fas inicia el mecanismo de apoptosis por la fragmentación prelitica del ADN ⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾.

Mecanismo Litico o membranolítico: El que se caracteriza por la secreción de componentes citotóxicos de los gránulos de las células NK post contacto con las células blanco por medio de la perforina, que se polimeriza para formar poros líticos en la membrana de las células diana, a su vez se secretan las granzimas, que son enzimas proteolíticas e inductoras de apoptosis ⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾.

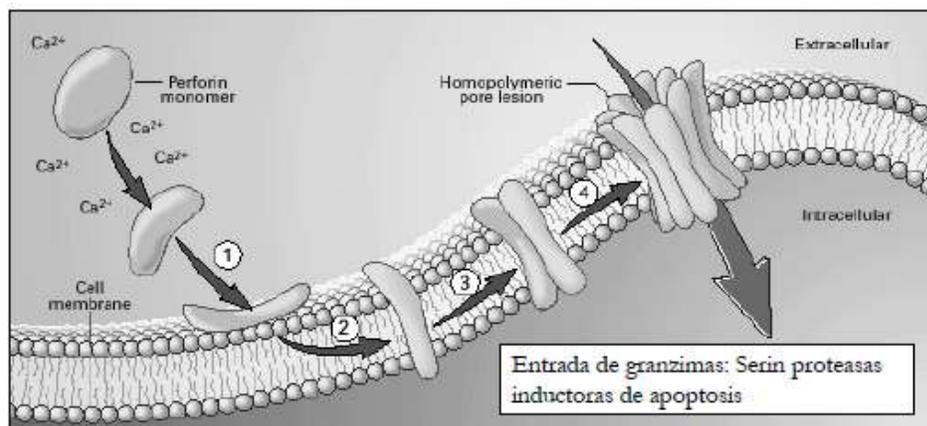


Fig. 3 Apoptosis por mecanismo membranolítico. Fuente: Prieto, 2011

k) Granzimas

Son serin proteasas que necesitan entrar en la célula, actúan unidas a la perforina, que permite el paso al interior de las células diana mediante la formación de poros y endocitosis ⁽¹⁰⁾.

Las granzimas en el interior de la célula diana activan la kinasa Cdc2, la proteasa caspasa CPP-32 y las nucleasas CAS; todo esto produciendo la fragmentación del ADN e induciendo la apoptosis de la célula diana ⁽¹⁰⁾.

l) El papel de las células NK en la leishmaniasis

En modelos animales, como ratones y hámsteres, los granulocitos son la primera y más significativa población en llegar a la piel luego de inyectar los parásitos. Uno o 2 días más tarde llegan células NK.

En *Leishmania*, varios trabajos han mostrado que la migración de neutrófilos, eosinófilos y células NK es inducida por la presencia del parásito. Esta inducción es indirecta en el caso de las células NK, es decir que el parásito estimula la producción de citocinas, como las proteínas inflamatorias del macrófago α y β (MIP- α y β) que a su vez, inducen migración de células NK ⁽⁶⁾.

La presencia de células NK igualmente se ha asociado con resistencia a diversos procesos infecciosos y se ha encontrado asociación entre el curso subclínico o la resolución de la infección y el aumento en número y actividad citotóxica de estas células. En *Leishmania* otros estudios muestran que hay relación entre las células NK y la protección frente a la enfermedad o su curación. Personas con infección subclínica y pacientes en que la enfermedad se resolvió sin tratamiento tienen mayor número de células NK. En contraste, pacientes que han desarrollado enfermedad cutánea

crónica o visceral tienen defectos en el reconocimiento, número, producción de IFN- γ y capacidad lítica de estas células ⁽⁶⁾.

Se ha demostrado que las células NK producen IFN- γ en la leishmaniasis, además que pueden influir en el desarrollo de Th1, que podrían desempeñar un papel en la resistencia y la susceptibilidad para la infección por *Leishmania*. Todas estas observaciones sugieren que las células NK son participantes activos en la fase no específica o de células pre-T en la actividad anti-*Leishmania*, es decir en el control de la multiplicación temprana del parásito ⁽¹²⁾.

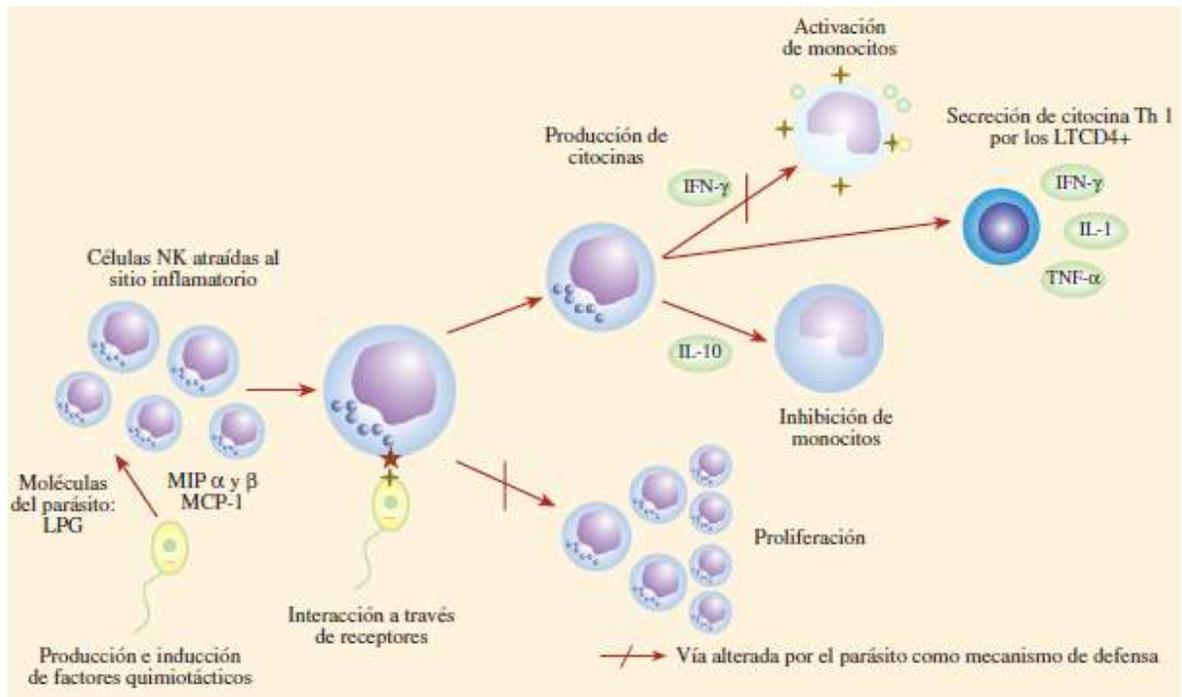


Fig. 4. Características generales de las interacciones entre células NK y parásito de *Leishmania*. Fuente: Bonilla, 2005

3.1.3 Proteínas Plasmáticas

Dentro de estas proteínas están: El sistema del complemento, las pentraxinas, colectinas y ficolinas y las citocinas del sistema innato ⁽⁹⁾.

3.1.3.1 Complemento

Son un complejo de alrededor de 20 proteínas, que junto con la coagulación sanguínea, la fibrinólisis y las formación de cininas constituyen uno de los sistemas de enzimas activadoras desencadenantes encontradas en el plasma. Estos sistemas se caracterizan por producir una respuesta rápida y muy amplificada frente a un estímulo desencadenante mediado por un fenómeno en cascada, en el cual el producto de una reacción es el catalizador enzimático de la próxima ⁽¹³⁾.

Puede seguir 3 caminos: La vía clásica que recurre a la proteína C1 para detectar los anticuerpos IgM, IgG1 o IgG3 ligados a la superficie de un microbio u otra estructura. La vía alternativa que se pone en marcha con el reconocimiento directo de ciertas estructuras presentes en la superficie microbiana y por tanto parte de la respuesta innata y la vía de la lectina que se dispara a partir de una proteína plasmática llamada lectina de unión a la manosa, que reconoce las manosas terminales en las glucoproteínas y los glucolípidos microbianos ⁽⁸⁾.

3.1.3.2 Pentraxinas

Son proteínas pentaméricas homologas por su estructura, encargadas de reconocer las estructuras microbianas y participar en

la inmunidad innata. Entre las más destacadas se encuentran la Proteína-C-Reactiva (PCR) y amiloide sérico P (SAP) y la PTX3. El aumento de estas proteínas se debe a su mayor síntesis en el hígado suscitada por las IL-6 e IL-1, producidas por los fagocitos por parte de la respuesta innata ⁽⁸⁾.

3.1.3.3 Colectinas y Ficolinas

Las colectinas son una familia de proteínas formadas por una cola similar al colágeno que está conectada por la región del cuello a una cabeza de lectina tipo C dependiente de calcio. En general funcionan como opsoninas y también son moléculas solubles para el reconocimiento de patrones en el sistema innato ⁽⁸⁾.

Las ficolinas son proteínas similares estructuralmente a las colectinas pero que poseen un dominio similar al colágeno de tipo fibrinógeno para el reconocimiento de hidratos de carbono, se unen a diversas especies bacterianas, las opsonizan y activan al complemento ⁽⁸⁾.

3.1.4 Citocinas de la Inmunidad Innata

Las citocinas de la inmunidad innata atraen a los leucocitos y los activan, además de producir modificaciones sistémicas como el aumento en la síntesis de células efectoras y de las proteínas que potencian las respuestas antimicrobianas. En la inmunidad innata las principales fuentes de citoquinas son los macrófagos, los neutrófilos y los linfocitos NK. A continuación se describen las mismas, sus funciones y origen ⁽⁸⁾.

Citocinas	
FNT, IL-1, quimiocinas	Inflamación
IFN- α , β	Resistencia a la infección vírica
IFN- γ	Activación de los macrófagos
IL-12	Producción de IFN- γ por los linfocitos NK y T
IL-15	Proliferación de los linfocitos NK
IL-10, TGF- β	Control de la inflamación

Tabla. 5 Citocinas de la Inmunidad Innata. Fuente: Abbas, 2008

3.1.5 Características del reconocimiento en la Inmunidad Innata

Los componentes de la inmunidad innata reconocen estructuras características de los patógenos microbianos que no están presentes en las células de los mamíferos. Son una cierta cantidad de productos microbianos que reciben el nombre de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y los receptores que se unen a estas estructuras se llaman receptores para el reconocimiento de patrones. Debido a la especificidad a dichas estructuras microbianas el sistema inmune innato es capaz de reconocer lo propio de lo ajeno. Entre los receptores para el reconocimiento de patrones más importantes se encuentran: Los receptores Toll-like, las lectinas tipo C, los receptores fagocíticos, los receptores de N-formil Met-Leu-Phe, etc. ⁽⁸⁾.

4. Inmunidad Adaptativa

La inmunidad adaptativa, que se desarrolla cuando los agentes extraños logran evadir los mecanismos innatos de defensa y está generada por la penetración de una dosis inicial de antígenos, se hace efectiva sólo después de varios días; tiempo requerido para que los linfocitos T y B reconozcan a dichos antígenos, se diferencien y se conviertan en células efectoras ⁽⁹⁾.

Sus características generales son:

Especificidad: Debido a que este tipo de respuesta va dirigida específicamente a determinada molécula antigénica, la porción del antígeno que es reconocida por los linfocitos se denomina determinante antigénico o epítope.

Memoria: Se refiere al incremento en la intensidad de respuesta ante los subsiguientes contactos con el mismo antígeno.

Heterogeneidad o diversidad: El número total de linfocitos con diferentes especificidades en un individuo ha recibido el nombre de repertorio linfocítico, cuya extraordinaria diversidad es el resultado de la variabilidad en la estructura de los sitios donde se unen los antígenos en los receptores linfocíticos.

Multifactorialidad: La respuesta inmune depende de múltiples factores, tanto del agente biológico que la origina como del hospedero que responde ⁽⁹⁾.

4.1 Componentes del Sistema Inmune Adaptativo

Entre los componentes de la respuesta adaptativa están las células del sistema adaptativo: Los linfocitos y las CPA ⁽⁸⁾.

4.1.1 Linfocitos

Los linfocitos son células que poseen un núcleo muy voluminoso y en el organismo sufren un proceso muy complejo de maduración, bien en el timo o bien en médula ósea en humanos o en la bolsa de Fabricio en las aves. Debido a ello I. Roitt los clasificó en linfocitos B

y linfocitos T, porque originariamente se vio que maduraba en la bolsa de Fabricio y timo respectivamente de las aves. Después en los mamíferos se ha visto que los linfocitos B maduran en la propia médula ósea ⁽⁷⁾ ⁽⁸⁾.

a) Linfocitos B

Morfológicamente los linfocitos B son indistinguibles de los linfocitos T, sin embargo existen enormes diferencias de tipo molecular que justifican su distinta función. En los mamíferos el proceso de diferenciación de los linfocitos B se realiza en la médula ósea y es independiente de todo estímulo antigénico y se regula por factores presentes en el microambiente de los órganos linfoides primarios ⁽⁷⁾ ⁽⁸⁾.

Fenotípicamente los linfocitos B se caracterizan por la presencia de inmunoglobulinas en su membrana, el marcador CD19 además de los marcadores de membrana CD35, MHC II y CD21. La molécula CD21 puede actuar como receptor del virus *Epstein barr* (EBV); precisamente el tratamiento de linfocitos con EBV es el procedimiento de elección para la preparación de líneas celulares de tipo B ⁽⁷⁾ ⁽⁸⁾.

Cuando los linfocitos B se activan se transforman en células memoria y en células plasmáticas. Éstas son células más grandes que los linfocitos, muy ricas en retículo endoplásmico, y especializadas en la síntesis y secreción de grandes cantidades de inmunoglobulinas ⁽⁷⁾ ⁽⁸⁾.

b) Linfocitos T

Los linfocitos T se caracterizan por poseer receptores específicos para los antígenos, denominados receptores de células T o TCR (con cadenas $\alpha\beta$) los cuales reconocen péptidos antigénicos unidos a proteínas codificadas por los genes del MHC. Fenotípicamente se caracterizan por expresar la molécula CD3 asociada al TCR además de otros marcadores de membrana como CD2 y CD7. Los linfocitos T son los responsables de la respuesta inmune celular, jugando un papel fundamental en controlar y desarrollar la respuesta inmune adquirida mediante la producción de citocinas solubles y el desarrollo de linfocitos T citotóxicos con una actividad lítica importante de células infectadas por virus o células tumorales ^{(7) (8)}.

Los linfocitos T maduran en el timo, durante dicho proceso, los timocitos adquieren una serie de moléculas nuevas en su superficie que después tendrán aspectos funcionales de relevancia. En el proceso de diferenciación de timocitos a linfocitos maduros se destruyen un gran número de células (aproximadamente el 97% de los timocitos), que son precisamente aquellas que presenta mayor capacidad autorreactiva. Esto se lleva a cabo por un proceso de selección tímica que se realiza en dos fases y está condicionado por el grado de afinidad del TCR con las moléculas del MHC de las células epiteliales del timo. Los linfocitos T son una población celular muy heterogénea formada por diferentes tipos de células y representan alrededor de 40-60% de los linfocitos periféricos ^{(7) (8)}.

Hay cuatro tipos de linfocitos T funcionalmente diferentes:

- **Linfocitos T de colaboración**

Se caracterizan por su capacidad de producir citoquinas. En consecuencia participan en la iniciación y el desarrollo de la respuesta inmune. Pueden ser de dos tipos Th1 y Th2. El tipo Th1 promueve la respuesta celular (IFN, IL-2 e IL-12). El tipo Th2 promueven la respuesta humoral, (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10). Fenotípicamente son CD3+ y CD4+ y reconocen MHC de tipo II.

- **Linfocitos T citotóxicas**

Principales responsables de la citotoxicidad de la respuesta inmune celular. Destruyen células infectadas por virus y células tumorales. Fenotípicamente son CD3 + y CD8+, reconocen MHC de tipo I. También se les conoce como CTLs.

- **Linfocitos T reguladoras**

Su función principal es terminar la inmunidad mediada por células T y suprimir las células T autorreactivas. Pueden ser de varios tipos, siendo las más comunes CD4+, CD25+ FoxP3+. Estas células presentan una potente acción reguladora de la respuesta Inmune y tienen gran relevancia en los procesos de tolerancia y en el desarrollo de enfermedades autoinmunes⁽⁷⁾.

Los linfocitos tratados hasta el momento son aquellos que poseen como TCR las cadenas α y β , pero sin embargo existe otra población minoritaria de Linfocitos T que poseen como TCR las cadenas gd. Estos son conocidos como linfocitos gd que se piensa que tienen una función importante en el reconocimiento de los antígenos lipídicos y se pueden encontrar en abundancia en la mucosa del intestino⁽⁷⁾.

4.1.2 Células Presentadoras de Antígeno (CPA)

Constituyen una población celular especializada en captar los antígenos microbianos o de otro tipo y exhibirlos ante los linfocitos y la emisión de señales que estimulen su proliferación y su diferenciación. Por conveniencia la CPA suele aludir a una célula que exhibe antígenos ante los linfocitos T. El principal tipo que participa en el inicio de las respuestas por parte de los linfocitos T es la célula dendrítica. Además de esta célula también participan como CPAs los macrófagos que presentan antígenos a los linfocitos T durante las respuestas de la inmunidad celular, los linfocitos B funcionan como CPA para los linfocitos T cooperadores en el caso de inmunidad humoral, y por último los fagocitos mononucleares funcionan como CPA en las respuestas de la inmunidad adaptativa llevadas a cabo a través de los linfocitos T ⁽⁸⁾.

5. Apoptosis

En estudios realizados sobre la apoptosis se pudo hallar que en células vivas la fosfatidil serina (PS) se encuentra en el lado interior de la membrana plasmática, pero en las primeras dos horas de citotoxicidad la etapa temprana o fase de activación de la apoptosis la PS es expuesta al exterior en un proceso activo dependiente de ATP por la enzima translocasa; dicha etapa se diferencia de la etapa tardía o de ejecución por la degradación de cromatina y proteínas por proteasas como ser: caspasas, calpainas, granzimas y el complejo proteosoma ^{(14) (15) (16) (17)}.

5.1 Etapas de la Apoptosis

La evolución de la apoptosis presenta tres fases que se pueden calificar como (a) la fase pre-mitocondrial o de inducción; (b) la fase

de daño mitocondrial efectivo (fase efectora) y (c) la fase post-mitocondrial, degradativa o de lisis celular.

Durante la primera fase las células reciben diferentes estímulos apoptogénicos extracelulares. Durante esta fase de la apoptosis, las caspasas activadas actúan sobre las membranas mitocondriales, en particular sobre el poro mitocondrial de permeabilidad transitoria (PMPT) o PORO.

Durante la segunda fase de la apoptosis (fase efectora), se producen cambios significativos en la función de las membranas mitocondriales, que se traducen en un incremento de la permeabilidad de las mismas. Se produce la apertura del PMPT.

En la tercera fase de la apoptosis, la salida de los factores apoptogénicos mitocondriales, liberados al citosol, sumados a los generados en el mismo citosol promueven la destrucción de las proteínas, del ADN, del ARN y de las membranas celulares consumando así la muerte celular. Algunas proteínas liberadas tienen capacidad para activar caspasas y nucleasas citosólicas. En primer término el citocromo c activa a la caspasa-3, que a su vez activa la endonucleasa nuclear. En segundo término, las mitocondrias apoptóticas liberan una proteína activa denominada AIP, que también activa las endonucleasas independientemente del citocromo c. Por último, las proteínas mitocondriales intermembrana incluyen una ADNasa específica que degrada la doble hélice del ADN. Durante esta última fase, aparecen las características morfológicas y bioquímicas de la apoptosis: condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN, la degradación masiva de proteínas esenciales, nucleólisis y finalmente citólisis⁽¹⁸⁾.

6. Tamoxifeno: Un inductor químico de la apoptosis

El tamoxifeno (TAM) es un derivado trifeniletileno, se usa como tratamiento de primera línea para el cáncer de mama a pesar de que su uso está asociado con un riesgo elevado de desarrollar carcinoma de endometrio.

La evidencia reciente sugiere que la generación de EROs (Especies Reactivas de Oxígeno) y estrés oxidativo provoca daño en el núcleo y otros compartimentos celulares. También se encontró que el tamoxifeno induce al clivaje del ADN por proceso activo aun no dilucidado, sugiere alta citotoxicidad. A concentraciones nM de tamoxifeno induce solo un detenimiento reversible en el crecimiento, en cambio a concentraciones uM existe una inducción de apoptosis por degradación irreversible del ADN ⁽¹⁹⁾ ⁽²⁰⁾ ⁽²¹⁾. Por todas estas razones se considera al tamoxifeno como un inductor de la apoptosis.

7. Medicina Tradicional

La Medicina tradicional en Bolivia es importante porque se conoce que alrededor de un 80% de la población acude a la práctica de esta usando plantas y procedimientos iniciados por pueblos indígenas desde hace cientos de años. Es una medicina alternativa que está al alcance del pueblo, no solo por su costo sino también porque se utilizan productos naturales, de baja toxicidad ⁽¹⁾ ⁽⁵⁾.

Según La Sociedad Boliviana de Medicina Tradicional, estas prácticas, entre las que se puede mencionar la fitoterapia (uso de plantas); geoterapia (tratamiento con el barro), hidroterapia (tratamiento con las aguas), y la helioterapia (baños solares), entre otras, ayudan a diversos tipos de pacientes a reconciliarse con los elementos que constituyen su esencia ⁽¹⁾.

Dentro de la fitoterapia existe un poco más de un centenar de plantas medicinales están registradas en la Dirección Nacional de Medicina Tradicional e Intercultural del Ministerio de Salud, pese a la gran riqueza y variedad que tiene Bolivia ⁽¹⁾.

En contraste, hay laboratorios de países industrializados que cada día hacen un control de diez mil diferentes especies vegetales y sus posibles usos en la medicina ⁽²²⁾.

7.1 *Galipea longiflora* Krause Kallunki (Evanta)

El género *Galipea* cuenta con treinta especies aproximadamente distribuidas desde Panamá, Guatemala, Nicaragua, Cuba, Perú, Venezuela, Brasil y Bolivia. La especie *longiflora* Evanta se encuentra en los bosques tropicales de Beni y La Paz y ha sido estudiada en los últimos veinte años por ser utilizada por los pueblos chimanes en el oriente para curar las lesiones de la *Leishmania* y otras enfermedades ⁽²²⁾.

Evanta es un árbol de 3 a 4 metros de altura con hojas trifoliadas alternas o superpuestas sobre la misma rama, con peciolo alado, sus flores se encuentran en forma de racimos, zigomorfas, vistosas en meses de mayo a junio y sus frutos se observan de junio a julio. ⁽²⁾.

En estudios realizados se halló que es una planta rica en alcaloides, llegando a descubrirse alrededor de veinte; estos productos tienen excelente actividad leishmanicida tanto *in vivo* como *in vitro* y se emplean concentraciones bajas para el tratamiento, en comparación con las drogas de referencia ⁽²³⁾. También se ha determinado su actividad frente a otros parásitos; entre ellos: *Trypanosoma cruzi*,

Plasmodium falciparum y *Acanthamoeba*; además de tener acción gastroprotectora ⁽²⁾ (24).

Reino	Vegetal
División	Magnoliophita
Sub clase	Rosidea
Orden	Sapindales
Familia	Rutáceae
Género	<i>Galipea</i>
Especie	<i>Longiflora krause</i>
Sinónimo	<i>Angostura longiflora</i> (Kallunki y pirani, 1998)
Nombre común	Yuruma huana epuna

Tabla 6. Clasificación taxonómica de *Galipea longiflora*. Fuente: Salamanca, 2008

III. Antecedentes

En estos últimos 20 años se han venido desarrollando estudios sobre una planta productora de alcaloides del tipo quinolínico llamada “Evanta”, que tiene actividades antiparasitarias importantes frente a: leishmaniasis, mal de chagas, tuberculosis y cáncer. Dicha planta es utilizada hace ya mucho tiempo por las comunidades de Tsimanes, Mosestenes y Tacanas como antidiarreico y para curar las lesiones de la leishmaniasis mediante la corteza fresca o seca molida aplicada directamente como cataplasma sobre las úlceras y bebiendo infusiones de ella durante tres días ⁽²⁾.

Evanta ahora llamada *Angostura longiflora (Krause) Kallunqui* ha sido objeto de ensayos biológicos *in vitro* con diferentes especies de *Leishmania*, en promastigotes y amastigotes, logrando aislar más de 20 alcaloides quinolinicos llamados chimaninas (A, B, C y D) en homenaje a los chimanes ⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾. También se encontró que extractos de las hojas, tallo y de la corteza del tallo fueron activos *in vitro* contra *Leishmania spp* y *Trypanosoma cruzi* a 100ug/mL ⁽²⁷⁾. Sobre la toxicidad y seguridad pre clínica del EAE se halló que los alcaloides totales de la corteza y hojas no muestran toxicidad alguna y que denotan una actividad superior a la del extracto crudo sobre los promastigotes de *Leishmania* ⁽²⁸⁾.

En experimentos *in vivo* en ratones BALB/C infectados con *L. amazonensis* o *L. venezuelensis* y después tratados subcutáneamente con alcaloides quinolínicos sustituidos en el segundo carbono se pudo verificar que resistieron a la infección por la cepa del parásito causante de leishmaniasis cutánea; además no se halló toxicidad. Los alcaloides sobresalientes son la 2-n-propilquinolina y la chimanina D, que fueron más o igual de activos que el glucantime ⁽²⁹⁾. En otro estudio con *L. donovani* se corroboró la eficacia de la chimanina D que suprimió el 87% de parásitos del hígado; y la 2-n-propilquinolina administrada oralmente suprimió el 99,9% de parásitos. El glucantime suprimió en un 97% a los parásitos. En este estudio se logró

demostrar de mejor forma que la actividad de los alcaloides quinolinicos es más efectiva cuando incluyen una cadena de propilo en posición I o II ⁽³⁰⁾.

Sobre los efectos del EAE en los componentes de la respuesta inmune se halló que el extracto crudo de Evanta mata directamente al parásito a una dosis de 10ug/mL, dicha concentración no tuvo mayor efecto sobre la viabilidad y la proliferación de células eucariotas, sin embargo influyó en la disminución de la proliferación de los linfocitos T *in vitro* y en la producción de IFN- γ ; todo esto sugiere que la Evanta contribuye al control de la reacción inflamatoria que caracteriza a la infección por *Leishmania* ⁽³¹⁾.

Asimismo se investigó si el extracto podía interferir en la activación específica de linfocitos contra el antígeno de *Leishmania* y se encontró que el tratamiento *in vivo* e *in vitro* reduce la respuesta de los linfocitos al medirse la producción de IFN- γ y producción de IL-12 e TNF que fueron suprimidas. El tratamiento combinado (EAE y glucantime juntos) controló eficientemente la carga de parásitos en el cojinete plantar y redujo el tamaño de la lesión comparada con el tratamiento de solo extracto o solo glucantime ⁽³²⁾.

Se investigó el efecto del EAE y del alcaloide mayoritario del extracto: La molécula la 2-fenilquinolina, sobre la activación de las CD humanas y su habilidad de estimular linfocitos CD4+. La expresión de moléculas de activación de superficie no se vio afectada en CDs estimuladas en la presencia del EAE o de 2-fenilquinolina, tampoco se afectó la expresión de las moléculas de activación en la superficie de células T halógenicas. La secreción del IL-12p40, IL-23 e IL-6 fue menor en CDs-EAE, CDs-2-ph y células T CD4+ halógenas que en el control. Se secretaron niveles bajos de IFN- γ e IL-10 y niveles similares de IL-17. Por los resultados se pudo demostrar que EAE y la 2-fenil-quinolina afectan la estimulación de CDs y la habilidad de estimular células T CD4+ disminuyendo la producción de IFN- γ ,

IL-12p40, IL-6 e IL-23, sugiriendo que el extracto y la 2-fenilquinolina ayudan en la regulación de la inflamación ⁽³³⁾.

En un estudio *in vitro* se evaluó el efecto del EAE sobre la actividad fagocítica de macrófagos humanos infectados con *L.braziliensis*; se pudo encontrar que el comportamiento de los macrófagos en presencia de EAE presentan un 63 al 65% de actividad fagocítica y es eficaz a diferencia del grupo control con un 41,4% que presentó actividad disminuida debido a la exacerbación del tejido y cronicidad de la enfermedad ⁽³⁴⁾.

De la misma forma se evaluó *in vitro* el efecto del EAE sobre la capacidad infectiva de *L.braziliensis* y la capacidad microbicida de macrófagos murinos provenientes de medula ósea. Se halló que la capacidad infectiva del parásito disminuyó en un 44,6% a una concentración de 10ug/mL, sin diferencias significativas respecto a las 48 horas ni al control, sin embargo a las 72 horas la Evanta mostró ser efectiva en el mantenimiento de la capacidad microbicida de los macrófagos y atenuante de los mecanismos de evasión del parásito ⁽³⁵⁾.

Igualmente se evaluó la respuesta proliferativa y la producción de citoquinas provenientes de linfocitos de pacientes con leishmaniasis cutánea. Los resultados sugirieron que los pacientes tratados con Evanta tienen una mejor regulación de la respuesta inmune que los tratados con Glucantime por la reducción de proliferación celular y la producción de IFN- γ ⁽³⁶⁾.

También en un estudio *in vivo* se evaluó el efecto del EAE sobre la actividad de los neutrófilos de ratones de la cepa Balb/c. Se pudo encontrar que el extracto disminuye el porcentaje de células fagocíticas capaces de reducir el NAT; disminuye la producción de IL-1 α , IL-1 β e IL-8 de forma dosis dependiente; en la producción de óxido nítrico no se pudo verificar ningún efecto. Por lo hallado se pudo observar que el extracto podría contribuir a un mejor control de la inflamación aguda, no afecta a la producción de óxido

nítrico que es el principal mecanismo microbicida contra la leishmaniasis (37).

Las células NK juegan un papel importante en el control del parasitismo de macrófagos infectados a través de la lisis directa de la célula huésped y / o parásitos, además esto se corrobora por la reducción en el número parásitos viables, degeneración parasitaria y lisis celular en el control del número de parásitos (38). Se soporta también el mismo rol de las células NK en la infección por *L.amazonensis* revelando el predominio de los desechos parasitarios dentro de los macrófagos que estaban en estrecho contacto con las células NK activadas por IL- 2, por lo que la disminución en la recuperación de parásitos fue directamente proporcional a la concentración de células NK activadas (39).

Otro estudio sugiere a las células NK como participantes activos en la fase no específica o la fase pre-T de la actividad anti-*Leishmania* por lo que ayuda en el control de la multiplicación temprana del parásito en el curso de la infección por *L. major* en ratones (12).

En pacientes que han atravesado por leishmaniasis como infecciones subclínicas o con lesiones recuperadas sin tratamiento se pudo verificar el número elevado de células NK, que mostró ser un aspecto importante de la protección establecida después de la curación de la enfermedad. Se considera también un buen marcador pronóstico al número de células NK en la infección, ya que en un estudio en el que se analizó cuantitativamente todas las clases de linfocitos; se pudo hallar en el infiltrado celular de diferentes lesiones de leishmaniasis cutánea un alto porcentaje de células NK, lo que también sugiere que las células NK pueden ser útiles en la limitación de la enfermedad (40) (41).

Respecto a la actividad de las células NK frente a la leishmaniasis se pudo hallar que las células NK pueden activarse directamente por la presencia del parásito o cuando el parásito estimula la secreción de citoquinas como

ser las proteínas inflamatorias del macrófago α y β (MIP- α y β) y a su vez inducen a la migración de estas células hacia el sitio de infección ⁽⁶⁾.

Asimismo se demostró *in vitro* que los antígenos de *Leishmania* pueden inducir a la respuesta de las células NK ⁽⁴²⁾. A su vez otros estudios afirman que la interacción entre promastigotes de *Leishmania* y células NK *in vitro* conduce a la lisis directa de los parásitos con una disminución conjunta en número de las células NK, también que pueden activar directamente las células NK para producir IFN- γ y una temprana producción de IL-12 ⁽⁴³⁾.

De la misma forma se ha descrito una vacuna con promastigotes muertos de *Leishmania* y Bacilos de *Calmette-Guerin* (BCG); la presencia de estos lideran *in vivo* la activación del sistema inmune innato celular especialmente en células NK y macrófagos, incrementando el número de estas células, la concentración de óxido nítrico, especies reactivas del oxígeno y la producción de TNF ⁽⁴⁴⁾.

IV. Planteamiento del Problema

Actualmente, la medicina tradicional utiliza un gran número de especies herbáceas y una farmacopea natural que colabora en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de enfermedades. En el caso de Bolivia, gracias a su alta diversidad cultural y biológica, se ha generado e identificado una amplia gama de prácticas de medicina tradicional, cuya forma de expresión principal es la utilización de diversas plantas. En este sentido, el conocimiento académico del número de plantas medicinales para el país ha incrementado. Se conocen alrededor de 3.000 especies de plantas medicinales y se cuenta con publicaciones recientes de ellas. Sin embargo dichos estudios han abarcado un porcentaje mínimo respecto a lo que falta todavía para poder utilizarlas con todas sus propiedades terapéuticas contribuyendo así a mejorar la calidad de vida de la población ⁽¹⁾ (45).

Para el caso de la leishmaniasis o lepra blanca, enfermedad parasitaria olvidada que compromete piel, mucosa y vísceras; misma patología que afecta a 81 países con alta prevalencia en Bolivia se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo* durante los últimos veinte años que revelan información sobre el uso de la Evanta. Con dichos estudios se ha logrado una contribución valiosa de información, pero aun se está trabajando en la validación científica de dicha planta para considerarla un tratamiento que se constituiría en una oportunidad de cura de bajo costo, accesible y menos toxico en relación a los fármacos actualmente utilizados.

Lo mencionado previamente exige esfuerzos dirigidos para aportar conocimiento sobre el efecto de la Evanta en la respuesta inmune innata para poder lograr su pleno estudio que a corto plazo permita implementar en la vida cotidiana a la Evanta como tratamiento.

V. Justificación

Dentro de las plantas utilizadas por la medicina tradicional para la cura de enfermedades se encuentran varias especies; que son ricas en alcaloides; dichos compuestos constituyen una clase importante de productos con actividades anti-*Leishmania* significantes, por ejemplo las especies: *Dictyoloma peruviana*, *Corynanthe pachyceras*, *Kopsia griffithii*, *Peschiera van heurkii* y la especie de nuestro estudio la *Galipea longiflora* o Evanta (46).

En este sentido se ha logrado identificar al EAE como un candidato prometedor para tratamiento alternativo contra la leishmaniasis por ser un producto natural, de baja toxicidad, económicamente accesible y además con un modo de administración bastante práctico, no necesitando que los pacientes dejen sus domicilios y permitiendo que puedan desarrollar su vida normalmente.

Por otro lado se ha iniciado hace pocos años atrás el estudio de los efectos de este extracto sobre la respuesta inmune, algunos sobre los componentes de la respuesta inmune innata pero se ha establecido estudiar el efecto del EAE sobre las células NK para poder contribuir a la validación científica de la Evanta como tratamiento alternativo y a su vez podría ayudar en su difusión de por toda latinoamérica y resolvería un gran problema de salud.

Se ha considerado el estudio de las células NK, ya que ahora dichas células no son solo consideradas como simples " máquinas de matar " sino que en la última temporada las células NK han ganado el reconocimiento por su capacidad de secretar citoquinas que influyen la diferenciación de la respuesta inmune adaptativa, combatir infecciones víricas, parasitarias y promover la respuesta inflamatoria. Es importante destacar que según los estudios las células NK participan en la leishmaniasis controlando el crecimiento de los patógenos, limitan la replicación del parásito y se indica

que a mayor número de células NK más rápida es la recuperación de la lesión.

Además este estudio es una innovación científica, ya que en nuestro país se han hecho pocos trabajos experimentales sobre las células NK por lo que su estudio sería un buen avance científico tanto a nivel nacional como a nivel internacional.

Por todas estas razones en este estudio se pretende evaluar el efecto del EAE sobre las células NK poder contribuir a validar el uso del mismo extracto como un tratamiento alternativo contra la leishmaniasis.

VI. Objetivos

6. Objetivo General

Evaluar el efecto del EAE sobre las células NK humanas.

7. Objetivos Específicos

Determinar el efecto del EAE sobre la polarización de células NK humanas.

Evaluar el efecto del EAE sobre la apoptosis y necrosis en células mononucleares humanas.

Determinar el efecto del EAE sobre la capacidad de Inducción a apoptosis y necrosis en células NK humanas.

VII. Diseño de la Investigación

- 1. Población en estudio:** 20 sujetos: mujeres y varones que residen en la ciudad de La Paz.
- 2. Criterios de Inclusión:** Mujeres y varones aparentemente sanos, de 18 a 56 años de edad, de ambos sexos.
- 3. Criterios de Exclusión:** Mujeres embarazadas, mujeres y varones con enfermedades hepáticas, cardíacas o renales, que hayan tenido tratamiento previo para la leishmaniasis cutánea.
- 4. Contexto y Lugar:** Este estudio se realizó en la Ciudad de La Paz, en el Instituto SELADIS, en el laboratorio de Inmunología, dependiente de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés.
- 5. Aspectos Éticos:** Se trabajó bajo el aval ético que ampara al Proyecto de Enfermedades Infecciosas (Ver anexo 1). La toma de muestra fue autorizada por cada uno de los sujetos en estudio a través del consentimiento informado (Ver anexo 2).

XV. Diseño del Estudio

1. Tipo de Diseño: Estudio piloto experimental.

2. Material y Métodos

2.4 Materiales

- Jeringas de 10 y 20 ml (Nipro)
- Propipeta
- Tubos Falcon estériles de 15 ml (Becton Dickinson)
- Tubos cónicos de fondo redondo de plástico (Becton Dickinson)
- Pipetas Pasteur de Vidrio
- Pipetas de plástico estériles de 5 y 10 ml (Greiner Bio-One)
- Cámara de Neubauer
- Portaobjetos
- Tubos de plástico de 1,5 mL (Eppendorf)
- Papel Filtro
- Cajas Koplín

2.5 Reactivos

- Extracto total de Alcaloides de Evanta provisto por el IIFB (EAE)
- Heparina
- Tampón PBS 0,15 M pH 7,4
- Anticuerpo Anti Granzima A purificado de ratón (BD Pharmingen)
- Anticuerpo Anti Granzima B purificado de ratón (BD Pharmingen)
- Anticuerpo Anti IgG humana con Fluoresceína
- Solución Ficol-Hypaque Densidad 1,077
- Suero fetal Bovino (Gibco)

- RPMI (Gibco)
- EDTA 0,1 M pH 7,2
- Azul Tripán 0,2% (Sigma-Aldrich)
- Dimetil Sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich)
- Suplementos para medio RPMI: Hapes, Bicarbonato de Sodio, Glutamina, Penicilina, Estreptomina
- Kit Citofix-Citoperm (BD Pharmingen)
- Kit Human NK Cell Enrichment Kit Easy Sep (Stemcell)
- Kit PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen)
- Fibroblastos ajustados a 1×10^6 cel/mL en RPMI

2.6 Equipos

- Campana de Flujo laminar
- Centrifuga (Eppendorf)
- Vortex
- Estufa de incubación (Fisher scientific isotherm)
- Microscopio de Fluorescencia
- Microscopio Óptico
- Citómetro de Flujo (BD FACSCalibur)

3. Procedimientos

3.5 Aislamiento de Células NK

Se realizó la toma de muestra de 40 mL de sangre periférica con heparina de los sujetos en estudio.

Se utilizó el método de separación de células mononucleares por centrifugación en gradiente de densidad. Se realizó una dilución $\frac{1}{2}$ de la muestra con PBS celular y se procedió a la estratificación en solución

Ficol Hypaque de densidad 1,077 (en proporción 3 mL de ficol para 5 mL de mezcla sangre-PBS) suave y lentamente. Se procedió a la centrifugación por 20 minutos a 1500 rpm. Luego de obtenido el anillo de células mononucleares se lo extrajo con pipeta pasteur de vidrio y se procedió a la centrifugación por 20 minutos a 1100 rpm para la sedimentación celular. Posteriormente se realizaron dos lavados uno con PBS-EDTA y otro con PBS por 10 minutos a 1100 rpm.

Después de los lavados se realizó el recuento de la viabilidad y ajuste celular utilizando azul tripán (dilución 1/10) y realizando el recuento en cámara de Neubauer. Se realizó el ajuste a 1×10^7 cel/mL.

Se realizó la separación de células NK por el método de enriquecimiento de células NK de EasySep de acuerdo al principio y procedimiento según instructivo del fabricante, resumido en breve:

El principio del método de enriquecimiento de células NK por selección negativo se basa en la adición de un cocktail de anticuerpos monoclonales unidos a complejos de anticuerpos tetraméricos biespecíficos, los cuales están dirigidos a antígenos de superficie de las células sanguíneas humanas (CD3, CD4, CD14, CD19, CD20, CD36, CD66b, CD123, HLA-DR y glicoforina A) y dextrán. Luego los anticuerpos del cocktail reconocerán al antígeno de superficie de las células no requeridas y al dextrán por lo que se pegaran a la superficie del tubo y las células NK quedaran en suspensión.

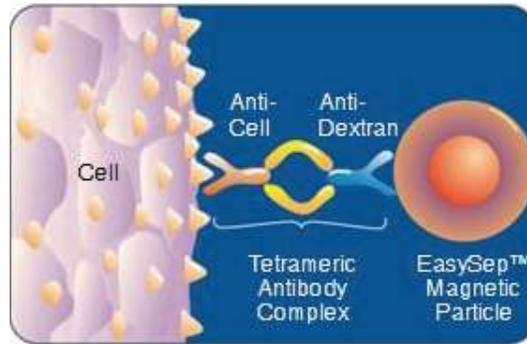


Fig.5 Fundamento del método de enriquecimiento de células NK Fuente: Prospecto EasySep

Se preparó una suspensión celular de 1 a 5×10^7 cel/mL en medio recomendado y se la puso en un tubo de fondo redondo de poliestireno. Se añadió el reactivo Human NK Cell Enrichment Cocktail at $50 \mu\text{L/mL}$ cel, se mezcló e incubó a $15 - 25^\circ\text{C}$ por 10 minutos. Se vortexeó el reactivo Magnetic Particles por 30 segundos y se añadió $100 \mu\text{L/mL}$ cel, Se mezcló bien y se incubó a $15 - 25^\circ\text{C}$ por 5 minutos; luego se completó la suspensión a $2,5$ mL con medio recomendado, se mezcló suavemente y se puso el tubo en el magneto por 2,5 minutos y en un movimiento continuo se volcó y se puso la fracción deseada en otro tubo.

3.6 Inmunofluorescencia Indirecta de células NK con Anti Granzima A y B

Se realizó nuevamente el recuento de la viabilidad y ajuste celular a 1×10^6 cel/mL en RPMI.

Se realizó el tratamiento de las células con EAE de concentración $5 \mu\text{g/mL}$ (a partir de una solución Stock $0,05 \text{g/mL}$ de EAE en DMSO). Se las incubó de 12 a 18 horas a 37°C .

Se alistó un portaobjetos para 3 improntas; un portaobjetos para células tratadas y un portaobjetos para células no tratadas.

Se puso 30uL de células NK tratadas y no tratadas en las 3 improntas, se puso 30uL de fibroblastos a la segunda y tercera impronta, se incubó a 37°C durante 20 minutos en cámara húmeda. Luego se centrifugaron los portaobjetos por 5 minutos a 800 rpm, posteriormente se pusieron los portaobjetos en solución de fijación por 20 minutos a 4°C. Se realizaron dos lavados en caja Koplín con buffer de lavado, luego se puso 30uL de Anti Granzima A y Anti Granzima B en diferentes improntas y se incubaron los portaobjetos por 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Por último se realizaron dos lavados con buffer de lavado y se colocó 30 uL del Anticuerpo Anti IgG antihumano conjugado con fluoresceína por 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda oscura.

Se realizaron dos lavados más con PBS celular, el último con una gota de Azul de Evans como colorante de contraste.

Se cargaron los portaobjetos con glicerol y se observaron con el microscopio de fluorescencia, se contaron 200 células por impronta, teniendo en cuenta la polarización de los gránulos de las células NK.

3.7 Tinción con anexina-PE y 7AAD de células mononucleares en apoptosis y necrosis

Se realizó la toma de muestra de 10mL de sangre periférica con heparina para la corrida de controles: como control positivo se utilizó células tratadas con tamoxifeno y como control negativo solo células mononucleares. Luego se realizó la toma de muestra de la misma

cantidad de sangre periférica con heparina de sujetos en estudio para el experimento. Se siguió el mismo procedimiento que el aislamiento de células NK para la prueba de inmunofluorescencia indirecta hasta el primer recuento y ajuste de viabilidad celular. Se ajustó de igual forma la suspensión celular a 1×10^7 cel/mL con RPMI. Se realizó el tratamiento con EAE de igual forma.

Se realizó la tinción de células en apoptosis con el PE Annexin V apoptosis Detection Kit 1 BD de acuerdo al principio y procedimiento según instructivo del fabricante, resumido en breve:

El principio del método es el siguiente: En la apoptosis temprana la célula expone su PS al exterior de la membrana; la anexina conjugada con ficoeritrina, una proteína de alta afinidad por la PS se une a ella y provoca su tinción. En la apoptosis tardía/necrosis la célula pierde la integridad de la membrana por lo que el colorante 7AAD (7 Amino Actinomicina) ingresa y tiñe el interior de la célula y la anexina también tiñe a la PS. Las células vivas no adquieren tinción, la apoptóticas tempranas adquieren el color verde de la anexina-PE y las tardías/necróticas adquieren ambos colores: el color rojo del 7AAD y el verde de la anexina-PE.

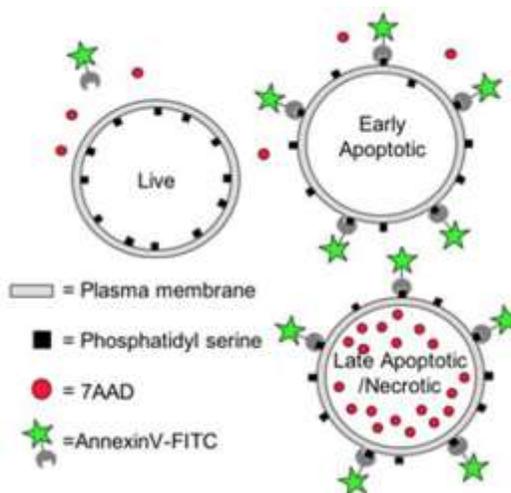


Fig.6 Fundamento del método de tinción de células en apoptosis con anexina-PE y 7AAD Fuente: Prospecto BD

3.8 Tinción con anexina-PE y 7AAD de células NK en apoptosis y necrosis

Se realizó la toma de muestra de 40 mL de sangre periférica con heparina en sujetos en estudio.

Se siguió el mismo procedimiento que el aislamiento de células NK para la prueba de inmunofluorescencia indirecta.

Se realizó nuevamente el recuento de la viabilidad y ajuste celular, se realizó el ajuste a 1×10^6 cel/mL en RPMI.

Se realizó el tratamiento de las células con EAE de concentración 5ug/mL (a partir de una solución Stock 0,05g/mL de EAE en DMSO). Se las incubó de 12 a 18 horas a 37°C.

Se realizó la tinción de células en apoptosis con el PE Annexin V apoptosis Detection Kit 1 BD y se analizaron las muestras por citometría de flujo.

4. Fuente de financiamiento

Este es un estudio que forma parte del proyecto de enfermedades infecciosas, financiado por la cooperación sueca, ASDI-SAREC y fondos propios del Instituto Seladis.

5. Análisis Estadístico

Los resultados fueron analizados por medio del paquete Excel y se determinaron las siguientes medidas de tendencia central: promedio; de dispersión: desviación estándar y de estimación: T de Student.

XVI. Resultados

1. Análisis de la pureza de las células NK separadas por el método de enriquecimiento de células NK con perlas magnéticas

Se aislaron células mononucleares por el método de separación por gradiente de densidad con Ficol-Hypaque de densidad 1,077; luego se aislaron células NK por el método Easy Sep, se verificó la pureza del aislamiento a través de la identificación de los marcadores Anti CD16 y Anti CD56, se analizó la pureza por citometria de flujo; la pureza fue de 97,9% para CD16 y 98,9 % para CD56.

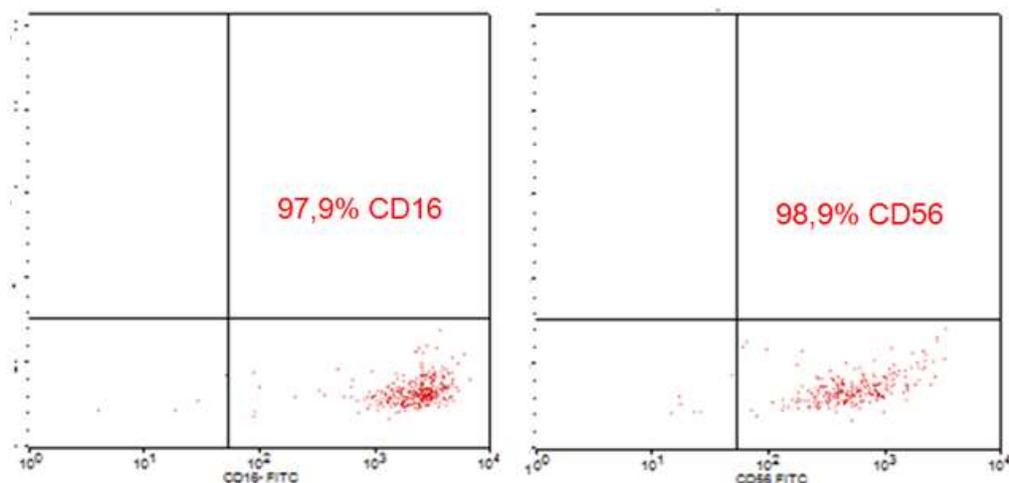


Fig.7 Pureza de células NK por método de enriquecimiento con perlas magnéticas con Anti CD16 y Anti CD56. Análisis por citometria de flujo de células NK aisladas, se confirmó su separación con Anti CD16 y Anti CD56.

De igual forma se verificó la pureza del aislamiento de células NK empleando Anti Granzima A y Anti Granzima B, se analizó pureza por citometria de flujo, la pureza fue de 100% para ambos.

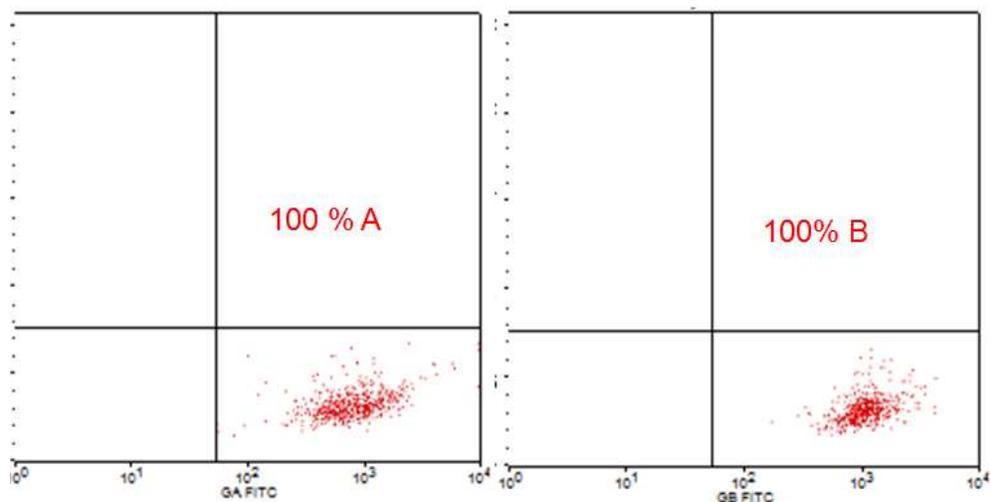


Fig.8 Pureza de células NK por método de enriquecimiento con perlas magnéticas con Anti Granzima A y Anti Granzima B. Análisis por citometria de flujo de células NK aisladas, se confirmó su separación con Anti Granzima A y Anti Granzima B.

2. Polarización de células NK

Se pudo observar al microscopio de fluorescencia la morfología de células NK, polarizada y no polarizada.

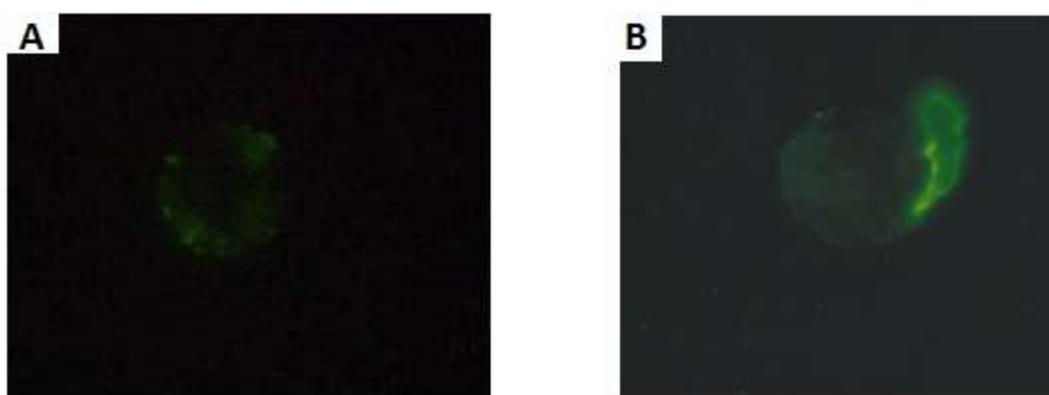


Fig.9 Polarización de las células NK. A. Célula NK no polarizada vista al microscopio de fluorescencia, B. Célula NK polarizada vista al microscopio de fluorescencia. Fuente: Inmunología 2012 Los gránulos líticos de las células NK se pueden observar en A, distribuidos en la periferia, en comparación con B donde se pueden observar los gránulos en uno de los polos de la célula.

3. Efecto de EAE sobre la polarización de células NK humanas con Anti Granzima A

Se aislaron células NK, fueron tratadas con EAE, luego células NK y fibroblastos fueron ajustados a 1×10^6 cel/mL; después se pusieron en contacto. Se realizó la prueba de inmunofluorescencia indirecta empleando Anti Granzima A en células NK, se visualizaron al microscopio de fluorescencia contándose 200 células por impronta.

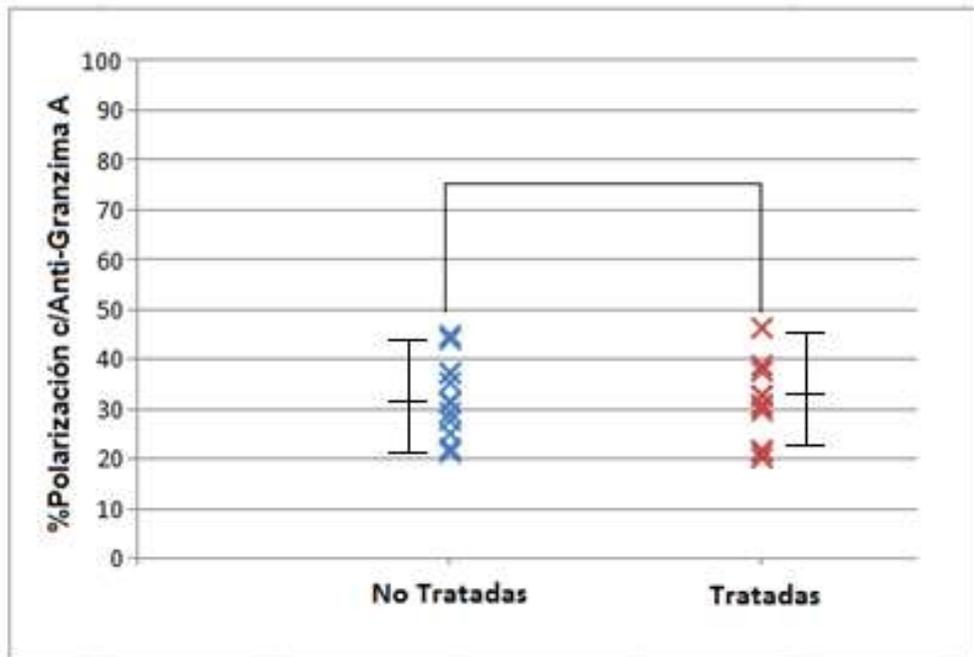


Fig 10. Efecto del EAE sobre el porcentaje de polarización de células NK con Anti Granzima A. Se analizaron las muestras por medio del microscopio de fluorescencia. Se determinaron los siguientes resultados; Células Tx: Promedio=31,17% y DS=3,82; Células no Tx: Promedio =32,54 y DS= 3,87($p > 0,05$)

- Las células NK tratadas con EAE muestran un promedio de polarización con Anti Granzima A de 31,17% y una DS de 3,82, con $p > 0,05$.
- Las células NK no tratadas con EAE muestran un promedio de polarización con Anti Granzima A de 32,54% y una DS de 3,87, con $p > 0,05$.

4. Efecto de EAE sobre la polarización de células NK humanas con Anti Granzima B

Se aislaron células NK, fueron tratadas con EAE, luego células NK y fibroblastos fueron ajustados a 1×10^6 cel/mL; después se pusieron en contacto. Se realizó la prueba de inmunofluorescencia indirecta empleando Anti Granzima B en células NK, se visualizaron al microscopio de fluorescencia contándose 200 células por impronta.

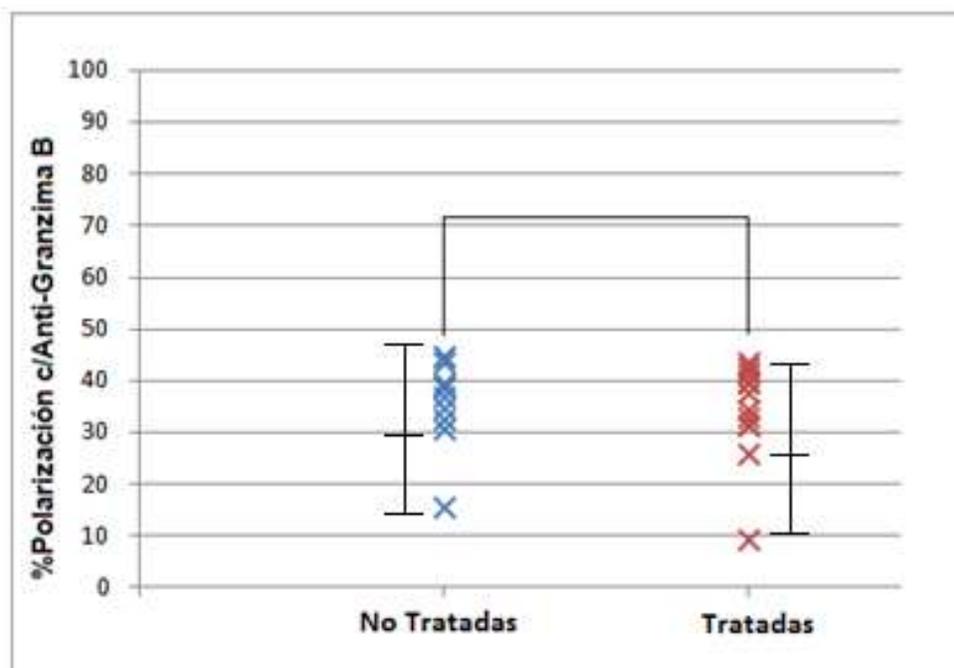


Fig 11. Efecto del EAE sobre el porcentaje de polarización de células NK con Anti Granzima B. Se analizaron las muestras por medio del microscopio de fluorescencia. Se determinaron los siguientes resultados; Células Tx: Promedio=34,30% y DS=4,70; Células no Tx: Promedio =36,46 y DS= 3,97(p>0,05)

- Las células NK tratadas con EAE muestran un Promedio de polarización con Anti Granzima B de 34,30% y una DS de 4,70, con $p > 0,05$
- Las células NK no tratadas con EAE muestran un Promedio de polarización con Anti Granzima B de 36,46% y una DS de 3,97, con $p > 0,05$.

5. Optimización del método de tinción de células en apoptosis con anexina-PE y 7AAD

Se realizó una corrida inicial en células mononucleares, con control (+) (células tratadas con tamoxifeno) y control (-) (células sin tratar) para poder optimizar el método. Después se realizó el mismo procedimiento con células tratadas con EAE.

	Anexina-PE (Marcador de Apoptosis Temprana)	Anexina-PE/7AAD (Marcador de Apoptosis Tardia-Necrosis)
Control (+) Tamoxifeno	0,68%	21,04%
Control (-)	0%	0%
Células Mononucleares con EAE	0,15%	5,71%

Tabla 7. Valores obtenidos en células mononucleares en corrida de prueba. Los controles utilizados para verificar la eficacia del método de tinción con Anexina-PE y 7AAD. Se corrieron controles: C(+) con Tamoxifeno, C(-) y células con EAE.

Se logró optimizar el método, ya que se obtuvieron resultados esperados en el caso de las células tratadas con tamoxifeno (control positivo) ya que el resultado fue de 21,04%.

A continuación se muestran las graficas obtenidas de los resultados de la corrida inicial.

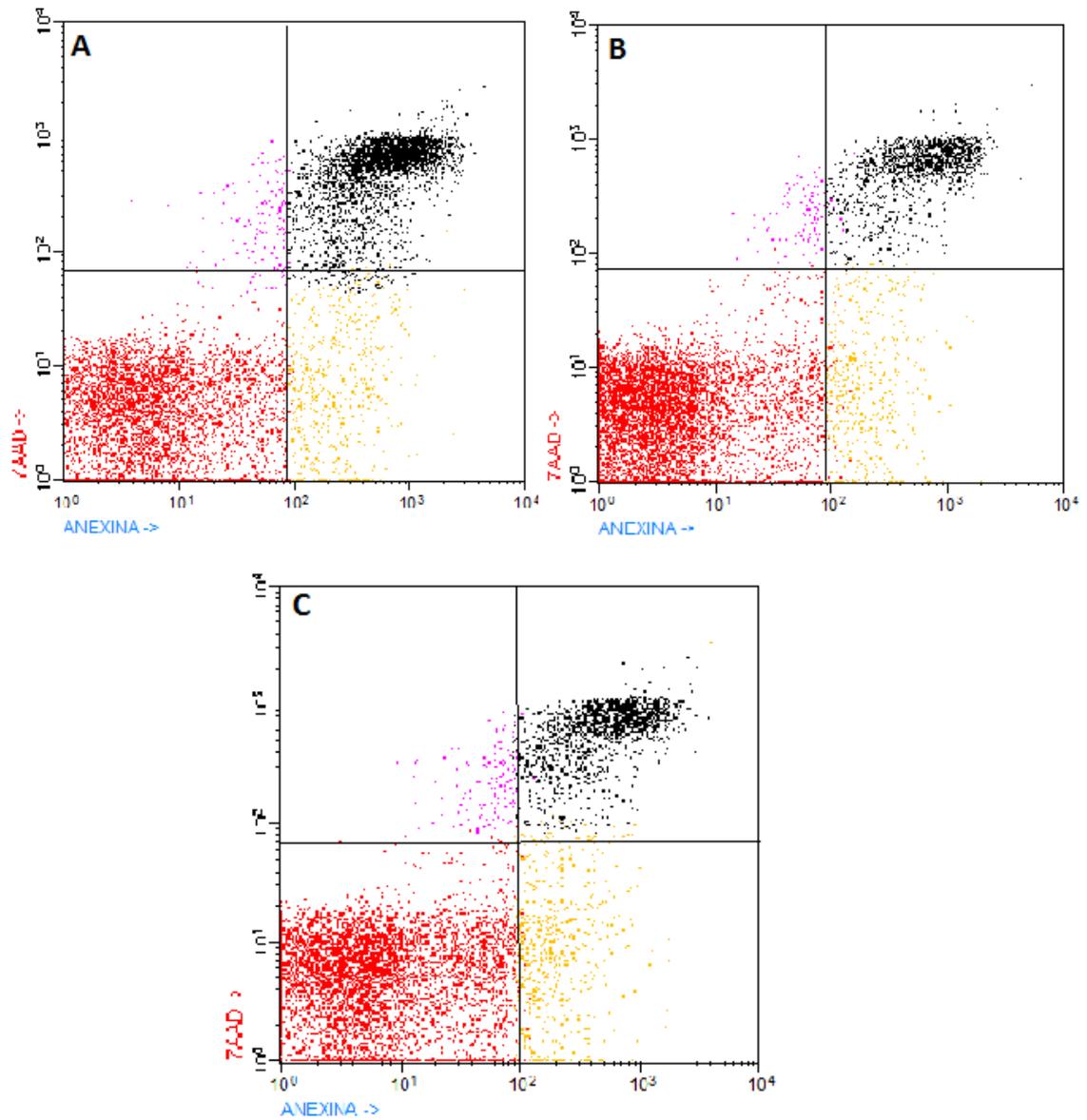


Fig. 12 Resultados del análisis por citometria de flujo de la corrida de controles y de células en presencia de EAE para optimizar tinción con anexina-PE y 7AAD de células apoptóticas. A. Control (+) Tamoxifeno B. Control (-) C. Células en presencia de EAE

6. Efecto del EAE sobre la inducción a apoptosis

Se realizó la evaluación del efecto de EAE en células mononucleares humanas, se utilizó el método de tinción con anexina-PE y 7AAD, se detectó la apoptosis temprana con el marcador PE y la apoptosis tardía/necrosis con el marcador 7AAD.

6.1 Efecto del EAE sobre la inducción a apoptosis temprana

Se aislaron células mononucleares ajustando a una concentración de 1×10^7 cel/mL, se las trató con EAE y luego se realizó la tinción con anexina-PE, luego se analizaron las muestras por citometría de flujo.

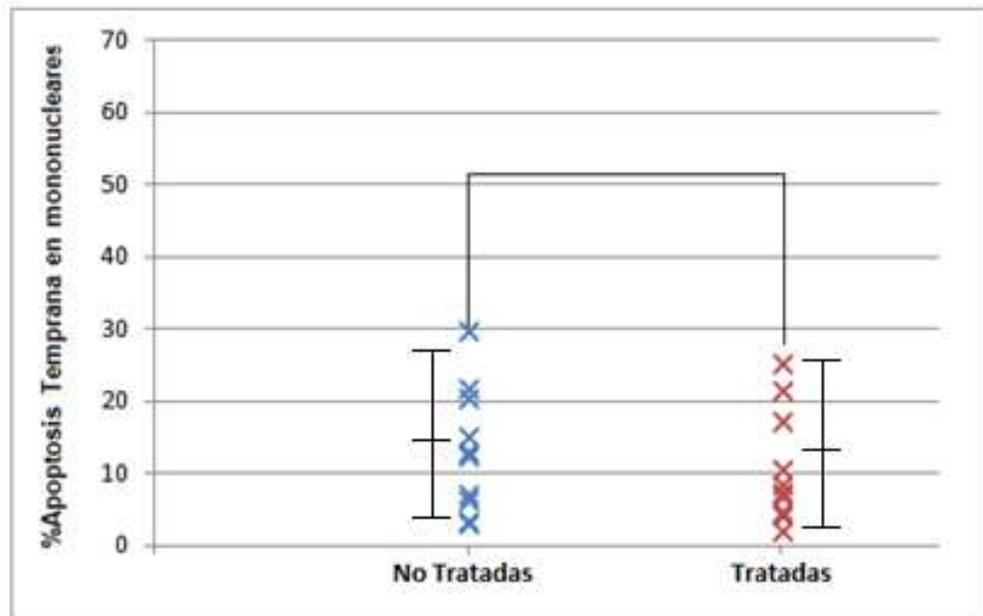


Fig 13. Efecto del EAE sobre el porcentaje de inducción a apoptosis temprana en células mononucleares por detección con el método de tinción de anexina. Se analizaron las muestra por citometría de flujo, se determinó promedio y DS, con $p < 0,05$. Se halló diferencia en el efecto del EAE en las células mononucleares.

- Se logró observar una diferencia en presencia de EAE de la apoptosis temprana en células mononucleares. Las células no tratadas muestran mayor apoptosis temprana; en células no tratadas

se determinó un promedio de 13,34%, una DS de 8,75; en células tratadas un promedio de 10,79% y una DS 7,90; con $p < 0,05$.

Según resultados del efecto del EAE sobre la inducción a apoptosis y necrosis en células NK humanas, se utilizó el método de tinción de la anexina con PE y 7AAD, se analizaron los resultados por citometría de flujo, se detectó la apoptosis temprana y la apoptosis tardía/necrosis.

- Se logró observar una diferencia en presencia de EAE en la apoptosis temprana. Las células NK no tratadas muestran mayor apoptosis temprana, con un 3,0% más respecto a las tratadas.

6.4 Efecto del EAE sobre la inducción a apoptosis tardía/necrosis

Se aislaron células mononucleares ajustando a una concentración de 1×10^7 cel/mL, se las trató con EAE y luego se realizó la tinción con anexina-PE y 7AAD, se analizaron las muestras por citometria de flujo y se calculó Promedio y DS.

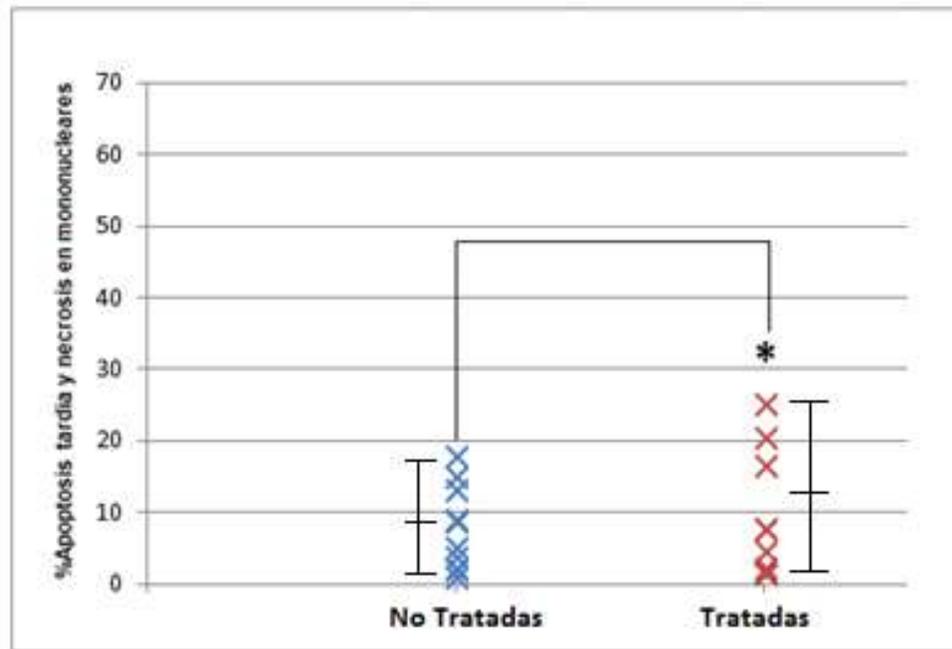


Fig 14. Efecto del EAE sobre el porcentaje de inducción a apoptosis tardía/necrosis en células mononucleares por el método de tinción de anexina-PE y 7AAD. Se analizaron las muestra por citometria de flujo, se determinó promedio y DS, con $p > 0,05$. (*) Se halló diferencia en el efecto del EAE en las células mononucleares.

- No se observa diferencia alguna en presencia del EAE en las células mononucleares en la apoptosis tardía/necrosis, en células mononucleares no tratadas se determinó un promedio de 8,01%, una DS de 6,0; y en células tratadas un promedio de 9,02 y una DS de 8,74, con $p > 0,05$.
- No existió una diferencia en el efecto del EAE en las células NK en la apoptosis tardía/necrosis, con un promedio de 8,5%.

6.5 Análisis por citometria de flujo de la detección de apoptosis en células NK por la tinción con anexina-PE y 7AAD

Se evaluó el efecto del EAE sobre inducción a apoptosis y necrosis en células NK, se realizó la tinción con anexina-PE y 7AAD, se analizaron las muestras por citometria de flujo y con el programa Paint-a-gate se obtuvieron las siguientes graficas.

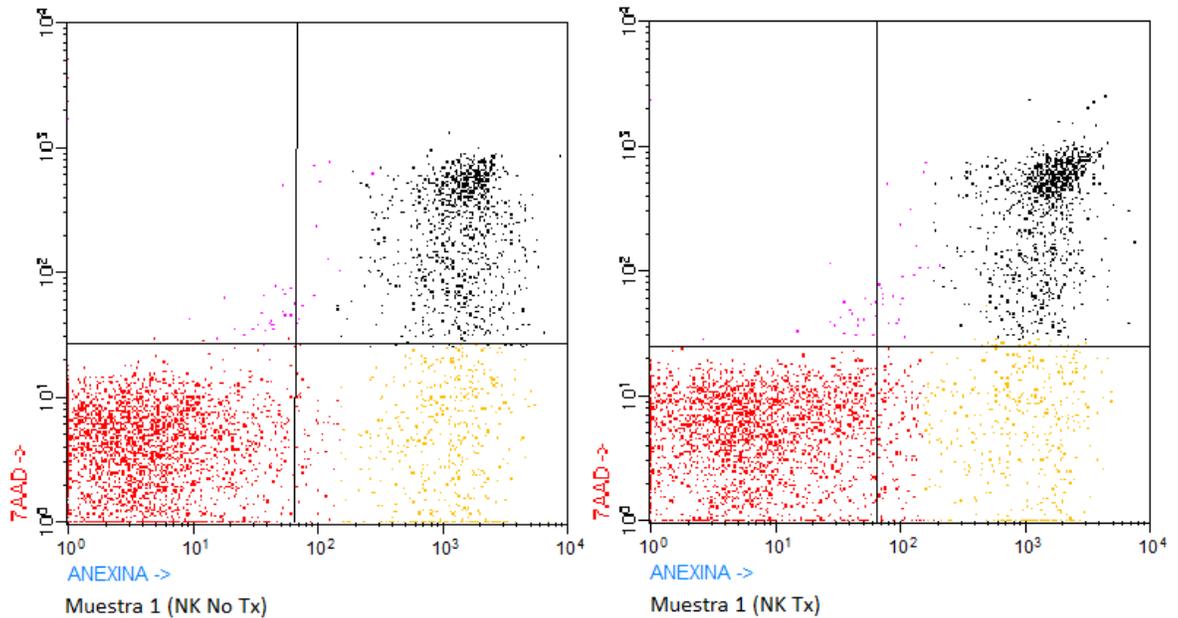


Fig. 15 Resultados del análisis por citometria de flujo de células NK de la detección de apoptosis por tinción con anexina-PE y 7AAD. En la figura de la derecha se muestran los resultados de la corrida de una muestra de células NK, la figura de la izquierda de la misma muestra pero de células NK tratadas con EAE. Se observa en el cuadrante superior derecho células apoptóticas tardías/necróticas (Anexina⁺ 7-AAD⁺), y en el cuadrante inferior derecho células apoptóticas tempranas (Anexina⁺ 7-AAD⁻) Se nota leve diferencia.

XVII. Discusión

El presente estudio ha tenido como objetivo ampliar nuestra comprensión del efecto del EAE sobre la respuesta inmune innata, específicamente sobre las células NK.

Estas células que suponen aproximadamente el 10% de los linfocitos normales de la sangre por medio de sus mecanismos apoptótico y membranólítico de destrucción de las células dañadas colaboran a limitar cualquier infección parasitaria como la leishmaniasis a pocos días de su inicio por lo que los hallazgos de esta tesis pueden aportar a un direccionamiento de nuevos estudios.

Análisis de la pureza de las células NK separadas por el método de enriquecimiento con perlas magnéticas

Para analizar la pureza de las células NK se emplearon los antisueros Anti CD16 y Anti CD56, que hicieron posible la detección de los marcadores específicos debido a que estos solo se encuentran en la superficie de células NK. El análisis de la población celular por citometría de flujo presentó valores de 97,9% y 98,9% para CD16 y CD56 respectivamente. Este porcentaje de rendimiento está dentro de lo esperado señalado por el fabricante.

Adicionalmente se emplearon los antisueros Anti Granzima A y Anti Granzima B para la detección de la presencia de granzima A y B, serinproteínas que se encuentran en los gránulos líticos, en el citoplasma de las células NK; los resultados fueron analizados por citometría de flujo. La pureza del aislamiento fue del 100% para ambas granzimas.

A través de este primer paso de aislamiento se pudo obtener una población altamente purificada de células NK para realizar los siguientes procedimientos. Se pudo además verificar que este es un procedimiento

más sencillo y económico que otros que emplean material adicional, como columnas y cuyo procedimiento es más moroso y complicado, susceptible de más errores.

Efecto de EAE sobre la polarización de células NK humanas con Anti Granzima A y B

Para evaluar el efecto del EAE sobre la actividad de células NK, se analizó el porcentaje de polarización de gránulos con Anti Granzima A y Anti Granzima B en células NK previamente tratadas con EAE y determinando un nivel basal de polarización.

La actividad de las células NK evaluada por el porcentaje de polarización de las mismas en presencia de fibroblastos utilizando Anti Granzima A y Anti Granzima B no mostró ninguna diferencia. Se podría sugerir entonces que el EAE no influye en la fase de polarización del mecanismo de activación de las células NK, ya que las células tratadas no están afectadas en esta fase, cabe notar que la polarización es parte del proceso de activación de las células efectoras para que puedan lisar a sus células diana y según estudios es importante la activación eficiente de las células NK para el control de la leishmaniasis ⁽⁶⁾.

Lo indicado no necesariamente implica que no debería influir en el mecanismo de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos de las células NK, ni en la secreción de citoquinas.

Análisis de la optimización del método de tinción de células apoptóticas con anexina-PE y 7AAD

Basados en el hallazgo previo en relación al efecto del EAE sobre la proliferación celular se evaluó el efecto del EAE sobre la inducción a apoptosis y necrosis en células NK humanas utilizando el método de tinción por medio de la anexina y 7AAD.

El método se optimizó mediante la corrida de controles con células mononucleares por citometría de flujo. Se trabajó con control positivo con células tratadas con tamoxifeno y control negativo.

Lo que se conoce del tamoxifeno según estudios es que este compuesto se caracteriza por su inducción en la fase de ejecución o fase tardía de la apoptosis, por su acción sobre la degradación irreversible del ADN ⁽⁴¹⁾⁽⁴²⁾.

Entonces el tamoxifeno mostró un porcentaje mayor de células en apoptosis tardía/necrosis respecto a los valores del control negativo por lo que se logró obtener los resultados esperados para la optimización del método ⁽¹⁸⁾ ⁽¹⁹⁾ ⁽²⁰⁾.

También se pudo hallar en una muestra preliminar de células mononucleares tratadas con EAE un 0,15% de apoptosis en su etapa temprana y en su etapa tardía-necrosis un 5,71%. Lo que nos podría indicar un posible efecto inductor de apoptosis del extracto en su etapa tardía; lo que más tarde se discute por los resultados obtenidos con todas las demás muestras procesadas.

Al realizar el procedimiento se pudo comprobar rapidez y menor dificultad de este en relación a otros como: la tinción túnel y la electroforesis en geles; por lo que se procedió a la siguiente etapa.

Efecto del EAE sobre la apoptosis temprana en células mononucleares y NK

En la detección de células mononucleares en apoptosis en su etapa temprana se pudo detectar un porcentaje mayor de apoptosis en células no tratadas, lo que a su vez significa que se halló un mayor porcentaje de células mononucleares vivas tratadas con EAE que no tratadas; por estos resultados se sugiere que el EAE puede tener un efecto protector sobre células mononucleares; en comparación con la corrida de controles que

indica lo contrario; dichos resultados contradictorios de la muestra preliminar dentro de la corrida de controles puede deberse al azar o a la variabilidad biológica.

En relación a la relevancia de estos hallazgos sobre la capacidad protectora del EAE se debe tomar en cuenta que dicha capacidad permite la cantidad adecuada de las células mononucleares. Es importante este resultado porque justifica lo que se ha podido hallar en otros estudios; que indican que en la leishmaniasis la presencia de los macrófagos, células NK y linfocitos es urgente para eliminar más eficientemente la infección ⁽⁶⁾.

En la detección de células NK apoptóticas en su etapa temprana se pudo encontrar que existió un 3% más de apoptosis en células no tratadas que en células tratadas con EAE; esto sugiere confirmar que el EAE tiene un efecto aparentemente protector en las células; lo que indicaría que al tratar pacientes con EAE aumentarían su número de linfocitos, lo que incluiría a las células NK; efecto beneficioso para el paciente ya que se ha reportado que pacientes con mayor presencia de células NK responden mejor a la recuperación de las lesiones a causa de la enfermedad ⁽⁴²⁾. Esto junto con todo lo conocido gracias a otros estudios; como ser que el extracto ayuda en la regulación de la respuesta inflamatoria debido a la disminución de interferon- γ , IL-1, IL-8, IL-6, IL-23, etc. Hasta el momento nos permitiría sugerir a la Evanta como un prometedor tratamiento alternativo para la leishmaniasis.

Al mismo tiempo por este hallazgo se puede insinuar que el EAE permite la cantidad adecuada de células NK por lo que hace importante seguir desarrollando estudios para evaluar el papel protector del EAE sobre células NK.

Efecto del EAE sobre la apoptosis tardía/necrosis en células mononucleares y células NK

En la evaluación del efecto de EAE en la apoptosis tardía/necrosis sobre las células mononucleares no se observó ninguna diferencia en el porcentaje de células tratadas, lo que no implica que apoye o no apoye el efecto protector del extracto.

Respecto al efecto del EAE en células NK en la apoptosis tardía/necrosis no se vio ninguna diferencia en el experimento por lo que se puede sugerir que no existe efecto del extracto sobre la etapa tardía de la apoptosis y necrosis en las células estudiadas.

Para explicar los resultados en cuanto apoptosis se puede mencionar que: En la fase temprana solo existe un reordenamiento de la membrana, donde la PS es expuesta al lado exterior de la misma por la enzima translocasa, esto ocurre en las dos primeras horas; en la etapa tardía existen alteraciones más groseras de la membrana, donde se forma un complejo multiproteico que conduce a la liberación de enzimas que contribuyen a la fragmentación de las proteínas y cromatina, con la pérdida de la impermeabilidad de la membrana. Esto nos lleva a sugerir que como en la primera fase, la membrana no se ve sustancialmente afectada por la apoptosis, el EAE actuaría con un efecto protector; en cambio en la etapa tardía debido al aumento de la permeabilización de la membrana, el EAE podría ingresar en la células y estimular la acción de la mitocondria, dicha organela al ser estimulada incrementa la permeabilidad de sus membranas llegando a la condensación de cromatina, fragmentación de ADN y degradación masiva de proteínas, lo que lleva a la nucleolisis y finalmente citólisis ^{(16) (17) (18) (19)}.

XVIII. Conclusiones

- Se logró evaluar el efecto del EAE sobre células NK mediante los siguientes procedimientos:
 - ✓ El aislamiento de células NK humanas obteniendo una población altamente pura (la pureza fue del 7,9% para CD-16 y 98,9% para CD-56).
 - ✓ Polarización de células NK humanas.
 - ✓ Inducción a apoptosis y necrosis de las células NK humanas.
- Se logró cumplir los objetivos específicos llegando a lo siguiente:
 - ✓ No se observó ningún efecto del EAE sobre la polarización de células NK humanas.
 - ✓ Los resultados sugieren que el EAE disminuye la inducción de la apoptosis en su etapa temprana por lo que tiene un efecto aparentemente protector tanto en células NK como células mononucleares.
 - ✓ No se observó ningún efecto sobre la apoptosis tardía/necrosis tanto en células mononucleares como en células NK.

XIX. Recomendaciones

Se recomienda seguir realizando estudios futuros sobre el efecto del EAE sobre células NK, tomando en cuenta la secreción de citoquinas o considerar realizar en estudio in vivo para poder verificar el efecto protector del EAE en otras funciones de las células NK. Además debido a la variabilidad de la población estudiada se aconseja ampliar la población para poder estudiar más a detalle el papel del EAE en las células NK.

XX. Bibliografía

1. Vidaurre de la Riva Prem Jai. Plantas medicinales en los Andes de Bolivia. Botánica Económica de los Andes Centrales 2006; 268-284
2. Salamanca Efraín. Actividad Antiparasitaria múltiple de Alcaloides Totales de corteza de *Galipea longiflora Krause Kallunki* (Evanta). Tesis de Post-grado. 2008;3-16
3. Fournet, A, Barrios Angelo, Roblot Hocquemiller. Antiprotozoal Activity of quinoline alkaloids isolated from *Galipea longiflora*, a Bolivian plant used as treatment for cutaneous leishmaniasis. Phytotherapy research; 1996;174-178.
4. Organización Panamericana de la Salud. Epidemiología de fin de siglo. Actualización 2007 Ministerio de Salud y Prevision Social. 2007; 1
5. Rojas Francia, Bolaños Natalia. Valores de referencia de células asesinas naturales (NK y NKT) en donantes de sangre de Bogotá. Acta Medica Colombiana. 2007; 3
6. Bonilla-Escobar. Respuesta inmune a la leishmaniasis: algo más que linfocitos T, Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas CIDEIM 2005; 1-6
7. Peña, M. Frias, J. M. Miranda y C. Alonso. Células y órganos del sistema inmune. Inmunología en línea. 2010; 1-5
8. Abbas Abul, Inmunología celular y molecular, Elsevier, Sexta Edicion. 2008
9. Castellanos Martínez, Rosa, Guevara Rosales Mercedes. Respuesta. s inmunes y adaptativas, Medisan. 2002;1-15
10. Prieto Martin Alfredo, Una visión de conjunto de la inmunología, Apuntes en línea. Universidad de Alcalá. 2010
11. Sepúlveda Cecilia. Células Natural Killer y el sistema inmune innato en la patología infecciosa. Revista Médica de Chile 2000; 1-8

12. Awasthi Amit. Immune response to *Leishmania* infection. Indian J Med Res. 2004; 238-258
13. Roitt. Inmunología, Fundamentos, Panamericana. Octava edición: 2008
14. Jordan Joaquin. Apoptosis: muerte celular programada. Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Castilla-La Mancha. 2003;100-108
15. Zhang G. Gurtu V. Early Detection of Apoptosis Using a Fluorescent Conjugate of Annexin V. BioTechniques 1997;525-531
16. Martin S. Early Redistribution of Plasma Membrane Phosphatidylserine Is a General Feature of Apoptosis Regardless of the Initiating Stimulus: Inhibition by Overexpression of Bcl-2 and Abl. Division of Cellular Immunology Review. 1995; 2-6
17. Aubry J., Blaecke A. Annexin V Used for Measuring Apoptosis in the Early Events of Cellular Cytotoxicity. Wiley-Liss 1999;197–204
18. Dubin M, Stoppani A. Muerte celular programada y apoptosis, función de las mitocondrias. Revista Medicina; 2000; 375-386
19. Mandleker S. Mechanisms of tamoxifen induced apoptosis. Apoptosis. 2001:649
20. Roger P. Effect of tamoxifen on growth and apoptosis of estrogen-dependent and independent in human breast cancer cells. Annals of Surgical Oncology. 1995; 238
21. S. Al Jassabi. Toxic Effects of Tamoxifen and the Protective Role of Silymarin and Zizyphus S. Middle-East Journal of Scientific Research. 2011; 110-114
22. Duran Lilian. Medicina tradicional andina, una alternativa para las comunidades en Bolivia. Global Citizenship. 2002;1-4
23. Llanos Medina, et. Al. Extracción acuosa de corteza de *Galipea longiflora* y su actividad leishmanicida. Biofarbo. 2009;1-8
24. Zanatta Francielle, Becker Renan, et. Al. Gastroprotective activity of alkaloid extract and 2-phenylquinoline obtained from the bark of

Galipea longiflora Krause (Rutaceae). [Chemico-Biological Interactions](#). 2009;180

25. Paz Magaly, et. Al. Establecimiento de Cultivos *In Vitro* de *Galipea longiflora*, una Rutaceae de la Amazonia Boliviana. Latin American Journal of Pharmacy .2006:1-4
26. Giménez M. Alberto. Estudios Químicos, biológicos y farmacológicos de *Galipea longiflora*. Revista Boliviana de Química. 2005; 1-6
27. Fournet Alain, Angelo Alcira, et. Antiprotozoal activity of quinoline alkaloids isolated from *Galipea longiflora*, a Bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis, Phytotherapy research, 1994;174-178
28. Herrera Vania. Toxicidad de extracto de alcaloides totales de la *Galipea longiflora* Krause Kallunki (Evanta) en fase preclínica. Biofarbo. 2009:1-6
29. Fournet Alain. Les chimanines nouvelles quinoleines substituées en 2. Isolée d'une plante. J. Nat Prod 1993; 1-3
30. Fournet Alain, Angelo Alcira, et. Al. 2-Substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1993; 859-863
31. Calla-Magariños J., Gimenez A., Troye-Blomberg, Fernandez C. An alkaloid extract of Evanta, traditionally used as antileishmania agent in Bolivia, inhibits cellular proliferation and interferon- γ production in polyclonally activated cells: Scandinavian Journal of Immunology: 251-258
32. Calla-Magariños J., Giménez A., Quispe Teddy, Giménez Alberto. Quinolinic alkaloids from *Galipea longiflora* Krause suppress production of proinflammatory cytokines in vitro and control inflammation *in vivo* upon *Leishmania* infection in mice. Scandinavian Journal of Immunology: 2013;30-38
33. Calla-Magariños J., Troye-Blomberg M, Fernandez C. Alkaloids from *Galipea longiflora* Krause modify the maturation of human dendritic

cells and their ability to stimulate allogenic CD4+ T cells. *Immunopharmacology*; 2013; 79-84

34. Castro Romero D. Evaluación del efecto del extracto de alcaloides totales de la *Galipea longiflora (Krause)* Evanta, sobre la actividad fagocítica de macrófagos humanos infectados con *Leishmania braziliensis*, Octubre de 2010 y abril 2011. [Tesis de Grado]. La Paz, Seladis, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés; 2014
35. Quispe Soto T. Efecto del extracto de alcaloides totales de Evanta, sobre macrófagos murinos infectados con *Leishmania braziliensis in vitro*. [Tesis de Especialidad]. La Paz, Seladis, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés; 2012
36. Montes Cordero F. Evaluación de la respuesta proliferativa y de producción de citoquinas de linfocitos provenientes de pacientes con leishmaniasis cutánea durante la gestión 2010 Seladis FCFB La Paz, Bolivia. [Tesis de Grado]. La Paz, Seladis, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés; 2011
37. Pérez Cocarico G. Evaluación in vivo del extracto de alcaloides de Evanta, sobre la actividad de neutrófilos en modelo murino. [Tesis de Especialidad]. La Paz, Seladis, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés; 2014
38. Laurenti, et Al. Braz J. The role of natural killer cells in the early period of infection in murine cutaneous leishmaniasis. *Med Biol Res*.1999
39. Aranha et Al. Interleukin-2-activated natural killer cells may have a direct role in the control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigote and macrophage infection. [Scand J Immunol](#). 2005:2-7
40. Rahman Simeen ber, Bar Arfan u. Composition of T cell immune response in cutaneous leishmaniasis. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists*; 2005; 296-303

41. Maasho.A. Indications of the protective role of natural killer cells in human cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity. *Infection and Immunity*. [Infect Immun](#). 1998:1-10
42. Nylén, et Al. Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. *Clin Exp Immunol*: 2003
43. Lieke, et Al. The interplay between *Leishmania* promastigotes and human Natural Killer cells in vitro leads to direct lysis of *Leishmania* by NK cells and modulation of NK cell activity by *Leishmania* promastigotes. *Parásitology*; 2011
44. Convit J, et Al. Therapy of Venezuelan patients with severe mucocutaneous or early lesions of diffuse cutaneous leishmaniasis with a vaccine containing pasteurized *Leishmania* promastigotes and bacillus *Calmette-Guerin*. [The American Society of Tropical Medicine and Hygiene](#). 2004
45. Maco Luján M. Evaluación de la actividad antitumoral de alcaloides purificados de plantas peruanas amazónicas [Trabajo Fin de Máster] Universidad Pública de Navarra. 2012; 36-38
46. Patil Rajeshree S. Synthetic and Natural Products Against Leishmaniasis: A Review. *World J Public Health Sciences*. 2012;1-7

XVI. Anexo

Anexo 1

Certificado de Aval ético del Proyecto de Enfermedades infecciosas

 **COMISIÓN DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN**

CERTIFICADO DE AVAL ÉTICO

A quien corresponda:

La Comisión de Ética de la Investigación (CEI) del Comité Nacional de Bioética, tiene a bien informar que fue presentado a la CEI, para su revisión y aval ético el proyecto titulado: **"Enfermedades Infecciosas, Nuevas Terapias: Evanta en el Tratamiento de Leishmaniasis Cutánea"**, por la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas –UMSA, Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud (SELADIS), Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas (IIFB), Centro de Información y Documentación del Medicamento (CIDME), Departamento de Inmunología – Universidad de Estocolmo – Suecia, Hospital de Palos Blancos y el Proyecto OSCAR – Obras Sociales Caminos de Acceso Rural-Palos Blancos. Cuyos Investigadores Responsables de la Valoración Clínica son: Dra. Susy Machicado, Dr. Walter Magariños, Dr. Fernando Sosa, Dr. Alberto Giménez y el Dr. Orlando Choque. Dicho proyecto fue evaluado en dos oportunidades, bajo los criterios éticos que se toman en cuenta para todo proyecto de investigación que involucra seres humanos:

1. Validez científica (que el proyecto cumpla con los requisitos de la metodología científica).
2. Selección equitativa de la muestra (tomando en cuenta principalmente el manejo de grupos vulnerables).
3. Validez social (pertinencia, atinencia y relevancia del proyecto).
4. Relación Riesgo/Beneficio (viendo que el riesgo(s) sea mínimo(s) y mayor el beneficio(s) para los sujetos de estudio).
5. El Consentimiento Informado (documento que refleje el respeto a la autonomía del participante en el estudio, redactado de una manera clara, comprensible y lo suficientemente informativo para el sujeto de investigación).

Una vez verificadas las correcciones hechas por el equipo investigador, en base a las observaciones de la CEI, es que se tiene a bien certificar que el mencionado proyecto cumple con todos los requisitos éticos arriba mencionados, por lo que los miembros del CEI dan el respectivo **AVAL ÉTICO** al proyecto **"Enfermedades Infecciosas, Nuevas Terapias: Evanta en el Tratamiento de Leishmaniasis Cutánea"**, el mismo que puede proseguir con su ejecución.


Dra. Jacqueline Cortez G.
COORDINADORA

La Paz, 21 de diciembre de 2006



Anexo 2

Consentimiento Informado proporcionado a los sujetos en estudio

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del protocolo: Evaluación del Efecto del Extracto de Alcaloides de Evanta en células Natural Killer humanas

Investigador principal: Lic. Liz Wendy Villarreal Waiwa

Nombre del donador: _____

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Este estudio permitirá el conocimiento de si existe o no efectos del extracto de alcaloides de la planta Evanta en las células NK, células que son importantes en la defensa de nuestro organismo frente a parásitos como *Leishmania*, este estudio colaborará con la implementación futura de la planta Evanta como tratamiento alternativo para curar la leishmaniasis. Además este estudio permitirá que en un futuro otros pacientes puedan beneficiarse del conocimiento obtenido.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

Su participación en el estudio implica la toma de muestra de 40 mL de sangre, tomada por personal con experiencia; dicha toma de muestra no afecta para nada el funcionamiento del organismo de ninguna forma, porque el cuerpo repondrá rápidamente la sangre perdida.

Posterior a la toma de sangre se puede presentar (dolor o se puede llegar a formar un morete), que desaparecerá progresivamente sin afectar ninguna actividad.

Luego de esta fase, se procederá a utilizar sus células donadas para poder observar el efecto del extracto de la Evanta mediante experimentos.

ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, -aun cuando el investigador responsable no se lo solicite-, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.

- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.

• Teléfono: 70679723

- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma del participante

Fecha