

**EFFECTO DE LOS EXTRACTOS TOTALES DE *SIPARUNA SESSILIFLORA*,
ROSMARINUS OFFICINALIS Y *CLETHRA FIMBRIATA* SOBRE LINFOCITOS T
CD8⁺ DE INDIVIDUOS SANOS**



TRABAJO DE GRADO

María Fernanda Suta Velásquez

Presentado como requisito parcial para optar al título de Bacterióloga

Adriana Cuéllar Avila; M.Sc.; Ph.D.

Directora

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

Facultad de Ciencias

Departamento de Microbiología

Carrera de Bacteriología

Bogotá D.C.

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS TOTALES DE *SIPARUNA SESSILIFLORA*,
ROSMARINUS OFFICINALIS Y *CLETHRA FIMBRIATA* SOBRE LINFOCITOS T
CD8⁺ DE INDIVIDUOS SANOS



María Fernanda Suta Velásquez

APROBADO:

Adriana Cuellar Ávila; M.Sc; Ph.D
Directora

Jose Mateus Triviño; M.Sc.
Asesor

Claudia Urueña Pinzón; Ph.D

Jurado

NOTA DE ADVERTENCIA

“Los criterios expuestos, las opiniones expresadas y conclusiones anotadas son responsabilidad sólo del autor y no comprometen en nada a la Pontificia Universidad Javeriana”

Artículo 9.18 del reglamento de los trabajos de grado de investigación
Agosto de 1989.

Al guía espiritual de mi vida, Dios.

*A mis padres, en especial a mi madre que es la persona más valiente y de quién
me siento inmensamente orgullosa.*

A mi hermana, que nunca me ha abandonado a pesar de las adversidades.

*A mi familia, que es mi mayor respaldo y siempre tuvieron palabras de aliento para
no dejarme desfallecer.*

A David Sotelo que contribuyo a mi formación académica y personal.

A mis amigos, que siempre estuvieron presentes.

AGRADECIMIENTOS

Especial agradecimiento a la Vicerrectoría de Investigación de la Pontificia Universidad Javeriana responsable de la financiación de este proyecto. A la doctora Adriana Cuéllar Avila, por darme la oportunidad de hacer parte del Laboratorio de Parasitología Molecular, depositar su confianza en mí para hacerme cargo de este trabajo y por siempre tener algo que aportar a mi formación como profesional. A José Mateus que más que un asesor de tesis, fue un gran compañero en este camino de aprendizaje y nunca dudo en compartir su conocimiento. A todos los miembros de Laboratorio de Parasitología Molecular y al Laboratorio de Fitoquímica.

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una afección sistémica y crónica causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad afecta a gran parte de la población, con alrededor de 6 a 7 millones personas infectadas y con una mortalidad de 12.000 personas al año. Aunque se desconocen las causas que evitan la progresión a la fase crónica, se ha asociado con la progresión a las formas severas de la enfermedad, la pérdida progresiva de la multifuncionalidad de los linfocitos T (LT) CD8⁺. Actualmente, existen dos medicamentos disponibles para el tratamiento de la enfermedad: Nifurtimox y Benznidazol. Sin embargo, el tratamiento no es bien tolerado por los múltiples efectos adversos y el uso del tratamiento en la fase crónica de la enfermedad es controversial. Por lo tanto, es importante buscar tratamientos alternativos que permitan evitar la progresión a la fase crónica sintomática o que eliminen el parásito. Por otro lado, Colombia cuenta con alrededor del 10% de las especies vegetales del mundo, las cuales representan una fuente de abundantes compuestos con actividades terapéuticas que en gran parte son atribuidos a sus metabolitos secundarios. Así, es importante la búsqueda de compuestos que permitan el tratamiento etiológico de los pacientes, así como compuestos que puedan modular la respuesta inmune como un coadyuvante en el tratamiento de la enfermedad. En el presente trabajo se analizó el efecto de extractos de especies vegetales colombianas en la producción de citocinas por linfocitos T CD8⁺ totales de individuos sanos. Encontrándose, que los extractos de hojas de *Siparuna sessiliflora* y de *Clethra fimbriata* inducen la producción de citocinas como IFN- γ y TNF- α en LT CD8⁺ de individuos sanos comparado con lo observado con el extracto de hojas de *Rosmarinus officinalis*. Estos hallazgos sugieren que existen especies de plantas vegetales colombianas con capacidad inmunoestimuladora y con potencial para ser usadas en la búsqueda de compuestos con actividad tripanocida. **Palabras claves:** *Enfermedad de Chagas, linfocitos T CD8⁺, tratamiento, especies vegetales, modulación, Siparuna sessiliflora, Clethra fimbriata, Rosmarinus officinalis, IFN- γ , TNF- α .*

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. MARCO TEÓRICO.....	12
2.1 Enfermedad de Chagas.....	12
2.1.1 Agente etiológico.....	12
2.1.2 Fases de la enfermedad.....	13
2.1.3 Epidemiología.....	14
2.1.4 Tratamiento.....	15
2.2 Productos naturales.....	17
2.3 Los productos naturales en la enfermedad de Chagas.....	18
2.4 <i>Siparuna sessiliflora</i>	20
2.4.1 Hábitat.....	20
2.4.2 Taxonomía.....	20
2.4.3 Morfología.....	21
2.4.4 Usos tradicionales y antecedentes.....	21
2.5 <i>Rosmarinus officinalis</i>	22
2.5.1 Hábitat.....	22
2.5.2 Taxonomía.....	22
2.5.3 Morfología.....	23
2.5.4 Usos tradicionales y antecedentes.....	23
2.6 <i>Clethra fimbriata</i>	24
2.6.1 Hábitat.....	24
2.6.2 Taxonomía.....	24
2.6.3 Morfología.....	25
2.6.4 Usos tradicionales y antecedentes.....	25
2.7 Inmunomodulación.....	26
2.8 Modulación de linfocitos T CD8 ⁺ por extractos naturales.....	27
3. OBJETIVOS	28
4.1 General.....	28

4.2 Específicos.....	28
4. METODOLOGÍA.....	29
4.1 Individuos.....	29
4.2 Extracción de células mononucleares de sangre periférica.....	29
4.3 Recolección y preparación del material vegetal.....	29
4.4 Evaluación de la actividad citotóxica de especies vegetales colombianas..	30
4.5 Evaluación de la producción de citocinas intracelulares mediante citometría de flujo.....	31
4.6 Análisis e interpretación de datos.....	32
5. RESULTADOS	
5.1 Actividad citotóxica de extracto total de hojas de <i>S. sessiliflora</i> , <i>R. officinalis</i> y <i>C. fimbriata</i>	33
5.2 Frecuencia de linfocitos T CD8 ⁺ productores de IFN- γ y TNF- α estimulados con extractos de <i>S. sessiliflora</i> , <i>R. officinalis</i> y <i>C. fimbriata</i>	35
6. DISCUSIÓN.....	40
7. CONCLUSIÓN.....	45
8. RECOMENDACIONES.....	46
9. REFERENCIAS.....	47
10. ANEXOS.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de plantas evaluadas contra *T. cruzi*.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Siparuna sessiliflora*.

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Rosmarinus officinalis*.

Tabla 4. Clasificación taxonómica de *Clethra fimbriata*.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados para evaluar la producción de IFN- γ y TNF- α en LT CD8⁺ de individuos sanos.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características generales de *Siparuna sessiliflora*.

Figura 2. Características generales de *Rosmarinus officinalis*.

Figura 3. Características generales de *Clethra fimbriata*.

Figura 4. Actividad citotóxica de extracto total de hojas de *S. sessiliflora*, *R. officinalis* y *C. fimbriata*.

Figura 5. Selección de LT CD8⁺ productores de IFN- γ o TNF- α .

Figura 6. Frecuencia de linfocitos T CD8⁺ que producen IFN- γ estimulados con extractos de especies vegetales colombianas

Figura 7. Frecuencia de linfocitos T CD8⁺ que producen TNF- α estimulados con extractos de especies vegetales colombianas

Figura 8. Proporción de la actividad funcional de linfocitos T CD8⁺ estimulados con extractos totales de hojas de *S. Sessiliflora* o *C. Fimbriata*.

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Encuesta de inclusión de individuos sanos.

Anexo 2. Coeficiente de variación de gráficas representativas de la actividad citotóxica del extracto total de hojas de *S. sessiliflora*

Anexo 3. Coeficiente de variación de gráficas representativas de la actividad citotóxica de extracto total de hojas de *R. officinalis*.

Anexo 4. Coeficiente de variación de gráficas representativas de la actividad citotóxica de extracto total de hojas de *C. fimbriata*.

Anexo 5. Actividad citotóxica de dimetilsulfóxido (DMSO) sobre células mononucleares de sangre periférica (CMSP).

Anexo 6. Actividad citotóxica de Nifurtimox sobre CMSP.

Anexo 7. Réplicas biológicas de la actividad citotóxica de extracto total de hojas de *S. sessiliflora*.

Anexo 8. Réplicas biológicas de la actividad citotóxica de extracto total de hojas de *R. officinalis*

Anexo 9. Réplicas biológicas de la actividad citotóxica de extracto total de hojas de *C. fimbriata*.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, denominada también tripanosomiasis americana, es considerada como una afección sistémica y crónica causada por el patógeno intracelular y protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. La enfermedad afecta una gran parte de la población con alrededor de 6 a 7 millones de personas infectadas en el mundo y con una mortalidad de 12 mil al año (World Health Organization, 2016). En Colombia, la prevalencia de la enfermedad para el año 2014 estuvo entre 700 mil y 1 millón 200 mil personas infectadas y se estima que hay alrededor de 8 millones de personas en riesgo de adquirir la infección (Instituto Nacional de Salud, 2014). La enfermedad posee dos fases clínicas: fase aguda y fase crónica. La fase crónica se clasifica en asintomática y sintomática. Por la inespecificidad de los síntomas observada en la fase aguda, la mayoría de los pacientes son diagnosticados en la fase crónica de la enfermedad. La fase crónica asintomática se caracteriza por tener una baja parasitemia y alrededor del 30 al 40% de los pacientes progresan a la fase sintomática con alteraciones cardíacas o digestivas (Rassi, et al., 2010). Aunque se desconocen los mecanismos inmunológicos que evitan la progresión a la fase crónica sintomática, en los pacientes en fase crónica con formas severas de la enfermedad se ha observado una pérdida progresiva de la actividad funcional de los linfocitos T (LT) CD8⁺ comparado con pacientes en fase crónica con formas menos severas (Laucella, et al., 2004) (Mateus, et al., 2015) (Lasso, et al., 2015).

En la actualidad, existen dos medicamentos nitroheterocíclicos disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas: Nifurtimox y Benznidazol. El tratamiento es recomendado en pacientes con infección aguda, pacientes con infección congénita y niños menores de 14 años con infección crónica asintomática (Urbina, 2010). Sin embargo, el uso de estos medicamentos en la fase crónica de la enfermedad es ampliamente debatido por los efectos adversos observados en los pacientes y porque algunos estudios en modelos murinos y en humanos sugieren que el tratamiento evita la progresión de la enfermedad y otros sugieren lo contrario (García, et al., 2005) (Rassi, et al., 2009) (Urbina, 2010) (Bern, 2015). De manera reciente, un estudio prospectivo,

multicéntrico y aleatorio en el que se incluyeron 2.854 pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica sintomática mostró que el tratamiento con Benznidazol reduce la detección del parásito en sangre pero no el deterioro clínico de los pacientes (Morillo, et al., 2015). De esta manera, es esencial la búsqueda de nuevos compuestos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas o nuevos compuestos que eviten la progresión en la fase crónica sintomática.

Por otro lado, las especies vegetales han constituido una de las principales fuentes de nuevos compuestos químicos que pueden tener actividad anti-microbiana (Cowan, 1999). Se estima que Colombia cuenta con cerca del 10% de las especies vegetales del mundo y alrededor de 5.000 de estas especies, se han asociado a usos medicinales, otorgándole al país una gran fuente de productos de origen vegetal para la búsqueda de compuestos que permitan el tratamiento y control enfermedades de origen infeccioso y no infeccioso (Fonnegra & Jiménez, 2006) Adicionalmente, se ha demostrado que la actividad terapéutica de los extractos obtenidos de especies vegetales, se debe en gran parte a que sus compuestos incluyen metabolitos secundarios que le asignan un valor agregado como compuesto terapéutico (Kayser, et al., 2003). Por ejemplo, se ha encontrado que extractos obtenidos de especies vegetales, tienen capacidad inmunomoduladora o la capacidad de modular la respuesta inmune, indicando un efecto biológico sobre la respuesta inmune humoral o celular de los seres humanos (Sánchez, et al., 2002).

Así, además de buscar alternativas terapéuticas para la enfermedad de Chagas resulta interesante evaluar la actividad inmunomoduladora de extractos de especies vegetales colombianas sobre células de individuos sanos, para que potencialmente puedan funcionar como un coadyuvante frente a la infección por *T. cruzi*. Por esta razón se plantea el siguiente interrogante de investigación: *¿Cuál es el efecto de los extractos de especies vegetales colombianas sobre linfocitos T CD8⁺ totales en individuos sanos?*

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es una enfermedad infecciosa potencialmente mortal causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (World Health Organization, 2016). Fue descubierta por Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas en 1909. El Dr. Chagas, se encargó de describir el agente etiológico, vectores, mecanismo de infección, así como las manifestaciones clínicas agudas del primer caso humano reportado (Rassi, et al., 2012). Sin embargo, la enfermedad de Chagas es considerada como una enfermedad mucho más antigua, debido a que se ha registrado la presencia de ADN de *T. cruzi* en momias precolombinas que existieron aproximadamente hace 9 mil años en países andinos (Aufderheide, et al., 2004). Aunque la infección es adquirida principalmente por vía vectorial, existen formas de infección adicional que han cobrado importancia, como la infección por vía oral y la infección congénita. Además, otras vías de transmisión se deben a transfusiones sanguíneas, trasplantes de órganos y accidentes de laboratorio.

2.2 Agente etiológico

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la enfermedad de Chagas en humanos, es un protozoario del filo Euglenozoa, del orden Kinetoplastida y de la familia Trypanosomatidae. Tiene un flagelo y su única mitocondria contiene el cinetoplasto, el cual posee un ADN extranuclear correspondiente al genoma mitocondrial (Rassi, et al., 2012).

Su ciclo de vida incluye dos hospederos, un vertebrado (mamífero) y un invertebrado (insecto), conocido como triatomino hematófago, implicados en el ciclo de transmisión vectorial de la enfermedad (Elliot, et al., 2015). El parásito es ingerido por triatominos cuando se alimentan de sangre de un mamífero infectado, como tripomastigotes sanguíneos. En el intestino medio del insecto, se transforman en epimastigotes, se multiplican por fisión binaria y en la región posterior del intestino del vector se diferencian en la forma infectiva del hospedero vertebrado, tripomastigotes metacíclicos. Una vez el insecto se alimenta de un mamífero, deposita en el sitio de picadura heces u orina que contienen la forma infectiva del parásito. Estas formas metacíclicas, ingresan por

mucosas o la herida generada a partir de la picadura e infectan las células adyacentes al sitio de entrada del parásito. Dentro de las células, los parásitos se diferencian en amastigotes y tras varias rondas de replicación, se diferencian en tripomastigotes sanguíneos que son liberados al torrente sanguíneo por la ruptura de las células. Estas formas de tripomastigotes sanguíneos pueden infectar otras células nucleadas e iniciar nuevamente el ciclo de infección (Rassi, et al., 2010) (Tayler & Engman, 2001).

2.2.1 Fases de la enfermedad

La enfermedad de Chagas cursa con una fase aguda y una fase crónica. La fase aguda de la enfermedad se caracteriza con una alta parasitemia y tiene una duración de 4 a 8 semanas (Rassi, et al., 2012). En esta fase, los pacientes pueden o no presentar signos y síntomas inespecíficos que se resuelven de manera espontánea (Rassi, et al., 2010). Los signos más característicos de la enfermedad son el chagoma que corresponde a un nódulo en la piel o el signo de Romaña que se presenta como un edema palpebral con dolor prolongado (dependiendo de la puerta de entrada del parásito), hepatoesplenomegalia y linfocitosis atípica. Los síntomas más comunes son fiebre y malestar general (Bern, 2015). Estos síntomas ocurren dentro de los 8 a 10 días después de la infección y en caso de infección por transfusión sanguínea se desarrollan aproximadamente de 20 a 40 días (Rassi, et al., 2012). La gran mayoría de infecciones en esta fase no se detecta de manera oportuna por la inespecificidad de los síntomas y en menos del 1% de los pacientes se manifiesta de manera grave, considerándose potencialmente mortal a causa de complicaciones como la meningoencefalitis o miocarditis (Bern, 2015). Durante la fase aguda de la enfermedad, la respuesta inmune mediada por la inmunidad celular y humoral del hospedero tiene la capacidad de controlar la replicación del parásito (Bern, 2015).

Una vez finalizada la fase aguda, los pacientes pasan a una fase crónica asintomática o indeterminada que puede llegar a durar toda la vida del paciente, sin alguna alteración clínica. Esta fase de la enfermedad se caracteriza por una baja parasitemia. Además, el pronóstico es bueno y la mortalidad en estos pacientes es baja. Posteriormente, alrededor del 30 al 40% de los pacientes desarrollan la fase crónica sintomática o determinada con manifestaciones cardiacas o digestivas (Rassi, et al., 2010). En

Colombia, la forma cardíaca es la más común y se ha asociado a la alta frecuencia de un grupo genético denominado unidad discreta de tipificación I (DTU I) de *T. cruzi* (Díaz, et al., 2011). En los pacientes con la forma cardíaca de la enfermedad, la falla cardíaca es la manifestación clínica más común acompañada de arritmias, palpitaciones o síncope, los cuales pueden traer como consecuencia la muerte de los pacientes (Rassi, et al., 2009) (Rassi & Marcondes de Rezende, 2010). En cambio, en los pacientes con la forma digestiva de la enfermedad se observan alteraciones en la función motora y secretora del esófago y del tracto gastrointestinal y suelen ocasionar lesiones en el sistema nervioso entérico, responsables de la patogénesis de los megasíndromes de la enfermedad de Chagas (Rassi & Marcondes de Rezende, 2010).

2.2.2 Epidemiología

La enfermedad de Chagas es considerada una enfermedad tropical desatendida y es históricamente una enfermedad que se produce en zonas rurales de América Latina, donde las condiciones de vivienda son precarias y promueven el contacto frecuente con los vectores triatomínicos infectados (Rassi, et al., 2010). La epidemiología de la enfermedad está en constante cambio, debido a que hay migración de los individuos infectados dentro y fuera de las zonas endémicas (Bern, 2015). Las zonas endémicas de la enfermedad incluyen 21 países de América Latina, abarcando desde México hasta Argentina. Se estima que cerca de 6 a 7 millones de personas en todo el mundo están infectadas con el parásito, de las cuales cada año mueren alrededor de 12 mil (World Health Organization, 2016). En Colombia, el Instituto Nacional de Salud (INS) reportó para el año 2014, que la prevalencia de la enfermedad se estimaba entre 700 mil y 1 millón 200 mil habitantes infectados y aproximadamente, 8 millones de personas se encontraban en riesgo de adquirir la infección (Instituto Nacional de Salud, 2014).

Adicional a esto, aunque se han establecido incitativas de control para la enfermedad en el cono sur y otras regiones de América Latina, la migración de personas de áreas endémicas para la enfermedad a áreas no endémicas en Europa y Estados Unidos, el incremento de la epidemia del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), la falla en el control del vector y la aparición de especies de vectores resistentes a los insecticidas han permitido la expansión de la enfermedad conllevando a un problema de salud

pública en todo el mundo (Bern, 2015). Además, como resultado de estos comportamientos humanos y biológicos, la infección congénita y la transmisión derivada de trasplante de órganos en áreas no endémicas ha aumentado (Muñoz, et al., 2007) (Bern, et al., 2011).

2.2.3 Tratamiento

El tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas se basa en dos compuestos nitroheterocíclicos, Nifurtimox (5-nitrofurano) o Benznidazol (2-nitromidazol). El tratamiento se recomienda en la fase aguda de la enfermedad con una eficacia cercana al 95% y en infecciones congénitas donde se ha observado la cura parasitológica en alrededor del 60 al 80% de los pacientes (Urbina, 2015). En pacientes menores de 14 años en la fase crónica asintomática se ha encontrado una cura parasitológica en el 60 al 70% (Urbina, 2010). El tratamiento es obligatorio para todos los pacientes con infección aguda (transmitida por vectores, de manera oral o accidental), infección congénita, infección reactivada por tratamiento inmunosupresor, coinfección con VIH y en niños hasta de 18 años con infección crónica (Rassi, et al., 2012) (World Health Organization, 2002).

El Benznidazol es un medicamento que al ser metabolizado por el parásito, genera metabolitos potencialmente citotóxicos y mutagénicos para el parásito, reaccionando con ácidos nucleicos y proteínas de *T. cruzi* (Hall & Wilkinson, 2012). Comparado con el Nifurtimox, presenta menos efectos adversos y tiene bases científicas más amplias que comprueban su eficacia, es considerado el tratamiento de primera línea (Bern, et al., 2007). En los pacientes tratados con Benznidazol, los efectos adversos que se observan con mayor frecuencia son las erupciones dermatológicas como la dermatitis exfoliativas severas o dermatitis acompañadas de fiebre y linfadenopatía, de forma menos frecuente se puede presentar neuropatía periférica y supresión de la médula ósea (Pinazo, et al., 2010) (Tornheim, et al., 2013) (Bern, 2015).

El Nifurtimox es un medicamento con capacidad de inhibir la síntesis de ácido pirúvico, alterando el metabolismo de los carbohidratos en *T. cruzi*. Este medicamento posee efectos secundarios gastrointestinales como anorexia, pérdida de peso, náuseas y vómitos (Jackson, et al., 2010); efectos neurológicos como irritabilidad, insomnio,

desorientación y temblores; y los efectos secundarios menos comunes están asociados a parestesias, polineuropatías y neuritis periférica (Bern, 2015). De esta manera, la principal consecuencia de los efectos adversos en el tratamiento de la enfermedad, es el abandono o interrupción del mismo en alrededor del 10 al 20% de los pacientes (Urbina, 2015).

Por otra parte, el uso de estos medicamentos en la fase crónica de la enfermedad es ampliamente debatido porque algunos estudios en modelos murinos y en humanos sugieren que el tratamiento evita la progresión de la enfermedad y otros sugieren lo contrario (Garcia, et al., 2005) (Rassi, et al., 2009) (Bern, 2015). Varios estudios clínicos observacionales en humanos y en modelos murinos han demostrado que los pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica sometidos al tratamiento etiológico con Benznidazol, tuvieron una reducción significativa en la aparición de cambios electrocardiográficos y una reducción del deterioro de su situación clínica (Viotti & Vigilano, 2007) (Garcia, et al., 2005). Contrario a esto, otro estudio más recientes demuestra que en pacientes en fase crónica sintomática o cardiomiopatía tratados con Benznidazol y seguidos durante 5 años, tienen una reducción significativa de detección del parásito en sangre, pero esto no evita la progresión en el deterioro cardíaco de los pacientes (Morillo, et al., 2015). Aunque son varias las hipótesis que generan controversia respecto al uso de estos medicamentos en la fase crónica de la enfermedad, se ha sugerido que a los pacientes adultos que se encuentran en esta, se les realice el tratamiento con estos medicamentos, pero con algunos criterios de exclusión, como un límite de edad mayor a 50 años y la presencia de cardiomiopatía irreversible (Bern, 2015).

Teniendo en cuenta lo anterior, se ha suscitado la búsqueda de mejores terapias y de nuevas alternativas para el tratamiento de la enfermedad. Por ejemplo, se han evaluado otros compuestos con blancos y mecanismos de acción diferentes como el posaconazol, fluconazol e itraconazol, disponibles actualmente para el tratamiento de infecciones fúngicas, con resultados prometedores (Lepesheva, et al., 2007). No obstante estas alternativas terapéuticas presentan dificultades relacionadas a su disponibilidad, eficiencia y seguridad, por lo que se propone encontrar un medicamento con diferentes

compuestos que permitan evitar la progresión a la fase sintomática de la enfermedad o permita eliminar el patógeno (Bermudez, et al., 2016).

2.3 Productos naturales

Los productos naturales son definidos como moléculas o sustancias químicas producidas por un organismo vivo. Por ejemplo, las plantas producen una gran diversidad de compuestos orgánicos, denominados metabolitos primarios y metabolitos secundarios. Los metabolitos primarios, son compuestos que cumplen funciones vitales en las plantas como nucleótidos, aminoácidos, ácidos orgánicos, entre otros (Croteau, et al., 2000). Los metabolitos secundarios, son compuestos que aunque no cumplen funciones vitales y su función no está completamente elucidada, se han asociado a mecanismos de defensa, pigmentación de las hojas y el sabor en las plantas (Sokovic , et al., 2013) (Bart & Pliz, 2011) (Cowan, 1999). De manera interesante, los productos naturales derivados de especies vegetales se consideran una fuente inagotable de moléculas activas en la búsqueda y descubrimiento de nuevos fármacos. Además, en el proceso de su desarrollo, existen fármacos que representan alternativas terapéuticas eficaces cuyas estructuras han sido utilizadas tal como han sido aislados de su fuente natural, denominados fitomedicamentos.

Por otra parte, los extractos naturales son preparaciones concentradas de origen vegetal, obtenidas mediante la purificación de los componentes activos o los componentes de interés a través de diferentes técnicas de extracción (Mongue, 2003). El uso de productos naturales con fines medicinales se encuentra en todas las culturas extintas y existentes sin ninguna excepción, desde Babilonia y Egipto hasta comunidades americanas (Pastor, 2012). Por esta razón, los productos naturales han representado a través de estas comunidades, la base de la medicina tradicional que es cada vez más receptiva al uso de medicamentos derivados de plantas o fitomedicamentos (Plaeger, 2003). El pilar para la fabricación de medicamentos de origen natural son los extractos que se obtienen de las partes de una planta y es la disciplina científica conocida como etnobotánica o etnofarmacología. El objetivo de estudio de esta disciplina, es utilizar la gran variedad de conocimiento sobre las especies vegetales que se ha construido por pueblos indígenas o pueblos tradicionales, para el

estudio y el consumo de plantas medicinales y la generación de fitomedicamentos (González, 2013).

2.4 Los productos naturales en la enfermedad de Chagas

Las dificultades y limitaciones que existen en el tratamiento disponible para la enfermedad de Chagas, han estimulado la búsqueda de alternativas terapéuticas basadas en productos naturales de origen vegetal. Durante los últimos 15 años, se han evaluado cerca de 400 especies pertenecientes a más de 100 familias de plantas, que poseen actividad frente a *T. cruzi* (Izumi, et al., 2011). Estos estudios, han evaluado la actividad tripanocida de las plantas teniendo en cuenta los estadios de vida del parásito, así como diferentes metodologías para la obtención de extractos de plantas. En la Tabla 1, se describen algunas especies de plantas con actividad tripanocida y su compuesto asociado y la concentración necesaria para inhibir el 50 o el 100% de viabilidad en los estadios de vida del parásito.

Tabla 1. Especies de plantas evaluadas contra *T. cruzi*.

Especie (Familia)	Compuesto	Subclase	Actividad contra <i>T. cruzi</i>		
			<i>Epimastigotes</i>	<i>Tripomastigotes</i>	<i>Amastigotes</i>
<i>Piper regnellii</i> (Piperaceae)	Eupomatenoide-3	Neolignano	26,3 µg/mL ^a	NE	NE
	Conocarpano		8 µg/mL ^a	NE	NE
<i>Arrabidaea triplinervia</i> (Bignoniaceae)	Ácido Ursólico	Triterpeno	NE	400 µg/mL ^b	NE
	Ácido Oleanico			1600 µg/mL ^b	
<i>Camellia sinensis</i> (Theaceae)	Epigalocatequina galato	Flavano	5,3 x 10 ⁻⁷ µM/mL ^c	NE	NE
<i>Garcinia livingstonei</i> (Clusiaceae)	Garcilivina A	1-Benzopirano	NE	NE	4 µM/mL ^c

<i>Nectandra megapotamica</i> (Lauraceae)	Aristolignina	Lignano	NE	34.8 $\mu\text{M}/\text{mL}^{\text{c}}$	NE
<i>Syzygium aromaticum</i> (Myrtaceae)	Eugenol	Fenol	246 $\mu\text{g}/\text{mL}^{\text{b}}$	76 $\mu\text{g}/\text{mL}^{\text{b}}$	NE
<i>Dugeria furfuracea</i> (Annonaceae)	Duguetina	Alcaloide	9,32 $\mu\text{M}/\text{mL}^{\text{c}}$	NE	NE
<i>Notogolaena nivea</i> (Polypodiaceae)	Ácido Isonotolaénico	Ácido	50 $\mu\text{g}/\text{mL}^{\text{b}}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}^{\text{b}}$	NE
<i>Anthemis auriculata</i> (Asteraceae)	Antecotulide	Lactona sesquiterpenica	NE	NE	18,05 $\mu\text{g}/\text{mL}^{\text{b}}$
<i>Pterodon pubescens</i> (Fabaceae)	Geranilgeraniol	Diterpeno	12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}^{\text{b}}$	15,3 $\mu\text{g}/\text{mL}^{\text{b}}$	2 $\mu\text{g}/\text{mL}^{\text{b}}$

NE: Actividad no evaluada, ^aConcentración que inhibe el 50% de la viabilidad del estadio de vida del parásito, ^bConcentración que inhibe el 100% de la viabilidad del estadio de vida del parásito, ^cConcentración capaz de causar la lisis o inhibir el 50% del crecimiento del estadio de vida del parásito.

Modificado de: (Izumi, et al., 2011)

De manera interesante, en otros estudios se ha evidenciado que algunos de los compuestos que tienen actividad tripanocida (Tabla 1), tienen la capacidad de modular la respuesta inmune. Por ejemplo, en un modelo animal usando ratas inmunizadas con glóbulos rojos de oveja, a las que se les administró por vía oral aceites esenciales que contenían terpenos, se encontró que estos animales aumentaban los títulos de anticuerpos específicos contra antígenos presentes en los glóbulos rojos de oveja y mejoraban la actividad fagocítica de los macrófagos comparado con las ratas inmunizadas pero no alimentadas con aceites esenciales (Farhath, et al., 2013). Otro ejemplo de esto, se describió en un modelo murino de infección por *Mycobacterium tuberculosis*, en donde por vía subcutánea se administró ácido ursólico aislado de partes

aéreas de *Chamaedora tepejilote* y *Lantana hispida*, encontrándose que los ratones tratados con este compuesto tenían menor número de bacilos en el pulmón, así como mayores niveles de expresión de IFN- γ y TNF- α en células obtenidas de los pulmones de los ratones infectados comparado con ratones infectados pero no tratados (Jiménez, et al., 2013).

2.5 *Siparuna sessiliflora*

2.5.1 Hábitat

En Colombia, a la especie *Siparuna sessiliflora* se le conoce con el nombre común de limoncillo. Esta especie es nativa del trópico americano y se reporta en bosques premontañosos y húmedos tropicales del norte de Sur América, que abarca países como: Colombia, Ecuador, Perú, Brasil, Bolivia y Venezuela. Esta especie es encontrada en América del Sur a una altura entre 0 y 3.051 metros sobre el nivel del mar (msnm) (Cardona Naranjo, et al., 2011).

2.5.2 Taxonomía

En la tabla 2, se presenta la descripción general de la taxonomía de la planta.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Siparuna sessiliflora*

Nombre científico	<i>Siparuna sessiliflora</i>
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Laurales
Familia	Siparuneaceae
Género	<i>Siparuna</i>

Tomado de: (Universidad Nacional, 2007)

2.5.3 Morfología

Es un arbusto con una altura aproximada de 2 a 3,5 metros, con indumento corto que da apariencia de textura aterciopelada, posee hojas simples, opuestas y de margen

dentado, las flores están dispuestas en sombrilla y los frutos son bayas de apariencia roja o rosada muy aromáticas que contienen de 8 a 10 semillas (Vigosa & Fonseca, 2013). En la figura 1, se evidencian las características de las hojas y los frutos de *S. sessiliflora*.



Tomado de: (Cardona Naranjo, et al., 2011)

Figura 1. Características generales de *S. sessiliflora*. Se observan las hojas características de color verde y margen dentado, flores de color violáceo a crema que se disponen en forma de sombrilla y las bayas de apariencia rosada.

2.5.4 Usos tradicionales y antecedentes

Especies de plantas del género *Siparuna* spp. han sido utilizadas como antiinflamatorios, característica atribuida por la presencia de compuestos alcaloides, terpenos, flavonoides, entre otros (Negri, et al., 2012). En la medicina tradicional, las hojas de estas plantas han sido utilizadas por sus propiedades analgésicas y cicatrizantes (Mahecha, 2010). En los neotrópicos se usa la infusión de las hojas y frutos de algunas especies como remedio contra la cefalea, fiebre y afecciones psicomáticas, así como también se ha evidenciado que los extractos de *Siparuna* spp. poseen actividad antipalúdica (Ordóñez Paola, et al., 2006). Sobre la especie *S. conica* y *S. guianensis* se han realizado estudios relacionados con actividad antimicrobiana reportando una acción bactericida sobre bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus*

subtilis (Pino, et al., 2008). Adicionalmente, se ha demostrado que una fracción de la especie *S. sessiliflora* posee actividad antifúngica contra especies de *Aspergillus niger* con porcentajes superiores al 80% (Guevara, 2012).

2.6 *Rosmarinus officinalis*

2.6.1 Hábitat

La especie *Rosmarinus officinalis* conocida con el nombre común de romero, es originaria del sur de Francia y otras regiones cerca al Mediterráneo y es cultivada en climas templados por sus cualidades aromáticas y medicinales, se caracteriza además por ser una excelente planta apícola (Fonnegra & Jiménez, 2006).

2.6.2 Taxonomía

En la tabla 3, se presenta la descripción general de la clasificación taxonómica de la planta.

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *R. officinalis*

Nombre científico	<i>Rosmarinus officinalis</i>
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Rosmarinus</i>

Tomado de: (Natural Resources Conservation Service, 2016)

2.6.3 Morfología

Es un arbusto de hoja perenne, siempre verde, con una longitud de hasta 2 metros, es muy ramificado y se caracteriza por su olor alcanforado, posee un tallo rectangular leñoso, hojas rígidas con punta aguda, lineales y enrolladas sobre sus bordes con una longitud de hasta 3 centímetros, de color verde oscuro por el haz y verde claro por el envés; las flores suelen ser de color púrpura a blanco, con estambres que sobresalen predominantemente y se disponen en forma solitaria, sus frutos se componen de cuatro núculas secas (una sola semilla dividida en cuatro secciones) son brillantes y pardos

(Fonnegra & Jiménez, 2006) (Royal Botanic Gardens Kew, 2016). En la figura 2, se evidencian las características de las hojas y las flores de *R. officinalis*



Tomado de: (Royal Botanic Gardens Kew, 2016)

Figura 2. Características generales de *R. officinalis*. Se observan las hojas dispuestas a lo largo del tallo de manera ramificada, punta roma y color verde oscuro en el haz (imagen superior), las flores de color purpura y blanco, con estambres sobresalientes (imagen inferior)

2.6.4 Usos tradicionales y antecedentes

R. officinalis tiene usos tradicionales medicinales, cosméticos y culinarios. Dentro de sus usos medicinales se ha reportado como antiespasmódico, empleándose por vía oral como infusión, pulverizada, así como también por vía tópica (Fonnegra & Jiménez, 2006). Los componentes químicos de esta planta han sido ampliamente estudiados desde décadas atrás e incluyen flavonoides como el carnosol, ácido carnósico y rosmarínico y aceites volátiles (Okamura, et al., 1994) (Angelini, et al., 2003). De estos compuestos, el ácido carnósico y el carnosol poseen actividades farmacológicas, se ha

demostrado en modelos *in vitro* e *in vivo* que el carnosol tiene una fuerte actividad antioxidante, efectos anti-mutagénicos y efectos antitumorales (Rababah, et al., 2004) (Huang, et al., 1994). En modelos murinos, se ha demostrado que el extracto de hojas de *R. officinalis* tiene actividad hipolipemiante, evidenciada a partir de la reducción del colesterol total en plasma de ratones tratados con extracto de hojas de romero por vía oral, así como también se ha demostrado que el extracto acuoso de esta planta puede aumentar el títulos de anticuerpos (Al Sheyab, et al., 2012).

2.7 *Clethra fimbriata*

2.7.1 Hábitat

Las especie *Clethra fimbriata* conocida con el nombre común de azafrán, manzano o cacao de paramo se encuentra habitualmente en bosque húmedo montañoso bajo y bosque seco, en una altitud entre los 2.400 y 3.500 msnm (Catálogo de la Biodiversidad de Colombia, 2008). En Colombia se encuentra en las cordilleras central y oriental (Mahecha, et al., 2012).

2.7.2 Taxonomía

En la tabla 4, se presenta la descripción general de la clasificación taxonómica de la planta.

Tabla 4. Clasificación taxonómica de *C. fimbriata*

Nombre científico	<i>Clethra fimbriata</i>
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Ericales
Familia	Clethraceae
Género	Clethra

Tomado de: (Catálogo de la Biodiversidad de Colombia, 2008)

2.7.3 Morfología

Es un árbol que alcanza aproximadamente los 15 metros de altura, posee un tronco cilíndrico de 40 centímetros de diámetro y se desprende en forma de escamas, posee

una copa grande y densa, sus hojas son simples de color verde oscuro por el haz y color marrón por el envés, de borde aserrado y con una longitud aproximada de 6 centímetros por 3 centímetros de ancho; sus flores son de color crema, vellosas y se agrupan en forma de racimos de 10 centímetros de largo, individualmente miden cerca de 8 milímetros de diámetro, sus frutos son capsulas circulares de color pardo y manchas amarillas que contienen 3 semillas de forma elíptica y de color marrón (Mahecha, et al., 2012) (Catálogo de la Biodiversidad de Colombia, 2008). En la figura 3, se puede evidenciar las características de las hojas, corteza y flores de *C. fimbriata*.



Tomado de: (Plantas de Colombia, 2014) (Global Biodiversity Information Facility, 2016)

Figura 3. Características generales de *C. fimbriata*. Se observa el color y la textura característica de las hojas (haz y envés). Las flores color crema o blanco, agrupadas en forma de racimo a lo largo del tronco arbóreo cilíndrico de la planta son también características.

2.7.4 Usos tradicionales y antecedentes

Clethra fimbriata tiene usos industriales y medicinales, según el Jardín Botánico José Celestino Mutis de Bogotá D.C. - Colombia, es una especie que se usa como adorno debido a su follaje y estructura, su madera es utilizada en carpintería y ebanistería, sus semillas son de alimentos para animales silvestres y medicinalmente su corteza pulverizada sirve como febrífugo (Catálogo de la Biodiversidad de Colombia, 2008). Aunque se han dilucidado los compuestos presentes en hojas y corteza de esta planta

como alcaloides, flavonoides, quinonas, taninos y fenoles, se desconoce cuáles de estos compuestos son los que le confieren a la planta su actividad febrífuga (Villareal, 2015).

2.8 Inmunomodulación

La modulación en el sistema inmune se le atribuye a cualquier cambio en la respuesta inmune que puede involucrar inducción, expresión, amplificación o inhibición de cualquier componente de la respuesta. De esta manera, un inmunomodulador corresponde a una sustancia que tiene efecto sobre el sistema inmunológico, existen dos tipos de sustancias inmunomoduladoras en función de sus efectos y se denotan como inmunosupresores e inmunoestimuladores (Saroj, et al., 2012).

Las plantas y sus metabolitos primarios y secundarios han representado durante varias décadas una fuente importante de compuestos inmunomoduladores novedosos que actúan sobre diferentes tipos de factores humorales y celulares del sistema inmune y pueden ser específicos o inespecíficos en su acción (Sánchez, et al., 2002). El interés por las actividades inmunomoduladoras de compuestos aislados de plantas y hongos y los primeros avances en inmunofarmacología fueron revisados hacia el año 1982. A partir de este momento, se han publicado un gran número de trabajos que sugieren que las plantas o sus componentes pueden ser importantes en el descubrimiento de nuevos fármacos innovadores con actividad inmunomoduladora que evidencia mecanismos de acción novedosos (Sánchez, et al., 2002).

Existe un gran número de plantas medicinales que han sido descritas como potenciales inmunomoduladores, gracias a la acción de sus constituyentes activos (Mukherjee, et al., 2014). Por ejemplo, los frutos de la planta denominada *Phyllanthus emblica* (L.) de la familia Euphorbiaceae, se han asociado a efectos inmunosupresivos en la proliferación linfocitaria (Sairam, et al., 2002); las flores y las hojas de *Calendula officinalis* de la familia Asteraceae tienen la capacidad de inhibir la proliferación de células tumorales (Jiménez, et al., 2006); las partes aéreas de *Urtica dioica* de la familia Urticaceae se han asociado a la reducción de TNF- α y otras citocinas pro-inflamatorias por inhibición de factores de transcripción (Akbay, et al., 2003); y recientemente, un polisacárido de una planta comestible nativa de Perú, denominada *Lepidium meyenii*, demostró tener efecto inmunomodulador promoviendo la activación de macrófagos,

aumento de la capacidad fagocítica de los macrófagos y la producción de óxido nítrico (NO), especies reactivas de oxígeno (ROS) y citocinas como TNF- α e IL-1 β (Wei , et al., 2016).

2.9 Modulación de linfocitos T CD8⁺ por extractos naturales

Los linfocitos T (LT) CD8⁺ clásicamente se han definido como leucocitos encargados de eliminar células infectadas por patógenos intracelulares (Okoye, et al., 2015). Inicialmente, estas células fueron nombradas como LT citotóxicos porque se estimaba que estaban principalmente involucrados en la muerte de células infectadas con virus y células cancerosas, por su capacidad de matar células infectadas o transformadas. Sin embargo, con el paso del tiempo se descubrió que además de su función citolítica, los LT CD8⁺ al igual que la población de LT CD4⁺ poseían la capacidad de secretar citoquinas pro-inflamatorias como Interferón Gamma (IFN- γ), Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- α) e interleucina 2 (IL-2) (Khan, 2015) (Kristensen, et al., 2004).

Los productos naturales son portadores de numerosos compuestos, que pueden entre otras cosas, conferirles actividad inmunomoduladora sobre varios componentes, tanto de la respuesta inmune humoral como de la respuesta inmune celular. Sobre los LT CD8⁺ existen algunos reportes de compuestos de origen vegetal que pueden causar un efecto inmunomodulador en estas células. Por ejemplo, extractos acuosos de plantas de la familia Apiaceae comúnmente conocidas como umbelíferas (zanahoria, apio, hinojo y perejil) poseen compuestos como cumarinas, responsables de los efectos inmunomoduladores sobre estos factores de la respuesta inmune: la isopimpinellina exhibe un comportamiento inmunomodulador al estimular la activación de los LT; y el bergapteno y la xantotoxina provocan una elevada secreción de IFN- γ y aumento de la proliferación de los LT CD8⁺ de individuos sanos, (Jaw-Ming, et al., 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de extractos totales de *Siparuna sessiliflora*, *Rosmarinus officinalis* y *Clethra fimbriata* en la producción de citocinas por linfocitos T CD8⁺ totales de individuos sanos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar la actividad citotóxica entre los extractos totales de especies vegetales colombianas sobre células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos.
- Comparar la frecuencia de linfocitos T CD8⁺ totales que producen IFN- γ y TNF- α en individuos sanos en presencia de extractos de especies vegetales colombianas.

4. METODOLOGÍA

4.1 Individuos

Se incluyeron 9 individuos, 3 hombres y 6 mujeres, con edades comprendidas entre 20 y 32 años, que de manera voluntaria accedieron a participar en el estudio. Se les aplicó una encuesta (Anexo 1) con el fin de asegurarse de que fueran individuos sanos, sin ningún tipo de sintomatología reciente, enfermedad de origen infeccioso o crónica diagnosticada en los últimos 12 meses.

4.2 Obtención de células mononucleares de sangre periférica

A partir de sangre periférica anticoagulada con heparina de sodio (BD Vacutainer), se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) por el método de gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (GE Healthcare). Las células obtenidas fueron contadas en cámara de Neubauer por el método de exclusión de azul de Tripano. Las CMSP de los individuos sanos incluidos en el presente trabajo se usaron para evaluar la actividad citotóxica de los extractos y para evaluar la frecuencia de LT CD8⁺ productores de citocinas.

4.3 Recolección y preparación del material vegetal

Los extractos de hojas de las plantas fueron cedidos por el Grupo de Investigación de Fitoquímica de la Pontificia Universidad Javeriana. Brevemente, las hojas de la especie *S. sessiliflora* fueron colectadas en el Sendero Ambiental Mogambo, ubicado en Viotá Cundinamarca, la recolección de la planta se realizó en colaboración de los guías del sendero, que optimizaron además la identificación de la especie. Las hojas de la especie *R. officinalis* se adquirieron en la plaza de Paloquemao Bogotá D.C. - Colombia. Finalmente, las hojas de la especie vegetal *C. fimbriata* fueron colectadas en el cerro Manjui en el municipio de Cota – Cundinamarca. La determinación taxonómica, se llevó a cabo en el Herbario de la Pontificia Universidad Javeriana y se registró con número de colección HPUJ: 028040. Los extractos se obtuvieron a partir de hojas secas de las tres especies vegetales. Se trituraron por maceración en frío con etanol al 95% y agitación durante dos semanas, se concentraron a presión reducida en un rotavaporador (BUCHI R-114), se secaron en una estufa de vacío a 30°C y se pesaron. Finalmente, para los

ensayos de actividad citotóxica en las CMSP, los extractos se resuspendieron en DMSO al 99,9% (Sigma-Aldrich) hasta su completa disolución.

4.4 Evaluación de la actividad citotóxica de extractos de especies vegetales colombianas

Para evaluar la capacidad citotóxica de extractos de especies vegetales colombianas, se realizó el ensayo colorimétrico que evalúa la actividad metabólica celular por método de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Mosmann, 1983). Inicialmente, 4×10^5 CMSP/pozo fueron cultivadas en microplacas de 96 pozos de fondo redondo por 48 horas en oscuridad a 37°C y CO₂ al 5% con medio RPMI con rojo de fenol (Eurobio) en presencia de los extractos de *S. sessiliflora*, *R. officinalis* y *C. fimbriata*, a concentraciones de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,81, 3,90, 1,95, 0,48 y 0,97 µg/mL. Posterior al tiempo de incubación, se determinó la viabilidad celular por el método de MTT, en donde las células se resuspendieron en medio RPMI sin rojo de fenol (Eurobio) y con el reactivo de MTT a 1 mg/mL (Sigma-Aldrich). Se incubaron las microplacas en oscuridad por 4 horas a 37°C y CO₂ al 5%. Se adicionó dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) al 99,9% para disolver los cristales de formazán, se incubaron en oscuridad por 20 minutos a 37°C y CO₂ al 5%. Finalmente, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 540 nm en el lector de microplacas ELISA Labsystems Multiskan (Thermo Scientific). En los ensayos se incluyeron los siguientes controles: control del ruido de fondo (extracto y medio), control negativo (CMSP y medio), control positivo (CMSP y Nifurtimox 170,5 µM/mL), control del vehículo (CMSP y DMSO al 1%) y el control de MTT (reactivo de MTT a 1 mg/mL y medio). Cada ensayo de MTT incluyó triplicados y tres réplicas biológicas. Además, se seleccionaron los siguientes criterios para la selección de los ensayos de MTT: viabilidad mayor al 90% en el control negativo, viabilidad del 50% en el control positivo, tendencia entre el porcentaje de viabilidad y la concentración de los extractos (a menor concentración del extracto, mayor viabilidad), un coeficiente de determinación de la recta o R² mayor o igual a 0,8 y un coeficiente de variación entre los triplicados experimentales de cada réplica biológica menor al 20% (Anexo 2,3,4) . Para el análisis de resultados, se seleccionaron las réplicas biológicas que cumplieran con al menos 4 de los 5 criterios.

4.5 Evaluación de la producción de citocinas intracelulares mediante citometría de flujo

Los anticuerpos conjugados para el marcaje de moléculas de superficie y moléculas intracelulares fueron titulados y evaluados de acuerdo a lo descrito previamente (Mateus, et al., 2013). Para evaluar la frecuencia de LT CD8⁺ productores de IFN- γ y TNF- α , las CMSP de 4 individuos sanos fueron cultivadas por 24 y 48 horas en presencia de los extractos de *S. sessiliflora*, *R. officinalis* o *C. fimbriata* en placas de 24 pozos. Teniendo en cuenta la concentración necesaria para inhibir el 50% de la viabilidad (CI₅₀) de las CMSP de los individuos sanos, se seleccionaron 3 concentraciones de cada uno de los extractos, correspondientes a 1/6, 1/12 y 1/24 de la concentración inhibitoria 50 obtenida inicialmente de la actividad citotóxica de cada uno de los extractos. En cada ensayo se incluyeron los siguientes controles: control negativo (células y medio), control positivo (células en presencia de la enterotoxina B de *S. aureus* (SEB) (Sigma-Aldrich) y control del vehículo (células y DMSO al 1%). Luego, en cada pozo se adicionaron los anticuerpos monoclonales anti-CD28 y anti-CD49d. Posterior a una incubación de 2 horas a 37°C con CO₂ al 5%, se agregó Brefeldina A (BD Biosciences). Pasado el tiempo de incubación restante, las células fueron teñidas con el marcador de viabilidad *Fixable Aqua Dead Cell Stain Viability* (Invitrogen) por 20 minutos, en oscuridad a temperatura ambiente. Después las células fueron marcadas con los anticuerpos conjugados anti-CD3 y anti-CD8 (Tabla 5) y se incubaron por 30 minutos a 4°C en oscuridad. Luego, las células se lavaron con la solución amortiguadora fosfato-alcalino para tinción (PBS 1X con suero fetal bovino al 1%). Posteriormente, las células fueron fijadas y permeabilizadas de acuerdo con las instrucciones del estuche comercial Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences) por 20 minutos a 4°C en oscuridad para luego realizar el marcaje con los anticuerpos conjugados anti-IFN- γ y anti-TNF- α (Tabla 5). Se adquirieron al menos 50.000 eventos de la población de células CD3⁺CD8⁺ utilizando el citómetro de flujo FACS Aria IIu. El análisis de células que produjeron IFN- γ y TNF- α se realizó mediante el programa FlowJo 10.1 (Tree Star) y el análisis de la multifuncionalidad se realizó a través del programa Pestle 1,7 (National Institutes of Health, NIH) y el programa SPICE 5,3 (NIH).

Tabla 5. Anticuerpos monoclonales utilizados para evaluar la producción de IFN- γ y TNF- α en LT CD8⁺ de individuos sanos.

Conjugado	Clon
CD3-Pacific Blue	UCHT1
CD8-APC-H7	SK1
IFN- γ -Alexa Fluor 700	B27
TNF- α -APC	6401.1111

4.6 Análisis e interpretación de datos

La concentración mínima inhibitoria 50 (CI₅₀) de cada extracto, se obtuvo a través de un análisis de regresión no lineal mediante una curva de dosis-respuesta con el logaritmo en base 10 de cada concentración. Para comparar dos grupos, los datos fueron analizados utilizando la prueba de Mann-Whitney con una cola y con una significancia de $p < 0,05$. Los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 6,0.

5. RESULTADOS

5.1 Actividad citotóxica del extracto total de hojas de *S. sessiliflora*, de *R. officinalis* y de *C. fimbriata*.

Teniendo en cuenta que el extracto total de hojas de *S. sessiliflora*, de *R. officinalis* y de *C. fimbriata* fue diluido en DMSO, se evaluó si el vehículo de dilución de los extractos tiene actividad citotóxica sobre las CMSP de individuos sanos. La viabilidad se determinó de acuerdo a lo descrito en la metodología. Las células se cultivaron con concentraciones de DMSO al 4%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25% y 0,125% por 48 horas. La concentración que inhibió el 50% de la viabilidad (CI_{50}) de las CMSP con DMSO fue de 3,48% (Anexo 5). Posteriormente, se determinó la CI_{50} para las CMSP tratadas con Nifurtimox, en donde las CMSP de individuos sanos fueron cultivadas en presencia de diferentes concentraciones del medicamento (215 $\mu\text{M}/\text{mL}$, 107,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$, 53,7 $\mu\text{M}/\text{mL}$, 26,8 $\mu\text{M}/\text{mL}$, 13,4 $\mu\text{M}/\text{mL}$ y 6,7 $\mu\text{M}/\text{mL}$) por 48 horas, encontrándose una CI_{50} de 170,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$ (Anexo 6).

Para la evaluación de la actividad citotóxica del extracto total de *S. sessiliflora* a las 48 horas, se realizaron diluciones seriadas del extracto desde una concentración inicial de 1.000,00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 0,98 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La viabilidad se determinó de acuerdo a lo descrito en la metodología. La CI_{50} de las CMSP de individuos sanos con el extracto total de hojas de *S. sessiliflora*, de *R. officinalis* y de *C. fimbriata* fue de 356,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 110,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 412,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente (Figura 4). Las réplicas biológicas de la actividad citotóxica de cada extracto se muestran en los anexos 7, 8 y 9.

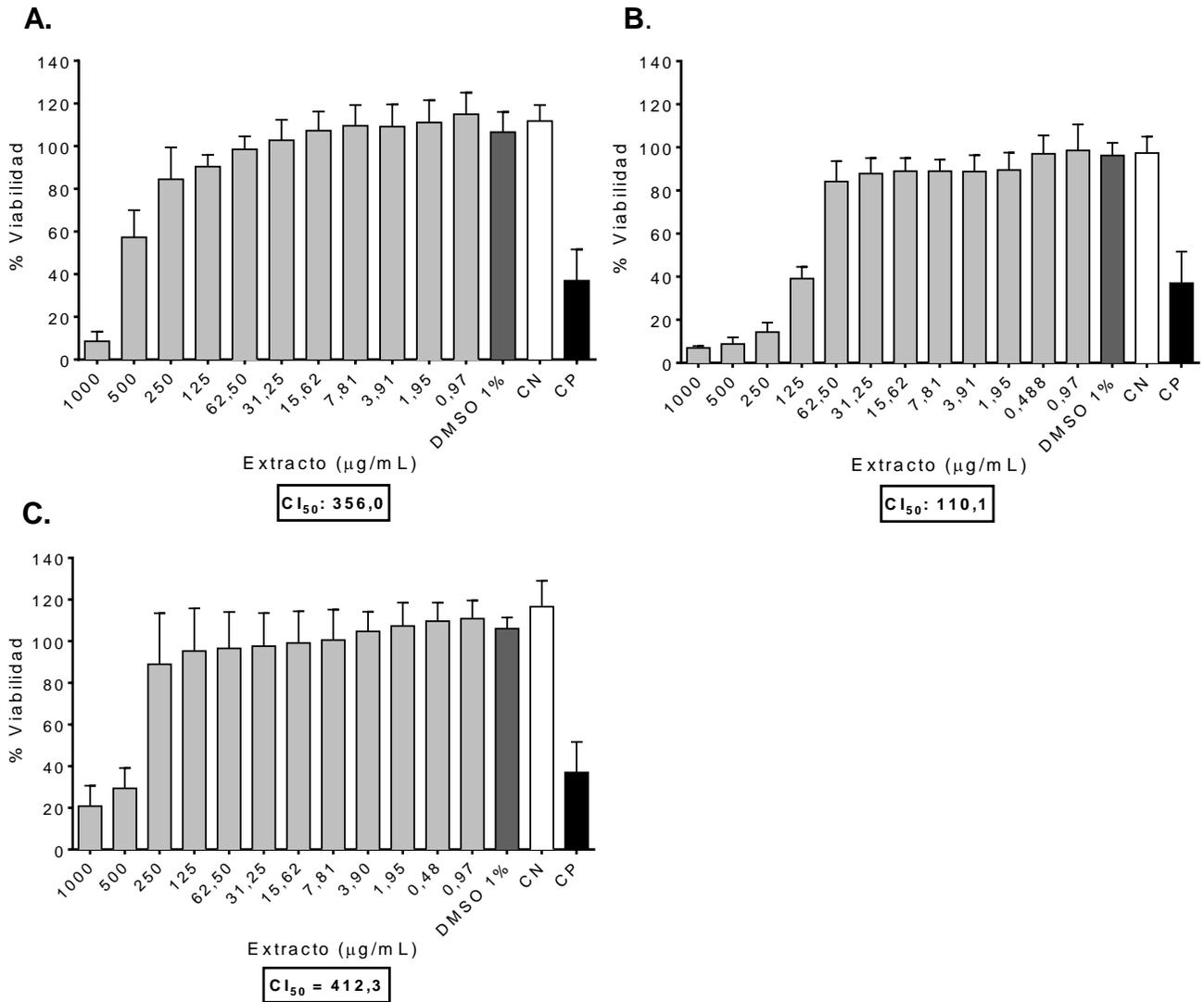


Figura 4. Actividad citotóxica del extracto total de hojas de *S. sessiliflora*, de *R. officinalis* y de *C. Fimbriata* en CMSP de individuos sanos. Porcentaje de viabilidad de las CMSP tratadas con el extracto total de hojas de *S. Sessiliflora* (A), de *R. officinalis* (B) y de *C. fimbriata* (C). Las columnas representan la media y la desviación estándar del promedio de las 3 réplicas biológicas. DMSO 1%, control del vehículo; CN, control negativo; CP, control positivo.

5.2 Frecuencia de linfocitos T CD8⁺ estimulados con extractos de hojas de *S. sessiliflora*, de *R. officinalis* y de *C. fimbriata* que producen IFN- γ y TNF- α

Con el objetivo de evaluar los LT CD8⁺ que producen IFN- γ y TNF- α , las CMSP fueron estimuladas por 24 y 48 horas con el extracto total de hojas de *S. sessiliflora*, de *R. officinalis* y de *C. fimbriata*, como se describió en la metodología. La Figura 5 muestra el representativo de los gráficos de contornos de la selección de los LT CD8⁺ que producen IFN- γ o TNF- α .

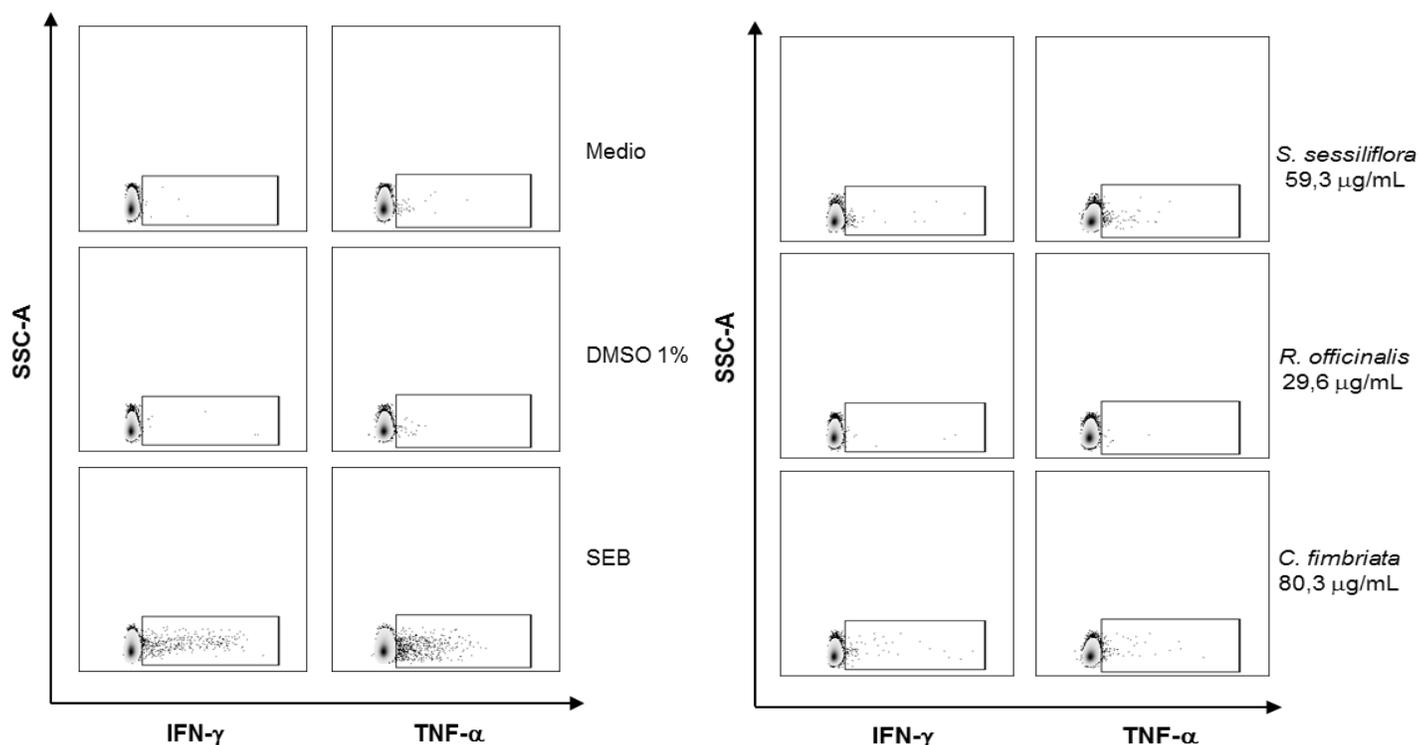


Figura 5. Selección de LT CD8⁺ que producen IFN- γ o TNF- α . Gráfica de contornos representativa de la selección de LT CD8⁺ productores de IFN- γ o TNF- α , cultivados con medio (control negativo), DMSO 1% (control del vehículo), SEB (control positivo) y extracto total de hojas de *S. sessiliflora*, de *R. officinalis* y de *C. fimbriata*.

Como se esperaba, se encontró una mayor frecuencia de LT CD8⁺ que producen IFN- γ o TNF- α cuando las células fueron cultivadas con el estímulo policlonal (Figura 6 -7). Tanto a las 24 horas como a las 48 horas, los LT CD8⁺ estimulados con el extracto total de hojas de *S. sessiliflora* o de *C. fimbriata*, tienen una mayor frecuencia de LT CD8⁺ que producen IFN- γ o TNF- α , comparado con las células cultivadas con medio y las

células cultivadas con DMSO al 1% (Figura 6-7). En contraste, no se observaron diferencias cuando se comparó la frecuencia de LT CD8⁺ que producen IFN- γ o TNF- α entre células estimuladas con el extracto total de hojas de *R. Officinalis*, el control negativo y el control del vehículo.

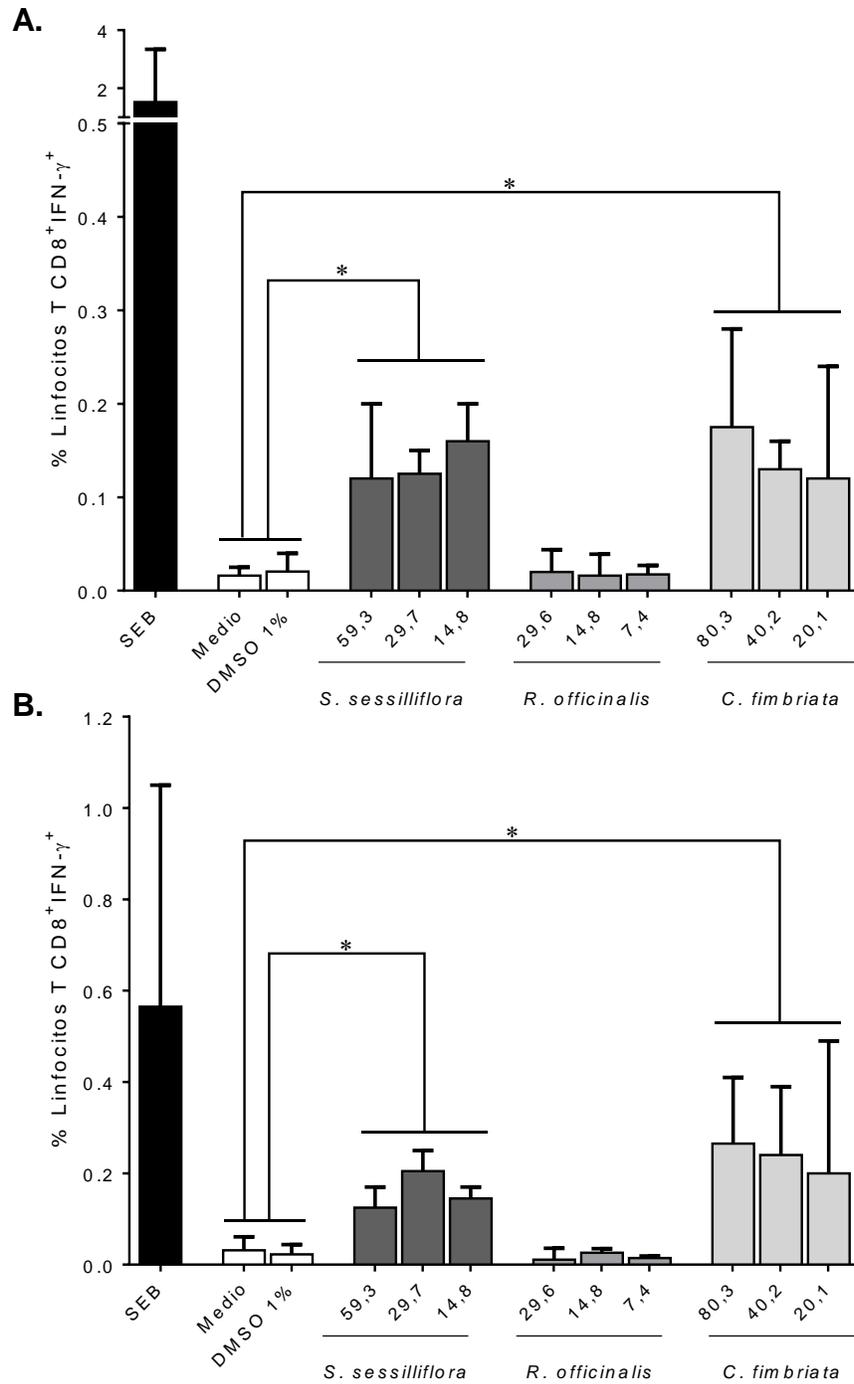
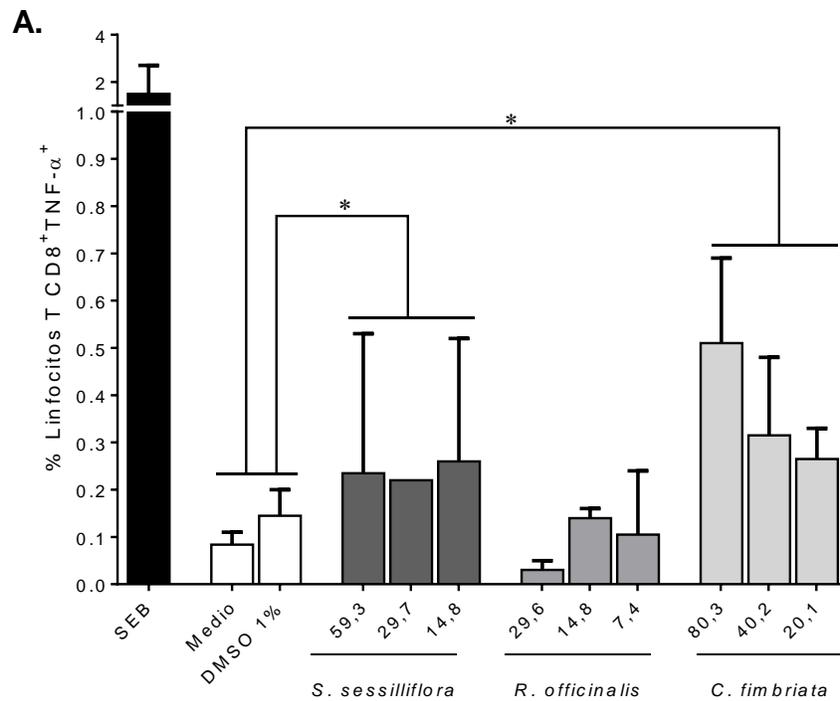


Figura 6. Frecuencia de linfocitos T CD8⁺ que producen IFN- γ estimulados con extractos de especies vegetales colombianas. Frecuencia de LT CD8⁺ que producen IFN- γ estimulados con extractos de especies vegetales colombianas por 24 horas (**A**) y 48 horas (**B**). Las columnas representan la mediana y los rangos de las frecuencias de las células que producen IFN- γ en 4 individuos sanos. El valor de *p* se calculó mediante la prueba de Mann-Whitney (**p*<0,05). SEB, Enterotoxina B de *S. aureus*; DMSO 1%, Control del vehículo.



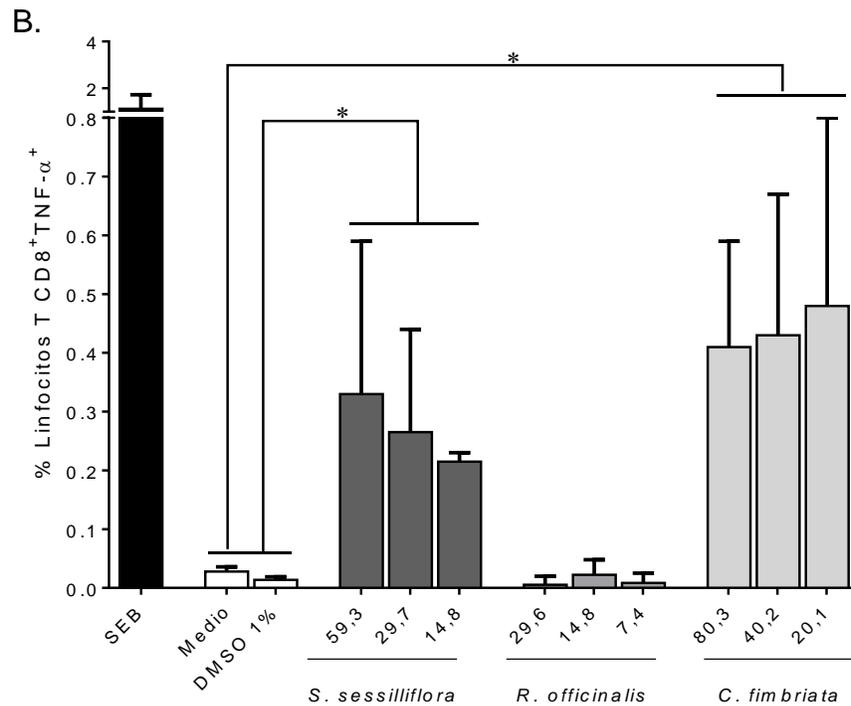


Figura 7. Frecuencia de linfocitos T CD8⁺ que producen TNF-α estimulados con extractos de especies vegetales colombianas. Frecuencia de LT CD8⁺ que producen TNF-α estimulados con extractos de especies vegetales colombianas por 24 horas (A) y 48 horas (B). Las columnas representan la mediana y los rangos de las frecuencias de las células que producen TNF-α en 4 individuos sanos. El valor de *p* se calculó mediante la prueba de Mann-Whitney (**p*<0,05). SEB, Enterotoxina B de *S. aureus*; DMSO 1%, Control del vehículo.

Posteriormente, se realizó el análisis de la capacidad multifuncional de los LT CD8⁺ estimulados con los extractos de especies de plantas colombianas. Teniendo en cuenta las diferencias observadas en la producción individual de las citocinas, este análisis se realizó con los resultados obtenidos cuando las CMSP fueron estimuladas con el extracto total de *S. sessiliflora* o de *C. fimbriata*. Tanto para *S. sessiliflora* como para *C. fimbriata*, se encontraron LT CD8⁺ que producen IFN-γ y TNF-α. Cuando se analizaron las células que producen una sola citocina, a las 24 horas, se encontró que los LT CD8⁺ estimulados con el extracto de *S. sessiliflora* o de *C. fimbriata* tienen un predominio de

LT CD8⁺ productores de TNF- α ⁺ comparado con lo observado con el estímulo policlonal, donde se observa una igual proporción de LT CD8⁺ que producen 1 o 2 citocinas,

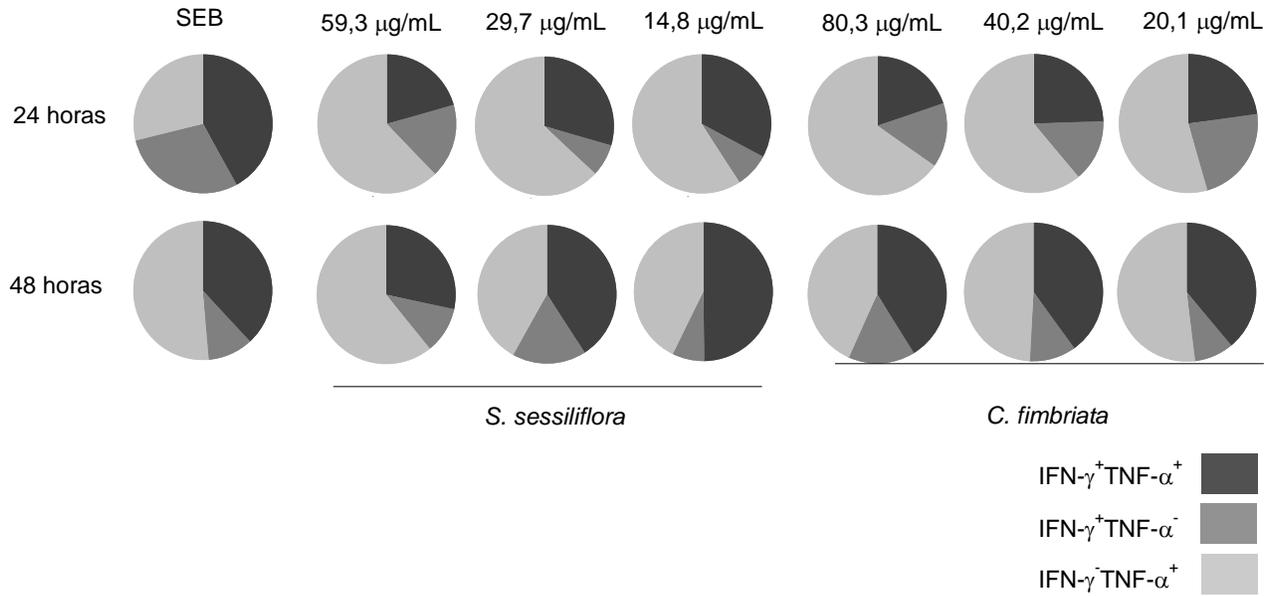


Figura 8. Proporción de la actividad funcional de los linfocitos T CD8⁺ estimulados con extractos totales de hojas de *S. Sessiliflora* o *C. Fimbriata*. Tortas de los perfiles funcionales de los LT CD8⁺ estimulados por 24 y 48 horas con el extracto total de hojas de *S. sessiliflora* y *C. Fimbriata*. Las células estimuladas con SEB corresponden al control positivo.

6. DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas, causada por el parásito intracelular *T. cruzi*, es un problema de salud pública en el mundo. La mayoría de los pacientes son diagnosticados en la fase crónica de la enfermedad, en donde el tratamiento disponible (Nifurtimox o Benznidazol) no es efectivo. Por esto, es importante la búsqueda de nuevos compuestos que permitan evitar la progresión a la fase crónica sintomática de la enfermedad o eliminar el agente causal para evitar el deterioro clínico en los pacientes sintomáticos. Nuestro grupo de investigación ha analizado la respuesta de los LT CD8⁺ en pacientes en fase crónica con diferentes grados de severidad de la enfermedad, encontrando que los pacientes con las formas severas tienen una mayor frecuencia de LT CD8⁺ monofuncionales comparado con los pacientes con formas leves. Así, nos encontramos en la búsqueda de compuestos que sean capaces de eliminar el patógeno, así como compuestos que puedan modular la respuesta inmune como un coadyuvante en el tratamiento de la enfermedad. En el presente trabajo se analizó el efecto de extractos de especies vegetales colombianas en la producción de citocinas por linfocitos T CD8⁺ totales de individuos sanos.

Nuestros hallazgos muestran que el extracto total de hojas de *S. sessiliflora* y de *C. fimbriata* necesitan una mayor concentración para inhibir el 50% de viabilidad en las CMSP de individuos sanos comparado con lo observado en el extracto total de hojas de *R. officinalis*. En contraste con lo observado en *R. officinalis*, se encontró que el extracto de *S. sessiliflora* y de *C. fimbriata* inducen la producción de citocinas como IFN- γ y TNF- α en LT CD8⁺ y una proporción de LT CD8⁺ multifuncionales.

A la fecha, se han encontrado diferentes compuestos que podrían tener un efecto tripanocida y se han obtenido a partir de especies vegetales. Aunque el objetivo del presente trabajo no era evaluar la actividad tripanocida, trabajos de nuestro grupo de investigación han mostrado que el extracto total de hojas de *S. sessiliflora*, de *R. officinalis* y de *C. fimbriata* tienen actividad tripanocida (Datos no publicados). Nosotros buscamos la concentración necesaria para inhibir la viabilidad en el 50% de las CMSP de individuos sanos. Existen reportes en la literatura que aunque no muestran el efecto citotóxico de la especie de *Siparuna* evaluada en el presente trabajo, sugieren que para extractos del

mismo género (*Siparuna*) son necesarias altas concentraciones de los extractos para inhibir la viabilidad usando otros modelos de células humanas. Por ejemplo, para la especie *S. guianensis* se ha encontrado que el extracto etanólico de hojas es citotóxica para una línea celular de cáncer de mama (SKBR3) a una concentración de 1000 µg/mL con solo una inhibición del 38% de la viabilidad celular durante 24 horas (Cesari, et al., 2006). Cabe mencionar, que en extractos etanólicos de *S. sessiliflora* se han encontrado saponinas, las cuales han sido descritas como protectores celulares (Pérez, 2014). Las saponinas son triterpenos o glucósidos de alto peso molecular que constan de un azúcar unido a un terpeno (Hoestettmann & Marston, 1995) y han sido asociadas como protectores celulares porque son capaces de inhibir la activación de las vías celulares asociadas al estrés oxidativo (Jung, et al., 2016)

Al evaluar la actividad citotóxica del extracto total de hojas de *R. officinalis*, se encontró una baja concentración necesaria para inhibir el 50% de la viabilidad en las CMSP de individuos sanos. Esta planta ha sido ampliamente estudiada en modelos de líneas celulares tumorales humanas y se le han atribuido una gran cantidad de compuestos derivadas de su extracto. Catteneo y colaboradores, determinaron que un extracto hidroalcohólico de *R. officinalis* es capaz de reducir de manera eficiente (dependiente de dosis y de tiempo) la proliferación de una línea celular de melanoma humano (A375), caracterizada por ser altamente resistente a los agentes citotóxicos, sugiriendo que la totalidad de los compuestos del extracto induce una reducción significativa de los niveles de proteínas que es esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular, por lo que podría inducir estrés celular (Catteneo, et al., 2015). El ácido carnósico, uno de los compuestos responsables de este tipo de actividad, ha demostrado tener efecto sobre diferentes líneas celulares tumorales humanas con una CI_{50} que oscilan entre 12,50 y 47,55 µg/mL (Yesil-Celiktas, et al., 2010). El carnosol, es otro de los compuestos aislados del extracto de esta planta que ha demostrado también tener una potente actividad en la inhibición de la fase S del ciclo celular de una línea de adenocarcinoma colorrectal epitelial humano (CACO-2) (Visanji, et al., 2006). Coherente con nuestros resultados, los antecedentes reportados de la actividad biológica de esta especie vegetal demuestran que los componentes presentes en los extractos totales de la planta tienen una potente actividad citotóxica.

En el presente trabajo, el extracto total de hojas de *C. fimbriata* exhibió el mayor valor de CI_{50} sobre las CMSP de individuos sanos. En la literatura científica, no se ha reportado la actividad citotóxica de extractos obtenidos a partir de la especie *C. fimbriata* sobre CMSP o líneas celulares, sin embargo, se han dilucidado algunos compuestos del extracto etanólico de esta planta obtenido a partir de hojas, entre los que se incluyen las saponinas (Villareal, 2015). Así, como se mencionó anteriormente, estos compuestos tienen un importante papel protector en las células. Adicionalmente, este papel protector podría deberse a la interacción de las saponinas con otros compuestos encontrados en esta especie de planta, como lo son: los flavonoides, los alcaloides, los taninos y los fenoles (Villareal, 2015).

Los productos naturales derivados de especies vegetales son portadores de un gran número de compuestos que tienen efectos inmunomoduladores con actividad estimuladora o supresora sobre algún componente de la respuesta inmune (Sánchez, et al., 2002). Los resultados de nuestro modelo *in vitro* indican que el extracto total de hojas de *S. sessiliflora* y de *C. fimbriata* tienen un efecto inmunoestimulador en la producción de $IFN-\gamma$ y $TNF-\alpha$ sobre $LT\ CD8^+$ de individuos sanos comparado con lo observado con el extracto de *R. officinalis*.

En un modelo murino, se evaluó el efecto estimulador de una cetona que ha sido encontrada en hojas y frutos de la especie *S. guianensis*, denominada 3-undecanona y de su derivado 3-undecanol (Fischer, et al., 2005), encontrándose que los ratones que habían inhalado el derivado 3-undecanol tenían mayores niveles de anticuerpos en sangre luego de 3 días de inhalación comparado con los ratones no tratados (Gibka, et al., 2008). Lo cual nos sugiere, que por proximidad taxonómica, algunos componentes de los extractos de hojas de *S. guianensis* que en otros modelos han mostrado tener un efecto modulador de la respuesta inmune, podrían compartirse en especies del mismo género de plantas y estar relacionados con lo observado en el presente trabajo. Aunque de manera específica no se han estudiado los efectos inmunomoduladores de los compuestos fitoquímicos de los extractos de hojas de *S. sessiliflora* y de *C. fimbriata*, se conoce que algunos de estos compuestos como flavonoides, fenoles, cetonas y terpenos, que comúnmente se encuentran en otras especies vegetales (Yadav &

Agarwala, 2011) poseen actividad inmunomoduladora (Pérez, 2014) (Villareal, 2015). Por ejemplo, se ha demostrado que estos compuestos obtenidos de especies de *Plantago* spp poseen la capacidad de inducir la proliferación y la secreción de IFN- γ en CMSP de individuos sanos *in vitro* (Chiang, et al., 2003). Cherng y colaboradores, han encontrado que compuestos flavonoides y cumarinas, estimulan la secreción de IFN- γ en LT CD8⁺, así como promueven la activación de los linfocitos *in vitro* (Cherng, et al., 2007). Otro compuesto, que se ha asociado a su óptima capacidad inmunopotenciadora, es el triterpeno denominado saponina, que ha sido encontrado en especies de *Siparuna* spp y en *C. fimbriata*, en el que se ha demostrado que es capaz de aumentar los niveles de anticuerpos e inducir la producción de citocinas en los LT CD8⁺ (Rajput, et al., 2007). Aunque se desconocen los metabolitos presentes en los extractos de especies vegetales que se analizaron en el presente trabajo, es importante mencionar que no podemos asumir que un compuesto con actividad biológica reportada en otras especies de plantas, este involucrada en la actividad inmunomoduladora observada en el presente trabajo. Si bien, muchas plantas comparten el mismo tipo de metabolitos secundarios, es posible que entre especies haya modificaciones de estos metabolitos que pueden atribuirle a la planta diferentes efectos biológicos (Quiadeae, et al., 2011) (Kumar & Pandey, 2013)

En nuestras condiciones experimentales, se encontró que el extracto de *R. officinalis* no induce la producción de IFN- γ y TNF- α comparado con *S. sessiliflora* y *C. fimbriata*. Grüdemann y colaboradores, encontraron que el extracto acuoso de *R. officinalis* puede inhibir la maduración células dendríticas y la secreción de IL-12 (Grüdemann, et al., 2015). Estos resultados sugieren que probablemente componentes de este extracto podrían tener un efecto inmunosupresor y sería interesante identificar los metabolitos que tienen la capacidad inmunosupresora observada.

Aunque hay poca información de los mecanismos por los que un compuesto vegetal puede inducir la producción o secreción de citocinas como IFN- γ o TNF- α , se ha descrito la forma en la que un compuesto aislado de especies del género *Phyllanthus* spp, denominada filantusmina C induce la producción de IFN- γ en células asesinas naturales (del inglés, *Natural Killer* o NK). La filantusmina C, es una molécula pequeña de tipo

lignano, esta molécula es capaz de inducir la producción de IFN- γ en células NK mediante la activación de la vía de señalización de los receptores tipo Toll (del inglés, *Toll-Like Receptor* o TLR) 1 o TLR6, que a su vez activa la subunidad p65 del complejo proteico conocido como Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa (NF- κ B), el cual se une al promotor *IFNG* en las células NK e induce la producción de IFN- γ (Deng, et al., 2014). Este estudio sugiere que probablemente este sea uno de los mecanismos que pueden estar involucrados en la inducción de la producción de IFN- γ y TNF- α en linfocitos T CD8⁺ en nuestras condiciones experimentales, debido a que se conoce que la secreción de citocinas como IFN- γ y TNF- α son controladas a nivel transcripcional por NF- κ B (Takeda & Akira, 2005) (Iwasaki & Medzhitov, 2004).

En resumen, los valores de la concentración que inhibe el 50% de la viabilidad de las CMSP de individuos sanos para los extractos de *S. sessiliflora* y *C. fimbriata*, además del hallazgo de sus efectos inmunomoduladores y la evidencia de que ambos son capaces de estimular la producción de citocinas como IFN- γ ⁺ y TNF- α ⁺ en LT CD8⁺, nos sugieren que existen extractos de especies vegetales colombianas con actividad inmunomoduladora que inducen la activación de células de la respuesta inmune, como lo son los LT CD8⁺. Teniendo en cuenta estos hallazgos, el panorama para encontrar compuestos activos que tengan actividad tripanocida y modulen la respuesta inmune, nos muestran un largo camino por recorrer en la búsqueda e identificación de estos compuestos y los mecanismos de acción tripanocida e inmunomoduladora para el tratamiento de pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica.

7. CONCLUSIÓN

El extracto total de hojas de *S. sessiliflora* y de *C. fimbriata* inducen la producción de IFN- γ y de TNF- α , así como de LT CD8⁺ multifuncionales luego de 24 y 48 horas de estímulo.

8. RECOMENDACIONES

Para futuros estudios, se deben dilucidar las fracciones o compuestos responsables de la actividad inmunomoduladora de los extractos totales obtenidos de hojas de *S. sessiliflora* y *C. fimbriata* sobre LT CD8⁺ específicos de *T. cruzi*, así como la evaluación de la capacidad citotóxica de las fracciones sobre las células de individuos sanos o pacientes con enfermedad de Chagas.

9. REFERENCIAS

Akbay, P., Basaran, A., Undeger, U. & Basaran, N., 2003. In vitro immunomodulatory activity of flavonoid glycosides from *Urtica dioica*. *Phytotherapy research: PTR*, 17(1), pp. 34-37.

Al Sheyab, F., Abuharfeil, N., Salloum, L., Rehan & Dalal, 2012. The Effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*. L) Plant Extract on the Immune Response and Lipid Profile in Mice. *Journal of Biology and Life Science*, 3(1), pp. 37-58.

Anazetti, M., Melo, P., Durán, N. & Haun, M., 2003. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology*, 188(2-3), pp. 261-274.

Angelini, L. Carpanese, G., Cioni, PL., Morelli, T., Macchia, M. & Famini, G., 2003. Essential oils from Mediterranean lamiaceae as weed germination inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), pp. 6158-6164.

Aufderheide, A. Salo, W., Madden, M., Streitz, J., Buikstra, J., Guhl, F., Arriza, B., Renier, C., Wittmers, LE Jr., Fornaciari, G. & Allison, M., 2004. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(7), pp. 2034-2039.

Bart, H. & Pliz, S., 2011. Extraction of Natural Products from Plants- An Introduction. En: H. Bart & S. Pliz, eds. *Industrial Scale Natural Products Extraction*. Weinheim Alemania: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.

Belmont Montes, R., 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología*, 29(1), pp. 73-82.

Bermudez, J., Davies, C., Simonazzi, A., Real, J. & Palma, S., 2016. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Tropica*, Volumen 156, pp. 1-16.

Bern, C., 2012. Chagas disease in the immunosuppressed host.. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 25(4), pp. 450-457.

Bern, C., 2015. Chagas' Disease. *The new england journal of medicine*, 373(5), pp. 456-466.

Bern, C., 2015. *Chagas disease. Epidemiology and control*. [En línea] Available at: http://www.uptodate.com.ezproxy.javeriana.edu.co:2048/contents/chagas-disease-epidemiology-and-control?source=search_result&search=Chagas+disease%3A+Epidemiology+and+control&selectedTitle=1~150

Bern, C., Kjos, S., Yabsley, M. & Montgomery, S., 2011. Trypanosoma cruzi and Chagas' Disease in the United States. *Clinical Microbiology Review*, 24(4), pp. 655-681.

Bern, C., Montgomery, SP., Herwaldt, BL., Rassi, A Jr., Marin-Neto, JA., Dantas, RO., Maguire, JH., Acquatella, H., Morillo, C, Kirshhoff, LV., Gilman, RH., Reyes, PA., Salvatella, R. & Moore, AC., 2007. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA*, 298(18), pp. 2171-2181.

Cardona Naranjo, F., Higuera, H. D., Gómez Hoyos, S. & Roldan Palacio, F., 2011. *Flora de Emblases, Centrales Hidroeléctricas de ISAGEN en el Oriente Antioqueño San Carlos, Jaguas y calderas. Guía Ilustrada*. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.

Carraher, C., Barot, G., Shai, K. & Roner, M., 2015. Influence of DMSO on the inhibition of various cancer cells by water-soluble organotin polyethers. *Journal of the Chinese Advanced Materials Society*, 1(4), pp. 294-304.

Catálogo de la Biodiversidad de Colombia, 2008. *Clethra fimbriata Kunth*. [En línea] Available at: <http://www.biodiversidad.co/fichas/1763> [Último acceso: 3 Mayo 2016].

Cattaneo, L., Cicconi, R., Mignongna, G., Giorgi, A., Mattei, M., Graziani, G., Ferracane, R., Grosco, A., Aducci, P., Schinina, E. & Marra, M., 2015. Anti-Proliferative Effect of Rosmarinus officinalis L. Extract on Human Melanoma A375 Cells. *Plos ONE*, 10(7), pp. 1-18.

Cesari, I., Taylor, P., Arsenak, M., Ballen, D., Abad, J., Fernández, A., Milano, B., Ruiz, M., Williams, B. & Michelangeli, F., 2006. Evaluation of Venezuelan Medicinal Plant Extracts for Antitumor and Antiprotease Activities. *Pharmaceutical Biology*, 44(5), pp. 349-362.

Chao-Lin, K., ung-Sheng, C., Shaw-Yih, L. & Chang-Chi, H., 2014. Immunomodulatory effects of EGCG fraction of green tea extract in innate and adaptative immunity via T regulatory cells in murine model. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 36(5), pp. 364-370.

Cherng, J., Chiang, W. & Chiang, L., 2007. Immunomodulatory activities of common vegetables and spices of Umbelliferae and its related coumarins and flavonoids. *Food Chemistry*, 106(3), pp. 944-950.

Chiang, L., Teik, L., Chiang, W., Chiang, M. & Lin, C., 2003. Immunomodulatory Activities of Flavonoids, Monoterpenoids, Triterpenoids, Iridoid Glycosides and Phenolic Compounds of Plantago Species. *Planta médica*, 69(7), pp. 600-604.

Condori, I. & Benigue, L., 2014. Evaluación de la actividad antimicótica de los aceites esenciales de plantas aromáticas. *Revista científica Investigación Andina*, 14(2), pp. 76-84.

Cowan, M. M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), pp. 564-582.

Cragg, G. M. & Newman, D. J., 2013. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(6), pp. 3670-3695.

Croteau, R., Kutchan, T. & Lewis, N., 2000. Natural Products (Secondary Metabolites). En: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, pp. 1250-1252.

Dahiya, P. & Purkayastha, S., 2012. Phytochemical screening and antimicrobial activity of some medicinal plants against multi-drug resistant bacteria from clinical isolates. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74(5), pp. 443-450.

Deng, Y., Chu, J., Ren, Y., Fan, Z., Ji, X., Mundy-Bosse, B., Yuan, S., Hughes, T., Zhang, J., Cheema, B., Camardo, A., Xia, Y., Wu, L., Wang, Li., He, X., Douglas, A., Li, X., Caligiuri, M. & Yu, J., 2014. The Natural

Product Phyllanthusmin C Enhances IFN-g Production by Human NK Cells through Upregulation of TLR-Mediated NF- κ B Signaling. *The Journal of Immunology*, 193(6), pp. 2994-3002.

Díaz, M., Solari, A. & Gonzáles, C., 2011. Differential expression of *Trypanosoma cruzi* I associated with clinical forms of Chagas disease: Overexpression of oxidative stress proteins in acute patient isolate. *Journal of proteomics*, 74(4), pp. 1673-1682.

Ebrahimi, M., Mohammad, Z., Mostafie, A., Zare, N. & Ghazanfari, T., 2013. Purified Protein Fraction of Garlic Extract Modulates Cellular Immune Response against Breast Transplanted. *Cell Journal*, 15(1), pp. 65-75.

Elliot, S. L., Mohammad, Z., Mostafie, A., Zare, N. & Ghazanfari, T., 2015. *Trypanosoma cruzi*, Etiological Agent of Chagas Disease, Is Virulent to Its Triatomine Vector *Rhodnius prolixus* in a Temperature-Dependent Manner. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(3), pp. 1-13.

Farhath, S., Vijaya, P. & Vimal, M., 2013. Immunomodulatory activity of geraniol, geraniol acetate, gingerol, and eugenol essential oils: evidence for humoral and cell-mediated responses. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 3(3), pp. 224-230.

Fischer, D., Limberger, R., Henriques, A. & Moreno, P., 2005. Essential oils from fruits and Leaves of *Siparuna guianensis* (Aubl.) Tulasne from Southeastern Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, 17(1), pp. 101-102.

Fonnegra, R. & Jiménez, S. L., 2006. *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Segunda ed. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia.

Garcia, S., Ramos, C., Senra, J., Vilas-Boas, F., Rodrigues, M., Campos de Carvalho, A., Ribeiro dos Santos, R. & Soares, M., 2005. Treatment with Benzimidazole during the Chronic Phase of Experimental Chagas' Disease Decreases Cardiac Alterations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(4), pp. 1521-1528.

Gibka, J., Majda, T., Tichek, A., Siwicki, A., Radomska, D., Glinski, M., Wasiutynski, A., Skopinska, E., Sommer, E. & Balan, B., 2008. Study of the Effect of 3-Undecanone and 3-Undecanol on Cellular and Humoral Immunity in Mice. *Journal of Essential Oil Research*, 20(3), pp. 47-49.

Global Biodiversity Information Facility, 2016. *Clethraceae*. [En línea] Available at: <http://www.gbif.org/species/115025476>

Global Biodiversity Information Facility, 2016. *Clethraceae*. [En línea] Available at: <http://www.gbif.org/species/115025476> [Último acceso: 3 Mayo 2016].

Gómez, L., Rugeles, M. & Zapata, W., 2014. Actividad antiviral de compuestos aislados de esponjas marinas. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(3), pp. 401-412.

González, C. J., 2013. El papel de los productos naturales en el mercado farmacéutico actual. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 109(2), pp. 134-141.

Grüdemann, C., Diegel, C., Sauer, B., Käufer, M. & Huber, R., 2015. Immunomodulatory effects of preparations from Anthroposophical Medicine for parenteral use. *BMC Complementary & Alternative Medicine*, 15(219), pp. 2-8.

Guevara, J., 2012. *Aislamiento, modificación sintética y evaluación in vitro de la actividad antifúngica de alcaloides provenientes de las hojas de la especie Siparuna sessiliflora*. Bogota: Pontificia Universidad Javeriana.

Gürtler, R., 2009. Sustainability of vector control strategies in the Gran Chaco Region: current challenges and possible approaches. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(1), pp. 52-59.

Hall, B. & Wilkinson, S., 2012. Activation of benzimidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(1), pp. 115-123.

Hoestettmann, K. & Marston, A., 1995. *Saponins*. New York: Cambridge University Press.

Huang, M., Ho, C.T., Wang, ZY., Ferraro, T., Lou, YR., Stauber, K., Ma, W., Georgiadis, C., Laskin, J.D. & Conney, A.H., 1994. Inhibition of skin tumorigenesis by rosemary and its constituents carnosol and ursolic acid. *Cancer Research*, 54(3), pp. 701-708.

Instituto Nacional de Salud, 2014. *Informe Final del Evento Enfermedad de Chagas, Colombia 2014*. [En línea]

Available at: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiologico/Chagas%202014.pdf>

Iwasaki, A. & Medzhitov, R., 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology*, 5(10), pp. 987-995.

Izumi, E., Ueda-Nakamura, T., Prado, B., Florencio, V. & Nakamura, C., 2011. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied. *Natural Product Reports*, 28(4), pp. 809-823.

Jackson, Y., Aliron, E., Getaz, L., Wolff, H., Combesure, C. & Chappuis, F., 2010. Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic chagas disease. *Clinical Infectious Diseases*, 51(10), pp. 69-75.

Jaw-Ming, C., Wen, C. & Lien-Chai, C., 2008. Immunomodulatory activities of common vegetables and spices of Umbelliferae and its related coumarins and flavonoids. *Food Chemistry*, 106(3), pp. 944-950.

Jiménez, A., Luna, J., Cornejo, J., López, S., Castro, M., Meckes-Fischer, M., Mata, D., Marquina, Brenda., Torres, Javier. & Hernández, R., 2013. Ursolic and oleanolic acids as antimicrobial and immunomodulatory compounds for tuberculosis treatment. *BMC Complementary & Alternative Medicine*, 13(258), pp. 1-11.

Jiménez, E., García, A., Paco, L., Algarra, I., Collado, A. & Garrido, F., 2006. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer*, 6(119), pp. 1-14.

Jung, K., Lee, D., Sik, J., Namgung, H., Kang, Ki. & Kim, Ki., 2016. Protective effect and mechanism of action of saponins isolated from the seeds of gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng.) against cisplatin-induced damage in LLC-PK1 kidney cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(5), pp. 1466-1470.

Kayser, O., Masihi, N. & Kiderlen, A., 2003. Natural products and synthetic compounds as immunomodulators. *Expert review of anti-infective therapy*, 1(2), pp. 319-335.

Khan, I. A., 2015. CD8+ T cell immune response against non-viral pathogens. *Seminars in immunopathology*, 37(3), pp. 209-210.

- Kitazato, K., Wang, Y. & Kobayashi, N., 2007. Viral infectious disease and natural products with antiviral. *Drug Discovery & Therapeutics*, 1(1), pp. 14-22.
- Klayman, D., 1985. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*, 228(4073), pp. 1049-1055.
- Kristensen, N., Madsen, A., Thomsen, A. & Christensen, J., 2004. Cytokine production by virus-specific CD8+ T cell varies with activation state and localization, but not with TCR avidity. *The Journal of General Virology*, 85(6), pp. 1703-1712.
- Kumar, S. & Pandey, A., 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, Volumen 2013, pp. 1-16.
- Lasso, P., Mateus, J., Pavía, P., Rosas, F., Roa, N., López, M., González, J. & Puerta, C., Cuéllar, Adriana, 2015. Inhibitory Receptor Expression on CD8+ T Cells Is Linked to Functional Responses against Trypanosoma cruzi Antigens in Chronic Chagasic Patients. *The Journal of Immunology*, 195(8), pp. 3748-3758.
- Laucella, S., Postan, M., Martin, D., Fralish, B., Albareda, M., Alvarez, M., Lococo, B., Barbieri, G., Viotti, R. & Tarleton, R., 2004. Frequency of Interferon-g–Producing T Cells Specific for Trypanosoma cruzi Inversely Correlates with Disease Severity in Chronic Human Chagas Disease. *The Journal of Infectious Diseases*, 189(5), pp. 909-918.
- Leite, N., Sobral, C., Albuquerque, R., Brito, D., Lavor, A., Alencar, L., Tintino, S., Ferreira, J., Figueredo, F., Lima, L., Cunha, F., Pinho, A. & Cotinho, H., 2013. Atividade antiparasitária in vitro e citotóxica de cariofileno e eugenol contra Trypanosoma cruzi e Leishmania brasiliensis. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(4), pp. 522-528.
- Lepesheva, G., Ott, R., Hargove, T., Kleshchenko, Y., Schuster, I., Nes, D., Hill, G., Villalta, F. & Waterman, M., 2007. Sterol 14 α -Demethylase as a Potential Target for Antitrypanosomal Therapy: Enzyme Inhibition and Parasite Cell Growth. *Chemistry & Biology*, 14(11), pp. 1283-1293.
- Lo, A., Liang, Y., Shiau, S., Ho, C. & Lin, J., 2002. Carnosol, an antioxidant in rosemary, suppresses inducible nitric oxide synthase through down-regulating nuclear factor- κ B in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, 23(6), pp. 983-991.
- Luize, P., Ueda-Nakamura, T., Filho, B., Cortez, D. & Nakamura, C., 2006. Activity of Neolignans Isolated from Piper regnellii (MIQ.) C. DC. var. pallescens (C.DC.) Yunck against Trypanosoma cruzi. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(10), pp. 2126-2130.
- Mahecha, C. A., 2010. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANA DE ACEITES ESENCIALES EXTRAIDOS DE HOJAS Y FRUTOS DE Siparuna sessiliflora. Bogota: Pontificia Universidad Javeriana.
- Mahecha, G., Ovalle, A., Camelo, D., Rozo, A. & Barrero, D., 2012. Vegetación del territorio CAR, 450 especies de sus llanuras y montañas.. Bogotá: Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca.
- Mateus, J., Lasso, P., Gonzáles, J., Puerta, C. & Cuéllar, A., 2013. Diseño de un panel multicolor para evaluar moléculas intracelulares y de superficie mediante citometría de flujo. *Biomédica*, 33(4), pp. 660-672.

Mateus, J., Lasso, P., Pavia, P., Rosas, F., Roa, N., Valencia, C., Gonzáles, J., Puerta, C. & Cuellar, A., 2015. Low Frequency of Circulating CD8+ T Stem Cell Memory Cells in Chronic Chagasic Patients with Severe Forms of the Disease. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 9(1), p. e3342.

Mongue, A., 2003. El descubrimiento de fármacos a partir de plantas medicinales. *Ciencia e Investigación*, 6(1), pp. 36-39.

Morillo, C., Marin-Neto, J.A., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi Jr, A., Rosas, F., Villena, R., Quiroz, R., Bonilla, R., Britto, C., Guhl, F., Velazquez, E., Bonilla, L., Meeks, B., Rao-Melacini, P., Pogue, J., Mattos, A., Lazdins, J., Rassi, A., Connolly, S.J. & Yusuf, S., 2015. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE*, 373(14), pp. 1295-1306.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), pp. 55-63.

Mukherjee, P., Nema, N., Bhadra, S., Mukherjee, D., Braga, F. & Matsabisa, M., 2014. Immunomodulatory leads from medicinal plants. *Indian Journal of Tradional Knowledge*, 13(2), pp. 235-256.

Muñoz, J., Portús, M., Corachan, M., Fumadó, V. & Gascon, J., 2007. Congenital Trypanosoma cruzi infection in a non-endemic area.. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(11), pp. 1161-1162.

Natural Resources Conservation Service, 2016. *Classification*. [En línea] Available at: <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=Lamiaceae&display=31> [Último acceso: 29 Abirl 2016].

Negri, G., Santi, D. & Tabach, R., 2012. Chemical composition of hydroethanolic extracts from Siparuna guianensis, medicinal plant used as anxiolytics in Amazon region.. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(5), pp. 1024-1034.

Okamura, N., Haraguchi, H., Hashimoto, K. & Yagi, A., 1994. Flavonoids in Rosmarinus officinalis leaves. *Phytochemistry*, 37(5), pp. 1466-1994.

Okoye, I., Wang, L., Pallmer, K., Richter, K., Ichimura, T., Hass, R., Crouse, J., Choi, O., Heathcote, D., Lovo, E., Mauro, C., Abdi, R., Oxenius, A., Rutschmann, S. & Ashton, P., 2015. The protein LEM promotes CD8+ T cell immunity through effects on mitochondrial respiration. *Science*, 348(6283), pp. 995-1001.

O'Neill, P. & Posner, G., 2004. A medicinal chemistry perspective on artemisinin and related endoperoxides. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(12), pp. 2945-2964.

Ordóñez P., Vega M. & Malagón O., 2006. Phytochemical study of native plant species used in traditional medicine in Loja Province. *Lyonia*, 10(2), pp. 65-71.

PAHO, O. P. d. I. S., 2015. *Sobre las enfermedades infecciosas desatendidas*. [En línea] Available at: http://www.paho.org/col/index.php?option=com_content&view=article&id=1474:sobre-las-enfermedades-infecciosas-desatendidas&Itemid=100017

Pastor, A., 2012. *ETNOBOTÁNICA EN ZONAS ÁRIDAS Y SEMIÁRIDAS DEL CONO SUR DE SUDAMERICA*. Buenos Aires: CEFYBO-CONICET.

Pérez, C. C., 2014. *Evaluación del potencial antioxidante de mezclas de extractos etanólicos de Mollinedia racemosa, Siparuna sessiflora y Croton leptostachyus*. Ibagué: Universidad del Tolima.

Phetkate, P., Kummalue, T., U-pratya, Y. & Kietinum, S., 2012. Significant Increase in Cytotoxic T Lymphocytes and Natural Killer Cells By Triphala: A Clinical Phase I Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volumen 2012, pp. 1-6.

Pinazo, M., Muñoz, J., Posada, E., López-Chejade, P., Gállego, M., Ayala, E., del Cacho, E., Soy, D. & Gascon, J., 2010. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11), pp. 4896-4899.

Pino, N., Martinez, L. & Stashenko, E. E., 2008. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *S. conica* y *S. guianensis* especies de la Familia Monimiaceae. *Salud UIS*, 40(2), pp. 140-142.

Plaeger, S. F., 2003. Clinical Immunology and Traditional Herbal Medicines. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(3), pp. 337-338.

Plantas de Colombia, 2014. *Clethra fimbriata*. [En línea] Available at: [LaAnti](#) [Último acceso: 3 Mayo 2016].

Quiadeae, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C. & Pouységu, L., 2011. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Natural Products*, 50(3), pp. 586-621.

Rababah, T., Hettiarachchy, N. & Horax, R., 2004. Total phenolics and antioxidant activities of fenugreek, green tea, black tea, grape seed, rosemary, guto kola, and ginkgo extracts, vitamin E and tert-butylhydroquinone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), pp. 5183-5186.

Rajan, A., Phil, M. & Bagai, U., 2012. Evaluation of Antiplasmodial Efficacy and Safety of Cinchona Officinalis Against Lethal Murine Malaria Parasite. *Homeopathic Research*, 105(2), pp. 76-83.

Rajput, Z., Hu, S., Xiao, C. & Arijo, A., 2007. Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *Journal of Zhejiang University*, 8(3), pp. 153-161.

Rangel, E., 2010. *Actividade antiprotozoária, antifúngica e citotóxica de extratos de plantas do bioma Cerrado, com ênfase em Leishmania (Leishmania) chagasi*. Brasília: Universidade de Brasília.

Rassi, A., Dias, J., Marin-Neto, J. & Rassi, A. J., 2009. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. *Heart British Cardiac Society*, 95(7), pp. 524-534.

Rassi, A., Dias, J., Marin-Neto, J. & Rassi, A. J., 2009. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. *Heart (British Cardiac Society)*, 95(7), pp. 524-534.

Rassi, A. J., Marcondes de Rezende, J. & Rassi, A., 2012. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious Disease Clinics of North America*, 26(2), pp. 575-591.

Rassi, A. J., Rassi, A. & Marin-Neto, J., 2010. Chagas disease. *Lancet*, 375(9723), pp. 1388-1402.

Rassi, A. & Marcondes de Rezende, J., 2010. Clinical Phases and Forms of Chagas Disease. En: *American Trypanosomiasis Chagas Disease One Hundred Years of Research*. Burlington: Elsevier, pp. 709-741.

Rivas, K., Muñoz, D., Pino, N. & Bálcazar, N., 2015. Actividad antioxidante, contenido fenólico total y citotóxicidad de extractos polares obtenidos de plantas antidiabéticas colombianas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(3), pp. 277-289.

Royal Botanic Gardens Kew, 2016. *Rosmarinus officinalis* (rosemary). [En línea] Available at: <http://www.kew.org/science-conservation/plants-fungi/rosmarinus-officinalis-rosemary> [Último acceso: 29 Abril 2016].

Sairam, K., Rao, ChV., Babu, MD., Kumar, KV., Agrawal, VK. & Goel, RK., 2002. Antiulcerogenic effect of methanolic extract of *Embllica officinalis*: an experimental study. *Journal of Ethnopharmacology*, 82(1), pp. 1-9.

Salih, S., Alobaidi, K. & Alobadi, Z., 2015. Cytotoxic Effect of *Rosmarinus officinalis* L. Leaf Extracts on Tumor Cell Line. *Journal of Al-Nahrain University*, 18(4), pp. 98-102.

Sánchez, C., Gupta, M. & Santana, A. I., 2002. Actividad Inmunomoduladora de las Plantas. *Revista de Fitoterapia*, 2(2), pp. 151-153.

Saroj, P., Verma, M., Jha, K. & Pal, M., 2012. AN OVERVIEW ON IMMUNOMODULATION. *Journal of Advanced Scientific Research*, 3(1), pp. 7-12.

Sokovic, M., Glamoclija, J. & Ciric, D., 2013. Natural Products from Plants and Fungi as Fungicides. En: M. Nita, ed. *Fungivides, Showcases of Integrated Plan Disease Management from Around the World*. s.l.:Intech.

Takeda, K. & Akira, S., 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*, 17(1), pp. 1-14.

Tayler, K. & Engman, D., 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, 1(31), pp. 472-481.

Tornheim, A., Lozano, F., Gilma, R., Castellon, M., Solano, M., Sullca, W., Torrico, F. & Bern, C., 2013. Improved Completion Rates and Characterization of Drug Reactions with an Intensive Chagas Disease Treatment Program in Rural Bolivia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(9), p. e2407.

Universidad Nacional, 2007. *Siparuna sessiliflora* (Kunth) A. DC. - *Siparunaceae*. [En línea] Available at: <http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=ShowObject&accion=show&id=49325> [Último acceso: 25 Abril 2016].

Urbina, J., 2010. New Insights in Chagas' disease treatment. *Drugs of the future*, 35(5), pp. 409-419.

Urbina, J., 2010. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitation and new approaches. *Acta Tropica*, 115(1-2), pp. 55-68.

Urbina, J. A., 2015. Recent Clinical Trials for the Etiological Treatment of Chronic Chagas Disease: Advances, Challenges and Perspectives. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(1), pp. 146-156.

Vazquez, M. P., 2007. The Genetics and Genomics of *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Biomedican and Pharmaceutical Sciences*, 1(1), pp. 1-11.

Vigosa, J. & Fonseca, R., 2013. Contribución a la Flora de Guerrero: Estudio de la familia Siparunaceae. *Medio Ambiente y Recursos Naturales*, 1(1), pp. 386-388.

Villareal, L. W., 2015. ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE *Clethra Fimbriata* Kunth (CLETHRACEAE) A PARTIR DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE HOJAS Y TALLOS. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.

Villareal, W., 2015. ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE *Clethra Fimbriata* Kunth (CLETHRACEAE) A PARTIR DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE HOJAS Y TALLOS. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.

Viotti, R. & Vigilano, C., 2007. Etiological treatment of chronic Chagas disease: neglected 'evidence' by evidence-based medicine. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 5(4), pp. 717-726.

Visanji, J., Thompson, D. & Padfield, P., 2006. Induction of G2/M phase cell cycle arrest by carnosol and carnosic acid is associated with alteration of cyclin A and cyclin B1 levels. *Cancer Letters*, 237(1), pp. 130-136.

Wei, W., Ye, Z., Qian, L., Riwen, M., Xingjun, S., Dun, J., Ting, Z., Huifen, Z., Lin, Z., Liuqing, Y., Xiangyang, W., 2016. Immunomodulatory effects of a polysaccharide purified from *Lepidium meyenii* Walp. on macrophages. *Process Biochemistry*, 51(4), pp. 542-553.

Wilkinson, S. R., Taylor, M., Horn, D., Kelly, J. & Cheeseman, I., 2008. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(13), pp. 5022-5027.

Wongsrichanalai, C., Pickard, A., Wernsdorfer, W. & Mesknick, S., 2002. Epidemiology of drug-resistant malaria. *The Lancet. Infectious diseases*, 2(4), pp. 209-218.

World Health Organization, 2016. *Chagas disease*. [En línea] Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>

World Health Organization, 2002. *CONTROL OF CHAGAS DISEASE, Second report of the WHO Expert Committee*. [En línea] Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42443/1/WHO_TRS_905.pdf

Yadav, R. & Agarwala, M., 2011. Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of Phytology*, 3(12), pp. 10-14.

Yesil-Celiktas, O., Sevamil, C., Bedir, E. & Vardar-Sukan, F., 2010. Inhibitory Effects of Rosemary Extracts, Carnosic Acid and Rosmarinic Acid on the Growth of Various Human Cancer Cell Lines. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65(2), pp. 158-163.

11. ANEXOS

Anexo 1. Encuesta de inclusión de individuos sanos.

	FORMATO DE DATOS INCLUSIÓN DE INDIVIDUOS Y MONTAJE EXPERIMENTAL	Código: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> Fecha: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> D M A
---	--	--

PROYECTO: Efecto de los Extractos Totales de *Siparuna sessiliflora*, *Rosmarinus officinalis* y *Clethra fimbriata* sobre Linfocitos T CD8⁺ de Individuos Sanos

*Como requisito para optar al título de Bacterióloga

ESTUDIANTE: Maria Fernanda Suta Velásquez

INFORMACIÓN GENERAL	
Nombres:	Apellidos:
Documento de identificación:	Fecha de nacimiento:
Edad:	Sexo:
Teléfono:	Lugar de nacimiento: Lugar de procedencia:
ANTECEDENTES	
¿Ha estado en contacto con el pito? Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> NS/NR <input type="checkbox"/>	Antecedentes en la familia de enfermedad de Chagas Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> NS/NR <input type="checkbox"/>
¿Ha recibido transfusiones? Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> NS/NR <input type="checkbox"/>	¿En su infancia su vivienda estaba construida de?
¿Su vivienda actual está construida de?	¿Tiempo de exposición a la infección?
¿Alguna enfermedad infecciosa aguda o crónica diagnosticada recientemente? Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> NS/NR <input type="checkbox"/>	¿Enfermedad crónica diagnosticada? Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> NS/NR <input type="checkbox"/>

INCLUSIÓN AL ESTUDIO

¿Incluido?
Sí No

Fecha de ingreso al estudio

D M A

MONTAJE EXPERIMENTAL

Objetivo 1

Muestra utilizada para extracto de:

Ss Ro Cf CP

Fecha

D M A

Objetivo 2

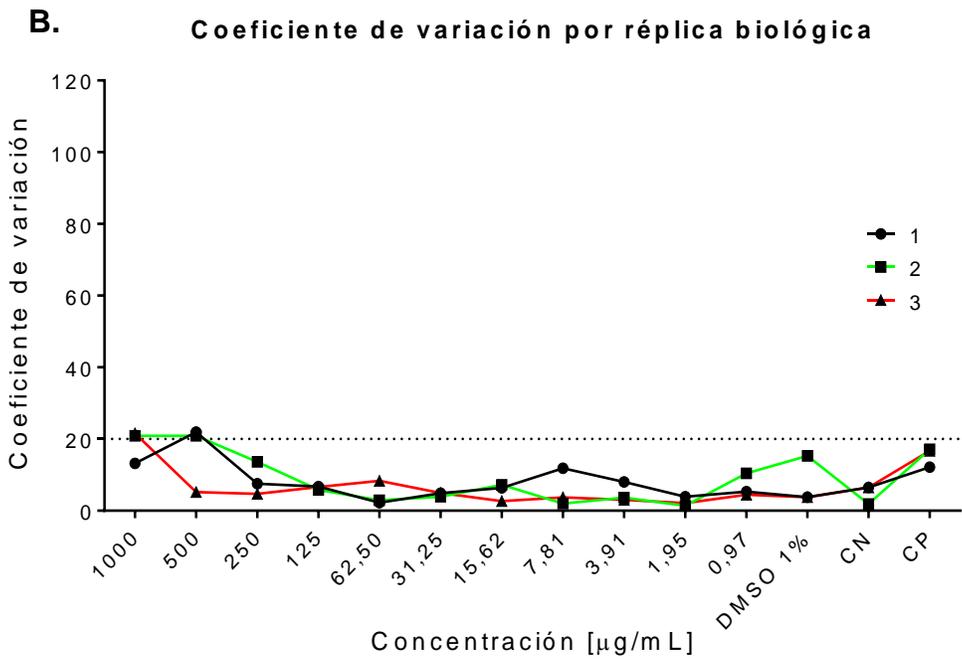
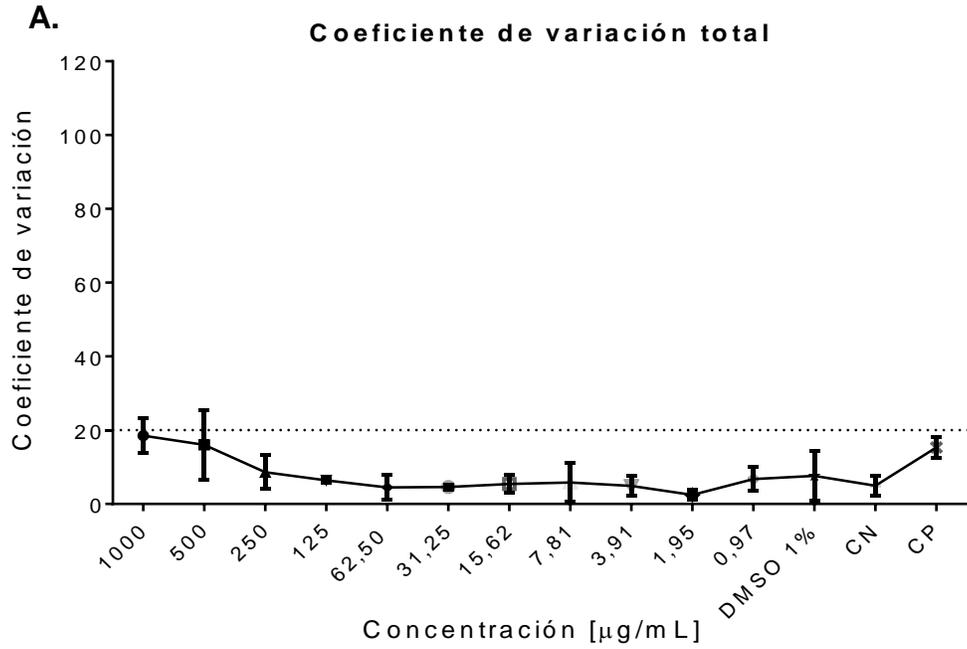
Muestra utilizada para extracto de:

Ss Ro Cf

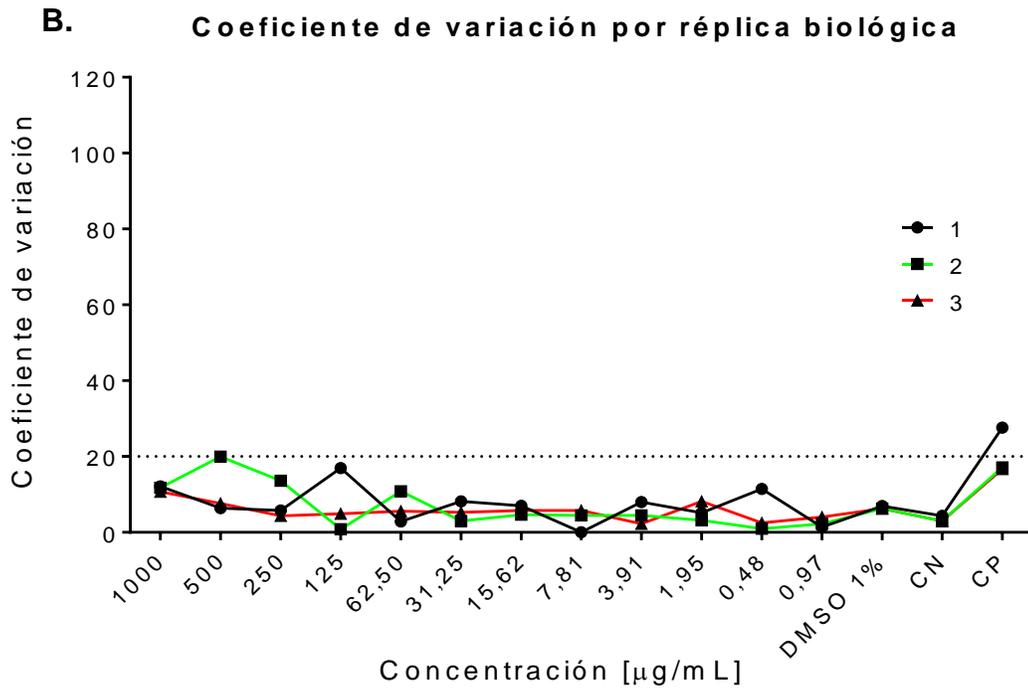
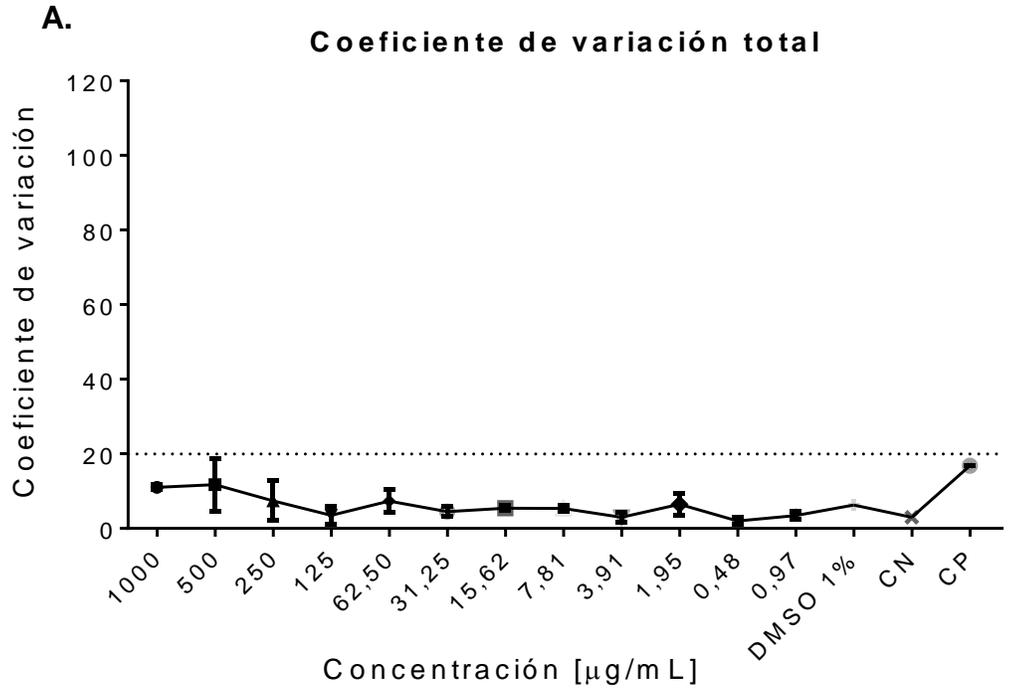
Fecha

D M A

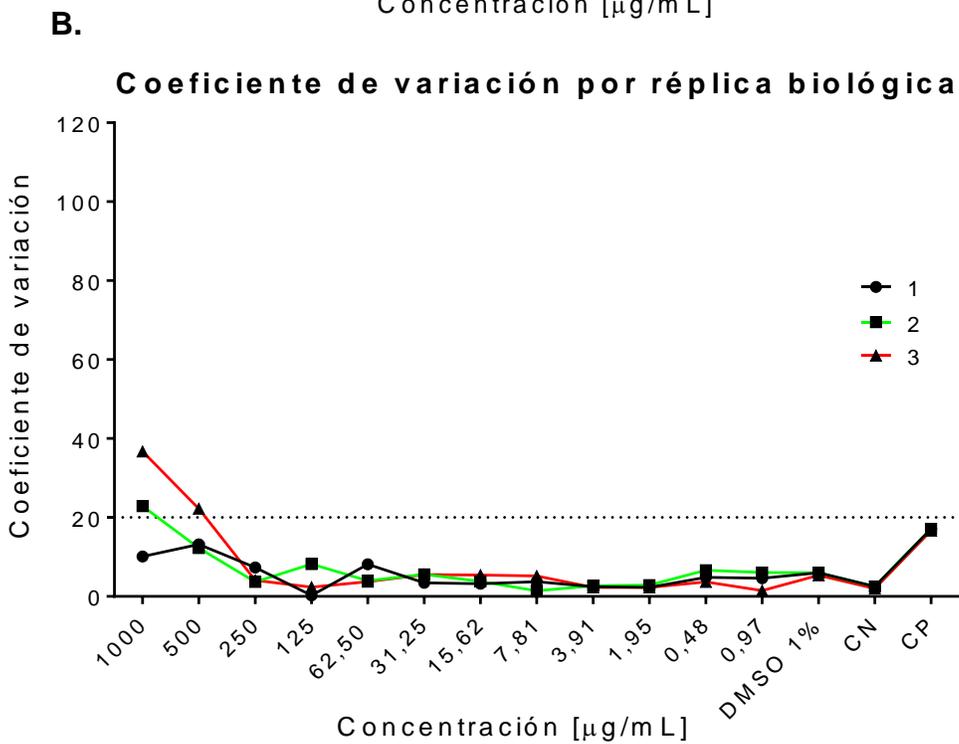
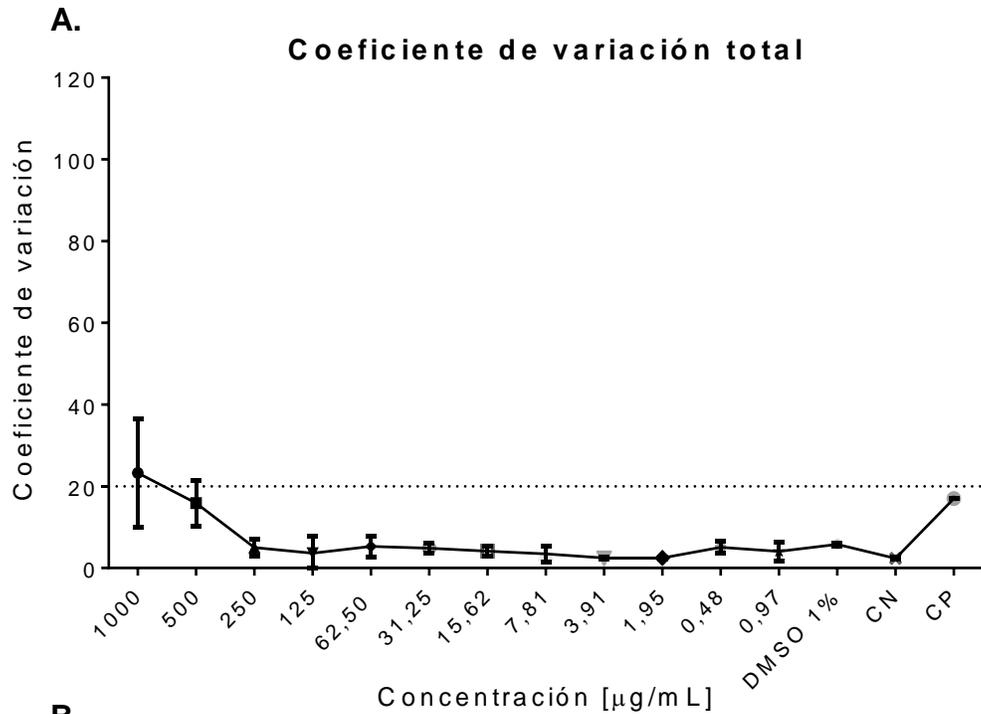
Anexo 2. Coeficiente de variación de gráficas representativas de la actividad citotóxica del extracto total de hojas de *S. sessiliflora*. A. Gráfica representativa de coeficiente de variación total de 3 réplicas biológicas y B. Coeficiente de variación por réplica biológica.



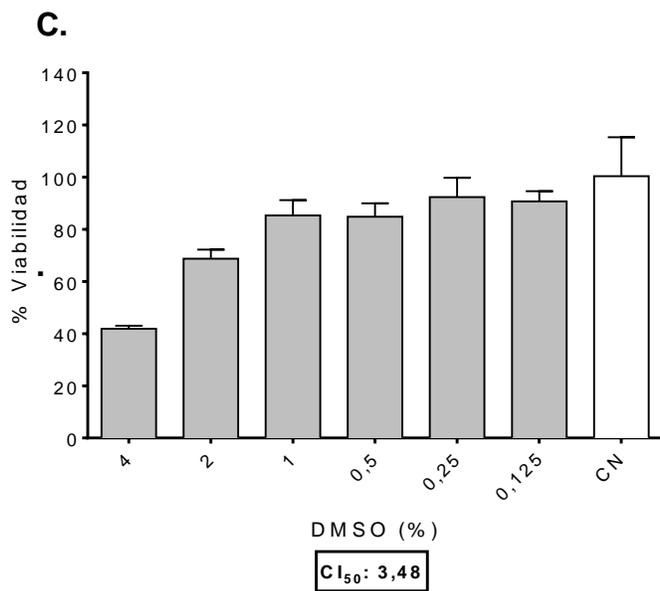
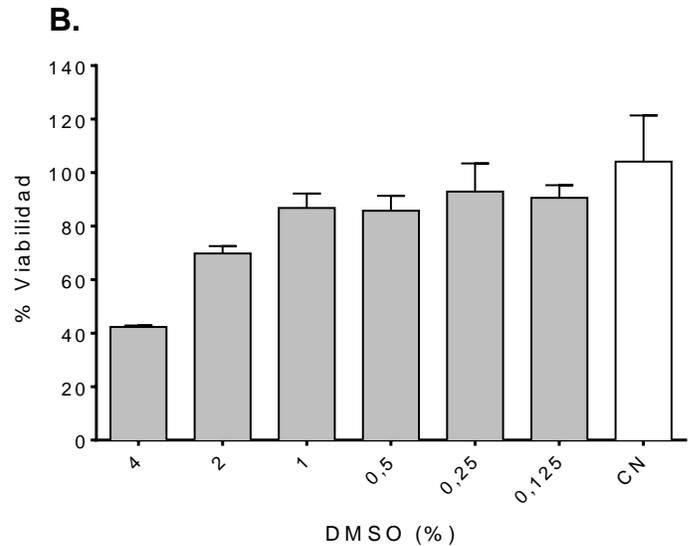
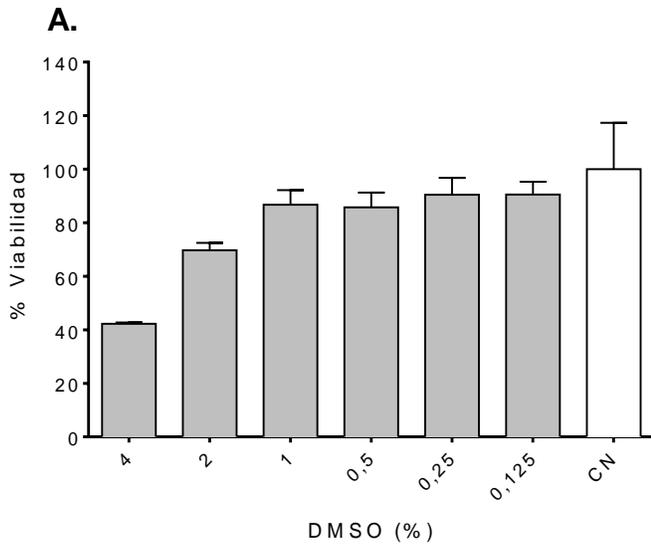
Anexo 3. Coeficiente de variación de la actividad citotóxica del extracto total de hojas de *R. officinalis*. A. Gráfica representativa de coeficiente de variación total de 3 réplicas biológicas y **B.** Coeficiente de variación por réplica biológica.



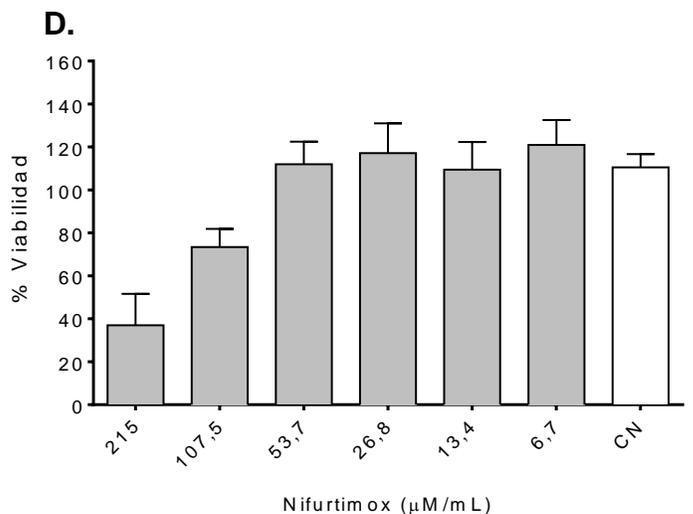
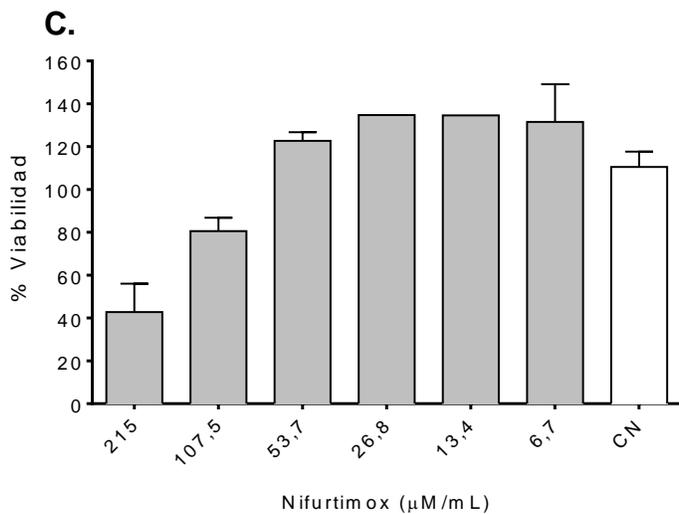
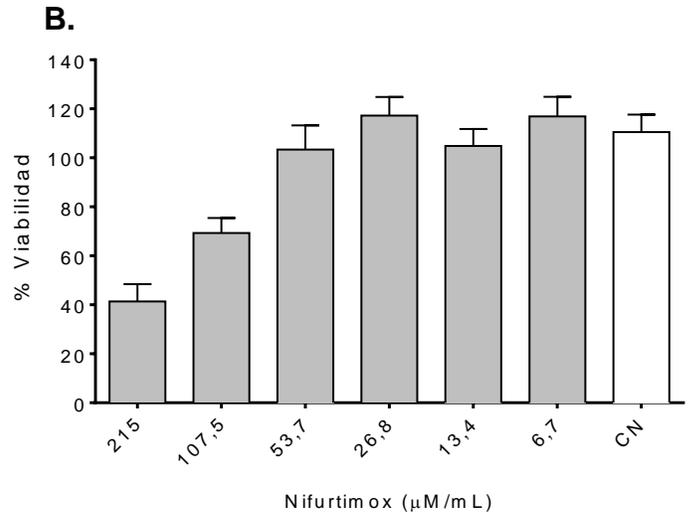
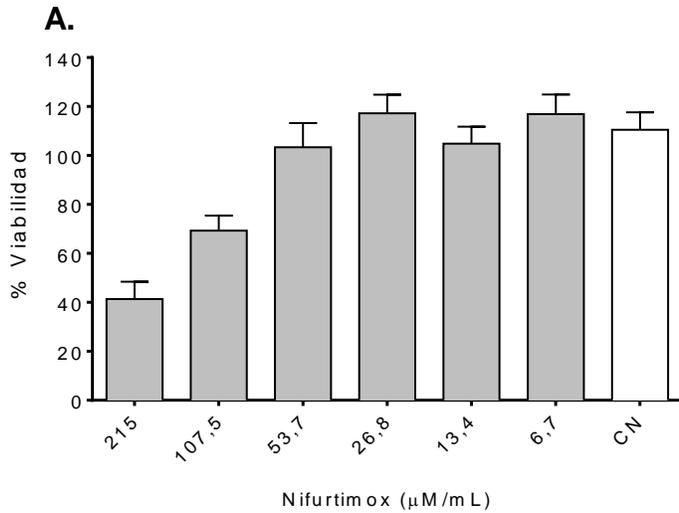
Anexo 4. Coeficiente de variación de la actividad citotóxica del extracto total de hojas de *C. fimbriata*. A. Gráfica representativa de coeficiente de variación total de 3 réplicas biológicas. B. Coeficiente de variación por réplica biológica.



Anexo 5. Actividad citotóxica del DMSO sobre CMSP. Réplicas biológicas de la estandarización del control del vehículo en CMSP con DMSO a diferentes concentraciones. **A.** Réplica biológica 1, **B.** Réplica biológica 2, **C.** Promedio de dos réplicas biológicas. Las columnas representan la media con desviación estándar (DS). CN, Control negativo.



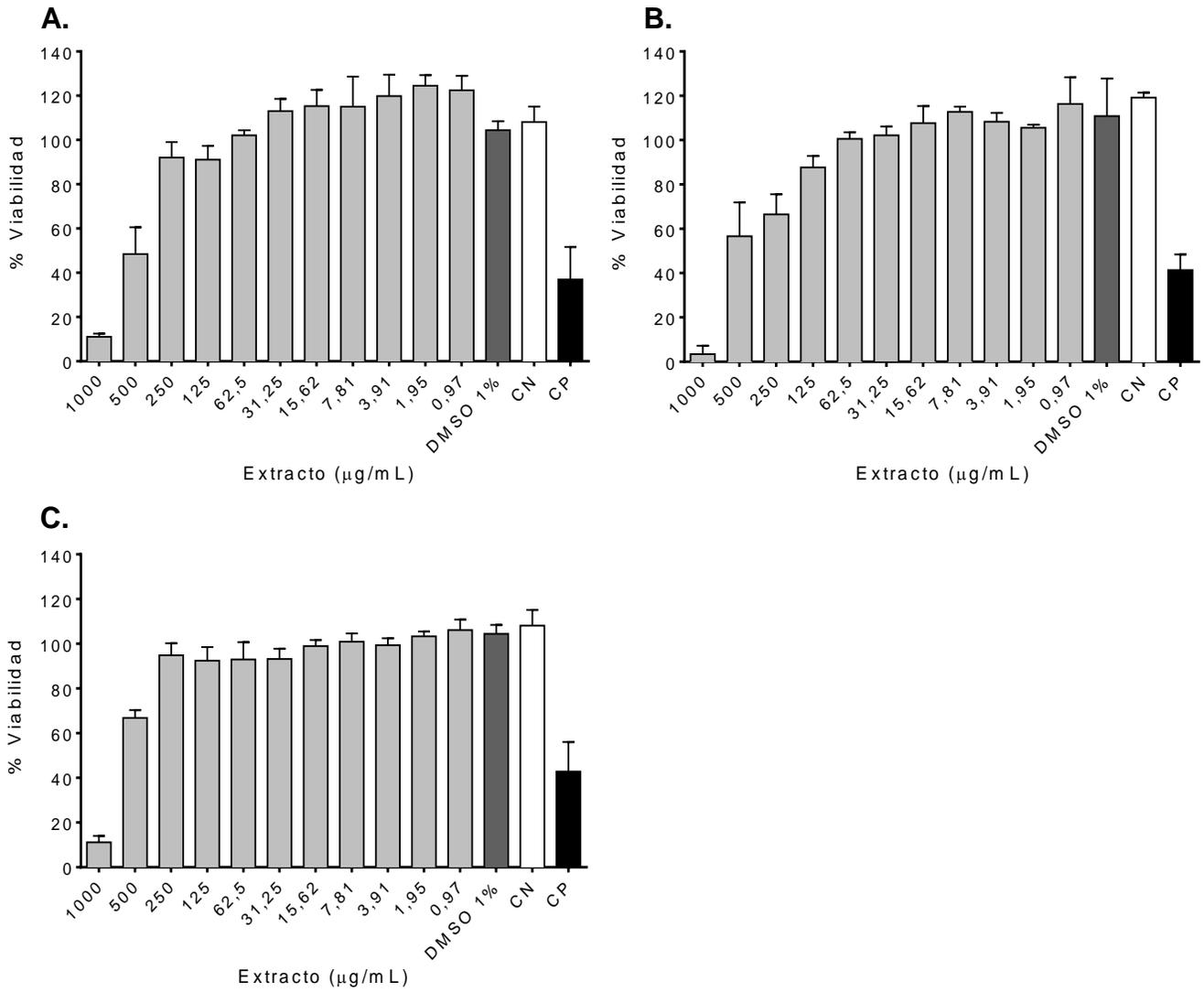
Anexo 6. Actividad citotóxica del Nifurtimox sobre CMSP. Réplicas biológicas de la estandarización del control positivo usando Nifurtimox con CMSP a diferentes concentraciones. **A.** Réplica biológica 1, **B.** Réplica biológica 2, **C.** Réplica biológica 3, **D.** Promedio de tres réplicas biológicas. Las columnas representan la media con desviación estándar (DS). CN, Control negativo.



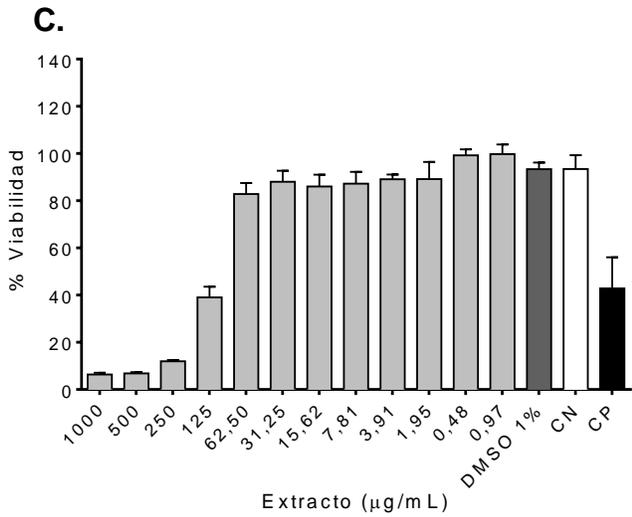
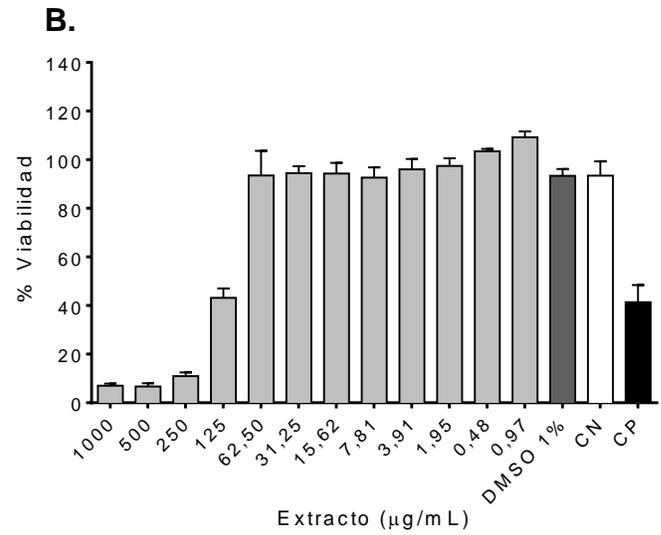
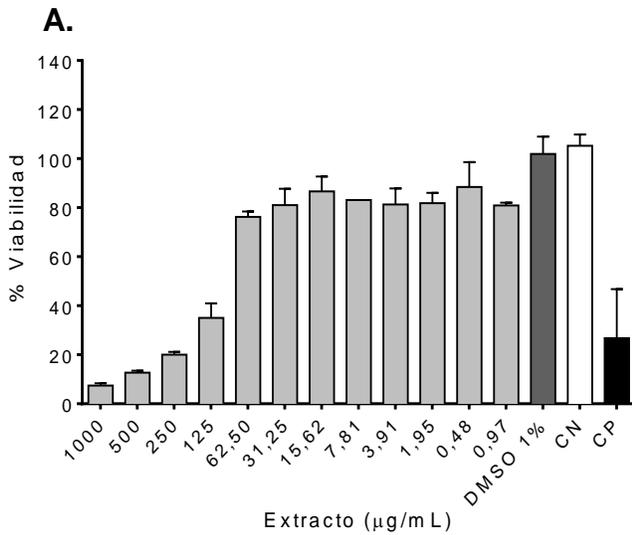
CI₅₀ = 170,5

Anexo 7. Réplicas biológicas de la actividad citotóxica de extracto total de hojas de *S. sessiliflora*. A. Réplica biológica 1, B. Réplica biológica 2, C. Réplica biológica 3.

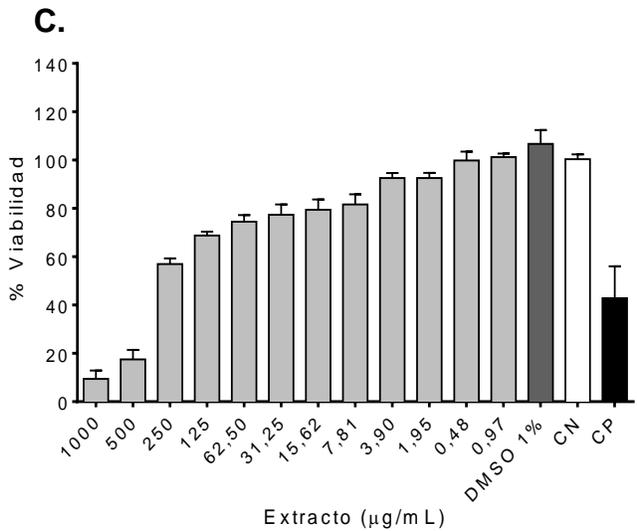
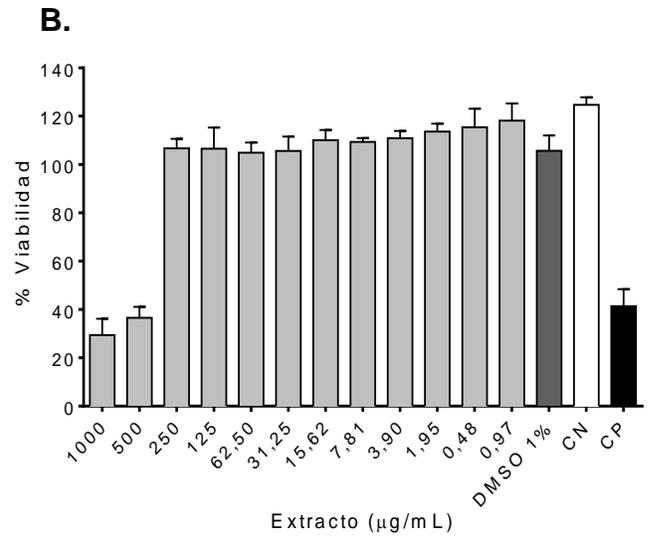
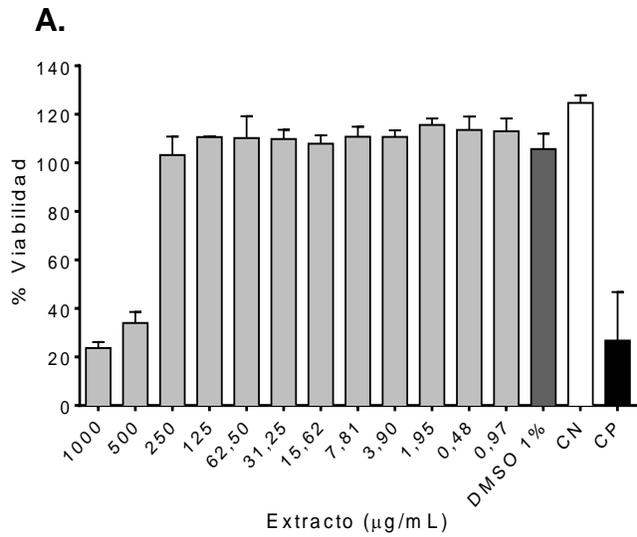
Las columnas representan la media con desviación estándar (DS). CN, Control negativo; CP, Control positivo.



Anexo 8. Réplicas biológicas de la actividad citotóxica de extracto total de hojas de *R. officinalis*. **A.** Réplica biológica 1, **B.** Réplica biológica 2, **C.** Réplica biológica 3. Las columnas representan la media con desviación estándar (DS). CN, Control negativo; CP, Control positivo.



Anexo 9. Réplicas biológicas de la actividad citotóxica de extracto total de hojas de *C. fimbriata*. A. Réplica biológica 1, B. Réplica biológica 2, C. Réplica biológica 3, Las columnas representan la media con desviación estándar (DS). CN, Control negativo; CP, Control positivo.



ANEXO 2

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE LOS AUTORES
(Licencia de uso)

Bogotá, D.C., 09 de junio de 2016

Señores
Biblioteca Alfonso Borrero Cabal S.J.
Pontificia Universidad Javeriana
Ciudad

Los suscritos:

María Fernanda Jota Velásquez, con C.C. No 1026290956
_____, con C.C. No _____
_____, con C.C. No _____

En mi (nuestra) calidad de autor (es) exclusivo (s) de la obra titulada:

EFFECTO DE LOS EXTRACTOS TOTALES DE SIPARUNA SESSILIFLORA,
ROSMARINUS OFFICINALIS Y CLEPTARA FIMBRIATA SOBRE LINFOCITOS TCD8+ DE
INDIVIDUOS SANOS (por favor señale con una "x" las opciones que apliquen)

Tesis doctoral Trabajo de grado Premio o distinción: Si No

presentado y aprobado en el año 2016, por medio del presente escrito autorizo (autorizamos) a la Pontificia Universidad Javeriana para que, en desarrollo de la presente licencia de uso parcial, pueda ejercer sobre mi (nuestra) obra las atribuciones que se indican a continuación, teniendo en cuenta que en cualquier caso, la finalidad perseguida será facilitar, difundir y promover el aprendizaje, la enseñanza y la investigación.

En consecuencia, las atribuciones de usos temporales y parciales que por virtud de la presente licencia se autorizan a la Pontificia Universidad Javeriana, a los usuarios de la Biblioteca Alfonso Borrero Cabal S.J., así como a los usuarios de las redes, bases de datos y demás sitios web con los que la Universidad tenga perfeccionado un convenio, son:

AUTORIZO (AUTORIZAMOS)	SI	NO
1. La conservación de los ejemplares necesarios en la sala de tesis y trabajos de grado de la Biblioteca.	X	
2. La consulta física (sólo en las instalaciones de la Biblioteca)	X	
3. La consulta electrónica - on line (a través del catálogo Biblos y el Repositorio Institucional)	X	
4. La reproducción por cualquier formato conocido o por conocer	X	
5. La comunicación pública por cualquier procedimiento o medio físico o electrónico, así como su puesta a disposición en Internet	X	
6. La inclusión en bases de datos y en sitios web sean éstos onerosos o gratuitos, existiendo con ellos previo convenio perfeccionado con la Pontificia Universidad Javeriana para efectos de satisfacer los fines previstos. En este evento, tales sitios y sus usuarios tendrán las mismas facultades que las aquí concedidas con las mismas limitaciones y condiciones	X	

De acuerdo con la naturaleza del uso concedido, la presente licencia parcial se otorga a título gratuito por el máximo tiempo legal colombiano, con el propósito de que en dicho lapso mi (nuestra) obra sea explotada en las condiciones aquí estipuladas y para los fines indicados, respetando siempre la titularidad de los derechos patrimoniales y morales correspondientes, de

acuerdo con los usos honrados, de manera proporcional y justificada a la finalidad perseguida, sin ánimo de lucro ni de comercialización.

De manera complementaria, garantizo (garantizamos) en mi (nuestra) calidad de estudiante (s) y por ende autor (es) exclusivo (s), que la Tesis o Trabajo de Grado en cuestión, es producto de mi (nuestra) plena autoría, de mi (nuestro) esfuerzo personal intelectual, como consecuencia de mi (nuestra) creación original particular y, por tanto, soy (somos) el (los) único (s) titular (es) de la misma. Además, aseguro (aseguramos) que no contiene citas, ni transcripciones de otras obras protegidas, por fuera de los límites autorizados por la ley, según los usos honrados, y en proporción a los fines previstos; ni tampoco contempla declaraciones difamatorias contra terceros; respetando el derecho a la imagen, intimidad, buen nombre y demás derechos constitucionales. Adicionalmente, manifiesto (manifestamos) que no se incluyeron expresiones contrarias al orden público ni a las buenas costumbres. En consecuencia, la responsabilidad directa en la elaboración, presentación, investigación y, en general, contenidos de la Tesis o Trabajo de Grado es de mí (nuestro) competencia exclusiva, eximiendo de toda responsabilidad a la Pontificia Universidad Javeriana por tales aspectos.

Sin perjuicio de los usos y atribuciones otorgadas en virtud de este documento, continuaré (continuaremos) conservando los correspondientes derechos patrimoniales sin modificación o restricción alguna, puesto que de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación de los derechos patrimoniales derivados del régimen del Derecho de Autor.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables. En consecuencia, la Pontificia Universidad Javeriana está en la obligación de RESPETARLOS Y HACERLOS RESPETAR, para lo cual tomará las medidas correspondientes para garantizar su observancia.

NOTA: Información Confidencial:

Esta Tesis o Trabajo de Grado contiene información privilegiada, estratégica, secreta, confidencial y demás similar, o hace parte de una investigación que se adelanta y cuyos resultados finales no se han publicado. Si No

En caso afirmativo expresamente indicaré (indicaremos), en carta adjunta, tal situación con el fin de que se mantenga la restricción de acceso.

NOMBRE COMPLETO	No. del documento de identidad	FIRMA
Maria Fernanda Sota Velásquez	1026290956	Maria Fernanda Sota

FACULTAD: Ciencias

PROGRAMA ACADÉMICO: Bacteriología

Anexo 3

**BIBLIOTECA ALFONSO BORRERO CABAL, S.J.
DESCRIPCIÓN DE LA TESIS O DEL TRABAJO DE
GRADO FORMULARIO**

TÍTULO COMPLETO DE LA TESIS DOCTORAL O TRABAJO DE GRADO						
EFECTO DE LOS EXTRACTOS TOTALES DE <i>SIPARUNA SESSILIFLORA</i> , <i>ROSMARINUS OFFICINALIS</i> Y <i>CLETHRA FIMBRIATA</i> SOBRE LINFOCITOS T CD8 ⁺ DE INDIVIDUOS SANOS						
SUBTÍTULO, SI LO TIENE						
AUTOR O AUTORES						
Apellidos Completos			Nombres Completos			
Suta Velásquez			Maria Fernanda			
DIRECTOR (ES) TESIS O DEL TRABAJO DE GRADO						
Apellidos Completos			Nombres Completos			
Cuellar Ávila			Adriana			
FACULTAD						
Ciencias						
PROGRAMA ACADÉMICO						
Tipo de programa (seleccione con "x")						
Pregrado	Especialización	Maestría	Doctorado			
X						
Nombre del programa académico						
Bacteriología						
Nombres y apellidos del director del programa académico						
Diana Cristina Patiño Cuervo						
TRABAJO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:						
Bacteriólogo						
PREMIO O DISTINCIÓN (En caso de ser LAUREADAS o tener una mención especial):						
CIUDAD		AÑO DE PRESENTACIÓN DE LA TESIS O DEL TRABAJO DE GRADO			NÚMERO DE PÁGINAS	
Bogotá		2016			66	
TIPO DE ILUSTRACIONES (seleccione con "x")						
Dibujos	Pinturas	Tablas, gráficos y diagramas	Planos	Mapas	Fotografías	Partituras
		X			X	
SOFTWARE REQUERIDO O ESPECIALIZADO PARA LA LECTURA DEL DOCUMENTO						
Nota: En caso de que el software (programa especializado requerido) no se encuentre licenciado por la Universidad a través de la Biblioteca (previa consulta al estudiante), el texto de la Tesis o Trabajo de Grado quedará solamente en formato PDF.						

MATERIAL ACOMPAÑANTE					
TIPO	DURACIÓN (minutos)	CANTIDAD	FORMATO		
			CD	DVD	Otro ¿Cuál?
Vídeo					
Audio					
Multimedia					
Producción electrónica					
Otro Cuál?					
DESCRIPTORES O PALABRAS CLAVE EN ESPAÑOL E INGLÉS Son los términos que definen los temas que identifican el contenido. (En caso de duda para designar estos descriptores, se recomienda consultar con la Sección de Desarrollo de Colecciones de la Biblioteca Alfonso Borrero Cabal S.J en el correo biblioteca@javeriana.edu.co , donde se les orientará).					
ESPAÑOL			INGLÉS		
Enfermedad de Chagas			Chagas Disease		
Linfocitos T CD8 ⁺			T CD8 ⁺ Lymphocytes		
Tratamiento			Treatment		
Especies Vegetales			Plant Species		
Modulación			Modulation		
<i>Siparuna sessiliflora</i>			<i>Siparuna sessiliflora</i>		
<i>Clethra fimbriata</i>			<i>Clethra fimbriata</i>		
<i>Rosmarinus officinalis</i>			<i>Rosmarinus officinalis</i>		
IFN- γ , TNF- α			IFN- γ , TNF- α		
RESUMEN DEL CONTENIDO EN ESPAÑOL E INGLÉS (Máximo 250 palabras - 1530 caracteres)					

La enfermedad de Chagas es una afección sistémica y crónica causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, que afecta gran parte de la población mundial. Aunque se desconocen las causas que evitan la progresión a la fase crónica, se ha asociado con la progresión a las formas severas de la enfermedad, la pérdida progresiva de la multifuncionalidad de los linfocitos T (LT) CD8⁺. Existen dos medicamentos disponibles para el tratamiento de la enfermedad: Nifurtimox y Benznidazol. Sin embargo, el tratamiento no es bien tolerado por múltiples efectos adversos y el uso del tratamiento en la fase crónica de la enfermedad es controversial. Por lo tanto, es importante buscar tratamientos alternativos que permitan evitar la progresión a la fase crónica sintomática o que eliminen el parásito. Colombia cuenta con alrededor del 10% de las especies vegetales del mundo, que representan una fuente de abundantes compuestos con actividades terapéuticas. Así, es importante la búsqueda de compuestos que permitan el tratamiento etiológico de los pacientes, así como compuestos que puedan modular la respuesta inmune como coadyuvante en el tratamiento de la enfermedad. Se analizó el efecto de extractos de especies vegetales colombianas en la producción de citocinas por linfocitos T CD8⁺ totales de individuos sanos. Encontrándose, que los extractos de hojas de *S. sessiliflora* y de *C. fimbriata* inducen la producción de IFN- γ y TNF- α en LT CD8⁺ de individuos sanos. Estos hallazgos sugieren que existen especies de plantas vegetales colombianas con capacidad inmunoestimuladora y con potencial para ser usadas en la búsqueda de compuestos con actividad tripanocida.

Chagas disease is a chronic systemic disease caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, which affects much of the world's population. Although the causes that prevent progression to chronic phase are unknown, it has been associated with progression to severe forms of the disease, the progressive loss of multifunctionality of the T (LT) CD8⁺ lymphocytes. There are two drugs available to treat the disease: Nifurtimox and Benznidazole. However, treatment is not well tolerated by multiple side effects and use of treatment in the chronic phase of the disease is controversial. Therefore, it is important to seek alternative treatments to prevent progression to symptomatic chronic phase or to eliminate the parasite. Colombia has about 10% of plant species worldwide, which represent a rich source of compounds with therapeutic activities. Thus, it is important to the search for compounds that allow etiological treatment of patients as well as compounds that can modulate the immune response as an adjunct in the treatment of disease. the effect of extracts of Colombian plant species in total cytokine production by healthy individuals CD8⁺ T cells was analyzed. Finding that leaf extracts of *S. C. fimbriata sessiliflora* and induce the production of IFN- γ and TNF- α in LT CD8⁺ healthy individuals. These findings suggest that there are species of Colombian vegetable plants with immunostimulatory capacity and potential to be used in the search for compounds with trypanocidal activity.