



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGÍA

**“Actividad anti-leishmánica del extracto
metanólico de *Bursera aptera* Ramírez.”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

PRESENTA:

RUIZ HURTADO PORFIRIO ALONSO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MARCO AURELIO RODRÍGUEZ MONROY



Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Índice General

Índice General	A
Índice de Apéndices	B
Índice de Figuras	C
Resumen	1
Introducción	2
Leishmaniosis	2
Leishmaniosis cutánea (LC).....	2
Leishmaniosis cutánea localizada (LCL)	3
Leishmaniosis cutánea determinada o difusa (LCD).....	3
Importancia médica	3
<i>Leishmania mexicana</i>	4
Ciclo de vida.....	6
Tratamiento.....	7
México y la medicina tradicional	8
Metabolitos secundarios	10
Tipos de metabolitos secundarios y sus propiedades medicinales	12
Terpenos.....	12
Fenilpropanoides	12
Alcaloides.....	13
El género <i>Bursera</i> y sus propiedades medicinales	14
<i>Bursera aptera</i>	15
Justificación	16
Planteamiento del problema	16
Hipótesis	17
Objetivos	17
1. General.....	17
2. Particulares.....	17
Material y métodos	18
Colecta de material	18
Obtención del extracto.....	18
Mantenimiento de la cepa de <i>L. mexicana</i>	18
Infección de ratones con <i>L. mexicana</i>	18

Curva patrón para los ensayos de viabilidad de los promastigotes de <i>L. mexicana</i>	18
Determinación del efecto <i>in vitro</i> del extracto de la corteza de <i>B. aptera</i> sobre promastigotes de <i>L. mexicana</i>	19
Determinación de la generación de apoptosis en promastigotes de <i>L. mexicana</i> inducida por el extracto a través del kit de Anexina V por citometría de flujo.	19
Determinación de la composición química del extracto por medio de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.	20
Evaluación de la actividad anti-inflamatoria con el modelo de edema plantar generado por carragenina	20
Evaluación de la citotoxicidad del extracto de la corteza de <i>B. aptera</i> sobre macrófagos P-388 de ratones con el método de Cristal Violeta.....	22
Resultados	22
Colecta del material	22
Determinación del efecto <i>in vitro</i> del extracto de la corteza de <i>B. aptera</i> sobre promastigotes de <i>L. mexicana</i>.	22
Determinación de la generación de apoptosis en promastigotes de <i>L. mexicana</i> inducida por el extracto utilizando el kit de Anexina V por citometría de flujo	27
Determinación de la composición química del extracto por medio de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas	28
Evaluación de la actividad anti-inflamatoria utilizando el modelo de edema plantar generado por carragenina.	34
Evaluación de la citotoxicidad del extracto de la corteza de <i>B. aptera</i> sobre macrófagos P-388 de ratones utilizando el método de Cristal Violeta	37
Discusión	38
Conclusiones	44
Referencias	45

Índice de Apéndices

Apéndices	I
Apéndice 1. Género <i>Lutzomyia</i>.	I
Estadios.....	I
Huevo	I
Larva	I
Pupa.....	II
Adulto.....	II

Apéndice 2. Familia Burseraceae (Rzedowski y Guevara-Féfer, 1992).	III
Apéndice 3. Zona de colecta.	IV
Clima	V
Hidrografía	V
Edafología	VI
Vegetación	VI
Población	VII
Apéndice 4. Citometría deFlujo.	VII
Apéndice 5. Tinción de Cristal Violeta (Badisa <i>et al</i> 2003).	VIII

Índice de Figuras

Figura 1. Estadios del género <i>Leishmania</i>	5
Figura 2. Ciclo de Vida del género <i>Leishmania</i>	7
Figura 3. Curva patrón de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	23
Figura 4. Curva del efecto anti-leishmánico.....	24
Figura 5. Efecto <i>in vitro</i> del estibogluconato de sodio y la anfotericina B sobre promastigotes de <i>L. mexicana</i> con sus respectivos valores de CL ₅₀	26
Figura 6. Dotplots de apoptosis celular.....	27
Figura 7. Cromatograma de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) del extracto metanólico de <i>B. áptera</i>	28
Figura 8. Porcentajes de la cinética de inflamación con los extractos de <i>B. áptera</i>	35
Figura 9. Porcentajes de la actividad anti-inflamatoria de las tres concentraciones del extracto metanólico de <i>B. áptera</i>	36
Figura 10. Ensayo de citotoxicidad del extracto de <i>B. aptera</i> sobre la línea celular de macrófagos murinos P-388.....	38
Figura 11. Estadios del ciclo de vida de <i>Lutzomyia</i>	III
Figura 12: Ubicación geográfica del poblado de San Rafael Coxcatlán, Puebla.....	V

Resumen

En la actualidad se ha reportado que los tratamientos de primera línea contra la leishmaniosis cada vez son menos efectivos, ya que son los mismos que se administraban desde hace 40 años (estibogluconato de sodio y antimonio de meglumina); debido a lo anterior, los parásitos han generado resistencia y se ha recurrido al uso de fármacos más tóxicos como la anfotericina B, pentamidina, paromicina o alopurinol. Por esta razón es necesario encontrar nuevos tratamientos que sean eficaces contra la leishmaniosis; una alternativa puede ser el uso de los productos naturales. En los últimos años se ha reportado que varias especies del género *Bursera* presentan propiedades antimicrobianas y antiprotozoarias, además de que estas plantas son utilizadas en la medicina tradicional mexicana para tratar y curar diversos padecimientos. Debido a su gran uso en la medicina tradicional y el contenido de flavonoides, lignanos, ácidos grasos y terpenos reportados con actividad anti-leishmanica en este trabajo se evaluó el efecto del extracto de la corteza de *Bursera aptera* sobre los promastigotes de *Leishmania mexicana*.

Se realizaron ensayos para evaluar el efecto *in vitro* del extracto por el método de viabilidad celular con MTT, el cual tuvo efecto anti-leishmánico con una CL_{50} calculada de 0.408 mg/ml; posteriormente se evaluó la generación de apoptosis del extracto de *B. aptera* sobre los promastigotes de *L. mexicana* por citometría de flujo con el kit de Annexina V acoplado a IP, con el cual el extracto mostró un 20% de generación de apoptosis. Se determinó la composición química del extracto por CG-EM, con lo que se identificaron 18 compuestos. Así mismo se comprobó el efecto antiinflamatorio del mismo con el modelo de edema plantar inducido por carragenina, el cual fue capaz de inhibir el edema hasta en un 63.55% a una concentración de 500 mg/kg. Finalmente se evaluó la citotoxicidad del extracto sobre macrófagos de la línea celular P-388 con el método de Cristal Violeta y se encontró que el extracto es tóxico de acuerdo al criterio del INC. Se concluye que el extracto metanólico de *B. aptera* presenta actividad anti-leishmánica contra promastigotes de *L. mexicana* por medio de apoptosis, lo cual está ligado con la presencia de metabolitos secundarios en su composición química; mismos que presentan actividad antiinflamatoria y hacen al extracto citotóxico.

Introducción

Las infecciones causadas por protozoos son uno de los mayores problemas de salud pública que afecta una gran parte de la población mundial, inducen enfermedades tales como la malaria, leishmaniosis, tripanosomiasis, entre otras; las cuales causan la mayor parte de mortalidad y morbilidad en los países tropicales, lo que afecta al desarrollo económico de las naciones que enfrentan estos problemas de salud (Hanna *et al.*, 2009).

Leishmaniosis

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria causada por distintas especies de un protozoario intracelular perteneciente al género *Leishmania*, el cual es transmitido al hombre y a otros mamíferos a través de la picadura de moscas que pertenecen a los géneros *Phlebotomus* en el continente Europeo, Asiático y Africano y *Lutzomyia* (Apéndice 1) en el Americano (Hanna *et al.*, 2009).

Se conocen alrededor de 30 especies de *Leishmania*, de las cuales al menos 21 pueden causar leishmaniosis en el hombre (TCDC, 2008). En los humanos la infección se da por tres manifestaciones clínicas, que dependen de la especie de *Leishmania* que causa la infección y de la respuesta inmunológica del hospedero; entre las que encontramos afecciones en la piel (leishmaniosis cutánea) causadas por *L. major* y por *L. mexicana*, en las mucosas (leishmaniosis mucocutánea) por *L. braziliensis* y en órganos internos, tales como el hígado, el bazo y la médula ósea (leishmaniosis visceral) por *L. infantum* y *L. donovani*; cada una de ellas conlleva diferentes grados de severidad de acuerdo con el tipo que se presente en el enfermo (Fraga *et al.*, 2008; Soong, 2008; El-On *et al.*, 2009; WHO, 2012).

Leishmaniosis cutánea (LC)

La Leishmaniosis cutánea en América es transmitida por la picadura de la mosca del género *Lutzomyia*; después de que ocurre el periodo de incubación de los parásitos, el cual oscila entre 2 y 8 semanas. La infección se caracteriza por lesiones ulcerosas o pápulas cubiertas de un exudado amarillento y adherente que da lugar a una costra, mientras que la lesión se extiende en superficie y profundidad debajo de esta. Las características más sobresalientes que se producen cuando se ulcera la lesión son: adquiere una forma redondeada, indolora y con bordes bien definidos.

En esta forma clínica el amastigote se multiplica en las células del sistema fagocítico mononuclear de la piel del hospedero (Cunningham, 2002); usualmente en áreas expuestas del cuerpo, como la cara, los brazos y las piernas (Desjeux, 2004). La leishmaniosis cutánea es la forma

más común de la enfermedad y puede presentarse en dos variantes principales: leishmaniosis cutánea localizada (LCL) y leishmaniosis cutánea diseminada o difusa (LCD).

Leishmaniosis cutánea localizada (LCL)

En los pacientes con LCL inicialmente aparece una pequeña pápula en el sitio de la picadura por el vector (mosca), la cual crece hasta convertirse en un nódulo que evoluciona a una úlcera bien definida, de forma redondeada, con fondo limpio y de bordes endurecidos. Se pueden presentar una o varias úlceras, esto depende del número de veces que el individuo fue picado y generalmente son indoloras, a menos de que exista una infección bacteriana secundaria. Los individuos con LCL generalmente se curan con el tiempo sin la necesidad de medicamentos (Herwaldt, 1999), excepto cuando la lesión es en la oreja, en donde se vuelve crónica y mutilante; esta forma es causada por *L. major*, *L. tropica* y *L. aethiopia* en Asia y África; mientras que en América es causada por *L. mexicana* y *L. braziliensis* (Velasco *et al.*, 1994; Cunningham, 2002; Becker, 2006).

Leishmaniosis cutánea determinada o difusa (LCD)

Los pacientes que padecen LCD se caracterizan por presentar el desarrollo de nódulos con abundantes parásitos, que en etapas tempranas se localizan en áreas determinadas y conforme avanza la enfermedad se distribuyen a lo largo de toda la piel, con excepción del cuero cabelludo; esto se debe a que los parásitos se diseminan lentamente a través del líquido tisular, la linfa o raramente por vía sanguínea, extendiéndose por casi todo el tegumento del paciente. Las lesiones no tienden a ulcerarse, a menos que sufran traumatismos y en etapas avanzadas puede ocurrir la invasión de las mucosas orales y nasales. Esta forma clínica es ocasionada por *L. aethiopia* en África y por *L. mexicana* y *L. amazonensis* en América (Velasco *et al.*, 1994; Cunningham, 2002; Becker, 2006).

Importancia médica

La leishmaniosis produce casos en alrededor de 88 países de los cuales 22 se encuentran en América y 66 en Asia, África y Europa; estos se encuentran distribuidos en las regiones tropicales y subtropicales de Centroamérica, Sudamérica, Medio Oriente (suroeste de Asia), en el norte y este de África y en el sur de Europa (cuenca del Mediterráneo), considerándose sólo ausente en el sureste de Asia, la Antártida y Oceanía. El 90% de leishmaniosis visceral ocurre en India, Nepal, Bangladesh, sureste de Sudán y noreste de Brasil, mientras que el 90% de los casos de leishmaniosis cutánea se presenta en Irán, Afganistán, Siria, Arabia Saudita, Brasil y Perú y son causados por *L. major* y *L. mexicana* (Herwaldt, 1999; Desjeux, 2004; Piscopo y Mallia, 2006; Sharma y Singh, 2008;). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima una prevalencia

mundial de leishmaniosis en 14 millones de personas y 350 millones de personas en riesgo de ser infectadas. La incidencia anual calculada es de aproximadamente 2 millones de casos nuevos en todo el mundo, de los cuales 1.5 millones son de leishmaniosis cutánea y 500 mil son de leishmaniosis visceral; asimismo se calculan entre 60 mil a 70 mil muertes por año a causa de esta última forma de la enfermedad (Herwaldt, 1999; Dutta *et al.*, 2007; Von Stebut, 2007; Bern *et al.*, 2008; El-On *et al.*, 2009; WHO, 2012).

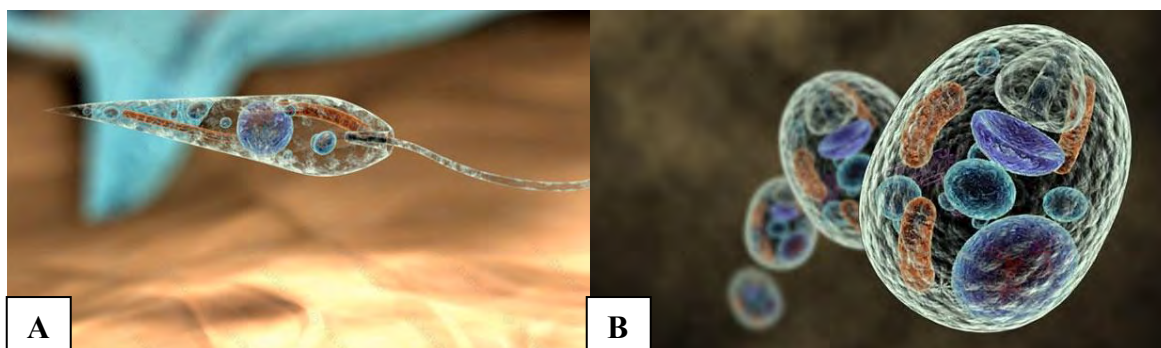
En México la leishmaniosis ha sido reportada en 19 estados de la República, en donde las especies más frecuentes son *L. chagasi*, *L. braziliensis* y *L. mexicana*, que son transmitidas por *Lutzomyia longipalpis* y *Lutzomyia olmeca* (Sharma y Singh, 2008). La enfermedad no es de notificación obligatoria, por lo tanto, la prevalencia e incidencia de casos son difíciles de conocer; se estima que anualmente se presentan 400 casos nuevos de leishmaniosis en el país (Becker, 2006) y la población en riesgo incluye a más de 9 millones de habitantes distribuidos en 149 municipios de 13 estados de la República Mexicana, la mayoría de ellos ubicados en el sur y sureste de México (Secretaría de Salud, 2008).

La leishmaniosis cutánea (también conocida como “Úlcera del Chiclero”) es causada por *Leishmania mexicana*, especie endémica de nuestro país, descrita por primera vez en 1912 en Yucatán, donde se observaron casos en hombres que se dedicaban a extraer goma del árbol del chicle. Actualmente se ha identificado en el suroeste de México, Veracruz, San Luis Potosí, Tamaulipas, Nuevo León, Coahuila, Michoacán y Nayarit. La manifestación clínica de la “Úlcera del Chiclero” se caracteriza por lesiones en el cartílago auricular que puede llegar a la necrosis total y se presenta inflamación en los ganglios linfáticos cercanos al sitio de la infección (Arias *et al.*, 1996; Dr. Scope, 2012).

Leishmania mexicana

El género *Leishmania* engloba a distintas especies de protozoarios parásitos intracelulares obligados pertenecientes al orden Kinetoplastida y a la familia Trypanosomatidae. Además de la presencia del cinetoplasto, una forma única de DNA no molecular mitocondrial característica del género (Sharma y Singh, 2008), presentan dos estadios: el promastigote, que es la forma flagelada del parásito, durante esta fase es extracelular su forma de vida, posee un forma alargada, son móviles, el cuerpo mide entre 1.5 a 3.5 μm de diámetro por 15 a 20 μm de largo, mientras que el flagelo tiene una longitud que oscila entre 15 a 18 μm (figura 1a); y el amastigote, o la forma intracelular del parásito, donde reside en la vacuola parasitófora de las células fagocíticas como los macrófagos y las células dendríticas del hospedero; en esta fase presenta una forma redonda u

ovoidal, no tienen movimiento, su cuerpo mide entre 2 a 4 μm de diámetro y adquieren un rizoplasto (figura 1b). La multiplicación de *Leishmania* en ambos estadios es por fisión binaria (Awasthi *et al.*, 2004; Besteiro *et al.*, 2007; Sharma y Singh, 2008). En la actualidad, este género se divide en tres subgéneros: *Leishmania*, *Viannia* y *Sauroleishmania* (Schonian *et al.*, 2010), inicialmente propuestos en función al desarrollo del parásito en el intestino de la mosca transmisora y ratificados posteriormente con base a estudios a nivel biomolecular y molecular (Lainson *et al.*, 1977; Bates, 2007). En el subgénero *Leishmania* el desarrollo del parásito en el vector es de tipo suprapilórico, esto es, una multiplicación de los parásitos llevada a cabo en la porción media del intestino, seguida por una migración a la probóscide para su transmisión al hospedero mamífero. En el subgénero *Viannia* el tipo de desarrollo es peripilórico con una multiplicación de los organismos en la porción posterior del intestino y una migración subsecuente hacia la parte anterior y a la probóscide. Los dos subgéneros agrupan a los organismos de importancia médica, ya que en ellos se encuentran las diversas especies que parasitan al humano así como a otros mamíferos. Finalmente en el subgénero *Sauroleishmania* se encuentran las especies que únicamente infectan reptiles, por lo tanto no son patogénicas para el hombre; su desarrollo es hipopilórico, donde la multiplicación de los parásitos se da en la porción posterior del intestino y la ampolla rectal; los organismos de este subgénero infectan al hospedero mediante la deposición de heces fecales intestinales infestadas (Schonian *et al.*, 2010).



© 2006 Kenneth Xavier Probst. All Rights Reserved.

Figura 1. Estadios del género *Leishmania*. A) Promastigote y B) Amastigote.

Ciclo de vida

Leishmania presenta un ciclo de vida digenético, es decir, cambia entre un hospedero vertebrado y un vector (mosca) del género *Phlebotomus* en Europa, Asia y África y *Lutzomyia* en América (Sharma y Singh, 2008). Comienza cuando la mosca inocula con su mordedura los promastigotes metacíclicos en un hospedero mamífero, los cuales son fagocitados por los macrófagos de la dermis; envueltos en una vacuola parasitaria pasan a su citoplasma donde los parásitos se diferencian en su forma amastigote dentro del fagolisoma; es en este punto donde comienzan a multiplicarse hasta que la célula donde se encuentran alojados se rompe. Las leishmanias libres invaden los macrófagos aledaños a la zona de infección y repiten el proceso nuevamente en cada una de las nuevas células parasitadas, o bien se dispersan a través de la piel, del torrente sanguíneo y/o linfático hasta alcanzar las mucosas u órganos ricos en células macrófagas fijas, como en el hígado, médula ósea y el bazo; esto depende de la especie de *Leishmania* que se transmita (Alexander *et al.*, 1999; TCDC, 2008).

Las hembras del vector (mosca) son hematófagas, pues necesitan sangre para el desarrollo de sus huevos; estas adquieren el parásito al alimentarse de macrófagos infestados con amastigotes; al llegar al sistema digestivo del vector pasan a la fase promastigote procíclico (forma flagelada no infectiva) los cuales se adhieren y dividen activamente en su estómago e intestino mediante un glicolípido denominado lipofosfoglicano (LPG); esta molécula se encuentra en la superficie de este estadio e interactúa con una galectina que reviste el epitelio del tracto digestivo del vector, además de poseer metaloproteasas gp63 que en conjunto con el LPG sirven para protección contra las enzimas hidrolíticas del intestino de la mosca (Alexander *et al.*, 1999; Kamhawi *et al.*, 2004). Tras el proceso de multiplicación, los promastigotes procíclicos se convierten en promastigotes metacíclicos (forma infectiva), en esta fase las moléculas de LPG se duplican y sufren cambios en la composición de las cadenas laterales, lo que permite al parásito desprenderse del epitelio intestinal, migrar a la faringe y posteriormente se sitúan en las glándulas salivales de la probóscide, donde pasan al hospedero cuando la mosca introduce las partes bucales en forma de sierra para cortar la piel, lo que forma una pequeña herida e inyecta saliva para anestesiar e ingerir la sangre que brota de los capilares superficiales lacerados; en este proceso introduce a las leishmanias en las células de la epidermis, con lo que se cierra el ciclo como se muestra en la figura 2 (Handman y Bullen, 2002; Becker, 2006).

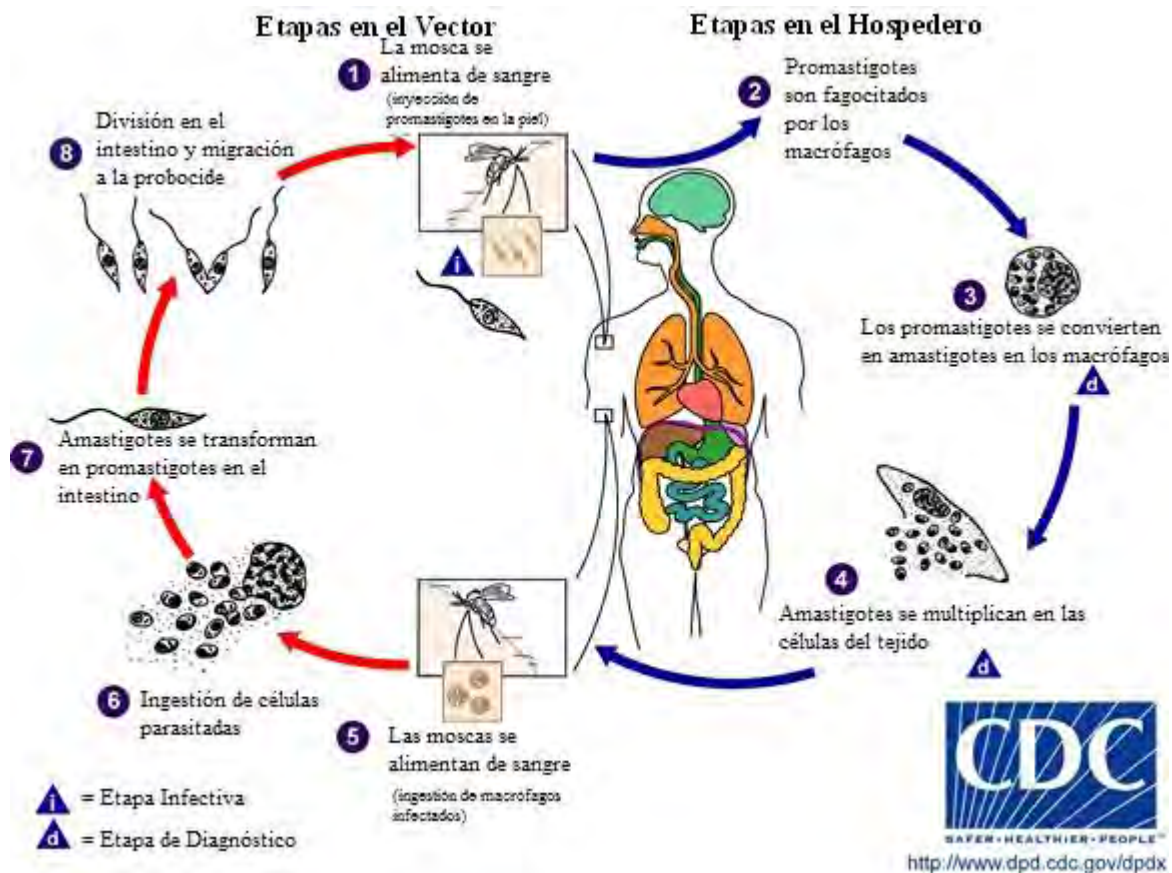


Figura 2. Ciclo de Vida del género *Leishmania*.

Tratamiento

Se utilizan los antimoniales pentavalentes como son: metilglucamina-antimoniato (Glucantime), el gluconato sódico de antimonio (Pentostam), Ketoconazol y Pentamida para el tratamiento de la leishmaniosis. Sin embargo, aún no existe una vacuna o un tratamiento eficiente contra la infección, además de que se ha desarrollado una resistencia a los fármacos que se emplean hoy en día para tratar la leishmaniosis, lo que obliga a los médicos a usar otros medicamentos con efectos tóxicos para el paciente como la amfotericina B, pentamidina, paromomicina o alopurinol, esto implica una gran necesidad de buscar nuevos compuestos que sean efectivos y menos dañinos con la salud para el tratamiento de esta enfermedad. Investigaciones recientes se han enfocado en tratar de establecer las respuestas inmunoprotectoras contra esta enfermedad parasitaria en el campo de la inmunología y la genética para poder desarrollar fármacos eficientes, centrándose algunas de ellas en el uso de la medicina tradicional, la cual nos da indicios sobre los efectos antimicrobianos que poseen una gran variedad de plantas empleadas contra este y muchos otros tipos de afecciones (Sülsen *et al.*, 2007; Fraga *et al.*, 2008; Sülsen *et al.*, 2008 y Dr. Scope, 2012).

México y la medicina tradicional

El interés por conocer las propiedades de las plantas, en los grupos humanos se da por la necesidad de buscar la forma de aliviar enfermedades, heridas, padecimientos y otros usos similares. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las plantas medicinales como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. Estima que el 80% de las personas en regiones menos desarrolladas emplean la medicina tradicional con plantas para el cuidado para la salud. Este conocimiento popular está basado en la eficacia, es decir, se acepta y se adopta lo que se ve que sirve, lo demás cae en desuso; sin embargo, un problema de la fitoterapia popular es la dificultad de llevar un control sobre la dosis y la calidad del producto, lo cual puede propiciar riesgos y daños a la salud (Schlaepfer y Mendoza, 2010).

En México, el uso de las plantas medicinales constituye una tradición que se ha mantenido desde las culturas prehispánicas; de acuerdo a estimaciones hechas en 1997 del Instituto Nacional Indigenista en el territorio nacional existen cerca de 3 mil especies de plantas con usos medicinales, esto es el 10% del total de la riqueza florística del país; sin embargo, se considera que aproximadamente puede haber 30 mil especies de plantas. Actualmente se ha registrado en México alrededor de 4 mil especies con atributos medicinales, esto es el 15% de la flora total, 3600 se recolectan de forma silvestre, 1500 son utilizadas regularmente sin procesar, 370 se cultivan en el huerto familiar o de manera comercial y 35 especies se encuentran amenazadas por factores externos. Sin embargo, se calcula que en el país, así como en todo el mundo, el número de plantas medicinales que han sido estudiadas fitoquímicamente no rebasa el 10% y evaluadas farmacológicamente son menos del 5% y las estudiadas agrónomicamente no llegan al 1%; pues prácticamente las únicas que se cultivan son aquellas introducidas por los españoles desde el siglo XVI como la manzanilla, romero, albaca, tomillo, mejorana, ajeno, mercadela, hinojo, cedrón, menta, hierbabuena, entre otras (Didier, 1995; Schlaepfer y Mendoza, 2010; Andrés y Espinosa *et al.*, 2002; Fierro *et al.*, 2012; Gómez, 2012).

La comprensión sobre los usos de las plantas silvestres ha dependido en gran parte al conocimiento de las culturas indígenas y mestizas; lo que representa en la actualidad más del 90% de las plantas que usamos para diferentes usos medicinales, mientras que menos del 10% de las plantas medicinales fueron traídas principalmente por los españoles a partir de la conquista de los territorios indígenas (Robinson y López, 1999).

La medicina moderna comenzó a practicarse sólo recientemente en muchos de los municipios rurales de México; los habitantes de estas regiones rara vez disponen de dinero para pagar los precios de los fármacos modernos, es por ello, que las personas continúan confiando en los “yerberos” y los curanderos, quienes son responsables de la salud de los pobladores; de esta manera se fomenta el uso de plantas curativas, las cuales son el recurso terapéutico por excelencia de la medicina tradicional mexicana que en gran parte es aún rescatable y puede constituir un importante elemento para implementar nuevos planes de salud, que combinen el conocimiento popular con el científico (Robinson y López, 1999; Canales *et al.*, 2006; Gómez, 2012).

Las plantas medicinales frecuentemente se emplean para tratar problemas del aparato respiratorio, la piel y tejido subcutáneo (como picaduras de alacranes, mosquitos y otros tipos de insectos, debido a las propiedades anti-inflamatorias y analgésicas que poseen un gran número de plantas), del aparato digestivo y del aparato genito-urinario, anemias agudas, deficiencias de ácido fólico en mujeres embarazadas, en enfermedades degenerativas y terminales en las personas adultas y de la tercera edad, al igual que en enfermedades como el cáncer, diabetes, hipertensión cardiovascular y obesidad; además, cabe destacar el hecho de que se emplea el totalidad de las plantas para tratar las afecciones mencionadas anteriormente (Méndez *et al.*, 2009; Fernández y Ramos, 2001; Sierra, 2012).

Por otro lado, no existe suficiente información sobre la abundancia y la distribución de las plantas medicinales. A pesar de la baja toxicidad de los principios activos de algunas de las especies vegetales, éstas pueden dar origen a problemas de salud debido a factores como contaminación microbiológica, presencia de restos de plaguicidas, herbicidas o metales pesados, y por efectos adversos debido a la interacción con el fármaco de síntesis si el paciente se encuentra en tratamiento. Actualmente, la causa de muchas consultas e ingresos médicos en México, es algún efecto indeseable provocado por la ingesta en dosis inadecuadas o por periodos prolongados de tiempo de las plantas curativas, que pueden traer efectos retardados como carcinogénesis o teratogénesis (Caballo *et al.*, 2005; Ochoa *et al.*, 2006; Schlaepfer y Mendoza, 2010).

El desarrollo de la química permitió el aislamiento de algunos de los elementos activos de las plantas, gran parte de estos son los llamados metabolitos secundarios, que son compuestos químicos de estructura relativamente compleja y de distribución más restringida y más característica de fuente botánicas específicas y en la mayoría de los casos, se pudo reproducir la actividad de los extractos crudos con la dosis equivalente del principio activo aislado; el estudio científico en este campo ha permitido descubrir nuevos compuestos derivados de las plantas, como la prostatina que

actúa sobre el virus del sida y una serie de compuestos con propiedades antiinflamatorias, además de compuestos promisorios para el tratamiento contra el cáncer, como vincristina, paclitaxel y etopósidos (Schlaepfer y Mendoza, 2010). En los últimos 50 años, se han desarrollado muchas técnicas analíticas que son útiles para la investigación de los constituyentes y de la actividad biológica de las plantas medicinales, como son: las cromatográficas, por ejemplo la Cromatografía en placa fina (TLC), Cromatografía gas-líquido (GLC) y la Cromatografía Líquida de alta Resolución (HPLC); así como las espectrográficas como Ultra Violeta (UV), Infra Rojo (IR), Resonancia Magnética Nuclear de protones de Hidrógeno y Carbono (H^1-C^{13} -NMR) y de Masas (MS); posteriormente, los extractos o constituyentes aislados son evaluados *in vitro* (ej. Inmunoensayos, pruebas de inhibición de crecimiento, expresión de proteínas, etc.) y/o *in vivo* (ej. modelos de carcinogenesis en animales de laboratorio) para finalmente ser evaluados en protocolos clínicos experimentales. A pesar de contar con estas técnicas poderosas, la mayoría de las plantas medicinales no se ha investigado con suficiente detalle ni química, ni biológicamente, y aún en las plantas más conocidas requieren de estudios clínicos más profundos (Schlaepfer y Mendoza, 2010).

Metabolitos secundarios

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico. Para defenderse del daño ocasionado por la herida y el ataque por insectos o microorganismos patógenos, las plantas sintetizan enzimas que degradan la pared celular de microorganismos o que tienen la capacidad de inactivar tóxicos de origen microbiano. Entre las estrategias utilizadas por las plantas como parte de la protección química es la producción de metabolitos secundarios (MS) con actividad antimicrobiana, en contra de herbívoros, o con actividad antioxidante. Los MS son compuestos con bajo peso molecular que no solamente tienen una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos, sino que también, una síntesis activa de MS se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: a) el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), b) el ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos, c) la competencia por espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y d) la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Sepúlveda *et al.*, 2003).

Una de las principales diferencias que presentan los MS con relación a los primarios es su distribución limitada en el reino vegetal; mientras que los compuestos primarios se encuentran en todo el reino y las diferencias entre especies sólo son de índole cuantitativo. Estos compuestos químicos se presentan típicamente en sólo una especie o un grupo de plantas relacionadas

taxonómicamente, por lo que muchos de ellos se consideran marcadores taxonómicos de familias y géneros. Los MS se encuentran principalmente en las plantas, pero cada estructura básica varía considerablemente acorde con su Phylum (García, 2004).

En la actualidad, se conocen aproximadamente 20 mil estructuras de MS que por su composición química son clasificados en dos grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los MS que contienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los MS no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides. La variedad estructural dentro de un mismo grupo de MS está dada por modificaciones químicas a una estructura básica, originadas por reacciones químicas, tales como la hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y la glucosilación. Los precursores de la biosíntesis de MS se derivan de rutas del metabolismo primario, tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del shikimato (García, 2004).

La síntesis de MS depende de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles constitutivos sólo se incrementan como parte de la respuesta al estrés biótico y abiótico. Este aumento en los niveles de MS, es importante para la supervivencia de las plantas, ya que su síntesis se deriva del metabolismo primario y porque algunos compuestos son tóxicos para la misma planta. En general, la síntesis de algunos alcaloides y terpenos se realiza en los plástidos; los esteroides y dolicoles se sintetizan en el retículo endoplasmático; mientras que la biosíntesis de algunas aminas y alcaloides tiene lugar en la mitocondria (Sepúlveda *et al.*, 2003).

El metabolismo primario proporciona un gran número de moléculas simples, como el ácido shikímico, el acetato y los aminoácidos, los cuales constituyen los materiales de partida para las rutas biosintéticas del metabolismo secundario. Basándonos en lo anterior podemos establecer 3 grandes grupos de compuestos secundarios: terpenos, alcaloides y fenilpropanoides. El ácido shikímico, por la ruta metabólica que lleva su nombre, da origen a muchos compuestos aromáticos, entre ellos los aminoácidos, los ácidos cinámicos y algunas estructuras polifenólicas. El acetato es el precursor de los ácidos grasos y de los policétidos en la ruta del acetato-malonato, y los terpenos o isopropanoides son sintetizados en la ruta del acetato-mevalonato. Los aminoácidos son precursores de los alcaloides y de los antibióticos peptídicos (Sepúlveda *et al.*, 2003).

Todos los terpenos naturales proceden de unidades de acetato activo (acetil-CoenzimaA), que se condensa y se transforma para originar ácido mevalónico, unidad de 5 átomos de carbono, específica de la biosíntesis de terpenos. En cambio la biosíntesis de las estructuras fenólicas se efectúa por 2 rutas metabólicas esenciales: la del ácido shikímico y la del ácido malónico (conocida

como la de los policétidos); la primera es mayoritaria en las plantas superiores y la segunda es favorecida en los microorganismos. La fenilalanina y la tirosina son intermediarios metabólicos en la biosíntesis de numerosos compuestos fenólicos, y el triptófano es el precursor de hormonas como el ácido indolacético (Sepúlveda *et al.*, 2003).

Los alcaloides se forman por rutas biosintéticas muy diversas, a partir de muchos aminoácidos como la L-arginina, la L-lisina, la L-fenilalanina, el L-triptófano y otros. Ocasionalmente derivan de la L-prolina, el ácido antranílico (precursor y producto de degradación del L-triptófano), el ácido nicotínico (formado a partir del ácido aspártico), raras veces del L-triptófano, restos de isopentilo, isopentil pirofosfato, acetilo proveniente del acetil-Coenzima A y de grupos metilo de S-adenosilmetionina. En la biosíntesis de los alcaloides se han reconocido 3 tipos generales de reacción que determinan su estructura principal: la formación de bases de Schiff, la reacción de Mannich y el acoplamiento oxidativo de fenoles (García, 2004).

Tipos de metabolitos secundarios y sus propiedades medicinales

A continuación, se describen las características estructurales de cada grupo de MS con el fin de establecer una panorámica general de cada uno de ellos.

Terpenos

Los terpenos, también conocidos con el nombre de terpenoides o sipoprenoides, forman un conjunto enormemente amplio de MS (más de 40 mil descritos) en plantas, animales y microorganismos; suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de Carbono); la denominación terpeno proviene del nombre *trementina* o aguarrás, y se limitó inicialmente a compuestos aislados de ésta y otras esencias naturales, pero luego se amplió a otras muchas sustancias volátiles y no volátiles. Pueden clasificarse como monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) y tetraterpenos (C40), según el número de unidades de isopreno (2,3...8) que los forman (Lock, 2007; Zacarés, 2008).

Fenilpropanoides

Engloban un grupo de metabolitos secundarios de una gran variabilidad tanto estructural como de función, producidos por plantas en respuesta a estrés de tipo biótico y abiótico de diversa naturaleza. Todos ellos se caracterizan por poseer un esqueleto carbonado del tipo C_6C_3 ; se piensa que su principal función en plantas es la de establecer barreras físicas que frenen la expansión del patógeno y también ejercer una acción protectora de las células vegetales frente a la generación de

especies de oxígeno activo como consecuencia de una infección patogénica. Se hallan presentes en todas las partes de las plantas, algunas clases se encuentran más ampliamente distribuidas que otras, por lo que son más comunes las flavonas y flavonoles, y más restringidas en su ocurrencia las isoflavonas, las chalconas y auronas. La acción farmacológica de los flavonoides son bien conocidas, como dilatadores de las coronarias (proantocianidinas de *Crata egus*), colerético, estrógena y diurética; al igual que la acción antimicrobiana de flavonoides prenilados y otros fenoles y la actividad antifúngica de las isoflavonas (Lock, 2007; Zacarés, 2008).

Alcaloides

El término alcaloide, debido al alemán W. Meissner en 1879, significa semejante a los álcalis y se aplica a compuestos nitrogenados básicos naturales, de origen vegetal. Los alcaloides son representantes arquetípicos del metabolismo de las plantas y constituyen un tipo de metabolitos secundarios en los que parte de la estructura, así como al nitrógeno, procede de los aminoácidos. El grado de conservación de la estructura del aminoácido en el alcaloide es, sin embargo, variable. En la mayoría de los casos se retiene prácticamente la totalidad de la misma salvo el grupo carboxilo, que suele perderse por lo general. A su vez, el aminoácido puede constituir la totalidad de la estructura del alcaloide o sólo una parte de ésta, por lo que el resto proviene de la estructura de la vía metabólica del acetato-malonato, de la del ácido shikímico o de algunos precursores isoprénicos C_{5n} . Se encuentran en las semillas, raíces, corteza y hojas; en estado libre o como glicósidos, o forman sales como ácidos orgánicos. La función de los alcaloides en las plantas aún no es muy conocida, aunque se reporta que algunos intervienen como reguladores del crecimiento, o como repelentes o atractores de insectos; el hecho que aproximadamente el 80% de las plantas no contienen alcaloides hace suponer que estos no son vitales para los organismos vivientes. Entre los alcaloides con alguna acción fisiológica están: la atropina (antiespasmódico, estimulante, analgésico), cocaína (estimulante, anestésico local, sedante), codeína (analgésico, sedante, hipnótico), emetina (emético, expectorante, antiperético, amebicida), escopolamina (hipnótico, sedante), esparteína (estimulante cardiaco, diurético), hiosciamina (hipnótico, sedante cerebral, mediático), morfina (narcótico, sedante, hipnótico, antipirético), quinina (tónico, emenagogo, antiséptico, antipirético), efedrina (vasoconstrictor, insuficiencia circulatoria), papaverina (relajante muscular), lobelina (expectorante, emético, estimulante respiratorio), reserpina (control de la presión alta en la sangre), tubocurarina (relajante muscular), entre otros (Lock, 2007; Zacarés, 2008).

El género *Bursera* y sus propiedades medicinales

Desde la época prehispánica en las regiones “cálidas y secas” eran exportados los árboles de la familia Burseraceae (Apéndice 2), para el uso de extracción de resinas (copal) que tenía gran relevancia social, económica, religiosa-ceremonial y en la vida cotidiana (Linares y Bye., 2008).

El género *Bursera* Jacq. Ex L. está constituido por un poco más de 100 especies distribuidas desde Perú hasta el sur de los Estados Unidos; su principal centro de diversificación es México, con aproximadamente 85 especies, 75 de las cuales son endémicas, distribuidas principalmente en el bosque tropical caducifolio. Existe una mayor diversificación y concentración de especies endémicas sobre la vertiente del Pacífico, particularmente en la Depresión del Balsas, donde se han registrado 47 especies; en 1979 Rzedowski y Kruse consideraron que el género *Bursera* pudo haber tenido un origen difilético, de acuerdo con la gran diferencia que hay entre las 2 secciones en que han sido divididas, *Bursera*, que incluye a todas las especies con fruto trivalvado y *Bullockia*, a las que tienen fruto bivalvado. Las especies de *Bursera* son muy resinosas y liberan un olor característico de pino-limón cuando las hojas o ramas son cortadas. El olor es debido a la alta volatilidad de compuestos terpénicos como α -pineno, β -felandreno, limoneno, careno, entre otros (Daly, 1993; Evans *et al.*, 2000; Andrés y Espinosa, 2002; Becerra, 2003; Guzmán y Sánchez, 2004).

Algunos ejemplos sobre las propiedades medicinales de *Bursera* se presentan a continuación: Las hojas de *B. simaruba* han sido usadas como remedios herbales, externamente en forma de pomadas, ya que presentan propiedades antiinflamatorias y antiartríticas, las cuales han sido objeto de estudio en investigaciones sobre los efectos farmacológicos que presenta el extracto hexánico de las hojas de la especie en cuestión, el cual tuvo un potente efecto en el proceso anti-inflamatorio sobre las faces aguda y crónica de ACII (adjuvant-carrageenan-induced inflammation) experimental probado en ratas (Abad *et al.*, 1996; Sosa *et al.*, 2002; Noguera *et al.*, 2004; Carretero *et al.*, 2008). También se ha registrado que tiene actividad antibacteriana sobre las cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Camporese *et al.*, 2003; Yasunaka *et al.*, 2005). Entre los usos medicinales de ésta especie están: la infusión del cocimiento de la madera se utiliza para bajar de peso; el fruto y la flor, se emplean para tratar el resfriado, disentería, diarrea, fiebre, hongos en la piel, mal de viento, como purgante y sudorífica; la hoja sirve para tratar la tosferina, el sarampión, amigdalitis, fiebre intestinal, comezón, úlceras (enfermedades venéreas), tiene propiedades anti-inflamatorias, antiasmáticas, analgésicas (dolor de cabeza, estómago y muelas), como acelerador del parto, para encías infectadas, evacuaciones con sangre, posee efectos diuréticos; la corteza sirve

como antipirético, para hemorragias nasales, dolor muscular, remedio para el hipo, limpieza de heridas, inflamación de ovarios y picaduras de arañas (Maldini *et al.*, 2009).

En la literatura se reporta que *B. glabrifolia* se emplea para el tratamiento de picaduras de alacrán; los ungüentos de la planta, se usan para aliviar los síntomas del resfriado; la inhalación del humo de la combustión de la resina es un remedio para calmar el dolor de cabeza (Peters *et al.*, 2003); por otra parte *B. tonkinensis* está entre las plantas que presentan una gran citotoxicidad en la búsqueda de componentes anticancerígenos activos en Vietnam y Laos; bioensayos realizados con extractos obtenidos de las raíces de ésta especie a partir del solvente CH₂Cl₂ mostraron citotoxicidad contra células KB (Jutiviboonsuk *et al.*, 2005). También se ha reportado la actividad antimicrobiana del linalool a partir de extractos obtenidos de las hojas de *B. aloexylon*, los cuales inhiben a *Rhodococcus equi* y *Staphylococcus epidermides* (Queiroga *et al.*, 2007); de igual manera se ha reportado que el extracto etanólico a partir de tallos de *B. fagaroides* presentó inhibición *in vitro* en el crecimiento de *Entamoeba histolytica* (Rosas-Arreguin *et al.*, 2008); por su parte Espinosa (2012) denota la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *B. schelechtendalii* (colectada en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla) sobre algunas cepas bacterianas, entre las cuales las más sensibles a este fueron *Streptococcus pneumoniae* y *Escherichia coli* 53228, así como la actividad antimicótica del aceite sobre *Candida albicans* y *C. glabrata*, asimismo Rojas (2012) concluye que el aceite esencial de *B. arida* presenta actividad antibacteriana sobre *E. coli* y *S. pneumoniae* y actividad antifúngica sobre *C. albicans*, *Aspergillus niger*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Fusarium sporotrichoides*; por otra parte Vences (2012) aisló tres triterpenos del extracto hexánico de la resina y corteza de *B. simaruba*, los cuales inhibieron el crecimiento de *S. mutans*; además se ha descrito la actividad antibacteriana que presentan los extractos metanólicos de diversas especies pertenecientes al género *Bursera* entre los que destaca la actividad de *B. aptera* sobre *E. coli* (Vásquez, 2012); también se ha reportado el efecto cicatrizante del extracto metanólico de *B. morelensis*, el cual no es dependiente de la dosis (Serrano, 2013); cabe destacar que los trabajos anteriores se realizaron sobre especies colectadas en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla al igual que el estudio realizado por Espinosa (2012).

Bursera aptera

Sobre *B. aptera* en particular no se tienen estudios sobre sus propiedades medicinales, antimicrobianas, y antiparasitarias; esta especie es endémica de México, se distribuye en los estados de Guerrero, Morelos, Oaxaca y Puebla. Habita en el bosque tropical caducifolio y en el matorral xerófilo, preferentemente en suelos de origen calizo, en altitudes entre 550 y 1950 msnm. Florece entre finales de abril y mediados de julio y no tiene follaje de noviembre a mayo. Se le conoce

como “Cuajote amarillo y Brea”. Es un árbol de 2 a 8 metros de alto de corteza, de color amarillo o beige, que se desprende en láminas. Las ramas tienen resina aceitosa y aromática. Sus hojas son compuestas de 5 a 9 pares de hojuelas elípticas con los márgenes enteros. Las flores son amarillas y nacen de abril a mayo. La goma que secreta el tallo se usa como veneno para perros, mezclada con el alimento del animal (Rzedowski *et al.*, 2004 y Rzedowski *et al.*, 2005).

Justificación

Los fármacos desarrollados para tratar los diferentes tipos de leishmaniosis y tripanosomiasis fueron introducidos hace algunas décadas, los cuales han tenido inconvenientes en términos de eficacia, duración del tratamiento, vía de administración, efectos secundarios en los pacientes y costos. Estos puntos se han visto agravados por la falta de desarrollo de un nuevo fármaco por parte de las industrias farmacéuticas y la resistencia que han desarrollado los parásitos a la mayor parte de los fármacos que se emplean hoy en día para tratar las infecciones producidas por éstos, como en el caso de la resistencia al gluconato sódico de antimonio (primera línea de tratamiento contra la leishmaniosis visceral). Y en general a las medicinas pentavalentes de antimonio por parte de *Leishmania* ha obligado a los médicos a usar otros medicamentos con efectos tóxicos para el paciente como la amfotericina B, pentamidina, paromomicina o alopurinol. Por ello se acentúa la necesidad de buscar nuevos compuestos que sean efectivos y menos dañinos para la salud del hombre y capaces de inhibir las infecciones causadas por microorganismos. La medicina tradicional nos da indicios sobre los efectos antimicrobianos que poseen una gran cantidad de plantas en nuestro país; entre ellas se encuentran las especies pertenecientes al género *Bursera*. Las especies como *B. simaruba*, *B. aloexylon* y *B. fagaroides* tienen propiedades antibacterianas y antiparasitarias, en el último caso, estas podrían ser una opción para el desarrollo de nuevos medicamentos para tratar las enfermedades parasitarias provocadas por protozoarios; es por esta razón que es importante realizar estudios con las especies pertenecientes a este género de plantas.

Planteamiento del problema

El tratamiento contra *L. mexicana* implica el uso de medicamentos de alto costo y que desencadenan efectos secundarios dañinos a los pacientes que son tratados con ellos, además de que este parásito ha desarrollado a lo largo del tiempo resistencia contra los fármacos empleados para aliviar esta enfermedad; debido a esto, existe la necesidad de buscar alternativas terapéuticas que sean efectivas contra la leishmaniosis y a un menor costo; por lo que una alternativa es recurrir al

uso de plantas medicinales para encontrar indicios de compuestos presentes en estas que pudieran ser una alternativa en el tratamiento de la leishmaniosis.

Hipótesis

Dado que se ha demostrado que los extractos de diferentes especies pertenecientes al género *Bursera* tienen actividad antimicrobiana, además de que comparten metabolitos secundarios similares a los que se reportan con actividad anti-leishmánica, entonces podemos suponer que: la especie *Bursera aptera* es un buen candidato a tener actividad anti-leishmánica contra *Leishmania mexicana*.

Objetivos

1. General

Evaluar la actividad anti-leishmánica y algunos mecanismos de acción de la corteza de *Bursera aptera*.

2. Particulares

- Obtener por maceración los extractos de la corteza de *B. aptera*.
- Determinar el efecto *in vitro* del extracto de la corteza de *B. aptera* sobre los promastigotes de *L. mexicana*.
- Determinar si el extracto induce apoptosis en promastigotes de *L. mexicana*.
- Determinar la composición química del extracto por medio de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.
- Evaluar la actividad anti-inflamatoria del extracto de la corteza de *B. aptera*.
- Evaluar la citotoxicidad del extracto de la corteza de *B. aptera* sobre macrófagos.

Material y métodos

Colecta de material

El material vegetal necesario de *Bursera aptera* se colectó durante los meses de marzo, abril, junio, agosto, septiembre y octubre en el año 2011 en San Rafael, Coxcatlán, Puebla (Apéndice 3). Se separó el material en hojas, frutos, ramas (las cuales se cortaron en trozos pequeños) y corteza.

Obtención del extracto

El extracto de las cortezas se obtuvo por el método de maceración (Domínguez, 1973). Se pesaron las cortezas secas y se colocaron en trozos en un matraz; se obtuvo el extracto metanólico crudo (MeOH) de las cortezas, el cual se filtró y destiló a presión reducida en un rotavapor.

El extracto se colocó en charolas de vidrio con la finalidad de completar la evaporación del solvente. El rendimiento del extracto se determinó por diferencia de peso con relación al peso seco de la planta.

Mantenimiento de la cepa de *L. mexicana*

El parásito de *L. mexicana* se obtuvo a partir de un ratón previamente infectado con la cepa (MNYC/BZ/M379) donado por la Dra. Miriam Rodríguez Sosa de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Se aislaron promastigotes de la lesión de ratones infectados en 5 ml de medio de cultivo Schneider suplementado con 10% de SFB inactivado y antibiótico al 1% (Gentamicina) para obtener la fase estacionaria del parásito; subsiguientemente fueron cultivados en botellas de cultivo con medio Schneider a 28° C. Posteriormente se cuantificaron en la cámara de Neubauer.

Infección de ratones con *L. mexicana*

Se infectaron de manera subcutánea ratones BALB/c machos del mismo peso y de 6 semanas de edad en la parte posterior cerca de la base de la cola. Los ratones se rasuraron para hacer más fácil la infección. Los ratones fueron infectados con un inóculo de 50 µL de PBS que contenía 2×10^6 promastigotes de *L. mexicana* con jeringas de insulina. Los ratones se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala durante 10 semanas posteriores a la infección.

Curva patrón para los ensayos de viabilidad de los promastigotes de *L. mexicana*

En una placa de cultivo de 96 pozos se sembraron diferentes cantidades promastigotes de *L. mexicana* (desde 1×10^7 hasta 9,765 promastigotes) en 200µL de medio de cultivo, posteriormente a todos los pozos se les agregó 25µL (5mg/ml) de MTT (3-[4,5 dimetilazol-2 y 1]-2,5

difeniltetrasolío bromuro) (método modificado del ensayo de Dutta et al., 2005), y se incubaron por un tiempo de cuatro horas a una temperatura de 37°C. Al término de este tiempo se centrifugó la placa a 2500 rpm durante cinco minutos y se retiró el sobrenadante, quedándose únicamente con la pastilla, a la cual se le agregó posteriormente 100µL de dimetil sulfóxido (DMSO) y se dejó reposar la placa por 15 min en obscuridad (se utilizaron como blanco tres pozos de la placa que no contenían células a los que se le agregaron 100 µL de DMSO). Como último paso del procedimiento, se leyó la absorbancia a 492nm en un lector para ELISA. Los datos de número de células y los valores de absorbancia se graficaron.

Determinación del efecto *in vitro* del extracto de la corteza de *B. aptera* sobre promastigotes de *L. mexicana*

Se utilizaron promastigotes en la fase exponencial, los cuales se resuspendieron en medio Schneider suplementado con SFB y 100 mg de gentamicina/ml. Los parásitos se colocaron en placas de cultivo celular de 96 pozos (2.5×10^4 promastigotes en 100µl de medio, en cada pozo) e interactuaron con diferentes concentraciones del extracto metanólico de *B. aptera*, disuelto en DMSO y Medio Schneider con una proporción 1:1, (desde 10 mg/mL hasta 0.009 mg/mL) durante 48 h a 22 °C, una vez transcurrido el tiempo se retiró el extracto; como control negativo se dejaron en la placa tres pozos a los que no se les agregó extracto; por otra parte, se utilizó como control positivo el estibogluconato de sodio (desde 25 mg/mL hasta 0.012 mg/mL) y la anfotericina B (desde 62.5 µg/mL hasta 0.030 µg/ml) debido a que son los medicamentos que se ocupan en el tratamiento de la leishmaniosis. La interacción de los medicamentos con los promastigotes de *L. mexicana* se evaluó a las 24h y las 48h. La viabilidad de los parásitos se evaluó con el método modificado del ensayo de MTT (Dutta *et al.*, 2005) donde la cantidad de sales de formazán producidas es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas. Las sales de formazán producidas se cuantificaron en un lector de ELISA a una longitud de onda de 492nm, los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron en la curva patrón y se graficaron para obtener la CL₅₀.

Determinación de la generación de apoptosis en promastigotes de *L. mexicana* inducida por el extracto a través del kit de Anexina V por citometría de flujo.

Para determinar si el mecanismo de acción de muerte celular en promastigotes de *L. mexicana* provocada por el extracto de *B. aptera* implica el proceso de apoptosis. Se utilizó un doble marcaje con Anexina V conjugada con un fluorocromo de color verde (FITC) e Ioduro de Propidio (PI) como se describe en Mehta y Shaha, 2004. La Anexina V es una molécula que tiene afinidad por la fosfatidilserina la cual normalmente se encuentra presente en el interior de la membrana plasmática

de los promastigotes; sin embargo, cuando se lleva a cabo el proceso de apoptosis celular hay una externalización de esta molécula en la membrana plasmática de los promastigotes, por lo que se le considera como un indicador de este proceso; mientras que el IP es una molécula que tiene afinidad por el DNA de la célula, lo que nos indica que la célula ya ha muerto, además de que presenta un fluorescencia en color rojo (es importante considerar el espectro de fluorescencia de los marcadores a emplear en la citometría de flujo para evitar el solapamiento de los parámetros que se estén evaluando).

Se incubaron promastigotes de *L. mexicana* con el extracto metanólico de *B. aptera* durante 4 h; al cabo de este tiempo las células se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min; se lavaron dos veces en PBS (0,02 M, pH 7,2) y se resuspendieron en buffer de unión a anexina-V (10 mM HEPES, 140 mM de NaCl, 2,5 mM de CaCl₂, pH 7,4). Después de lo cual se añadió la Anexina V-FITC y PI, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Apéndice 4) y se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a 20-25 °C. La adquisición de datos se llevó a cabo en un citómetro de flujo FACS Calibur (BD) y se analizaron con el programa CellQuest.

Determinación de la composición química del extracto por medio de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

El análisis del extracto metanólico de la corteza de *B. aptera* se realizó mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM). Se empleó un Cromatógrafo de gases HP 6890 usando un detector de masas selectivo HP 5973, equipado con el software Chemstation y el espectro de datos Wiley 275. Se utilizó una columna capilar HP-5.5% de fenil metil siloxano (30 m × 0.32 mm; 0.25 mm de espesor). Las condiciones cromatográficas fueron: temperatura de la columna 70 °C (0.5 min), 70-150 °C (15 °C/min), 150-220 °C (20 °C/min), 220-310 °C (25°C/min), 310 °C (5 min), la interfaz 180 °C; relación de separación 1:10 del gas portador, He (3.43 Psi), la tasa de flujo 1.6 mL/min; energía de ionización 70 eV, rango de masa 30-550; volumen inyectado 2.0 mL.

Evaluación de la actividad anti-inflamatoria con el modelo de edema plantar generado por carragenina

La actividad anti-inflamatoria del extracto metanólico de *B. aptera* se evaluó utilizando el modelo de edema generado por carragenina, el cual es un polisacárido que promueve la inflamación en los tejidos animales, por lo que este fue considerado como el control negativo en el ensayo; mientras que el control positivo que se utilizó fue la dexametasona ya que es un medicamento

esteroideo utilizado comúnmente por su efecto anti-inflamatorio además que de impide la acción pro-inflamatoria inducida por carragenina.

Se utilizaron seis grupos de ratas Wistar (n=3) a los cuales se les indujo un edema en el cojinete plantar de ambas extremidades inferiores; al grupo testigo no se le administró ningún medicamento, solamente solución salina (10 mL/kg, vía oral); por otra parte al grupo control negativo se le administró carragenina al 1% y al grupo control positivo se le administró dexametasona (0.5 mg/kg, vía oral) disuelta en solución salina estéril por vía oral; en contraste se ocuparon tres grupos experimentales, a los cuales se les administró oralmente, mediante cánula concentraciones de 250, 500 y 750 mg/kg del extracto metanólico del extracto de la corteza de *B. áptera* disueltos con solución salina estéril. Previamente, todos los grupos de ratas se mantuvieron en ayuno de 16 h, con acceso libre de agua.

Una hora después se les inyectó 100 µL de carragenina al 1 % en el cojinete plantar de la extremidad posterior derecha; mientras que al cojinete plantar de la extremidad izquierda se le aplicó solución salina. El grosor de las extremidades posteriores de las ratas se midió antes y después de la inyección de carragenina o solución salina con ayuda de un medidor de espesor marca Mitutoyo, modelo ID-C112X/1012X, tomando como grosor de la inflamación en milímetros el primer dato que arrojaba el equipo al realizar la medición; por lo que se hizo una modificación al método propuesto por Van Arman et al., 1965. El grosor de las extremidades posteriores de las ratas se midió a 0, 1, 2, 3 y 4 horas después de la inyección de carragenina debido a que esta promueve la exudación plasmática inflamatoria máxima a las cuatro horas de aplicarla en los tejidos plantares (Martínez, 2002); posteriormente se sacrificaron a las ratas en una cámara de CO₂. Se utilizaron las siguientes ecuaciones para calcular el porcentaje de inflamación y el porcentaje de inhibición de la inflamación:

$$\% \text{ de inflamación} = \frac{(T_f - T_i)}{T_f} \times 100$$

$$\% \text{ de inhibición de la inflamación} = 100 - (\% \text{ de Inflamación})$$

Dónde:

T_f es el valor del grosor del cojinete plantar en milímetros de la carragenina al tiempo cuatro.

T_i es el valor del grosor del cojinete plantar en milímetros al tiempo cero.

Evaluación de la citotoxicidad del extracto de la corteza de *B. aptera* sobre macrófagos P-388 de ratones con el método de Cristal Violeta

La línea de macrófagos P-388 de ratón leucémico, fue mantenida en medio DMEM-F12 (Sigma), suplementado con suero fetal bovino al 10% (GIBCO) y 100 µg/mL de antimicótico (Anfotericina B). Las células se cultivaron en una incubadora con una atmósfera de 5% de CO₂ a 37°C y se despegaron con Tripsina-Verseno 0.5%.

Se sembraron en una placa de cultivo de 96 pozos a una densidad de 1.5×10^4 células por pozo y se dejaron incubar por 2 horas antes del tratamiento. Tras esto, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones del extracto de *B. aptera* (20–0.004 mg/mL); se obtuvo la concentración inicial mediante dilución en DMSO, asegurándose que la concentración final del solvente no fuera superior al 1% (v/v); los ensayos se realizaron por triplicado. La placa fue incubada por 48h a 5% de CO₂ y 37°C. Como control positivo se utilizó Doxorubicina; los pozos con células sin ningún tratamiento fueron considerados como control negativo.

Al finalizar el periodo de incubación, se evaluó la viabilidad celular mediante la tinción de Cristal Violeta (Apéndice 5) con base al protocolo reportado por Badisa *et al.*, (2003). Para la interpretación de los resultados se tomó en cuenta el criterio del Instituto Nacional de Cáncer (INC) en el cual se considera que para que un extracto tenga un efecto citotóxico activo el valor de CI₅₀, tras la incubación entre 48-72 h debe ser de 20 µg/mL o menos y para un compuesto puro es de 4 µg/ml o menos (Geran *et al.*, 1972).

Resultados

Colecta del material

Se obtuvo el extracto metanólico de la corteza de *B. aptera*, cuyo color es verde claro, lustroso. A partir de 2,516g de peso seco de la planta se obtuvieron 57.8g de extracto metanólico; por lo tanto, el rendimiento fue del 2.3%.

Determinación del efecto *in vitro* del extracto de la corteza de *B. aptera* sobre promastigotes de *L. mexicana*.

Para evaluar el efecto *in vitro* del extracto metanólico de la corteza de *B. áptera* se procedió a realizar una curva patrón (figura 3) para poder interpolar los datos de absorbancia de los siguientes experimentos a número de promastigotes.

Curva patrón del ensayo *in vitro* con promastigotes de *L. mexicana*

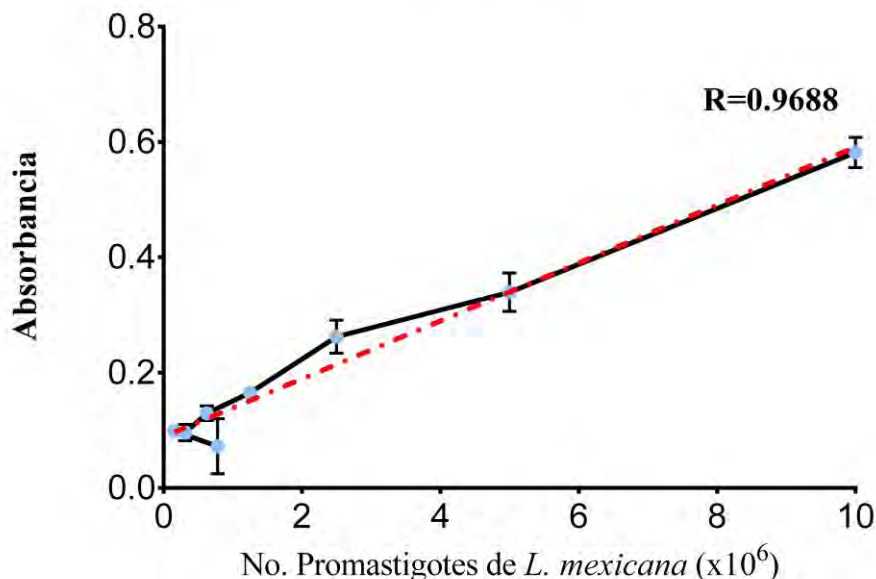


Figura 3. Curva patrón de promastigotes de *L. mexicana*. Se muestra la absorbancia que presentan distintas cantidades de promastigotes (desde 1×10^7 hasta 9,765); en color rojo la curva del modelo matemático del ensayo con respecto al modelo experimental.

De la interacción *in vitro* por 48h del extracto con los promastigotes de *L. mexicana* (2.5×10^4) y se obtuvo un valor de CL_{50} de 0.408 mg/mL ($R = 0.9855$) los datos obtenidos a partir de este ensayo se expresaron en porcentaje de mortalidad de promastigotes de *L. mexicana* (figura 4); se observó que la interacción del extracto con respecto al porcentaje de mortalidad de los promastigotes es de tipo dosis dependiente, es decir, que a una concentración mayor del extracto metanólico de *B. aptera* existe una tasa mayor de mortalidad de promastigotes.

Actividad anti-leishmánica de la corteza de *B. aptera*.

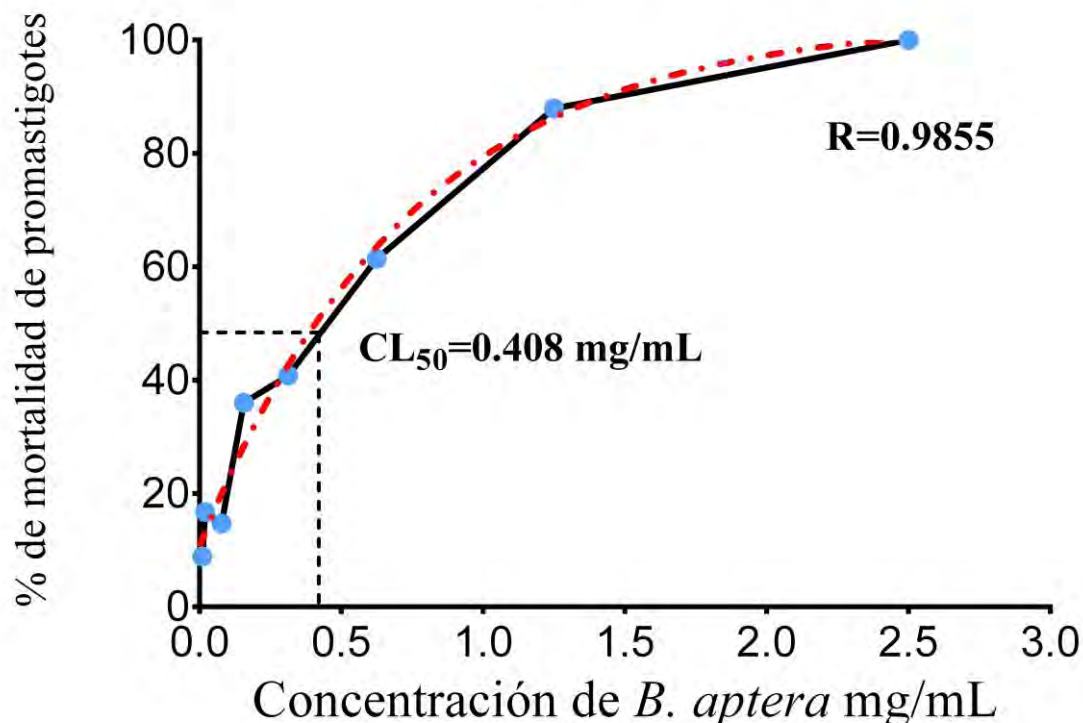


Figura 4. Curva del efecto anti-leishmánico. Interacción tras 48 h con diferentes concentraciones del extracto de *B. aptera* (desde 10 a 0.004 mg/mL) contra promastigotes de *L. mexicana* (2.5×10^4). Como se puede observar el efecto del extracto es dosis dependiente, reportándose una $CL_{50} = 0.408 \text{ mg/mL}$.

Con base a los resultados obtenidos por medio de este ensayo se puede afirmar que el extracto de *B. aptera* posee un efecto anti-leishmánico directo sobre el crecimiento de los promastigotes de *L. mexicana*, la cual es la fase infectiva de este parásito, descrita en su ciclo de vida. De acuerdo con Dutta (*et al.*, 2007) la máxima concentración de DMSO que se ocupó en el ensayo contra leishmania (8%) causa un mínimo de muerte celular, mientras que en el presente se ocupó un concentración del 1%, por lo que se descarta que el comportamiento observado en la curva de la figura 4 sea causado por la interacción del parásito con el solvente.

De igual forma se realizó la interacción de los promastigotes de *L. mexicana* con los fármacos de referencia; con los resultados obtenidos se determinó que el valor de CL_{50} para el estibogluconato de sodio fue de 0.205 mg/mL a las 24h y de 0.508 mg/mL a las 48h (figura 5 A-B) mientras que en

el caso de la anfotericina B la CL_{50} calculada fue de 7.747 $\mu\text{g/mL}$ a las 24h y de 0.133 $\mu\text{g/mL}$ a las 48h (figura 5 C-D) de la evaluación del efecto *in vitro* respectivamente, en ambos casos se observan curvas de tipo dosis dependiente en los dos tiempos en que se realizaron los ensayos; cabe destacar que la anfotericina B después de 48h presenta el valor más bajo de CL_{50} en comparación a los otros tiempos en que se evaluó el mismo; así mismo, fue la anfotericina B la que mostró una mejor capacidad para matar a los promastigotes de *L. mexicana* al disminuir notablemente la CL_{50} que presentó a las 48h con respecto a las 24h de la interacción con los parásitos, en comparación al estibogluconato de sodio debido a que este último a las 48h de la interacción presenta una CL_{50} más elevada que a las 24h de la misma.

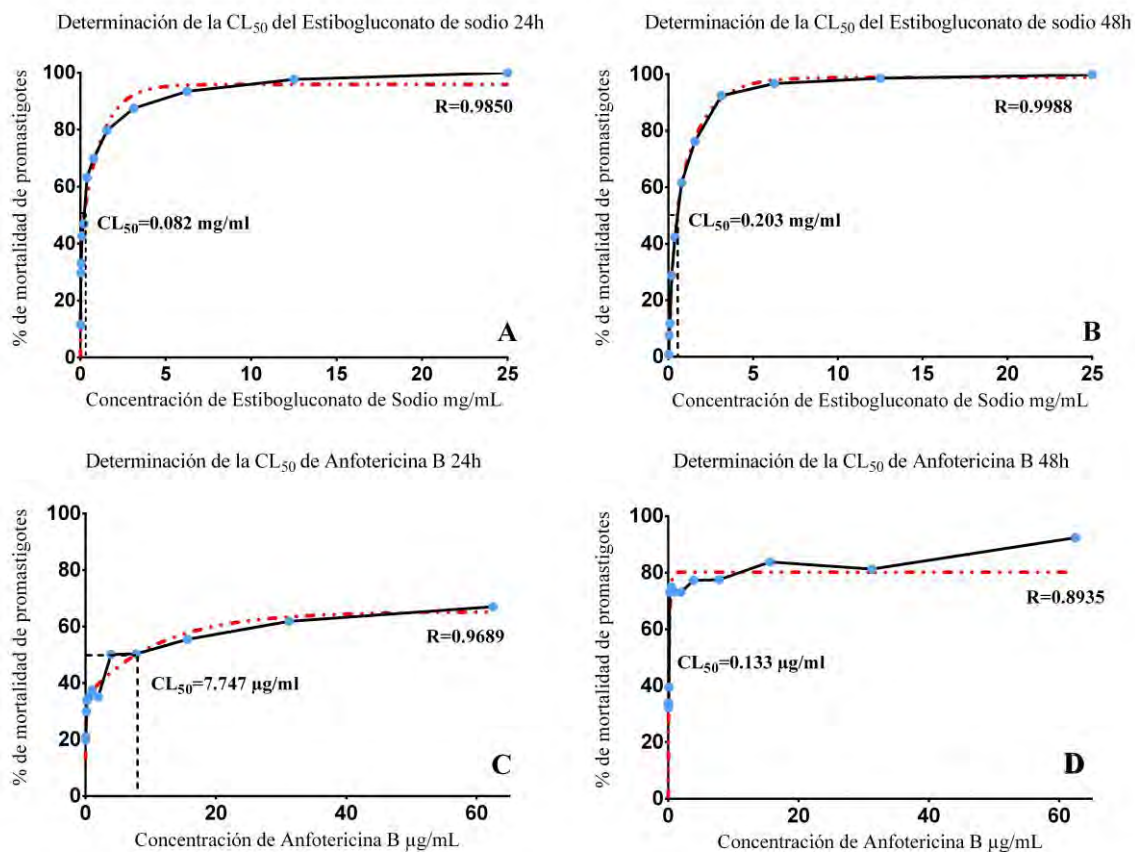


Figura 5. Efecto *in vitro* del estibogluconato de sodio y la anfotericina B sobre promastigotes de *L. mexicana* con sus respectivos valores de CL₅₀. A) Se observa el resultado de la interacción tras 24h del tratamiento con estibogluconato de sodio; B) se muestra el resultado después de 48h del mismo; C) se aprecia la interacción después de 24h con anfotericina B y D) después de 48h con el mismo; en todas las curvas se observa en color rojo la curva del valor matemático del ensayo y en negro los resultados experimentales.

Determinación de la generación de apoptosis en promastigotes de *L. mexicana* inducida por el extracto utilizando el kit de Anexina V por citometría de flujo

La interacción de los promastigotes de *L. mexicana* con la CL₅₀ del extracto metanólico de *B. aptera* (obtenido a partir del ensayo de la actividad anti-leishmánica que presentó el mismo) después de 4h, se procedió a leer en un citómetro de flujo, contabilizando un total de 100,000 eventos tanto para el grupo experimental como para el grupo control, al cual no se le agregó el extracto de *B. aptera*; obteniendo dotplots para cada medición (figura 6), donde se muestra que en el cuadrante positivo para anexina V de la interacción con el extracto presentó un 20% de apoptosis; mientras que el control presentó un 0.05% de apoptosis. Por otra parte en el cuadrante positivo para PI fue de 17.21% para la interacción con el extracto, mientras que para el control fue de 0.62%, lo que nos podría sugerir procesos de necrosis en los promastigotes de *L. mexicana*.

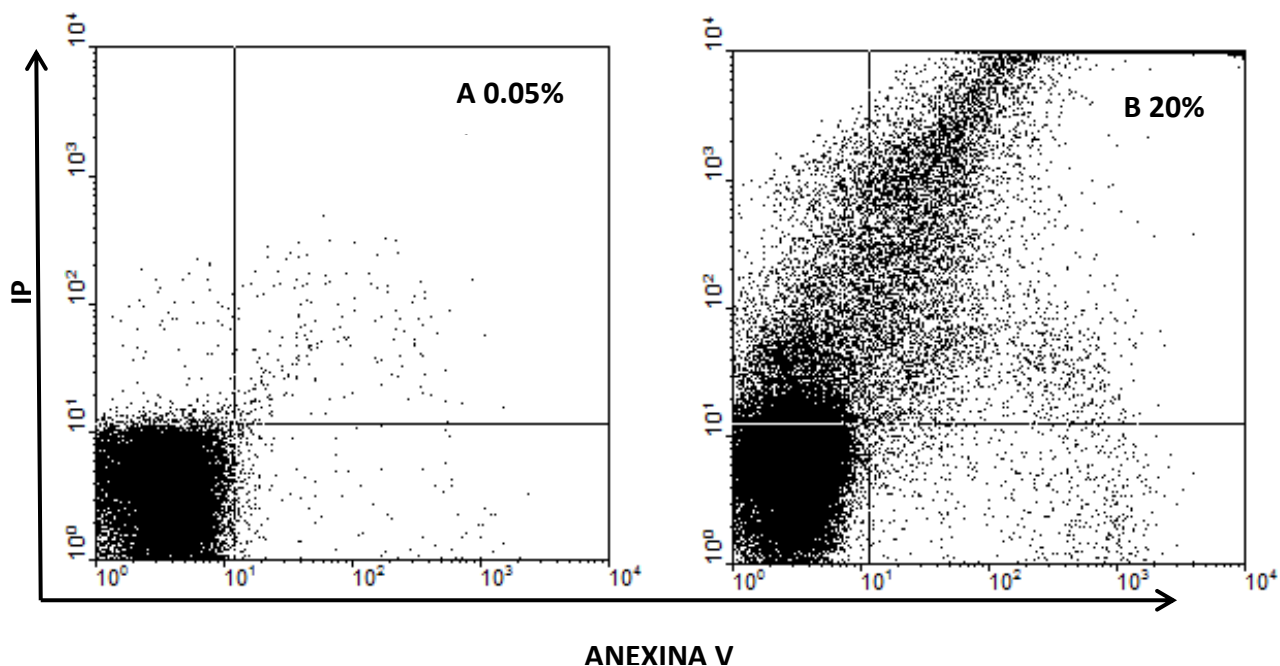


Figura 6. Dotplots de apoptosis celular. Control (A) y la apoptosis generada por el extracto de *B. aptera* sobre *L. mexicana* después de interactuar por 4h (B); se registró un 0.05% y un 20% de células que externalizan fosfatidilserina respectivamente, lo cual es un indicador de apoptosis en las células.

Determinación de la composición química del extracto por medio de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

Por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) se obtuvieron los compuestos presentes en las muestras de *B. aptera* (figura 7), representados en una gráfica con diversos picos con base al tiempo de retención y la abundancia de dichos compuestos en el extracto. Es importante resaltar el hecho de que no todos los picos que se presentan en la figura pudieron ser identificados con el CG-EM, esto se debe a que en la base de datos aún no se han identificado todos los metabolitos secundarios que pueden poseer las plantas, por lo que se analizan con respecto a los patrones conocidos hasta el momento. Sin embargo, abre la posibilidad de encontrar compuestos dentro de este extracto que no se hayan descrito anteriormente al aislar cada uno de los metabolitos secundarios presentes dentro del mismo.

Patrón de fragmentación del extracto metanólico de *B. aptera*

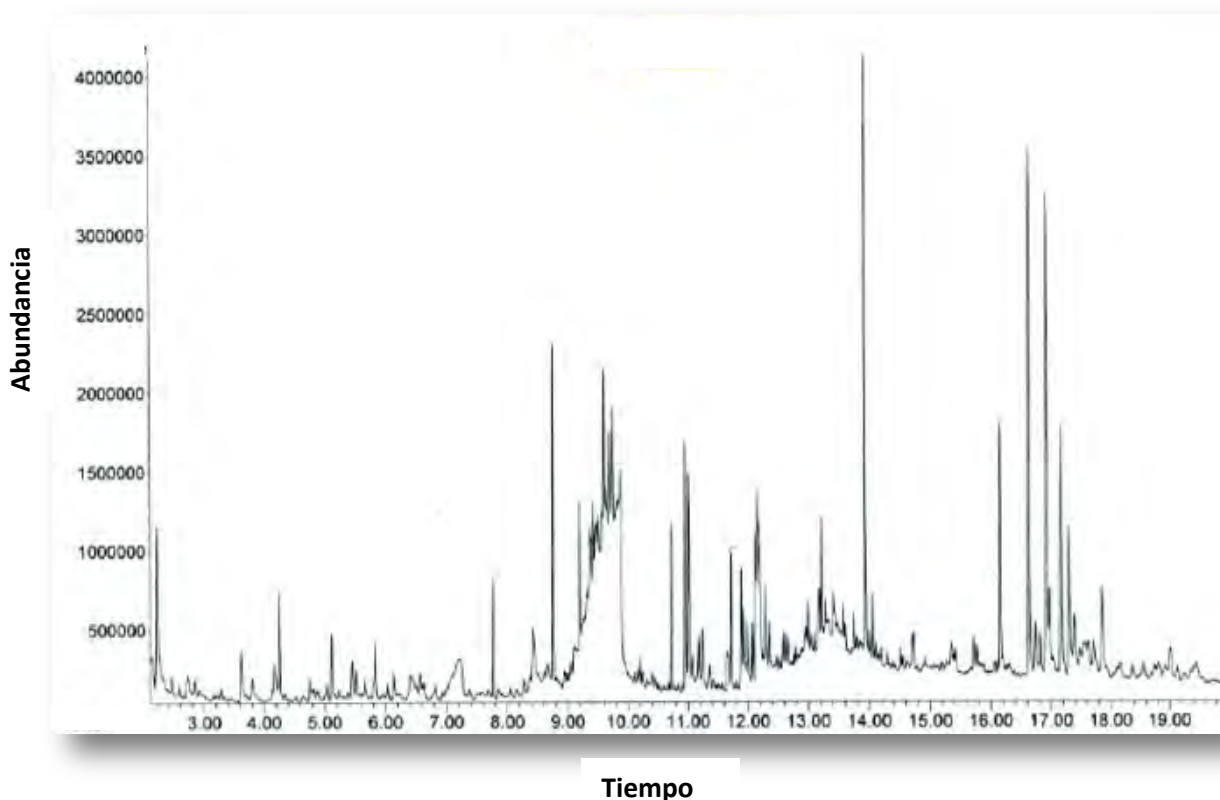
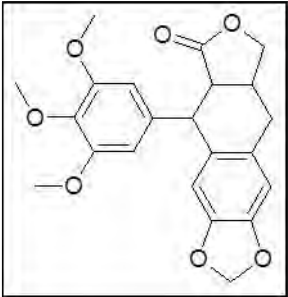
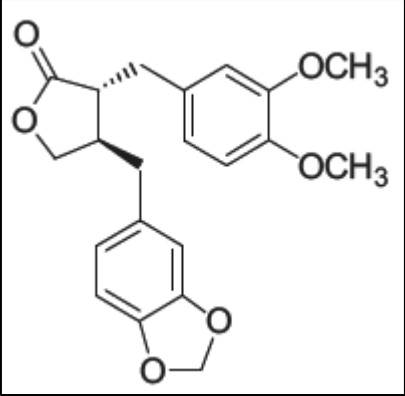
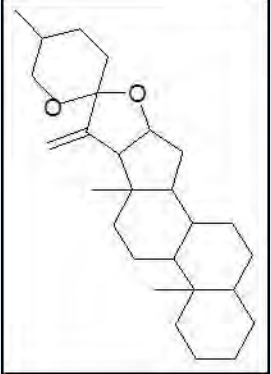
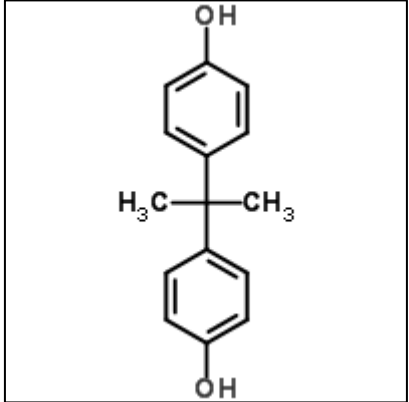
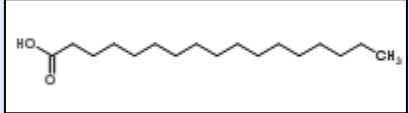
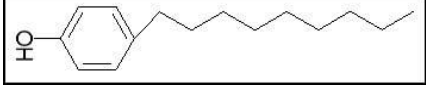


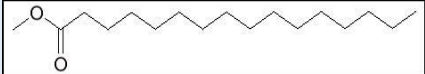
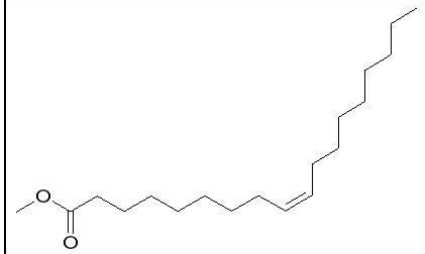
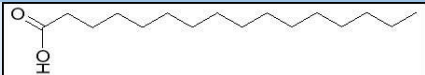
Figura 7. Cromatograma de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) del extracto metanólico de *B. aptera*. Se muestra el tiempo de retención de cada uno de los compuestos detectados con respecto a su abundancia dentro del extracto.

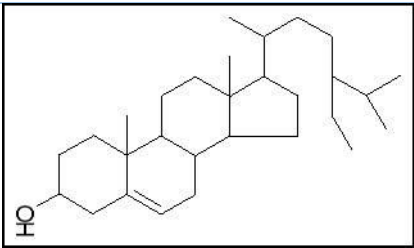
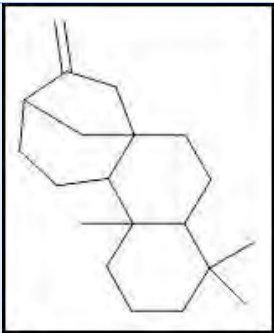
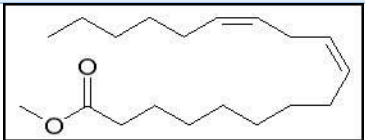
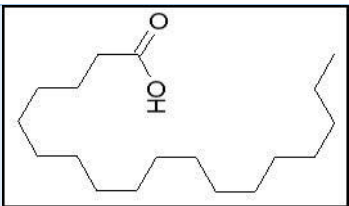
Se identificaron 18 metabolitos secundarios a partir de la CG-EM, los cuales se presentan en el cuadro 1, con su respectivo porcentaje de abundancia dentro del extracto metanólico de *B. aptera*, así como con su respectiva estructura química. De entre los compuestos hallados destacan en cuanto a su mayor abundancia el Ter-butilbifenol y la Podofilotoxina con 17.14 y 13.79% respectivamente; mientras que el compuestos con menor abundancia fue el Ácido linoleico con 1.34%. En general los demás compuestos encontrados varían entre el dos y el siete por ciento de abundancia dentro del extracto.

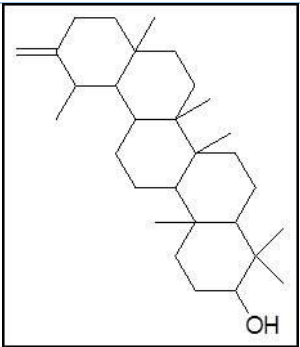
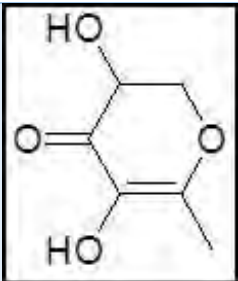
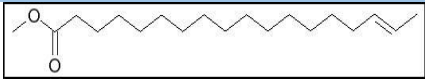
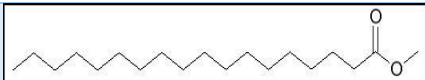
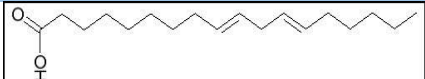
Cuadro 1. Porcentaje de abundancia de los compuestos detectados en una Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) del extracto metanólico de *B. aptera*.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	<i>B. aptera</i> (% de abundancia)	Propiedades medicinales	Estructura química
Podofiloxina	16.925	13.79	Anti-leishmania, anti-inflamatorio, citotóxico, apoptótico anti-tumoral (Qi <i>et al.</i> , 2005; Vasilev <i>et al.</i> , 2005; Liu <i>et al.</i> , 2010; Kirmızıbekmez <i>et al.</i> , 2011; Guerrero <i>et al.</i> , 2013).	
trans-metilpluviatólido	16.154	7.52		

<p>Spirost-20-en</p>	<p>17.175</p>	<p>7.49</p>	<p>Anti-inflamatorio, citotóxico apoptótico anti-tumoral (Myszka <i>et al.</i>, 2003; Shwe <i>et al.</i>, 2010; Timite <i>et al.</i>, 2013; Huang <i>et al.</i>, 2013).</p>	
<p>Tert-butilbisfenol</p>	<p>13.934</p>	<p>7.14</p>	<p>Anti-inflamatorio (Kwak <i>et al.</i>, 2009).</p>	
<p>Ácido 8-heptadecenoico</p>	<p>12.159</p>	<p>5.68</p>	<p>Anti-leishmania (Carballeira <i>et al.</i>, 2011).</p>	
<p>p-nonil fenol</p>	<p>9.429</p>	<p>5.43</p>	<p>Pro-inflamatorio, citotóxico apoptótico (Xiao <i>et al.</i>, 2011; Yen <i>et al.</i>, 2012).</p>	

Metil palmitato	10.729	4.93	Anti-inflamatorio (El-Demerdash, 2011).	
Metil éster del ácido oléico	12.183	4.93	Anti-inflamatorio, anti-apoptótico (inhibe el ácido palmítico) (Zhu <i>et al.</i> , 2005; Belosludtsev <i>et al.</i> , 2006; Harvey <i>et al.</i> , 2010; Saeed <i>et al.</i> , 2012).	
Ácido palmítico	10.960	4.76	Pro-inflamatorio, citotóxico, apoptótico anti-tumoral (Harada <i>et al.</i> , 2002; Lu <i>et al.</i> , 2003; Belosludtsev <i>et al.</i> , 2006; Laurenza <i>et al.</i> , 2008; Jin <i>et al.</i> , 2013).	

Clionasterol	17.299	4.60		
Kaureno	11.720	4.03	Anti-inflamatorio, citotóxico, apoptótico anti-tumoral (Suzuki <i>et al.</i>, 2004; Hueso-Falcon <i>et al.</i>, 2011; Lizarte Neto <i>et al.</i>, 2013).	
Metil linoleato	11.892	3.59		
Ácido esteárico	12.278	3.26	Pro-inflamatorio, apoptótico (Anderson <i>et al.</i>, 2012).	

Taraxasterol	17.851	3.22	Anti-inflamatorio (Shanu <i>et al.</i> , 2010; Zhang <i>et al.</i> , 2012).	
Piranona	4.253	3.18	Anti-leishmania, citotóxico (Wilson y Jairo, 2011).	
Ácido metil éster 16-octadecenoico	11.928	2.67		
Metil estearato	12.070	2.42		
Ácido linoleico	12.124	1.34	Anti-apoptótico (inhibe el ácido palmítico), antioxidante (Beeharry <i>et al.</i> , 2003).	

Evaluación de la actividad anti-inflamatoria utilizando el modelo de edema plantar generado por carragenina.

Después de corroborar que el extracto metanólico de *B. aptera* presentaba una actividad biológica contra el crecimiento de los promastigotes de *L. mexicana* y de que algunos de los metabolitos secundarios presentan propiedades anti-inflamatorias, se procedió a evaluar la actividad anti-inflamatoria del extracto, debido a que la leishmaniosis genera en el cuerpo del hospedero lesión ulcerosa, la cual generalmente presenta una inflamación local, por lo que se busca disminuir

la inflamación provocada por la infección con el uso de las burseras en la medicina tradicional; por ello cobra relevancia el evaluar esta propiedad que puede presentar el extracto.

Los datos se expresaron en porcentajes de inflamación con respecto a los obtenidos con respecto a la inflamación generada por la carragenina; se consideró como el 100% de inflamación a la cuarta medición realizada; mientras que la dexametasona tuvo 30.99% de inflamación mientras que el grupo control negativo presentó 56.36% de inflamación; por otra parte se observó una disminución del edema en el cojinete plantar de las ratas con las tres concentraciones del extracto utilizadas, las cuales presentaron un 55.33%, 63.55% y 62.83% de inflamación para las concentraciones de 250, 500 y 750 mg/kg respectivamente (figura 8), por lo que se puede observar que la concentración que tuvo el mejor efecto anti-inflamatorio fue la de 500 mg/kg con 63.55% con respecto a las otras dos concentraciones, puesto que la de 750 mg/kg obtuvo un 62.83% y la de 250 mg/kg solamente tuvo un 55.33% del mismo, por lo que esta última representa el efecto más bajo entre las concentraciones probadas (figura 9). Para corroborar si existían o no diferencias significativas entre las concentraciones de 500 y 750 mg/kg se realizó un análisis estadístico (ANOVA de dos vías; $\alpha=0.05$) y se encontró que no existen diferencias significativas entre ambas concentraciones.

Disminución de la inflamación del extracto de *B. aptera*

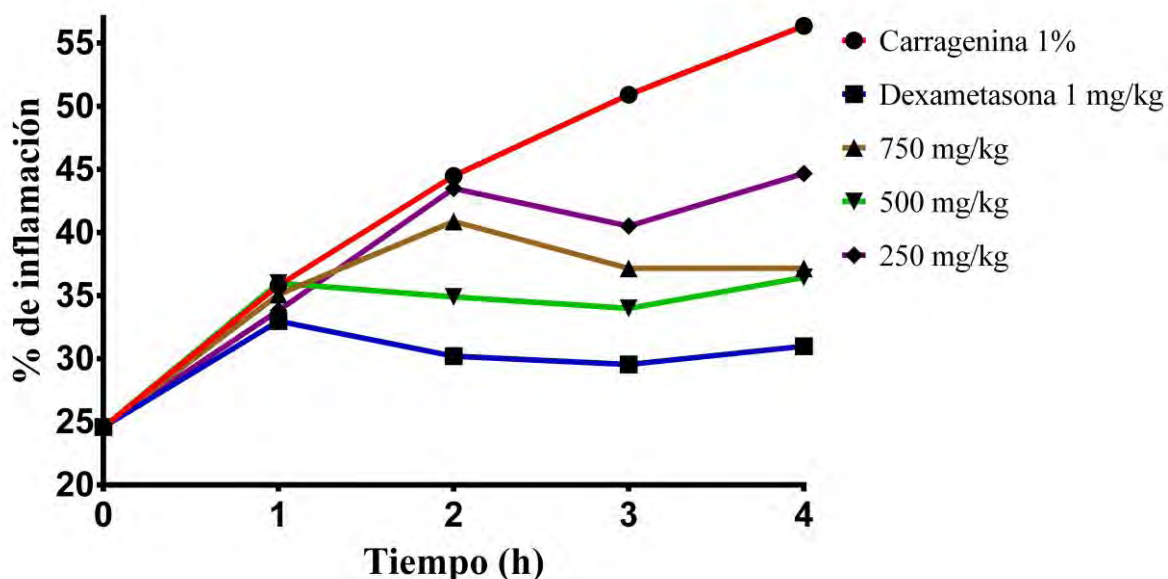


Figura 8. Porcentajes de la cinética de inflamación con los extractos de *B. aptera*. Para las concentraciones de 250, 500 y 750 mg/kg, utilizando como control negativo carragenina (1%) y como control positivo dexametasona (1 mg/kg). Las tres concentraciones mostraron un efecto

diferente entre ellas y se encontró que no existen diferencias significativas entre las concentraciones de 500 y 750 mg/kg, pero sí entre las dos anteriores y la concentración de 250 mg/kg.

Actividad anti-inflamatoria del extracto de *B. aptera*

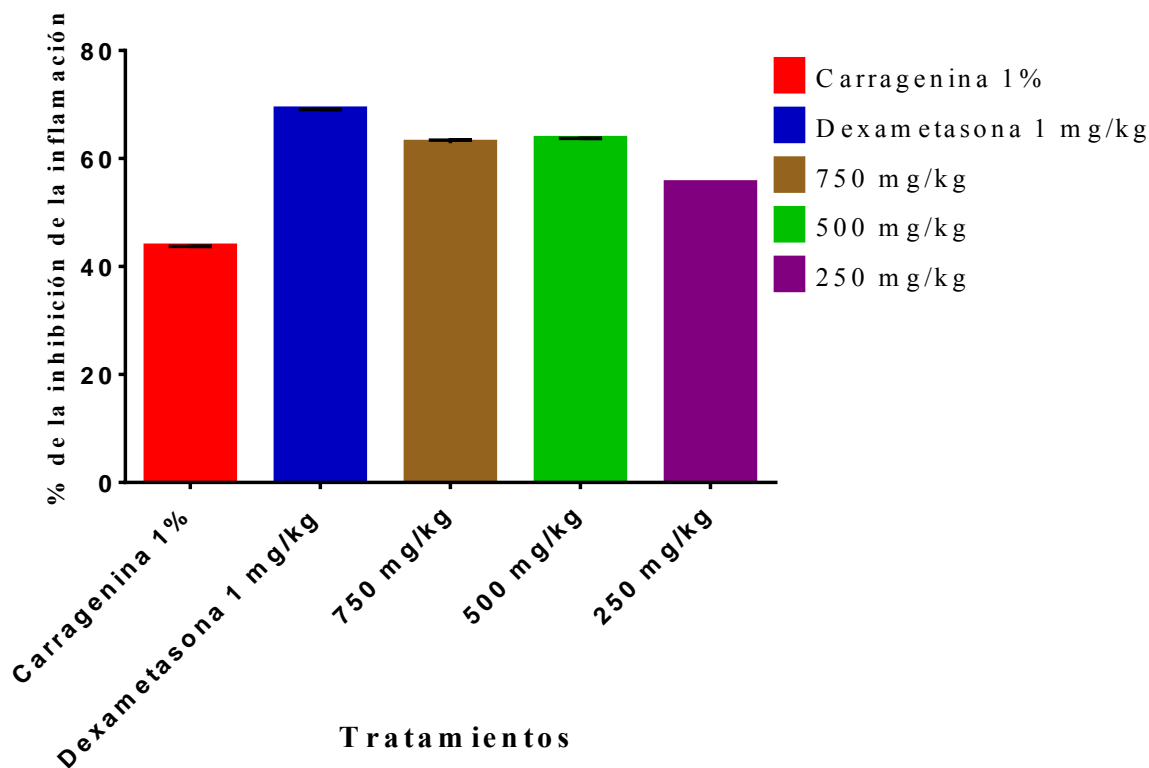


Figura 9. Porcentajes de la actividad anti-inflamatoria de las tres concentraciones del extracto metanólico de *B. aptera*. Como se puede apreciar, las concentraciones de 500 y 750 mg/kg mostraron una alta actividad anti-inflamatoria, en contraste a la de 250 mg/kg. La carragenina al ser el control negativo no presenta actividad anti-inflamatoria al ser el marco de referencia del ensayo.

El comportamiento del gráfico nos sugiere que el extracto pudiera tener efectos sobre la producción de prostaglandinas y la migración de neutrófilos en la respuesta inflamatoria; debido a que se ha sugerido que el efecto en la formación y migración de neutrófilos son algunas de las características de los agentes anti-inflamatorios cuyo mecanismo de acción está relacionado con la acción inhibidora de la ruta del ácido araquidónico (Higgs *et al.*, 1979); misma que sigue la dexametasona, la cual es un fármaco esteroideo que inhibe la enzima fosfolipasa A₂ que es responsable de la liberación de ácido araquidónico el sustrato para la producción de prostaglandina (Blackwell *et al.*, 1980).

Evaluación de la citotoxicidad del extracto de la corteza de *B. aptera* sobre macrófagos P-388 de ratones utilizando el método de Cristal Violeta

Al ser utilizadas diferentes especies pertenecientes al género *Bursera* en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de diferentes enfermedades de origen bacteriano, micótico o parasitario es importante corroborar la citotoxicidad que pueden presentar estas plantas; es por esta razón que una vez que se comprobó en el presente estudio el efecto anti-leishmánico, apoptótico, anti-inflamatorio y la presencia de metabolitos secundarios con propiedades citotóxicas del extracto metanólico de *B. aptera* se procedió a evaluar la posible citotoxicidad que pudiese presentar el mismo; para esto, se emplearon macrófagos de ratones leucémicos de la línea celular P-388, ya que es en los macrófagos del sistema inmune del hospedero en el que se albergan los parásitos de *L. mexicana*.

Los resultados obtenidos tras la interacción de las células con diferentes concentraciones del extracto metanólico (de 20 a 0.004 mg/mL) durante 48h fueron expresados en porcentaje de mortalidad de los macrófagos con respecto a la concentración del extracto de *B. aptera* presentados en la figura 10; se obtuvo que a la menor concentración probada del extracto (0.004 mg/mL) este presentó un porcentaje de mortalidad de macrófagos del 72.82%, por lo que no se logró calcular la CI_{50} del mismo; lo que nos indica que el extracto metanólico de la corteza de *B. aptera* es tóxico, de acuerdo al criterio del Instituto Nacional de Cancerología (INC), en el cual se considera a un extracto como tóxico si el valor de CI_{50} tras la incubación entre 48-72h debe ser menor de 0.02mg/mL.

Mortalidad en macrófagos causada por el extracto de *B. aptera*

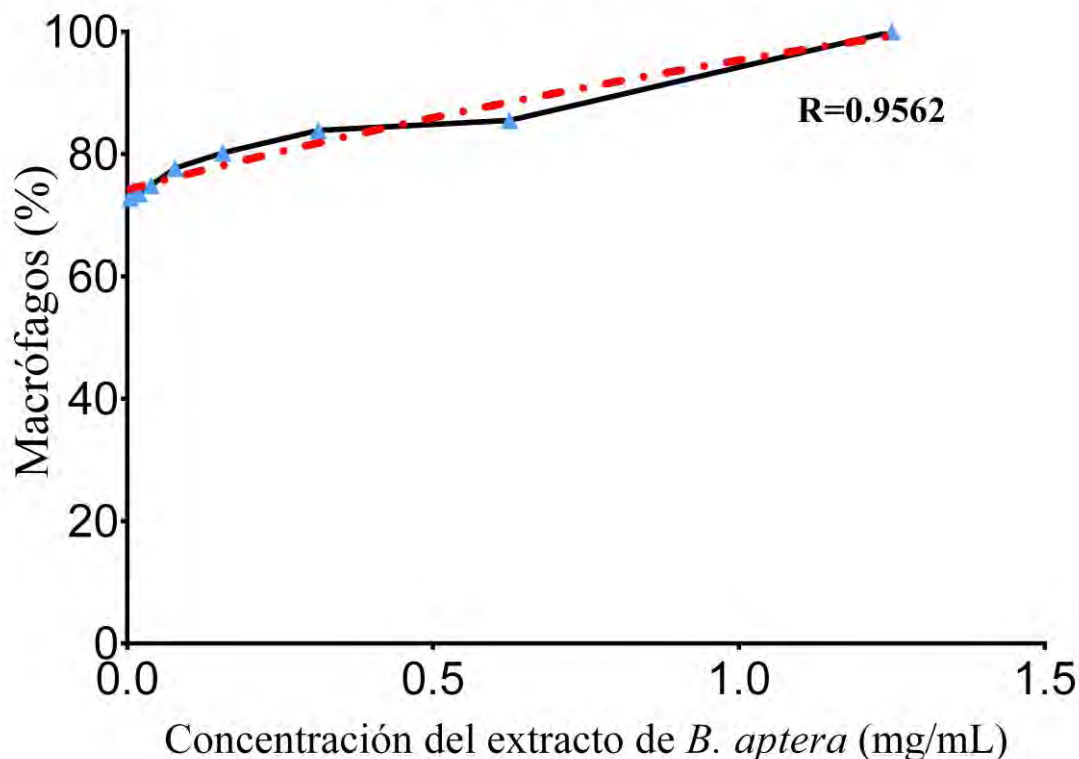


Figura 10. Ensayo de citotoxicidad del extracto de *B. aptera* sobre la línea celular de macrófagos murinos P-388. El extracto es altamente tóxico ya que a concentraciones menores a 4 $\mu\text{g/mL}$ tiene efectos nocivos en más del 70% de la población.

Discusión

Este es el primer estudio que se realiza sobre la actividad anti-leishmánica del extracto metanólico de la corteza de *B. aptera* debido a que no existe ningún reporte en la bibliografía que refiera actividad anti-leishmánica. Hasta el momento, solamente existen dos estudios que relacionan a plantas del género *Bursera* como son *B. graveolens* y *B. simaruba* que tuvieron actividad anti-leishmánica contra amastigotes de *L. amazonensis* cada una con un valor de CL_{50} de $36.7 \pm 4.7 \mu\text{g/mL}$ y de $163.3 \pm 1.8 \mu\text{g/mL}$ respectivamente (García *et al.*, 2012; Monzote *et al.*, 2012). Sin embargo, en el presente estudio es la primera vez que se evalúa la actividad anti-leishmánica de *B. aptera* sobre promastigotes de *L. mexicana*, por lo que es destacable que la especie y la forma celular del parásito son totalmente distintas a las que se han descrito en la bibliografía.

Los resultados que se obtuvieron demuestran que *B. aptera* tiene actividad anti-leishmánica contra *L. mexicana*; se determinó el valor de CL_{50} , el cual fue de 408 $\mu\text{g/mL}$, este es un valor mayor al reportado en las otras plantas del mismo género; sin embargo, cabe mencionar que en el caso de *B. graveolens* se trabajó con el aceite esencial de la planta (Monzote *et al.*, 2012) por otra parte, en el caso de *B. simaruba* se probó el extracto etanólico de las hojas de la planta (García *et al.*, 2012). Se ha encontrado que en otras plantas del género *Bursera* como *B. fagaroides*, que el extracto etanólico de la corteza inhibe la actividad de la ornitina descarboxilasa (ODC) entre un 12% y un 50% a concentraciones de 4 y 8 mg/mL respectivamente; la ODC es la primera enzima clave en la biosíntesis de poliaminas en la mayoría de organismos vivos desde bacterias hasta mamíferos; cataliza la descarboxilación de ornitina para producir putrecina; esta reacción juega un papel clave en la regulación del metabolismo de poliaminas que está estrechamente asociada con la progresión del crecimiento, proliferación y regeneración celular por mecanismos que aún no se entienden completamente (Rosas-Arreguin *et al.*, 2008). Además de lo anterior existen estudios en los que se reporta una gran variedad de metabolitos secundarios en la plantas de este género; motivo por el cual se realizó el análisis fitoquímico del extracto metanólico de la corteza de *B. aptera* para comprender la actividad anti-leishmánica que presentó el mismo (Zuñiga *et al.*, 2005).

Al realizar el análisis fitoquímico por CG-EM se encontró que algunos de los compuestos presentes en el extracto presentan actividad anti-leishmánica; entre estos compuestos encontramos a la podofilotoxina (Kırmızıbekmez *et al.*, 2011); el ácido heptadecanoico, aislado de la esponja marina *Dragmaxia undata*, se ha reportado que presenta actividad antiprotozoa contra *L. donovani* (causante de leishmaniosis visceral) con un valor de Cl_{50} de $165.5 \pm 23.4 \mu\text{M}$ e inhibe la enzima DNA topoisomerasa IB de *Leishmania* (LdTopIB), sin dañar la enzima de mamíferos DNA topoisomeras IB, lo cual es el posible mecanismo de acción de este compuesto (Carballeira *et al.*, 2011); y la piranona, la cual ha mostrado tener actividad *in vitro* contra diferentes especies del género *Leishmania*, por ejemplo la argenilactona que es una piranona natural presenta actividad contra promastigotes de *L. mexicana* a una concentración de 5 $\mu\text{g/mL}$ y que a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ presenta un marcado retardo en el crecimiento de los promastigotes de este parásito; los cuales son incapaces de proliferar y mueren en un periodo de dos a tres días (Wilson y Jairo, 2011).

Por otra parte entre los compuestos presentes en el extracto de *B. aptera* se encuentran algunos metabolitos secundarios reportados como inductores de apoptosis. La apoptosis o muerte celular programada es un, controlado y hasta cierto punto reversible, proceso de desintegración celular que usualmente no genera reacciones inflamatorias; aunque la comprensión detallada de las vías de señalización que componen la apoptosis es incompleta, este proceso es controlado por numerosas

proteínas y complejos proteicos que cuando son activados por diversos factores desencadenantes inician la activación secuencial de los mecanismos efectores. La apoptosis es desencadenada por dos vías principales de iniciación de apoptosis, designadas como la vía interna intrínseca mediada por la mitocondria y la vía externa extrínseca mediada por receptores (Fulda, 2010; Klener *et al.*, 2006). En este estudio se encontró que el extracto metanólico de *B. aptera* induce un 20% de apoptosis en promastigotes de *L. mexicana*. Dentro de los metabolitos secundarios que generan apoptosis están la podofilotoxina que activa apoptosis en células BV-173, HL-60 y HepG2; esta última presenta fragmentación de DNA (Vasilev *et al.*, 2005) y arresto celular en las fases G₂ y M del ciclo celular (Liu *et al.*, 2010; Qi *et al.*, 2005); además incrementa la actividad de Bax y el nivel de activación de la caspasa-3 en este tipo de células (Qi *et al.*, 2005); ambos son considerados biomarcadores característicos de la apoptosis (Liu *et al.*, 2010). El mecanismo de acción que sigue la podofilotoxina es similar al que se ha descrito para el p-nonil fenol que también presenta actividad sobre Bax y la caspasa-3 (Yen *et al.*, 2012).

Los compuestos relacionados al kaureno son una familia única de diterpenoides que causan apoptosis caspasa dependiente, incrementando la expresión de caspasa -8, -3 y un decremento en la expresión de los genes anti-apotóticos miR-21 y c-FLIP, o muerte celular por necrosis (Lizarte Neto *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2004). Además se ha reportado que las saponinas esteroideas aumentan el número de células apoptóticas en linfocitos leucémicos B-CLL (Myszka *et al.*, 2003), en nuestro caso se encontró el spirost-20-en que es un compuesto que pertenece a esta familia de metabolitos secundarios, el cual podría intervenir en la actividad anti-leishmánica al presentar esta actividad entre sus propiedades. De igual forma se sabe que los ácidos grasos libres (AGL) son modificadores biológicos naturales que afectan numerosas funciones fisiológicas. Se ha encontrado que AGL como el ácido palmítico induce apoptosis en la línea celular de leucemia humana MOLT-4 (Harada *et al.*, 2002), en células testiculares de Leydig y que junto con el ácido esteárico inducen apoptosis por la producción de ceramida (Lu *et al.*, 2003); además se sabe que el ácido palmítico induce la apertura del poro mitocondrial ciclosporina A, lo cual conduce a una caída del potencial de la membrana mitocondrial lo que produce la liberación de la señal pro-apoptótica del citocromo c (Belosludtsev *et al.*, 2006). En contraste los ácidos oleico y linoleico impiden la apertura de los poros en la mitocondria intacta inducidos por el ácido palmítico, lo cual está directa y significativamente correlacionadas con el efecto de estos ácidos grasos sobre la apoptosis inducida por el ácido palmítico, el cual induce daño en el DNA de la células; además se ha observado que el ácido linoleico impide este daño, ya que actúa como un agente protector contra el estrés oxidativo, en lugar de como una fuente de metabolitos mutagénicos (Beeharry *et al.*, 2003; Belosludtsev *et al.*,

2006). A pesar de la actividad del ácido oleico mencionada anteriormente, se ha demostrado que este ácido graso monosaturado induce apoptosis neuronal a través del mecanismo caspasa-3 independiente involucrado en la defosforilación de Bad (Zhu *et al.*, 2005).

Las plantas medicinales pertenecientes a la familia Burseraceae son especialmente conocida por sus propiedades anti-inflamatorias; entre los miembros de esta familia se sabe que los árboles pertenecientes al género *Bursera* producen resinas y exudados que son usados contra infecciones bacterianas y como agentes anti-inflamatorios tópicos (Carretero *et al.*, 2008; Duwiejua *et al.*, 1993; Noguera *et al.*, 2004; Zuñiga *et al.*, 2005). En el presente estudio se demostró que el extracto metanólico de la corteza de *B. aptera* presenta actividad anti-inflamatoria debido a que inhibe el edema plantar generado por carragenina entre el 55.33% y el 63.55%, lo que coincide con otros reportes de plantas del género *Bursera* que han sido estudiados, tal es el caso del extracto hexánico de las hojas de *B. simaruba* el cual se mostró una fuerte actividad anti-inflamatoria con un 83% de inhibición del edema de la oreja inducido con tetradecanoilforbol acetato (TPA) comparable al medicamento de referencia (fenilbutazona) y en el edema plantar inducido por carragenina donde inhibió el edema en un 58.87%, mientras que la fenilbutazona lo inhibió en un 40%; además de que el análisis fitoquímico del extracto mostró la presencia de triterpenos y lignanos en este, a los cuales se les atribuyó el efecto que presentó la planta (Carretero *et al.*, 2008; Noguera *et al.*, 2004); en comparación a nuestros resultados el efecto anti-inflamatorio que presentó el extracto de *B. simaruba* es menor al que presenta *B. aptera* en el mismo modelo de inflamación considerando que el extracto metanólico de *B. aptera* inhibió el edema plantar en un 63.55% a una concentración de 500 mg/kg; sin embargo, hay que considerar que la naturaleza de los extractos es diferente ya que en *B. simaruba* se ocupó un extracto hexánico mientras que en el presente estudio se ocupó un extracto metanólico y por tanto los metabolitos secundarios obtenidos en ambos extractos son de diferente naturaleza, ya que en el primer caso los compuestos que se extraen son de baja polaridad, con respecto a los que se obtienen del extracto metanólico donde se obtienen compuestos altamente polares; aun así, a partir de la CG-EM que se realizó con el extracto de *B. aptera* se encontró al taraxasterol, que es un triterpeno pentacíclico con actividad anti-inflamatoria, debido a que inhibe la producción de óxido nítrico (NO), prostaglandina (PGE₂) (ambos son mediadores pro-inflamatorios producidos por la activación de macrófagos y juegan un rol crítico en enfermedades inflamatorias), TNF- α , IL-1 β e IL-6 (que son citocinas pro-inflamatorias conocidas por contribuir al daño tisular y al fallo multiorgánico; además son importantes iniciadores en la respuesta inflamatoria y mediadores en el desarrollo de diversas enfermedades inflamatorias) y bloquea la vía NF-kappaB, que es uno de los más importantes reguladores de la expresión de genes pro-inflamatorios (Zhang *et*

al., 2012); y a la podofilotoxina, que se ha reportado como un compuesto anti-inflamatorio al inhibir el desarrollo del edema plantar inducido por carragenina en un 66.3% (Guerrero *et al.*, 2013).

En un estudio donde se evaluó la fracción volátil de la corteza de ocho especies de burseras mexicanas, entre ellas la fracción volátil de *B. aptera* inhibió en un 10% el edema de la oreja inducido con TPA, en contraste con la indometacina (la cual es un medicamento anti-inflamatorio) que inhibió el edema en un 31.4%, adicionalmente se sabe que la fracción volátil de *B. aptera* se compone en un 94.6% de limoneno y en un 5.4% del diterpeno kaureno (Zuñiga *et al.*, 2005), el cual bloquea la vía NF-kappaB, (Hueso-Falcon *et al.*, 2011) por lo que tiene el mismo mecanismo de acción anti-inflamatoria del taraxasterol, lo que podría explicar la gran eficacia anti-inflamatoria del extracto de *B. aptera* estudiado el este trabajo. Es importante resaltar que diversos compuestos presentes en el extracto metanólico de *B. aptera* presentan actividad anti-inflamatoria como la podofilotoxina, la cual presenta un porcentaje de inhibición de edema plantar inducido por carragenina muy similar al que presentó el extracto estudiado, que como se mencionó anteriormente presentan un 66.3% y un 63.55% de inhibición de la inflamación respectivamente; las saponinas esteroideas como el spirost-20-en que se encuentra presente en el extracto muestran actividad anti-inflamatoria al inhibir la generación de superóxido y elastasa, moléculas implicadas en el proceso inflamatorio (Huang *et al.*, 2013); y los ácidos grasos como el metil palmitato y el metil ester del ácido oleico (El-Demerdash, 2011; Harvey *et al.*, 2010; Saeed *et al.*, 2012), los cuales siguen el mismo mecanismo de acción que el descrito para el taraxasterol; también se sabe que el *tert*-butilbisfenol activa las interleucinas anti-inflamatorias IL-4 e IL-10 (Kwak *et al.*, 2009; Shanu *et al.*, 2010). En contraste a los metabolitos secundarios antes mencionados, en el extracto de *B. aptera* se encuentran compuestos que se han reportado presentan actividad pro-inflamatoria como el ácido esteárico a través de la activación del receptor Toll-like 4 (TLR4) que genera inflamación (Anderson *et al.*, 2012); de la misma forma actúa el ácido palmítico, además de que estimula la expresión de la interleucina pro-inflamatoria IL-6 (Jin *et al.*, 2013; Laurenza *et al.*, 2008); sin embargo, se ha encontrado que el ácido oleico es capaz de inhibir la actividad pro-inflamatoria del ácido esteárico (Harvey *et al.*, 2010); por otra parte, el *p*-nonil fenol incrementa los niveles de genes y proteínas pro-inflamatorios como la expresión de NF-KappaB, TNF- α , y disminuye la expresión endotelial del óxido nítrico sintetasa (eNOS) un indicador anti-inflamatorio (Yen *et al.*, 2012). Sin embargo, cabe resaltar el hecho de que estos compuestos con propiedades pro-inflamatorias tienen una baja abundancia en el extracto metanólico de *B. áptera*; por lo que su concentración en el extracto es menor al de los metabolitos secundarios reportados como agentes anti-inflamatorios.

Es importante tener en cuenta que los estudios de la actividad anti-leishmánica y generación de apoptosis del extracto metanólico de *B. aptera* se realizaron con modelos experimentales *in vitro*, por lo que es necesario el realizar estos estudios sobre modelos experimentales *in vivo*; debido a lo anterior surgió la necesidad de determinar la citotoxicidad del extracto y se encontró que este es tóxico, ya que a la menor concentración evaluada (0.004 mg/mL) inhibió el 72.82% de macrófagos de la línea celular P-388, de acuerdo al criterio del INC (Geran *et al* 1972); lo que concuerda con la citotoxicidad reportada para otras especies del género *Bursera* como el extracto etanólico de las hojas de *B. klugii* que mostró actividad contra la misma línea celular probada con el extracto de *B. aptera* y sobre células de carcinoma epidermoide humano de la nasofaringe (9KB) (Jolad *et al.*, 1977a); el extracto metanólico de tallos de *B. graveolens* que presentó actividad inhibitoria contra células de fibroblastoma humano HT1080 (Nakanishi *et al.*, 2005); el extracto de éter de petróleo de hojas de *B. tomentosa* el cual mostró citotoxicidad positiva contra las líneas de células tumorales humanas Colo-205 y CSC-1595 (Robles *et al.*, 2010); también se conoce de la presencia de la podofilotoxina que es un lignano citotóxico que inhibe la polimerización de los microtúbulos; estos son componentes importantes del citoesqueleto celular envueltos en la regularización de la proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Guerrero *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2010; Qi *et al.*, 2005; Vasilev *et al.*, 2005); este compuesto se ha señalado como el responsable del efecto citotóxico en las ramas de *B. permollis*; en el exudado seco de *B. morelensis* y en el extracto etanólico e hidroalcohólico de la corteza de *B. fagaroides* (Jolad *et al.*, 1977b; Rojas-Sepulveda *et al.*, 2012; Velazquez-Jimenez *et al.*, 2011; Wickramaratne *et al.*, 1995). Lo anterior corrobora los resultados obtenidos, ya que además de la podofilotoxina el análisis fitoquímico del extracto metanólico de *B. aptera* reveló la presencia de otros compuestos citotóxicos como son el spirost-20-en que inhibe las líneas celulares cancerígenas de colon humano HCT-116 y HT-29 (Myszka *et al.*, 2003; Shwe *et al.*, 2010; Timite *et al.*, 2013); el p-nonil fenol (Xiao *et al.*, 2011); el ácido palmítico que actúa sobre células leucémicas humanas (Belosludtsev *et al.*, 2006; Laurenza *et al.*, 2008); el kaureno que presenta actividad citotóxica significativa contra la línea celular de neuroblastoma IMR-32 y contra las células tumorales humanas K-562 (Li *et al.*, 2006; Thirugnanasampandan y Jayakumar, 2009) y la piranona que presenta actividad sobre la línea celular de ratones leucémicos P-388 (Wilson y Jairo, 2011). Lo que podría explicar su citotoxicidad sobre la línea celular P-388.

Debido a la citotoxicidad que presenta el extracto metanólico de *B. aptera* y a la presencia de compuestos reportados como anti-tumorales (ya que inhiben el crecimiento de diversas líneas celulares tumorales como las mencionadas en el párrafo anterior) abre la posibilidad de realizar y evaluar la actividad anti-tumoral de este extracto, pues se han reportado otras burseras que

presentan este efecto, tal es el caso de *B. tonkinensis*, *B. schelechtendalii* y *B. microphylla* las cuales presentan podofilotoxina en su composición fitoquímica, por lo que señalan a este compuesto como el principal agente anti-tumoral dentro de estas plantas (Bianchi et al., 1968; Cole et al., 1969; Jutiviboonsuk et al., 2005; McDoniel and Cole, 1972; Trumbull and Cole, 1969).

Conclusiones

En el presente estudio se encontró que el extracto metanólico de la corteza de *B. aptera* presentó actividad anti-leishmánica, la cual es inducida por apoptosis en los promastigotes de *L. mexicana*, lo que coincide con otros reportes de actividades similares de especies pertenecientes al género *Bursera*, además de que los compuestos caracterizados por CG-EM presentes en el extracto nos muestran indicios de que el mismo probablemente induce apoptosis por medio de la vía intrínseca. También se corroboró la actividad anti-inflamatoria y la citotoxicidad del extracto; ambas actividades fueron explicadas con respecto a los metabolitos secundarios presentes en el mismo; entre los compuestos que presentó el extracto se destaca la presencia de la podofilotoxina debido a que este lignano exhibe todas las propiedades evaluadas en el presente estudio, lo que abre la posibilidad de seguir otras líneas de investigación con el extracto, por lo que se sugiere la evaluación de la actividad anti-tumoral del mismo, así como evaluar por medio de modelos experimentales *in vivo* la actividad anti-leishmánica del extracto metanólico de *B. aptera*.

Referencias

- Abad, M.J., P. Bermejo, E. Carretero, C. Martínez, B. Noguera y A. Villar. 1996. Antiinflammatory activity of some medicinal plant extracts from Venezuela. *Journal of Pharmacology*. 55: 63-68.
- Alexander, J., A.R. Satoskar y D.G. Russell. 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *Journal of Cell Science*. 112: 2993-3002.
- Almanza, R.C. y C.M. Martínez. 2008. Estudio del ciclo biológico del vector de leishmaniasis visceral *Lutzomyia evansi* (Núñez-Tovar, 1924) (Diptera: Psychodidae) bajo condiciones de laboratorio. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología con Énfasis en Biotecnología. Universidad de Sucre. Facultad de Educación y Ciencias Biología con Énfasis en Biotecnología SINCELEJO. 66 p.
- Anderson, E.K., A.A. Hill, y A.H. Hasty. 2012. Stearic acid accumulation in macrophages induces toll-like receptor 4/2-independent inflammation leading to endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 32: 1687-1695.
- Andrés, H. A. y Espinosa, D. 2002. Morfología de plántulas de *Bursera* JACQ; EX L. (*Burseraceae*) y sus implicaciones filogenéticas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 70: 5-12.
- Arias, J., F. Beltran, P. Desjeux, B. Walton. 1996. Epidemiología y control de la Leishmaniosis en las américas, por país o territorio. *Organización Panamericana de la Salud*. 44-52 p.
- Awasthi, A., R.K. Mathur y B. Saha. 2004. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian Journal of Medical Research*. 119:238-258.
- Bates, P.A. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal of Parasitology*. 37: 1097-1106.
- Badisa, R.B., O. Tzakou, M. Couladis, y E. Pilarinou. 2003. Cytotoxic activities of some Greek Labiatae herbs. *Phytotherapy Research*. 17: 472-476.
- Becerra, J.X. 2003. Evolution of Mexican *Bursera* (*Burseraceae*) inferred from ITS, ETS, and 5S nuclear ribosomal DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 26: 300-309.

- Becker, I. 2006. Capítulo 41, Leishmaniosis. En: Flisser, A. Y R. Pérez-Tamayo. Aprendizaje de la parasitología basado en problemas. *Editores de Textos Mexicanos, ETM*. México DF. 394-406 pp.
- Beeharry, N., J.E. Lowe, A.R. Hernandez, J.A. Chambers, F. Fucassi, P.J. Cragg, M.H. Green y I.C. Green. 2003. Linoleic acid and antioxidants protect against DNA damage and apoptosis induced by palmitic acid. *Mutation Research*. 530: 27-33.
- Belosludtsev, K., N.E. Saris, L.C. Andersson, N. Belosludtseva, A. Agafonov, A. Sharma, D.A. Moshkov, y G.D Mironova. 2006. On the mechanism of palmitic acid-induced apoptosis: the role of a pore induced by palmitic acid and Ca²⁺ in mitochondria. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 38: 113-120.
- Bern, C. J.H. Maguire y J. Alvar. 2008. Complexities of assasin the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2: e313.
- Besteiro, S., R.A. Williams, G.H. Coombs y J.C. Mottram. 2007. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International Journal of Parasitology*. 37: 1063-1075.
- Bianchi, E., M.E. Caldwell, y J.R. Cole. 1968. Antitumor agents from *Bursera microphylla* (Burseraceae) I. Isolation and characterization of deoxypodophyllotoxin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 57: 696-697.
- Blackwell, G.J., R. Carnuccio, M. DiRosa, R.J. Flower, L. Parente y P. Persico. 1980. Macrocortin: a polypeptide causing the anti-phospholipase effect of glucocorticoid. *Nature*. 287: 147-149.
- Caballo, M.A., C.M. Cortada y A.B. Gadano. 2005. Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. *Theoria Ciencia Artes y Humanidades*. 14(2): 95-108.
- Camporese, A., M.J. Balick, R. Arvigo, R.G. Esposito, N. Morsellino, F. De Simone y A. Tubaro. 2003. Screening of anti-bacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). *Journal of Pharmacology*. 87:103-107.
- Canales, M.M., T. Hernández, J. Caballero, A. Romo de Vivar Romo, A. Durán y R. Lira. 2006. Análisis cunitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán, Puebla, México. *Acta Botánica Mexicana*. 75: 21-43.

- Carballeira, N.M., N. Montano, G.A. Cintron, C. Marquez, C.F. Rubio, C.F. Prada, y R. Balana-Fouce. 2011. First total synthesis and antileishmanial activity of (Z)-16-methyl-11-heptadecenoic acid, a new marine fatty acid from the sponge *Dragmaxia undata*. *Chemistry and Physics of Lipids*. 164: 113-117.
- Carretero, M.E., J.L Lopez-Perez, M.J. Abad, P. Bermejo, S. Tillet, A. Israel, y P.B. Noguera. 2008. Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fractions from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves. *Journal of Ethnopharmacology*. 116: 11-15.
- Cole, J.R., E. Bianchi y E.R. Trumbull. 1969. Antitumor agents from *Bursera microphylla* (Burseraceae). II. Isolation of a new lignan-burseran. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 58: 175-176.
- Cunningham, AC. 2002. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology*. 72: 132-141.
- Daly, D.C. 1993. Notes on *Bursera* in South America, including a new species. Studies in Neotropical *Burseraceae* VII. *Brittonia*. 45: 240-246.
- Desjeux, P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 27: 305-318.
- Didier, H. 1995. La colección de plantas medicinales más importante de América Latina. *Del Herbario. Ciencias*. 39: 46-47.
- Domínguez, X.A. 1973. Métodos de Investigación fitoquímica. Ed. Limusa. México. 281 p.
- Dr. Scope. 2012. Leishmaniosis cutánea. En línea: <http://www.drscope.com/privados/pac/generales/parasitologia/leishmaniasis.html>. Consultado: 11 agosto 2012.
- Dutta, A., S. Bandyopadhyay, C. Mandal y M. Chatterjee. 2005. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitology International*. 54:119-122.

- Dutta, A., S. Bandyopadhyay, C. Mandal y M. Chatterjee. 2007. *Aloe vera* leaf exudate induces a caspase-independent cell death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of Medical Microbiology*. 56: 629-636.
- Duwiejua, M., I.J. Zeitlin, P.G. Waterman, J. Chapman, G.J. Mhango y G.J. Provan. 1993. Anti-inflammatory activity of resins from some species of the plant family Burseraceae. *Planta Medica*. 59: 12-16.
- El-Demerdash, E. 2011. Anti-inflammatory and antifibrotic effects of methyl palmitate. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 254: 238-244.
- El-On, J., L. Ozer, J. Gopas, R. Sneir, H. Enav, N. Luft, G. Davidov y A. Golan. 2009. Antileishmanial activity in Israeli plants. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 103(4): 297-306.
- Espinosa, L. 2012. Estudio de la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Bursera schelechtendalii* Engle. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 71 p.
- Evans, P.H., J.X. Becerra, D.L. Venable y W.S. Bowers. 2000. Chemical analysis of squirt-gun defense in *Bursera* and counterdefense by Chrysomelid beetles. *Journal of Chemical Ecology* 26(3): 745-754.
- Fernández, B. Ma. N. 1999. Análisis de la dinámica de comunidades vegetales con relación a la evolución del paisaje, en la zona semiárida de Coxcatlán, Puebla. Tesis para obtener el grado de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF. 98 p.
- Fernández, N.R. y D. Ramos. 2001. Notas sobre plantas medicinales del estado de Querétaro, México. *Polibotánica*. 12:1-40.
- Fierro, A., M.M. González, D. Montiel, D. Ruiz, L.J. Olivares y J.C. Romualdo. 2012. La recolección y cultivo de especies medicinales y aromáticas silvestres, una propuesta de manejo sustentable. En línea: http://www.somas.org.mx/imagenes_somas2/pdfs_libros/agriculturasostenible6/63/96.pdf. Consultado: 11 agosto 2012.

- Fraga, C. F., L. Henrique, B. Barros, R. Basques, A.L. Teles, T.M. Almeida, C. Augusto y C. Leomar. 2008. Leishmanicidal metabolites from *Cochliobolus* sp., an endophytic fungus isolated from *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae). *Plos Neglected Tropical Diiseases*. 2(12): e348.
- Fulda, S. 2010. Evasion of apoptosis as a cellular stress response in cancer. *International Journal of Cell Biology*. 2010: 370835.
- García, M.E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen. 3^a ed. Instituto de Geografía. *Universidad Nacional Autónoma de México*. México DF. 252 p.
- García, D.E. 2004. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y Forrajes*. 27: 1-12.
- Garcia, M., L. Monzote, R. Scull, y P. Herrera. 2012. Activity of Cuban Plants Extracts against *Leishmania amazonensis*. *ISRN pharmacology*. 2012: 104540.
- Geran, R.I., N.H. Greenberg, M.M. Macdonald, A.M. Schumache y B.J. Abbot. 1972. Protocols for screening chemical against animal tumor and other biological systems. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*. 3: 1-103.
- Guerrero, E., A. Abad, G. Montenegro, E. Del Olmo, J.L. Lopez-Perez, y A. San Feliciano. 2013. Analgesic and anti-inflammatory activity of podophyllotoxin derivatives. *Pharmaceutical Biology*. 51: 566-572.
- Gómez, R. 2012. Plantas medicinales de una aldea del estado de Tabasco, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 35: 43-49.
- Guzmán, R. y G. Sánchez. 2004. Estudio preliminar morfológico y fitoquímico de las especies de *Brsera arbórea* (Rose) Riley y *Bursera instabilis* McVaugh y Rzed en la Estación Biológica de Chamela, Jalisco. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria. Facultad de Ciencias y Tecnología*. 3: 47-54.
- Hanna, E., R. Thuladhar y A.R. Satoskar. 2009. Cytokines and their STATs in Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010: 1-6.
- Handman, E. y D.V. Bullen. 2002. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology*. 18: 332-334.

- Harada, H., U. Yamashita, H. Kurihara, E. Fukushi, J. Kawabata, y Y. Kamei. 2002. Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in a marine red alga. *Anticancer Research*. 22: 2587-2590.
- Harvey, K.A., C.L. Walker, Z. Xu, P. Whitley, T.M. Pavlina, M. Hise, G.P. Zaloga, y R.A. Siddiqui. 2010. Oleic acid inhibits stearic acid-induced inhibition of cell growth and pro-inflammatory responses in human aortic endothelial cells. *Journal of Lipid Research*. 51: 3470-3480.
- Herwaldt, B.L. 1999. Leishmaniasis. *Lancet*. 354: 1191-1199.
- Higgs, A.G., J.R. Flower y R.J. Vane. 1979. A new approach to antiinflammatory drugs. *Biochemical Pharmacology*. 28: 1959-1961.
- Huang, H.C., M.K. Lin, S.Y. Hwang, T.L. Hwang, Y.H. Kuo, C.I. Chang, C.Y. Ou, y Y.H. Kuo. 2013. Two anti-inflammatory steroidal saponins from *Dracaena angustifolia* Roxb. *Molecules*. 18: 8752-8763.
- Hueso-Falcon, I., I. Cuadrado, F. Cidre, J.M. Amaro-Luis, A.G. Ravelo, A. Estevez-Braun, B. de Las Heras, y S. Hortelano. 2011. Synthesis and anti-inflammatory activity of ent-kaurene derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 46: 1291-1305.
- Jin, J., Zhang, X., Z. Lu, D.M. Perry, Y. Li, S.B. Russo, L.A. Cowart, Y.A. Hannun, y Y. Huang. 2013. Acid sphingomyelinase plays a key role in palmitic acid-amplified inflammatory signaling triggered by lipopolysaccharide at low concentrations in macrophages. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*. 305: 853-867.
- Jolad, S.D., R.M. Wiedhopf y J.R. Cole. 1977a. Cytotoxic agents from *Bursera klugii* (Burseraceae) I: isolation of sapelins A and B. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 66: 889-890.
- Jolad, S.D., R.M. Wiedhopf y J.R. Cole. 1977b. Cytotoxic agents from *Bursera morelensis* (Burseraceae): deoxypodophyllotoxin and a new lignan, 5'-desmethoxydeoxypodophyllotoxin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 66: 892-893.
- Jutiviboonsuk, A., H. Zhang, G.T. Tan, C. Ma, N. Van Hung, N. Manh Cuong, N. Bunyaphatsara, D.D. Soejarto y H.H. Fong. 2005. Bioactive constituents from roots of *Bursera tonkinensis*. *Phytochemistry*. 66: 2745-2751.

- Kamhawi, S., M. Ramalho, V.M. Pham, S. Kumar, P.G. Lawyer, S.J. Turco, C. Barillas, D.L. Sacks y J.G. Valenzuela. 2004. A role for insect galectins in parasite survival. *Cell*. 119: 329-341.
- Kırmızıbekmez H., I. Atay, M. Kaiser, E. Yesilada y D. Tasdemir. 2011. In vitro antiprotozoal activity of organic and aqueous extracts of several Turkish Lamiaceae species. *Planta Medica*. 77: 107.
- Klener, P., Jr., L. Andera, P. Klener, E. Necas y J. Zivny. 2006. Cell death signalling pathways in the pathogenesis and therapy of haematologic malignancies: overview of apoptotic pathways. *Folia Biologica*. 52: 34-44.
- Kwak, E.S., A. Just, R. Whyatt y R.L. Miller. 2009. Phthalates, Pesticides, and Bisphenol-A Exposure and the Development of Nonoccupational Asthma and Allergies: How Valid Are the Links? *The Open Allergy Journal*. 2: 45-50.
- Lainson, R., R.D. Ward y J.J. Shaw. 1977. *Leishmania* in phlebotomid sandflies: VI importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character Sciences*. 199: 309-320.
- Laurenza, I., R. Colognato, L. Migliore, S. Del Prato y L. Benzi. 2008. Modulation of palmitic acid-induced cell death by ergothioneine: evidence of an anti-inflammatory action. *BioFactors*. 33: 237-247.
- Li, X., W. Xiao, J. Pu, L. Ban, Y. Shen, Z. Weng, S. Li y H. Sun. 2006. Cytotoxic ent-kaurene diterpenoids from *Isodon phyllostachys*. *Phytochemistry*. 67: 1336-1340.
- Linares, E. y R. Bye. 2008. El copal en México. *CONABIO. Biodiversitas*. 78: 1-8.
- Liu, Y., C. Zhao, H. Li, M. Yu, J. Gao, L. Wang y Y. Zhai. 2010. Cytotoxicity and apoptosis induced by a new podophyllotoxin glucoside in human hepatoma (HepG2) cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 88: 472-479.
- Lizarte Neto, F.S., D.P. Tirapelli, S.R. Ambrosio, C.R. Tirapelli, F.M. Oliveira, P.C. Novais, F.M. Peria, H.F. Oliveira, C.G. Carlotti Junior y L.F. Tirapelli. 2013. Kaurene diterpene induces apoptosis in U87 human malignant glioblastoma cells by suppression of anti-apoptotic signals and activation of cysteine proteases. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 46: 71-78.

- Lock, O. 2007. Capítulo IV. Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios. En: Castillo, G.I. y I. Martínez. 2007. Manual de fitoterapia. *Elsevier*. España. 41-64 pp.
- Lu, Z.H., Y.M. Mu, B.A. Wang, X.L. Li, J.M. Lu, J.Y. Li, C.Y. Pan, T. Yanase y H. Nawata. 2003. Saturated free fatty acids, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis by stimulation of ceramide generation in rat testicular Leydig cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 303: 1002-1007.
- Maldini, M., P. Montoro, S. Piacente y C. Pizza. 2009. Phenolic compounds from *Bursera simaruba* Sarg. bark: Phytochemical investigation and quantitative analysis by tandem mass spectrometry. *Phytochemistry*. 70(5): 641-649.
- Martínez, J.M. 2002. Actividad antiinflamatoria de *Porophyllum tagetoides*. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 47 pp.
- McDoniel, P.B. y J.R. Cole. 1972. Antitumor activity of *Bursera schlechtendalii* (burseraceae): isolation and structure determination of two new lignans. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 61: 1992-1994.
- Medina, S.J. 2000. Determinación del vigor y estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (Cactáceas) a lo largo de una cronosecuencia edáfica. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. 35 p.
- Mehta, A. y Shaha, C. 2004. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *JBiol Chem* 279, 11798–11813.
- Méndez, H.A., A.A. Hernández, M.C. López y J. Morales. 2009. Herbolaria oaxaqueña para la salud. *Instituto Nacional de las Mujeres*. Primera edición. México. 141 p.
- Monzote, L., G.M. Hill, A. Cuellar, R. Scull, y W.N. Setzer. 2012. Chemical composition and anti-proliferative properties of *Bursera graveolens* essential oil. *Natural product communications*. 7: 1531-1534.

- Myszka, H., D. Bednarczyk, M. Najder y W. Kaca. 2003. Synthesis and induction of apoptosis in B cell chronic leukemia by diosgenyl 2-amino-2-deoxy-beta-D-glucopyranoside hydrochloride and its derivatives. *Carbohydrate Research*. 338: 133-141.
- Nakanishi, T., Y. Inatomi, H. Murata, K. Shigeta, N. Iida, A. Inada, J. Murata, M.A. Farrera, M. Iinuma y T. Tanaka. 2005. A new and known cytotoxic aryltetralin-type lignans from stems of *Bursera graveolens*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 53: 229-231.
- Noguera, B., E. Diaz, M.V. Garcia, A.S. Feliciano, J.L. Lopez-Perez y A. Israel. 2004. Anti-inflammatory activity of leaf extract and fractions of *Bursera simaruba* (L.) Sarg (Burseraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 92: 129-133.
- Ochoa, P.A., Y.R. González y F. Viso. 2006. Las reacciones adversas de las plantas medicinales y sus interacciones con medicamentos. *MEDISAN*. 10(4). En línea: http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol10_4_06/san12406.htm. Consultado: 11 agosto 2012.
- Peters, C.M., S.E. Purata, M. Chibnik, B.J. Brosi, A.M. López y M. Ambrosio. 2003. *Economic Botany*. 57(4): 431-441.
- Piscopo, T.V. y A.C. Mallia. 2006. Leishmaniasis. *Postgrad. Med. J.* 82: 649-657.
- Qi, Y.L., F. Liao, C.Q. Zhao, Y.D. Lin y M.X. Zuo. 2005. Cytotoxicity, apoptosis induction, and mitotic arrest by a novel podophyllotoxin glucoside, 4DPG, in tumor cells. *Acta Pharmacologica Sinica*. 26: 1000-1008.
- Queiroga, C.L., M.C. Teixeira, B. Baesa y P. Melillo. 2007. Linalool production from the leaves of *Bursera aloexylon* and its antimicrobial activity. *Fitoterapia*. 78: 327-328.
- Robinson, G.G. y B. López. 1999. Patrones del uso de plantas medicinales entre los amuzgos del estado de Guerrero, México. *Instituto Lingüístico de Verano A.C.* 1:1-12.
- Robles C.J., A.N. Téllez, R.A. Rojas, C. Castro y T. Riveros. 2010. Efectos citotóxicos *in vitro* de extractos y fracciones de *Bursera tomentosa* (Lacq.). Triana & Planch., Burseraceae, frente a líneas celulares tumorales humanas. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 20(4): 588-593.
- Rojas-Sepulveda, A.M., M. Mendieta-Serrano, M.Y. Mojica, E. Salas-Vidal, S. Marquina, M.L. Villarreal, A.M. Puebla, J.I. Delgado y L. Alvarez. 2012. Cytotoxic podophyllotoxin type-

- lignans from the steam bark of *Bursera fagaroides* var. *fagaroides*. *Molecules*. 17: 9506-9519.
- Rojas, S.B. 2012. Variación temporal en la composición química del aceite esencial de *Bursera arida* (Rose) Standl., y validación de su actividad antimicrobiana. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 68 p.
- Rosas, L.R. 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 94 p.
- Rosas-Arreguin, P., P. Arteaga-Nieto, R. Reynoso-Orozco, J.C. Villagomez-Castro, M. Sabanero-Lopez, A.M. Puebla-Perez y C. Calvo-Mendez. 2008. *Bursera fagaroides*, effect of an ethanolic extract on ornithine decarboxylase (ODC) activity in vitro and on the growth of *Entamoeba histolytica*. *Experimental Parasitology*. 119: 398-402.
- Rzedowski, J. y Kruse, H. 1979. Algunas tendencias evolutivas en *Bursera* (Burseraceae). *Taxon*. 28: 103-116.
- Rzedowski, J. y F. Guevara-Féfer. 1992. Burseraceae. Flora del Bajío y de Regiones. Adyacentes. *Instituto de Ecología, A.C. Pátzcuaro, Michocacán*. 3: 1-46.
- Rzedowski, J., R. Medina y G. Calderón. 2004. Las especies de *Bursera* (Burseraceae) en la cuenca superior del río Papaloapan (México). *Acta Botánica Mexicana*. 66: 23-151.
- Rzedowski, J., R. Medina y G. Calderón. 2005. Inventario del conocimiento taxonómico, así como de la diversidad y del endemismo regionales de las especies mexicanas de *Bursera* (Burseraceae). *Acta Botánica Mexicana*. 70: 85-111.
- Saeed, N.M., E. El-Demerdash, H.M. Abdel-Rahman, M..M. Algandaby, F.A. Al-Abbasi y A.B. Abdel-Naim. 2012. Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 264: 84-93.
- Salacedo-Sánchez, B. 1997. Insectos precortesianos de la cueva de Coxcatlán, del Valle de Tehuacán, Puebla. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. 6-10 pp.

- Schlaepfer, L. y J.A. Mendoza. 2010. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 41(4): 18-27.
- Schonian, G., I. Mauricio y E. Cupolillo. 2010. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*?. *Trends. Parasitol.* 26: 466-469.
- Secretaría de Salud. Censo de población 2001. Casa de salud de la Comunidad. Instituto Mexicano del Seguro Social. Ayuntamiento de Coxcatlán, Puebla, Méxcio. 10 p.
- Secretaría de Salud. 2008. Programa de acción específico 2007-2010. Enfermedades transmitidas por vector. México DF. 70 p.
- Sepúlveda, J.G., H. Porta y M. Rocha. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(3): 355-363.
- Serrano, P.R. 2013. Efecto cicatrizante de *Bursera morelensis* Ramírez (Burseraceae), de San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Tesis para obtener el grado de Doctora en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. Posgrado en Ciencias Biológicas. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 121 p.
- Shanu, A., S.N. Parry, S. Wood, E. Rodas y P.K. Witting. 2010. The synthetic polyphenol tert-butyl-bisphenol inhibits myoglobin-induced dysfunction in cultured kidney epithelial cells. *Free Radical Research*. 44: 843-853.
- Sharma, U. y S. Singh. 2008. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J. Vector Borne Dis*. 45: 255-272.
- Shwe, H.H., M. Aye, M.M. Sein, K.T. Htay, P. Kreitmeier, J. Gertsch, O. Reiser y J. Heilmann. 2010. Cytotoxic steroidal saponins from the rhizomes of *Tacca integrifolia*. *Chemistry & Biodiversity*. 7: 610-622.
- Sierra, L.F. 2012. "Utilización de plantas medicinales en comunidades vulnerables del estado de Tabasco, México". En línea: <http://www.itzonaolmeca.edu.mx/difusion/INV9.PDF>. Consultado: 11 agosto 2012.
- Soong, L. 2008. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. *J. immunol*. 180: 4355-4360.

- Sosa, S., M.J. Balick, R. Arvigo, R.G. Esposito, C. Pizza, G. Altinier y A. Tubaro. 2002. Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants. *Journal of Pharmacology*. 81: 211-215.
- Sülsen, V.P., S.I. Cazorla, F.M. Frank, F.C. Redko, C.A. Anesini, J.D. Coussio, E.L. Malchiodi, V.S. Martino y L.V. Muschietti. 2007. Trypanocidal and Leishmanicidal Activities of Flavonoids from Argentine Medicinal Plants. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77(4): 654-659.
- Sülsen, V.P., F.M. Frank, S.I. Cazorla, C.A. Anesini, E.L. Malchiodi, B. Freixa, R. Vila, L.V. Muschietti y V.S. Martino. 2008. Trypanocidal and Leishmanicidal Activities of Sesquiterpene Lactones from *Ambrosia tenuifolia* Sprengel (*Asteraceae*). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52(7): 2415-2419.
- Suzuki, I., M. Kondoh, F. Nagashima, M. Fujii, Y. Asakawa y Y. Watanabe. 2004. A comparison of apoptosis and necrosis induced by ent-kaurene-type diterpenoids in HL-60 cells. *Planta Medica*. 70: 401-406.
- The Center for Disease Control (TCDC). 2008. Parasites and health: leishmaniasis. En línea: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/leishmaniasis.htm>. Consultado: 11 agosto 2012.
- Thirugnanasampandan, R., y R. Jayakumar. 2009. Cytotoxic and anticarcinogenic activity of the ent-kaurene diterpenoid, melissoidesin, from *Isodon wightii* (Benth) H. Hara. *Natural Product Research*. 23: 1499-1506.
- Timite, G., A.C. Mitaine-Offer, T. Miyamoto, C. Tanaka, J.F. Mirjolet, O. Duchamp, y M.A. Lacaille-Dubois. 2013. Structure and cytotoxicity of steroidal glycosides from *Allium schoenoprasum*. *Phytochemistry*. 88: 61-66.
- Trumbull, E.R., y J.R. Cole. 1969. Antitumor agents from *Bursera microphylla* (Burseraceae). 3. Synthesis of burseran. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 58: 176-178.
- Valiente, B.L. 1991. Patrones de precipitación en el valle semiárido de Tehuacán, Puebla, México. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. 65 p.
- Valiente-Banuet, a., A. Alcantara, P. Dávila, N. Flores-Hernández, M.C. Arismendi, J. Ortega-Ramírez y J.A. Soriano. 2000. La vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 67:25-75.

- Van Arman, C.G., A.J. Begany, L.M. Miller y H.H. Pless. 1965. Some details of the inflammations caused by Yeast and Carrageenin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 150: 328-333.
- Vasilev, N., G. Momekov, M. Zaharieva, S. Konstantinov, P. Bremner, M. Heinrich, y I. Ionkova. 2005. Cytotoxic activity of a podophyllotoxin-like lignan from *Linum tauricum* Willd. *Neoplasma*. 52: 425-429.
- Vásquez, V.M. 2012. Estudio preliminar de la actividad antibacteriana del extracto de la parte aérea de algunas especies del género *Bursera*. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 14 p.
- Velasco, C.O., B.C. Guzmán, S.B. Rivas, T.F. Aguilar y M.J. Hernández. 1994. Las leishmaniosis con especial referencia a México. *Colección de cuadernos técnicos del INDRE*. No. 4. México DF. 51 p.
- Velazquez-Jimenez, R., J.M. Torres-Valencia, C.M. Cerda-Garcia-Rojas, J.D. Hernandez-Hernandez, L.U. Roman-Marin, J.J. Manriquez-Torres, M.A. Gomez-Hurtado, A. Valdez-Calderon, V. Motilva y S. Garcia-Maurino. 2011. Absolute configuration of podophyllotoxin related lignans from *Bursera fagaroides* using vibrational circular dichroism. *Phytochemistry*. 72: 2237-2243.
- Vences, C.C. 2012. Estudio de la resina y el extracto hexánico de la corteza de *Bursera simaruba* (L.) Sarg. Determinación de la actividad de los compuestos aislados sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. 59 p.
- Von Stebut, E. 2007. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol*. 17:115-122.
- Wickramaratne, D.B., W. Mar, H. Chai, J.J. Castillo, N.R. Farnsworth, D.D. Soejarto, G.A. Cordell, J.M. Pezzuto y A.D. Kinghorn. 1995. Cytotoxic constituents of *Bursera permollis*. *Planta Medica*. 61: 80-81.
- Wilson C.G. y S.V. Jairo. 2011. Antiprotozoal Activity of α,β -Unsaturated σ -Lactones: Promising Compounds for the Development of New Therapeutic Alternatives. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 10(5): 671-680.

- World Health Organization (WHO). 2012. Leishmaniasis En línea: <http://www.who.int/tdr/diseases-topics/leishmaniasis/en/>. Consultado: 11 agosto 2012.
- Xiao, Q., D. Li y H. Liu. 2011. A flounder (*Paralichthys olivaceus*) gill cell line as in vitro acute assay system of nonylphenol cytotoxicity. *Environmental Monitoring and Assessment*. 175: 315-319.
- Yasunaka, K., F. Abe, A. Nagayama, H. Okabe, L. Lozada, E. López, E. Estrada, A. Aguilar y R. Reyes. 2005. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *Journal of Pharmacology*. 97: 293-299.
- Yen, C.H., C.K. Sun, S. Leu, C.G. Wallace, Y.C. Lin, L.T. Chang, Y.L. Chen, T.H. Tsa, Y.H. Kao y P.L. Shao. 2012. Continuing exposure to low-dose nonylphenol aggravates adenine-induced chronic renal dysfunction and role of rosuvastatin therapy. *Journal of Translational Medicine*. 10: 147.
- Zacarés, L. 2008. Nuevas aportaciones al metabolismo secundario del tomate. Identificación y estudio de moléculas implicadas en la respuesta a la infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Tesis. Universidad Politécnica de València. España. 164 p.
- Zhang, X., H. Xiong y L. Liu. 2012. Effects of taraxasterol on inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*. 141: 206-211.
- Zhu, Y., S. Schwarz, B. Ahlemeyer, S. Grzeschik, S. Klumpp, y J. Krieglstein. 2005. Oleic acid causes apoptosis and dephosphorylates Bad. *Neurochemistry International*. 46: 127-135.
- Zuñiga, B., P. Guevara-Fefer, J. Herrera, J.L. Contreras, L. Velasco, F.J. Perez y B. Esquivel. 2005. Chemical composition and anti-inflammatory activity of the volatile fractions from the bark of eight Mexican *Bursera* species. *Planta Medica*. 71: 825-828.

Apéndices

Apéndice 1. Género *Lutzomyia*.

Los flebotómíneos son dípteros pequeños hematófagos holometábolos reconocidos como insectos vectores de los agentes etiológicos de la leishmaniosis, estomatitis vesicular, bartonelosis de importancia en la salud pública y veterinaria. Las especies de *Lutzomyia* tienen actividad crepuscular y nocturna (desde las 16:00 hasta las 07:00 horas del día siguiente), aunque también pueden activarse durante el día cuando se ingresa a los lugares donde ellos reposan. Ambos sexos vuelan planeando en desplazamientos, generalmente cortos. Poseen un ciclo biológico terrestre no sometido a corrientes de aire; afectan su actividad factores relacionados con el calor o el frío y las temporadas de lluvia o sequía. Las hembras muerden cuando la temperatura oscila entre 25 y 28 °C y la humedad se encuentra entre 88 y 95% aunque esto puede variar, según la especie y la adaptación de estas al medio. Las hembras buscan lugares ricos en nutrientes para realizar su ovoposición, que comúnmente puede ser de 40 huevos por ovoposición, esto para las colonias de laboratorio; desarrollándose en larvas entre cuatro a 20 días (Almanza y Martínez, 2008).

Estadios

Los conocimientos sobre los estadios inmaduros de las especies de *Lutzomyia* se derivan de individuos adaptados y criados en el laboratorio. Las variables ambientales óptimas son: 80-85% de humedad relativa, 21-27 °C de temperatura; en general presentan 4 estadios que son: huevo, larva, pupa y adulto.

Huevo

Son de forma elíptica y alargados, miden entre 0.3-0.5 mm de largo y 0.1 mm de ancho (Figura 9 A). Tardan entre 30 a 60 días antes de eclosionar. En el momento de la ovoposición son de color blanco, transcurrido un tiempo adquieren una coloración oscura. Son frágiles y les afectan diversos factores ambientales (Almanza y Martínez, 2008).

Larva

El cuerpo es de color blanco, mientras que la cabeza, el lóbulo caudal y la seta caudal son de color café claro y pueden llegar a medir entre 0.4 y 0.6 mm. El exoesqueleto craneal no muestra una sutura dorsal, los primeros segmentos antenales son largos; los segundos son casi de la misma medida pero muestran una forma enroscada simulando un cabello (Figura 9 B). Durante el segundo estadio el color es muy similar al primero y se pueden visualizar cuatro setas caudales con un tamaño que alcanza al doble de la longitud del cuerpo (Figura 9 C). Para el estadio tres los cambios

no son tan notorios, solo se puede observar un cambio en el tamaño del cuerpo (Figura 9 D). En el estadio cuatro (Figura 9 E) el tamaño del cuerpo alcanza entre 2.2 y 2.5 mm de longitud del cuerpo, dos setas con una base prominente y redonda que se ubican a cada lado de la cabeza; también presenta mandíbulas claramente distinguibles; en el tórax se ubican los órganos locomotores, algunos poseen seudópodos, de igual manera tienen unas largas sedas en la parte caudal y se encuentran en un solo número par en el primer estadio y en dos pares en los siguientes estadios (Almanza y Martínez, 2008).

Pupa

Puede llegar a medir 3 mm de largo, son de color blanco al principio de la metamorfosis y luego se tornan oscuras al momento de eclosionar (Figura 9 F). El periodo pupal puede durar entre 7 y 8 días (Almanza y Martínez, 2008).

Adulto

Llega a medir entre 1 y 4 mm de longitud; presenta patas largas y finas, siendo el tercer par más largos que los otros dos, en el tórax se insertan las alas lanceoladas que se mantiene levantadas en reposo formando un ángulo de 90 grados entre sí; todo el cuerpo está cubierto de pelos (Figura 9 G). Los machos se diferencian de las hembras por las estructuras anatómicas presentes en los últimos segmentos abdominales que constituyen la genitalia (Almanza y Martínez, 2008).

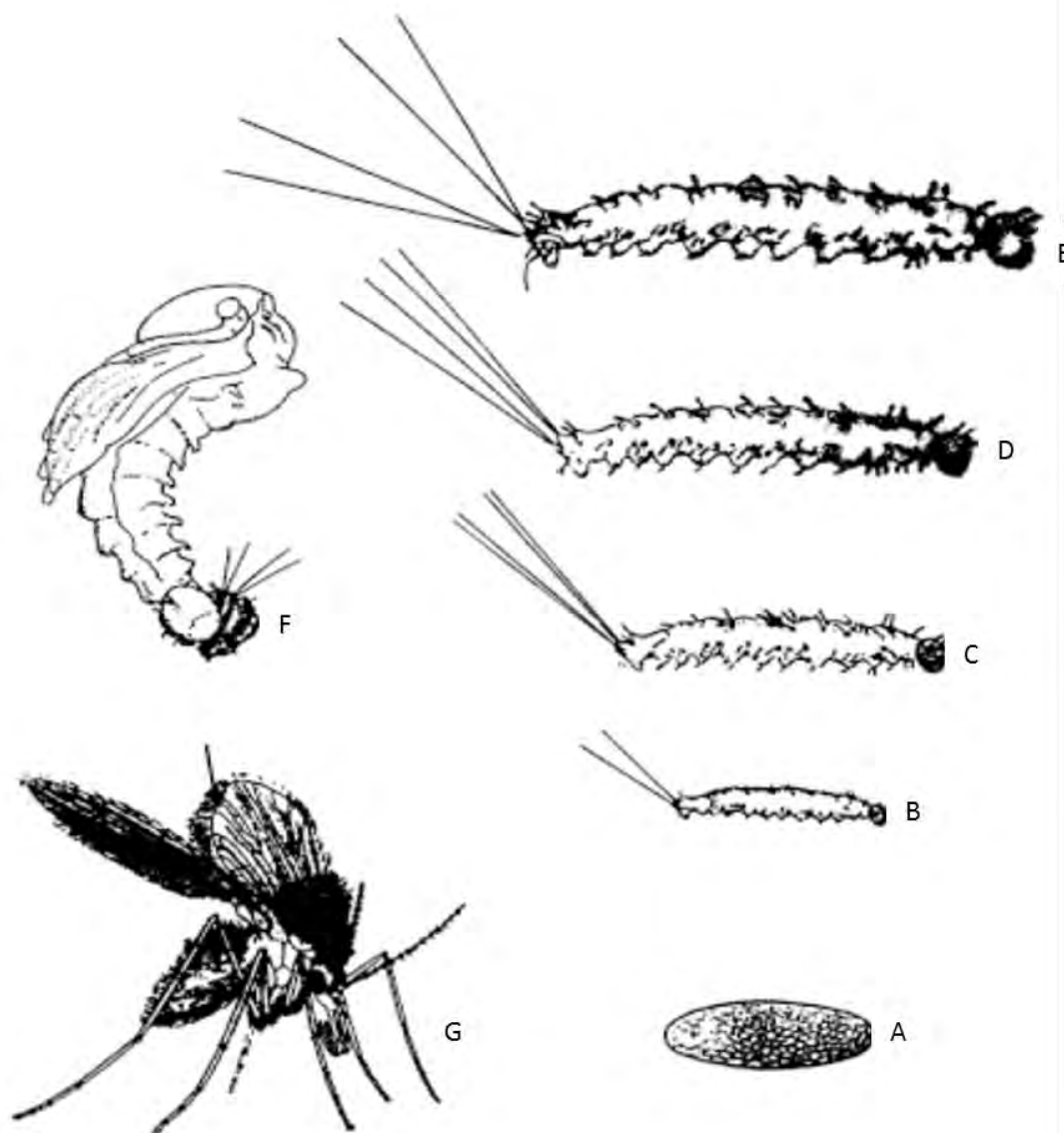


Figura 11. Estadios del ciclo de vida de *Lutzomyia*. Se muestran las fases de A) huevo; B) larva uno; C) larva dos; D) larva tres; E) larva cuatro; F) pupa y G) adulto.

Apéndice 2. Familia Burseraceae (Rzedowski y Guevara-Féfer, 1992).

Son árboles o arbustos, provistos de resina y a menudo de aceite esencial; hojas alternas, por lo general imparipinnadas, algunas veces bipinnadas, trifoliadas o reducidas a un sólo foliolo, los foliolos laterales opuestos, comúnmente sin estípulas; inflorescencias axilares o terminales, básicamente cimosas, pero a menudo paniculadas, pseudoracimosas o fasciculadas, o bien las flores solitarias; flores casi siempre unisexuales (las plantas suelen ser dioicas o plígamo-dioicas), pequeñas, actinomorfas, 3 a 5 (6)-meras; cáliz más o menos cupiliforme, dividido en 3 a 5 (6)

segmentos connados o casi libres, valvados, contortos o abiertos en botón; pétalos 3 a 5 (6), rara vez ausentes, libres o en pocos casos unidos para formar un tubo, contortos o valvados en botón; estambres dispuestos en 1 o 2 vertilicios, del mismo número que las divisiones del cáliz o más frecuentemente dos veces más numerosas, por lo general estériles en las flores femeninas (que a menudo dan la apariencia de ser hermafroditas), filamentos por lo común libres, insertos debajo o rara vez sobre el disco, anteras biloculares, longitudinalmente dehiscentes, disco anular o cupuliforme, a veces inconspicuo; pistilo1, el ovario súpero, 2 a 5-locular y de otros tantos carpelos, placentación axilar, óvulos 2 por cada lóculo, estilo corto o casi obsoleto, estigama 2 a 5-lobado; fruto más o menos drupáceo, el pericarpo por lo general carnosos, pero a menudo finalmente dehiscente por medio de 2 a 5 valvas, huesos (endocarpios lignificados) 1 a 5, casi siempre monospermos y con frecuencia cubiertos por un pseudoarilo; semillas sin endosperma, embrión por lo común derecho. Familia de unos 20 géneros y más de 600 especies, distribuidas en las regiones calientes del mundo, con mayor diversidad en América tropical, en el norte y en el sur de África y en Malasia.

Apéndice 3. Zona de colecta.

La especie *B. aptera* se colectó en el poblado de San Rafael, municipio de Coxcatlán, que se localiza al sureste de Tehuacán, en el valle de Tehuacán-Cuicatlán, entre 18°12' y 18°14' de latitud norte, así como 97°07' y 97°09' de longitud oeste (Figura 10), con un rango de altitud de 957 a 1400 msnm.

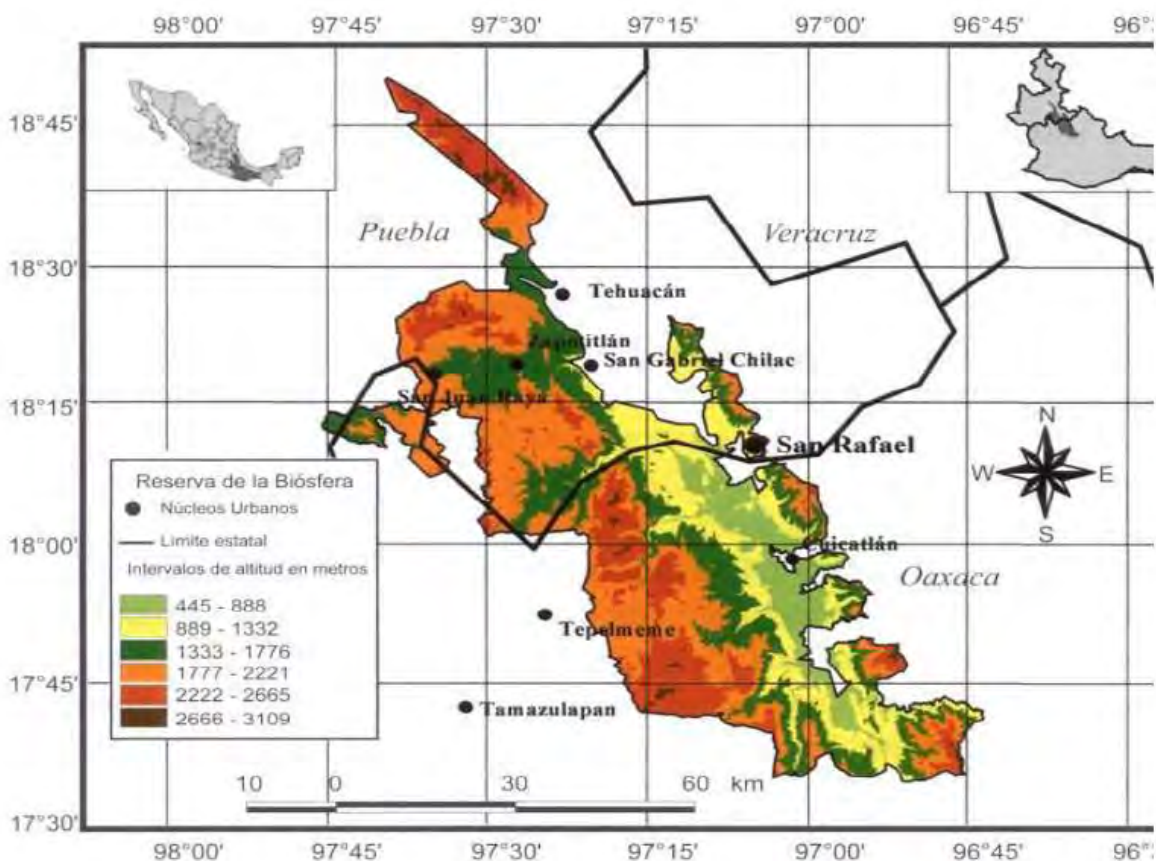


Figura 12: Ubicación geográfica del poblado de San Rafael Coxcatlán, Puebla.

Clima

El clima es de tipo Bs (h') W'' (w) de acuerdo con la clasificación de Koeppen, modificado por García (1981), el cual corresponde a un tipo seco o árido con lluvias en verano y temperatura media anual de 22°C, que varía entre 25°C en abril y mayo, y 18°C en enero (Medina, 2000). Valiente (1991) calcula una precipitación anual de 364.6 mm para la zona; cerca de los 386.57 mm registrada en 1988 en la estación climática Tilapa, situada a 3.25 Km al sur de la zona de estudio. En 1998 los 763.7 mm de precipitación duplicaron el promedio anual, concentrándose en los meses de junio a noviembre.

Hidrografía

El sureste de Puebla se encuentra irrigado por el Río Salado. La parte sur del Valle de Tehuacán-Cuicatlán es drenado por el Río Grande o Tomellin, que fluye al norte desde Oaxaca; uniéndose cerca de Quitepec los dos forman el Río de Santo Domingo, el cual corta la Sierra Madre de Oaxaca en dirección este y eventualmente se vuelve el Río Papaloapan. El Río Tehuacán encuentra su

camino al oeste del Cerro Colorado, para entrar en el Valle de México cerca de San Diego, Chalma. Este pequeño río el cual se convierte en el Río Salado, se une por un número de cortas ramificaciones hasta alcanzar la Sierra Madre de Oaxaca en el noreste (Salacedo-Sánchez, 1997).

Edafología

El origen del suelo data del periodo Cuaternario, era Cenozoica. Los suelos en las regiones están pobremente desarrollados y pueden ser divididos en dos grandes tipos: regosoles, predominantemente calcáreos y regosoles éutricos y xerosoles, predominantemente xerosoles háplicos.

Vegetación

La vegetación predominante es un bosque tropical caducifolio, donde *Escontria chiotilla* (F.A.C. Weber) Rose y *Pachycerus weberi* (J. Couleter) Backeberg son particularmente abundantes (Valiente-Banuet *et al.*, 2000).

Fernández (1999), reconoció por nivel topográfico los siguientes tipos de vegetación en San Rafael: Cordonal de *P. weberi*, que se caracteriza por el predominio de cactáceas columnares (cardones).

Chiotillal de *E. chiotilla*, en el nivel próximo al cauce del río, sobre niveles de terreno de 0.7 a 1.5 m por encima del nivel basal de esta región, con una alta densidad arbustiva.

Cuajiotal con especies dominantes como *Bursera morelensis* Ramírez, *Mimosa polyantha* (Brandegge), *Fouqueiria formosa* (Kunth), así como arbustos y hierbas como *Sanvitalia fructicosa* (Helms), localizada aproximadamente a 1.5-3.5 m por encima del nivel basal.

Fouqueria con especies dominantes como *F. formosa*, *Bursera aptera* (Ramírez), *M. polyantha*, *Ceiba parvifolia* (Rose), *Manihotoides pasifora* (Brandegge), *Senna wisliseni* (DC), *M. Luisiana* (Brandegge) y *S. fructicosa*.

En un estudio etnobotánico realizado en San Rafael (Rosas, 2003), se determinó un total de 374 especies pertenecientes a 249 géneros y 87 familias botánicas, de las cuales 368 especies fueron registradas con uno o más usos (18% son usadas como plantas medicinales). Las familias con un mayor número de especies fueron Ateraceae, Cactaceae, Solanaceae, Araceae y Euphorbiaceae, que corresponden a las familias más representativas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

Población

La comunidad de San Rafael, es relativamente joven. Se fundó a principios del siglo XX y cuenta con 298 habitantes (151 mujeres y 147 hombres) (Secretaría de Salud, 2001). La mayor parte de la población actual es nativa de San Rafael y la actividad económica más importantes es la agricultura, cuyo principal ingreso proviene del cultivo de la caña de azúcar. También se dedican a la cría de ganado caprino, la recolección de frutos, semillas, leña y madera para diversos fines (Rosas, 2003).

Apéndice 4. Citometría deFlujo.

1. Inducir apoptosis en las células usando el método deseado. Preparar un control negativo e incubar las células en ausencia del agente inductor.
2. Cosecha de las células después de la incubación y lavar con PBS.
3. Preparar 1X buffer de unión a anexina. Por ejemplo para 10 ensayos, agregar 1 mL 5X buffer de unión a anexina (componente C) con 4 mL de agua desionizada.
4. Preparar una solución de trabajo de 100 µg/mL de PI por dilución 5 µL sobre 1 mg/mL de solución stock de PI (componente B) en µl 1X de buffer de unión a anexina.
5. Recentrifugar las células lavadas (del paso 2) deseche el sobrenadante y resuspenda las células en 1X buffer de unión a anexina.
6. Agregue 5µL de FITC anexina V (componente A) y 1 µL de la solución de trabajo de PI 100 µg/mL (preparado en el paso 4) para cada 100 µL de células en suspensión.
7. Incubar las células a temperatura ambiente por 15 minutos.
8. Después del periodo de incubación, agrega 400 µL de 1X buffer de unión a anexina, mezclar suavemente y mantener las muestras en hielo.
9. Tan pronto como sea posible, analice las células teñidas por citometría de flujo, midiendo la emisión de fluorescencia entre 530 nm-575 nm. La población debe separarse en tres grupos: células vivas se mostrarán solo a bajos niveles de fluorescencia, células apoptóticas muestran fluorescencia verde y células muertas muestran fluorescencia roja y verde.

Apéndice 5. Tinción de Cristal Violeta (Badisa *et al* 2003).

1. Se elimina el medio de la placa de cultivo de 46 pozos sacudiéndola, después de lo cual se lava dos veces suavemente con PBS 1X estéril.
2. Con 50 μ L de glutaraldehido 1.1% por 5 minutos se fijan las células.
3. Se retira el resto de glutaraldehido y se lava suavemente dos veces con PBS 1X estéril y se agregan 100 μ L de solución de Cristal Violeta a todos los pozos.
4. Se incuba de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se elimina el exceso de colorante sacudiendo la placa.
5. Nuevamente se lava la placa con solución salina o PBS 1X. con 50 μ L de ácido acético al 10% se solubilizan las células y se procede a leer en un lector de ELISA a una longitud de onda de 595 nm.