

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**COMPARACIÓN DE DOS METODOLOGÍAS PARA LA EVALUACIÓN
IN VITRO DE LA ACTIVIDAD DE EXTRACTOS DE PLANTAS
SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Trypanosoma cruzi***

Informe de Tesis

Presentado por

Adolfo Pérez

Para optar al Título de

Químico Biólogo

Guatemala, Agosto del 2003.

I. RESUMEN

La Tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas, es una zoonosis causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*. Es una enfermedad tropical típica, siendo una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en los países endémicos de América Latina.

El tratamiento de la enfermedad está reducido al uso de unas cuantas drogas ya que el parásito es sumamente resistente a la mayoría de los fármacos que se han sintetizado para tal propósito. A la fecha el tratamiento que se utiliza para la infección de *T. cruzi* es la administración de los derivados imidazólicos: Benzonidazole y Nifurtimox; sin embargo, los resultados obtenidos a la fecha no han sido satisfactorios ya que éstos son efectivos únicamente durante el estadio agudo de la infección o cuando el parásito se encuentra circulante. Además, estos fármacos producen una gran cantidad de efectos secundarios, lo que ocasiona que los pacientes suspendan el uso del mismo.

Varios investigadores han utilizado extractos de plantas en la búsqueda de nuevos compuestos activos contra infecciones por protozoos. En Guatemala, Cáceres y colaboradores por medio de estudios etnobotánicos y de bioprospección han recopilado información para la equiparación y uso oficial de medicamentos fitoterapéuticos a través de su validación científica.

Berger y colaboradores realizaron estudios con distintas fracciones de extractos de *Neurolaena lobata* en la búsqueda de compuestos anti-*Trypanosoma cruzi*, encontrando que la fracción etanólica es la de mayor actividad. Para la evaluación de la actividad antiparasitaria de los extractos de plantas, se ha utilizado una metodología en la cual la cantidad de parásitos se determina por conteo manual en cámara de Neubauer, procedimiento que requiere de mucho tiempo, además de estar sujeto a errores del analista. Estos inconvenientes han creado la necesidad de recurrir a métodos más tecnificados que acorten el tiempo de ensayo, permitan la evaluación de más plantas en menor tiempo y minimicen los errores en el conteo de los parásitos.

Para dicho propósito en el presente estudio se evaluaron catorce extractos utilizando dos metodologías para el tamizaje de la actividad anti-*T. cruzi*. Una de ellas fue el conteo directo en cámara de Neubauer y la otra fue una técnica colorimétrica, utilizando la cepa CL-Brener recombinada con el gen *lacZ* de *E. coli* que expresa la enzima de la β -galactosidasa; ésta cataliza el cambio de color

amarillo a rojo del sustrato cloro-fenol-rojo- β -D-galactopiranosido (CPRG), en una reacción directamente proporcional a la concentración de parásitos.

El conteo en cámara de Neubauer se consideró como la metodología de referencia, en la cual se incuban los parásitos de *T. cruzi* (epimastigotes y tripomastigotes) con diferentes concentraciones de los extractos de plantas; posteriormente se realiza un conteo manual del número de parásitos que sobrevivieran al ser incubados con diferentes concentraciones de los extractos, después de cuarenta y ocho horas de incubación.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la metodología colorimétrica no cumplió con las expectativas de igualar o mejorar la sensibilidad de la metodología de conteo directo y de esta manera minimizar el tiempo y esfuerzo en la búsqueda de nuevos extractos con actividad anti-*T. cruzi*.

En la determinación de la actividad anti-*T. cruzi* con la metodologías de conteo directo se utilizaron tres extractos etanólicos de plantas con actividad anti-*T. cruzi* demostrada como: *N. lobata*, *L. graveolens* y *S. americanum*. De los extractos con sospecha de actividad obtuvo que todos los extractos utilizados poseen un IC₉₀ menor a 1 mg/ml para el estadio de epimastigote y tripomastigote y de los extractos escogidos al azar, el extracto que mostró la mejor actividad anti-*T. cruzi* fue el de hoja de *S. conterminus* con IC₉₀ de 122 μ g/ml para epimastigotes y un IC₉₀ de 29 μ g/ml para tripomastigote. El único extracto de las plantas escogidas al azar y del resto de plantas del estudio que no mostró actividad contra el parásito para el estadio de epimastigote fue el de tallo de *A. densiflora*.

II. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es una enfermedad parasitaria crónica causada por el protozoo flagelado, *Trypanosoma cruzi*. Este parásito normalmente se transmite al ser humano y otros mamíferos a través de insectos triatomíneos de la familia *Reduviidae*, los cuales al succionar sangre del hospedero, defecan eliminando el parásito por las heces. También puede transmitirse por vía transplacentaria, por transfusión de sangre contaminada, por transplante de órganos contaminados y por accidentes con material contaminado en el laboratorio (1).

Desafortunadamente, *T. cruzi* no es susceptible a una gran lista de drogas sintéticas para las cuales se ha evaluado su actividad. En el tratamiento contra este parásito se han utilizado principalmente dos drogas; la primera de éstas es el Nifurtimox, con el cual el 70% de los pacientes tratados presentan una reducción en la duración y severidad de la enfermedad. Sin embargo, la terapia utilizando esta droga debe de iniciarse durante la fase aguda de la enfermedad y los pacientes experimentan una gran cantidad de efectos secundarios. El segundo agente utilizado es el Benzonidazol, el cual posee características similares al Nifurtimox. Desafortunadamente, algunas variedades de *T. cruzi* han mostrado resistencia a alguna de estas drogas (1, 2). Por estas razones, varios investigadores han realizado pruebas en la búsqueda de nuevos medicamentos. En Guatemala, estudios realizados por Cáceres y colaboradores han sugerido el uso de extractos vegetales como una alternativa en el tratamiento de esta infección. A la fecha han evaluado la actividad antiparasitaria de por lo menos sesenta plantas de uso medicinal, de las cuales han demostrado que 12 presentan actividad contra *T. cruzi* (3, 4).

En la evaluación de la actividad antiparasitaria de los diferentes extractos de plantas, se ha utilizado una metodología en la cual la cantidad de parásitos se determina por un conteo manual en cámara de Neubauer, procedimiento que requiere de mucho tiempo, además de estar sujeto a errores (4-9).

Según estudios realizados por Buckner y colaboradores, utilizando la cepa de CL-Brener *T. cruzi*, que expresa la enzima β -galactosidasa de *Escherichia coli*, puede llevarse a cabo una reacción colorimétrica que puede ser cuantificada espectrofotométricamente; esta reacción ocurre por la capacidad de la enzima de catalizar el cambio del sustrato rojo de fenol β -D-galactopyranosida. La cantidad de la enzima presente es directamente proporcional al número de parásitos, permitiendo así medir en forma exacta, rápida y fácil los parásitos, así como evaluar la actividad de diferentes medicamentos contra *T. cruzi* (10, 11).

Este estudio se propuso como parte de un proyecto del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) para evaluar el ensayo, colorimétrico utilizando la cepa de *T. cruzi* que expresa la enzima β -galactosidasa de *Escherichia coli*, que permita la cuantificación de la actividad del extracto de plantas en una forma objetiva. Así como también se evaluó cuatro plantas con sospecha de actividad contra *T. cruzi* (*Rhizophora mangle*, *Baccharis trinervis*, *Miconia glaberrima*, y *Smilax domingensis*) y tres plantas que no se conocía su actividad contra *T. cruzi*, escogidas al azar (*Styrax conterminus*, *Ardisia densiflora* y *Quercus crispifolia*). Los datos obtenidos se compararon con los obtenidos en el ensayo manual por conteo directo; además, se estandarizó la técnica colorimétrica para su uso rutinario en el Departamento de Citohistología en futuros proyectos de investigación.

III. ANTECEDENTES

A. Descripción de la enfermedad de Chagas

La Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas, es una zoonosis causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*. Es una enfermedad tropical típica, siendo una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en los países endémicos de América Latina (1).

La fase aguda de la enfermedad generalmente es inadvertida o bien la sintomatología que se observa es bastante inespecífica. Sin embargo, se han reportado menos de un 5% de casos fatales. La diseminación sistémica del parásito desde el sitio de entrada, se inicia con la multiplicación del parásito, la cual puede estar acompañada por fiebre, irritación y edema de la cara y extremidades inferiores, con linfadenopatía generalizada y hepatoesplenomegalia. El tejido muscular, incluyendo el corazón, se ha encontrado ligeramente paralizado y en una pequeña proporción de pacientes se ha observado una miocarditis severa. *T. cruzi* puede también invadir el sistema nervioso central y causar meningoencefalitis (2).

La fase aguda de la enfermedad se resuelve espontáneamente en un período de 4 a 6 semanas y los pacientes progresan a la fase indeterminada de la infección, en la cual no se observan síntomas pero se caracteriza por presentar un bajo grado de parasitemia y gran cantidad de anticuerpos contra los antígenos de *T. cruzi*. Durante esta fase algunas personas presentan signos subclínicos cardíacos o gastrointestinales (2).

Aproximadamente el 10 al 30 por ciento de las personas en fase indeterminada, evoluciona a la fase crónica, siendo el corazón el órgano que con mayor frecuencia es afectado. Entre los cambios patológicos que se observan se encuentra un alargamiento ventricular, adelgazamiento de sus paredes y un aneurisma atípico. En tinciones del tejido cardíaco, se observa la diseminación de infiltraciones linfocíticas, como una fibrosis intersticial difusa y atrofia de las células miocárdicas. El sistema de conducción es afectado por un bloqueo fascicular anterior o un bloqueo atrioventricular completo (12, 13). Los síntomas que se reflejan son arritmias, cardiopatías y tromboembolismo. La muerte usualmente resulta por los disturbios del ritmo o fallas congestivas del corazón. El megaesófago, megacolon o ambos, se encuentran asociados a pacientes con disfagia, regurgitación, aspiración

repetida y constipación severa. La patogénesis de estas lesiones cardíacas y gastrointestinales que se asocian con la infección crónica por *T. cruzi* es aún poco entendida (2, 14).

B. Agente etiológico

El *Trypanosoma cruzi* pertenece al subfilo *Mastigophora* del filo *Sarcomastigophora*, orden *Kinetoplastida*, que se compone de organismos flagelados con un quinetoplasto, una organela localizada en la mitocondria de la célula que contiene una red fibrosa de ácido desoxiribonucleico (ADN). Estos parásitos pueden aislarse por xenodiagnóstico, cultivo sanguíneo y por inoculación en ratones (1).

Este parásito presenta tres diferentes estadios los cuales son identificados por la posición del quinetoplasto con relación al núcleo y por el lugar de donde emerge el flagelo; a su vez, los estadios están relacionados con el ciclo de vida del parásito que incluye vector y hospederos vertebrados (1, 15).

El estadio de tripomastigote se encuentra en los hospederos vertebrados y se caracteriza por un quinetoplasto que se localiza en el extremo posterior del parásito y detrás del núcleo; el flagelo emerge de la bolsa flagelar que se localiza cerca del quinetoplasto. Mide de 15-20 μm de largo y representa un estadio infectivo no multiplicativo (1, 15).

En el epimastigote (estadio presente en el insecto vector), tanto el quinetoplasto como la bolsa flagelar se localizan en posición anterior al núcleo; son organismos fusiformes de unos 20 μm de largo que se reproducen por fisión binaria (1, 15). Los tripomastigotes son de aproximadamente 20 μm de largo y generalmente en frotis sanguíneos se les observa en forma de U o C en cultivo. Pueden ser almacenados por criopreservación (-70 a -196°C) (1).

La identificación es relativamente fácil a través de criterios morfológicos y biológicos, excepto para distinguir de *Trypanosoma rangeli* (1).

El último estadio es el amastigote el cual presenta una forma redondeada con núcleo, quinetoplasto y un flagelo muy corto apenas visible por microscopía. En esta fase la multiplicación es intracelular en el hospedero (1, 15).

El ciclo de vida empieza cuando los triatomíneos adquieren el parásito succionando sangre de vertebrados infectados; los tripanosomas ingresan al vector en el estadio de tripomastigotes convirtiéndose luego en epimastigotes cortos, los cuales a su vez se reproducen por división binaria y evolucionan a formas largas que se alojan en la parte posterior del intestino medio. Aproximadamente

8-10 días después aparecen en su estadio de tripomastigote metacíclico, que se encuentra en las heces de los triatomíneos, en el momento que las chinches succionan sangre, defecan y las heces ingresan en la persona debido a la reacción alérgica que provoca la saliva del insecto. El tripomastigote invade gran cantidad de células entre ellas: sistema retículo-endotelial, células de la glia, musculares, endoteliales, neuronas, fibroblastos, adipositos; y un gran tropismo por células del tejido cardíaco. Una vez los tripomastigotes entran en la célula se transforman en amastigote y se multiplican hasta llenarla, luego se diferencian en tripomastigotes y rompen la célula y así quedan libres para infectar otras células o alcanzar la circulación sanguínea (1, 15, 16).

La forma de transmisión a seres humanos es a través de las heces de los insectos triatomíneos infectados. Puede ocurrir también por transfusión sanguínea, específicamente en las zonas urbanas, por la presencia de migrantes que han pasado sus primeros años de vida en zonas endémicas. Otras de las formas de transmisión son la congénita, por lactancia materna, infección accidental en el laboratorio, transmisión oral, y por trasplante de órganos (2).

En el año de 1994, el Proyecto "Parasite Genome" realizado en Río de Janeiro decidió seleccionar como cepa de referencia la clona CL Brener de *T. cruzi*, por sus características biológicas: (a) Los tripomastigotes infectan cultivos celulares de mamíferos y desarrollan su ciclo completamente intracelular a 33 y 37°C; (b) las formas sanguíneas son altamente infecciosas para ratones; (c) las formas sanguíneas son susceptibles a nifurtimox y benzonidazol; (d) presenta tropismo por células musculares cardíacas (e) muestra una clara fase aguda en humanos accidentalmente infectados (17).

En la búsqueda de compuestos activos anti-*T. cruzi*, se ha utilizado la metodología por conteo directo; la cual involucra un trabajo intenso debido al conteo de los parásitos en cámara de Neubauer para determinar la actividad de diferentes compuestos. Buckner y colaboradores modificaron genéticamente cepas de *T. cruzi* para expresar la enzima β -galactosidasa proveniente del gen *lacZ* de *Escherichia coli*. Esta enzima es capaz de catalizar la reacción del sustrato rojo de cloro fenol β -galactopiranosido, evidenciando el cambio de color del sustrato amarillo a rojo; cambio que puede ser registrado espectrofotométricamente. La actividad de la β -galactosidasa es directamente proporcional a el número de parásitos en cada pozo, por lo que permite cuantificarlos fácilmente en micro placas de 96 pozos y así realizar una búsqueda rápida y eficiente de compuestos activos anti-*T. cruzi* (11).

C. Vectores

Estos insectos se clasifican en el Orden *Hemiptera*, Familia *Reduviidae*, Subfamilia *Triatominae*, siendo las especies mayormente implicadas el *Triatoma dimidiata*, *Triatoma nitida*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus* y *Rhodnius prolixus* (1).

Casi todas las especies triatomíneas se limitan a las regiones neotropicales y neoárticas, encontrándose algunas de ellas en ambas regiones. Estos insectos triatomíneos han sido infectados naturalmente con *Trypanosoma cruzi* (1).

Esta familia se distingue de la mayoría de los demás hemípteros por poseer una proboscide de tres segmentos. El género *Rhodnius* se diferencia de los demás géneros de triatomíneos por su cabeza alargada, con antenas en la parte delantera, cerca del clipeo. El género *Triatoma*, posee una cabeza de longitud intermedia y las antenas se insertan en el punto medio entre los ojos y el clipeo (1, 18).

La principal característica biológica de los triatomíneos es la de succionar sangre en un sólo ambiente, y esto implica tanto a las ninfas como a los adultos de ambos sexos. De ahí que sus hábitats naturales sean los ecotopos silvestres que sirven como nidos, refugios para los mamíferos, aves y reptiles, donde los triatomíneos viven en fácil contacto con los vertebrados, los cuales constituyen sus fuentes naturales de alimentación de sangre. Debido a la destrucción de los hábitats naturales, algunas especies de triatomíneos ocuparon ambientes peridomésticos y domiciliarios, por lo que se crearon nuevas condiciones epidemiológicas que involucran a los seres humanos, convirtiendo a la asociación natural del *T. cruzi* y los triatomíneos en una verdadera antropozoonosis (18, 19).

D. Diagnóstico de Laboratorio

Debido a que los hallazgos clínicos de la enfermedad de Chagas no son específicos, los estudios parasitológicos o serológicos son de gran importancia para establecer el diagnóstico. El diagnóstico de la enfermedad en su fase aguda se realiza por la detección del parásito en frotis sanguíneos y la positividad en las diferentes pruebas serológicas que permiten la detección de anticuerpos tanto de tipo IgG como IgM (20). Las formas activas de *T. cruzi* pueden ser demostradas a través del examen microscópico de sangre con anticoagulante por medio de tinciones de Giemsa o por métodos de concentración, observando en fresco la capa de glóbulos blancos. En pacientes inmunosuprimidos, puede observarse los parásitos en el análisis de la médula ósea, líquido cerebroespinal y líquidos pericardiales (21).

El diagnóstico de la infección de *T. cruzi* se realiza por la detección de anticuerpos específicos contra los antígenos del parásito. Los estudios parasitológicos son dificultosos, requieren de una gran cantidad de sangre (> 50 ml) y el resultado puede obtenerse hasta después de 5 meses de incubación; por estas razones raramente son solicitados. Para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* se han utilizado un gran número de pruebas que varían en su sensibilidad y especificidad, entre las que se encuentran la fijación del complemento, hemaglutinación indirecta, inmunofluorescencia indirecta y

por ensayos inmunoenzimáticos. Reacciones falsamente positivas son típicas en sueros de personas con leishmaniasis, malaria, sífilis, enfermedad vascular de la colágena y otros daños. Por lo tanto, es recomendado que las muestras de pacientes con una prueba positiva, se confirmen por lo menos con dos metodologías diferentes, antes de ser interpretados como positivos (22).

Hasta la fecha únicamente una prueba para anticuerpos contra *T. cruzi* ha sido aceptada por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) la cual es una prueba elaborada por Gull Laboratories de Salt Lake City, que por medio de la técnica de ELISA detecta anticuerpos IgG. Sin embargo, esta prueba es aceptada únicamente para el estudio y diagnóstico clínico pero no en el tamizaje de donadores en los bancos de sangre, debido a su baja sensibilidad (23, 24).

E. Epidemiología

T. cruzi ha sido encontrado únicamente en el Hemisferio occidental, encontrándose infectados principalmente animales salvajes, domésticos e insectos. Se encuentra distribuido desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Argentina, se estima que aproximadamente mueren 30,000 personas anualmente y que 16 a 18 millones de personas se encuentran infectadas en fase crónica; esta alta proporción se debe a las migraciones de áreas rurales endémicas (1).

Nuevas infecciones de *T. cruzi* ocurren en las áreas rurales, principalmente en niños, pero la mayoría de ellos no tienen un diagnóstico de la enfermedad, debido a los síntomas inespecíficos que presentan y la falta de accesibilidad a servicios de salud (1, 16).

Los estudios realizados por el Ministerio de Salud y Asistencia Social de Guatemala, en los años 1950-3 permitieron definir la zona endémica del país, la que incluyó a los departamentos de Chiquimula, El Progreso, Zacapa, Santa Rosa, Jutiapa y Jalapa, siendo los principales vectores *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* y *Triatoma nitida*. Posteriormente, en el estudio realizado por el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de 1984-87 se confirmó una seropositividad del 12.6% (25, 26, 27).

F. Tratamiento

Desafortunadamente, este parásito no es susceptible a una gran lista de drogas, a la fecha el tratamiento que se utiliza durante la infección aguda de *T. cruzi* es la administración de dos derivados imidazólicos: el benzonidazole (un derivado de nitroimidazole) y el nifurtimox (un derivado del nitrofurán), sin embargo los resultados obtenidos a la fecha no han sido satisfactorios ya que estos son efectivos únicamente en el estadio agudo o cuando el parásito se encuentra circulante. Por otro lado, ambos producen una gran cantidad de efectos secundarios, tales como problemas gastrointestinales

(que incluyen dolor abdominal, náuseas, vómitos, anorexia y pérdida de peso), y problemas a nivel neurológico (insomnio, mareos y parestesias), lo que ocasiona que los pacientes suspendan el tratamiento. Todos estos síntomas desaparecen en el momento en que la dosis se reduce o discontinúa (2, 10, 11, 24, 28, 29, 30).

Durante la fase indeterminada o crónica de la enfermedad, se ha debatido sobre la utilización del nifurtimox o benznidazol como tratamiento (30).

Además se han utilizado drogas como el itraconazole, fluconazole y alopurinol, pero con resultados menos exitosos que los tratamientos de elección, durante la infección aguda por *T. cruzi* (30).

Una posibilidad para el tratamiento de la enfermedad de Chagas podría ser el uso de extractos de plantas. A la fecha existen diversos trabajos que a través de la etnobotánica o la bioprospección utilizan productos de origen natural como potenciales agentes quimioterapéuticos contra la infección por *T. cruzi* (30).

La etnobotánica es el conocimiento sobre las prácticas tradicionales de curación y agricultura. Sin embargo es un recurso que no se ha aprovechado, debido a su transmisión oral limitada, donde no existe una metodología consistente, ni el recurso humano y financiero disponible, por lo que es difícil plasmar el conocimiento en documentos confiables y accesibles a la población (3).

Mientras que la bioprospección se refiere a la búsqueda sistemática de nuevas fuentes de compuestos químicos, genes, proteínas, microorganismos y otros productos que posean valor comercial potencial y que pueden encontrarse en la riqueza biológica natural, acortando el camino y los costos en la identificación de principios activos básicos existentes en los organismos vivos; así, esos compuestos y moléculas pueden terminar transformados, por ejemplo, en fármacos. El proceso de bioprospección involucra la localización, descripción detallada y recolección de especies que son sometidas a procesos de extracción, separación y ensayos biológicos para detectar una actividad determinada (4).

En 1987, Cavin *et al.* probaron *in vitro* la actividad de alcaloides derivados de plantas contra epimastigotes de *T. cruzi*, diez de estos redujeron significativamente el crecimiento del parásito a una dosis de 50 µg/ml (31). En 1990, González *et al.* evaluaron la actividad de compuestos aislados y extractos crudos de vegetales autóctonos de Chile y observaron una marcada actividad tripanocida en los extractos de *Baccharis boliviensis*, *Gelidium pusillum* y *Miroglia grandis* (32).

En Guatemala, Cáceres y colaboradores por medio del estudio de la etnobotánica y la bioprospección ha recabado información para la equiparación y uso oficial de medicamentos fitoterapéuticos a través de su validación científica e integración a los sistemas oficiales de salud (3).

Cáceres, y colaboradores en 1998 realizaron un estudio con 13 plantas de estudios etnobotánicos, nativas de Guatemala utilizadas en el tratamiento contra infecciones por protozoos, para evaluar su actividad *in vitro* contra epimastigotes, tripomastigotes e *in vivo* contra tripomastigotes de *T. cruzi*. De las plantas 5 presentaron actividad contra *T. cruzi in vivo y/o in vitro*. Los extractos con actividad fueron *Neurolaena lobata*, *Solanum americanum*, *Acalypha guatemalensis*, *Petiveria alliacea* y *Tridax procumbens* (9).

Durante el mismo año Berger y colaboradores utilizaron 5 extractos de plantas usadas popularmente en Guatemala contra infecciones por protozoos. En el estudio sólo las fracciones hexánicas y etanólicas de *N. lobata* demostraron actividad contra epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*, mientras que las fracciones hexánicas de *Petiveria alliacea*, *T. procumbens* y la fracción etanólica de *Byrsonima crassifolia* sólo mostraron una fuerte actividad contra tripomastigotes. Las fracciones de *Gliricidia sepium* no mostraron ninguna actividad tripanocida (8).

G. Plantas del Estudio

1. *Neurolaena lobata* (Tres puntas)

- a. Familia: *Asteraceae*.
- b. Procedencia para el estudio: Etnobotánica.
- c. Descripción botánica y hábitat:

Hierba erecta, 1-4 m de alto, poco ramificada; tallos estriados, sulcados, pubescentes. Hojas corto-pecioladas o sésiles, glabras, alternas, acuminadas o agudas a la base, 5-30 cm de largo, dentas escabroso-hirsutulosas en el haz, corto-pilosas al envés. Inflorescencia corimbosopaniculada, cabezuelas numerosas, pediceladas, discoides; involucre 5-6 mm; filarios 4 seriados, oblongos, 1-3 nervaduras, pálidos; corolas anaranjado-amarillas. Aquenios negros, glabros, 1-2 mm de largo; pappus uniseriado, cerdas 30 ó más, blanco amarillentos. Nativa del Sur de México a Panamá como maleza en plantaciones, lugares escarpados u orilla de caminos o ríos, en matorrales húmedos o bosques de encino, común crecimiento secundario, en terrenos cultivados y lugares abiertos; se distribuye de 0-

1,400 msnm. En Guatemala se ha descrito en Alta Verapaz, Chiquimula, Escuintla, Izabal, El Petén, El Progreso, Quetzaltenango, Retalhuleu, San Marcos, Santa Rosa y Suchitepéquez (33, 34).

d. Usos:

La infusión amarga de hojas es administrada por vía oral para el tratamiento de afecciones gastrointestinales (diarrea y cólico), diabetes, malaria y otros procesos febriles, gonorrea e inflamaciones (33).

Las hojas frescas machacadas se aplican tópicamente en picazones; el jugo es sobado en la piel como repelente de garrapatas; la infusión se aplica para sanar diversos tipos de heridas, lesiones y úlceras (33).

Se le atribuye propiedad antibiótica, antimalárica, aperitiva, carminativa, diurética, espasmolítica, febrífuga, hipoglicémica, hipotensora y tónica (33).

e. Propiedades y composición:

Estudios antimicrobianos demuestran que la tintura de hojas es activa contra bacterias (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. typhi*), hongos levaduriformes (*C. albicans*, *C. neoformans*) y filamentosos (*E. floccosum*, *M. gypseum*, *T. rubrum*). Los extractos alcohólicos (DE50= 25 mg/ml) son activos contra epimastigotes *in vitro* y contra tripomastigotes *in vitro* e *in vivo* de *T. cruzi* (4, 8, 9, 33).

En su composición química las hojas y tallos contienen un principio amargo constituido por sesquiterpenlactonas (germacranólidos), derivado del timol y 11 flavonoides: 5 derivados de quercetagenina, 4 kampferoles y dos leteolinas (8, 33).

2. *Lippia graveolens* (Orégano)

a. Familia: *Verbenaceae*.

b. Procedencia para el estudio: Etnobotánica.

c. Descripción botánica y hábitat:

Arbusto, hasta 3 m de altura, con tallos largos, delgados. Hojas opuestas, 1.5 a 7 cm de largo, 0.5 a 3.5 cm de ancho, el margen dentado, peluda en ambos lados. Flores blancas, tubular, de 3 a 6 mm de largo, en cabezuelas redondas u oblongadas, en grupos de 4 a 6 en las axilas de las hojas. Toda la planta tiene olor aromático (4, 35). Se encuentra en laderas rocosas o llanuras húmedas, 350 m o menos; Petén, Zacapa. Sur de Texas; México; Nicaragua (35).

d. Usos:

Se utiliza para espasmos e inflamaciones, para inducir la menstruación, antitusivo y expectorante (4).

e. Propiedades y Composición:

La tintura e infusión de las hojas es activa contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. flexneri*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *S. pyogenes*. Los extractos con diclorometano y etanol son activos contra *C. albicans*, *A. flavus*, *E. floccosum*, *M. gypseum* y *T. rubrum*. La concentración mínima inhibitoria (CIM) del extracto diclorometánico contra bacterias es 10 mg/ml y del etanol es 1.75 mg/ml; la CIM de la actividad contra *M. gypseum* es 2.5 mg/ml (4, 36).

El tamizaje fitoquímico demostró la composición de las hojas: aceite esencial (1.8%), glicósidos saponínicos, taninos y triterpenos, celulosa, pigmento y elementos minerales, además flavononas (pinocembrina, naringenina) y lapachenol; la corteza y raíz contienen glicósidos saponínicos, aceite esencial y taninos (4, 36).

3. *Solanum americanum* (Macuy)

a. Familia: *Solanaceae*.

b. Procedencia para el estudio: Etnobotánica.

c. Descripción botánica y hábitat:

Hierba de 1 m de alto, tallo pubescente. Hojas en pares o solitarias, 3-14 cm de largo lanceoladas, ápice agudo. Inflorescencia internodal, racemiforme, pedunculada, pocas flores. Flores en cálices de 1-2 mm, lóbulos ovalados, agudos; corola blanca, limbo partido, 5-8 mm de ancho, estilo 2.5-3.5 cm de largo, más largo que los estambres ovario globoso. Frutos globosos, negros al madurar, 4-8 mm de diámetro; semillas pequeñas. Planta nativa de América, crece en matorrales y sembradíos de

350-1,500 msnm. En Guatemala se ha descrito en alta Verapaz, Chimaltenango, Chiquimula, Escuintla, Guatemala, Huehuetenango, Jutiapa, Petén, Retalhuleu, Sacatepéquez, San Marcos, Santa Rosa, Suchitepéquez y Zacapa (34, 37).

d. Usos:

El cocimiento de las hojas y semillas, se administra por vía oral en afecciones gastrointestinales y respiratorias, anemia, cirrosis, dolor de muelas, escorbuto, presión alta, retención urinaria y reumatismo (37).

La decocción de hojas se usa por vía tópica para el tratamiento de afecciones dermatomucosas; el cataplasma de hojas frescas se usa para tratar erisipela. Los frutos se usan para tratar verrugas y madurar abscesos (37).

Se le atribuye propiedad calmante, depurativa, diurética, desinflamatoria, emoliente, febrícula, mineralizante, reconstituyente y sedante (37).

e. Propiedades y composición:

La decocción de hojas posee actividad antibiótica, contra *S. aureus*. La tintura de las hojas es activa contra *C. albicans* y *C. neoformans*. La decocción de hojas es activa contra los seis dermatofitos ensayados. La CIM es de 100-300 mg/ml, demostrándose actividad fungicida, el extracto hidroalcohólico es inactivo contra *A. fumigatus* (36, 37).

Su composición es compleja y poco estudiada. Contiene alcaloides como: solasodina, solasonina, glucoalcaloides y alcalinas (37).

4. *Rhizophora mangle* (Mangle)

a. Familia: *Rhizophoraceae*.

b. Procedencia para el estudio: Etnobotánica.

c. Descripción botánica y hábitat:

Árboles hasta 30 m o arbustos, depauperados y muy ramificados. Hojas 5-20 x 2-10 cm, elípticas, el ápice agudo; pecíolo 1-4 cm; estípulas 3-7 cm. Inflorescencias ramificadas

dicotómicamente 1-2 veces, rara vez 3 veces, o la primera ramificación tricotómica, o las flores solitarias. Pedúnculo 1.5-8 cm, laxo; pedicelos 6-23 mm; brácteas 2 o 3, 5-20 mm, connatas, los márgenes escariosos, el ápice agudo a anchamente agudo; bractéolas 2, 5-20 mm, connatas, los márgenes escariosos, el ápice agudo a anchamente agudo. Yemas floríferas 8-14 mm, ovoides a piriformes; sépalos 6-8 x 2.5-3.5 mm en las flores, 12-15 x 5-7 mm en los frutos, triangulares; pétalos 6-8 x 1-2 mm, caducos, glabros abaxialmente, vilosos adaxialmente; estambres 8, 4-6.5 mm, sésiles, apiculados; estilo c. 4 mm. Fruto 28-33 x 12-15 mm; hipocótilo 11-40 cm, recto o curvado. 2 $n = 36$. Zonas de marea, lagunas estuarinas y costeras, de aguas salobres (34, 38).

d. Usos:

Es una planta cuya aplicación terapéutica actual contra afecciones del aparato digestivo, dolor de garganta, lepra, sífilis y de la piel en la que se involucra un proceso infeccioso (38).

e. Propiedades y composición:

Se ha demostrado la actividad antibiótica de los extractos acuosos obtenidos de las hojas y el tallo sobre las bacterias *E. coli*, *B. subtilis*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa*, *S. lutea*, *S. aureus*, *M. havana*; y de los extractos alcohólicos de hojas y tallos sobre hongos *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. ochracei*, *A. niger*, *C. utilis*, *C. tropicalis* y *C. Echimulata* (38).

El cocimiento de la corteza tomado y usado externamente ha aliviado enfermos de lepra. Varias Observaciones clínicas realizadas a principios de siglo quedaron descritas en literatura, demuestran los beneficios de la planta en estos casos (38).

Al respecto de su composición química se tiene esta planta, de la hoja se ha extraído el componente fenólico ácido genticico, y de la corteza de los tallos, taninos. Se efectuó una prueba para detectar la presencia de alcaloides en el fruto como resultados negativos (37).

5. *Baccharis trinervis* (Hierba de Santo Domingo)

a. Familia: *Asteraceae*.

b. Procedencia para el estudio: Etnobotánica.

c. Descripción botánica y hábitat:

Usualmente arbustos densos de 3 m. de alto, erectos o algunas veces con ramificaciones de 5 m. y soportadas en otras plantas, con tallo estriado o angulado, usualmente glabrado, algunas veces sorvido-veloso o tomentoso, especialmente cuando es joven. Hojas subselides o con peciósos cortos menores de 1 cm. de largo, las láminas lanceoladas a elípticas, 5-10 cm. de largo, 0.5-3.5 cm. de ancho, comúnmente acuminada pero algunas veces aguda, cuneado de la base, triplinervado conspicuo, usualmente lustroso, márgenes enteros. El área de la inflorescencia es amplia, las cabezas sesiles o cortas, pediceleos pilosos, dispuestos cortamente, panicelos densos al final de las ramificaciones; filiales de 4-5 series, ovalada a oblongada-lanceolada, aguda o obtusa, erosa, palo amarillento a verdoso, con una ligera sombra, los márgenes escarisos, ciliados; aquenios pilosos (34).

Es una planta común en bosques de pinos, espesuras de 0-2200 msnm. Crece en Guatemala (Alta Verapaz, Baja Verapaz, Izabal, Zacapa, Jalapa, Jutiapa, Petén, Quetzaltenango, Quiché, Santa Rosa, Sololá, Suchitepéquez y Sacatepéquez), Sur de México, del Salvador a Panamá y las partes tropicales de Sur América (34).

d. Usos:

Los extractos acuosos son utilizados como: analgésico, antihelmintico, antiácido, antihepatotóxico, antiinflamatorio, antioxidante, antiulcerogénico, antiviral, depurativo, digestivo, diurético, gastrotónico, protector hepático, hipoglucémico y laxante (36).

e. Propiedades y composición:

El extracto acuoso presenta una débil actividad antiviral al virus Herpes simplex 1. La fracción clorofórmica tiene una débil actividad contra *C. albicans*. Para la actividad antitripanosoma utilizando una concentración 2.5 mg/ml del extrato etanólico es inactivo contra *T. cruzi* (36).

Dentro de su composición encontramos: diterpenos (trineracetal), flavinoides, saponinas (tipo inespecíficas o hemolíticas) y taninos (36).

6. *Miconia glaberrima* (Uva)

a. Familia: *Melastomataceae*

b. Procedencia para el estudio: Bioprospección

c. Descripción botánica y hábitat:

Arbusto o árbol pequeño de algunos 8 metros de altura. Usualmente, glabroso por todo o casi todo, las ramas delgadas, tetrágonos obtusos; hojas membranosas o muchas veces gruesas y firmes, verde seco o verde amarillento, encima pétalos de 1-3.5 cm. De largo, elípticos-oblongos o lanceolados-oblongos, principalmente de 8-14 cm. De largo y 2.5-5 cm de ancho, acuminadas o largas-acuminadas, a menudo abruptamente así. Principalmente agudo a la base, con nervios adicionales débiles cerca del margen. Los nervios internos que a veces se levantan ligeramente sobre la base de la hoja pero normalmente basal o casi así, entero o esencialmente así. Panicles piramidales, principalmente 5-7 cm de largo; pedúnculo-corto, libremente echando ramas, muy florecido, las flores principalmente el pedículo, hipanthium hemisférico, glabroso, 1.5 mm de largo; los sépalos diminutos; pétalos blanco o raramente teñido con rosa, 1 mm de largo; el estilo 1-3 mm de largo; bayas pequeñas, blanco o a veces teñido con púrpura o por rosa (34).

Crece en bosques húmedos y a veces en bosques de pino. Se encuentra en alta Verapaz, Zacapa, El Progreso, Quiché, Huehuetanango, Quetzaltenango, San Marcos, Guatemala, Sur de México, El Salvador, Costa Rica y Panamá (34).

d. Usos, Propiedades y Composición:

De acuerdo a la revisión en la base de datos NAPRALERT no se reporta ninguna información (36).

7. *Smilax domingensis* (Zarzaparrilla)

a. Familia: *Smilacaceae*.

b. Procedencia para el estudio: Bioprospección.

c. Descripción botánica y hábitat:

Glabras completamente. Tallos teretes, escasamente armados en la parte inferior con agujones robustos recurvados, inermes en la parte superior. Hojas 6-15 x 1.5-10 cm, 1.4-6 veces más largas que anchas, ovadas, lanceolado-ovadas, o lanceoladas, cartáceas, inermes, 5-nervias desde la base, las nervaduras primarias prominentes en el envés, no impresas en el haz, el par exterior submarginal, las nervaduras secundarias conspicuas, algo prominentes, reticuladas, el ápice brevemente acuminado o breviscuspidado, la base aguda, el margen entero; pecíolos 0.5-2 cm. Umbelas estaminadas solitarias;

pedúnculo 1-5 mm, más corto que el pecíolo subyacente, terete o algo aplanado. Umbelas pistiladas solitarias; pedúnculo 1-5 mm, más corto que el pecíolo subyacente, subterete. Tépalos de las flores estaminadas 4-6 mm; filamentos 2-4 mm, anteras 1-2 mm. Tépalos de la flores pistiladas, c. 4 mm. Bayas 7-10 mm, rojas purpúreas o negras (38).

Es una planta común en los terrenos pedregosos de las montañas y colinas calcáreas de todas las provincias. Crece a alturas de 0-2100 msnm. Crece en Puerto Rico, Jamaica, Haití, Santo Domingo, México, Honduras, Salvador, Costa Rica, Panamá y Guatemala (Alta Verapaz, Baja Verapaz, Izabal, Zacapa, Escuintla, Sacatepéquez) (34).

d. Usos:

El cocimiento del rizoma se usa como depurativo, sudorífico. Grosourdy le atribuye propiedad antihemorrágica, sudorífica, antiasmática y antiherpética. Se emplea contra diversas manifestaciones de la sífilis, afecciones de origen reumático y enfermedades de origen cutáneo. Se le considera un gran depurativo, se estima muy buena para la sangre y los riñones, se utiliza cuando hay picazón y dolor en la piel (30). Se emplea en afecciones gastrointestinales y nerviosas (31).

e. Propiedades y composición:

De acuerdo a la revisión en la base de datos NAPRALERT no se reporta ninguna información (36).

8. *Styrax conterminius* (Sin nombre común conocido)

a. Familia: *Styracaceae*.

b. Procedencia para el estudio: Bioprospección.

c. Descripción botánica y hábitat

Árbol de 7 a 10 m, las ramas escamosas, hojas en pecíolos de 1.5 cm de longitud, oblongadas, 12 a 13 cm de longitud, 4 a 4.5 cm de ancho, acuminadas, cuneadas, agudas en la base, coriáceas, enteras, lepidotas esparcidas, superficie más o menos ampollas, 9 a 10 pares de nervios laterales, inflorescencia racemosa, 4 a 5 cm de longitud, 3 a 5 flores, los pedicelos 7 a 15 cm de longitud, cáliz 4 mm de longitud y 5 mm de ancho, densamente escamosa, las escamas orbiculares sujetas por el centro,

el margen del cáliz truncado, el tubo de la corola 3 mm de longitud, los lóbulos de 11 mm de longitud, lepidotas estrelladas en el exterior. Ovario de lepidotas amarillentas, muchos óvulos en 3 celdas. Bosque húmedo, frecuentemente en lugares rocosos a lo largo de arroyos, a alturas de 1800 a 2500 msnm.; Zacapa, Quiché, Huehuetenango, México (Chiapas), El Salvador (39).

d. Usos, Propiedades y Composición:

De acuerdo a la revisión en la base de datos NAPRALERT no se reporta ninguna información (36).

9. *Ardisia densiflora* (Sin nombre común conocido)

- a. Familia: *Myrsinaceae*
- b. Procedencia para el estudio: Bioprospección
- c. Descripción botánica y hábitat:

Árbol o arbusto, de unos 25 cm. de diámetro y 12 m. de alto, ramificaciones gruesas; los internodos terminales son ferruginosos-tomentosos con tomento cerrado, cerca del quiebre de la glabra; el capullo de la hoja es ferruginoso-tomentoso; las hojas gruesas poseen pecíolos marginados usualmente menores a 1 cm. de largo; el filo de la hoja es oval a elíptico, 7-20 cm. de largo, 2.5-8 mm. de ancho, ápice obtuso, algunas veces agudo, base aguda y decurrente, entero, glabro, coriáceo o subcoriáceo, seco pálido, se eleva desde abajo; inflorescencia terminal, espicada-paniculada, arriba de 15 mm. de largo, 2-3 pinnadas, separadas, ferruginosas-tomentosas desde el principio; flores sésiles o subsésiles, los pedicelos no mayores de 6 mm.; flores 5-6 mm. de largo, casi libres de la base, anchas, ovales o suborbicular 1.7-2.4 mm. de largo, ápice redondeado, ciliado, coriáceo, rugoso, márgenes separados, glabra-lepidota desde la base; pétalos oblongados 5-5.5 cm. de largo, unidos de la base, tubo cerca de 2 mm. de largo, ápice redondeado, linear, glandular, lepidota; anteras ovaladas-trianguulares, agudas o apiculadas; ovarios glabros; estambre arriba de 6 mm de largo, numerosos óvulos; frutas subglobosas, secas, de 6-7 mm. de ancho y de color negro (34).

Generalmente se encuentra en bosques secos, algunas veces en lugares pantanosos o bosques de pinos, usualmente crece a alturas menores de 1,800 msnm; En Guatemala se encuentra en Peten y Zacapa; en México (Veracruz, Oaxaca y Chiapas) y Honduras (34).

d. Usos, Propiedades y composición:

De acuerdo a la revisión realizada en la base de datos NAPRALERT no se reporta información (36).

10. *Quercus crispifolia* (Encino)

- a. Familia: *Fagaceae*.
- b. Procedencia para el estudio: Bioprospección.
- c. Descripción botánica y hábitat:

Árbol grande o mediano, ramal de 1-3 mm de grosor, laxamente tomentoso fulvoso-estrellado al principio, luego es glabra y pardo-rojizo o grisáceo, con prominentes o inconspicuas lentecelas; brotes de 5-6 mm de largo, oblongos-fusiformes, agudos, de color pardo claro, glabros; hojas angostas pero duras pueden ser coriáceas, de 10 a usualmente 15-20 o raramente 25 cm de largo, 3-5 en ocasiones 7.5 cm de ancho, oval-linear lanceoladas, acuminadas a atenuadas o flageladas, de base cuneiforme a estrechamente redondeada, o sucordada, entera, el haz un poco lustroso, glabro o con tricomas estrellados en la base del nervio principal, el envés similar, usualmente un poco más conspicua la pubescencia estrellada a lo largo de la base del nervio principal, los nervios laterales de 15-20 en cada lado, peciolos de 5 o raramente 10 mm de largo; rojo oscuro en la base, laxamente tomentoso fuvuloso casi glabro; frutos bienales, bellota ovoide de 25-30 mm de largo y 22-26 mm de ancho, parda, puberulenta, incluida sólo en la base (34).

Se localiza usualmente en Chiapas, El Salvador y Guatemala (Alta Verapaz, Chiquimula, Jalapa, San Marcos). Crece en bosques húmedos o mojados, mixtos, montañosos a 1,300-2700 msnm (34).

- d. Usos, Propiedades y composición:

De acuerdo a la revisión realizada en la base de datos NAPRALERT no se reporta información (36).

IV. JUSTIFICACIÓN

La enfermedad de Chagas es una enfermedad endémica en gran parte de Latinoamérica. Para su tratamiento se han utilizado medicamentos como el Nifurtimox, Benzonidazol, Alopurinol y otros, los que tienen gran diversidad de efectos secundarios, deben de utilizarse por un tiempo prolongado y son útiles únicamente en la fase aguda de la enfermedad. Por ello se considera necesario desarrollar nuevos tratamientos alternativos a los ya existentes, entre ellos el uso de extractos de plantas que ofrecen ser una buena alternativa, ya que por estudios etnobotánicos o de bioprospección, han sido considerados como elementos potencialmente útiles en el tratamiento de esta enfermedad. Por lo anterior, es evidente la necesidad de evaluar estas plantas por metodologías más rápidas y sensibles para confirmar su actividad tripanocida.

Por estas razones, varios investigadores han realizado pruebas en la búsqueda de nuevos medicamentos. En Guatemala, estudios realizados por Cáceres y colaboradores han sugerido el uso de extractos vegetales como una alternativa en el tratamiento de esta infección. A la fecha han evaluado la actividad antiparasitaria de por lo menos sesenta plantas de uso medicinal, de las cuales 12 han demostrado actividad contra *T. cruzi*.

Para la evaluación de la actividad antiparasitaria de diferentes extractos de plantas, se ha utilizado una metodología en la cual la cantidad de parásitos se determina por un conteo manual en cámara de Neubauer, procedimiento que requiere de mucho tiempo, además de estar sujeto a errores del investigador. Como parte de un proyecto del Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), se desarrolló un método, utilizando la cepa de *T. cruzi* que expresa el gen β -galactosidasa de *Escherichia coli*, que permite la cuantificación de la actividad del extracto de

plantas en una forma objetiva, por lo que permitió validar dicha metodología y estandarizarla para su uso rutinario en el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia en futuros proyectos de investigación.

V. OBJETIVOS

A. General

1. Evaluar la metodología colorimétrica establecida por el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), para el tamizaje de la actividad anti-*Trypanosoma cruzi* en productos naturales, utilizando la cepa *T. cruzi* que expresa el gen β -galactosidasa de *Escherichia coli*.

B. Específicos

1. Comparar la metodología colorimétrica, para evaluar la actividad anti-*T. cruzi* con el conteo directo en cámara de Neubauer utilizando el estadio de epimastigote y tripomastigote.
2. Determinar ventajas y desventajas de la metodología colorimétrica para evaluar la actividad anti-*T. cruzi*.
3. Determinar la actividad anti-*T. cruzi* de 3 plantas escogidas al azar (*Styrax conterminus*, *Ardisia densiflora* y *Quercus crispifolia*).
4. Determinar la actividad anti-*T. cruzi* de 4 plantas con sospecha de actividad (*Rhizophora mangle*, *Smilax domingensis*, *Baccharis trinervis* y *Miconia glaberrima*).

VI. HIPÓTESIS

La metodología colorimétrica utilizando la cepa *T. cruzi* que expresa el gen β -galactosidasa de *Escherichia coli* puede utilizarse para demostrar la actividad anti-*T. cruzi* de los productos naturales.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de Trabajo:

Metodología colorimétrica y metodología por conteo directo en cámara de Neubauer, para evaluar la actividad de productos naturales contra epimastigotes y tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

B. Recursos:

1. Recursos humanos:

- ◆ Investigador: Br. Adolfo Pérez
- ◆ Asesores: M. Sc. Vivian Matta Ríos
Licda. María Paula de León
- ◆ Colaboradores: Lic. Armando Cáceres
Licda. Margarita Paz

2. Recursos Físicos

- ◆ Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.
- ◆ Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas (IIQB).
- ◆ Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED).

C. Materiales y Equipo:

1. Equipo:

- ◆ Microscopio invertido
- ◆ Lector ELISA
- ◆ Centrífuga
- ◆ Microscopio de luz

- ◆ Refrigerador
- ◆ Incubadora a 27°C y 37°C
- ◆ Autoclave
- ◆ Agitador automático
- ◆ Pipetas automáticas (0.5-10, 10-100, 40-200 y 200-1000 µl)
- ◆ Pipetas multicanales
- ◆ Gradillas
- ◆ Campana de flujo laminar

2. Reactivos:

- ◆ Medio de cultivo Liver Infusion Tryptose (LIT) (Anexo No. 1)
- ◆ Medio de cultivo Minimum Essential Medium Eagle (MEM) (Anexo No. 2)
- ◆ Dimetil Sulfoxido (DMSO)
- ◆ Anfotericina B
- ◆ Nifurtimox
- ◆ Rojo-Cloro-Fenol-β-D-galactopiranosida (CPRG)
- ◆ Nonidet P-40 (NP-40)
- ◆ Suero de Bovino Fetal (FBS)
- ◆ Suero de Ternero Recién Nacido (NCS)
- ◆ Solución de Tripsina-EDTA (Anexo No. 3)
- ◆ Buffer de Fosfatos (PBS)
- ◆ PBS libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ (Anexo No. 4)

3. Material de Vidrio:

- ◆ Cámara de Neubauer
- ◆ Pipetas Pasteur
- ◆ Pipetas serológicas
- ◆ Portaobjetos
- ◆ Cubreobjetos
- ◆ Tubos de ensayo

4. Material:

- ◆ Viales de criogenización
- ◆ Microtubos Eppendorf

- ◆ Filtros 0.22 μm
- ◆ Tips (amarillos y azules)
- ◆ Micro-placas de fondo plano
- ◆ Flask para cultivo celular
- ◆ Fibra de vidrio
- ◆ Cinta testigo
- ◆ Papel aluminio
- ◆ Tubos para centrifugación
- ◆ Dispensador para pipetas multicanales
- ◆ Marcador permanente
- ◆ Parafilm

D. Metodología:

1. Actividad tripanocida *in vitro* utilizando epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*

a. Cultivo de epimastigotes de *T. cruzi*

- ◆ Se descongeló rápidamente a temperatura ambiente un vial conteniendo la cepa de *T. cruzi* (CL-Brener).
- ◆ Se lavó el criopreservado dos veces con PBS estéril, centrifugando a 3000 rpm por 10 min.
- ◆ Se lavó una vez con LIT y se pasó los parásitos a frascos de cultivo o tubos con medio LIT.
- ◆ Se incubó a 26°C. Los cultivos se revisaron cada 2 días contando en cámara de Neubauer el número de parásitos.
- ◆ Cuando se alcanzó un recuento de 1×10^7 parásitos/ml (lo cual se logró en aproximadamente una semana), se preparó subcultivos con una concentración 1×10^6 parásitos/ml en medio LIT, para poder realizar el ensayo *in vitro* (39).

b. Ensayo *in vitro* utilizando epimastigotes de *T. cruzi* (Conteo Directo)

- ◆ Se disolvieron 100 mg de los extractos apolares en 500 μl de DMSO (2 mg/dl).
- ◆ Se esterilizaron por filtración (0.22 μm). Los extractos solubles se disolvieron en agua destilada.
- ◆ Se mezclaron 10 μl de la solución de extracto con 990 μl de medio de cultivo LIT (2 mg/ml).
- ◆ Se pipeteó 100 μl de la solución de los extractos en cada uno de los pozos, se hizo por triplicado. Se agregó 100 μl de la suspensión de parásitos (1×10^6 parásitos/ml) a cada pozo (1:1).
- ◆ Como control positivo se usó una solución al 50 mg/ml de nifurtimox y como control negativo una solución al 0.5 % de DMSO en medio de cultivo LIT. Se incubó a 26°C por 48 horas.

- ◆ Se contó en cámara de Neubauer el número de parásitos de cada pozo.
- ◆ Interpretación de resultados: Se comparó el número de parásitos vivos en los pozos con extracto contra el control negativo (39).

c. Ensayo *in vitro* utilizando epimastigotes de *T. cruzi* (Ensayo Colorimétrico)

- ◆ Se tomó un tubo de cultivo de medio LIT de epimastigotes de la cepa CL-Brener con el gen *Lac Z* de *E. coli* que expresa la enzima β -galactosidasa (recombinante); la concentración de parásitos debía ser mayor o igual a 70,000 parásitos/ml.
- ◆ Se tomó una alícuota y se centrifugaron los parásitos por 15 minutos a 1,500 rpm. Se resuspendió el sedimento en medio LIT fresco.
- ◆ Se contó los parásitos utilizando un hemocitómetro y un microscopio. Cuando la población del cultivo axénico fue mayor de 70,000 parásitos/ml se realizaron los cálculos para establecer un cultivo con una población de 70,000 parásitos/ml diluyendo una alícuota del cultivo axénico con medio LIT con el volumen adecuado tantas veces fue necesario. Para desarrollar el ensayo se necesitó aproximadamente 10.5 ml de medio con parásitos por placa de 96 pozos.
- ◆ Se disolvieron 3 mg de extracto crudo en 75 μ l DMSO (dimetil sulfóxido) para obtener una concentración de 40 μ g/ μ l. Se utilizó un sonicador para ayudar a disolver los extractos.
- ◆ Se adicionó 592.5 μ l de medio LIT a otro vial estéril. Luego se adicionó 7.5 μ l del extracto crudo disuelto en DMSO cuya concentración es de 40 μ g/ μ l. Se agitó por 10 segundos en un vortex.
- ◆ Se tomó una micro-placa de fondo plano de 96 pozos y se rotuló con la fecha y el número de código de los extractos que se probaron en el bioensayo.
- ◆ Como control positivo, se utilizó medio LIT con anfotericina B a una concentración de 1.5 μ g/ml de. Se agregó 100 μ l de medio con una micropipeta a los pozos B1, B2, B3 y B4.
- ◆ Para el control negativo (medio LIT con DMSO) se adicionó 100 μ l de medio LIT a cada uno de los pozos C1, C2 y C3. Luego se adicionó 125 μ l de medio LIT con DMSO al 1.25% al pozo C4.
- ◆ Se transfirieron 25 μ l del pozo C4 al pozo C3. Se mezcló con la micropipeta y se tomó 25 μ l del pozo C3 y se transfirió al pozo C2. Se repitió la operación hasta el pozo C1. Se descartó los 25 μ l del último pozo B1.
- ◆ Se adicionó 100 μ l de medio LIT al resto de los pozos de la placa de 96 pozos, excepto en los pozos destinados para control positivo, control negativo y el control de color de los extractos correspondientes a la concentración final más alta del extracto (de 250 μ g/ml).
- ◆ Se adicionó 125 μ l de los extractos diluidos en medio LIT en los pozos que le corresponden a cada extracto destinado para la concentración más alta por triplicado y en los pozos destinados para el control del color de los extractos.

- ◆ Se realizó una dilución seriada del extracto. Se mezcló el primer pozo con la ayuda de la micropipeta y se tomó 25 μ l del primer pozo y se transfirieron al segundo pozo. Se realizó esto sucesivamente hasta el último pozo. Cada extracto se evaluó por triplicado.
- ◆ Se realizó la misma dilución en los pozos destinados para el control de la coloración del extracto.
- ◆ Se adicionó 100 μ l de medio LIT con parásitos con una población de aproximadamente 70,000 parásitos/ml a todos los pozos del ensayo excepto a los destinados al control del color del extracto.
- ◆ Se adicionó 100 μ l del medio LIT a los pozos destinados para el control de la coloración del extracto (D1 al D4, E1 al E4, F1 al F4 y G1 al G4).
- ◆ Se incubó la placa por 4 días a 28°C.
- ◆ Al final de la incubación se adicionó 25 μ l del sustrato Cloro-fenol-rojo- β -D-galactopiranoside (CPRG 100 μ M concentración final) junto con el detergente (NP-40 al 0.9% concentración final) en PBS con un pH 7.4 a cada pozo.
- ◆ Se incubó a 37°C por 7 horas.
- ◆ Se leyó las densidades óptica en un lector de microplacas Bio-Rad Benchmark utilizando un filtro de 570 nm (40).

2. **Actividad tripanocida *in vitro* utilizando tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* cultivados en línea celular**

a. **Cultivo de línea celular FLC (Feeder Layer Cells) a partir de descongelamiento:**

- ◆ Se descongeló un vial con FLC rápidamente a 37°C. Se lavó con medio de cultivo MEM sin suero centrifugando a 1000 rpm por 5 min.
- ◆ Se agregó 5 ml de MEM_{FBS} y se puso en frascos de 25 cm² moviendo suavemente para lograr una distribución homogénea de las células sobre el fondo del frasco.
- ◆ Se incubó a 37°C hasta que los fibroblastos estén pegados en el frasco formando una cubierta en el fondo.
- ◆ Se observó al día siguiente si las células se adhirieron a la superficie del frasco.
- ◆ Si el medio de cultivo cambió a color amarillo se cambió por nuevo medio completo (39).

b. **Subcultivo de línea celular FLC (Feeder Layer Cells)**

- ◆ Se descartó el medio de cultivo de los frascos y se lavó la superficie de las células con 5 ml de PBS libre de iones calcio y magnesio; se descartó el PBS.
- ◆ Se repitió el paso anterior una vez más. Es importante que las células queden bien lavadas y sin suero bovino fetal, ya que éste inhibe la acción de la tripsina.

- ◆ Se agregó de 0.5 - 1 ml de solución de tripsina-EDTA a las células, se cerraron los frascos. Se movieron suavemente (en posición horizontal) los frascos, para permitir que toda la superficie de la capa celular se ponga en contacto con la tripsina.
- ◆ Se incubó los frascos con tripsina a 37°C por 5 minutos. Si se observó desprendimiento de las células en menos tiempo, se continuó con adición del medio.
- ◆ Mientras la tripsinización se llevó a cabo, se prepararon nuevos frascos estériles para realizar los subcultivos.
- ◆ Una vez se observó el desprendimiento de las células, se agregó inmediatamente al frasco 15 ml de MEM_{FBS}. Se mezcló varias veces con la pipeta tratando de que el medio humedeciera toda la superficie del frasco y así parar la acción de la tripsina.
- ◆ Se dividió los 15 ml en subcultivos de 5 ml por frasco. Se colocó los frascos en posición horizontal, se movieron suavemente para que las células se distribuyeran homogéneas sobre la superficie del frasco.
- ◆ Se incubó a 37°C y se observó al siguiente día si los nuevos subcultivos se adhirieron al frasco.
- ◆ Se cambió medio cuando se observó que estuviera amarillo (39).

c. Cultivo de tripomastigotes de *T. cruzi* en FLC

- ◆ Se descartó del cultivo de fibroblastos (FLC) el medio MEM_{FBS}.
- ◆ Se agregó a los frascos con FLC 10 ml de medio MEM suplementado con Suero de Ternero Recién Nacido (NCS).
- ◆ Se agregó a los frascos con MEM_{NCS} epimastigotes de la cepa recombinante y se incubó a 37°C.
- ◆ Se observó en los frascos (usando el microscopio de inversión) el apareamiento de amastigotes intracelulares (aprox. a los 3 días de la inoculación de los epimastigotes).
- ◆ Se cambió el medio de cultivo cuando se observó amarillo. Una vez se observó el crecimiento de tripomastigotes, el cambio de medio se hizo diariamente.
- ◆ Cuando se observó gran cantidad de tripomastigotes (aprox. 10 días post-inoculación), se tomó una gota del sobrenadante y se colocó en cámara de Neubauer para calcular la cantidad de parásitos (39).

d. Ensayo *in vitro* utilizando tripomastigotes de *T. cruzi* (Conteo Directo)

- ◆ Los tripomastigotes se contaron en cámara de Neubauer, se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos y se agregó medio MEM_{NCS} hasta obtener una suspensión de tripomastigotes de 3-5 X 10⁶ parásitos/ml.
- ◆ Se disolvieron 100 mg del extracto apolar en 500 µl de DMSO. Se esterilizó por filtración (0.22 mm).

- ◆ Se mezcló 10 μ l de la solución de extracto con 990 μ l de medio de cultivo MEM_{NCS} (2 mg/ml).
- ◆ En una microplaca estéril de 96 pozos de fondo plano: Se pipeteó 100 μ l de la solución del extracto en cada uno de los pozos por triplicado. Se agregó 100 μ l de la suspensión de tripomastigotes a cada pozo (1:1).
- ◆ Se usó como control positivo una solución de 50 mg/ml de nifurtimox. Como control negativo se utilizó una solución al 0.5% de DMSO en medio de cultivo MEM_{NCS}. Se incubó a 36°C durante 24 horas.
- ◆ Se contó en cámara de Neubauer el contenido de parásitos en cada uno de los pozos.
- ◆ Interpretación de los resultados: Se comparó el número de parásitos vivos en los pozos con extracto contra el control negativo (11, 39).

e. Ensayo *in vitro* utilizando tripomastigotes de *T. cruzi* (Ensayo Colorimétrico)

- ◆ Se tomó una microplaca de fondo plano de 96 pozos y se rotuló con el número de código de los extractos que se probaron en el bioensayo.
- ◆ Se contó en cámara de Neubauer las FLC y se diluyó con MEM_{FBS} hasta que se obtuvo una concentración de 1×10^4 células/ml en medio MEM_{FBS}.
- ◆ Se agregó a cada pozo 100 μ l de FLC con una concentración de 1×10^4 células/ml en medio MEM_{FBS}.
- ◆ Se incubó durante toda la noche a 36°C.
- ◆ Se agregó a todos los pozos del ensayo, excepto a los destinados al control del color del extracto, 50 μ l tripomastigotes de *T. cruzi* en una concentración de 1×10^4 parásitos/ml en MEM_{NCS}.
- ◆ Se adicionó 50 μ l de MEM_{NCS} a los pozos destinados para el control de la coloración del extracto (D1 al D4, E1 al E4, F1 al F4 y G1 al G4).
- ◆ Se incubó la placa por 2 horas a 36°C.
- ◆ Se adicionó como control positivo, medio MEM_{NCS} con una concentración de 3 μ g/ml de anfotericina B en la placa de 96 pozos. Se colocó los controles positivos con una micropipeta en 4 pozos (B1, B2, B3 y B4) 50 μ l de medio MEM_{NCS} con una concentración de 3 μ g/ml de anfotericina B a cada pozo.
- ◆ Para el control negativo se adicionó previamente diluidos, 50 μ l (0.0034, 0.032, 0.276 y 2.5% de DMSO en MEM_{NCS}) a cada uno de los pozos C1, C2, C3 y C4, respectivamente.
- ◆ Se adicionó 50 μ l de los extractos previamente diluidos en medio MEM_{NCS} en los pozos que le corresponden a cada extracto. Se agregó diluciones de extractos con una concentración de 1, 0.2, 0.04 y 0.008 mg/ml a cada pozo. Cada extracto se evaluó por triplicado.
- ◆ Se realizó el mismo procedimiento en los pozos destinados para el control de la coloración del extracto.

- ◆ Se incubó durante 7 días a 37°C.
- ◆ Al final de la incubación se adicionó a cada pozo 25 µl del sustrato cloro-fenol-rojo-β-D-galactopiranosida (CPRG 100 µM concentración final) junto con el detergente (NP-40 al 0.9% concentración final) en PBS con un pH 7.4 a cada pozo.
- ◆ Se incubó a 37°C por 7 horas.
- ◆ Se leyeron las densidades ópticas en un lector de microplacas Bio-Rad Benchmark utilizando un filtro de 570 nm (11).

3. Plantas del Estudio

	Nombre planta	Parte	Tipo extracto
1. Plantas con actividad demostrada	<i>Neurolaena lobata</i>	hoja	etanol
	<i>Lippia graveolens</i>	hoja	etanol
	<i>Solanum americanum</i>	hoja	etanol
2. Plantas con Sospecha	<i>Rhizophora mangle</i>	corteza	etanol
	<i>Baccharis trinervis</i>	hoja/tallo	etanol
	<i>Miconia glaberrima</i>	hoja	etanol
	<i>Smilax domingensis</i>	rizoma	etanol
3. Plantas escogidas al azar	<i>Styrax conterminus</i>	hoja/tallo	etanol
	<i>Ardisia densiflora</i>	hoja/tallo	etanol
	<i>Quercus crispifolia</i>	hoja/tallo	etanol

4. Diseño de la Investigación

a. Muestra:

Metodología por conteo directo en cámara de Neubauer y metodología colorimétrica.

b. Diseño Estadístico:

Cada ensayo se hizo por triplicado, los resultados obtenidos para cada una de las dos metodologías fueron las concentraciones de parásitos a las cuales los extractos inhibieron el 90% (IC₉₀) del crecimiento de epimastigotes y tripomastigotes *T. cruzi*.

Se analizaron los resultados por un diseño de bloques de los tres grupos del estudio (plantas con actividad demostrada, plantas con sospecha y plantas escogidas al azar por conveniencia de la siguiente forma: control positivo, control negativo y cuatro extractos con diluciones a 250, 50, 10 y 2 µg/ml).

El análisis de IC₉₀ se hizo en forma descriptiva con el promedio y la desviación estándar para comparar el nivel de acuerdo que existe entre ambas metodologías, en función de los extractos y las réplicas utilizadas.

II. RESULTADOS

Esta investigación se realizó con el objetivo de evaluar la metodología colorimétrica, establecida por el Programa de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), para el tamizaje de la actividad anti-*T. cruzi* en productos naturales, utilizando la cepa *T. cruzi* que expresa la enzima β -galactosidasa de *E. coli*. Los resultados obtenidos, se compararon con la metodología de referencia, en la determinación del índice de concentración al cual existe un 90 por ciento de muerte de parásitos, debido a la actividad tripanocida de los extractos de las plantas analizadas (11, 40).

Para tener grupos de comparación con respecto a cada método utilizado, se seleccionaron tres grupos de plantas como sigue: el primer grupo integrado por plantas a las cuales ya se les había demostrado actividad anti-*T. cruzi* por la metodología de conteo directo en cámara de Neubauer; actividad determinada por Berger y colaboradores (6). En la tabla No. 1 se muestran los datos obtenidos por Berger y cols. así como los nombres científicos, populares, la parte de las plantas utilizadas y el porcentaje de rendimiento que se obtuvo para cada parte analizada.

Tabla No.1
Plantas con actividad anti-*T. cruzi*

Planta	Familia	Nombre Popular	Parte	w/w porcentaje de rendimiento	Actividad anti- <i>T. cruzi</i> (mg/ml epimastigote (6))
<i>Neurolaena lobata</i>	<i>Asteraceae</i>	Tres puntas	Hoja	11.4	0.118
<i>Lippia graveolens</i>	<i>Verbenaceae</i>	Orégano	Hoja	22.4	0.500
<i>Solanum americanum</i>	<i>Solanaceae</i>	Macuy	Hoja	25.1	< 0.500

En la tabla No. 2 se muestra el segundo grupo de plantas seleccionado, por presentar sospecha de actividad anti-*T. cruzi* y que estudios previos han demostrado su actividad contra otros parásitos de importancia médica (10). Así también en esta tabla se muestra el tercer grupo de plantas las que fueron escogidas al azar de una base de datos sobre plantas provenientes de estudios de bioprospección de Cáceres y cols. (39). Los extractos de plantas utilizados fueron las fracciones de etanol al 95 por ciento, los que fueron preparados por Cáceres y cols. para este estudio.

En la tabla No. 3 se pueden observar los resultados obtenidos con ambas metodologías, de las plantas del primer grupo, en la que *N. lobata* utilizando la metodología de referencia mostró los menores IC₉₀ para ambos estadios.

Tabla No. 2

Plantas con sospecha de actividad anti-*T. cruzi* y plantas escogidas al azar

	Planta	Familia	Nombre popular	Parte	w/w porcentaje de rendimiento
Plantas con sospecha de actividad	<i>Rhizophora mangle</i>	<i>Rhizophoraceae</i>	Mangle	Corteza	31.3
	<i>Baccharis trinervis</i>	<i>Asteraceae</i>	Hierba de Santo Domingo	Hoja	34.5
	<i>Baccharis trinervis</i>	<i>Asteraceae</i>	Hierba de Santo Domingo	Tallo	11.4
	<i>Miconia glaberima</i>	<i>Melastomataceae</i>	Uva	Hoja	15.5
	<i>Smilax domingensis</i>	<i>Smilacaceae</i>	Zarzaparrilla	Rizoma	21.5
Plantas escogidas al azar	<i>Styrax conterminus</i>	<i>Styracaceae</i>	Sin nombre común	Hoja	21.6
	<i>Styrax conterminus</i>	<i>Styracaceae</i>	Sin nombre común	Tallo	16.4
	<i>Ardisia densiflora</i>	<i>Myrsinaceae</i>	Sin nombre común	Hoja	21.3
	<i>Ardisia densiflora</i>	<i>Myrsinaceae</i>	Sin nombre común	Tallo	18.3
	<i>Quercus crispifolia</i>	<i>Fagaceae</i>	Encino	Hoja	5.6
	<i>Quercus crispifolia</i>	<i>Fagaceae</i>	Encino	Tallo	16.8

Tabla No. 3

Actividad *in vitro* de extractos de plantas con actividad demostrada contra *T. cruzi* por dos metodologías (IC₉₀ µg/ml ± SD*)

Extractos	Epimastigote		Tripomastigote	
	Conteo Directo	Colorimétrico	Conteo Directo	Colorimétrico
<i>Neurolaena lobata</i>	144 (± 20)	765 (± 200)	32 (± 1.2)	621 (± 56)
<i>Lippia graveolens</i>	151 (± 19)	1700 (± 346)	39 (± 2)	1467 (±254)
<i>Solanum americanum</i>	198 (± 28)	> 2000	43 (± 1.3)	1721 (±425)

* Promedio del índice de concentración al 90% ± Desviación estándar.

En la tabla No. 4 se muestran los resultados obtenidos para el segundo grupo de plantas, todos los extractos mostraron actividad anti-*T. cruzi* para ambos estadíos por la metodología de referencia.

En la tabla No. 5 se muestran los resultados de la actividad anti-*T. cruzi* obtenidos del tercer grupo de plantas, en el que solo el extracto de *A. densiflora* no mostró actividad tripanocida para el estadío de epimastigote.

Tabla No. 4

Actividad *in vitro* de extractos de plantas con sospecha de actividad contra *T. cruzi* por dos metodologías (IC90 $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}^*$)

Extractos	Epimastigote		Tripomastigote	
	Conteo Directo	Colorimétrico	Conteo Directo	Colorimétrico
<i>Rhizophora mangle</i>	922 (\pm 367)	> 2000	106 (\pm 10)	> 2000
<i>Baccharis trinervis</i> (hoja)	198 (\pm 27)	537 (\pm 255)	52 (\pm 3.2)	1647 (\pm 298)
<i>Baccharis trinervis</i> (tallo)	402 (\pm 245)	> 2000	82 (\pm 8)	> 2000
<i>Miconia glaberima</i>	247 (\pm 45)	> 2000	67 (\pm 9)	1875 (\pm 412)
<i>Smilax domingensis</i>	414 (\pm 69)	1169 (\pm 379)	85 (\pm 12)	> 2000

* Promedio del índice de concentración al 90% \pm Desviación estándar.

Tabla No. 5

Actividad *in vitro* de extractos de plantas escogidos al azar para determinar su actividad contra *T. cruzi* por dos metodologías (IC90 $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}^*$)

Extractos	Epimastigote		Tripomastigote	
	Conteo Directo	Colorimétrico	Conteo Directo	Colorimétrico
<i>Styrax conterminius</i> (hoja)	122 (\pm 8)	> 2000	29 (\pm 2)	520 (\pm 48)
<i>Styrax conterminius</i> (tallo)	712 (\pm 117)	> 2000	121 (\pm 20)	1574 (\pm 247)
<i>Ardisia densiflora</i> (hoja)	697 (\pm 432)	> 2000	120 (\pm 24)	1430 (\pm 214)
<i>Ardisia densiflora</i> (tallo)	1589 (\pm 620)	> 2000	408 (\pm 30)	> 2000
<i>Quercus crispifolia</i> (hoja)	238 (\pm 100)	1593 (\pm 537)	40 (\pm 7)	1794 (\pm 241)
<i>Quercus crispifolia</i> (tallo)	287 (\pm 53)	754 (\pm 111)	45 (\pm 4)	1826 (\pm 301)

* Promedio del índice de concentración al 90% \pm Desviación estándar.

Los resultados de los índices de concentración ($\mu\text{g/ml}$), a la cual existió el 90 por ciento de muerte (IC_{90}) para el estadio de epimastigote y tripomastigote de cada extracto crudo probado fueron calculados en tres experimentos diferentes por lo que se reportó en las tablas la media y su desviación estándar.

El control negativo de la metodología colorimétrica se utilizó con el propósito de seleccionar la mejor longitud de onda al cual se tuviera la mayor absorbancia. Para ello se evaluaron las longitudes de onda a 340, 405, 490 y 630 nm, obteniéndose la mayor absorbancia y la mejor discriminación entre el control positivo y el negativo con el filtro de 405 nm.

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

La enfermedad de Chagas es una enfermedad endémica en gran parte de Latinoamérica. Para su tratamiento se han utilizado medicamentos como el Nifurtimox, Benzonidazol, Alopurinol y otros, los que tienen gran diversidad de efectos secundarios, deben utilizarse por un tiempo prolongado y son útiles únicamente en la fase aguda de la enfermedad. Por ello se considera necesario desarrollar nuevos tratamientos alternativos a los ya existentes, entre ellos el uso de extractos de plantas ofrecen ser una buena alternativa, ya que por estudios etnobotánicos o de bioprospección, han sido considerados como elementos potencialmente útiles en el tratamiento de esta enfermedad. Por lo anterior, es evidente la necesidad de evaluar estas plantas por metodologías más rápidas y sensibles para confirmar su actividad tripanocida.

Existe una gran cantidad de metodologías para el tamizaje de los extractos; entre ellos se pueden mencionar la microscopía, colorimetría, radiometría y fluorometría las que cuantifican la concentración de parásitos en el ensayo. Dentro de las técnicas cuyo principio es la colorimetría se encuentra la utilizada en el presente estudio, en la que se aprovecha el cambio de color de amarillo a rojo del sustrato cloro-fenol-rojo- β -D-galactopiranosido (CPRG), reacción que es directamente proporcional a la concentración de parásitos. Esta reacción se observa ya que la cepa CL-Brener utilizada en la metodología fué recombinada con el gen *lacZ* de *E. coli* que expresa la enzima β -galactosidasa; enzima que al actuar sobre el sustrato produce una coloración roja. En este caso la coloración amarilla demuestra poca concentración del parásito y el rojo indica lo contrario; por lo tanto, a mayor actividad del extracto anti-*T. cruzi*, se obtendrá una coloración amarilla y fácilmente registrable a través del lector de microplacas a una longitud de onda de 570 nm.

En este estudio no se logró utilizar el filtro recomendado, debido a la falta del filtro en el lector, por lo que se utilizó la longitud de onda de 405 nm en los cuales los controles de la metodología dieron una respuesta correcta en las lecturas de la absorbancia para el ensayo.

En el presente estudio se comparó la metodología colorimétrica, con la metodología de conteo en cámara de Neubauer considerada como referencia, en la cual se incubó un cultivo de parásitos de *T. cruzi* (epimastigotes y tripomastigotes) con diferentes concentraciones de extractos de plantas; la interpretación de los resultados se realizó a través de un conteo directo de los parásitos en cámara de Neubauer.

Ambas metodologías proporcionaron información acerca del índice de concentración en la cual el 90 por ciento de parásitos está muerto (IC_{90}); para ello se comparó la concentración de extracto con la concentración de parásitos y controles utilizando agentes que en estudios previos han demostrado actividad anti-*T. cruzi* tales como la anfotericina B. El cálculo para determinar la IC_{90} de ambas metodologías se obtuvo por regresión lineal para cada extracto evaluado. Cada una de las determinaciones fue realizada en tres ensayos independientes para poder calcular el promedio y su desviación estándar.

En el diseño estadístico se planteó un análisis de bloques por conveniencia, sin embargo, la metodología colorimétrica no mostró la sensibilidad que se esperaba, tal como se muestra en las tablas No. 3, 4 y 5. Con esta metodología se obtuvo los mayores IC_{90} para cada uno de los extractos probados contra los estadios de epimastigote y tripomastigote de *T. cruzi* en comparación con los índices obtenidos por la metodología de conteo directo. Lo anterior concuerda con lo establecido por los otros laboratorios que participaron en el Proyecto de CYTED, según la reunión en Punta Cana en el 2002.

El menor IC_{90} encontrado en el estudio correspondió al extracto de *N. lobata* para el estadio de tripomastigote, tal como se muestra en la tabla No. 3. El aumento de los índices en la metodología colorimétrica probablemente se debió a la alta concentración de la enzima β -galactosidasa en el cultivo al momento de agregar el sustrato y por lo tanto se obtuvo un aumento de las absorbancias por el lector de microplacas a una longitud de 405 nm. La elevada concentración de la enzima pudo incrementarse por la presencia de la enzima liberada en el medio, aunque los extractos destruyan al parásito y así, reaccionen con el sustrato. Los resultados obtenidos en el ensayo colorimétrico denotan que esta metodología no cumplió con las expectativas de igualar o mejorar la sensibilidad de la metodología de conteo directo y de esta manera minimizar el tiempo y esfuerzo en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad anti-*T. cruzi*.

En la determinación de la actividad anti-*T. cruzi* con las metodologías de conteo directo y colorimétrico se utilizaron tres extractos etanólicos de plantas con actividad anti-*T. cruzi* demostrada como: *N. lobata*, *L. graveolens* y *S. americanum*, cinco extractos etanólicos con sospecha de actividad como: *R. mangle*, dos de *B. trinervis*, *M. glaverrima* y *S. domingensis* y seis extractos etanólicos escogidos al azar: dos de *S. conterminius*, dos de *A. densiflora* y dos de *Q. crispifolia*, tal como se muestran en las tablas No. 1 y 2 de resultados.

Los extractos con actividad demostrada anti-*T. cruzi* para el estudio con epimastigotes mostraron un IC₉₀ menor a 1 mg/ml tal como se indica en publicaciones reportadas por Berger y colaboradores, quienes utilizaron la metodología por conteo directo con la cepa de *T. cruzi* MHOM/GT/94/SMI-04 (6). Esto corrobora los datos obtenidos por la metodología de conteo directo, para cada uno de los extractos probados en el estudio, tanto como para el estadio de epimastigote y tripomastigote, tal como se muestra en las tablas No. 1 y 3 los resultados son concordantes, a pesar de que se utilizó una cepa diferente para cada estudio.

En la determinación de la actividad anti-*T. cruzi* de extractos con sospecha de actividad se obtuvo que todos los extractos utilizados poseen un IC₉₀ menor a 1 mg/ml para el estadio de epimastigote y tripomastigote tal como se muestra en la Tabla No. 2 de resultados. De estos extractos el que posee una mayor actividad anti-*T. cruzi* fue la hoja de *B. trinervis* con un IC₉₀ de 198 µg/ml para epimastigotes y un IC₉₀ de 52 µg/ml para el tripomastigotes.

La tabla No. 5 ilustra que de los extractos escogidos al azar el extracto que mostró la mejor actividad anti-*T. cruzi* fue el de hoja de *S. conterminius* con IC₉₀ de 122 µg/ml para epimastigotes y un IC₉₀ de 29 µg/ml para tripomastigote. El único extracto de las plantas escogidas al azar y del resto de plantas del estudio que no mostró actividad contra el parásito para el estadio de epimastigote fue el de tallo de *A. densiflora*.

Como se observa en las tablas No. 3, 4 y 5 todos los extractos utilizados para el estudio demostraron actividad contra el estadio de tripomastigote de *T. cruzi* en concentración menor a 1 mg/ml de extracto. Este hecho hace pensar que el estadio de tripomastigote pareciera ser más

susceptible a los extractos de plantas que el estadio de epimastigote. Este hallazgo también ha sido observado en otros estudios acerca del tema (6, 9, 10).

Otro de los objetivos del estudio fue comparar los dos métodos para luego evaluar las ventajas y desventajas del método colorimétrico. Esta técnica, ofrece las ventajas de proporcionar lecturas impresas, fácil de automatizar, necesita menos tiempo en el análisis de la concentración de parásitos y menor concentración de parásitos, por lo que si esta metodología hubiese demostrado una sensibilidad mayor o igual a la utilizada como referencia, ofrecería ser la metodología de elección para este tipo de ensayo. La desventaja que presenta esta metodología es la contaminación que puede ocurrir dentro del tiempo de incubación. Sin embargo los resultados no fueron los esperados.

La metodología por conteo directo tiene la desventaja de resultar tediosa, requerir más tiempo en el conteo de parásitos, no poder analizar al mismo tiempo una gran cantidad de extractos de plantas y estar sujeta a errores del investigador en el conteo de parásitos. Sin embargo, en la evaluación descriptiva esta metodología fue la que proporcionó la mejor sensibilidad comparado con resultados previamente obtenidos por Berger y colaboradores empleando esta misma técnica y no pudo ser reemplazada por la colorimétrica.

IX. CONCLUSIONES

1. La metodología colorimétrica establecida por el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), para el tamizaje de la actividad anti-*T. cruzi* en productos naturales utilizando la cepa *T. cruzi* que expresa el gen de la β -galactosidasa de *E. coli* no fue muy sensible para demostrar la actividad de extractos de plantas para este estudio.
2. Al comparar la metodología colorimétrica con la de conteo directo, se concluye que esta última es más sensible en la evaluación de extractos de plantas contra parásitos de *T. cruzi*.
3. De las plantas seleccionadas con sospecha de actividad tripanocida, el extracto de hoja de *S. conterminus* fue el que mostró mayor actividad anti-*T. cruzi* con IC₉₀ de 122 μ g/ml para epimastigotes y un IC₉₀ de 29 μ g/ml para tripomastigotes.
4. De las plantas seleccionadas al azar todos los extractos mostraron actividad tripanocida, excepto el extracto de tallo de *A. densiflora* que no mostró actividad contra el parásito para el estadio de epimastigote.
5. Los resultados obtenidos de los extractos de: *N. lobata*, *L. graveolens* y *S. americanum*, concordaron con los datos conocidos de su actividad tripanocida.

X. RECOMENDACIONES

1. Confirmar la actividad tripanocida de los extractos de este estudio utilizando modelos *in vivo*.
2. Realizar pruebas *in vitro* de los extractos que poseen actividad anti-*T. cruzi* para otros protozoos con importancia médica.
3. Evaluar otras metodologías para cuantificar la actividad anti-*T. cruzi* y así mejorar la eficiencia en la búsqueda de tratamientos contra la enfermedad de Chagas.
4. Continuar el tamizaje de la actividad tripanocida de otras plantas que se usan popularmente en el tratamiento contra protozoos.
5. Realizar ensayos de viabilidad celular con los extractos de este estudio.

XII. REFERENCIAS

1. World Health Organization. Prevention and control methods, p. 38-57. *In* Control of Chagas' disease: report of a WHO expert committee. WHO Tech. Rep. Ser. 1991; 811:1-95.
2. Kirchhoff, L. V. American trypanosomiasis (Chagas' disease) a tropical disease now in the United States. *N. Engl. J. Med.* 1993; 329:639-644.
3. Cáceres, A., *et al.* Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. 1a. ed. Guatemala C.A. Editorial Universitaria. 1996; 396 p.
4. Cáceres, A., *et al.* Screening of Antimicrobial Activity of Plants Popular Used in Guatemala for the treatment of Dermat mucosal Diseases. *J. Ethnopharmacol.* 1987; 20(3):223 - 237.
5. Berger, I, *et al.* Antiprotozoal activity of *Neurolaena lobata*. *Phytother Res.* 2001; 15(4):327-30.
6. Berger, I., *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections: II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. *J Ethnopharmacol.* 1998; 62(2):107-15.
7. Morales, C, *et al.* Preliminary screening of five ethnomedicinal plants of Guatemala. *Farmacol.* 2001; 56(5-7):523-6.
8. Giron, LM, *et al.* Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. *J Ethnopharmacol.* 1991; 34(2-3):173-87.
9. Berger, I. *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. *J. Ethnopharmacol.* 1998; 62:107-115.
10. Cáceres, A. *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *J. Ethnopharmacol.* 1998; 62:195-202.
11. Buckner F. S., *et al.* Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing β -galactosidase *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996; 40:2592-2597.

12. Buckner, F. S., *et al.* Induction of resistance to azole drugs in *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998; 42:3245-3250.
13. Rodriguez, A. M., *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection in B-cell-deficient rats. *Infect. Immun.* 1981; 31:524-529.
14. Tarleton, R. L. Immunity to *Trypanosoma cruzi*, Host response to intracellular pathogens. R. G. Landes Co., Austin, *In* S. H. E. Kaufman (ed.), Tex. 1997; p. 227-247.
15. Kierszenbaum, F., and Howard JC. Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. *J. Immunol.* 1976; 116:1208-1211.
16. Brener Z. *Trypanosoma cruzi*: taxonomy, morphology and life cycle. p. 13-29. [In Wendel S., *et al.* Chagas' disease (American Trypanosomiasis); its impact on transfusion and clinical medicine. Brazil. International Society of Blood Transfusion. 1992. X+270 p.].
17. Brener, Z. Chagas' disease clinical features. Chagas' disease (American trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. *Int. Soc. Blood Transfusion Cap.* 1992; 6:81-101.
18. Zingales, B. *et al.* Biological parameters and molecular markers of clone CL Brener -The reference organism of the *Trypanosoma cruzi* genome project-. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 92;6:811-814.
19. Tabaru Y. *et al.* The geographical distribution of vectors of Chagas' disease and populations at risk of infection in Guatemala. *Med. Entomol. Zool.* 1999; 50:1 (9-17).
20. Tabaru Y. *et al.* Chemical control of *Triatoma dimidiata* and *Rhodnius prolixus* (*Reduviidae: Treptominae*) the principal vectors of Chagas' disease in Guatemala. *Med. Entomol.* 2001. Vol 49, No. 2 P 87-92, 1998.
21. Krettli, A. U., and Brener Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.* 1976; 116:755-761.
22. Chiari, E., Dias JC, Lana M, and Chiari CA. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1989; 22:19-23.
23. Umezawa, E. *et al.* Immunoblot Assay using Excreted-Secreted Antigens of *Trypanosoma cruzi* in Serodiagnosis of Congenital, Acute and Chronic Chagas Disease. *J. Clinical Microbiol.* 1996; 34(9): 2143-2147.
24. Carvalho, M. R *et al.* Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion.* 1993; 33:830-834.

25. Appleman, M. D. *et al.* Use of a questionnaire to identify potential blood donors at risk for infection with *Trypanosoma cruzi*. *Transfusion*. 1993; 33:61-64.
26. Matta R, VL. Enfermedad de Chagas en Guatemala: Prevalencia y Transmisión congénita. En: *Enfermedades Parasitarias de mayor prevalencia y transmitidas por vectores en Centroamérica*. Compiladores H. Cosenza y A. Kroeger. Parlamento Centroamericano. 287pp(59 -70).
27. Matta R, VL. Avances en el diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas en Guatemala, Guatemala, Informe Anual No. 3 para la investigación de Enfermedades Tropicales. JICA. 1994; 207 p (p 40-45)
28. Andrade, A. L. S. S., *et al.* Randomized trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet* 1996; 348:1407-1413.
29. Filardi, L. S., and Z. Brener. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1987; 81:755-759.
30. Galvão, L. M. C., *et al.* Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas' disease: a 10 years follow-up study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1992; 86:1-4.
31. Cavin JC., *et al.* Plant derived alkaloids active against *Trypanosoma cruzi*. *J. Ethnopharmacol.* 1987; 19:89-94.
32. Gonzáles, J, *et al.* *In vitro* activity of natural products against the trypomastigote form of *T. cruzi*. *Phytother. Res.* 1990; 4:14
33. Cáceres, A. *Plantas de Uso Medicinal en Guatemala*. ed. by Girón, L.M., and Cáceres, A. Editorial Universitaria, Dirección General de Extensión, Guatemala, Centroamericana. 1996. p. 402.
34. Paul C. Standler & Louis O. Williams. February 24, 1966. *Flora of Guatemala*. United States of America. Fieldana Botany Published by Chicago Natural History Museum. Volumen 24. 230-231, 321-323, 405-407.
35. House, P. R., *et al.* *Plantas Medicinales Comunes de Honduras*. Universidad Nacional Autónoma de Honduras. 1a. ed. Tegucigalpa, Honduras. Lotografía López. 1995.
36. Base de datos Napralert consultada en Junio del 2001.
37. Gerrit, D., Sousa M., and A Charte, A.O.. *Flora Mesoamericana. (Alismateceae - Cyperaceae)* Universidad Autónoma de México. Instituto de Biología. Misuri Botanical Garden The Natural History Museum (London) México D.F. 1994; Volumen 6. p. 235-243, 270-278.
38. Gupta, M. P. (Edit.) *270 Plantas Medicinales Iberoamericanas*. CYTED - SECAB. 1a. ed. Santa Fe de Bogotá. Convenio Andrés Bello. 1995; 545 p.

39. Cáceres, A., *et al.* Manual de Procedimientos del Proyecto Biodiversidad Tropical Centroamericana (Organización de Estados Americanos, OEA). Guatemala: Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Doc. Tec., 1999.
40. Procedimiento para medir la actividad tripanocida in vitro de *T. cruzi* por metodología colorimétrica. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED). Doc. Tec., 2000.

XIII. ANEXO

Anexo No. 1

Medio LIT (Liver Infussion Tryptose) modificado

Reactivos (para 1 L de medio)

Solución A:

NaCl	4.0 g
KCl	0.4 g
Na ₂ HPO ₄ anhidro	8.0 g
Bacto-triptosa (DIFCO)	5.0 g
Agua destilada	cps 800 ml

Solución B (stock):

Infusión de hígado-Bacto (DIFCO) al 6%	12.0 g
Agua destilada	cps 200 ml

Solución C (stock):

D-glucosa anhidra al 5%	10.0 g
-------------------------	--------

Agua destilada	cps 200 ml
Solución eritrocitos lisados (hemina)	10 ml
Suero Bovino fetal (FBS)	100 ml

Preparación de soluciones

Solución A:

- Agregar en un beacker 800 ml. de agua destilada.
- Pesar todas las sales y agregarlas una por una a los 800 ml. de agua.
- Mezclar por agitación con magneto, hasta que las sales estén totalmente disueltas.
- Colocar la solución en botella adecuada para autoclavar.
- Esterilizar por autoclaveado a 120° C (115 lb) por 20 minutos.
- Guardar la solución a 4° C.

Solución B:

- Pesar 12.0 g de Infusión de hígado-Bacto (DIFCO) y disolverlos en 200 ml. de agua destilada; la concentración de la solución es 6% .
- Colocar la solución en una botella y autoclavar a 120° C (115 lb) por 20 minutos.
- Guardar la solución a 4° C.

Solución C:

- Pesar 10.0 g de D-glucosa anhidra y disolverlos en 200 ml. de agua destilada; la concentración de la solución es 5% .
- Colocar la solución en una botella y autoclavar a 120° C (115 lb) por 20 minutos.
- Guardar la solución a temperatura ambiente.

A. Solución de eritrocitos lisados

NOTA: Aunque al final de la preparación de los eritrocitos, la solución será esterilizada por filtración, es conveniente trabajar todo el proceso de la preparación ASÉPTICAMENTE (en campana con flujo laminar), ya que es una solución que se contamina fácilmente.

- Extraer asépticamente 20 ml. de sangre humana (con anticoagulante EDTA).
- Colocar la sangre en tubos estériles apropiados para centrifugación; centrifugar a 3,000 rpm durante 20 minutos.
- Aspirar cuidadosamente el plasma y descartarlo.
- Agregar a los eritrocitos abundante solución salina estéril con amortiguador de fosfatos (PBS) para lavarlos; cerrar los tubos y mezclar por inversión cuidadosamente.
- Centrifugar a 3,000 rpm por 15 min.
- Aspirar cuidadosamente el sobrenadante y descartarlo.
- Repetir el procedimiento de lavado dos veces más.
- Agregar por cada parte de eritrocitos, 4 partes de agua destilada estéril (1:4), cerrar los tubos y agitar vigorosamente para lisar las células y así liberar la hemina.
- Almacenar los tubos conteniendo la solución de eritocitos lisados a una temperatura de -80°C y dejarlos congelados por 24 horas.
- Descongelar la solución de eritrocitos lisados cuidadosamente y sin agitar, centrifugar a 3,000 rpm por 45-60 min.
- Sacar cuidadosamente los tubos de la centrífuga sin agitar y obtener el sobrenadante.
- Filtrar el sobrenadante empezando con un filtro 0.8, seguido de 0.4 y luego $0.2\ \mu\text{m}$.
- Guardar la solución a -20°C .

Preparación de LIT completo (LIT +):

Solución A	800 ml
Stock de solución B	50 ml
Stock de solución C	40 ml
Solución de hemina	10 ml
Suero bovino fetal	100 ml

Anexo No. 2**Medio MEM -Minimum Essential Medium-****Reactivos (para 1 L de medio)**

Medio Eagle's MEM (modificado para autoclavar)*	9.4 g
Agua destilada	cps 1000 ml
Solución stock de L-glutamina (2.92%)	10 ml
Solución stock de NaHCO ₃ (solución al 10%)	3-5 ml
Suero Bovino Fetal	112.54 ml

*NOTA: Sigma distribuye dos tipos de MEM Eagle's: uno que ya contiene L-glutamina y otro que no; el medio que ya trae la L-glutamina incorporada No se puede autoclavar, se esteriliza por filtración con filtro de 0.22 mm.

Preparación de soluciones:**Solución de NaHCO₃ (10%)**

- Pesar 10 gr. de NaHCO_3 y disolverlos en 90 ml. de agua destilada.
- Agitar hasta que se disuelva.
- Colocar la solución en una botella y autoclavar a 120°C (115 lb) por 20 minutos.
- Guardar la solución a temperatura ambiente.

Solución de L-glutamina (2.92%)

- Disolver 2.92 g de L-glutamina en agua destilada; el pH de la solución será aproximadamente 6.0 (color amarillo).
- Agregar 1-2 gotas de indicador rojo de fenol y 1 ml de NaHCO_3 (10%); deberá agregarse el carbonato que sea necesario para que la solución se torne de color rosado, lo que indicará un pH de 8.0.
- Esterilizar con filtro 0.2 mm . Guardar la solución a -20°C . Es frecuente que al sacar la L-glutamina del congelador se observe un precipitado blancuzco; esperar a que se atempere y agitar para que se disuelva.

Preparación de MEM completo (MEM +):

Medio MEM estéril	900 ml
Solución stock de L-glutamina (2.92%)	10 ml
Solución stock de NaHCO_3 (10%)	3-5 ml (hasta cambio a color rosado)
Suero Bovino Fetal (FBS)	112.5 ml

Anexo No. 3

PBS (libre de iones Ca^{++} y Mg^{++})

Pesar y medir:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.31 g (2mM)
NaHPO_4 anhidra	1.13 g (8 mM)
NaCl	7.65 g (131mM)
Agua destilada	cps 1000 ml

Ajustar el pH a 7.4, autoclavar a 127°C (115 lb) por 20 min y almacenar en una botella a temperatura ambiente.

Anexo No. 4
Solución de Tripsina/ EDTA

Para la solución stock de Tripsina al 0.25% :

- Pesar 0.5 g de Tripsina y disolverlos en 200 ml. de PBS libre de iones Ca^{++} y Mg^{++} .
- Esterilizar con filtro 0.2 mm .
- Si se usa frecuentemente se almacena a 4°C y si no, debe de almacenarse a -20°C.

Para la solución stock de EDTA al 2% :

- Pesar 1.0 g de EDTA.2Na y disolverlos en 49 ml. de PBS libre de iones Ca^{++} y Mg^{++} .
- Autoclavar a 127°C (115 lb) por 20 min y almacenar en una botella herméticamente a temperatura ambiente.

Solución de trabajo de Tripsina (0.05%)/EDTA(0.02%) :

Para 100 ml. de solución de trabajo:

20 ml. de tripsina (0.25%)

1 ml. de EDTA (2%)

79 ml. de PBS libre de iones Ca^{++} y Mg^{++}