



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR

**Efecto de extractos metanólicos de semillas de
Carica papaya sobre promastigotes de
Leishmania mexicana.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre

Universidad Central de Venezuela

Por el Br. Luis Miguel Rodríguez Montilla

como requisito parcial para optar

al título de Licenciado en Biología

Tutora: Dra. Concepción Hernández Chinaa

Caracas, Venezuela

Abril - 2015.

RESUMEN

La leishmaniasis comprende un grupo de enfermedades infecciosas causadas por parásitos protozoarios pertenecientes al género *Leishmania*, siendo un problema de salud pública alrededor del mundo. Esta enfermedad prevalece en 98 países tropicales con un estimado de 2 millones de casos nuevos por año. El control de la enfermedad es deficiente, ya que los tratamientos disponibles no son satisfactorios debido a la alta toxicidad, la generación de resistencia por los parásitos y los altos costos del tratamiento. Por lo tanto, se busca desarrollar nuevas alternativas terapéuticas para tratar la enfermedad. Los productos naturales constituyen una fuente ilimitada para la obtención de productos químicos que sirven de base para el desarrollo de nuevas drogas. Diversos extractos de plantas han mostrado actividad antiparasitaria, entre los cuales se encuentran los extractos de *Carica papaya*. Esta planta perteneciente a la familia *Caricaceae*, tiene una amplia gama de propiedades medicinales. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de extractos metanólicos de semillas de *Carica papaya* sobre promastigotes de *Leishmania mexicana*. Las semillas se secaron, se molieron y el polvo obtenido se maceró en metanol. El extracto se filtró, se concentró en un rotoevaporador y se resuspendió en dimetilsulfóxido (DMSO). Diversos compuestos fitoquímicos se lograron identificar en el extracto metanólico, tales como alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides, glicósidos cianogénicos, taninos y triterpenos. Los ensayos de citotoxicidad mediante el método de reducción de la sal de tetrazolio (MTT) revelaron un efecto citotóxico de los extractos contra los promastigotes ($IC_{50} = 0,18 \pm 0,02$ mg/ml) y un efecto inhibitorio del crecimiento de cultivos de promastigotes ($IC_{50} = 0,20 \pm 0,05$ mg/ml). Los extractos mostraron una menor actividad citotóxica sobre macrófagos murinos J774 con IC_{50} de 6,75 mg/ml, calculándose un Índice de Selectividad de 37. Los estudios por microscopía de contraste de fase, revelaron alteraciones en la morfología celular, la movilidad flagelar y la citocinesis de los promastigotes tratados con los extractos. Los resultados demuestran que los extractos metanólicos de semilla inhiben el crecimiento y causan alteraciones estructurales en promastigotes de *L. mexicana*, proporcionando nuevas perspectivas en el desarrollo de drogas con actividad antileishmanial obtenidas de productos naturales.

Palabras clave: *Leishmania mexicana*, *Carica Papaya*, extracto metanólico, citotoxicidad.

INDICE GENERAL

1. Introducción	1
1.1. Tratamiento de la enfermedad.....	5
1.2. Metabolitos secundarios como base para la obtención de drogas antileishmania.....	8
1.3. Actividad antiparasitaria y antibacteriana de metabolitos secundarios de <i>Carica papaya</i>	11
2. Objetivos	16
2.1. Objetivo General.....	16
2.2. Objetivos Específicos.....	16
3. Materiales y Métodos	17
3.1. Cultivo celular.....	17
3.1.1. Cultivo de promastigotes.....	17
3.1.2. Cultivo de macrófagos.....	17
3.2. Contaje celular.....	18
3.3. Obtención de extractos metanólicos.....	19
3.4. Análisis fitoquímico de semillas pulverizadas y del extracto metanólico de semillas.....	19
3.4.1. Alcaloides.....	19
3.4.2. Compuestos Fenólicos.....	20
3.4.3. Flavonoides.....	20
3.4.4. Glicósidos cianogénicos.....	20
3.4.5. Saponinas.....	20
3.4.6. Taninos.....	21
3.5. Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de semilla de <i>Carica papaya</i>	21
3.6. Efecto citotóxico de los extractos metanólicos sobre los cultivos de promastigotes.....	22
3.7. Efecto de los extractos metanólicos sobre el crecimiento de cultivos de promastigotes.....	23
3.8. Evaluación del efecto de los extractos metanólicos sobre la morfología de los promastigotes y la parálisis de la citocinesis.....	24
3.9. Evaluación del efecto de extractos metanólicos sobre macrófagos de la línea celular murina J774.....	25
3.10. Evaluación del efecto de los extractos metanólicos sobre amastigotes intracelulares.....	26
3.11. Fraccionamiento de los extractos metanólicos mediante cromatografía en gel de Sílice.....	27

4. Resultados	28
4.1. Análisis fitoquímico de semillas pulverizadas y del extracto metanólico de semillas.....	28
4.2. Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de semillas.....	29
4.3. Efecto citotóxico de los extractos metanólicos sobre los cultivos de promastigotes.....	30
4.4. Efecto de los extractos metanólicos sobre el crecimiento de cultivos de promastigotes.....	31
4.5. Evaluación del efecto de los extractos metanólicos sobre la morfología de los promastigotes	32
4.6. Evaluación del efecto de extractos metanólicos sobre macrófagos de la línea celular murina J774.....	35
4.7. Evaluación del efecto de los extractos metanólicos sobre amastigotes intracelulares.....	36
4.8. Efecto de fracciones obtenidas de extractos metanólicos sobre el crecimiento de los promastigotes.....	37
5. Discusión	41
6. Conclusiones	48
7. Bibliografía	49

1. INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis comprende un grupo de enfermedades infecciosas originadas por parásitos protozoos de la familia Trypanosomatidae, género *Leishmania*. Es un problema de salud pública a nivel mundial, ya que es considerada como una de las enfermedades más importantes del planeta. Es transmitida al ser humano mediante la picadura de insectos vectores del género *Phlebotomus* y *Lutzomyia* (De Lima y col. 2010), puede ser zoonótica o antroponótica según el reservorio del parásito. En la infección zoonótica los reservorios son animales salvajes y domésticos; y en la infección antroponótica el hombre es el hospedador reservorio (Castro y col. 2003).

La leishmaniasis es prevalente en 98 países tropicales del mundo con 14 millones de individuos, con más de 350 millones de personas aproximadamente expuestas al riesgo de contraerla. Se estima que la incidencia anual a nivel mundial es de 2 millones de casos nuevos (McGwire y Satoskar, 2013). El espectro clínico depende de la capacidad de la *Leishmania* para producir la enfermedad en hospederos susceptibles (patogenicidad) y de la capacidad inmunológica del hospedero (Castro y col. 2003; McGwire y Satoskar, 2013). Se han descrito varias formas de la enfermedad: leishmaniasis visceral y leishmaniasis tegumentaria americana, que incluye la leishmaniasis cutánea y la mucocutánea. La enfermedad cutánea simple se presenta como lesiones ulcerosas singulares o nodulares, localizada cerca o en el sitio inicial de la picadura del insecto. La enfermedad cutánea difusa se presenta con múltiples lesiones tipo pápulas, nódulos o placas que erupcionan con frecuencia en distintos lugares de la piel (Castro y col. 2003). La leishmaniasis mucocutánea puede ser debida a la extensión de la enfermedad cutánea local hacia el tejido mucocutáneo o debida a la diseminación hematógena o linfática del parásito desde la piel

hasta la mucosa oronasofaríngea (McGwire y Satoskar, 2013; Montalvo, 2010). Es una de las formas clínicas más severas debido a las secuelas que produce en el tracto respiratorio superior como consecuencia del daño a nivel de las mucosas (Castro y col. 2003), además, de la infección desfigurante resultante de la destrucción crónica local del tejido de la nariz, de la entrada orofaríngea y nasofaríngea y de los párpados de los ojos (McGwire y Satoskar, 2013). La leishmaniasis visceral es la forma que amenaza la vida del hospedero, resulta de la infección de los fagocitos dentro del sistema retículo-endotelial debido a la metástasis de los parásitos y de macrófagos infectados por parásitos, desde el sitio inicial de la infección cutánea, afectando los órganos internos, siendo el hígado y el bazo los órganos más afectados (McGwire y Satoskar, 2013).

El género *Leishmania* incluye aproximadamente 30 especies, divididas en dos subgéneros, *Leishmania* y *Vianna*, que se diferencian por el lugar donde se multiplican dentro del tracto digestivo del insecto vector. En el primero, los parásitos se desarrollan en el intestino posterior y en el segundo, los promastigotes se desarrollan en el intestino medio-anterior (Bañuls y col. 2007). La clasificación taxonómica incluye el complejo *L. mexicana* que comprende seis especies (*L. amazonensis*, *L. forattinii*, *L. garnhami*, *L. mexicana*, *L. pifanoi* y *L. venezuelensis*), el complejo *L. donovani* que comprende cuatro especies (*L. archibaldi*, *L. chagasi*, *L. donovani* y *L. infantum*), el complejo *L. tropica* que comprende dos especies (*L. kilicki* y *L. tropica*) y los complejos *L. aethiopica* y *L. major* comprendido por una especie del mismo nombre que el complejo. El grupo del subgénero *Vianna* incluye cuatro complejos; *L. guyanensis* que comprende tres especies (*L. guyanensis*, *L. panamensis* y *L. shawi*), *L. braziliensis* que incluye dos especies (*L. braziliensis* y *L. peruviana*) y los complejos *L. lainsoni* y *L. naiffi* (Bañuls y col. 2007).

Leishmania tiene dos etapas principales del ciclo de vida: la de promastigote extracelular móvil y flagelado, alargado, de 10 a 15 μm de longitud, presente en el tracto digestivo del flebótomo vector y la de amastigote intracelular inmóvil y redondeado, de 2.5 a 5.0 μm de diámetro, presente dentro de las células del hospedador mamífero (McGwire y Satoskar, 2013) (Fig. 1).

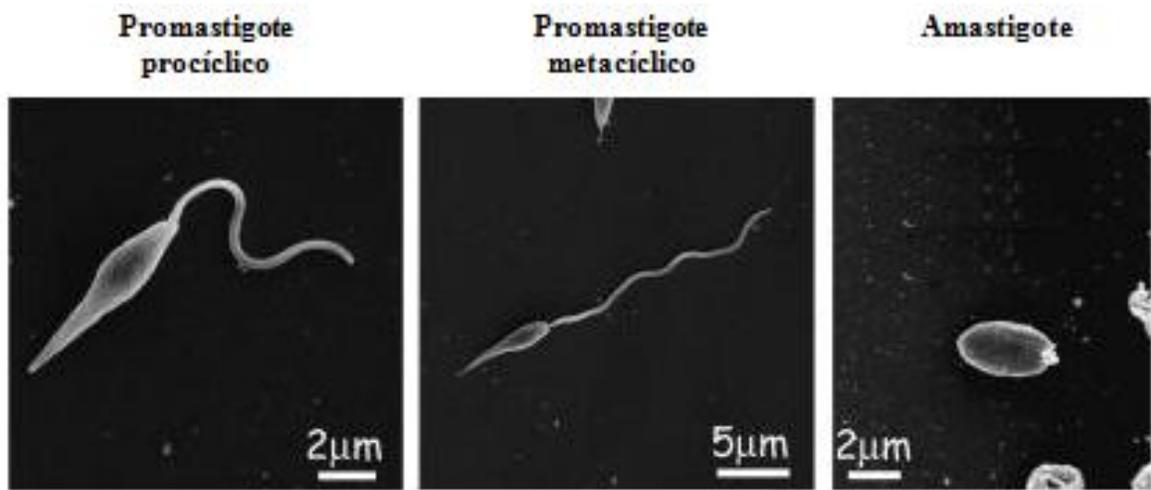


Figura 1. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de promastigote procíclico, promastigote metacíclico y amastigote de *Leishmania*. Tomado de Besteiro y col. 2007.

Los parásitos del género *Leishmania* son transmitidos a su hospedador por la picadura de un insecto flebótomo (especies *Phlebotomus* y *Lutzomia*) hembra infectado, que necesita alimentarse de sangre para producir sus huevos. Los insectos vectores se infectan cuando se alimentan de pequeñas cantidades de sangre de un individuo infectado. Durante la alimentación, los amastigotes del hospedador vertebrado son ingeridos por el vector y liberados en el intestino medio, donde se transforman en promastigotes para comenzar su ciclo de vida extracelular en el vector. Los promastigotes luego migran a la

parte anterior del tracto digestivo del flebótomo, donde se multiplican por fisión binaria. Aproximadamente 7 días después de la alimentación del insecto, los promastigotes sufren metaciclologénesis y se vuelven infecciosos (promastigotes metacíclicos), siendo liberados en el hospedero vertebrado junto con la saliva del insecto, cuando este lacera la piel con su probóscide durante la alimentación. Los promastigotes metacíclicos son internalizados por células dentríticas y por macrófagos del hospedador (Hide y col. 2007). Los parásitos son incorporados en vacuolas parasitóforas que se fusionan con lisosomas para formar fagolisosomas, se transforman en la forma de amastigote, se multiplican por fisión binaria dentro del fagolisosoma, destruyen la célula huésped e infectan a otras células fagocíticas, multiplicándose de nuevo (McGwire y Satoskar, 2013; Hide y col. 2007). El ciclo continúa cuando el flebótomo se alimenta de sangre por la picadura a un hospedador vertebrado infectado (Hide y col. 2007) (Fig. 2).

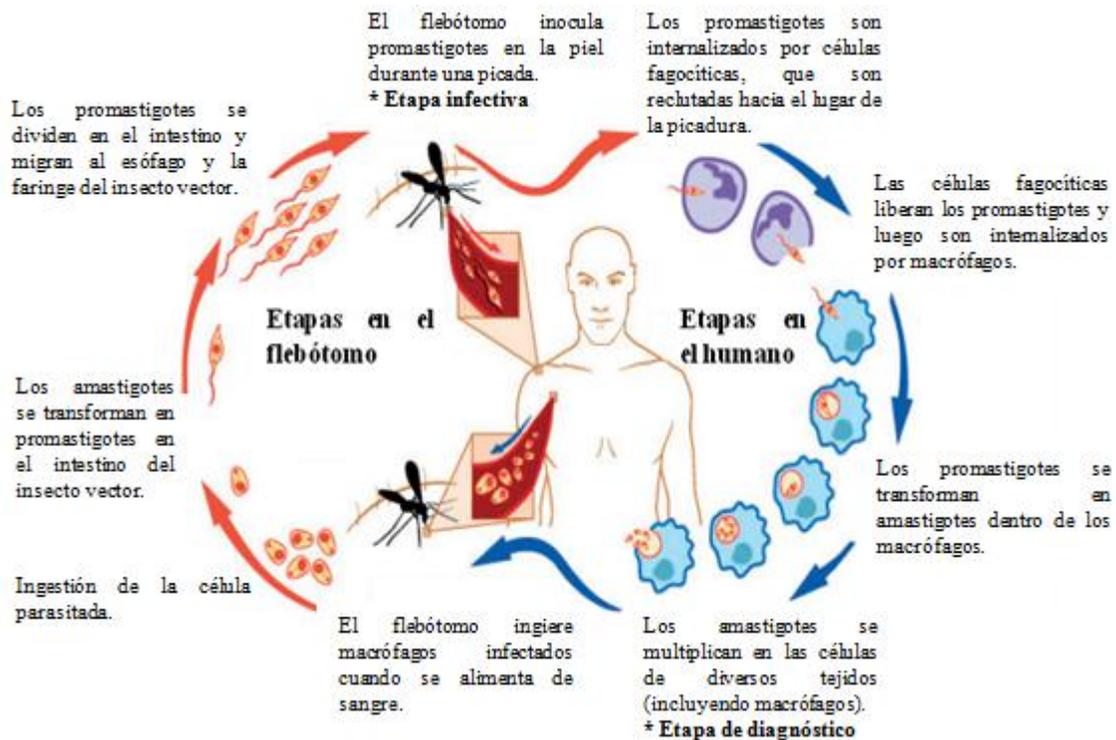


Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania* (McGwire y Satoskar, 2013).

1.1. Tratamiento de la enfermedad

En áreas endémicas, la quimioterapia constituye la principal medida para el control de la enfermedad. Entre las drogas empleadas para combatirla se encuentran en primer lugar los compuestos orgánicos de antimonio trivalentes y pentavalentes, siendo estos últimos los mejor tolerados y menos tóxicos. Sin embargo, estos presentan varios inconvenientes como: alto costo, efectos colaterales severos en algunos casos, variación respuesta -paciente y -especie infectante (Castro y col. 2003). De los compuestos pentavalentes se utilizan el antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime ®) y el estibogluconato de sodio (Pentostan®) (Bonfante y Barroeta, 2002) (Fig. 3). Los derivados de antimonio inhiben la glucólisis y la beta-oxidación de los ácidos grasos en el metabolismo del parásito, provocando una disminución en la generación de ATP y GTP (Castro y col. 2003).

Como drogas de segunda línea se emplea la anfotericina B, la pentamidina y la aminosidina (Fig. 3).

La anfotericina B actúa mediante su unión a esteroides y ésteres de colesterol de la membrana celular del parásito formando poros o canales que producen alteraciones en la permeabilidad, con pérdida de potasio, aminoácidos y purinas. Produce efectos colaterales como fiebre, escalofríos, cefalea, náuseas, vómitos, malestar general, convulsiones, pérdida de potasio y magnesio, anemia microcítica-hipocrómica, entre otros (Castro y col. 2003).

La pentamidina es una diamidina aromática con amplio espectro de actividad antiparasitaria (Vásquez, 2009), que actúa inhibiendo la topoisomerasa mitocondrial, inhibe la captación de poliaminas e inhibe la S-adenosilmetionina descarboxilasa (Gil y col, 2007;

Castro y col. 2003). Además, parece que inhibe la RNA-polimerasa, la función ribosomal y la síntesis de ácidos nucleicos (Ausina y Moreno, 2005).

La aminosidina es un aminoglucósido que se une a la subunidad ribosomal 30 S, inhibiendo la síntesis de proteínas. Asimismo, perturba la estructura y la permeabilidad de la membrana citoplasmática (Vásquez, 2009).

A partir del año 2002 se aprobó el uso de miltefosina como droga oral para el tratamiento de la leishmaniasis. La miltefosina es un alquil-fosfolípido usado para el tratamiento de leishmaniasis cutánea y visceral. Altera el metabolismo de lípidos de promastigotes de *L. mexicana*, la unión del glicosilfosfatidilinositol (GPI) a las proteínas y afecta la transducción de señales dentro del parásito, produce apoptosis en promastigotes de *Leishmania* (condensación del núcleo, fragmentación del ADN y pérdida del volumen celular). Además, tiene efectos sobre la mitocondria en promastigotes de *L. panamensis* provocando la reducción del potencial de membrana e inhibiendo la citocromo-c oxidasa dentro de la mitocondria (Dorlo y col. 2012).

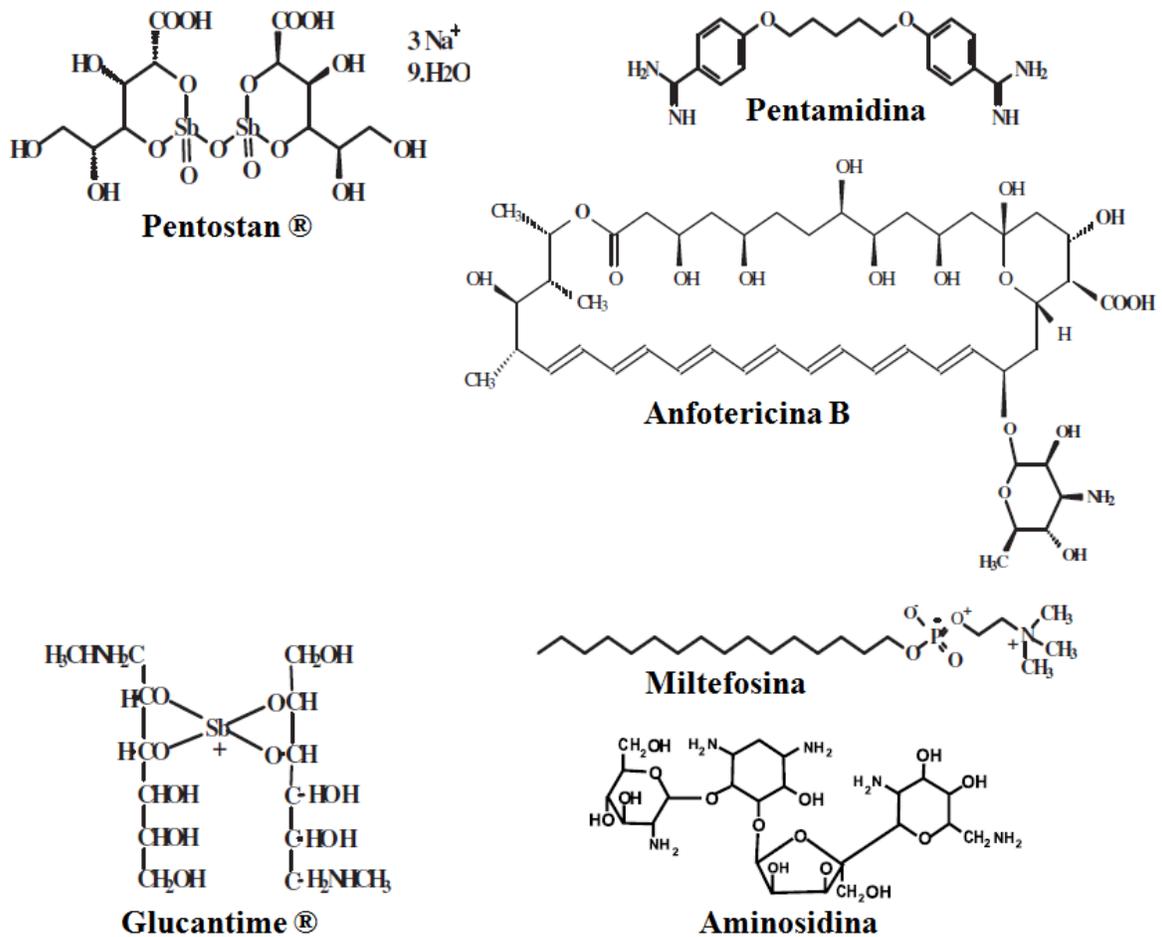


Figura 3. Estructura química de medicamentos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis. Tomado de Mesa y col. 2008 y Vásquez, 2009, con modificaciones.

Estos fármacos tienen una eficacia limitada, se desarrolla resistencia por parte del parásito, son tóxicos para el paciente, requieren administración parenteral (a excepción de la miltefosina), se requieren seguir tratamientos largos y costosos. Debido a estas razones, aún no existen fármacos completamente eficaces contra la enfermedad y de fácil accesibilidad para los pacientes. Hasta ahora no se cuenta con una vacuna, por lo que tampoco existe control de la enfermedad por esta vía (García y col. 2008).

Es necesario encontrar nuevas alternativas terapéuticas que posean una eficiente actividad antileishmanial, que resulten inocuas al administrarse a mamíferos y que además sean económicas (Jiménez y col. 2012).

1.2. Metabolitos secundarios como base para la obtención de drogas antileishmania

Las fuentes naturales constituyen una base para la obtención de principios químicos útiles para el desarrollo de nuevas drogas. En áreas endémicas se utiliza un gran número de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades infecciosas y parasitarias (García y col. 2008). Las plantas medicinales son una importante fuente de productos biológicamente activos, tales como carbohidratos, proteínas, enzimas, grasas y aceites, minerales, vitaminas, alcaloides, quinonas, terpenoides, flavonoides, carotenoides, esteroides, glucósidos fenólicos simples, taninos, saponinas, polifenoles, entre otros (Adejuwon y col. 2011), de los cuales muchos han servido como modelos para la síntesis de gran cantidad de fármacos, propiciando importantes avances en la terapéutica de varias enfermedades (Cuéllar y col. 2012).

En un estudio realizado por Hubert y col. 2013, se probaron once plantas usadas en la medicina tradicional de Camerún contra la forma de promastigote de *Leishmania donovani*. Los investigadores demostraron que después de 48 horas de incubación con los extractos de plantas, *Solanocia mannii* y *Solanum torvum* se observa una significativa inhibición de la proliferación de promastigotes, con valores de IC₅₀ de 60,78 ±5,05 µg/ml y 96,08 ±4,39 µg/ml, respectivamente.

Basándose en la información existente en la historia etnobotánica local, Kheiri y col. 2012, probaron extractos etanólicos de diecisiete plantas medicinales iraníes contra promastigotes de *Leishmania major* y macrófagos de la línea celular J774. Los investigadores demostraron que cuatro plantas mostraron alta actividad antileishmanial: *Caesalpinia gilliesii* (IC₅₀= 9,76 ±1,27 μM), *Satureia hortensis* (IC₅₀= 15,625 ±3,76 μM), *Carum copticum heirm* (IC₅₀= 15,625 ±5,46 μM) y *Thymus migricus* (IC₅₀= 31,25 ±15,44 μM) y fueron tóxicos contra macrófagos de la línea celular J774 en concentraciones más altas que las necesarias para inhibir el crecimiento celular del parásito. Estos resultados confirman que los productos naturales son una fuente potencial de agentes nuevos y selectivos que pueden contribuir significativamente en el desarrollo de nuevos fármacos o compuestos para el tratamiento de la leishmaniasis.

El fraccionamiento de extractos de plantas ha conducido al hallazgo de los metabolitos secundarios responsables de la actividad antiparasitaria.

Los aceites esenciales de *Allium sativum* (ajo) y *Rosmarinus officinalis* (romero), poseen amplio espectro antimicrobiano y antiparasitario, incluyendo a los parásitos del género *Leishmania* (Rojas y col. 2012).

Los flavonoides son compuestos polifenólicos con quince átomos de carbono, cuya estructura consta de dos anillos de benceno unidos por una cadena lineal de tres carbonos (Martínez, 2005). Son un tipo de metabolitos secundarios de especies vegetales que presentan actividad antileishmanial. Se ha demostrado que dos biflavonas de *Podocalyx loranthoides* fueron moderadamente activas contra promastigotes de *Leishmania mexicana* (Rojas y col. 2012).

Se ha demostrado que las fracciones obtenidas de extractos etanólicos de las hojas, de la corteza del tronco y de la corteza de la raíz de *Rollinia rufinervis* (Annonaceae) poseen actividad contra *Leishmania*. En fracciones con actividad citotóxica se ha detectado la presencia de acetogeninas, que pueden ser responsables de la actividad antiparasitaria. Las fracciones fueron probadas a concentraciones entre 0.095 µg/mL y 100 µg/mL contra promastigotes de *Leishmania chagasi*, contrastando el efecto con glucantime como control. De las fracciones obtenidas de la planta, la de acetato de etilo de extracto de hojas presenta la mayor actividad, causando inmovilidad apreciable o total de los parásitos después de 72 horas de incubación (Hernández y col. 2005).

Passero y col. 2007, evaluaron la actividad antileishmania de un extracto metanólico de hojas de *Jacaranda puberula* y de fracciones obtenidas del mismo. El extracto crudo mostró inhibición del crecimiento de promastigotes de una manera dosis-dependiente con un IC₅₀ de 88.0 µg/mL e inhibición del crecimiento de las formas amastigotes dentro de macrófagos, con baja actividad (IC₅₀ de 359.0 µg/mL). Este extracto presentó actividad citotóxica contra macrófagos infectados con *L. amazonensis*, a concentraciones elevadas (>88.0 µg/mL). La fracción de hexano:acetato de etilo (3:2) y la de diclorometano:metanol (4:1) mostraron un efecto citotóxico sobre macrófagos murinos de manera dosis-dependiente, sin embargo, la fracción de metanol no presentó este efecto citotóxico, y su actividad sobre amastigotes fue mayor que la del extracto crudo (IC₅₀ de 14.0 µg/mL), por lo que dicha fracción es potencialmente eficaz contra la leishmaniasis cutánea, representando una buena perspectiva para el desarrollo de nuevos compuestos leishmanicidas.

Brenzan y col. 2007, evaluaron la actividad antileishmanial *in vitro* de extractos de diclorometano de las hojas de *Calophyllum brasiliense*. Se demuestra que el extracto de diclorometano inhibe el crecimiento del parásito con IC₅₀ de 40.0 y 3.7 µg/mL para las formas promastigote y amastigote, respectivamente, después de 72 horas de incubación. La fracción de hexano mostró un efecto inhibitorio del crecimiento, mayor que el extracto de diclorometano, con IC₅₀ de 17.0 µg/mL para promastigotes y de 3.2 µg/mL para las formas amastigotes. De la fracción de hexano se purificó una cumarina (Mammea A/BB), la cual mostró mejor efecto inhibitorio del crecimiento de los parásitos, que la fracción de hexano y que el extracto de diclorometano, con IC₅₀ de 3.0 µg/mL contra promastigotes y de 0.88 µg/mL contra las formas amastigotes. También se demostró que la cumarina Mammea A/BB causa cambios ultraestructurales como una significativa alteración de la mitocondria con membranas concéntricas en la matriz mitocondrial, intensa actividad exocítica en la región de la bolsa flagelar con membranas concéntricas dentro de la bolsa, aparición de células binucleadas y vacuolización citoplasmática múltiple en promastigotes cuando se tratan con 3.0 µg/mL de cumarina Mammea A/BB durante 72 horas. Estos resultados indican la potente actividad leishmanicida, inhibidora del crecimiento y con capacidad de causar importantes cambios ultraestructurales en el parásito y sin toxicidad para macrófagos (Brenzan y col. 2007).

1.3. Actividad antiparasitaria y antibacteriana de metabolitos secundarios de *Carica papaya*

Carica papaya es una planta que sobresale como medicamento vegetal alternativo. Pertenece a la familia de las *Caricaceae*, es una planta herbácea tipo arbustiva de crecimiento continuo, con tallo sencillo que a veces se ramifica, tronco hueco y madera

esponjosa, que en su madurez alcanza alturas de hasta 10 metros. Esta especie es originaria de América Central, entre el sureste de México y Costa Rica. Es cultivada en la mayoría de los países de la zona intertropical del mundo; a lo largo de los trópicos y en zonas subtropicales cálidas (Mateo, 2005).

Respecto a los componentes químicos presentes en las hojas y semillas de la planta se encuentran: alcaloides, enzimas, esteroides, glicósidos, lípidos, carotenos y componentes azufrados (Tabla 1).

Dentro de los diversos usos dados a dicha planta, destaca la utilización de sus semillas como desparasitante y antipirético, además de sus propiedades medicinales como antiséptico, antiparasitario, antiinflamatorio, antidiabético y anticonceptivo (Cuéllar y col. 2012; Bamisaye y col. 2013).

Desde hace muchos años se ha estudiado la actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de la papaya. En Nigeria, Emeruwa (1982) utilizó extractos de frutos maduros y verdes de *Carica papaya* (epicarpo, endocarpo y semillas) como sustancia antibacteriana, obteniendo diferentes grados de actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas Aeruginosa* y *Shigella flexneri*. Los extractos, además de inhibir el crecimiento de las bacterias, ocasionaron cambios en la morfología celular de *S. aureus*, *B. cereus* y *E. coli*, como hinchamiento y acortamiento de las células.

Tabla 1. Principales compuestos químicos presentes en hojas y semillas de *Carica papaya*. Tomado de Osuna y col. 2005 y Fonnegra y Jiménez, 2007.

Compuesto	Hojas	Semillas
Alcaloides	Carpaína, pseudocarpaína, colina, nicotina, dehidrocarpaína I y II, cotinina, miosmina	Carpaína, carpasemina
Enzimas	Papaína, quimopapaína	Mirosina
Esteroles	B-sitosterol	B-sitosterol, Hidroavenasterol, campesterol, colesterol, estigmasterol, 5 δ -estigmasterol,
Glicósidos	Cianogénico	Sinigrino
Lípidos	Ácido láurico, linoleíco, oleico, palmítico, esteárico	Ácido linoleíco, mirístico, oleico, palmítico, esteárico
Carotenoides	β -caroteno	β -caroteno
Componentes azufrados	Bencilglucosinolato, aglicona bencilglucotropaeolina	Benciltiocinato, bencil senevoles

Jiménez y col. 2013, evaluaron la actividad antiprotozoaria *in vivo* en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi* de un extracto clorofórmico crudo de semillas de *Carica papaya* a dosis de 50 y 75 mg/kg y de una mezcla de compuestos (ácido oleico, palmítico y esteárico) obtenida del extracto clorofórmico a concentraciones de 100, 200 y 300 mg/kg, contra las formas infectivas del parásito (tripomastigote sanguíneo y amastigote), utilizando buffer fosfato salino (PBS) como control negativo y alopurinol (8.5 mg/kg) como control

positivo. Ambos extractos se administraron oralmente durante 28 días. Los investigadores observaron una actividad antiprotozoaria significativa de *C. papaya* en ratones tratados con el extracto clorofórmico crudo, así como en ratones tratados con las mezclas de compuestos, además, mostraron la actividad antiprotozoaria de ambos extractos contra la forma de tripomastigote, pero no se demuestra actividad significativa contra los nidos de amastigotes en tejido cardíaco. Estos resultados demuestran que los ácidos grasos identificados en los extractos de semilla de *C. papaya* (de fruta madura) son capaces de reducir el número de parásitos en las etapas de tripomastigote sanguíneo y amastigote. Además, demuestran que el extracto clorofórmico tiene actividad antiprotozoaria significativa, pero no elimina totalmente los tripomastigotes de *T. cruzi* durante la fase activa de infección (Jiménez y col. 2013).

Valadeau y col. 2009, utilizaron en un estudio noventa y cuatro extractos etanólicos de diferentes partes de plantas utilizadas con fines medicinales por la etnia amazónica peruana Yanasha, para afecciones relacionadas con la leishmaniasis y la malaria. Los investigadores probaron los extractos contra amastigotes axénicos de *Leishmania amazonensis* y contra una cepa de *Plasmodium falciparum* resistente a la cloroquina. De las plantas probadas, ocho especies mostraron actividad leishmanicida interesante, entre las cuales destaca el extracto etanólico de hoja de *Carica papaya*, ya que mostró la mejor actividad con valores de IC_{50} de 11 ± 1.2 ($\mu\text{g/ml}$) después de 72 horas de incubación frente a anfotericina B, la cual se utilizó como droga de referencia para *Leishmania*, con valores de IC_{50} de 0.14 ± 0.03 ($\mu\text{g/ml}$).

En estudios realizados por Cuellar y col. 2012, se demuestra una moderada actividad antiprotozoaria y antileishmanial de un extracto metanólico de hojas, enriquecido

en alcaloides de *C. papaya* y menor actividad de una fracción de n-hexano del extracto metanólico de hojas. El extracto enriquecido en alcaloides mostró mayor actividad que la fracción de n-hexano frente a promastigotes de *Leishmania amazonensis* y frente a estadios intraeritrocitarios de *Plasmodium berghei*, obteniendo valores de IC₅₀ de 73.3 µg/ml de extracto de alcaloides frente a *L. amazonensis* y de 50.0 µg/ml frente a esquizontes de *P. berghei*. La fracción de n-hexano mostró valores de IC₅₀ mayores a 100 µg/ml y 50 µg/ml frente a *L. amazonensis* y *P. berghei*, respectivamente. El extracto enriquecido en alcaloides mostró menor IC₅₀, siendo más efectivo contra el crecimiento de estadios intraeritrocitarios de *Plasmodium berghei* que contra el crecimiento de promastigotes de *Leishmania amazonensis*.

Estos estudios demuestran la actividad que presentan extractos de *Carica papaya* contra distintos organismos patógenos. Por tal razón, es posible considerar un estudio más profundo sobre el potencial terapéutico de la planta contra la leishmaniasis. Dado que el mayor número de reportes encontrados en la literatura describen el efecto de extractos de hoja de *C. papaya*, consideramos interesante evaluar el efecto leishmanicida de extractos de semillas de la planta.

2. OBJETIVOS

2.1. General:

Evaluar el efecto de extractos metanólicos de semillas de *Carica papaya* sobre *Leishmania mexicana* MHOM/BZ/82/BEL21 (BEL21).

2.2. Específicos:

Obtener extractos metanólicos a partir de semillas de *Carica papaya*.

Evaluar el efecto de los extractos metanólicos sobre el crecimiento de cultivos de promastigotes de *L. mexicana*.

Determinar el efecto citotóxico de los extractos metanólicos sobre los promastigotes.

Evaluar mediante microscopía de fluorescencia el efecto de los extractos metanólicos sobre la morfología y la parálisis del ciclo celular o citocinesis.

Evaluar la citotoxicidad de los extractos metanólicos sobre macrófagos de la línea celular murina J774.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cultivo celular

3.1.1. Cultivo de promastigotes

Para el estudio del efecto leishmanicida de extractos metanólicos de semillas de *Carica papaya*, se trabajó con cultivos de parásitos de la especie *Leishmania mexicana* (BEL21). Los promastigotes se cultivaron a 25 °C, sin agitación, en medio de cultivo T-Y (triptosa 10,0 g/L, extracto de levadura 2,5 g/L, fosfato disódico 7,5 g/L, cloruro de sodio 8,0 g/L) pH 7.2 según lo descrito por Limoncu y col. 1997, con algunas modificaciones, suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (60 °C, 30 min).

3.1.2. Cultivo de macrófagos

Los macrófagos de la línea celular murina J774 se cultivaron en frascos de cultivo con medio RPMI 1640 con L-glutamina, suplementado con 10% de SFB inactivado por calor, estreptomycin y penicilina a concentración final de 0,1 µg/ml y 100 U/ml, respectivamente. Los cultivos se mantuvieron en una estufa a 37 °C, en una atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad.

Una vez que los macrófagos alcanzaron la confluencia, se removió el medio de cultivo y se agregó buffer fosfato salino (PBS) frío estéril. Se centrifugó la suspensión celular en una centrífuga MSI Minor de rotor basculante a 2600 rpm durante 10 minutos y las células se resuspendieron en medio fresco. Se comprobó la viabilidad celular mediante la prueba de exclusión de azul tripano, agregando 5 µl de azul de tripano al 0,8% a 100 µl de la suspensión celular.

Este es un método utilizado para determinar el número de células viables presentes en una suspensión celular. Se basa en el principio de que las células vivas poseen membranas celulares intactas que excluyen el colorante, mientras que las células muertas no lo excluyen. Las células vivas no son coloreadas ya que el colorante no entra en las células, por lo que tendrán un citoplasma claro, mientras que las células muertas tendrán un citoplasma azul (Strober, 1997).

3.2. Contaje celular

Se estimó el número de promastigotes presentes en el cultivo celular mediante el contaje directo en la cámara de Neubauer. Previamente se diluyó una alícuota del cultivo (1:1) con formaldehído al 3,7%. Se calculó la concentración de células en cada cultivo (cel/mL) utilizando la siguiente fórmula:

$$C = (\text{N}^\circ \text{ de células promedio por cuadrante central} / \text{Volumen (mL)}) \times \text{N}^\circ \text{ de casillas} \\ \times \text{Dilución} \times \text{Volumen de cultivo (mL)}.$$

Donde el volumen del cuadrante central es constante e igual a 10^{-4} (0,0001 mL).

El número de macrófagos se determinó por contaje directo en la cámara de Neubauer. Se realizó una dilución 1:1 de la suspensión celular con azul de tripano. Se contaron las células vivas utilizando los cuadrantes externos de la cámara. Se utilizó la siguiente expresión para calcular la concentración de células:

$$C = (\text{N}^\circ \text{ de células promedio} / \text{Volumen de los 4 cuadrantes secundarios (10}^{-4} \text{ mL)}) \times \\ \text{Dilución} \times \text{Volumen de cultivo (mL)}.$$

3.3. Obtención de extractos metanólicos

Las semillas se recolectaron de frutos maduros de *Carica papaya*, se lavaron con agua destilada, se secaron en la estufa a 42 °C y se molieron. El polvo obtenido se almacenó en un envase de vidrio bajo protección de la luz.

Se tomaron 20 g de polvo de semilla y se agregaron 100 ml de metanol para su extracción, con agitación continua durante 24 horas. El extracto se filtró en papel Watman N° 1 y se almacenó el filtrado en refrigeración. Se agregaron 100 ml de metanol al residuo de polvo de semillas y se agitó durante 3 horas. Se repitió el proceso una vez más. Se agregaron 100 ml de metanol y se dejó en agitación durante 18 horas. Se mezclaron todos los filtrados y se rotoevaporó a una temperatura de 55 - 60 °C con vacío, según lo descrito por Alzamora y col. 2007, con modificaciones de reducción del tiempo de extracción, de consecutivas extracciones y mezclado las mismas. Una vez concentrado el extracto se determinó el peso del residuo untuoso y se resuspendió en DMSO:H₂O (1:1). Se almacenó a -10°C hasta su uso.

3.4. Análisis fitoquímico de semillas pulverizadas y del extracto metanólico de semillas

La detección de metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de semilla y en extractos de polvo de semilla, se realizó mediante reacciones de identificación para cada compuesto fitoquímico:

❖ Alkaloides: utilizando los reactivos de Wagner y Hager (Marcano y Hasegawa, 2002). En 1 tubo de ensayo se agregaron 3 ml de ácido clorhídrico (HCl) al 5% y 150 µl de extracto (1g/ml), se calentó en baño María durante 5 minutos, se enfrió y se

filtró. Se transfirió 1ml del filtrado en dos tubos de ensayo, al primer tubo se le adicionaron 2 gotas del reactivo de Wagner (yodo 1,27 % y yoduro de potasio al 2%) y al segundo 2 gotas del reactivo de Hager (solución de ácido pícrico al 10 %). La presencia de turbidez o precipitado, se consideró positiva.

❖ Compuestos Fenólicos: utilizando ensayo de cloruro férrico. En 1 tubo de ensayo se colocaron 3 ml de agua miliQ y 150 µl de extracto (1g/ml), se calentó en baño María durante 15 minutos, se enfrió y se filtró. Se transfirió 1ml del filtrado acuoso a un tubo de ensayo y se adicionaron 3 gotas de FeCl₃ al 2,5 % en metanol al 50%. Los compuestos fenólicos dan coloración o precipitado verdoso con sales de hierro.

❖ Flavonoides: utilizando el ensayo con hidróxido de sodio. En 1 tubo de ensayo se colocaron 3ml de agua miliQ y 150µl de extracto (1g/ml), se calentó en baño María durante 15 minutos, se enfrió y se filtró. Se transfirió 1ml del filtrado acuoso en un tubo de ensayo y se adicionaron 3 gotas de NaOH 1N. Los flavonoides se solubilizan en soluciones alcalinas diluidas, dando o intensificando la coloración amarilla.

❖ Glicósidos cianogénicos: utilizando papel picrosódico. Con la ayuda de una espátula se disolvió en 1ml de agua miliQ, una pequeña porción de extracto metanólico seco. Una tira de papel de filtro Whatman N° 1 se impregnó con una solución de ácido pícrico al 1%, se dejó secar para luego impregnarla con carbonato de sodio al 10%. Una vez seca, se introdujo la tira dentro de un tubo de ensayo y se tapó el tubo sujetando la misma. Se calentó en baño María durante 30 minutos. El desprendimiento de gas CNH se detecta en la tira de papel picrosódico de color amarillo, que se transforma en ácido isopurpúrico de color naranja por el CNH desprendido.

❖ Saponinas: utilizando el reactivo de Rosenthaler y el ensayo de espuma. Se colocaron 0,5ml de filtrado acuoso en un tubo de ensayo y se diluyó con 4,5ml de agua

miliQ. Se transfirió 1ml del filtrado diluido a un tubo de ensayo, se agregó 1 gota del reactivo de Rosenthaler (vainillina al 1% en metanol) y 1 gota de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado. El volumen restante del filtrado diluido se tapó y agitó vigorosamente durante 2 minutos. Las saponinas dan coloración violeta con el reactivo de Rosenthaler. La presencia de espuma de grosor >5mm y estable durante 30 minutos se considera positiva para la prueba de la espuma.

❖ **Taninos:** Utilizando el reactivo de gelatina-sal (gelatina al 1% y cloruro de sodio al 10%). Se transfirió 1ml de filtrado acuoso en un tubo de ensayo y se añadió 1ml de solución de gelatina-sal. La formación de precipitado, turbidez y/o coloración verde, azul o negra es prueba positiva de la presencia de taninos.

Los ensayos con el polvo de semilla se realizaron de manera similar a los ensayos antes descritos, disolviendo 2,5 gr de polvo de semilla en 30 ml del solvente requerido para cada prueba.

3.5. Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de semilla de *Carica papaya*

Se realizaron diluciones seriadas del extracto metanólico de semilla, con medio de cultivo, en placas de 96 pozos. Se ensayaron concentraciones finales de 25.0, 12.5, 6.25, 3.125 y 0.625, 0.312, 0.156 mg/ml. Las placas se incubaron durante 48 horas a 25 °C y se evaluó la reducción del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difenil tetrazolio bromuro) incubando durante 4 horas. La absorbancia se estimó a 570nm. Este ensayo se utiliza como una herramienta para medir el potencial antioxidante de gran variedad de extractos de productos naturales y compuestos puros (Liu y Nair, 2010).

3.6. Efecto citotóxico de los extractos metanólicos sobre los cultivos de promastigotes

Se realizaron diluciones seriadas del extracto metanólico de semilla, con medio de cultivo, en placas de 96 pozos y se agregaron 50 µl de suspensión de parásitos 4×10^6 cel/mL (2×10^5 parásitos/pozo). Se obtuvieron concentraciones finales de 25.0, 12.5, 6.25, 3.125 y 0.625, 0.312, 0.156 mg/ml. Las placas se incubaron a 25 °C y se evaluó la citotoxicidad a las 48 horas mediante el método de reducción del MTT.

Este es un ensayo colorimétrico basado en la reducción metabólica del MTT mediante la acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa que separa el anillo de tetrazolio del MTT, formándose el compuesto formazán, de color azul, parcialmente insoluble en agua y soluble en disolventes orgánicos, como el isopropanol que produce una solución homogénea adecuada para la medición de la densidad óptica. El método permite medir la supervivencia y la proliferación celular, ya que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán formado (Mosmann, 1983).

Finalizado el periodo de incubación, se agregaron 50 µl de MTT (1 mg/ml en PBS) a cada pozo y se incubó la placa a 25°C por 4 horas. Se realizó la interrupción de la reacción enzimática y la extracción del formazán agregando 50 µl de dodecilsulfato sódico (SDS) al 20% a cada pozo. Se determinó indirectamente el número de promastigotes vivos midiendo la cantidad de formazán producido, a 570 nm en un lector de ELISA.

Finalmente, se calculó el porcentaje de viabilidad y de inhibición utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Viabilidad} = (AT-AB)/(AC-AB) \times 100$$

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \% \text{ Viabilidad}$$

Donde:

AT: Absorbancia de parásitos tratados con el extracto

AC: Absorbancia de parásitos no tratados

AB: Absorbancia del medio de cultivo

La concentración que produce 50% de inhibición del crecimiento celular del cultivo (IC_{50}) se calculó mediante el programa PRISMA 5, dicho valor se obtuvo mediante una regresión no lineal de los datos y mediante el análisis de la curva del logaritmo de la dosis versus el porcentaje de inhibición.

Como controles se utilizó DMSO como diluyente del extracto y la suspensión de parásitos en ausencia de droga como control positivo. Como blanco se utilizó medio de cultivo T-Y. Además, se utilizó el extracto metanólico sin parásitos como control de la actividad reductora de MTT.

3.7. Efecto de los extractos metanólicos sobre el crecimiento de cultivos de promastigotes

Se preparó un cultivo celular de 6×10^6 células/mL en medio T-Y suplementado con SFB al 5%, estreptomicina y penicilina a concentración final de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ y 100 U/mL respectivamente. Se prepararon cultivos de promastigotes en frascos de cultivo, con diferentes concentraciones finales del extracto de semilla (1.667, 0.833, 0.416 y 0.208 mg/ml). El volumen final de cada frasco fue de 3ml. Como controles se utilizó la suspensión de parásitos sin extracto y DMSO 0,083% con parásitos. Los cultivos se incubaron a 25 °C, durante 48 horas. Se realizó conteo de promastigotes en la cámara de

Neubauer. Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento de los promastigotes y se graficaron los resultados con la ayuda del programa Prisma 5.

3.8. Evaluación del efecto de los extractos metanólicos sobre la morfología de los promastigotes y la parálisis de la citocinesis

Se incubaron 2×10^6 cel/ml con el extracto metanólico de semilla a concentración de 0.2 mg/ml, en frascos de cultivo durante 48 horas a 25 °C.

Una vez finalizado el período de incubación, se colocó la suspensión de promastigotes sobre un portaobjetos y se agregó igual volumen de naranja de acridina 1,44 mg/ml. Las modificaciones a nivel morfológico se observaron mediante microscopía de contraste de fases y fluorescencia, con objetivo de 100X, en un microscopio NIKON eclipse.

La naranja de acridina (N,N,N'N'-tetrametilacridina) es un colorante fluorescente catiónico selectivo para los ácidos nucleicos en forma nativa o desnaturalizada. Interactúa con el ADN por intercalación dentro de la molécula y con el ARN por interacciones electrostáticas. La naranja de acridina cuando está asociada al ADN, es espectralmente similar a la fluoresceína, y presenta un máximo de excitación a 502 nm y una emisión a 525 nm (en el verde). Al asociarse con el ARN, la excitación máxima deriva a 460 nm (en el azul) y la emisión máxima a 650 nm (en el rojo) (<http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioTinciones.htm>;

<http://virologiamedicafesc.blogspot.com/2010/09/naranja-de-acridina.html>). La naranja de acridina (AO) impregna todas las células y hace que los núcleos aparezcan de color verde, lo cual permite utilizarla como colorante vital, dando fluorescencia verde con células en

fase de división activa y/o con microorganismos vivos y fluorescencia naranja con microorganismos muertos (Ribble y col. 2005).

3.9. Evaluación del efecto de extractos metanólicos sobre macrófagos de la línea celular murina J774

Con la finalidad de determinar la selectividad de los extractos de semillas de *Carica papaya* sobre *Leishmania*, se estudió el efecto citotóxico de los extractos sobre macrófagos murinos J774. Los macrófagos recolectados de los cultivos, se resuspendieron a relación de 2×10^4 cel/ml y se sembraron en placas de 96 pozos (2×10^3 cel/pozo). Después de la incubación a temperatura de 37 °C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa, durante 24 horas, los macrófagos se incubaron con diferentes concentraciones del extracto metanólico (6.05, 3.03, 1.51, 0.76, 0.38, 0.19, 0.09 y 0.05 mg/mL) durante 48 horas, bajo las condiciones anteriormente descritas. Transcurrido el tiempo de incubación, se estimó la viabilidad de los macrófagos mediante el método del MTT.

Se determinó indirectamente el crecimiento de macrófagos, midiendo la cantidad de formazán producido, en un lector de ELISA a 570 nm.

El IC₅₀ se calculó mediante el programa PRISMA 5, por medio de una regresión no lineal de los datos y el análisis de la curva del logaritmo de la dosis versus el porcentaje de crecimiento.

El índice de selectividad (IS) se determinó como el cociente entre el IC₅₀ de los macrófagos y el IC₅₀ de los promastigotes (Valencia y col. 2011).

3.10. Evaluación del efecto de los extractos metanólicos sobre amastigotes intracelulares

Los macrófagos se resuspendieron a relación de 5×10^5 cel/mL y se sembraron 2×10^5 cel/pozo sobre cubreobjetos estériles en una placa de 6 pozos. Se incubó la placa en la estufa a temperatura de 37 °C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa durante 4 horas. Posteriormente se lavaron los pozos 2 veces con PBS 1X estéril, se agregó medio fresco y se incubó la placa durante 24 horas. Se realizaron dos lavados con PBS 1X estéril, se incubaron con promastigotes en fase estacionaria en una proporción de 10 promastigotes por macrófago durante 4 horas, bajo las condiciones descritas previamente. Posteriormente, se removieron los parásitos extracelulares mediante 2 lavados con PBS estéril. Se incubó la placa durante 24 horas para permitir el desarrollo de la infección, se retiró el medio de los pozos y se incubaron los macrófagos infectados durante 48 horas en la estufa bajo las mismas condiciones utilizadas previamente, con concentraciones de 0.2 y 1.0 mg/ml del extracto metanólico. Finalizado el período de incubación, los cubreobjetos se sumergieron en metanol frío fijando las células y se tiñó con colorante de Giemsa (1:10) en agua durante 20 min.

La tinción de Giemsa se basa en la distinta afinidad que tienen las células y sus componentes, a los colorantes incluidos en el colorante de Giemsa, permitiendo identificar parásitos dentro de células hospederas. Los núcleos de células y de protozoarios se observan de color violeta, mientras que el citoplasma se observa de color rosado.

El número de macrófagos infectados se determinó mediante observación de 500 macrófagos por cubreobjeto.

3.11. Fraccionamiento de los extractos metanólicos mediante cromatografía en gel de Sílice.

Se pesaron 20 gr de gel de sílice y se agregaron 100 ml de isopropanol. Se empacó la sílica en una columna vertical.

El extracto se adsorbió al gel de sílice y se colocó en la columna. Se eluyó con 20 ml de isopropanol recolectando fracciones de 10 ml. Luego se eluyó con 20 ml etanol, 20 ml metanol y 20 ml de metanol:agua (8:2) recolectando fracciones de 10 ml. Las fracciones se evaporaron en la estufa a 35 °C. El sedimento de cada fracción se resuspendió en DMSO:Agua (1:1).

4. RESULTADOS

4.1. Análisis fitoquímico de semillas pulverizadas y del extracto metanólico de semillas

Se realizaron diferentes pruebas cualitativas con la finalidad de identificar diferentes compuestos presentes en semillas de papaya. El análisis fitoquímico cualitativo de los extractos reveló la presencia de alcaloides, compuestos fenólicos; como flavonoides y taninos y glicósidos cianogénicos (Tabla 2). No se logró identificar saponinas en los extractos metanólicos de semillas ni en el polvo de semilla.

Tabla 2. Análisis fitoquímico del extracto metanólico y del polvo de semillas de *Carica papaya*.

Compuesto fitoquímico	Prueba	Extracto (1g/ml)	Polvo de Semilla
Alcaloides	Hager	+	+
	Wagner	+	+
Compuestos fenólicos (Flavonoides, Taninos)	Cloruro férrico	+	+
Flavonoides	Hidróxido de Sodio	+	+
Glicósidos cianogénicos	Papel picrosódico	+	+
Saponinas	Espuma	-	-
	Rosenthaler-H ₂ SO ₄	-	-
Taninos	Gelatina-sal	+	+

4.2. Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de semillas

Los resultados de las placas (absorbancia) con el extracto metanólico, obtenidos mediante el lector de Elisa (570 nm), presentaron una reducción del MTT superior a la del control, lo cual condujo a ensayar el extracto sin parásitos, a las mismas concentraciones a las ensayadas con los promastigotes con la finalidad de determinar la causa de tal efecto. Los ensayos con el extracto metanólico sin promastigotes, causaron la reducción del MTT, indicando que el extracto posee actividad antioxidante.

Los resultados obtenidos de tres experimentos realizados por duplicado, de la actividad antioxidante del extracto metanólico se muestran en la figura 4, indicando una dependencia lineal de la absorbancia respecto a la concentración de extracto.

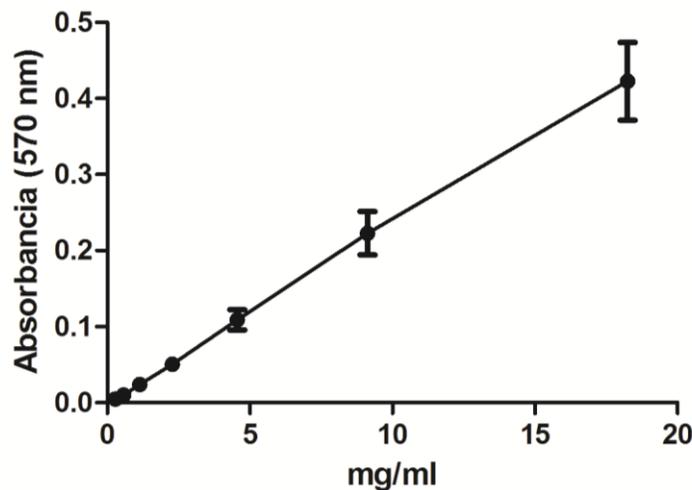


Figura 4. Actividad antioxidante del extracto metanólico de semillas de *C. papaya*. El extracto se incubó con MTT durante 4 horas y se midió la absorbancia a 570 nm para determinar su efecto antioxidante.

4.3. Efecto citotóxico de los extractos metanólicos sobre los cultivos de promastigotes

Con la finalidad de estudiar el efecto citotóxico de los extractos metanólicos de semillas de *Carica papaya* sobre promastigotes de *Leishmania mexicana*, se incubaron los parásitos con diferentes concentraciones del extracto de semilla.

Una vez determinado el efecto antioxidante del extracto metanólico, se restó dicho efecto y el efecto del DMSO, determinando así el efecto citotóxico neto del extracto sobre los promastigotes. La figura 5, muestra la curva del porcentaje de citotoxicidad de los extractos metanólicos contra promastigotes de *L. mexicana*, de cuatro experimentos realizados por triplicado. Se observó que a concentraciones mayores de 3.12 mg/ml, se logró 100% de citotoxicidad. El análisis estadístico realizado por el programa Prisma 5, mediante una regresión no lineal de los datos, arrojó una curva hiperbólica con valor de $IC_{50} = 0,18 \pm 0,02$ mg/ml. La curva hiperbólica presentó un R^2 de 0,76.

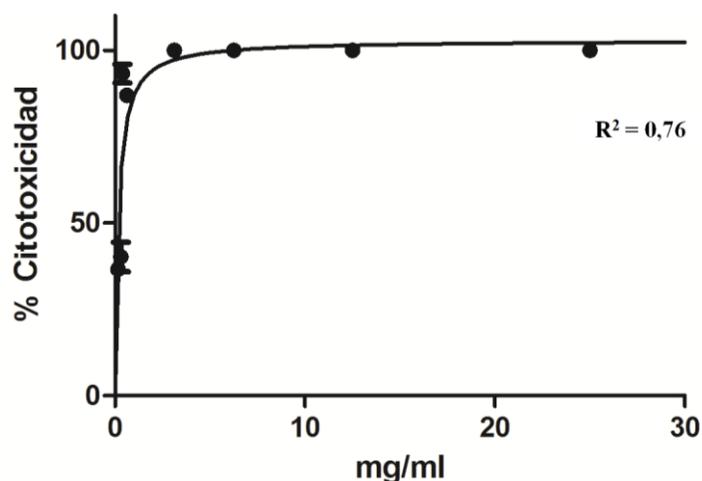


Figura 5. Porcentaje de citotoxicidad de los extractos metanólicos de semillas. Los promastigotes se incubaron durante 48 horas con los extractos y se evaluó la citotoxicidad mediante el método del MTT. Se muestran los datos producto de cuatro experimentos realizados por triplicado. El ajuste de los puntos de la curva arrojó un $IC_{50} = 0,18 \pm 0,02$ mg/ml.

4.4. Efecto de los extractos metanólicos sobre el crecimiento de cultivos de promastigotes

Debido a que los ensayos de citotoxicidad realizados podrían arrojar resultados inexactos por los efectos de restar la actividad antioxidante del extracto, se procedió a determinar el efecto de los extractos sobre el crecimiento de cultivos mediante contaje celular. Los promastigotes se incubaron en frascos de cultivo, con diferentes concentraciones finales (1.667, 0.833, 0.416 y 0.208 mg/ml) del extracto de semilla. La Figura 6, muestra la curva del porcentaje de inhibición del crecimiento de los promastigotes de *L. mexicana* versus la concentración del extracto. Los datos provienen de cinco experimentos, de los cuales, en dos se realizó contaje por duplicado. Se observa que con la más alta concentración utilizada (1,667 mg/ml) se alcanzó 99,34% de inhibición a las 48 horas de incubación. A partir de los resultados de porcentaje de inhibición obtenidos se realizó una regresión no lineal de los datos, obteniendo un IC_{50} de $0,20 \pm 0,05$ mg/ml.

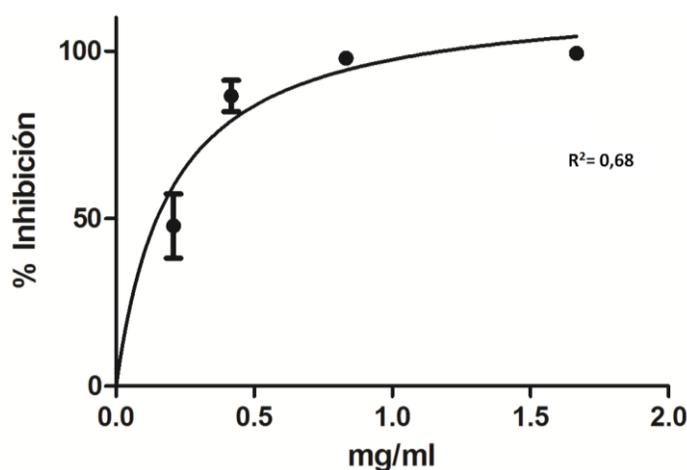


Figura 6. Efecto del extracto metanólico de semilla de *C. papaya* sobre el crecimiento de cultivos de promastigotes. Los promastigotes se incubaron durante 48 horas con los extractos y se realizó contaje celular en la cámara de Neubauer. Los datos son producto de cinco experimentos independientes. El ajuste de los puntos de la curva permitió obtener un valor de IC_{50} de $0,20 \pm 0,05$ mg/ml.

4.5. Evaluación del efecto de los extractos metanólicos sobre la morfología de los promastigotes

La evaluación de la morfología de los parásitos tratados con el extracto metanólico, mediante microscopía de contraste de fases, permitió observar vacuolización celular (fig. 7-B1), además, del bloqueo de la división celular caracterizado por alteraciones en el movimiento flagelar, la presencia de flagelos cortos o la pérdida del mismo (Fig. 7-B2).

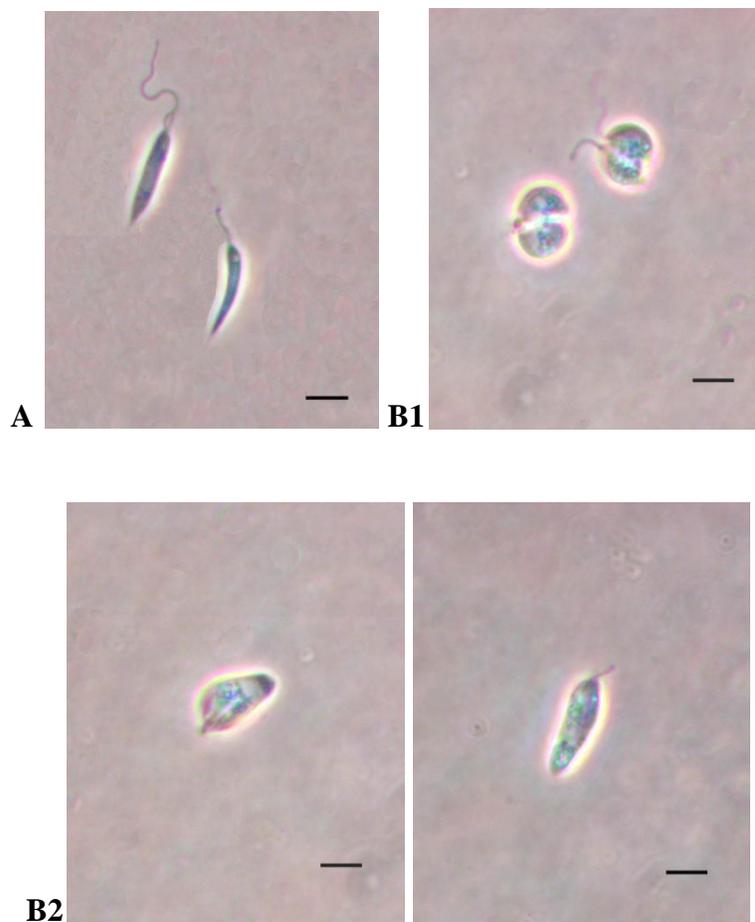


Figura 7. Cambios morfológicos producidos en promastigotes de *L. mexicana*. Los parásitos se incubaron con 0,2 mg/ml del extracto durante 48 h. Barra 10 μ m.

La evaluación de los parásitos tratados con el extracto metanólico, mediante microscopía de fluorescencia con naranja de acridina, permitió observar que las células, en general presentan un solo núcleo y un único kinetoplasto (Fig. 8B). Sin embargo, en

comparación con las células control (Fig. 8A), el núcleo es de mayor tamaño. Estos resultados demuestran que aunque los extractos presentan actividad leishmanicida moderada contra promastigotes de *L. mexicana*, causan alteraciones morfológicas en los parásitos, afectando su movimiento y alterando los eventos de división flagelar, además de alteraciones en el tamaño del núcleo, vacuolización, formas redondeadas u ovaladas y aparente detención del evento de citocinesis.



Figura 8. Cambios morfológicos en promastigotes de *L. mexicana* observados mediante microscopía de contraste de fases y fluorescencia con naranja de acridina. Control (A), Tratados con 0,2 mg/ml de extracto metanólico (B). Barra: 10 µm.

4.6. Evaluación del efecto de extractos metanólicos sobre macrófagos de la línea celular murina J774

Con la finalidad de determinar la selectividad de los extractos metanólicos de semillas de *C. papaya* contra promastigotes de *L. mexicana*, nos planteamos estudiar el efecto citotóxico de los extractos sobre macrófagos murinos J774, incubados durante 48 horas. La Figura 9, muestra la curva del logaritmo de la dosis de extracto versus el porcentaje de crecimiento de los macrófagos, de tres experimentos realizados por triplicado.

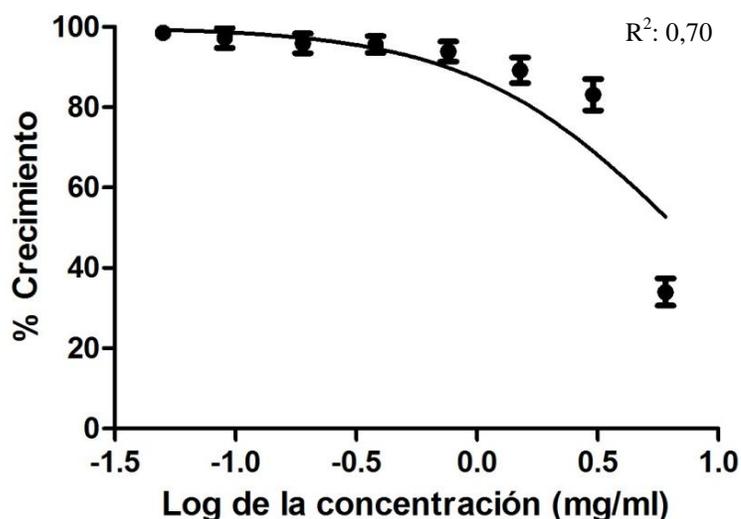


Figura 9. Porcentaje de crecimiento de macrófagos vs el log de la concentración de extracto metanólico de semillas. Los macrófagos se incubaron durante 48 horas con los extractos y se evaluó la citotoxicidad mediante el método del MTT durante 4 horas. Los datos son producto de tres experimentos por triplicado. La curva permite estimar un valor de IC₅₀ de 6,75 mg/ml (log IC₅₀= 0,83 ±0,05 mg/ml).

Los resultados se obtuvieron mediante una regresión no lineal de los datos. El análisis de la curva arrojó un valor de IC₅₀ de 6,75 mg/ml y un R²=0,70. Se observó, que con valores mayores a 1 mg/ml, el crecimiento de los macrófagos es aproximadamente del

100%. Comparando los valores de IC_{50} obtenidos para los promastigotes mediante citotoxicidad y conteo celular ($IC_{50} = 0,18 \pm 0,02$ y $0,20 \pm 0,05$ mg/ml, respectivamente) frente al valor de IC_{50} obtenido para los macrófagos, es notable que existe un efecto selectivo sobre los promastigotes, calculándose un Índice de Selectividad de 37.

4.7. Evaluación del efecto de los extractos metanólicos sobre amastigotes intracelulares

Los macrófagos de la línea celular murina J774 se infectaron con los parásitos durante 4 horas y se incubó durante 24 horas para permitir el desarrollo de la infección, posteriormente se agregó el extracto metanólico de semillas a concentraciones de 0,2 y 1,0 mg/ml, estos valores corresponden al valor del IC_{50} y a un valor mayor que el IC_{50} del extracto metanólico obtenido en los ensayos con los promastigotes. Los resultados de un experimento realizado por duplicado, se muestran en la Figura 10, donde aparentemente no existen diferencias significativas entre las dos concentraciones utilizadas y el control sin extracto. Los extractos metanólicos mostraron baja actividad contra los amastigotes intracelulares de *L. mexicana* en los macrófagos murinos.

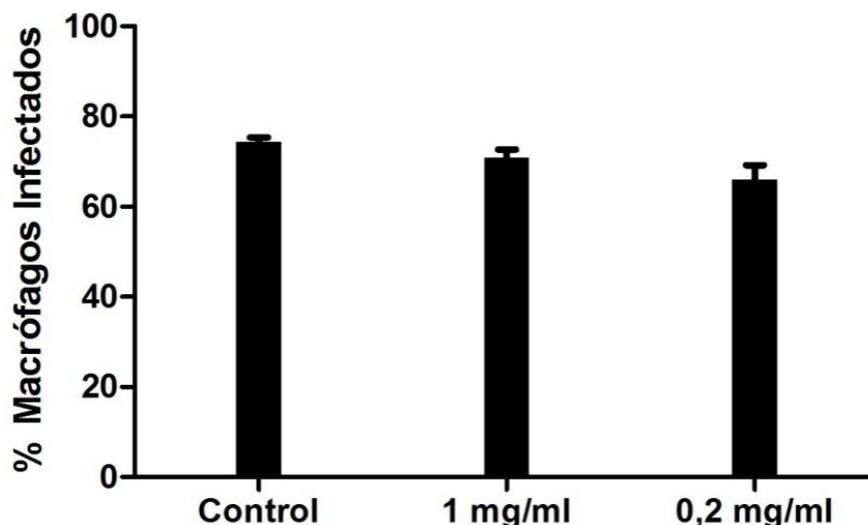


Figura 10. Efecto de extractos metanólicos de semillas de *C. papaya* sobre amastigotes internalizados. Los macrófagos se incubaron con dos concentraciones diferentes de extracto durante 48 horas y se contaron los macrófagos infectados. Se muestran los datos producto de un experimento realizado por duplicado.

4.8. Efecto de fracciones obtenidas de extractos metanólicos sobre el crecimiento de los promastigotes

En vista que los extractos metanólicos de semillas de *C. papaya* presentan actividad moderada contra los promastigotes, se procedió a fraccionar el extracto crudo mediante cromatografía en columna de sílica gel. Las fracciones se eluyeron con isopropanol (F1 y F2), etanol (F3 y F4), metanol (F5 y F6) y metanol-agua 1:1 (F7 y F8). La Figura 11 muestra los resultados obtenidos mediante conteo de promastigotes en la cámara de Neubauer, de tres experimentos realizados por duplicado. Las fracciones F3, F4 y F5 se ensayaron en un solo experimento por duplicado. De las fracciones estudiadas, la F1, F2, F3 y F7 fueron las que presentaron mayor actividad frente a los promastigotes, las cuales corresponden a las 2 eluciones con isopropanol, a la primera elución con etanol y a la primera elución con metanol-agua.

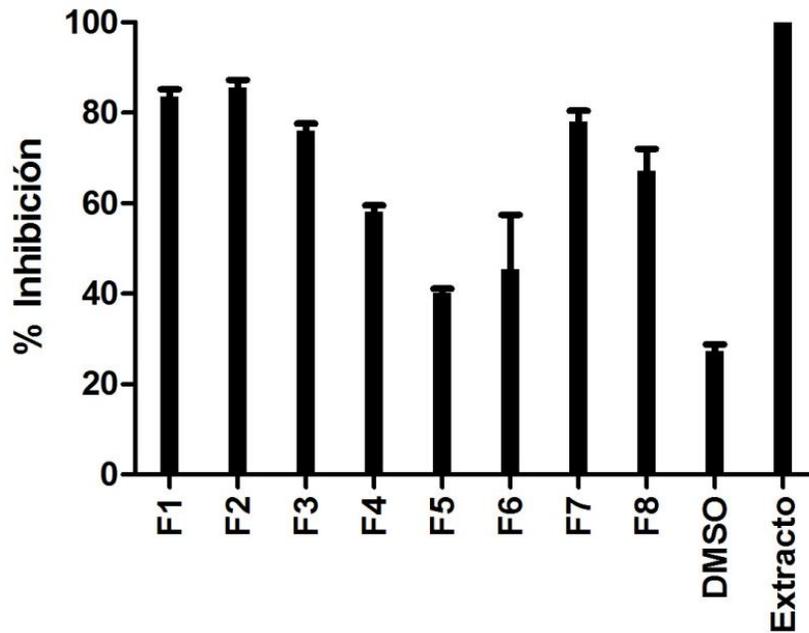


Figura 11. Efecto de fracciones del extracto metanólico sobre el crecimiento de los promastigotes. Se muestra el % de inhibición de fracciones obtenidas por cromatografía en columna de sílica gel, eluidas con isopropanol (F1 y F2), etanol (F3 y F4), metanol (F5 y F6) y metanol-agua 1:1 (F7 y F8). Los datos son producto de tres experimentos realizados por duplicado.

Mediante microscopía de contraste de fases se observaron notorias diferencias entre los promastigotes tratados con las diferentes fracciones y las células control (Fig 12A). En las fracciones de isopropanol (fig. 12B), se observaron promastigotes con flagelos cortos o sin flagelos que le ocasionaban dificultad o pérdida del movimiento, la presencia de células vacuoladas y células que pierden la forma alargada. Los promastigotes tratados con la primera fracción de etanol (fracción 3) se observaron con alteraciones en el proceso de división celular con células detenidas en citocinesis y células con dos flagelos (fig. 12C), además, se observaron células que presentaban movimiento flagelar pero anormal, células vacuoladas y con extensiones de la membrana.

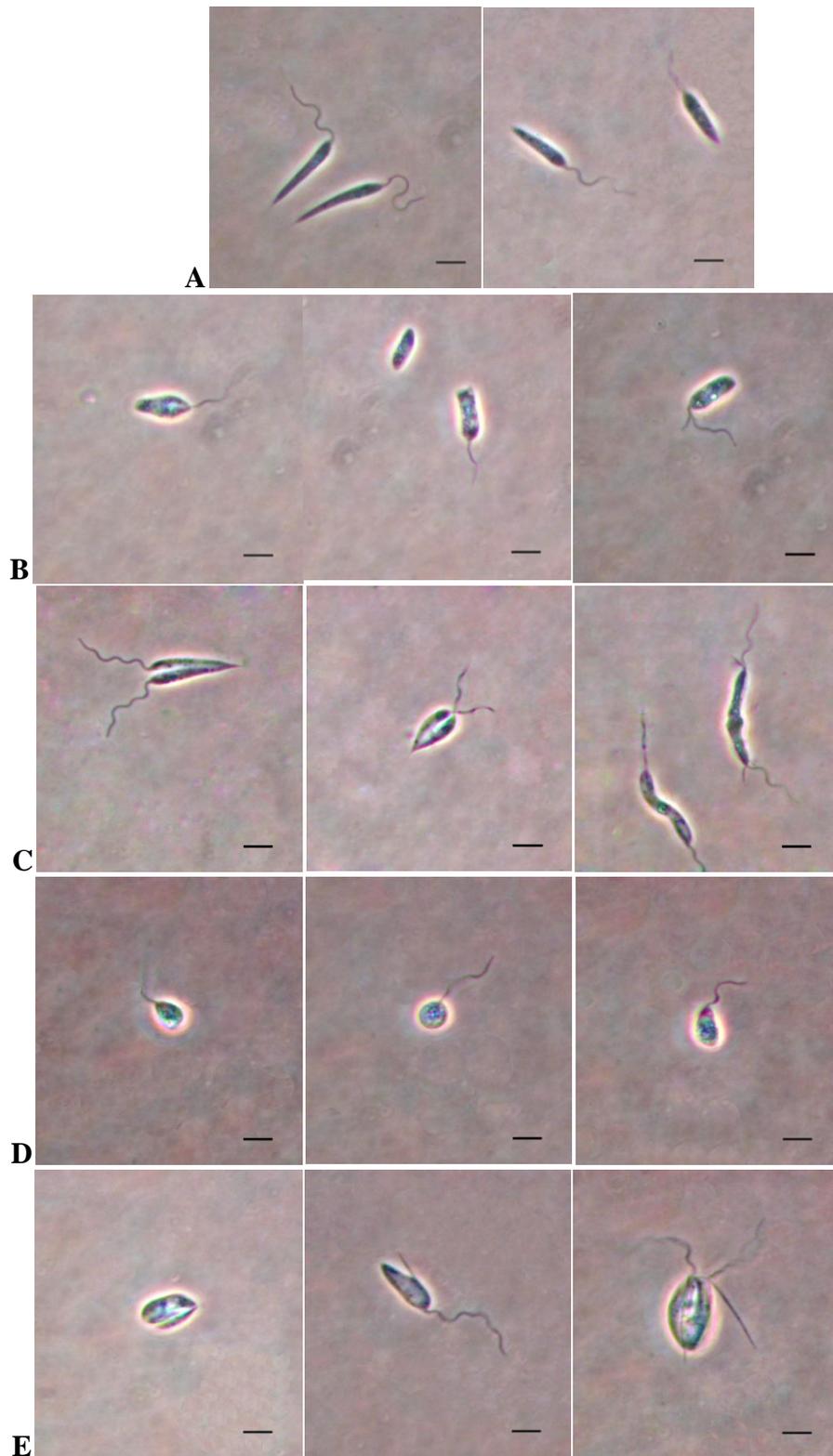


Figura 12. Cambios morfológicos producidos en promastigotes de *L. mexicana* por fracciones del extracto metanólico: Control (A), Fracciones de isopropanol (1 y 2) (B), Fracción de etanol (3) (C), Fracción de metanol:agua (7) (D), Fracción de metanol:agua (8) (E). Barra: 10µm.

En la primera fracción de metanol:agua (fracción 7) fueron notorias las células redondeadas u ovaladas y con vacuolas grandes (fig. 12D). En la segunda fracción de metanol:agua (fracción 8) se observaron células con estructuras peculiares que parecen extensiones delgadas de la membrana, células ovaladas con vacuolas grandes y células sin flagelo (fig. 12E).

Estos resultados indican que las fracciones de los extractos afectan de manera diferente a los promastigotes, por lo que cada fracción presenta compuestos que causan cambios morfológicos distintivos.

5. DISCUSIÓN

La evaluación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos de semillas indican la presencia de los siguientes compuestos: alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides, glicósidos cianogénicos y taninos. Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos en estudios realizados con extractos acuosos de diferentes partes de la planta de papaya, como hojas y raíz, los cuales, indican la presencia de compuestos fitoquímicos como flavonoides, taninos, alcaloides, esteroides, saponinas y compuestos fenólicos (Bamisaye y col. 2013). Udoh y Udoh (2005), reportaron la presencia de glicósidos, polifenoles, alcaloides, flavonoides, quinonas y saponinas, en extractos metanólicos de semillas de *C. papaya*. No obstante, aunque los estudios descritos anteriormente revelan la presencia de saponinas, en el presente estudio, no se logró identificar este tipo de compuestos. Un estudio fitoquímico realizado con extractos etanólicos de semillas de papaya, revela la presencia de alcaloides, glicósidos, taninos, polifenoles, entre otros compuestos, sin embargo, no indican la presencia de saponinas (Ikpeme y col. 2011). Eleazu y col. 2012, reportaron la presencia de glicósidos cianogénicos en extractos acuosos de hojas de *C. papaya*. Las diferencias entre los compuestos detectados en el presente estudio y en diferentes extractos de diversas partes de la planta *C. papaya*, pueden ser debidas a la variedad de la planta y a la forma de obtención de los extractos.

Se confirmó la presencia de alcaloides, los cuales presentan actividad leishmanicida como ha sido demostrado por Cuellar y col. 2012. Tempone y col. 2005, reportaron actividad leishmanicida *in vitro* de alcaloides isoquinolínicos, contenidos en extractos de

Annona cariácea y *Annona crassiflora*, entre otras plantas, lo cual se podría relacionar la actividad leishmanicida, que se le atribuye a este tipo de compuestos.

Alzamora y col. 2007, atribuyen la actividad de *Lepidium peruvianum* frente a *L. brazilensis* y *L. peruviana*, a la presencia de alcaloides imidazólicos, taninos, flavonoides, saponinas y benzilglucósidos presentes en dicha planta. Algunos de estos compuestos se lograron identificar en las semillas pulverizadas y en el extracto metanólico de semillas de *Carica papaya* y su presencia puede guardar alguna relación con la actividad leishmanicida de dicha planta.

La actividad antioxidante detectada en el extracto metanólico de semillas, se puede relacionar con la presencia de ciertos metabolitos secundarios como polifenoles y flavonoides. Kothari y Seshadri (2010), encontraron también una elevada actividad antioxidante en extractos cloroformo-metanol (2:1) de semillas de *C. papaya*.

Se han propuesto diversos parámetros de eficacia de actividad antiinfecciosa para compuestos puros y extractos crudos (Cos y col. 2006). Estos criterios refieren actividad relevante y selectiva con valores de IC_{50} menores a 100 $\mu\text{g/ml}$ para extractos crudos y menores a 25 μM para compuestos puros, sin embargo, estos valores dependen del modelo de estudio y del protocolo utilizado. Diversos estudios con extractos metanólicos crudos de diferentes plantas naturales, han reportado potente actividad leishmanicida con valores de IC_{50} menores a 100 $\mu\text{g/ml}$ (Braga y col. 2007; Estevez y col. 2007; Peraza y col. 2007).

Los resultados demuestran que los extractos son citotóxicos y causan una inhibición del crecimiento de promastigotes de *L. mexicana*. Los valores de IC_{50} obtenidos tanto para la actividad citotóxica como para la actividad leishmanicida sobre cultivos de

promastigotes, refieren un rango de actividad antileishmanial moderada, según lo descrito en la bibliografía para extractos de plantas, por lo que *C. papaya* podría servir de base para la obtención de metabolitos que contribuyan a mejorar el desarrollo de compuestos antileishmaniales.

La actividad antileishmanial de los extractos metanólicos y de las fracciones se corroboró por la reducción y/o pérdida de la movilidad de los parásitos, la manifestación de alteraciones morfológicas y la presencia de promastigotes lisados en los cultivos al ser observados bajo el microscopio. Es notable hacer referencia que el efecto más evidente de los extractos sobre los promastigotes es el bloqueo de la división celular, caracterizada principalmente por efectos en la división flagelar.

La principal porción motora de los flagelos es denominada axonema. El centro del axonema consiste de dos microtúbulos centrales rodeados por una hilera de nueve dobletes de microtúbulos. Los dos microtúbulos de cada par periférico se disponen en forma oblicua. Un microtúbulo contiene 13 protofilamentos (A) y el otro posee 11 protofilamentos (B) y tiene forma de C. Los protofilamentos interconectados del microtúbulo A, están formados por dímeros de tubulina exclusivamente. La fuerza de impulso de la célula es proporcionada por la dineína, una proteína adherida a los microtúbulos. La dineína hidroliza moléculas de ATP y convierte la energía química liberada en energía mecánica que impulsa a la célula. Dicha energía permite el activo deslizamiento del doblete externo de microtúbulos, haciendo que el flagelo se doble (Gilbert, 2005).

Es evidente que los extractos tienen un efecto en el bloqueo de la división celular, principalmente en el bloqueo del evento de división flagelar, impidiendo la formación de un nuevo flagelo.

En varios estudios realizados con extractos de *C. papaya*, se han demostrado los efectos perjudiciales de la semilla de la papaya sobre espermatozoides de conejos, monos, perros, ratones y humanos, presentando un efecto contraceptivo importante (Lohiya y col. 1999; Lohiya y col. 2008; Ortega y col. 2010; Manivannan y col. 2009; Lohiya y col. 2000). En estudios realizados por Lohiya y col. 2002 y Ortega y col. 2010, en monos langures y en perros domésticos, respectivamente, se demuestra que los extractos clorofórmicos de semillas de papaya, provocan la inhibición total de la movilidad espermática, efecto observado también con los extractos metanólicos sobre promastigotes.

Los cambios morfológicos que parecieran manifestar incremento del tamaño celular y vacuolización citoplasmática, podrían ser atribuidos a que los compuestos presentes en los extractos tienen como blanco a la membrana plasmática, desencadenando una pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana, según lo descrito en estudios realizados por Marchán y col. (2000).

Una vez conocida la actividad leishmanicida de los extractos metanólicos de semillas sobre los promastigotes, se estudió el efecto de fracciones eluídas en una columna de silica gel con diferentes disolventes, de menos polar a más polar. Las dos fracciones de isopropanol, la primera fracción de etanol y la primera fracción de metanol-agua, son las que presentan mejor actividad contra los promastigotes. La actividad presentada por estas fracciones son menores a la del extracto metanólico. El fraccionamiento del extracto

permite la separación de compuestos de diferente polaridad, por lo que en las fracciones de isopropanol y de etanol se tendrán compuestos hidrofóbicos (no polares) y en las fracciones de metanol-agua se tendrán compuestos más hidrofílicos (polares). Posiblemente, uno de los principales responsables de tal actividad sean los alcaloides, teniendo correlación con los resultados de Cuellar y col. 2012, quienes afirman que un extracto de hojas enriquecido en alcaloides presenta actividad moderada contra promastigotes de *L. amazonensis*.

La actividad de las fracciones sobre promastigotes de *L. mexicana* parece estar relacionada con la polaridad de los compuestos presentes en cada una de ellas. La pérdida del movimiento flagelar y cambios en la morfología celular es ocasionada por las fracciones que contienen compuestos más hidrofóbicos y el efecto sobre la división celular es producto de los compuestos más hidrofílicos.

Como es típico de los tripanosomatídeos, *L. mexicana* posee un único núcleo, cinetoplasto y flagelo que se replican solo una vez durante cada ciclo celular, ocurriendo primero la formación de un nuevo flagelo, seguido de la duplicación del núcleo, la mitosis y división del cinetoplasto y finalmente la citocinesis (Wheeler y col, 2011). Los extractos metanólicos parecen tener un efecto preferencial sobre los eventos tempranos de replicación del ciclo celular.

Una vez conocida la actividad citotóxica y antileishmanial de los extractos sobre los promastigotes, se prosiguió con la evaluación de la citotoxicidad de los extractos metanólicos sobre macrófagos murinos J774, con la finalidad de conocer si los mismos son selectivos contra los promastigotes. Los resultados demuestran que estos presentan un efecto a concentraciones superiores a las utilizadas en los ensayos de viabilidad del

parásito, por lo que no afectan significativamente el crecimiento de los macrófagos a bajas concentraciones de extracto. Además, presentan una marcada acción selectiva sobre los promastigotes (IS=37), según la clasificación de IS descrita por Valencia y col. 2011, quienes consideraron selectivos a extractos con $IS \geq 3$ y muy selectivos aquellos extractos con $IS \geq 10$. Estos resultados resultan promisorios en vista de que los extractos actúan selectivamente contra los promastigotes.

En este estudio se ha demostrado una moderada actividad antileishmania de los extractos metanólicos de semillas de *C. papaya* sobre promastigotes de *L. mexicana*. Sin embargo, los resultados obtenidos contra amastigotes intracelulares en macrófagos murinos no muestran tal actividad. En el ciclo de vida de *Leishmania*, el amastigote intracelular es el estadio que se encuentra dentro de los mamíferos y es el blanco para la quimioterapia. Cabe destacar que existen diferencias a nivel bioquímico y molecular entre la forma de amastigote y promastigote; en el catabolismo de glucosa, utilización de los ácidos grasos, nucleasas, proteasas de cisteína, metabolismo de purina, fosforilación de proteínas, expresión génica, proteína de superficie de membrana, metaloproteasa gp63 y el lipofosfoglicano (Croft y Yardley, 2002). Tales diferencias entre ambos estadios celulares podrían estar determinando las diferencias de sensibilidad de los parásitos a los extractos. Además, la accesibilidad de los extractos a los amastigotes se encuentra limitada debido a que las drogas deben ser internalizadas por fagocitosis o atravesar la membrana de los macrófagos para poder llegar al amastigote, por lo tanto, el hecho de encontrarse el amastigote internalizado representa una barrera en la accesibilidad de la droga a los parásitos. Sin embargo, se recomienda realizar experimentos adicionales, que permitan corroborar estadísticamente los resultados obtenidos.

En vista que los extractos metanólicos presentan actividad antileishmanial moderada contra la forma de promastigote, es importante resaltar que los extractos presentan efectos notables en el bloqueo del proceso de división celular y alteraciones morfológicas de las células, aunque no presentan actividad anti-mastigote. Por lo tanto, se sugiere continuar realizando estudios con la finalidad de obtener de los extractos metanólicos, metabolitos secundarios que puedan servir como base para el desarrollo de productos terapéuticos contra la leishmaniasis.

6. CONCLUSIONES

Los extractos metanólicos de semillas de *Carica papaya* obtenidos, contienen alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides, glicósidos cianogénicos y taninos, siendo los compuestos fenólicos y flavonoides los posibles responsables de la actividad antioxidante detectada en los extractos.

Los extractos metanólicos mostraron un efecto inhibitorio del crecimiento de cultivos de promastigotes (IC_{50} de $0,20 \pm 0,05$ mg/ml) y actividad citotóxica (IC_{50} de $0,18 \pm 0,02$), sin embargo no se observó efecto sobre la forma amastigote a las concentraciones ensayadas.

Los extractos metanólicos inducen cambios morfológicos en los promastigotes, afectan la citocinesis y la movilidad de los parásitos. El efecto sobre la movilidad parece estar asociado a los componentes más hidrofóbicos del extracto mientras que los cambios en la forma celular son producto de los metabolitos con menor hidrofobicidad.

La citotoxicidad de los extractos metanólicos sobre macrófagos J774 no es significativa a las concentraciones citotóxicas para promastigotes, demostrando un elevado efecto selectivo de los extractos hacia el parásito.

Los extractos metanólicos de semillas de *C. papaya* mostraron una moderada pero selectiva actividad leishmanicida, por lo que el aislamiento e identificación de los metabolitos activos contra el parásito podría aportar nuevos compuestos con potencial para el desarrollo de drogas contra la leishmaniasis.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adejuwon, A., Agbaje, E., Idika, N. 2011. Antifungal and antibacterial activities of aqueous and methanolic root extracts of *Carica papaya* linn. (Caricaceae). *International Research Journal of Microbiology*. **2**(8): 270-277.
- Alzamora, L., Solís, H., Rojas, M., Calderón, M., Fajardo, N., Quispe, J., Alvarez, E., Colona, E., Torres, D. 2007. Actividad leishmanicida de los extractos metanólicos de cuatro ecotipos de *Lepidium peruvianum*, Chacón (*Brassicaceae*). *Revista Peruana de Biología*. **13**(3): 211-214.
- Ausina, V., Moreno, S. 2005. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Primera Edición. Médica Panamericana. Madrid, España.
- Bañuls, A., Hide, M., Prugnolle, F. 2007. *Leishmania* and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. *Advances in Parasitology*. **64**: 1-113.
- Bamisaye, F., Ajani, E., Minari, J. 2013. Prospects of ethnobotanical uses of pawpaw (*Carica papaya*). *Journal of Medicinal Plants Studies*. **1**(4): 171-177.
- Besteiro, S., Williams, R., Coombs, G., Mottram, J. 2007. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International Journal for Parasitology*. **37**: 1063-1075.
- Bonfante, G., Barroeta, S. 2002. Leishmanias y Leishmaniasis en América con especial referencia a Venezuela. Primera Edición. Editorial Horizonte C.A. Barquisimeto, Lara, Venezuela.

- Braga, F., Bouzada, M., Fabri, R., Matos, M., Moreira, F., Scio, E., Coimbra, E. 2007. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. **111**: 396-402.
- Brenzan, M., Nakamura, C., Prado, B., Ueda-Nakamura, T., Young, M., Aparicio, D. 2007. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. *Parasitology Research*. **101**: 715-722.
- Castro, G., Zerpa R., Rondón, L. 2003. Leishmaniasis en la infancia. *Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*. **31**(6): 351-361.
- Cos, P., Vlietinck, A., Vanden, D., Maes, L. 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept’. *Journal of Ethnopharmacology*. **106**: 290-302.
- Croft, S., Yardley, V. 2002. Chemotherapy of leishmaniasis. *Current Pharmaceutical Design*. **8**(4): 319-342
- Cuéllar, A., Scull, R., Martínez, Y., Fernández, A., Monzote, L. 2012. Evaluación preliminar de la composición química de las hojas de *Carica papaya L* y del efecto antiprotozoario de un extracto enriquecido en alcaloides a partir de la misma. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*. **4**(2): 364-376.
- De Lima, H., Borges, R., Escobar, J., Convit, J. 2010. Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela: un análisis clínico epidemiológico a nivel nacional y por entidad federal, 1988-2007. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*. **50**(2): 283-299.

- Dorlo, T., Balasegaram, M., Beijnen, J., De Vries, P. 2012. Miltefosine: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **67**(11): 2576-2597.
- Eleazu, C., Eleazu, K., Awa, E., Chukwuna, S. 2012. Comparative study of the phytochemical composition of the leaves of five Nigerian medicinal plants. *Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research*. **3**(2): 42-46.
- Emeruwa, A. 1982. Antibacterial substance from *Carica papaya* fruit extract. *Journal of Natural Products*. **45**(2): 123-127.
- Estevez, Y., Castillo, D., Tangoa, M., Arevalo, J., Rojas, R., Alban, J., Deharo, E., Bourdy, G., Sauvain, M. 2007. Evaluation of the leishmanicidal activity of plants used by Peruvian Chayahuita ethnic group. *Journal of Ethnopharmacology*. **114**: 254-259.
- Fonnegra, R., Jiménez, S. 2007. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Segunda Edición. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
- García, M., Monzote, L., Montalvo, A., Scull, R. 2008. Evaluación antileishmanial *in vitro* de extractos provenientes de *Citrus limetta*, *Cucurbita máxima* y *Rhoeo spathacea*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. **60**(3). pp. 0. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602008000300010&lng=es&nrm=iso&tlng=es [consulta: 27 de noviembre de 2013].
- Gil, E., Cunha, L., Gonçalves, A., Souza, A., Valderrama, A. 2007. Importancia de los compuestos inorgánicos en el tratamiento de la leishmaniasis. *Latin American Journal of Pharmacy*. **26**(3): 454-61.

- Gilbert, S. 2005. Biología del desarrollo. Séptima Edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Hernández, J., Tenorio, J., Rojas, C., Vallejo, G. 2005. Evaluación de la actividad leishmanicida de los extractos etanólicos de *Rollinia rufinervis* sobre *Leishmania chagasi*. *VITAE, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. **12**(2): 37-43.
- Hide, M., Bucheton, B., Kamhawi, R., Bras-Gonçalves, R., Sundar, S., Lemesre, J., Banuls, A. 2007. Understanding Human Leishmaniasis: The need for an integrated approach. Págs. 87-123 en: *Encyclopedia of Infectious Diseases: Modern Methodologies*. Tibayrenc, M (ed). Primera Edición. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, USA.
- Hubert, D.J., Céline, N., Michel, N., Reddy, V., Florence, N., Johnson, B., Bonaventure, N.T., Singh, I.P., Sehgal, R. 2013. *In vitro* leishmanicidal activity of some Cameroonian medicinal plants. **134**: 304-308.
- Ikpeme, E., Ekaluo, U., Kooffreh, M., Udensi, O. 2011. Phytochemistry and Hematological Potential of Etanol Seed, Leaf and Pulp Extracts of *Carica papaya* (Linn.). *Pakistan Journal of Biological Sciences*. **14**(6): 408-411.
- Jiménez, M., Guzmán, E., Pérez, M., Ortega, A., Acosta, K. 2012. Semillas de papaya contra la enfermedad de Chagas. Evaluación *in vivo* de su actividad antiprotozoaria hacia *Trypanosoma cruzi*. *Fomix Campeche*. **4**(13): 39-43.
- Jiménez, M., Guzman, E., Ortega, A., Perez, S., Acosta, K. 2013. Assessment of the anti-protozoal activity of crude *Carica papaya* seed extract against *Trypanosoma cruzi*. *Molecules*. **18**: 12621-12632.

- Kheiri, H., Jafari, H., Ramazani, A., Davoudi, N. 2012. Anti-leishmanial and toxicity activities of some selected Iranian medicinal plants. *Parasitology Research*. **111**: 2115-2121.
- Kothari, V., Seshadri, S. 2010. Antioxidant activity of seed extracts of *Annona squamosa* and *Carica papaya*. *Nutrition & Food Science*. **40**(4): 403-408.
- Limoncu, M., Balcioglu, I., Yereli, K., Ozbel, Y.,Ozbilgiu, A. 1997. A new experimental *in vitro* cultive medium for cultivation of *Leishmania* species. *Journal of Clinical Microbiology*. **35**(9): 2430-2431.
- Liu, Y., Nair, M. 2010. An efficient and economical MTT assay for determining the antioxidant activity of plant natural product extracts and pure compounds. *Journal of Natural Products*. **73**(7): 1193-1195.
- Lohiya, N., Kothari, L., Manivannan, B., Mishra, P., Pathak, N. 2000. Human sperm immobilization effect of *Carica papaya* seed extracts: an *in vitro* study. *Asian Journal of Andrology*. **2**: 103-109.
- Lohiya, N., Manivannan, B., Goyal, S., Ansari, A. 2008. Sperm motility inhibitory effect of the benzene chromatographic fraction of the chloroform extract of the seeds of *Carica papaya* in langur monkey, *Presbytis entellus entellus*. *Asian Journal of Andrology*. **10**(2): 298-306.
- Lohiya, N., Manivannan, B., Mishra, P., Pathak, N., Sriram, S., Bhande, S., Panneerdoss, S. 2002. Chloroform extract of *Carica papaya* seeds induces long-term reversible azoospermia in langur monkey. *Asian Journal of Andrology*. **4**(1): 17-26.

- Lohiya, N., Mishra, P., Pathak, N., Manivannan, B., Jain, S. 1999. Reversible azoospermia by oral administration of the benzene chromatographic fraction of the chloroform extract of the seeds of *Carica papaya* in rabbits. *Advances in Contraception*. **15**: 141-161.
- Manivannan, B., Mittal, R., Goyal, S., Ansari, A., Lohiya, N. 2009. Sperm characteristics and ultrastructure of testes of rats after long-term treatment with the methanol subfraction of *Carica papaya* seeds. *Asian Journal of Andrology*. **11**: 583-599.
- Marcano, D., Hasegawa, M. 2002. Fitoquímica Orgánica. Segunda Edición. Editorial Torino. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas, Venezuela.
- Marchán, E., Arrieche, D., Henríquez, W., Crescente, O. 2000. Efecto *in vitro* de una sustancia alcaloidea aislada de *Amphimedon viridis* (Porifera) sobre promastigotes de *Leishmania mexicana*. *Revista de Biología Tropical*. **48**(1): 31-38.
- Martínez, A. 2005. Flavonoides. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín, Colombia.
- Mateo, J. 2005. Prontuario de Agricultura. Cultivos Agrícolas. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Primera Edición. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España.
- McGwire, B., Satoskar, A. 2013. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM: An International Journal of Medicine*. **107**(1): 7-14.
- Mesa, A., Molano, P., Seon, B., Figadere, B., Robledo, S., Muñoz, D., Sáez, J. 2008. Síntesis y actividades leishmanicida y citotóxica *in vitro* de análogos 2-

arilquinolinas. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. **15**(2): 259-266.

- Montalvo, A. 2010. Leishmaniasis. Aspectos de interés sobre un parasitismo exótico para Cuba. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. **48**(1): 78-92.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. **65**: 55-63.
- Ortega, A., Jiménez, M., Gutiérrez, E., Acosta, K., Guzmán, E., Zavala, M., Montalvo, N., Pérez, M. 2010. Effects of Chloroformic Extracts from Washed and Unwashed Papaya Seeds (*Carica papaya*) on the Sperm Concentration of Dogs. *Reproduction in Domestic Animals*. **45**: 1126-1129.
- Osuna, L., Tapia, M., Aguilar, A. 2005. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. Estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Primera Edición. Universitat de Barcelona. España.
- Passero, L., Castro, A., Tomokane, T., Kato, M., Paulinetti, T., Corbett, C., Laurenti, M. 2007. Anti-leishmania activity of semi-purified fraction of *Jacaranda puberula* leaves. *Parasitology Research*. **101**: 677-680.
- Peraza, S., Cen, F., Noh, A., May, F., Simá, P., Dumonteil, E., García, M., Mut, M. 2007. Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatan peninsula. *Fitoterapia*. **78**: 315-318.
- Ribble, D., Goldstein, N., Norris, D., Shellman, Y. 2005. A simple technique for quantifying apoptosis in 96- well plates. *BMC Biotechnology*. **5**(12).

<http://www.biomedcentral.com/1472-6750/5/12> [consulta: 01 de diciembre de 2014].

- Rojas, J., Ronceros, S., Palacios, O. 2012. Evaluación *in vitro* de la actividad antileishmaniásica del extracto metanólico de siete plantas medicinales. *Ciencia e Investigación*. **15**(2): 90-95.
- Strober, W. 1997. Trypan blue exclusion test of cell viability. A.3B.1-A.3B.2 en: Coligan, J., Kruisbeek, A., Margulies, D., Shevach, E., Strober, W (eds). *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA.
- Tempone, A., Treiger, S., Andrade, H., Amorin, N., Yogi, A., Salerno, C., Bachiega, D., Lupo, F., Bonotto, S., Fischer, D. 2005. Antiprotozoal activity of Brazilian plants extract from isoquinoline alkaloid-producing families. *Photochemistry*. **12**: 382-390.
- Udoh, F., Udoh, P. 2005. Hepatotoxicity of the methanol extract of *Carica papaya* seeds in wistar rats. *Pharmaceutical Biology*. **43**: 349-352.
- Valadeau, C., Pabon, A., Deharo, E., Albán-Castillo, J., Estevez, Y., Lores, F., Rojas, R., Gamboa, D., Sauvain, M., Castillo, D., Bourdy, G. 2009. Medicinal plants from the Yanasha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. **123**: 413-422.
- Valencia, L., Muñoz, D., Robledo, S., Echeverri, F., Arango, G., Vélez, I., Triana, O. 2011. Actividad tripanocida y citotóxica de extractos de plantas colombianas. *Biomédica*. **31**: 552-559.
- Vásquez, L. 2009. Terapéutica antileishmania: revisando el pasado, el presente y el futuro. *Gaceta Médica de Caracas*. **117**(2): 93-111.

- Wheeler, R., Gluenz, E., Gull, K. 2011. The cell cycle of Leishmania: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Molecular Microbiology*. **79**(3): 647-662.

Consultas en línea:

- <http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioTinciones.htm> [Consulta: 19 de Enero de 2015].
- Virología Médica. <http://virologiamedicafesc.blogspot.com/2010/09/naranja-de-acridina.html> [Consulta: 19 de Enero de 2015].