

AÑO 2017

EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD IN VITRO DE LA CLOROQUINA Y LA ACTIVIDAD ANTIMALÁRICA DE MOLECULAS DE ORIGEN NATURAL Y SINTÉTICAS EN AISLADOS CLÍNICOS DE PLASMODIUM VIVAX

AUTORES: MARCELA SANTANA

RESUMEN

Plasmodium vivax fue responsable de 13,8 millones de casos de malaria en todo el mundo en 2015. En todas las regiones endémicas se han registrado casos graves y muertes. Debido a la dificultad en el control de esta especie, su incidencia ha disminuido más lentamente que la de *Plasmodium falciparum* en lugares donde coexisten las dos especies. En este estudio, se estableció un cultivo *in vitro* a partir de aislados clínicos de *P. vivax* con una duración de 48 horas para luego evaluar la susceptibilidad *in vitro* de la cloroquina y la actividad antimalárica de moléculas sintéticas y de origen natural frente a aislados de *P. vivax* obtenidos en el municipio de Tierralta (Córdoba). Se utilizó el método de maduración de esquizontes (Microtest de la OMS). De cada molécula se evaluaron siete concentraciones seriadas por triplicado. Las concentraciones inhibitorias del 50 % (IC₅₀) fueron de 37,15 nM para cloroquina (CQ) y 7,53 µg/mL, 3,46 µg/mL, 8,86 µg/mL y 16,21µg/mL, para la molécula sintética (MS), molécula sintética 1 (MS1), molécula sintética 4 (MS4) y molécula natural (MN) respectivamente. En conclusión, se estableció un cultivo *in vitro* de corta duración, los aislados clínicos evaluados fueron susceptibles a CQ (66,6%), aunque el 33.3% de los aislados mostraron muy baja susceptibilidad. Las moléculas evaluadas, fueron activas frente a *P. vivax*, siendo la molécula MS1 la que mejor actividad antimalárica presentó.

Palabras claves: Malaria, *Plasmodium vivax*, antimaláricos, cloroquina, susceptibilidad, resistencia, estirilquinolinas, productos naturales.

ABSTRACT

Plasmodium vivax was responsible for 13.8 million malaria cases worldwide in 2015. Severe *P. vivax* malaria cases and deaths have been reported in all endemic regions. Due to the difficulty in the control of this species, its incidence has decreased more slowly than that of *Plasmodium falciparum* in places where the two species coexist. In this study, an *in vitro* culture was established from clinical *P. vivax* isolates with a duration of 48 hours to evaluate the *in vitro* susceptibility to chloroquine and the antimalarial activity of synthetic and naturally occurring molecules against isolates of *P. vivax* obtained in the municipality of Tierralta, Córdoba. The schizonts maturation method (WHO microtest) was used. Seven serial concentrations in triplicate were evaluated from each molecule. The inhibitory concentrations of 50% (IC 50) were 37.15 nM for chloroquine (CQ) and 7.53 µg/mL, 3.46 µg/mL, 8.86 µg/mL and 16.21 µg/mL, for Synthetic molecule (MS), synthetic molecule 1 (MS1), synthetic molecule 4 (MS4) and natural molecule (MN) respectively. In conclusion, an *in vitro* short term culture was established, the clinical isolates evaluated were susceptible to CQ (66.6%), although 33.3% of the isolates showed very low susceptibility. The molecules evaluated were active against *P. vivax*, with the MS1 molecule having the best antimalarial activity.

Key words: Malaria, *Plasmodium vivax*, antimalarials, chloroquine, susceptibility, resistance, styrylquinolines, natural products.

AÑO 2017

**GENOTIPIFICACIÓN *DEL GEN Pvm_{sp}3 α* Y RESPUESTA DE
CITOQUINAS COMO FACTORES PREDISPONENTES PARA MALARIA
COMPLICADA POR *P. vivax*.**

Autor: Luis Causil Vargas

RESUMEN

Objetivo. Determinar los genotipos del gen Pvm_{sp} 3 α y la respuesta de citoquinas como factores predisponentes para malaria complicada por P vivax.

Materiales y métodos. Se recolectaron 61 muestras de sangre total en papel filtro y plasma de pacientes con P. vivax. Se evaluaron dos grupos de individuos, pacientes ingresados a hospitalización con algún signo de complicación, y el grupo control de pacientes con malaria aguda, quienes no presentaban ningún signo de complicación. A partir de la muestra en papel filtro, se realizó la extracción de ADN utilizando chelex-100, posteriormente se aplicó una PCR anidada para amplificar el gen Pvm_{sp}-3 α . Se implementó la técnica PCR-RFLP de la región variable del gen Pvm_{sp}- 3 α . A las muestras confirmadas como P. vivax se les realizó digestión enzimática con Alu I y Hha I. Para determinar los niveles séricos de citoquinas se realizó un ELISA multiplex utilizando un equipo Luminex, en el que se determinó la concentración de las citoquinas GM-CSF, IFN γ , IL10, IL1 β , IL2, IL4, IL5, IL6, IL8 y TNF α de acuerdo con el protocolo de la casa comercial Millipore. **Resultados.** El 100 % de los pacientes presentaron anemia, el 90% trombocitopenia, el 20,6% falla respiratoria y 3,4% presentaron falla renal. Se observó que existen diferencias significativas, para las variables, parasitemia y hemoglobina entre los dos grupos. Existe diferencias significativas para las citoquinas IL8 (p=0,025), TNF α (p=0,04) y ILB1 (p=0,03), con un alfa < 0,05.entre pacientes con MC y el grupo control. El tamaño de los productos de la PCR del gen Pvm_{sp}-3 α evidenció dos genotipos diferentes: tipo A (1900 pb), tipo B (1500 pb). La digestión de los productos de PCR del gen Pvm_{sp}-3 α con la enzima Alu I produjo diez patrones de restricción, mientras que la enzima Hha I produjo nueve en pacientes con malaria complicada (MC). El haplotipo con mayor frecuencia en los pacientes complicados fue el PA1 y se encontró diferencias significativas en IL10, IL6 y GM-CSF entre el grupo que presentó el haplotipo PA1 y los pacientes que presentaron otros haplotipos. **Conclusiones.** La densidad parasitaria parece ser un factor importante para estimular la producción de TNF α y el haplotipo PA1 del gen Pvm_{sp}-3 α y las moléculas TNF α , IL1B e IL2, pueden ser factores predisponentes para las complicaciones durante la enfermedad de malaria por P. Vivax

Palabras clave: Plasmodium vivax, citoquina, genotipo, haplotipo, Pvm_{sp}-3 α , hemoglobina.

ABSTRACT

Objective. To determine the genotypes of the Pvmsp 3 α gene and the response of cytokines as predisposing factors for P vivax-complicated malaria. **Materials and methods.** Sixty one whole blood samples were collected on filter paper and plasma from patients with P. vivax. Two groups of individuals, hospitalized patients with some sign of complication, and the control group of patients with acute malaria, who did not present any sign of complication, were evaluated. From the sample on filter paper, DNA extraction was performed using chelex-100, then a nested PCR was applied to amplify the Pvmsp-3 α gene. The PCR-RFLP technique of the variable region of the Pvmsp-3 α gene was implemented. Confirmed samples of P. vivax were enzymatically digested with Alu I and Hha I. To determine serum cytokine levels, a multiplex ELISA was performed using a Luminex kit, in which the concentration of GM-CSF cytokines, IFN γ , IL10, IL1 β , IL2, IL4, IL5, IL6, IL8 and TNF α according to the protocol of the commercial house Millipore. **Results.** One hundred percent of the patients had anemia, 90% thrombocytopenia, 20.6% respiratory failure and 3.4% presented renal failure. It was observed that there are significant differences, for the variables, parasitemia and hemoglobin between the two groups. There were significant differences for the cytokines IL8 (p = 0.025), TNF α (p = 0.04) and ILB1 (p = 0.03), with an alpha <0.05 between patients with MC and the control group. The size of the PCR products of the Pvmsp-3 α gene showed two different genotypes: type A (1900 bp), type B (1500 bp). Digestion of the PCR products of the Pvmsp-3 α gene with the enzyme Alu I produced ten restriction patterns, whereas the enzyme Hha I produced nine in patients with complicated malaria (MC). The most frequent haplotype in complicated patients was PA1 and significant differences were found in IL10, IL6 and GM-CSF between the PA1 haplotype group and patients who had other haplotypes. **Conclusions.** The parasite density seems to be an important factor to stimulate TNF α production and the PA1 haplotype of the Pvmsp3 alpha gene and the TNF α , IL1B and IL2 molecules may be predisposing factors for complications during P. vivax malaria disease

Key words: Plasmodium vivax, cytokine, genotype, haplotype, Pvmsp-3 α , hemoglobin.

AÑO 2017

**BÚSQUEDA DE PRINCIPIOS ACTIVOS ÚTILES CONTRA ENFERMEDADES
TROPICALES A PARTIR DE PLANTAS MEDICINALES DE LA
SIERRA NEVADA DE SANTA MARTA – COLOMBIA**

AUTOR: HELENA QUINTERO

RESUMEN

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la actividad de extractos de plantas de la Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia, de uso en la Etnomedicina frente a diferentes microorganismos. **Materiales y Métodos.** Se desarrolló un estudio de tipo descriptivo que comprendió una serie de etapas como la recolección del material vegetal y su identificación, la obtención de los extractos de las partes aéreas de las especies mediante el uso de solventes orgánicos alcohólicos, la obtención de fracciones mediante extracción líquido-líquido, la purificación y aislamiento de compuestos mediante cromatografía de capa fina y cromatografía de columna, la identificación y caracterización mediante técnicas de IR, RMN ^1H ; RMN ^{13}C y CG-EM, y la evaluación de la actividad de los extractos y fracciones mediante técnicas de cribado farmacológico frente a diferentes microorganismos. Como resultado se obtuvo el fraccionamiento líquido-líquido de todas las especies de plantas, excepto de *Neurolaena lobata*. No se encontró en la literatura ningún estudio fitoquímico sobre los extractos de *Castanedia santamartensis*, por lo que se decidió purificar, aislar e identificar los componentes de esta planta, identificándose principalmente ácido kaurenoico en un 12%. Se evaluó la actividad tripanocida en *T. cruzi* de los extractos metanólico y acuoso de *Castanedia santamartensis*, siendo la IC_{50} de 5.5 $\mu\text{g/mL}$ y 81.25 $\mu\text{g/mL}$; La actividad antihelmíntica frente a Larvas (L3) de *Strongyloides venezuelensis* fue evaluada a diferentes concentraciones para los extractos globales. En el ensayo de actividad frente a amastigotes y promastigotes de *Leishmania donovani* y citotoxicidad de extractos y fracciones, el más potente fue el extracto global de *Neurolaena lobata* ($\text{EC}_{50} = 16.14 \pm 1.36$). Se ensayó la actividad y citotoxicidad de extractos y fracciones frente a VIH a 100 y a 10 $\mu\text{g/mL}$, destacando la actividad inhibitoria de la replicación del virus de los extractos globales *Neurolaena lobata* (99%) y *Castanedia santamartensis* (53%). Se observó actividad anti fungica para algunos extractos y fracciones. **Conclusiones:** Se obtuvieron extractos de cinco plantas de las familias Asteraceae y Piperaceae (*Piper Peltatum*, *Bacharis inamoena*, *Neurolaena lobata*, *clibadium arboreum* y *Castanedia santamartensis*); Se fraccionaron 4 de los extractos obtenidos calculando el porcentaje de rendimiento. Se separaron, purificaron e identificaron los componentes de menor proporción y el componente mayoritario de *C. santamartensis* cuya presencia era desconocida en esta especie. Se evaluó actividad de los extractos y fracciones frente a protozoos, helmintos, hongos, levaduras y VIH, calculando la IC_{50} y también se evaluó citotoxicidad frente a líneas celulares calculando la EC_{50} .

PALABRAS CLAVE:

Extractos botánicos, bioactividad, cribado farmacológico

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the activity of extracts of plants of the Sierra Nevada of Santa Marta, Colombia, of use in the Ethnomedicine against different microorganisms. Materials and methods. A descriptive study was developed that included a series of stages such as the collection of the plant material and its identification, obtaining the extracts of the aerial parts of the species through the use of organic alcoholic solvents, obtaining fractions by means of liquid extraction, purification and isolation of compounds by thin layer chromatography and column chromatography, the identification and characterization by IR techniques, ^1H NMR; ^{13}C NMR and GC-MS, to the evaluation of the activity of the extracts and fractions by pharmacological screening techniques against different microorganisms. As a result, the liquid-liquid fractionation of all plant species was obtained, except for *Neurolaena lobata*. The phytochemical study of *Castanedia santamartensis* extracts was not found in the literature, so it was decided to purify, isolate and identify the components of this plant, mainly kaurenoic acid being identified in 12%. The trypanocidal activity on *T. cruzi* of the methanolic and aqueous extracts of *Castanedia santamartensis* was evaluated, with IC_{50} of $5.5 \mu\text{g} / \text{mL}$ and $81.25 \mu\text{g} / \text{mL}$; The anthelmintic activity against Larvae (L3) of *Strongyloides venezuelensis* was evaluated at different concentrations for the global extract. In the activity test against amastigotes and promastigotes of *Leishmania donovani* and cytotoxicity of extracts and fractions, the most potent was the overall extract of *Neurolaena lobata* ($\text{EC}_{50} = 16.14 \pm 1.36$). The activity and cytotoxicity of extracts and fractions against HIV at 100 and $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ were tested, highlighting the inhibitory activity of virus replication of the global extracts *Neurolaena lobata* (99%) and *Castanedia santamartensis* (53%). Antifungal activity was observed for some extracts and fractions. Conclusions: Extracts of five plants of the families Asteraceae and Piperaceae (*Piper Peltatum*, *Bacharis inamoena*, *Neurolaena lobata*, *clibadium arboreum* and *Castanedia santamartensis*) were obtained; Four of the extracts obtained were fractionated by calculating the percent yield. The components of lower proportion and the major component of *C. santamartensis* were separated, purified and identified, the presence of which was unknown in this species. Activity of the extracts and fractions against protozoa, helminths, fungi, yeasts and HIV was evaluated by calculating the IC_{50} and also cytotoxicity against cell lines was evaluated by calculating EC_{50} .

KEY WORDS: Botanical extracts, bioactivity, pharmacological screening