



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGÍA

**Efecto amebicida de los extractos metanólicos de tres especies del género**

***Bursera* contra *Naegleria fowleri***

Tesis

Que para obtener el Título de Biólogo

P R E S E N T A

Rodríguez Canales Mario

Asesor: 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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy, Dra. Ma. Margarita Canales Martínez, Dra. Patricia Bonilla Lemus, M. en C. Luis Antonio Hernández González y Dr. Cesar Mateo Flores Ortiz por sus revisiones y observaciones para la redacción de mi tesis.

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), con los proyectos: PAPIIT IN213713, IN211614

## **DEDICATORIAS**

A mis padres, mis guías en todos los sentidos, tanto en las cuestiones académicas como aquellas fuera de la escuela. Por siempre apoyarme incondicionalmente, por no dejarme caer, por preocuparse y siempre querer lo mejor para mí, por quererme y tenerme paciencia, y por todo lo que han hecho y dejado de hacer por mí, les estoy eternamente agradecido y no creo poder pagárselos nunca. Los amo

A mis abuelitas, por todo el cariño que me han dado toda la vida. Las quiero como si fueran mis segundas madres.

A mi hermano Marco, porque a pesar de las grandes diferencias que tenemos, siempre ha estado cerca, y en los momentos difíciles siempre ha sido un gran apoyo para mí.

A mis tíos y mis primos, por creer en mí, por sus palabras de aliento y por ayudarme siempre a salir adelante.

A todos mis amigos, sin excluir a ninguno, pero en especial a Michael, Óscar A., Perla, Mariela, Jossimar, Laurel y Mirna por los buenos momentos que hemos pasado. Han sido una parte fundamental en mi vida y en este logro mucho tienen que ver ustedes. Los quiero y los estimo mucho a todos.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
Amibas de vida libre (AVL) .....	3
<i>Naegleria fowleri</i> .....	5
Ciclo de vida .....	5
Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MEAP) .....	7
Tratamiento .....	9
Plantas medicinales .....	10
Metabolitos secundarios .....	11
Antecedentes .....	12
<b>OBJETIVOS</b> .....	13
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	14
Material Biológico .....	14
Obtención de los extractos metanólicos .....	15
Reactivación de la virulencia de <i>N. fowleri</i> .....	15
Curva patrón .....	15
Efecto <i>in vitro</i> de los extractos de <i>B. aptera</i> , <i>B. arida</i> y <i>B. morelensis</i> sobre <i>N. fowleri</i> .....	16
Prueba de citotoxicidad de los extractos metanólicos de <i>B. aptera</i> , <i>B. arida</i> y <i>B. morelensis</i> .....	17
Ensayos de apoptosis .....	18
Caracterización química de los extractos metanólicos de <i>B. aptera</i> , <i>B. arida</i> y <i>B. morelensis</i> .....	19
<b>RESULTADOS</b> .....	20
Rendimiento de los Extractos .....	20
Evaluación del efecto <i>in vitro</i> de los extractos metanólicos de <i>B. aptera</i> , <i>B. arida</i> y <i>B. morelensis</i> . .....	20
Evaluación de la citotoxicidad de los extractos metanólicos de <i>B. aptera</i> , <i>B. arida</i> y <i>B. morelensis</i> sobre la línea de macrófagos P388 de ratón leucémico .....	22
Evaluación del efecto apoptótico de los extractos metanólicos de <i>B. aptera</i> , <i>B. arida</i> y <i>B.</i> <i>morelensis</i> sobre <i>N. fowleri</i> .....	23
Caracterización química de los extractos metanólicos de <i>B. aptera</i> , <i>B. arida</i> y <i>B. morelensis</i> .....	25
<b>DISCUSIÓN</b> .....	29
<b>CONCLUSIONES</b> .....	32

<b>REFERENCIAS</b> .....	34
<b>APÉNDICE 1</b> .....	45
<b>APÉNDICE 2</b> .....	48

## RESUMEN

Las especies del género *Bursera* tienen una gran diversidad en México y son de gran importancia dentro de la medicina tradicional mexicana. En investigaciones previas, se ha demostrado que los extractos de las cortezas de las especies *B. arida*, *B. morelensis* y *B. aptera* tienen una gran actividad antibacteriana y antifúngica.

La meningoencefalitis amebiana primaria, es una enfermedad producida por la amiba de vida libre *Naegleria fowleri* y es considerada actualmente como un problema de salud pública. El único agente anti-*Naegleria* del que se tiene evidencia, es el antifúngico Anfotericina B, el cual es eficiente contra la amiba pero produce efectos secundarios que pueden ser letales., por lo que la búsqueda de alternativas para el tratamiento de esta enfermedad es de gran importancia.

Al estar comprobado que los extractos de las cortezas de *B. aptera*, *B. morelensis* y *B. arida*, tienen actividad antifúngica, se cree que pueden ser efectivos contra *N. fowleri*, por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto amebicida de los extractos metanólicos de *B. aptera*, *B. morelensis* y *B. arida* sobre *N. fowleri*.

Los extractos fueron obtenidos mediante la técnica de maceración. El efecto *in vitro* sobre *N. fowleri* y la citotoxicidad de los mismos, fueron evaluados mediante la técnica de viabilidad celular de cristal violeta. Se evaluó el efecto apoptótico de los extractos y se determinó la composición química de estos mediante HPLC y GC-MS.

Las 3 especies tuvieron efecto *in vitro* sobre *N. fowleri*, siendo *B. arida* la que obtuvo la menor  $CL_{50}$ . *B. morelensis* no presentó efecto citotóxico, mientras que los otros 2 extractos sí. Los 3 extractos presentaron un efecto apoptótico, siendo *B. morelensis* la especie con mayor porcentaje de células en apoptosis. La composición química de los 3 extractos resultó ser diferente.

Se ha reportado que algunos de los compuestos encontrados en los extractos, presentan actividad biológica, como propiedades medicinales, antibacterianos, antimicóticos, antiparasitarios, anti-inflamatorios, proapoptóticos y anticancerígenos entre otras. Es

probable que la actividad de los extractos sobre *N. fowleri*, se deba a la presencia de algunos de estos compuestos.

## INTRODUCCIÓN

### **Amibas de vida libre (AVL)**

Las amibas de vida libre (AVL) son protozoos que se encuentran en todo tipo de ambiente y su distribución es cosmopolita, ocupando un lugar importante en la cadena alimenticia y las comunidades naturales donde hay agua, alimentándose de bacterias, hongos, algas y otros protozoos [1,2].

Viven principalmente donde hay agua, pudiéndoseles encontrar en estanques, ríos, arroyos, lagos, piscinas, sistemas de tratamiento de agua residual, corrientes subterráneas e incluso agua entubada y embotellada [2,3]. Las temperaturas elevadas favorecen su proliferación, principalmente de las AVL potencialmente patógenas, por lo que se les encuentra comúnmente en aguas termales, naturales y en aguas contaminadas térmicamente por descargas industriales [4,5].

Las AVL son organismos unicelulares, asexuales y de dimensiones variables. Pueden estar desnudas o cubiertas por una testa y se desplazan mediante pseudópodos, los cuales también utilizan para fagocitar [6]. Su mecanismo de protección ante los cambios ambientales es la formación de quistes, de esta manera pueden sobrevivir a la ausencia de humedad, cambios extremos de temperatura, presión, pH, falta de oxígeno, acumulación de desechos metabólicos, escasez de alimento o algún otro factor adverso [7,8].

Las AVL pueden llegar a los cuerpos de agua, alimentos y heridas superficiales en forma de quiste. En los cuerpos de agua, viven adheridas a partículas flotantes, en la columna de agua o en sedimentos, o bien pueden desprenderse de ellos en forma de aerosoles. Los cuerpos de agua que tienen temperaturas estables por arriba de los 35°C son lugares ideales para la sobrevivencia y el desarrollo de las especies patógenas [9].

Al ser habitantes comunes de los suelos, juegan un papel importante dentro del ciclo de los nutrientes, ya que estimulan el incremento en la tasa de transformación bacteriana del fósforo y del nitrógeno a formas aprovechables para las plantas, lo que produce una mayor producción de biomasa vegetal [10,11].

En su forma de quiste, las amibas pueden ser acarreadas por el viento a través de grandes distancias, incluso entre continentes [12].

La distinción entre los protozoos parásitos y los de vida libre está claramente definida, quedando fácilmente dentro de una categoría o de otra. Algunas de las AVL son muy inusuales, debido a que cruzan la línea que separa a los 2 grupos, e incluso son igual de destructivas como cualquier otro protozoo parásito clásico. A diferencia de los parásitos obligados, estos protozoos no están bien adaptados para el parasitismo, ya que ellos casi invariablemente matan a sus hospederos en lugar de evolucionar, como muchos otros parásitos, a un estado en el cual sean capaces de obtener los nutrientes necesarios del huésped sin llegar a causar la muerte del mismo [13].

A las amibas que pueden vivir en el ambiente y como endoparásitos, se les ha dado el término de anfizoicos (del griego *amphi*, que significa “ambos lados”) [14,15].

Las AVL raramente infectan al ser humano, sin embargo, ya sea que el individuo se encuentre en condiciones normales o inmunocomprometido, el desarrollo de una infección amebiana del sistema nervioso central, es casi siempre fatal [16].

Entre los muchos géneros de AVL que existen en la naturaleza, solamente los miembros de 4 géneros están asociados con enfermedades humanas: *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Sappinia* y *Naegleria* [17]. Estos organismos son únicos, ya que a diferencia de otros protozoos patógenos, se desconocen vectores, estadios que se presenten sólo cuando el humano sea portador y porque hay una relación muy pequeña entre estados pobres de sanidad y su transmisión [18].

Hay 4 síndromes clínicos causados por las AVL antes mencionadas que afectan a los humanos: 1) Queratitis amebiana, 2) Encefalitis amebiana granulomatosa, 3) Enfermedad amebiana granulomatosa diseminada y 4) Meningoencefalitis amebiana primaria, siendo esta última la enfermedad producida por *Naegleria fowleri* [16].

De las aproximadamente 40 especies de amibas pertenecientes al género *Naegleria*, solamente la especie *N. fowleri*, produce la Meningoencefalitis amebiana primaria [19]; aunque se han encontrado cientos de infecciones producidas por estas amibas, sólo unas cuantas personas han sobrevivido, a causa del retraso en el diagnóstico producido por la falta de conocimiento y al tratamiento empírico, que se debe a la falta de un tratamiento óptimo [20].

### ***Naegleria fowleri***

*N. fowleri* es un ameboflagelado de la familia Vahlkampfiidae [21] que ha sido aislada de muestras de albercas con agua clorada, lagos, aguas termales, depósitos de agua domésticos, aguas contaminadas térmicamente, aguas residuales, suelo, aire, sistemas de humidificación, cultivos celulares y de las cavidades nasales y garganta de humanos [7].

Son más susceptibles que otras AVL a las condiciones ambientales, por ejemplo a la desecación y a los niveles de pH extremos, y no pueden sobrevivir en agua marina, sin embargo son termotolerantes, siendo capaces de sobrevivir a temperaturas mayores a 45°C [13].

Esta especie puede invadir a animales y al ser humano, siendo el trofozoíto su estadio invasivo, y tiene un periodo de incubación variable entre los dos días y las tres semanas, dependiendo del tamaño del inóculo y la virulencia de las amibas [22].

La inhalación de agua, o más raramente, de aire conteniendo amibas, pone en contacto a estos microorganismos con el neuroepitelio olfatorio, constituyéndose de esta manera la ruta de diseminación de las amibas a otras partes del encéfalo y del espacio subaracnoideo vascular [23,24].

### **Ciclo de vida**

*N. fowleri* consta de tres estadios durante su ciclo de vida en el ambiente: [17,25]:

- Trofozoíto, o forma vegetativa, que es la fase del ciclo en la que se alimenta y reproduce.
- Quiste, que es la forma de resistencia.
- Flagelado, estadio transitorio que no se alimenta, ni se multiplica y después de un tiempo regresa a la fase trófica [7,13].

A los trofozoítos se les conoce como amibas limax, y son alargadas y se mueven de manera unidireccional por medio de un pseudópodo eruptivo, llamado lobópodo; el núcleo posee un denso y esférico nucléolo central o cariosoma y una membrana nuclear sin cromatina granular. El trofozoíto de *N. fowleri* en movimiento mide en promedio 22

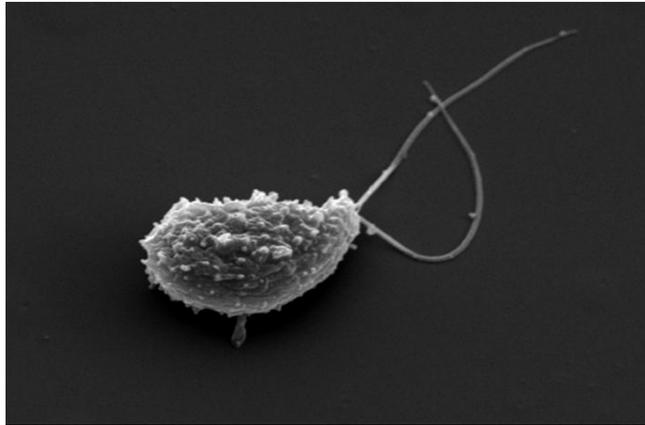
$\mu\text{m}$  de longitud; en forma inactiva, redondeada, mide de 9 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 1) [26]. La reproducción es por fisión binaria de este estadio [24].



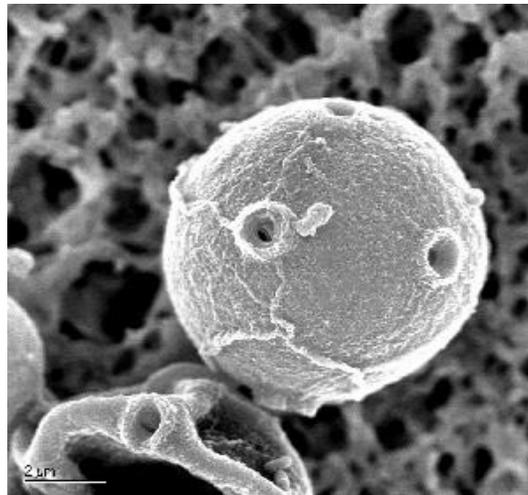
**Figura 1.- Trofozoíto de *Naegleria fowleri***

El trofozoíto se transforma en el flagelado, generalmente con dos flagelos en la región anterior (Figura 2), cuando la concentración iónica del medio ambiente cambia [17]. Tiene una longitud entre 10 a 16  $\mu\text{m}$ . Se cree que el flagelado juega un papel en la dispersión de las amibas en su hábitat natural de suelo o agua.

El quiste de *N. fowleri* (Figura 3) es su estructura de resistencia; es esférico, con un diámetro de 7 a 15  $\mu\text{m}$  [25]. El trofozoíto se transforma en quiste cuando el alimento es escaso y/ó cuando las condiciones de crecimiento se vuelven adversas [13].



**Figura 2.-** Estadio flagelar de *Naegleria fowleri*



**Figura 3.-** Quiste de *Naegleria fowleri*

*N. fowleri* es un microorganismo de importancia médica, debido a que es el agente causal de la meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP).

### **Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MEAP)**

La MEAP es una enfermedad aguda, rápidamente progresiva y fatal, y puede llegar a producir la muerte del ser humano en una semana después de la infección [27]. La mayoría de los casos, ocurren en los meses calurosos de verano, en los que grandes grupos de personas pueden ser encontrados nadando, buceando o realizando alguna actividad acuática en lagos, albercas mal cloradas y otros cuerpos de agua en los que la ameba pueda ser encontrada [28].

*N. fowleri* no es considerada como un patógeno oportunista, generalmente la infección (MEAP) se presenta en niños y adultos jóvenes inmunológicamente sanos [17,28].

La infección es adquirida por realizar actividades en cuerpos acuáticos como los mencionados anteriormente. Los trofozoítos, los quistes, e incluso los flagelados [29] presentes en el agua, entran a las fosas nasales, penetran el epitelio nasal y migran a través de los nervios olfatorios al cerebro [30]. En los bulbos olfatorios, *N. fowleri* induce una intensa respuesta inflamatoria, asociada con necrosis lítica y hemorragias [28]. Esto se debe en gran parte, a la formación de amebostomas (apéndices como ventosas) que comen y destruyen los tejidos [31].

Los pacientes que presentan MEAP son difíciles de diagnosticar debido a que no hay una característica clínica que distinga la meningoencefalitis amebiana de otras, como es el caso de la meningoencefalitis bacteriana [20,28,32]; por lo tanto, la atención clínica y el conocer si el paciente ha estado expuesto a cuerpos de agua dulce son importantes [28].

Los signos y síntomas de la MEAP consisten en presión intracraneal elevada (náusea, vómito en proyectil y fotofobia), cefalea intensa, irritación de la mucosa nasal, fiebre, datos de irritación meníngea (rigidez de nuca) y encefalitis. El curso clínico se caracteriza por confusión mental, en algunos casos crisis convulsivas; pérdida de apetito, visión doble y/o borrosa, trastornos del gusto, del olfato y alucinaciones, coma profundo y finalmente la muerte. La mayoría de los pacientes mueren dentro de la primera o segunda semana después de la aparición de los primeros síntomas, dependiendo del manejo y resistencia del paciente, así como la virulencia de las amibas [24].

Durante la MEAP los hemisferios cerebrales y el cerebelo muestran edema y una gran congestión. El bulbo olfatorio y los córtices orbitofrontales presentan necrosis y hemorragia. El exudado fibrinopurulento es usualmente escaso. Histológicamente los trofozoítos se encuentran rodeando los vasos sanguíneos dentro de los espacios de Virchow-Robin con un número reducido de leucocitos polimorfonucleares. Generalmente no se encuentran quistes en los tejidos [33].

El diagnóstico definitivo de la MEAP está basado en la detección al microscopio óptico de los trofozoítos en muestras de líquido cefalorraquídeo o en tejido cerebral. La movilidad de los trofozoitos se observa a través del microscopio de luz, de campo oscuro o de contraste de fases. Las muestras teñidas con Giemsa o Wright muestran la forma típica del trofozoito. El diagnóstico también puede realizarse utilizando técnicas inmunohistoquímicas como inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia con anticuerpos anti-*Naegleria* [34].

La MEAP es una enfermedad fulminante y casi invariablemente fatal en cuestión de días; como la enfermedad tiene un tiempo de incubación corto y sigue su curso clínico entre siete y diez días, el rápido diagnóstico y la iniciación de un tratamiento antimicrobiano son críticos para que el paciente sobreviva [30].

### **Tratamiento**

Hasta el momento no existe un tratamiento satisfactorio para la MEAP. Los antibióticos usados para tratar la meningitis bacteriana no son efectivos en una infección por *Naegleria*, al igual que los fármacos que se usan generalmente como antiamebícos. La anfotericina B (AMB), una droga considerablemente tóxica, es el único agente anti-*Naegleria* del cual se tiene evidencia de su efectividad en el tratamiento de esta infección [35].

Esta droga es un polieno que actúa sobre la membrana plasmática perturbando su permeabilidad selectiva y causando poros y por ende, fuga de los componentes celulares [36]. Cuando la amiba es expuesta a la AMB, se redondea y es incapaz de formar pseudópodos.

El problema del uso de la AMB, no radica entonces en su eficacia, sino en su alta toxicidad, ya que se ha reportado que produce daño renal principalmente, el cual generalmente resulta irreversible y puede evolucionar a una insuficiencia renal, además de que ocasiona otros daños, como insuficiencia hepática aguda y alteraciones hematopoyéticas [37].

Hasta 2011, solamente hay 235 casos reportados en el mundo de MEAP, por lo que la enfermedad es considerada rara; sin embargo, es casi siempre fatal, sólo cerca del 5% de los pacientes han logrado sobrevivir, y afecta principalmente a niños y jóvenes, por lo que es un problema de seriedad para la salud pública [32]. Tomando en cuenta lo anterior, se hace necesaria la búsqueda de nuevas combinaciones de fármacos o incluso la prueba de nuevos compuestos que ofrezcan una alternativa al uso de la AMB tanto en eficacia como en la disminución de los efectos colaterales.

Una de las posibilidades para encontrar nuevos tratamientos para aliviar la infección por *N. fowleri* se puede encontrar en la medicina tradicional, sobre todo si se toma en cuenta que el uso de las plantas medicinales para combatir ciertas enfermedades, ofrecen una disminución de los efectos colaterales además de ser productos que están al alcance de un gran porcentaje de la población mundial [38].

### **Plantas medicinales**

La medicina tradicional es una realidad presente en todo el mundo. Como su nombre lo indica, forma parte del patrimonio cultural de cada país y emplea prácticas que se han transmitido de una generación a otra desde antes del desarrollo de nuestra medicina actual [39].

Las plantas medicinales son el principal recurso terapéutico de la medicina tradicional mexicana. La diversidad biológica y cultural que caracteriza a nuestro país, se funden en una variedad de conocimientos y prácticas populares que es necesario valorar, rescatar y desarrollar científicamente en beneficio de la salud [40].

Las plantas medicinales según definición de la Organización Mundial de Salud es “toda especie vegetal en la que toda o una parte de la misma está dotada de actividad farmacológica”. La actividad biológica reside en uno o un conjunto de compuestos químicos que se encuentran en los tejidos de la planta llamados metabolitos secundarios [41].

## **Metabolitos secundarios**

Los metabolitos secundarios que producen las plantas, en su mayoría no participan directamente en el crecimiento y desarrollo de esta [42]. Algunos de ellos, son responsables de los olores y colores característicos de los vegetales; otros proporcionan a la planta sus virtudes culinarias, medicinales o tóxicas [43]. Muchos de estos metabolitos, se sabe que son atractivos de polinizadores, algunos otros confieren características alelopáticas, otros protegen a las plantas contra herbívoros, de infecciones microbianas, etc.; no se distribuyen de manera uniforme por toda la planta, pues se concentran preferentemente en las flores, hojas o raíces, aunque en algunas ocasiones también se pueden encontrar contenidos en semillas, frutos y corteza [44].

En general, las características de los metabolitos secundarios son:

- No tener funciones metabólicas directas aparentes
- Ser importantes para la supervivencia e interacción con el entorno
- Presentar diferente distribución en el reino vegetal
- No ser clasificados como secundarios basándose en su estructura, ruta biosintética o tipo de distribución [45].

Los metabolitos secundarios se pueden dividir en 3 grandes grupos, con base a sus orígenes biosintéticos:

- **COMPUESTOS FENÓLICOS** (fenilpropanoides y derivados): Los más de 8,000 compuestos fenólicos que se conocen están formados o bien por la vía del ácido shikímico o bien por la vía del malonato/acetato. Este grupo también juega una variedad muy heterogénea de roles en las plantas, muchos son productos de defensa contra herbívoros y patógenos, otros proveen soporte mecánico a la planta, otros atraen polinizadores o dispersores de frutos, algunos de ellos absorben la radiación ultravioleta, o actúan como agentes alelopáticos [46]. Dentro de este grupo se encuentran los fenoles, quinonas, flavonas y flavonoides, de los cuales se sabe tienen actividad bactericida para *Pseudomonas*, inhiben el

crecimiento *in vitro* de *Vibrio cholerae*, *Streptococcus* y otras bacterias, actividad antiviral y astringente, entre otras propiedades biológicas [47].

- **ALCALOIDES** (compuestos nitrogenados): Los alrededor de 12,000 alcaloides que se conocen, que contienen uno o más átomos de nitrógeno, son biosintetizados principalmente a partir de aminoácidos. Los alcaloides poseen una gran diversidad de estructuras químicas. Son fisiológicamente activos en los animales, aún en bajas concentraciones, por lo que son muy usados en medicina [46]. Se ha reportado que tienen efecto contra parásitos como *Giardia*, *Entamoeba*, *Trypanosoma* y *Plasmodium* [47].
- **TERPENOS**: Todos los terpenos, tanto los que participan del metabolismo primario como los más de 25,000 metabolitos secundarios, son derivados del compuesto IPP (Isopentenil difosfato o 5-carbono isopentenil difosfato) que se forman en la vía del ácido mevalónico. Es un grupo grande de metabolitos con actividad biológica importante. Están distribuidos ampliamente en las plantas y muchos de ellos tienen funciones fisiológicas primarias. La distribución de unos pocos de ellos en las plantas es más restringida, como los que forman los aceites esenciales, entre otros [46]. Son activos contra bacterias, virus, hongos y protozoarios [47].

La actividad biológica de estos metabolitos secundarios, muchas veces coincide con una actividad farmacológica en los seres humanos [42,48].

Un ejemplo de plantas medicinales que contienen estos metabolitos secundarios, son las pertenecientes al género *Bursera*, de las cuales se ha determinado que su composición química está constituida principalmente por terpenos [49].

### **Antecedentes**

Las especies del género *Bursera*, que han sido reconocidas como un género de importante diversidad en México [50], se les atribuyen algunos usos medicinales, ya que la resina que exudan algunas especies la utilizan como antiséptico para curaciones dentales, en heridas de la piel como cicatrizante y contra enfermedades respiratorias [51,52].

De las especies *B. arida*, *B. morelensis* y *B. aptera* (Apéndice 2), en investigaciones previas, se ha demostrado que los extractos de las cortezas y los aceites esenciales tienen una gran actividad antibacteriana y antifúngica [53-55].

Como se mencionó anteriormente, la MEAP es considerada actualmente como un problema de salud pública, y existe una problemática con el tratamiento de esta enfermedad al ser tratada con AMB (antimicótico) debido a su alta toxicidad, por lo cual es importante buscar alternativas que sean eficaces pero que reduzcan los daños colaterales.

Es importante mencionar que actualmente, *B. aptera*, *B. morelensis* y *B. arida* son parte de un proyecto integral (realizado en los laboratorios de Farmacognosia, FES Iztacala, UNAM, e Inmunobiología, FES Iztacala, UNAM), en el cual, además de caracterizar su composición química y validar científicamente el uso que se les da en la medicina tradicional, se han estudiado sus propiedades como antioxidantes, antibacterianas, antimicóticas y antiparasitarias. Debido a lo mencionado anteriormente, y al estar comprobada la actividad antifúngica de los extractos metanólicos de estas 3 especies de *Bursera*, estos fueron seleccionados como buenos candidatos para probar su efecto contra trofozoítos de *N. fowleri*.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

- Determinar el efecto amebicida de los extractos de *B. aptera*, *B. morelensis* y *B. arida* sobre *N. fowleri*.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Obtener el extracto metanólico de las cortezas de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis* mediante la técnica de maceración.
- Evaluar el efecto *in vitro* de los extractos metanólicos de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis* contra las amibas utilizando la técnica de viabilidad celular de cristal violeta.

- Evaluar la citotoxicidad de los extractos en un ensayo con macrófagos utilizando la técnica de viabilidad celular de cristal violeta.
- Evaluar el efecto apoptótico de los extractos utilizando el kit FITC/Anexina V y MitoProbe JC-1 de Invitrogen™.
- Determinar la composición química de los extractos metanólicos de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis* mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Material Biológico**

#### PLANTAS

La colecta de las tres especies de *Bursera* (*B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis*) se realizó a finales del año 2011 y principios de 2012 en la región de Tehuacán-Cuicatlán, Reserva de la Biosfera (Apéndice 1).

#### RATONES

Para reactivar la virulencia de las amibas se utilizaron ratones (*Mus musculus*) machos de la cepa BALB/c de seis semanas de edad, obtenidos y mantenidos en el bioterio de la FES Iztacala, UNAM, en un ambiente libre de patógenos según las normas nacionales e institucionales.

#### AMIBAS

Las amibas que se utilizaron para probar el efecto de los extractos de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis*, son de la cepa ATCC-30808, de la especie *Naegleria fowleri* (donadas por el laboratorio de Conservación y Mejoramiento del Ambiente CyMA de la F.E.S Iztacala).

### **Obtención de los extractos metanólicos**

La obtención de los extractos se llevó a cabo por el método de maceración [56]. El material (ramas y corteza) fue pesado y colocado en trozos en un matraz con metanol, para posteriormente obtener el extracto metanólico crudo que fue filtrado y destilado a presión reducida en un rotavapor. El rendimiento del extracto se determinó con referencia de peso con relación al peso seco de la planta.

### **Reactivación de la virulencia de *N. fowleri***

La reactivación de la virulencia de las amibas se realizó en 2 ratones anestesiados con éter, a los que se les inocularon por vía intranasal  $2 \times 10^5$  trofozoítos de *N. fowleri* con una micropipeta. Se tuvieron en observación durante 7 días aproximadamente, que fue el tiempo durante el cual aparecieron los primeros síntomas y evolucionó la enfermedad, tomando nota de los cambios que se presentaron durante ese tiempo y haciendo a los ratones pruebas de reacción a estímulos externos. Al momento de la muerte, se extrajeron los cerebros para recuperar las amibas y cultivarlas.

Las amibas se cultivaron axénicamente en frascos Corning de 75 cm<sup>2</sup> con 30 mL de medio Bactocasitona al 2% (DIFCO) enriquecido con suero fetal bovino (SFB) al 10% y se mantuvieron en incubación a 37°C para promover el crecimiento óptimo.

### **Curva patrón**

Se realizó una curva patrón en una placa de cultivo de 96 pozos en la que se colocaron diferentes cantidades de trofozoítos de *N. fowleri*. Se ajustó la suspensión de amibas a  $1 \times 10^6$  en 200  $\mu$ l y se agregaron al primer pozo. Se mezclaron las amibas del primer pozo con la micropipeta entre 5 y 10 veces procurando no hacer burbujas. Se tomaron 100  $\mu$ l y se pasaron al segundo pozo. Se mezclaron las amibas del segundo pozo con la micropipeta entre 5 y 10 veces procurando no hacer burbujas. De este se tomaron 100  $\mu$ l y se pasaron al tercer pozo. Se repitió este procedimiento hasta llegar al pozo 12.

Posteriormente se incubó la placa a 37°C por 30 min. Se eliminó el medio sacudiendo la placa. Se lavó suavemente con solución salina o PBS 1X estéril (dos veces). Se fijaron las células con 100  $\mu$ l de metanol por 30 segundos. Se retiró el resto de metanol. Se

agregaron 100  $\mu$ l de solución de Cristal Violeta a todos los pozos y se dejó incubar de 10 a 15 min a temperatura ambiente en oscuridad. Se eliminó el colorante, sacudiendo la placa. Se lavó suavemente con solución salina o PBS 1X. Se solubilizaron las células agregando 100  $\mu$ l de SDS al 1% y finalmente la placa se leyó en el lector de ELISA a una longitud de onda de 620 nm. Después se graficaron el número de amibas contra la absorbancia obtenida.

#### **Efecto *in vitro* de los extractos de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis* sobre *N. fowleri***

Para probar el efecto *in vitro* de los extractos de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis* sobre *N. fowleri* se realizó el siguiente ensayo: se recuperaron los trofozoítos de *N. fowleri* con PBS y se realizó un conteo mediante cámara de Neubauer. Se llevaron a cabo los ajustes necesarios para tener una densidad de 30 mil trofozoítos en 100  $\mu$ L. Se agregaron 100  $\mu$ L a cada pozo de 9 filas (3 por cada extracto) de una placa de cultivo.

Los extractos fueron diluidos con DMSO, para tener una concentración de 40 mg/mL. Se preparó un grupo control de trofozoítos de *N. fowleri* interactuando con la máxima concentración de DMSO utilizada (20  $\mu$ L). No se observó ningún efecto sobre los trofozoítos.

En otra placa de cultivo, se prepararon las diluciones del extracto de la siguiente manera: el primer pozo tuvo 40  $\mu$ L del extracto y 160  $\mu$ L de medio de cultivo. Los demás pozos de la fila tuvieron 100  $\mu$ L de medio de cultivo. Del primer pozo se tomaron 100  $\mu$ L que se añadieron al siguiente pozo, se mezclaron y se tomaron otros 100  $\mu$ L que se agregaron al siguiente pozo; este proceso se repitió hasta terminar la fila; se realizó por triplicado para cada extracto.

Una vez concluido lo anterior: Las diluciones de cada extracto se pipetearon y se añadieron a los pozos de la placa en la que se encontraban las amibas. Las placas de cultivo se incubaron a 37°C por 24 horas. Posteriormente se lavaron suavemente con solución salina o PBS 1X estéril (dos veces). Se fijaron las células con 100  $\mu$ l de metanol por 30 segundos. Se retiró el resto de metanol. Se agregaron 100  $\mu$ l de solución de Cristal Violeta a todos los pozos y se dejaron incubar de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se eliminó el colorante, sacudiendo la placa. Se lavó suavemente con

solución salina o PBS 1X. Se solubilizaron las células agregando 100 µl de SDS al 1%. La placa se leyó en el lector de ELISA a una longitud de onda de 620 nm.

Los valores que se obtuvieron se interpolaron en la curva patrón y se graficaron para obtener el resultado del número de trofozoítos que soportaron la aplicación del extracto.

### **Prueba de citotoxicidad de los extractos metánolicos de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis***

Para la prueba de citotoxicidad celular *in vitro*, se realizó la siguiente técnica:

La línea de macrófagos P388 de ratón leucémico, fueron mantenidas en medio DMEM-F12 (Sigma), suplementado con suero fetal bovino al 10% (GIBCO) y 100 µg/mL de antibiótico antimicótico (Anfotericina B). Las células se cultivaron en una incubadora con una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Las células se despegan utilizando Tripsina-Verseno 0.5%.

Se sembraron las células en una placa de cultivo de 96 pozos a una densidad de 15,000 células por pozo y se dejan incubando por 2 horas antes del tratamiento. Después de las 2 horas de incubación, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de los extractos de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis*, (de 20 a 0.004 mg/mL), los ensayos se realizaron por triplicado. Las placas fueron incubadas por 48h a 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C. La solución inicial del extracto fue obtenida disolviendo la concentración requerida en DMSO. Las diluciones siguientes para probar las diferentes concentraciones se realizaron asegurándose que la concentración final de DMSO en cada pozo no fuera superior al 1% (v/v).

No se observó ningún efecto del DMSO sobre las células. Como control positivo se utilizó Doxorubicina. Los pozos con células sin ningún tratamiento fueron considerados como control negativo. Al final del periodo de incubación, se evaluó la viabilidad celular mediante la tinción de Cristal Violeta, de la siguiente manera: se elimina el medio sacudiendo la placa. Se lava suavemente con PBS 1X estéril (dos veces). Con 50 µl de glutaraldehído 1.1 % por 5 minutos se fijaron las células. Se retiró el resto de glutaraldehído lavando suavemente 2 veces con PBS 1X estéril y se agregaron 100 µl de solución de Cristal Violeta a todos los pozos. Se incubó de 10 a 15 min a temperatura

ambiente en oscuridad y se eliminó el exceso de colorante, sacudiendo la placa. Nuevamente se lava suavemente con solución salina o PBS 1X. Con 50  $\mu$ l de ácido acético al 10% se solubilizaron las células y se procedió a leer en un lector de ELISA a una longitud de onda de 620 nm.

### **Ensayos de apoptosis**

Como se observó efecto de los extractos sobre *N. fowleri*, se realizaron los ensayos de apoptosis con los kits FITC/Anexina V (para comprobar la presencia de procesos apoptóticos) y MitoProbe JC-1 de Invitrogen<sup>TM</sup> (para probar un posible mecanismo de apoptosis por cambios en el potencial de membrana mitocondrial) siguiendo los protocolos experimentales descritos en los manuales de uso.

**FITC/Anexina V.** Se indujo apoptosis a las células con la aplicación de los extractos, utilizando la  $CL_{50}$ . Se preparó un control negativo de células con ausencia de extractos. Se cosecharon las células después del periodo de incubación y se lavaron con PBS frío. Se preparó 1X del buffer de unión de Anexina. Después se prepararon 100  $\mu$ g/mL de la solución de PI (Yoduro de propidio), al diluir 5  $\mu$ L de la solución stock (componente B) en 45  $\mu$ L del buffer de unión de Anexina 1X. Posteriormente, se centrifugaron las células lavadas, desechando los sobrenadantes y después resuspendiendo las células en el buffer de unión de Anexina 1X. Se determinó la densidad celular y se diluyeron en el buffer de unión de Anexina 1X, aproximadamente un millón de células por mL, preparando suficiente volumen para tener 100  $\mu$ L por ensayo. Se agregaron 5  $\mu$ L de FITC Anexina V (componente A) y 1  $\mu$ L de los 100  $\mu$ g/mL de PI a cada 100  $\mu$ L de la suspensión celular. Se incubaron las células a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después se agregaron 400  $\mu$ L del buffer de unión de Anexina 1X, se mezcló ligeramente y se mantuvieron las muestras en hielo. Finalmente, se realizó el análisis de las células por citometría de flujo lo más pronto posible, midiendo la emisión de fluorescencia a 530 nm y >530 nm. La población se dividió en 3 grupos: células vivas con sólo un poco de fluorescencia, células apoptóticas con fluorescencia verde y células muertas con fluorescencia verde y roja.

**MitoProbe JC-1.** El polvo de JC-1 y el DMSO se llevaron a temperatura ambiente antes del uso. Se preparó un stock de JC-1 de 200  $\mu\text{M}$  inmediatamente antes de su uso, al disolver el contenido de un vial en 230  $\mu\text{L}$  de DMSO

Marcaje celular.- Por cada muestra, se suspendieron los trofozoítos de *N. fowleri* en 1 mL de medio tibio, PBS u otro buffer, aproximadamente 1 millón de células por mL. Para el tubo control, se agregó 1  $\mu\text{L}$  de CCCP (provisto con el kit, concentración final de 50  $\mu\text{M}$ ) y 10  $\mu\text{L}$  de JC-1 200  $\mu\text{M}$  (concentración final de 2 $\mu\text{M}$ ) y se incubaron las células a 37°C durante 15 o 30 minutos.

Las amibas se lavaron una vez con PBS tibio. Se centrifugaron los tubos para obtener la pastilla de células. Se resuspendió la pastilla suavemente y se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de PBS a cada tubo.

Se analizaron las muestras por citometría de flujo a 480 nm de excitación, utilizando los filtros adecuados para los fluorocromos Alexa Fluor 488 y R-Ficoeritrina. Se utilizó la muestra control de CCCP para realizar la compensación estándar.

#### **Caracterización química de los extractos metanólicos de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis***

El análisis de los extractos mediante la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) se realizó en un cromatógrafo de gases HP 6890 acoplado a un espectrómetro de masas modelo HP 5973, equipado con el software Chemstation. La identificación de los compuestos se llevó a cabo por medio de la base de datos Wiley 275. Se utilizó una columna capilar HP-5 5% de fenil metil siloxano de 30 m de largo, 0.32 mm de diámetro interno y película de 0.25  $\mu\text{m}$ .

Las condiciones de la cromatografía 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), interface 180°C. El tipo de inyección fue split y la cantidad de muestra empleada fue de 2  $\mu\text{L}$  de una solución de 1 mg de extracto en 1 ml de hexano grado HPLC. El gas de acarreo fue Helio.

## RESULTADOS

### Rendimiento de los Extractos

De *B. aptera*, se obtuvieron 59.78 g de extracto metanólico crudo, que corresponden al 2.37% del rendimiento total, tomando en cuenta 2516 g de ramas y corteza a partir de la cual se obtuvo el extracto; con respecto a *B. arida*, se obtuvieron 74.5 g de extracto metanólico crudo, que corresponden al 18.54% del rendimiento total, tomando en cuenta 401.7 g de ramas y corteza a partir de la cual se obtuvo el extracto; para *B. morelensis* se obtuvieron 236 g de extracto metanólico crudo, que corresponden al 19.66% del rendimiento total, tomando en cuenta 1200 g de ramas y corteza a partir de la cual se obtuvo el extracto (Cuadro 1).

**Cuadro 1.- Porcentaje de rendimiento de los extractos metanólicos de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis*.**

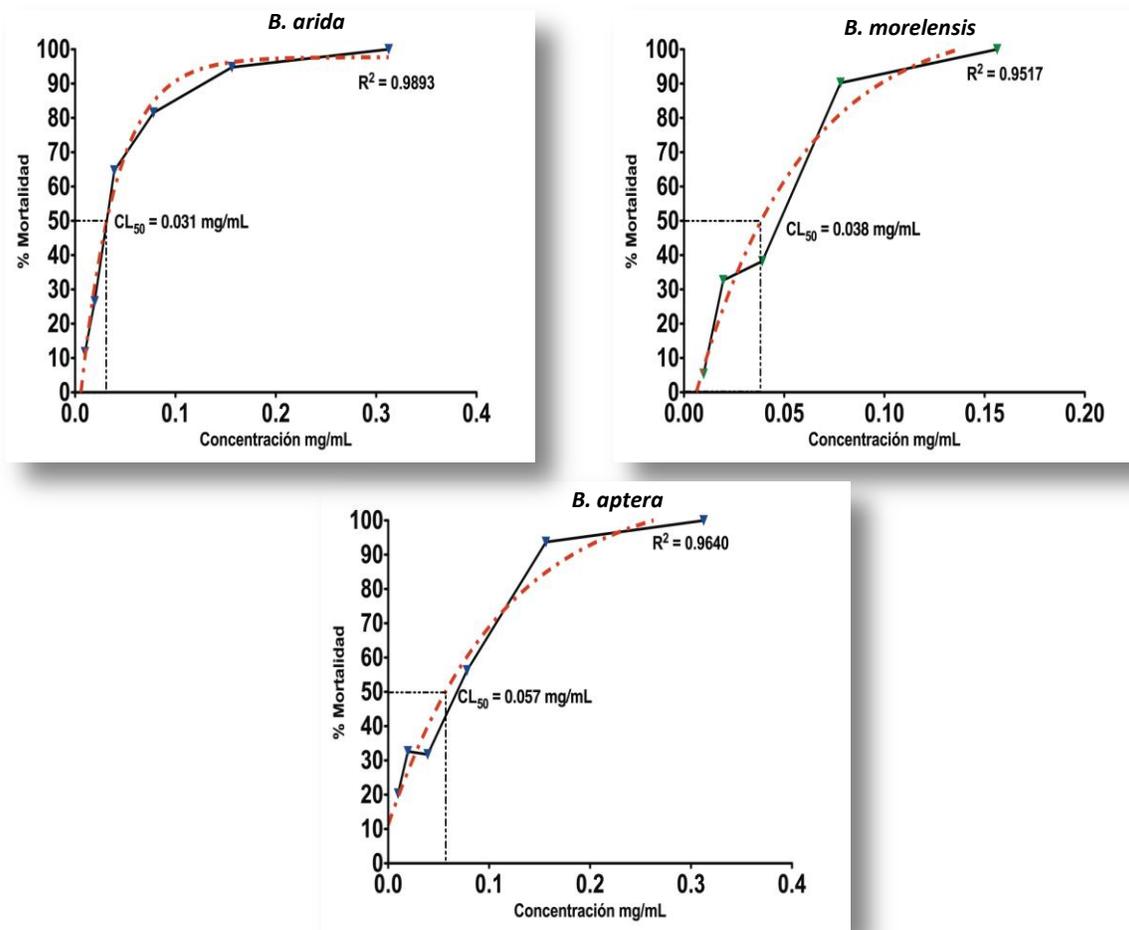
PLANTA	PESO SECO (g)	% DE RENDIMIENTO
<i>B. aptera</i>	2516	2.37 (59.78 g)
<i>B. arida</i>	401.7	18.54 (74.5 g)
<i>B. morelensis</i>	1200	19.66 (236 g)

### Evaluación del efecto *in vitro* de los extractos metanólicos de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis*.

Cuando los trofozoítos de *N. fowleri* interactúan con diferentes concentraciones de los extractos metanólicos de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis* (de 20 a 0.01 mg/mL), se observa que en los 3 casos hay un efecto dosis-dependiente, es decir, que cuando incrementa la concentración de los extractos, la mortalidad es mayor.

La determinación de la CL<sub>50</sub> se realizó haciendo una regresión no lineal e interpolando en el modelo matemático, encontrándose que *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis* tuvieron efecto sobre *N. fowleri*.

Las CL<sub>50</sub> menores corresponden a *B. arida* y *B. morelensis* (0.031 y 0.038 mg/mL respectivamente) y la mayor fue *B. aptera*, con un valor de 0.057 mg/mL (Figura 4).



Concentración Letal Media (CL<sub>50</sub>)

PLANTA	CL <sub>50</sub> (mg/mL)
<i>B. aptera</i>	0.057
<i>B. morelensis</i>	0.038
<i>B. arida</i>	0.031

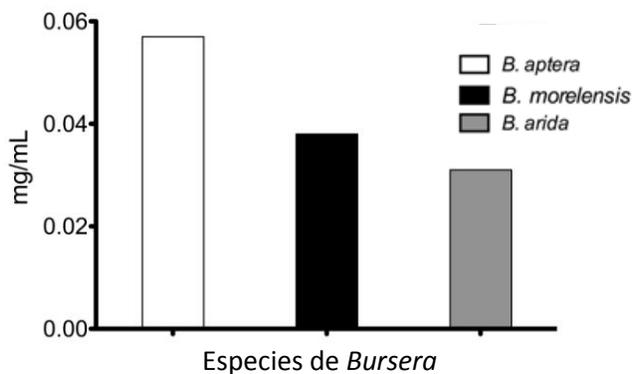


Figura 4.- Efecto *in vitro* de los extractos de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis*. Se obtuvo el modelo matemático mediante una regresión no lineal. El valor de R<sup>2</sup> en los 3 casos es mayor a 0.95.

**Evaluación de la citotoxicidad de los extractos metanólicos de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis* sobre la línea de macrófagos P388 de ratón leucémico**

La citotoxicidad de los extractos se evaluó determinando la  $CI_{50}$  (Concentración Inhibitoria Media), que es la concentración a la cual se inhibe la viabilidad celular del 50% de la población celular. Para considerar que un extracto tiene actividad citotóxica, se tomó como parámetro el criterio del NCI (Instituto Nacional de Cáncer por sus siglas en inglés), donde refiere que para que un extracto sea citotóxico, el valor de su  $CI_{50}$  debe ser menor o igual a 0.02 mg/mL, y para un compuesto puro, debe ser menor o igual a 4 mg/mL [57,58].

Como se observa en la Figura 5, solamente *B. morelensis* no tiene actividad citotóxica contra la línea celular de macrófagos P388 de ratón leucémico, ya que su  $CI_{50}$  fue de 0.238 mg/mL.

De manera interesante, *B. aptera* y *B. arida*, tienen una gran actividad citotóxica, ya que a la menor concentración utilizada en el ensayo (0.004 mg/mL), se obtuvo un 70% de mortalidad.

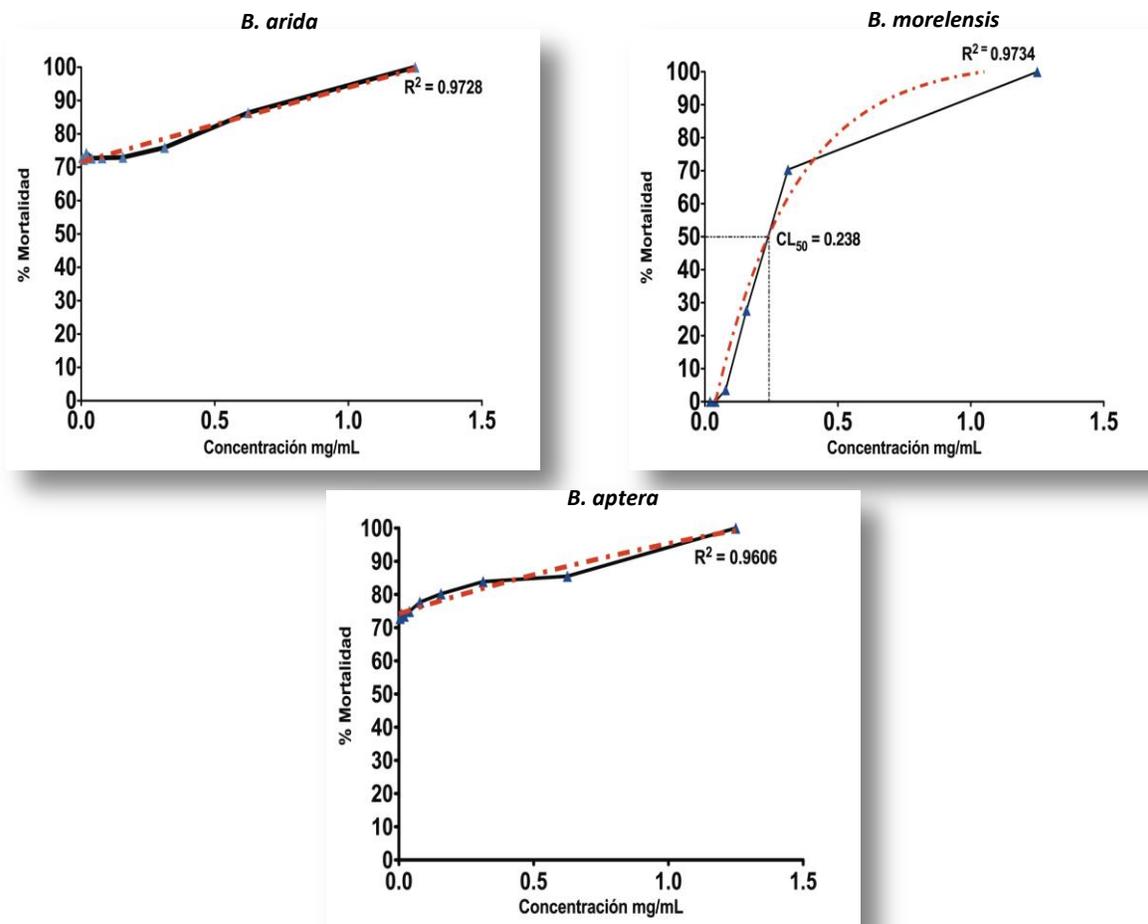
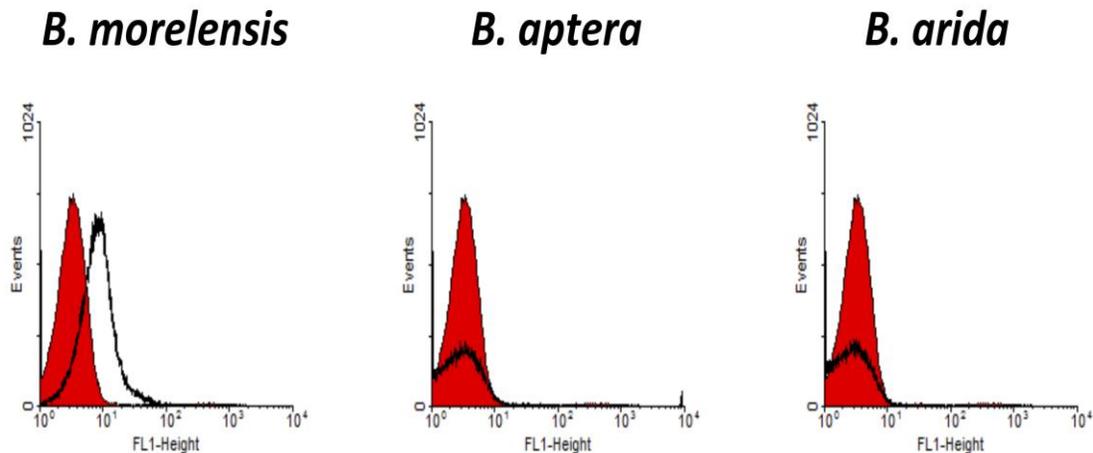


Figura 5.- Efecto citotóxico de los extractos metanólicos de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis* sobre la línea de macrófagos P388 de ratón leucémico. Se obtuvo el modelo matemático mediante una regresión no lineal. El valor de  $R^2$  en los 3 casos es mayor a 0.95.

#### Evaluación del efecto apoptótico de los extractos metanólicos de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis* sobre *N. fowleri*

Mediante el análisis de la externalización de la fosfatidilserina, se probó el efecto apoptótico de los extractos metanólicos de las cortezas de las tres especies de *Bursera*. El extracto de *B. morelensis* fue el que provocó la mayor cantidad de apoptosis en los trofozoitos de *N. fowleri* (28.95%). Tanto el extracto de *B. aptera* como *B. arida*, producen apoptosis pero en porcentajes muy bajos (5.24% y 1.01% respectivamente) y la cantidad de células observadas es muy pequeña (Figura 6). Es muy probable que estos dos extractos provoquen otro tipo de muerte celular, como por ejemplo necrosis ya que algunos de los componentes de estos extractos, como el ácido esteárico, clionasterol y

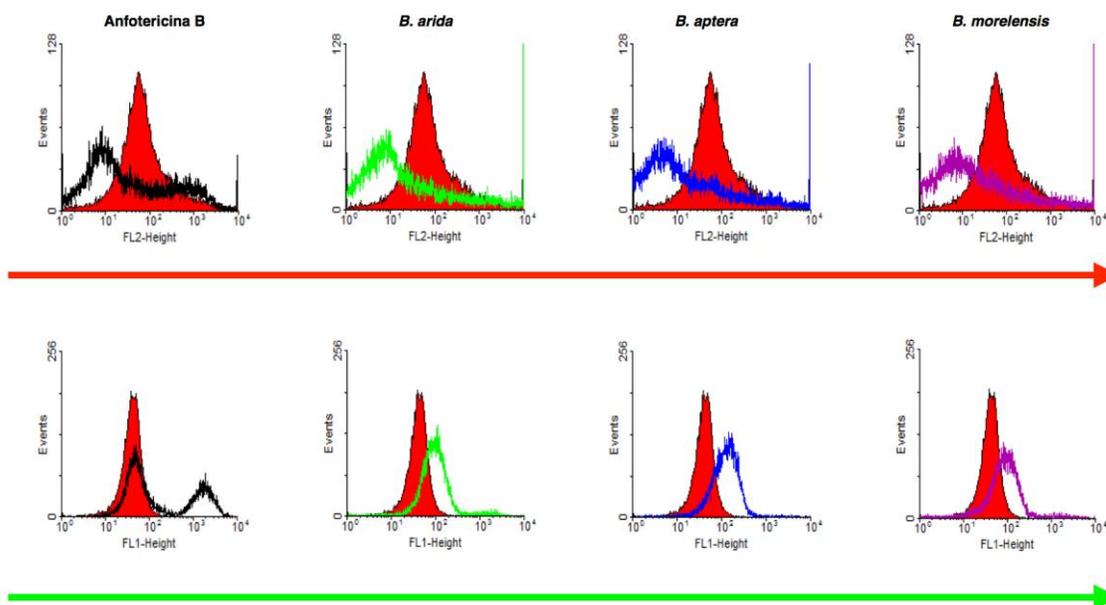
lanosterol pueden estar relacionados con efectos de disrupción de la membrana plasmática y de las membranas mitocondriales [59-61].



**Figura 6.- Efecto apoptótico de los extractos metanólicos de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis* observado con el kit FITC/Anexina V de Invitrogen™ y analizado por citometría de flujo.**

JC-1 es una molécula que presenta acumulación dependiente del potencial de membrana en la mitocondria. En células sanas, en las cuales el potencial de membrana mitocondrial es alto, JC-1 forma espontáneamente agregados conocidos como “J-agregados”, los cuales tienen una fluorescencia roja intensa. Por otro lado, en células que se encuentran en apoptosis, en las que el potencial de membrana mitocondrial es bajo, JC-1 se mantiene en forma monomérica, la cual muestra fluorescencia verde. Es decir, cuando las células se encuentran sanas, la fluorescencia será roja, mientras que en células apoptóticas, la fluorescencia será verde.

Como se observa en la figura 7, los extractos de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis* y la AMB, indujeron apoptosis en los trofozoítos de *N. fowleri* al disminuir su potencial de membrana mitocondrial, ya que la fluorescencia roja disminuyó y la verde incrementó con respecto al grupo control.



**Figura 7.- Efecto apoptótico de los extractos metanólicos de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis* observado con el kit MitoProbe JC-1 de Invitrogen™ y analizado por citometría de flujo. Con flechas se indica la dirección en la cual la fluorescencia roja (flecha roja) y la fluorescencia verde (flecha verde) incrementan.**

### **Caracterización química de los extractos metanólicos de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis***

Como se observa en el Cuadro 2, a pesar de ser especies del mismo género, los extractos metanólicos de las cortezas de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis* son diferentes en cuanto a su composición química. Sin embargo, existen compuestos que están presentes en las 3 especies o en al menos 2, como el metil palmitato, ácido palmítico, ter-butylbisfenol, taraxesterol y cicloartenol; otros compuestos son exclusivos de cada especie, como el pirogalol (*B. arida*), lanosterol (*B. morelensis*) y podofilotoxina (*B. aptera*).

Cabe destacar, que de algunos de estos compuestos, se ha reportado que presentan actividad biológica importante, de las que destacan las actividades anti-parasitaria, anti-cancerígena, apoptótica y citotóxica

**Cuadro 2.- Compuestos encontrados en los extractos metanólicos de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis*, porcentaje de abundancia correspondiente y su actividad biológica reportada. Las acotaciones corresponden a las siguientes actividades biológicas: Rojo: actividad anti-cancerígena; Verde: actividad apoptótica; Morado: actividad anti-parasitaria; Azul: actividad citotóxica.**

Compuesto	Tipo de compuesto	Abundancia %			Propiedades Biológicas
		<i>B. aptera</i>	<i>B. morelensis</i>	<i>B. arida</i>	
<p><b>Ácido palmítico</b></p> 	Ácido graso	9.69	7.85	7.75	<p>Reduce la deposición de colágeno, tiene actividad anti-inflamatoria, ya que reduce la citocina TNF-<math>\alpha</math> en el pulmón, contrarresta la infiltración de las células inflamatorias y por lo tanto la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y regula los efectos de las citocinas [62].</p> <p>Reduce el edema plantar de ratas inducido por carragenina y disminuye la prostaglandina E2 en los exudados inflamatorios.</p> <p>En la endotoxemia inducida por lipopolisacáridos, reduce los niveles en plasma de TNF<math>\alpha</math> y de IL-6 [63].</p> <p>Daña la viabilidad celular e incrementa la apoptosis en las “neural stem cells”</p> <p>Puede regular la función de las células progenitoras del endotelio; produce apoptosis en las células progenitoras del endotelio por la vía p38 y por las rutas JNK y MAPKS [64]</p>
<b>Metil linoleato</b>	Ácido graso	3.59			NA
<p><b>Ácido linoleico</b></p> 	Ácido graso	1.34			<p>En ratas, se comprobó que tiene efecto en cuanto a la disminución de la presión sanguínea, colesterol y glucosa en el suero [65], incrementa la apoptosis de hepatocitos [66], induce apoptosis en células cancerígenas relacionadas con</p>

					el cáncer de mama [67].
<b>Metil estearato</b>	Ácido graso	2.42			NA
<b>Metil éster del ácido oleico</b>	Ácido graso	7.6			NA
<b>Ácido esteárico</b> 	Ácido graso	3.26			Produce apoptosis y necrosis en la línea celular de macrófagos J774, al cambiar el potencial de membrana transmembranal de la mitocondria y la acumulación neutral de lípidos intracelular [61].
<b>2-mercaptobenzotiasol</b>	Heterociclo			2.47	NA
<b>trans-metilpluviatólido</b> 	Fenilpropanoide	7.52			Actividad anti-parasitaria sobre <i>Trypanosoma brucei</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> y <i>Leishmania</i> spp. [68].
<b>Podofilotoxina</b> 	Fenilpropanoide	13.79			Puede ejercer un efecto anti-cáncer, al producir arresto mitótico y estrés pro-apoptótico [69], efecto citotóxico contra líneas celulares cancerígenas humanas [70], actividad citostática contra <i>Trypanosoma brucei</i> [71], se le atribuye su acción contra helmintos en los extractos de especies del género <i>Podophyllum</i> [72] y algunos de sus derivados incluso tienen actividad anti-VIH [73].
<b>Lignocerato de metilo</b>	Fenilpropanoide			9.49	NA
<b>2-austrobailignano</b> 	Fenilpropanoide			16.4	Actividad citotóxica [74].
<b>Pirogalol</b> 	Fenol			55.43	Actividad anti-proliferativa en algunas líneas celulares cancerígenas humanas y una alta citotoxicidad en líneas celulares de cáncer pulmonar [75], induce apoptosis en

					diversos tipos celulares debido a que se relaciona con la producción excesiva de ROS [76].
<b>Kaureno</b> 	Terpeno	4.03			Sus derivados presentan actividad anti-tumoral en carcinoma nasofaríngeo, por inducción de apoptosis y arresto del ciclo celular [77], induce apoptosis en células malignas del glioblastoma [78].
<b>Spirost-20-en</b>	Terpeno	7.49			NA
<b>Clionasterol</b>	Terpeno	4.6			Regula las dinámicas de las membranas lipídicas [60].
<b>Taraxasterol</b>	Terpeno	3.22	8.79		Actividad anti-inflamatoria porque bloquea la ruta NF- $\kappa$ B [79].
<b>Lanosterol</b>	Terpeno		45.82		Induce desacoplamiento mitocondrial y protege las neuronas dopaminérgicas de la muerte celular en un modelo para la enfermedad de Parkinson [59].
<b>Cicloartenol</b> 	Terpeno		19.46	3.91	Potencial de actividad citotóxica frente a diferentes líneas celulares de cáncer humano [80].
<b>Moretenol</b>	Terpeno			4.55	NA
<b>Piranona</b> 		3.18			Actividad anti-leucémica [81], pro-apoptótico y anti-proliferativo ya que inhibe la vía del Nf $\kappa$ B [82].

## DISCUSIÓN

Las especies del género *Bursera* tienen una gran diversidad en México y son de gran importancia dentro de la medicina tradicional mexicana, ya que se les atribuyen algunos usos medicinales y son utilizadas como antisépticos para curaciones dentales, en heridas de la piel como cicatrizante y contra enfermedades respiratorias entre otras [51,52,83].

En este trabajo, por primera vez se demostró que los extractos metanólicos de las cortezas de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis*, tienen efecto sobre los trofozoítos de *N. fowleri*. Estos resultados son importantes, ya que no existen reportes sobre el efecto de productos naturales de estas tres especies que tengan algún efecto sobre amibas de vida libre ni sobre otros parásitos.

Como se ha mencionado anteriormente, el único fármaco al que los trofozoítos de *N. fowleri* son altamente susceptibles, es la AMB [35], la cual a su vez es altamente tóxica y puede provocar daños como insuficiencia renal [37]. Actualmente, se han buscado nuevas combinaciones de fármacos que reduzcan la dosis de AMB sin disminuir su actividad, sin embargo no han logrado ser efectivas en su totalidad, ya que el tratamiento para este tipo de infección, depende de la virulencia de la cepa que está infectando, del tamaño del inóculo y de la susceptibilidad del paciente [30]. Es por esto que los resultados obtenidos en esta investigación, pueden brindar en un futuro, una nueva alternativa en el tratamiento contra la infección producida por *N. fowleri*.

Previamente se ha dicho que las especies del género *Bursera* son parte de la medicina tradicional mexicana y de un proyecto de investigación integral, realizado en los laboratorios de Farmacognosia, FES Iztacala, UNAM, e Inmunobiología, FES Iztacala, UNAM. Recientemente se ha descrito que las especies *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis* han presentado actividad anti-bacteriana y anti-micótica [53-55]; debido a esto, las 3 especies fueron consideradas como buenas candidatas para ser probadas contra los trofozoítos de *N. fowleri*, ya que la AMB, que es el fármaco al que son altamente susceptibles estas amibas, es un anti-micótico [13,37].

El extracto metanólico de las cortezas de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis* mostraron un efecto *in vitro* sobre los trofozoítos de *N. fowleri*, aunque cada una con una CL<sub>50</sub> diferente. Como la bibliografía refiere, algunos de los compuestos presentes en los extractos metanólicos, como son el ácido palmítico, presente en las 3 especies, ácido linoleico, ácido esteárico, clionasterol y podofilotoxina, presentes en *B. aptera* y pirogalol, presente en *B. arida*, tienen actividad antimicótica [84-89], lo que podría explicar el efecto de estos extractos sobre esta amiba.

Aunque hasta el momento no se habían realizado estudios del efecto de plantas del género *Bursera* sobre *N. fowleri*, cabe destacar que se ha reportado que otras especies de este género, presentan actividad anti-parasitaria contra protozoarios, como es el caso de *B. fagaroides* contra *Entamoeba histolytica* [90], *B. graveolens* contra *Leishmania amazonensis* [91] y *B. copallifera* contra el nemátodo *Haemonchus contortus* [92].

Por otro lado, compuestos como el ácido palmítico, presente en las 3 especies, piranona, kaureno, ácido linoleico, ácido esteárico y podofilotoxina, presentes en *B. aptera* y pirogalol, presente en *B. arida*, han sido reportados como compuestos que tienen un efecto apoptótico en diferentes líneas celulares, como son hepatocitos, células de carcinoma y macrófagos [61,64,66,67,69,76-78,82]. Estos antecedentes corroboran los resultados obtenidos, ya que al tratar de explicar el mecanismo por el cual los extractos metanólicos de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis* tienen efecto sobre los trofozoítos de *N. fowleri*, se encontró que las 3 especies provocan apoptosis, siendo *B. morelensis* la que tuvo un mayor porcentaje (28.95%), y las otras 2 especies, aunque en un porcentaje menor (*B. aptera* 5.24% y *B. arida* 1.01%) también provocaron apoptosis.

Aunque *B. aptera* y *B. arida* tienen más compuestos con actividad apoptótica reportada, fueron las que menor porcentaje de apoptosis presentaron. Como se puede observar en la figura 6, es probable que los extractos de *B. aptera* y *B. arida* tengan un efecto más agresivo y rápido contra los trofozoítos de *N. fowleri*, ya que el número de células encontradas después de 24 horas de exposición a los extractos es muy bajo en comparación a las encontradas con *B. morelensis*, lo que hace suponer que la muerte

celular está ocurriendo a tiempos más cortos cuando los trofozoítos se exponen a los extractos de *B. aptera* y *B. arida* que cuando se exponen a *B. morelensis*, o que se está induciendo otro tipo de muerte celular, como por ejemplo necrosis. Por otra parte, el hecho de que *B. morelensis* tenga el mayor porcentaje en cuanto a la presencia de células en apoptosis, a pesar que solamente uno de sus compuestos sea pro-apoptótico (ácido palmítico), se puede explicar debido a la presencia de sinergismos entre los componentes del extracto, ya que la capacidad biológica total de un fluido biológico no puede medirse al evaluar sus compuestos por separado, sino en su conjunto, considerando los efectos sinérgicos que puedan establecerse entre ellos [93].

Los resultados reportados sobre la actividad apoptótica sobre *N. fowleri* de los extractos metanólicos de las cortezas de estas tres especies de *Burseras*, conllevan a visualizar un potencial biológico de estos extractos más allá del antiparasitario, ya que estudios recientes han permitido entender que el cáncer, además de la proliferación celular acelerada o desregulada, que conlleva a la expansión celular y a la acumulación de masas tisulares, también abarca la supervivencia celular aberrante, como consecuencia de fallas en los mecanismos de inducción de apoptosis o de muerte celular. La apoptosis defectuosa es un importante factor causal en el desarrollo y progresión del cáncer, y la habilidad de las células tumorales a evadir el proceso de apoptosis, puede jugar un rol significativo en su resistencia a los regímenes terapéuticos convencionales [94].

El conocimiento actual sobre las complejidades de la apoptosis y los mecanismos evolucionados de las células tumorales para evitar la muerte celular, han centrado los esfuerzos de investigación en el desarrollo de estrategias diseñadas para inducir apoptosis en células cancerígenas [94]; debido a la estrecha relación entre el cáncer y la apoptosis, en esta investigación se realizaron ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares cancerígenas.

Solamente el extracto de *B. morelensis* ( $CI_{50}$  de 0.238 mg/mL) no fue citotóxico sobre la línea de macrófagos P388 de ratón leucémico, mientras que los extractos de *B. aptera* y *B. arida* si mostraron actividad citotóxica ( $CI_{50}$  menor a 0.004 mg/mL). Esta actividad puede

deberse a la presencia de compuestos de los cuales se ha reportado que tienen un efecto anticancerígeno, como el cicloartenol, presente en *B. arida* y *B. morelensis*, piranona, kaureno, ácido linoleico, y podofilotoxina en *B. aptera*, y pirogalol en *B. arida* [67,69,70,75,77,80,81].

Si bien es cierto que son pocos los reportes acerca de la actividad citotóxica de las especies del género *Bursera* [92,95,96], estos resultados son muy importantes ya que el encontrar e identificar nuevos productos naturales que tengan una toxicidad baja o moderada, menor que el que presentan las drogas sintéticas, pero que además sean capaces de inducir apoptosis y detener el crecimiento de las células cancerígenas, abre la posibilidad de encontrar nuevas alternativas terapéuticas.

Sin embargo, cabe aclarar, que todos estos resultados provienen de experimentos *in vitro* y utilizando el extracto metanólico de las cortezas de las *Burseras*, por lo que es necesario realizar estudios *in vivo* y utilizando los compuestos aislados de los extractos para comprender mejor su acción y los mecanismos moleculares que inducen no sólo en células cancerígenas, sino también sobre parásitos como la amiba de vida libre *N. fowleri*.

## CONCLUSIONES

- Los extractos metanólicos de las cortezas de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis*, tienen un efecto *in vitro* sobre los trofozoítos de *N. fowleri*
- *B. arida* y *B. aptera* resultaron tener un efecto citotóxico, mientras que *B. morelensis* no.
- Los 3 extractos metanólicos de las cortezas producen apoptosis en los trofozoítos de *N. fowleri*, aunque *B. morelensis* en un porcentaje mayor que *B. aptera* y *B. arida*.
- La composición química de los extractos metanólicos de *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis*, aunque son especies del mismo género, es distinta; con compuestos que les confieren diferentes propiedades medicinales, como antibacterianos,

antimicóticos, antiparasitarios, antiinflamatorios, proapoptóticos y anticancerígenos entre otras.

## REFERENCIAS

- [1] Pelczar JM, Reid DR, Chan SC. Microbiología. Nueva York, USA: McGraw Hill, 1982.
- [2] Wellings FM, Amuso SL, Lewis AL, Farmelo MJ, Moody DJ, Oiskowics CL. Pathogenic *Naegleria*, Distribution in Nature. In: Agency USEP, editor. Cincinnati, USA: EPA, 1979.
- [3] Wellings FM, Amuso PT, Chang SL, Lewis AL. Isolation and identification of pathogenic *Naegleria* from Florida lakes. Applied and environmental microbiology 1977;34:661-667.
- [4] De Jonckheere J. Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Naegleria fowleri* isolates. Applied and environmental microbiology 1977;33:751-757.
- [5] De Jonckheere JF. Pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba* spp. in thermally polluted discharges and surface waters. The Journal of protozoology 1981;28:56-59.
- [6] John DT, Howard MJ. Opportunistically pathogenic free-living amebae. In: Kreier JP, Barker JR, editors. Parasitic Protozoa. San Diego California, USA: Academic Press, 1993: 143-246.
- [7] Marciano-Cabral F. Biology of *Naegleria* spp. Microbiological reviews 1988;52:114-133.
- [8] Schuster FL. Small amebas and ameboflagellates. In: Levandowsky M, Hunter SH, editors. Biochemistry and physiology of protozoa. New York, USA: Academic Press, 1979: 462.
- [9] Kyle DE, Noblet GP. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. II. Lake Issaqueena. The Journal of protozoology 1987;34:10-15.
- [10] Fenchel T. Ecology of protozoa: The Biology of Free-living Phagotrophic Protists. Wisconsin, USA: Springer Verlag, 1987.
- [11] Tyndall RL, Ironside KS, Metler PL, Tan EL, Hazen TC, Fliermans CB. Effect of thermal additions on the density and distribution of thermophilic amoebae and

- pathogenic *Naegleria fowleri* in a newly created cooling lake. Applied and environmental microbiology 1989;55:722-732.
- [12] Rondanelli EG. Infectious Disensen. 1. Amphizoic amoebae human pathology. Padua, Italia: Piccin Nuova Libreria, 1987.
- [13] Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. International journal for parasitology 2004;34:1001-1027.
- [14] Page FC. A further study of taxonomic criteria for limax amoebae, with description of new species and a key to genera. Arch Protistenkd 1974;116:149-184.
- [15] Page FC. An illustrated key to freshwater and soil amoebae: with notes on cultivation and ecology. Ambleside: Freshwater Biological Association, 1976.
- [16] Hall WA. Free-living amoebas: is it safe to go in the water? World neurosurgery 2012;78:610-611.
- [17] Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. FEMS immunology and medical microbiology 2007;50:1-26.
- [18] Koshy AA, Blackburn BG, Singh U. Free living amoebas. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Filadelfia: Churchill Livingstone Elsevier, 2010: 3427-3436.
- [19] Marciano-Cabral F, Cabral G. *Naegleria fowleri*. In: Khan NA, editor. Emerging protozoan pathogens. Nueva York: Taylor and Francis, 1988: 119-152.
- [20] Visvesvara GS. Amebic meningoencephalitides and keratitis: challenges in diagnosis and treatment. Current opinion in infectious diseases 2010;23:590-594.
- [21] Hannisch W, Hallagan LF. Primary amebic meningoencephalitis: a review of the clinical literature. Wilderness & environmental medicine 1997;8:211-213.
- [22] Peña JMC. Efecto in vitro de la resina de *Gymnosperma glutinosum* (Spreng.) Less. sobre *Naegleria fowleri*. Lab Inmunobiología. México: UNAM, 2009: 64.
- [23] Martinez AJ. Free-living amoebas; natural history, prevention, diagnosis, pathology and treatment of disease. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, 1985.

- [24] Martinez AJ, Visvesvara GS. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain pathology* 1997;7:583-598.
- [25] Page FC. A new Key to Freshwater and soil Gymnamoebae. Londres: Freshwater Biological Association Scientific Publication, 1988.
- [26] Carter RF. Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *The Journal of pathology* 1970;100:217-244.
- [27] Visvesvara GS, Schuster FL. Opportunistic Free-Living Amebae, Part II. *Clinical Microbiology Newsletter* 2008;30:159-166.
- [28] Heggie TW. Swimming with death: *Naegleria fowleri* infections in recreational waters. *Travel medicine and infectious disease* 2010;8:201-206.
- [29] Singh BN, Das SR. Intra-nasal infection of mice with flagellate stage of *Naegleria aerobia* and its bearing on the epidemiology of human meningo-encephalitis. *Current Science* 1972;41:625-628.
- [30] Schuster FL, Visvesvara GS. Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 2004;7:41-51.
- [31] Cervantes-Sandoval I, Serrano-Luna Jde J, Garcia-Latorre E, Tsutsumi V, Shibayama M. Characterization of brain inflammation during primary amoebic meningoencephalitis. *Parasitology international* 2008;57:307-313.
- [32] De Jonckheere JF. Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 2011;11:1520-1528.
- [33] Valenzuela G, Lopez-Corella E, De Jonckheere JF. Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from northwestern Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1984;78:558-559.
- [34] Visvesvara GS, Martínez AJ, Theodore FH, Daggett PM, Sawyer TK. *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections: Review. *Reviews of infectious diseases* 1990;12:490.

- [35] Goswick SM, Brenner GM. Activities of therapeutic agents against *Naegleria fowleri* *in vitro* and in a mouse model of primary amebic meningoencephalitis. *The Journal of parasitology* 2003;89:837-842.
- [36] Kobayashi GS, Medoff G. Antifungal agents: recent developments. *Annual review of microbiology* 1977;31:291-308.
- [37] Belofsky G, Carreno R, Goswick SM, John DT. Activity of isoflavans of *Dalea aurea* (Fabaceae) against the opportunistic ameba *Naegleria fowleri*. *Planta medica* 2006;72:383-386.
- [38] Rates SM. Plants as source of drugs. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology* 2001;39:603-613.
- [39] Morón RJF, Jardinez MJB. La medicina tradicional en las universidades médicas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 1997;2:35-41.
- [40] Aguilar A, Camacho JR. Uso popular de las plantas medicinales y su distribución por aparatos y sistemas. *Archivos de Investigación Médica* 1984;6:13-14.
- [41] Muñoz-Concha D, Vogel H, Razmili I. Variación de compuestos químicos en hojas de poblaciones de *Drymis* spp. (Magnoliophyta: Winteraceae) en Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 2004;77:43-50.
- [42] Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG. Natural Products (Secondary Metabolites). In: B. B, Grisse W, Jones. R, editors. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Estados Unidos: American Society of Plants Physiology, 2002: 1250-1318.
- [43] Trease GE, Evans WC. *Farmacognosia*. España: McGraw Hill, 1991.
- [44] Tyler VE. *Farmacognosia*. Buenos Aires, Argentina: El Ateneo, 1979.
- [45] Lock O. *Investigación Fitoquímica: métodos de estudio de productos naturales*. Lima, Perú: Pontificia Universidad Católica del Perú, 1994.
- [46] Kuklinski C. *Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. España: Omega, 2000.
- [47] Araujo JD, Salas RA. Actividad antimicrobiana de plantas. *Científica* 2008;6:6-18.
- [48] Wink M. *Functions of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology*. Sheffield, England: Sheffield Academic Press, 1999.

- [49] Evans PH, Becerra JX, Venable DL, Bowers WS. Chemical analysis of squirt-un defense in *Bursera* and counterdefense by chrysomelid beetles. *Journal Chemical Ecology* 2000;26:745-754.
- [50] Rzedowski J, Medina LR, Rzedowski GC. Las especies de *Bursera* (Burseraceae) en la cuenca superior del río Papaloapan (México). *Acta Botánica Mexicana* 2004;66:23-151.
- [51] Peraza SSR, Salazar ANE, Peña RLMJ. A new triterpene from the resin of *Bursera simaruba* (L.)Sarg. y *Cedrela odorata* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 1995;13:1-5.
- [52] Syamasundar KV, Mallavarapu GR, Muralikrishna E. Two triterpenoid lactones from the resin of *Bursera delpechiana*. *Phytochemistry* 1995;40:337-339.
- [53] López HLR. Propiedades medicinales y determinación de los compuestos del aceite esencial de *Bursera morelensis* Ramírez. Lab Farmacognosia. México: UNAM FES Iztacala, 2011: 64.
- [54] Rojas SB. Variación temporal en la composición química del aceite esencial de *Bursera arida* (Rose) Standl., y validación de su actividad antimicrobiana. Lab Farmacognosia. México: UNAM, 2012: 71.
- [55] Vásquez VM. Estudio preliminar de la actividad antimicrobiana del extracto de la parte aérea de algunas especies del género *Bursera*. Lab Farmacognosia. 2012: UNAM, 2012: 14.
- [56] Domínguez XA. Métodos de investigación fitoquímica. México: Limusa, 1973.
- [57] Geran RI, Greenberg HS, McDonald MM, Schumacher AM, Abbott BJ. Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumor and other biological systems. *Cancer Chemother Rep* 1972;3:17-19.
- [58] Swanson SM, Pezzuto JM. Bioscreening technique for cytotoxicity potential and ability to inhibit macromolecule biosynthesis. In: Thompson EB, Ed VCH, editors. *Drug bioscreening: drug evaluation techniques in pharmacology*. New York, 1990: 273-297.

- [59] Lim L, Jackson-Lewis V, Wong LC, Shui GH, Goh AX, Kesavapany S, et al. Lanosterol induces mitochondrial uncoupling and protects dopaminergic neurons from cell death in a model for Parkinson's disease. *Cell death and differentiation* 2012;19:416-427.
- [60] Marsan M, Muller I, Milon A. Ability on clionasterol and poriferasterol (24-epimers of sitosterol and stigmasterol) to regulate membrane lipid dynamics. *Chemistry and Physics of Lipids* 1996;84:5.
- [61] Martins de Lima T, Cury-Boaventura MF, Giannocco G, Nunes MT, Curi R. Comparative toxicity of fatty acids on a macrophage cell line (J774). *Clinical science* 2006;111:307-317.
- [62] Sharawy MH, El-Agamy DS, Shalaby AA, Ammar el SM. Protective effects of methyl palmitate against silica-induced pulmonary fibrosis in rats. *International immunopharmacology* 2013;16:191-198.
- [63] Saeed NM, El-Demerdash E, Abdel-Rahman HM, Algandaby MM, Al-Abbasi FA, Abdel-Naim AB. Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models. *Toxicology and applied pharmacology* 2012;264:84-93.
- [64] Jiang H, Liang C, Liu X, Jiang Q, He Z, Wu J, et al. Palmitic acid promotes endothelial progenitor cells apoptosis via p38 and JNK mitogen-activated protein kinase pathways. *Atherosclerosis* 2010;210:71-77.
- [65] Hernandez-Diaz G, Alexander-Aguilera A, Arzaba-Villalba A, Soto-Rodriguez I, Garcia HS. Effect of conjugated linoleic acid on body fat, tumor necrosis factor alpha and resistin secretion in spontaneously hypertensive rats. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 2010;82:105-109.
- [66] Lopes PA, Martins SV, Viana RS, Ramalho RM, Alfaia CM, Pinho MS, et al. Contrasting apoptotic responses of conjugated linoleic acid in the liver of obese Zucker rats fed palm oil or ovine fat. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 2011;85:89-96.

- [67] Miglietta A, Bozzo F, Bocca C, Gabriel L, Trombetta A, Belotti S, et al. Conjugated linoleic acid induces apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells through ERK/MAPK signalling and mitochondrial pathway. *Cancer letters* 2006;234:149-157.
- [68] Castillo GE, González-Rosende ME, Dea AMA, Galiana RC. Productos naturales con actividad leishmanicida y tripanocida. *Revista de Fitoterapia* 2011;11:8.
- [69] Chen JY, Tang YA, Li WS, Chiou YC, Shieh JM, Wang YC. A synthetic podophyllotoxin derivative exerts anti-cancer effects by inducing mitotic arrest and pro-apoptotic ER stress in lung cancer preclinical models. *PloS one* 2013;8:e62082.
- [70] Li WQ, Wang XL, Qian K, Liu YQ, Wang CY, Yang L, et al. Design, synthesis and potent cytotoxic activity of novel podophyllotoxin derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2013;21:2363-2369.
- [71] Uddin MJ, Smithson DC, Brown KM, Crews BC, Connelly M, Zhu F, et al. Podophyllotoxin analogues active versus *Trypanosoma brucei*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2010;20:1787-1791.
- [72] Gordaliza M, Garcia PA, del Corral JM, Castro MA, Gomez-Zurita MA. Podophyllotoxin: distribution, sources, applications and new cytotoxic derivatives. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxicology* 2004;44:441-459.
- [73] Chen SW, Wang YH, Jin Y, Tian X, Zheng YT, Luo DQ, et al. Synthesis and anti-HIV-1 activities of novel podophyllotoxin derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2007;17:2091-2095.
- [74] Song YN, Zhang HL, Chang CJ, Bollag DM. Cytotoxic cyclolignans from *Koelreuteria henryi*. *Journal of natural products* 1994;57:1670-1674.
- [75] Yang CJ, Wang CS, Hung JY, Huang HW, Chia YC, Wang PH, et al. Pyrogallol induces G2-M arrest in human lung cancer cells and inhibits tumor growth in an animal model. *Lung cancer* 2009;66:162-168.
- [76] Han YH, Park WH. Pyrogallol-induced calf pulmonary arterial endothelial cell death via caspase-dependent apoptosis and GSH depletion. *Food and chemical toxicology*

- : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association 2010;48:558-563.
- [77] Otsuka M, Kenmoku H, Ogawa M, Okada K, Mitsuhashi W, Sassa T, et al. Emission of ent-kaurene, a diterpenoid hydrocarbon precursor for gibberellins, into the headspace from plants. *Plant & cell physiology* 2004;45:1129-1138.
- [78] Lizarte Neto FS, Tirapelli DP, Ambrosio SR, Tirapelli CR, Oliveira FM, Novais PC, et al. 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 = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica* [et al] 2013;46:71-78.
- [79] Zhang X, Xiong H, Liu L. Effects of taraxasterol on inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Journal of ethnopharmacology* 2012;141:206-211.
- [80] Sureshkumar D, Senthilraja P, Kalavathy S. In-silico docking analysis of *Calotropis gigantea* (L.) R.Br derived compound against anti-cervical cancer activity. *World Research Journal of Computer-Aided Drug Design* 2012;1:4.
- [81] Bransova J, Brtko J, Uher M, Novotny L. Antileukemic activity of 4-pyranone derivatives. *The international journal of biochemistry & cell biology* 1995;27:701-706.
- [82] Ban JO, Hwang IG, Kim TM, Hwang BY, Lee US, Jeong HS, et al. Anti-proliferate and pro-apoptotic effects of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyranone through inactivation of NF-kappaB in human colon cancer cells. *Archives of pharmacal research* 2007;30:1455-1463.
- [83] Canales M, Hernandez T, Caballero J, Romo de Vivar A, Avila G, Duran A, et al. Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlan, Puebla, Mexico. *Journal of ethnopharmacology* 2005;97:429-439.

- [84] Black BA, Sun C, Zhao YY, Ganzle MG, Curtis JM. Antifungal Lipids Produced by Lactobacilli and Their Structural Identification by Normal Phase LC/Atmospheric Pressure Photoionization-MS/MS. *Journal of agricultural and food chemistry* 2013;61:5338-5346.
- [85] Hirasawa M, Takada K. Multiple effects of green tea catechin on the antifungal activity of antimycotics against *Candida albicans*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2004;53:225-229.
- [86] Jung K, Miyagawa M, Matsuda A, Amagai Y, Oida K, Okamoto Y, et al. Antifungal effects of palmitic acid salt and ultrapure soft water on *Scedosporium apiospermum*. *Journal of applied microbiology* 2013;115:711-717.
- [87] Kumar AK, Singh SK, Kumar BS, Doble M. Synthesis, anti-fungal activity evaluation and QSAR studies on podophyllotoxin derivatives. *Central European Journal of Chemistry* 2007;5:17.
- [88] Novak AF, Fisher MJ, Fore SP, Dupuy HP. Antimycotic activity of some fatty acid derivatives. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 1964;41:3.
- [89] Ocharo KM. Isolation and identification of antibacterial and antifungal compounds from selected Kenyan medicinal plants. *MST-Chemistry* 2012.
- [90] Rosas-Arreguin P, Arteaga-Nieto P, Reynoso-Orozco R, Villagomez-Castro JC, Sabanero-Lopez M, Puebla-Perez AM, et al. *Bursera fagaroides*, effect of an ethanolic extract on ornithine decarboxylase (ODC) activity in vitro and on the growth of *Entamoeba histolytica*. *Experimental parasitology* 2008;119:398-402.
- [91] Monzote L, Hill GM, Cuellar A, Scull R, Setzer WN. Chemical composition and anti-proliferative properties of *Bursera graveolens* essential oil. *Natural product communications* 2012;7:1531-1534.
- [92] Lopez-Aroche U, Salinas-Sanchez DO, Mendoza de Gives P, Lopez-Arellano ME, Liebano-Hernandez E, Valladares-Cisneros G, et al. In vitro nematicidal effects of medicinal plants from the Sierra de Huautla, Biosphere Reserve, Morelos, Mexico against *Haemonchus contortus* infective larvae. *Journal of helminthology* 2008;82:25-31.

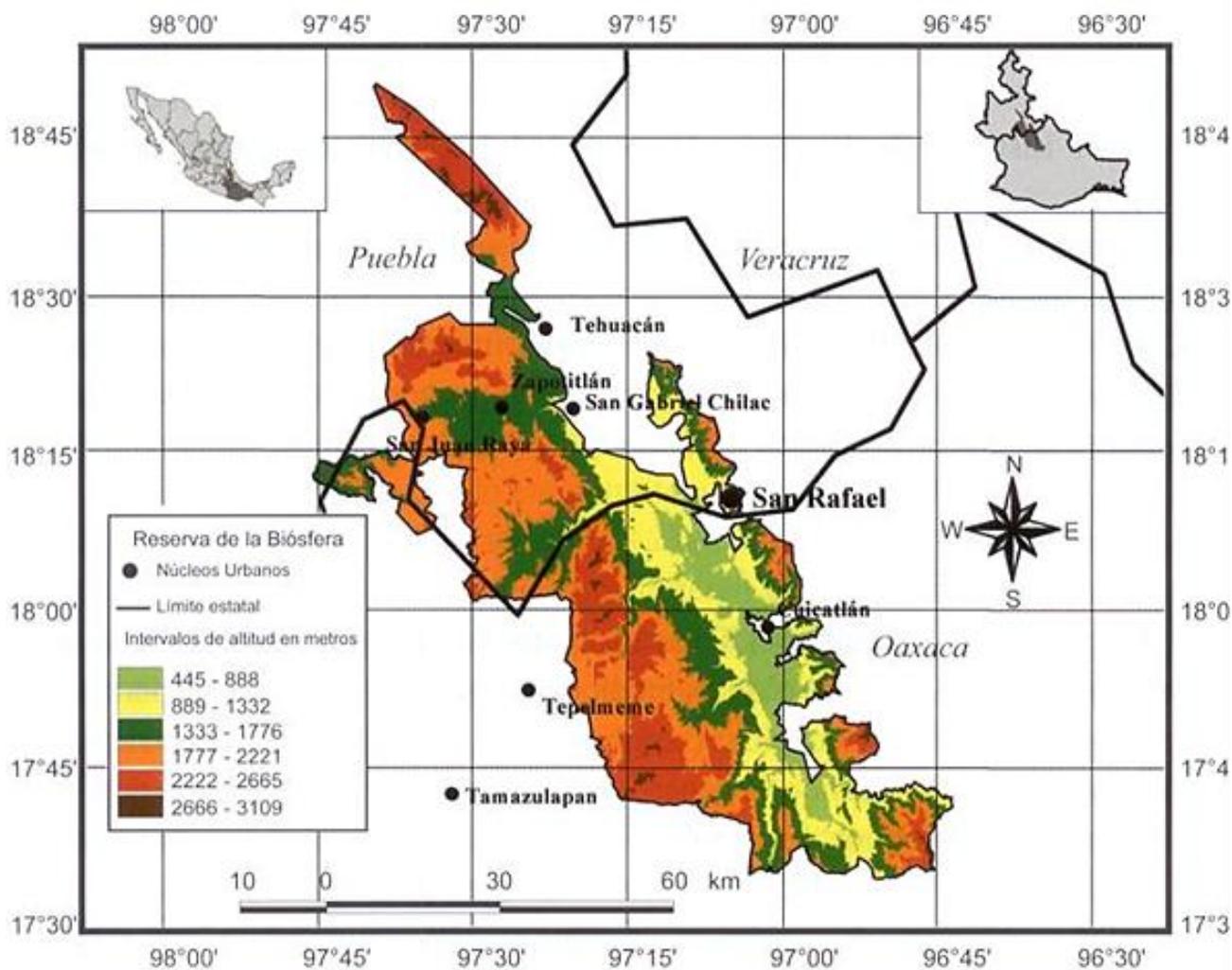
- [93] Pineda-Alonso D, Salucci M, Lázaro R, Maiani G, Ferro-Luzzi A. Capacidad antioxidante y potencial de sinergismo entre los principales constituyentes antioxidantes de algunos alimentos. *Rev Cubana Aliment Nutr* 1999;13:93.
- [94] Kasibhatla S, Tseng B. Why target apoptosis in cancer treatment? *Molecular cancer therapeutics* 2003;2:573-580.
- [95] Peraza-Sanchez SR, Pena-Rodriguez LM. Isolation of picropolygamain from the resin of *Bursera simaruba*. *Journal of natural products* 1992;55:1768-1771.
- [96] Rojas-Sepulveda AM, Mendieta-Serrano M, Mojica MY, Salas-Vidal E, Marquina S, Villarreal ML, et al. Cytotoxic podophyllotoxin type-lignans from the steam bark of *Bursera fagaroides* var. *fagaroides*. *Molecules* 2012;17:9506-9519.
- [97] García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koopen. México: Instituto de Geografía, UNAM, 1981.
- [98] Medina SJ. Determinación del vigor y estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (Cactáceas) a lo largo de una cronosecuencia edáfica. México: UNAM, 2000: 35.
- [99] Valiente BL. Patrones de precipitación en el valle semiárido de Tehuacán, Puebla, México. México: UNAM, 1991: 65.
- [100] Salcedo-Sánchez B. Insectos precortesianos de la cuenca de Coxcatlán, del Valle de Tehuacán, Puebla. Facultad de Ciencias. México: UNAM, 1997: 71.
- [101] Valiente-Banuet A, Alcántara A, Dávila P, Flores-Hernández N, Arizmendi MC, Ortega-Ramírez J, et al. La Vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 2000;67:25-75.
- [102] Fernández BMN. Análisis de la dinámica de comunidades vegetales con relación a la evolución del paisaje en la zona semiárida de Coxcatlán, Puebla. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1999: 98.
- [103] Rosas LR. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. México: UNAM, 2003: 94.
- [104] Salud Sd. Censo de Población 2001. In: Comunidad Cdsdl, editor. Puebla, México: IMSS, Ayuntamiento de Coxcatlán, 2001: 10.

- [105] Rzedowski J. Proyecto Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Memoria de la primera Muestra “Los Recursos Vegetales de Michoacán”. Morelia, Michoacán, México, 1992: 3-6.
- [106] Medina LR. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán. México: Instituto de Biología, UNAM, 2008.

## APÉNDICE 1

### Zona de colecta

Las especies *B. aptera*, *B. arida* y *B. morelensis* se colectaron 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, con un rango de altitud de 957 a 1400 m.s.n.m. (Figura 4).



## **Clima**

El clima es de tipo Bs (h') w" (w) de acuerdo con la clasificación de Köppen, modificado por García (1981) [97], el cual corresponde a un tipo seco o árido con lluvias en verano y temperatura media anual de 22 °C, variando entre 25 °C en abril y mayo, y 18 °C en enero [98]. Valiente (1991) [99] 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 casi 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 Tomellín, 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 alcanzando la Sierra Madre de Oaxaca en el noreste [100].

## **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 *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeberg son particularmente abundantes [101].

Fernández (1999) [102], reconoció por nivel topográfico los siguientes tipos de vegetación en San Rafael: Cordonal de *Pachycereus weberi* (J. Coulter) Backeberg, que se caracteriza por el predominio de cactáceas columnares (cardones).

Chiotillal de *Escontria 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* (Brandege), *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 *Fouqueiria formosa*, *Bursera aptera* (Ramírez), *Mimosa polyantha*, *Ceiba parvifolia* (Rose), *Manihotoides pasiflora* (Brandege), *Senna wisliseni* (DC), *Mimosa luisiana* (Brandege) y *Sanvitalia fructicosa*. Localizada en el nivel más alto, de 3.5 a 5 m por encima del nivel basal. La densidad de plantas en los estratos arbustivos y herbáceos es muy baja, dominado en su totalidad por *Sanvitalia fructicosa*.

En un estudio etnobotánico realizado en San Rafael [103], 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 Asteraceae, 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) [104]. La mayor parte de la población actual es nativa de San Rafael y la actividad económica más importante 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 [103].

## APÉNDICE 2

### Descripción de las 3 especies de *Bursera*

#### ***Bursera aptera* Ramírez [50]**

Conocida como copalillo, cuajote, cuajote amarillo, cuajote verde, coxinyotl iztac (lengua náhuatl), cuachital o cuajote blanco.

Árbol o a veces arbusto dioico, hasta de 8 m de alto, con resina abundante, aromático y glabro; tronco con corteza interna verde mate o verde brillante, la externa amarillenta y exfoliante en láminas papiráceas, ramillas glabras; hojas imparipinnadas, peciolo de ca. 0.5 cm de largo, glabro, lámina de 1 a 7 (8.5) cm de largo y 0.6 a 3 cm de ancho, raquis sin alas, foliolos 7 a 19, sésiles a subsésiles, elípticos a ovados u obovados, de 4 a 12(15) mm de largo y 2 a 5(6) mm de ancho, ápice agudo a redondeado, base cuneada a redondeada, margen generalmente entero, de textura membranácea a cartácea, glabros, nervadura principal oscura y poco evidente en el haz, en el envés amarillenta y prominente, las secundarias inconspicuas; flores por lo general solitarias o a veces dispuestas en grupos de 2 o 3, glabras, bractéolas triangular-acuminadas, de 1 a 1.2 mm de largo, de base ensanchada, glabras, pedicelos de 1 a 1.2 mm de largo, glabros; flores masculinas trímeras o a veces tetrámeras, hasta de 8 mm de largo (incluyendo el pedicelo), lóbulos del cáliz triangulares, desiguales, de 1.5 a 3 mm de largo, glabros, borde al secar con escasos tricomas cortos, pétalos de color amarillo, rojizo o blanquecino, elíptico-oblongos, de ca. 5 mm de largo y 1 a 1.5 mm de ancho, cuculados, coriáceos, ápice encorvado, glabros, estambres 6, filamentos de ca. 1.5 mm de largo, anteras oblongas, de ca. 2 mm de largo; flores femeninas trímeras, hasta de 6 mm de largo (incluyendo el pedicelo), lóbulos del cáliz iguales, cuculadodeltoides, de 1.2 a 1.6 mm de largo, reflexos en la madurez, pétalos cuculadoaquillados, de 4 a 5 mm de largo, estaminodios con anteras de ca. 1 mm de largo, ovario trilocular, estilo de menos de 1 mm de largo, estigmas 3; frutos solitarios o agrupados por varios en los ápices de ramillas cortas, trivalvados, globosos a ovoides, apiculados, escasamente triquetros, de 6 a 7 mm de largo y de 5 a 6 mm de ancho, rojizos

a pardos en la madurez, glabros, hueso de 5 a 6 mm de diámetro, totalmente cubierto por un pseudoarilo amarillo o blanquecino.

Habita en el bosque tropical caducifolio y en el matorral xerófilo, preferentemente en suelos de origen calizo, en altitudes entre 550 y 1950 m. A veces se encuentra compartiendo el hábitat con *B. fagaroides*, *B. morelensis* y *B. schlechtendalii*. Florece de finales de abril a mediados de julio. Sin follaje de noviembre a mayo.

El látex es utilizado mezclado con pomada para el tratamiento de picaduras de mosquitos. La goma que secreta el tallo se usa como veneno para perros, mezclada con el alimento del animal.

### **Taxonomía**

Reino Plantae

Subreino Tracheobionta

División Magnoliophyta

Clase Magnoliopsida

Subclase Rosidae

Orden Sapindales

Familia Burseraceae

Género *Bursera*

Especie *B. aptera*

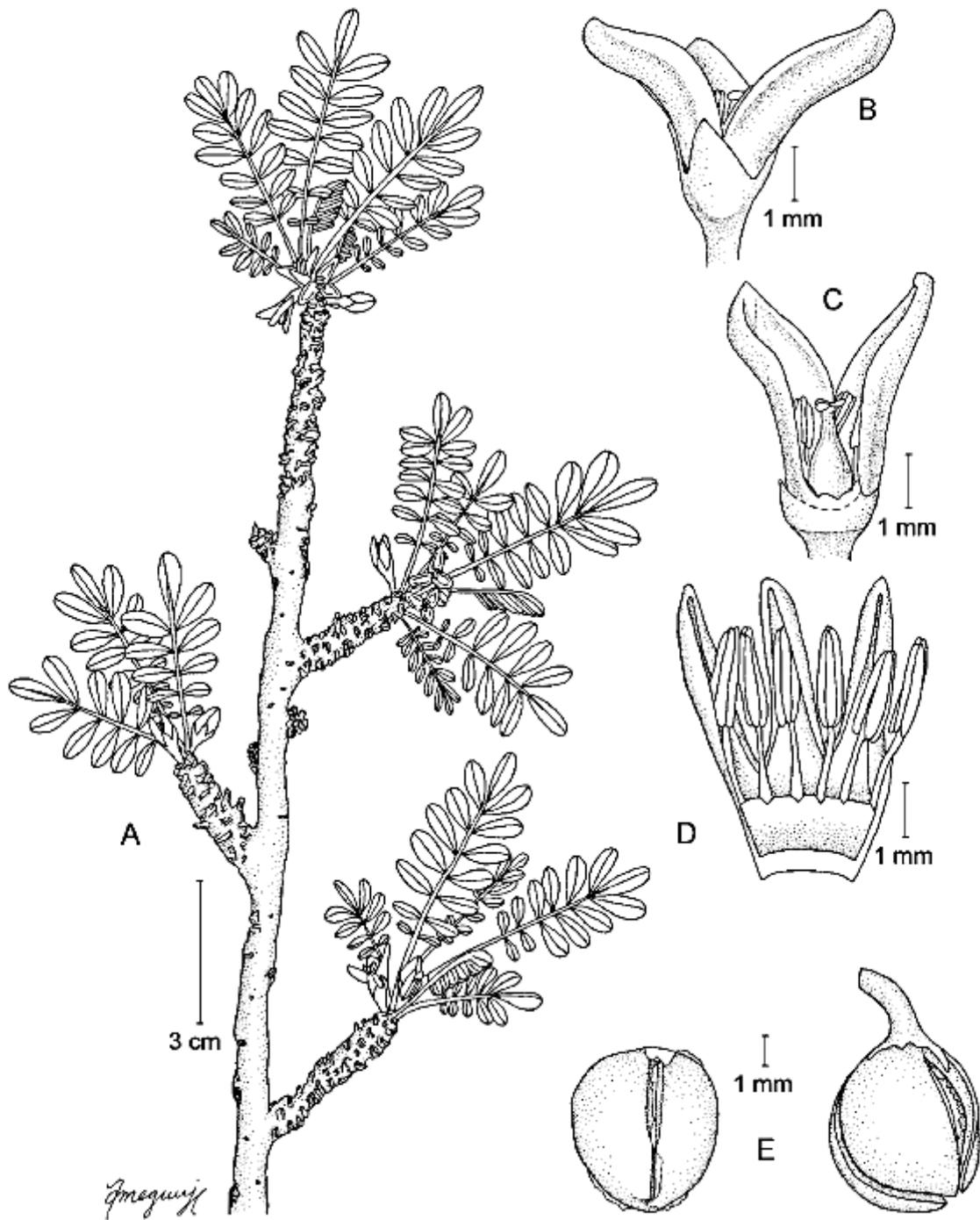


Figura 9. Anatomía vegetal de *Bursera aptera* Ramírez. A. rama con hojas y flores masculinas; B. flor femenina en vista externa; C. flor femenina desprovista de un pétalo y 3 estaminodios; D. flor masculina disecada; E. frutos. Ilustrado por Megumi Andrade [50].

### ***Bursera morelensis* Ramírez [105]**

Es un árbol dioico, hasta de 10 (13) m de alto, con abundante resina aceitosa con olor a aguarrás en la corteza y en las partes verdes, glabro, aunque algunas porciones muy tiernas cubiertas con papilas blanquecinas diminutas; tronco hasta de 40 cm 25 de diámetro, su corteza externa rojiza, exfoliante en láminas delgadas; hojas de 5 a 11 cm de largo y 1.5 a 3.5 (4.5) cm de ancho, peciolo acanalado, de 1 a 2 cm de largo, foliolos (15) 33 a 45 (51), raquis con alas inconspicuas, los foliolos sésiles o subsésiles, linear-oblongos a linear-lanceolados, de 7 a 17 (22) mm de largo y (1.3) 1.6 a 2.5 mm de ancho, disminuyendo de tamaño hacia los extremos de la hoja, ápice agudo, margen entero, la nervadura central conspicua, las laterales poco marcadas, peciolo acanalado, de 1 a 2 cm de largo; catafilos inconspicuos, pronto caedizos; las flores masculinas en inflorescencias racimosas o paniculadas hasta de 5 cm de largo, provistas de bracteolas filiformes a subuladas, caedizas, flores en su gran mayoría pentámeras, a veces algunas 3 ó 4-meras, lóbulos del cáliz angostamente triangulares, de 0.7 a 1.3 mm de largo, agudos en el ápice, pétalos amarillentos a verdosos o blanquecinos, oblongos a lanceolados, de 3 a 6 mm de largo, cuculados, estambres todos aproximadamente al mismo nivel, filamentos de  $\pm 1$  mm de largo, anteras oblongas, de 1.5 a 2 mm de largo; las flores femeninas por lo común solitarias, a veces por pares o en una panícula corta, por lo general trímeras, a veces algunas 4 ó 5-meras, similares en forma y tamaño a las masculinas, anteras de los estaminodios de  $\pm 1$  mm de largo, ovario trilocular; pedúnculos en fruto notablemente engrosados y encorvados, "drupa" trivalvada, oblicuamente ovoide, de 5 a 10 mm de largo y 4 a 6 mm de ancho, más o menos pronunciadamente apiculada, el hueso recubierto totalmente por un pseudoarilo amarillo.

Este árbol es un componente ocasional del bosque tropical caducifolio, pero en la región de la Flora más frecuentemente forma bosquetes o se presenta en forma aislada en medio del matorral xerófilo, sobre todo en laderas de pendiente pronunciada de cañadas profundas, preferentemente de exposición sur. De una Altitud 600-1500 msnm. Florece de abril a junio. Permanece con follaje de mayo a noviembre (diciembre). La especie es

muy común en la parte oriental de la depresión del Balsas, extendiéndose hacia los valles de los ríos Tehuantepec y Papaloapan; también reaparece en forma dispersa en los cañones de muchos de los afluentes del río Pánuco. San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, México, Morelos, Puebla, Guerrero, Oaxaca.



Figura 10. Ejemplar de *B. morelensis*

***Bursera arida* (Rose) Standley 1923 [106]**

Arbusto o a veces árbol bajo dioico, de 0.8-4 m de alto. Troncos hasta 20.0 cm diámetro, corteza externa exfoliante rojizo-anaranjada o pardo-amarillenta, descarpela en tiras grandes, la interna verdosa, con resina aromática, ramas jóvenes rojizas, densamente hirsútulas, ramas maduras gris oscuro, glabras; catafilos inconspicuos, pronto deciduos. Hojas imparipinnadas, pecíolos 3-6 mm largo, densa a escasamente hirsútulos, ligeramente alados; láminas (0.8-) 1.3-2.5 cm largo, aprox. 1.0 cm ancho, ovadas en contorno general, raquis estrechamente alado, margen hirsútulo, peciólulos laterales ca. 1.0 mm largo, generalmente presentes en los folíolos proximales, el terminal hasta 3.0 mm largo; folíolos (3- ) 5-9(-11), 4.0-6.0 (-9.0) mm largo, 1.3-2.0 mm ancho, oblongos a obovados, base cuneada, ápice agudo a obtuso, margen entero, cartáceos, haz y envés glabros, sólo la nervadura central evidente. Inflorescencias reducidas a flores solitarias, subsésiles. Flores rojizas, las masculinas 3(-4)-meras, 2.0-2.5 mm largo, cáliz con lóbulos ca. 1.5 mm largo, triangulares, pilósulos por fuera, corola con pétalos aprox. 2.0 mm largo, aprox. 0.5 mm ancho, cuculados, pilósulos por fuera, estambres 6(-8), filamentos ca. 0.4 mm largo, anteras 0.7- 0.8 mm largo, oblongas, gineceo vestigial; las femeninas 3-meras, semejantes a las masculinas, pero cáliz con lóbulos 1.5-2.0 mm largo, sobre pedicelos 0.5-1.0 mm largo, pilosos, estaminodios con anteras ca. 0.3 mm largo, ovario 3-locular, glabro, estilo menor 1.0 mm largo, estigmas 3. Frutos 1-2, con pedúnculos 1.0-2.0 mm largo, engrosados y pilosos, 3-valvados, 4.0-5.0 mm largo, hasta 3.0 mm ancho, trígonos u ovoidales, apiculados, en la madurez oscuros, pilósulos o glabros; huesos 3.0-5.0 mm largo, 2.5-3.0 mm diámetro ovoidales o trígonos, totalmente cubiertos por un pseudoarilo amarillo pálido [106].

Aspectos ecológicos: esta especie florece y fructifica durante el periodo de sequía, ya que durante el período de lluvias se dedican a crecer y formar hojas. Durante el período de secas pierde las hojas, por lo que realiza la fotosíntesis por el tallo, gracias a que se desprenden restos de su corteza. Esta especie es un árbol relativamente grande.



Figura 11. Ejemplar de *B. arida*.

1: tallos con resina, 2: fruto, 3: planta completa, 4: tallo mostrando corteza exfoliante, 5: rama con hojas y fruto. 6: hojas 7: corteza [54].