

La Viabilidad y Funcionalidad de Leucocitos Humanos en presencia de un Extracto Hidro-alcohólico de *E. coca*

The Viability and Functionality of Human Leukocytes in the presence of a Hydro-alcoholic Extract of *E. coca*.

^{1*} Ximena Padilla, <https://orcid.org/0000-0003-1796-3586>

¹ Katty Terrazas, <https://orcid.org/0000-0001-5487-7121>

¹ Roger Carvajal, <https://orcid.org/0000-0003-3998-6658>

¹Unidad de Biomedicina Experimental, Unidad de Virología, Inmunidad e Infección. Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud (SELADIS). Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. UMSA, La Paz, Bolivia.

*Autor de correspondencia: ximenitapliz@gmail.com

FECHA DE RECEPCIÓN: 10 MAYO 2023
2024

FECHA DE ACEPTACIÓN: 23 ENERO

Resumen

Introducción: Para estudiar el efecto de cualquier producto natural, aunque sea de uso habitual de la medicina tradicional, es necesario establecer previamente los márgenes de seguridad para su utilización en humanos. En el caso de *Erythroxylum coca*, para trazar sus perspectivas de uso como fitofármaco o de producto industrial, es necesario conocer si tiene algún grado de toxicidad o si es completamente inocuo, no obstante, su larga tradición de consumo.

Objetivo: Explorar el efecto de un extracto hidro-alcohólico de *E. coca* sobre granulocitos y mononucleares de voluntarios donadores humanos, en condiciones de cultivo celular. Se examinó, por un lado, el efecto sobre la viabilidad celular y la actividad del sistema mitocondrial/citoplasmático de óxido-reductasas y, por otra parte, se exploró su efecto sobre la funcionalidad celular a través de la determinación de la capacidad fagocítica, la quimiotaxis, la endocitosis y la actividad microbicida, en el ámbito de la inmunidad innata, y la capacidad de liberación o estimulación de citoquinas en el ámbito de la respuesta inflamatoria.

Materiales y Métodos: Se evaluó la viabilidad por Azul Tripan, la actividad de oxido reductasas por reducción de MTT, la capacidad endocítica de levaduras, quimiotaxis en gel de agarosa

hacia el péptido Fmlp y actividad microbicida sobre *S.aureus*. Las liberaciones de citoquinas se evaluaron por ELISA.

Resultados: Se encontró que a las dosis equivalentes a la del consumo habitual humano, los leucocitos conservan su viabilidad (0,13µg/ml), la que se mantiene hasta dosis relativamente altas (130µg/ml). En esta franja de seguridad se encontró que *E. coca* no altera la capacidad de las enzimas mitocondriales y citoplasmáticas de óxido- reducción, al contrario, en dosis bajas es capaz de estimular dicha actividad. La actividad quimiotáctica no es afectada por el extracto hidroalcohólico de coca por el contrario a dosis intermedias esta actividad se eleva de manera ostensible. La capacidad endocítica no se ve afectada y por el contrario se pudo observar un estímulo de la misma; en la actividad microbicida no existe cambios significativos.

Conclusiones: Se concluye que, este producto a las dosis equivalentes a las recomendadas por la medicina tradicional no tiene efectos deletéreos sobre la viabilidad y funcionalidad de los leucocitos humanos. En lo que respecta a la actividad del extracto sobre la producción de citoquinas, se encontró que *E. coca* tiene efecto de estimulación en la liberación de TNF e inhibición de IL-10 modulando así mayor actividad proinflamatoria.

Palabras clave: Inmunidad innata, Coca, inflamación, medicina tradicional

Abstract

Introduction: In order to study the effect of any natural product, even if it is commonly used in traditional medicine, it is necessary to previously establish the safety margins for its use in humans. In the case of *Erythroxylum coca*, in order to trace its prospects of use as a phytopharmaceutical or industrial product, it is necessary to know if it has any degree of toxicity or if it is completely innocuous, despite its long tradition of consumption.

Objective: To explore the effect of a hydro-alcoholic extract of *E. coca* on granulocytes and mononuclear cells of human donor volunteers, under cell culture conditions. We examined, on the one hand, the effect on cell viability and the activity of the mitochondrial/cytoplasmic oxidoreductase system and, on the other hand, it was explored its effect on cellular functionality through the determination of phagocytic capacity, chemotaxis, endocytosis and microbicidal activity, in the field of innate immunity, and the capacity of release or stimulation of cytokines in the field of inflammatory response.

Materials and Methods: Viability by Trypan Blue, oxidoreductase activity by MTT reduction, endocytic capacity of yeast, chemotaxis in agarose gel towards Fmlp peptide and microbicidal activity on *S.aureus* were evaluated. Cytokine release was evaluated by ELISA.

Results: It was found that at doses equivalent to the usual human consumption, leukocytes retain their viability (0.13µg/ml), which is maintained up to relatively high doses (130µg/ml). In this safety range it was found that *E. coca* does not alter the capacity of mitochondrial and cytoplasmic oxidation-reduction enzymes, on the contrary, at low doses it is able to stimulate such activity. The chemotactic activity is not affected by the hydroalcoholic extract of coca, on the contrary, at intermediate doses this activity is ostensibly elevated. The endocytic capacity is

not affected and, on the contrary, a stimulus of the same was observed; in the microbicidal activity there are no significant changes. **Conclusions:** It is concluded that this product, at doses equivalent to those recommended by traditional medicine, has no deleterious effects on the viability and functionality of human leukocytes. Regarding the activity of the extract on the production of cytokines, it was found that *E. coca* has a stimulating effect on the release of TNF and inhibition of IL-10, thus modulating greater proinflammatory activity.

Keywords: Innate immunity, Coca, inflammation, traditional medicine.

INTRODUCCIÓN

La herbolaria medicamentosa nativa de los andes centrales utiliza ampliamente las hojas de coca en forma de infusiones, ungüentos y harina ingerida, para el manejo de diversas entidades mórbidas. Entre estas se cita, preferentemente, procesos inflamatorios articulares, osteoporosis, espasmos viscerales, contracturas y estados de ansiedad/depresión, trastornos ventilatorios en la altura, tumores e infecciones (Rojas, 2013)(Penny et al., 2009) . Por todo lo anterior, dada la promisoriedad de este producto como recurso terapéutico con perspectivas de industrialización, cobra importancia realizar estudios pre-clínicos y clínicos en las patologías citadas. Sin embargo, para abordar estas tareas es indispensable explorar, de manera previa, la inocuidad de este producto a través de estudios de seguridad que determinen las dosis a las cuales puede ser utilizado con la suficiente seguridad en modelos preclínicos y clínicos. Para esto, se consideró que a la ingestión de los derivados de la coca, particularmente la harina (como la indican los médicos tradicionales) continúa la absorción de sus componentes y el contacto con las células sanguíneas. En ese sentido, tiene importancia establecer si los componentes de este producto pueden afectar a dichos componentes de la sangre, particularmente a los que están encargados de la primera línea de la defensa del organismo: los leucocitos. Estudiar este posible efecto, además de permitir conocer la inocuidad o toxicidad del derivado para evidenciar una franja de seguridad en estudios in vitro e in vivo, permitiría conocer si tiene actividad sobre la funcionalidad de dichas células inmunitarias.

En el presente trabajo se exploró el efecto de un extracto hidro-alcohólico de *E. coca* (EHAec) sobre células mononucleares y polimorfonucleares de sangre periférica de donadores sanos en sistemas de cultivo celular. Se determinó, por un lado, el efecto sobre la viabilidad celular y la actividad del sistema mitocondrial/citoplasmático de óxido- reductasas y, por otra parte, se exploró su efecto sobre la funcionalidad celular a través de la capacidad fagocítica, la quimiotaxis, y la capacidad microbicida. Además, se estudió la influencia en la liberación de citoquinas pro y anti inflamatorias.

Aspectos Éticos

El protocolo de investigación ha sido aprobado por el comité de ética de la UMSA al momento de su aprobación por los fondos IDH 2013-2014 para el Proyecto RES.C.T.A.88/2017; RES.H.C.F. N°179/17 “Investigación pre-clínica de la toxicidad/inocuidad de *E. coca*: estudios *in vitro* e *in vivo* en modelos experimentales animales” Instituto SELADIS-UMSA del cual forma parte este trabajo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Extracto de E. coca. Las hojas de coca fueron provistas por los técnicos del Viceministerio de la Coca y Desarrollo Integral, y provenían de un cultivo en parcela controlada en la región de Los Yungas (Coripata), en la que no se aplicaron productos químicos en calidad de pesticidas.

Para eliminar partículas y microorganismos que pudiera contener el producto, este fue lavado con agua corriente y después sumergido 3 veces por 5 minutos, de manera continuada y secuencial, en una solución de etanol al 70 % en agua tri-distilada. Después se secaron las hojas a temperatura ambiente. Una vez secas las hojas fueron molidas en molino (BUHLER MIAG Milán) con cuchillas de acero inoxidable a diámetro semi-fino (como harina) obteniéndose un polvo que fue macerado en una solución de etanol con agua al 50 % en proporción 100 gramos de hoja por 1 litro p/v., por 48 horas. El sobrenadante fue filtrado en papel Whatman3 y sometido a evaporación en rotaevaporador para eliminar el alcohol. El agua fue eliminada por liofilización en un equipo Labconco. Se logró un polvo fino, que fue conservado a 4 °C hasta su uso. El rendimiento promedio fue de 16%. Las dosis a las que se utilizó el extracto fueron calculadas en base a lo que corresponde a equivalencia a 3 gramos de harina de coca consumida por el ser humano (con base a las indicaciones de la medicina tradicional), asumiendo que el extracto tiene un rendimiento definido y que en contacto con un número determinado de células puede equivaler al contacto de un extracto con las células del organismo completo, particularmente con las células sanguíneas, una vez absorbidos sus componentes.

Donadores voluntarios sanos. Sobre la base de criterios de exclusión (fumadores, enfermedades infecciosas recientes, episodios de ansiedad y depresión) e inclusión (edad entre 21 y 36 años), se seleccionaron 9 sujetos clínicamente sanos con base en un examen clínico en el que no se detectaron signos ni síntomas que demuestren alteraciones morfológicas o fisiológicas evidentes. A los 9 sujetos (6 mujeres y 3 hombres) clínicamente saludables, se les efectuó una radiografía P.A. de tórax, un

electrocardiograma y un barrido ecográfico abdominal. Se les tomó sangre para practicar un hemograma completo y pruebas bioquímicas que exploran los perfiles hepático, renal, pancreático y metabólico. Una vez confirmada la condición de salud por estar los parámetros bioquímicos y hematológicos dentro de los límites de la población normal, para su edad, y los reportes de gabinete sin alteraciones detectables, se los convocó para la aceptación explícita del consentimiento informado. En diferentes fechas se hicieron las tomas de muestra de sangre venosa periférica en ayunas, para el estudio propuesto.

Separación y preparación de células. Las células se obtuvieron de la separación de sangre periférica heparinizada de humanos voluntarios aparentemente sanos. La sangre fue mezclada en partes iguales con una solución de PBS Ph: 7,2 y luego se procedió a la centrifugación y separación por gradientes de densidad con Ficoll-Hypaque de dos densidades diferentes, Histopaque 1,077 (SIGMA-ALDRICH), para separar células mononucleares e Histopaque 1,119 (SIGMA-ALDRICH), para separar células polimorfo-nucleares. Se separó primero la interface de células mononucleares para luego separar las células polimorfonucleares (PMN); los pellets obtenidos se lavaron tres veces con PBS centrifugando a 1100 rpm, se resuspendieron en medio RPMI-1640 (SIGMA-ALDRICH) suplementado con suero fetal bovino al 10% y antibióticos, para luego determinar la viabilidad y número de células por exclusión con azul tripan en cámara de Neubauer (Corredor R, 1994).

Determinación de la viabilidad Celular por el método de exclusión de Azul Tripan. Se procedió a mezclar 0.20 μ L de la suspensión celular con 0.20 μ L de la solución de azul tripan al 0.4%, relación 1:1; posteriormente se cargó a una cámara de Neubauer para realizar el conteo en microscopio donde se diferenció las células viables, de una tonalidad refringente, de las células no viables teñidas de azul. Se contó 4 cuadrantes de la cámara y se hizo el cálculo de viabilidad y número de células (Strober, 2015).

Ensayo de MTT. Este ensayo se basó en una modificación del método original de (Mosmann, 1983). La reducción de MTT por las células se realizó mediante la incubación de 1×10^6 cel/ml en placas de cultivo de 96 pozos las cuales se pusieron a incubar en diferentes tiempos (24 y 48 horas) con diferentes concentraciones de extracto 5idroalcohólico de *E. coca*. El MTT (SIGMA-ALDRICH) fue disuelto en una solución de PBS Ph:7,2, para obtener una concentración de 5mg/ml y luego se hizo una dilución en RPMI sin Rojo fenol para obtener una concentración final de 1mg/ml. Se esterilizó por filtración con filtro millipore de 0.2 μ m de poro y luego se adicionó 100 μ L de la solución en los pozos con la suspensión celular para ser incubada por 4 horas

a 37°C, 99% de humedad y 5%CO₂. Para disolver los cristales de formazan generados, se añadió etanol absoluto y luego la absorbancia fue determinada a 405 nm con filtro diferencial de 630 nm en el lector de ELISA (Awareness INC, USA) (Bernas y Dobrucki, 2002; Berridge, Herst, y Tan, 2005; Vistica et al., 1991).

Determinación de la actividad quimiotáctica. El procedimiento fue realizado a partir de la modificación al método de Nelson, Quie, y Simmons (1975) y Dahl y Lindroos, (1979). Se disolvió una mezcla de agarosa con gelatina sin sabor como matriz de proteínas; la solución se mezcló con RPMI 2X y luego se vaciaron en placas Petri. Después de su gelificación se realizaron perforaciones en el gel en tres líneas paralelas. Se preparó el péptido quimioattractante N formyl-methionyl-Leucyl-phenylalanine (f-MLP, Sigma. Co) a una concentración final a 10⁻⁷ M, con base en lo reportado por Dahl & Lindroos, (1979) y Chenoweth, Rowe, y Hugli (1979), que señalan las concentraciones máximas de actividad 6idroalcohóli de los péptidos formilados (Schiffmann, Corcoran, y Wahl, 1975; Showell et al., 1976; Williams, Snyderman, Pike, y Lefkowitz, 1977). Posteriormente se colocó 10µL de PMN (1x10⁶cel) en los pocillos del centro, 10µL del péptido 6idroalcohóli f-MLP en los pocillos superiores y 10µL de medio RPMI en los pocillos inferiores. Se dejó en incubación por 2 horas a 37°C y luego se detuvo la migración con la adición de metanol absoluto por 30 minutos, para luego cambiar con metanol fresco. Se dejó 18 horas en incubación, luego se procedió a colorear con tinción Panóptica Rápida y se dejó secando para observar y medir el frente de la migración en milímetros (John y Sieber, 1976).

Ensayo de Capacidad Endocítica. La prueba se realizó usando levaduras de *Saccharomyces cerevisiae* (Levadura Fleishmann) las cuales fueron hidratadas con PBS a temperatura ambiente; estas se dejaron en reposo, disgregando los cúmulos por acción del Vortex cada 15 minutos. Para el ensayo se tomó las levaduras que se encontraban dispersas en el sobrenadante, el cual se centrifugo a 1500 rpm para ser concentradas; se lavó dos veces el pellet con solución de PBS y se resuspendió en 1ml de la misma solución. Se determinó la población de levaduras por conteo en cámara de Neubauer con objetivo 40X. Posteriormente las levaduras se pusieron en contacto con las células previamente incubadas en presencia de extracto hidroalcohólico de *E. coca* por 3 horas; luego se lavó con PBS para remover las levaduras no endocitadas para después proceder a fijar y teñir con Tinción Panóptica Rápida y llevar a observar con objetivo de inmersión, realizando el conteo en 5 campos de células (Terrazas,1993).

Evaluación de la capacidad microbicida.- Se utilizó una cepa de *Staphylococcus aureus* coagulasa (+) identificada y proporcionada por el laboratorio de bacteriología del Instituto SELADIS. El método usado fue una modificación de los protocolos de (Heather A. Parker, 2014) y (Hampton, Vissers, y Winterbourn, 1994) y (Leijh, Van Den Barselaar, y Van Furth, 1981). Se tomó una cantidad de colonias de 18 horas de cultivo para llevar a una suspensión de concentración de 2×10^7 bacterias/ml. Con anterioridad se puso a incubar por 3 horas las células 7idroalcohó en presencia del extracto de *E. coca* a una concentración de 2×10^5 cel/ml. Luego se puso en contacto las células incubadas con la suspensión de bacterias, se centrifugó la mezcla a 1100 rpm durante 15 minutos. Se desechó el sobrenadante para proceder a sembrar por triplicado en Agar Sangre un tubo control a tiempo 0 para determinar el número de bacterias real en contacto con las células. Los demás tubos conteniendo las células con las bacterias se dejaron incubando por 3 horas a 37°C y 5% de CO₂ para que se lleve a cabo la fagocitosis, se lavó el pellet con PBS, se recolecto y fueron sembrados los sobrenadantes por triplicado. Luego se resuspendió el pellet en medio RPMI y se colocó en placas de 96 pozos para incubar por 30 y 60 minutos para que se lleve el proceso de digestión de lo endocitado; posterior a este tiempo, se detuvo este proceso por adición de agua albuminada al 0,1 % y un cambio brusco de temperatura de 37°C a -20°C; luego se sembró por triplicado en Agar Sangre el contenido de cada uno de los pocillos y se realizó el conteo de numero de colonias formadas para determinar el número de UFC/ml.

Detección de citoquinas. – Las citoquinas se detectaron en el sobrenadante de células mononucleares cultivadas con el extracto hidroalcohólico a diferentes concentraciones. Se dividieron las células en 2 grupos: en uno de ellos se incubo solo con extracto, el otro contenía células previamente activadas con Lipopolisacarido (LPS), dado que este estimulante es el más versátil, en concentración de 10µg/ml. Para la obtención de sobrenadantes se realizó el cultivo por 24 horas con extracto de *E. coca* en la dosis más relevante obtenida con los resultados previos de funcionalidad celular. Posteriormente se centrifugaron los cultivos de las células y se recolecto los sobrenadantes los cuales se congelaron a -20°C hasta su uso. La liberación de Interleucina 1β(IL-1β), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-8 (IL-8), Interleucina 10 (IL-10), Factor de necrosis tumoral (TNF), e Interferón gamma (INFγ) en sobrenadantes de cultivo celular fue determinada usando el kit HU OptEIA SET (B&D Bioscience) de acuerdo a instrucciones del fabricante.

Análisis estadístico. – Para establecer las diferencias estadísticas de las variables se usó la prueba de ANOVA de una y dos vías usando el programa PRISM 6.0® GraphPad Software Inc., San Diego, CA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para explorar un posible efecto toxico del Extracto 8idroalcohólico de *E. coca* sobre células humanas de sangre periférica, mononucleares y polimorfonucleares obtenidos de voluntarios humanos fueron expuestas a diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Erythroxylum coca*, en condiciones de cultivo celular, por diferentes periodos de tiempo (24 y 48 horas). En la figura 1 se aprecia los resultados de la evaluación en cultivos primarios de mononucleares del conjunto de los 9 sujetos voluntarios. Se advierte que a las 24 hr., la viabilidad celular se mantiene hasta la dosis de 130 $\mu\text{g/ml}$ en 80% y hasta 1300 $\mu\text{g/ml}$ en 75%. Estos resultados se reproducen de manera casi idéntica en todos los casos. A las 48 hr. La viabilidad celular se mantiene hasta la dosis de 13 $\mu\text{g/ml}$ en un 80% y hasta 130 $\mu\text{g/ml}$ en un 75%.

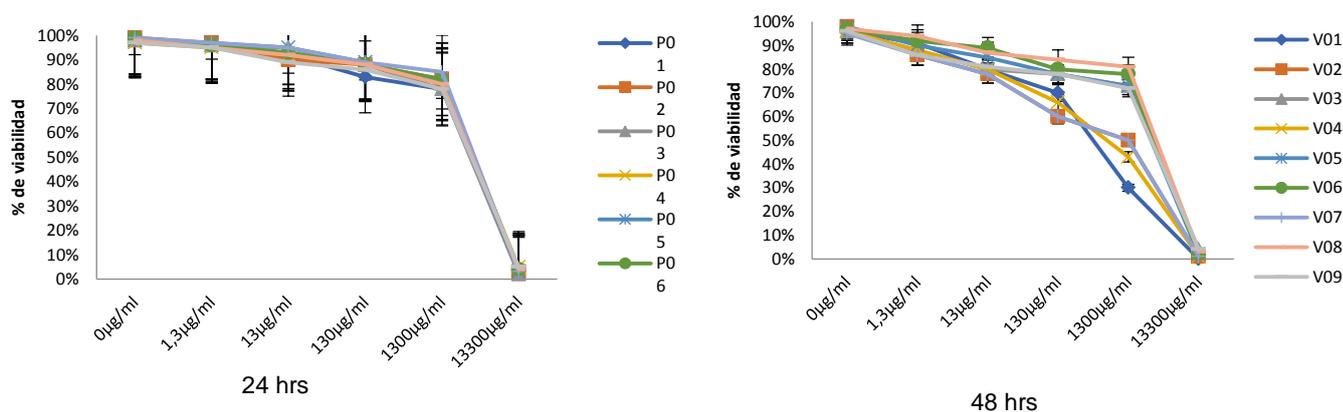


Figura 1. Viabilidad por azul tripan en células mononucleares en 24 horas y 48 horas de cultivo se expresa el promedio $\pm 1\text{SD}$, de tres experimentos por triplicado de 9 donantes voluntarios

En la figura 2 se aprecia los resultados de esta evaluación en cultivos primarios de polimorfonucleares del conjunto de los 9 sujetos voluntarios, se observa un comportamiento similar al de las células mononucleares.

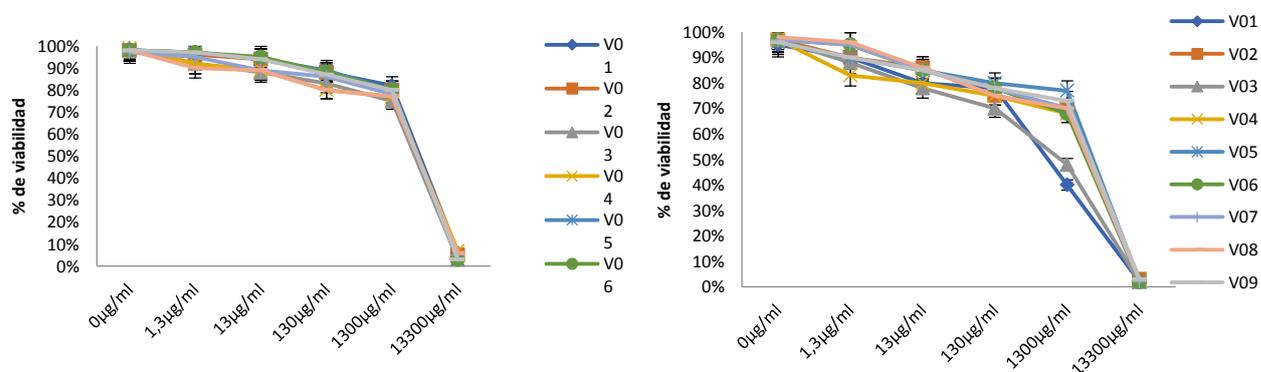


Figura 2. Viabilidad por azul tripan en células polimorfonucleares en 24 horas y 48 horas de cultivo se expresa el promedio $\pm 1SD$, de tres experimentos por triplicado en 9 donantes voluntarios

En la figura 3 se presenta los resultados de la medición de la actividad enzimática mitocondrial de la reducción de MTT en cultivos primarios de mononucleares de los 9 voluntarios.

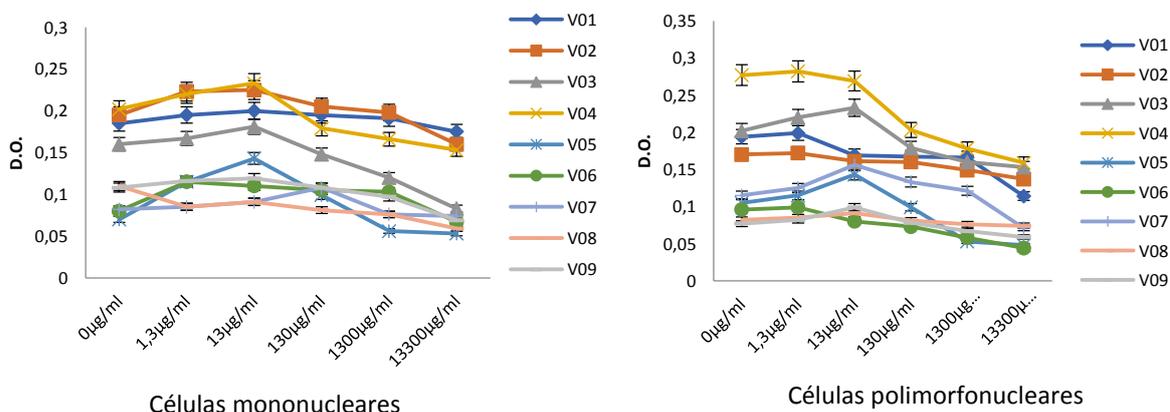


Figura 3. Evaluación *in vitro* del efecto sobre la actividad enzimática mitocondrial y citoplasmáticas en células mononucleares y polimorfonucleares de los 9 pacientes voluntarios se expresa el promedio $\pm 1SD$, de tres experimentos por triplicado en 9 donantes voluntarios

Se advierte que la actividad enzimática celular se eleva en algunos casos, en porcentajes menores al 20%, en la dosis de 1,3µg/ml y 13µg/ml en un 20% respecto al control. En cultivos primarios de polimorfonucleares se ve un comportamiento similar a las células mononucleares siendo leve estimulación a la dosis de 13µg/ml. Estos resultados permiten establecer que, la actividad mitocondrial de las oxido-reductasas no se altera en presencia del extracto de *E. coca*, a las dosis no tóxicas; asimismo no solamente no afecta esta actividad, sino que, aparentemente, esta es promovida a las dosis intermedias. Esto podría correlacionar con el hecho de que este producto es consumido para aumentar la capacidad de consumo de oxígeno en el organismo y con esto la resistencia a la fatiga y el aumento de la fortaleza física temporal

En relación a la funcionalidad de los leucocitos referida a su movilidad, la figura 4 muestra los resultados de la evaluación de la quimiotaxis de células polimorfonucleares que migraron hacia el péptido N-FMLP en placas de gel de agarosa de 9 voluntarios. Se puede observar que no solo no se altera la capacidad de migración dirigida de estas células en respuesta a quimio-atractantes, sino que existe un leve incremento en presencia del extracto (alrededor de un 20 a 30%) respecto al control (0 $\mu\text{g/ml}$), a dosis de 1,3 $\mu\text{g/ml}$ y 13 $\mu\text{g/ml}$.

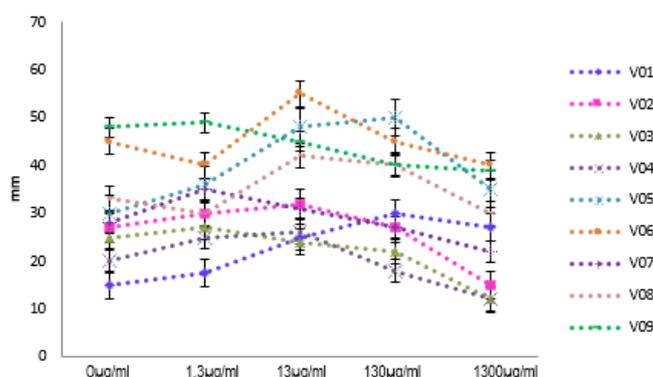


Figura 4. Evaluación de la quimiotaxis de células polimorfonucleares que migraron hacia el péptido N-FMLP en placas de gel de agarosa

Lo anterior permite inferir que este producto, una vez en contacto con las células sanguíneas no interfiere con su funcionalidad en lo relacionado a la capacidad de tomar contacto con microorganismos para ejercer las funciones de defensa, de las que son la primera barrera. Este hecho podría tener trascendencia durante los procesos de defensa inmunológica contra microorganismos, toda vez que el quimioattractante utilizado es un derivado de los quimioattractantes naturales de los microorganismos que, cuando ingresan al organismo, provocan la llegada masiva de células defensivas. Esto correlacionaría con algunas propuestas de la medicina tradicional sobre el papel de la hoja de coca en el control de enfermedades infecciosas

En ese mismo propósito, también fue examinada la capacidad de estas células para fagocitar y digerir microorganismos, *in vitro*. La figura 5 muestra la evaluación de la capacidad endocítica de las células mononucleares en presencia de diferentes concentraciones del extracto; se puede observar un leve aumento (alrededor de 19% respecto al control) de dicha función, aunque no se considera que sea estadísticamente significativa; en las células polimorfonucleares se ve un aumento de esta función alrededor de un 21% a la dosis de 130 $\mu\text{g/ml}$ respecto al control

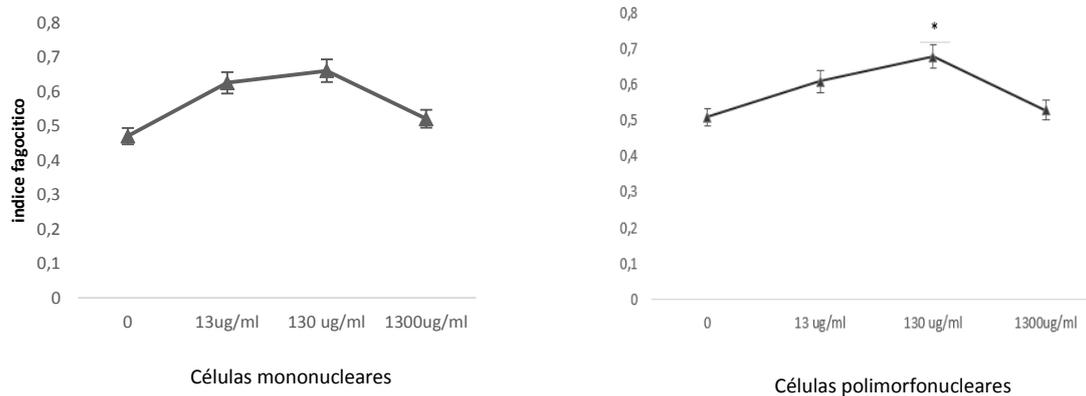
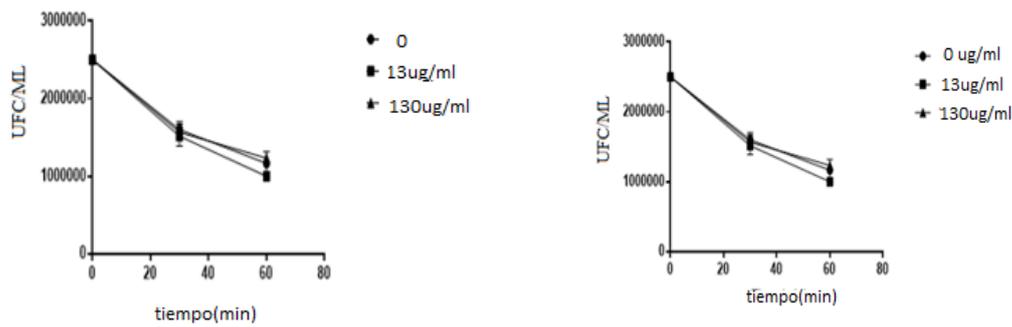


Figura 5. Evaluación de la capacidad endocítica en células mononucleares y polimorfonucleares, se expresa el promedio $\pm 1SD$, de tres experimentos por triplicado la diferencia estadística entre dosis respecto al control fue $^* = p < 0.05$, $^{**} = p < 0.01$, $^{***} = p < 0.001$

Lo observado permite proponer que *E. coca* no tiene capacidad de afectación negativa de la funcionalidad de los leucocitos humanos, al menos en lo que corresponde a su capacidad migratoria y endocítica; al contrario, parece estimular esta última función a dosis bajas, lo cual podría tener connotaciones favorables en su uso como fármaco, hecho compatible con la valoración que hace la medicina tradicional andina de este producto. Para redondear el estudio del extracto sobre la funcionalidad de las células que se constituyen en la primera barrera defensiva dentro de la inmunidad innata, se exploró la actividad microbicida de células mononucleares y polimorfonucleares humanas. Se encontró, tal como lo evidencia la figura 6, que este extracto no modifica la función de eliminación de microorganismos ya que a las diferentes concentraciones ambos tipos de células son capaces de procesar *S. aureus in vitro* de manera similar a lo que efectúan las células sin el extracto.



Células mononucleares

Células polimorfonucleares

Figura 6. Evaluación de la capacidad microbicida de células mononucleares y polimorfonucleares tratadas con el extracto h.a. de *Erythroxylum coca*. Se expresa el promedio $\pm 1SD$, de tres experimentos por triplicado; la diferencia estadística entre dosis respecto al control fue: $=p < 0.05$, $**=p < 0.01$, $***=p < 0.001$

Lo anterior, ratifica la idea de que *E. coca* en su encuentro con las células leucocíticas de sangre humana no tiene efectos deletéreos en su función defensiva, explorada por los procedimientos ensayados reportados en este trabajo. En lo referente a la posibilidad de que este producto tenga efectos sobre el funcionamiento de los mononucleares, en relación con su capacidad para liberar autocoides involucrados en la inflamación, se exploró in vitro el efecto de las concentraciones estudiadas en los experimentos anteriores sobre la liberación de diferentes citoquinas. La figura 7a muestra que IL-1 β , una citoquina inductora de inflamación por diferentes vías, existe una muy leve estimulación de su liberación de que no es estadísticamente significativa ($p > 0.05$) en ensayos con estimulación previa con LPS como activador policlonal (en lugar de antígeno); en los ensayos sin estimulación se observó que no existe modificaciones en relación con el control. Por su parte, se observó que no existe una liberación o inhibición significativa estadísticamente en la liberación de IL-6 – una citoquina involucrada en la estimulación de la inflamación propia de procesos infecciosos y autoinmunes- tanto en los ensayos con estimulación de LPS como los sin estimulación (Fig. 7b). Asimismo, se pudo observar que no existe estimulación ni

inhibición en la producción de IL-8 por parte del extracto (Fig. 7c). Para la IL-10 una citoquina involucrada en procesos de modulación tanto positiva como negativa de la inflamación, se ve que existe una dependencia inversa entre concentración utilizada del extracto y respuesta, ya que a menor concentración del extracto existe mayor inhibición en la liberación de esta, viéndose claramente esta dependencia inversa en la respuesta de células con estimulación de lipopolisacarido (LPS) por 24 horas y no así en los ensayos sin estimulación de lipopolisacarido (Fig.7d). Para TNF, la Figura 7e muestra una leve pero significativa estimulación de su liberación en los cultivos sin presencia de LPS (casi 10 veces, con respecto al control, a la concentración de 130 μ g/ml del extracto); en el caso de los ensayos con LPS el leve aumento de liberación observado no es estadísticamente significativo. Al evaluar el efecto del extracto hidroalcoholico de *E. coca* en la producción de Interferón gamma (Fig. 7f), una citoquina proinflamatoria, se observó una leve inhibición (15% respecto al control) a la dosis más baja en los ensayos con estimulación de LPS ($p < 0.05$); en los cultivos sin LPS no se apreció estimulación estadísticamente significativos en la producción de INF- γ .

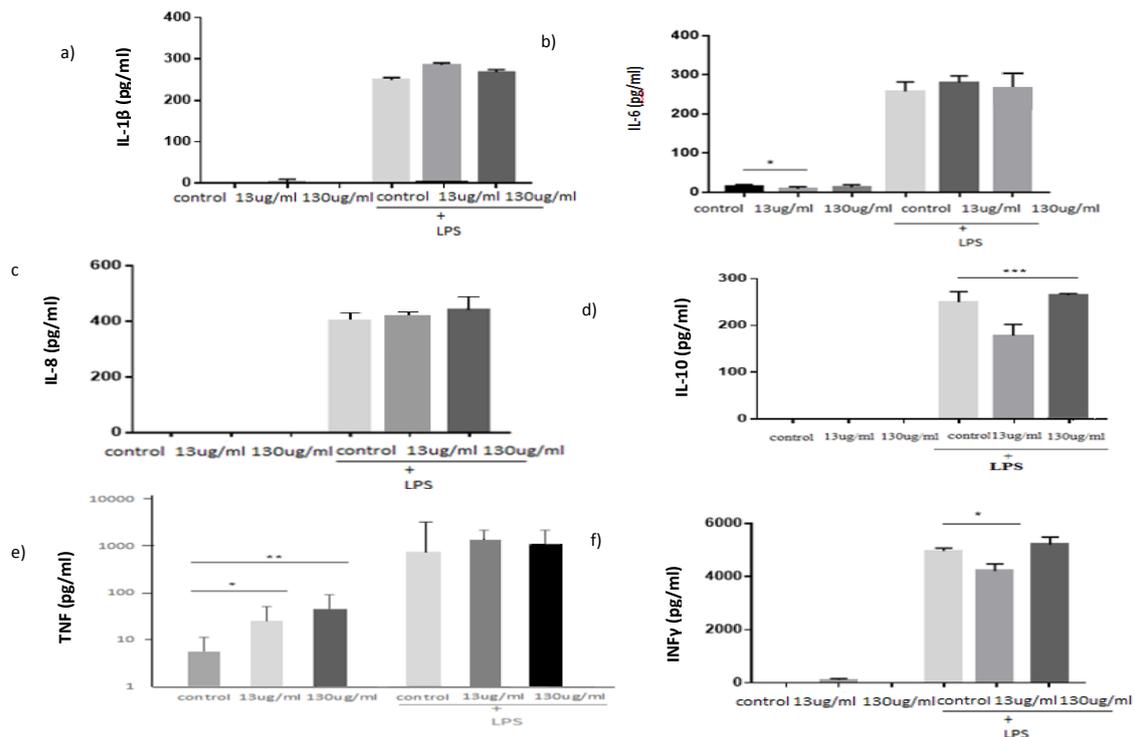


Figura 7. Evaluación de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF, INF- γ en células mononucleares en 24 horas de cultivo celular tratadas con el extracto h.a. de *Erythroxylum coca* y estimulación con Lipopolisacarido (LPS) como control positivo. $n=3\pm 1$ DS, la significancia estadística entre dosis respecto al control de células no tratadas fue * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Como puede observarse, la posible actividad antiinflamatoria de *E. coca* no parece ser mediada a través de la modulación de la producción de citoquinas ya que lo único que se observó es una leve inhibición de IFN- γ a dosis baja que podría tratarse más bien de un epifenómeno no asociado a una dinámica de modulación farmacológica de la inflamación. En cambio, en contra de lo esperado, lo que se observó con más consistencia es la estimulación de las células mononucleares en su capacidad para producir Factor de Necrosis tumoral (TNF), una citoquina de gran potencia proinflamatoria, aun en ausencia de un estimulador policlonal (ante ausencia de antígeno) como el LPS. La inhibición de la producción de IL-10 estaría correlacionando con este último hallazgo ya que esta citoquina tiene mayormente efectos proinflamatorios. De ser así, habría que pensar en la existencia de efectos proinflamatorios, que pudieran relacionarse con la defensa del organismo, particularmente en procesos tumorales, tal como lo reivindica la medicina tradicional en el uso de la coca y algunos reportes de corte epidemiológico. De existir actividad biológica para controlar la inflamación en algunas patologías, ésta no dependería de la modulación de las citoquinas pro o antiinflamatorias sino de otros mecanismos tales como los señalados en otros estudios en nuestro laboratorio: la capacidad de inhibición de la Fosfolipasa A2 enzima crucial en la formación de moléculas inflamatorias en los aspectos vasculares de dicho proceso.

CONCLUSIONES

El extracto hidroalcohólico de *E. coca* no se considera tóxico para las células mononucleares y polimorfonucleares en los rangos de 13 a 1300 μ g/ml siendo estas dosis equivalentes a las de consumo humano, por tanto, se establece un claro margen de seguridad beneficioso al consumo de esta planta. Además, se determinó que este producto favorece la actividad enzimática mitocondrial, hecho que concuerda con los estudios de aumento de la capacidad respiratoria, además, se vio que promueve a un aumento de la capacidad de ingestión de bacterias y en la actividad migratoria de polimorfonucleares, y no tuvo efecto sobre la actividad microbicida de las células. En lo que respecta a la actividad del extracto sobre la producción de citoquinas se determinó que *E. coca* tiene efecto más en citoquinas proinflamatorias que antiinflamatorias.

Agradecimientos

A la Dra. Karla Rojas por la selección clínica de los voluntarios sanos y su colaboración con el proyecto. A la Dra. Raquel Calderón del Instituto SELADIS-UMSA por la gentil donación de la cepa de *S. aureus* y apoyo con los ensayos. Al programa IDH por el financiamiento brindado para la ejecución del proyecto. A la Maestría en

Ciencias Biológicas y Biomédicas y al programa UMSA-ASDI a través del cual también se logró la realización de los distintos ensayos.

REFERENCIAS

- Bernas, T., y Dobrucki, J. (2002). Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: Interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*, 47(4), 236-242. doi:<https://doi.org/10.1002/cyto.10080>
- Berridge, M. V., Herst, P. M., y Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11, 127-152. doi:10.1016/s1387-2656(05)11004-7
- Corredor R, C. (1994). Separación rápida de leucocitos de sangre periférica. *Revista de la Facultad de Medicina*, 42(1), 5-8.
- Chenoweth, D. E., Rowe, J. G., y Hugli, T. E. (1979). A modified method for chemotaxis under agarose. *Journal of Immunological Methods*, 25(4), 337-353. doi:[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(79\)90026-7](https://doi.org/10.1016/0022-1759(79)90026-7)
- Dahl, M. V., y Lindroos, W. E. (1979). Leukocyte chemotaxis under agarose: Manipulations of serum and plasma before incorporation into agarose can influence cell movement. *Journal of Immunological Methods*, 29(4), 301-310. doi:[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(79\)90001-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(79)90001-2)
- Hampton, M. B., Vissers, M. C. M., y Winterbourn, C. C. (1994). A single assay for measuring the rates of phagocytosis and bacterial killing by neutrophils. *Journal of leukocyte biology*, 55(2), 147-152. doi:10.1002/jlb.55.2.147
- Heather A. Parker, N. J. M., Jessie N. Green, Mark B. Hampton, y Christine C. Winterbourn. (2014). *Neutrophil methods and protocols* (M. T. Q. F. R. DeLeo Ed. second edition ed.).
- John, T. J., y Sieber, O. F., Jr. (1976). Chemotactic migration of neutrophils under agarose. *Life Science*, 18(2), 177-181. doi:10.1016/0024-3205(76)90022-9
- Leijh, P. C. J., Van Den Barselaar, M. T., y Van Furth, R. (1981). Kinetics of Phagocytosis and Intracellular Killing of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* by Human Monocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 13(2), 159-174. doi:10.1111/j.1365-3083.1981.tb00122.x
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1), 55-63. doi:[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Nelson, R. D., Quie, P. G., y Simmons, R. L. (1975). Chemotaxis under agarose: a new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *the Journal of Immunology*, 115(6), 1650-1656.
- Penny, M. E., Zavaleta, A., Lemay, M., Liria, M. R., Huaylinas, M. L., Alminger, M., . . . Reddy, M. B. (2009). Can coca leaves contribute to improving the nutritional status of the Andean population? *Food Nutrition Bull*, 30(3), 205-216. doi:10.1177/156482650903000301
- Rojas, K. (2013). AGRUCO- VICEMINISTERIO DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA Monografía solicitada por el VMCyT actividad farmacológica de la hoja de coca,

- Schiffmann, E., Corcoran, B. A., y Wahl, S. M. (1975). N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(3), 1059-1062. doi:10.1073/pnas.72.3.1059
- Showell, H. J., Freer, R. J., Zigmond, S. H., Schiffmann, E., Aswanikumar, S., Corcoran, B., y Becker, E. L. (1976). The structure-activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal secretion for neutrophils. *Journal of Experimental Medicine*, 143(5), 1154-1169. doi:10.1084/jem.143.5.1154
- Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current Protocols in Immunology*, 111, A3.b.1-a3.b.3. doi:10.1002/0471142735.ima03bs111
- Terrazas Aranda, K. (1993) *Efectos Biológicos de la Musa paradisiaca sobre el sistema inmunitario* (Tesis de Licenciatura, UMSA-SELADIS)
- Vistica, D. T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A., y Boyd, M. R. (1991). Tetrazolium-based Assays for Cellular Viability: A Critical Examination of Selected Parameters Affecting Formazan Production. *Cancer Research*, 51(10), 2515-2520.
- Williams, L. T., Snyderman, R., Pike, M. C., y Lefkowitz, R. J. (1977). Specific receptor sites for chemotactic peptides on human polymorphonuclear leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(3), 1204-1208. doi:10.1073/pnas.74.3.1204