



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGÍA

**“Actividad anti-leishmánica del extracto
metanólico de *Bursera arida* (Rose)
Standl.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

GORGUA JIMÉNEZ GUSTAVO



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. MARCO AURELIO RODRÍGUEZ
MONROY**



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, Facultad de Ciencias y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy y por sus excelentes consejos y tiempo invertido en la realización de este trabajo.

Al M. en C. Oscar de Jesús Nieto Yáñez por su tiempo, experiencias y consejos compartidos durante la realización de esta tesis.

A la Dra. María Margarita Canales Martínez por haber aportado el material vegetal, pero aún más importante, sus consejos y opiniones durante todo el tiempo de realización de este trabajo.

A la Dra. Miriam Rodríguez Sosa por proporcionar la cepa de parásitos durante toda la realización del trabajo.

Al Dr. Adolfo Andrade Cetto, Dra. María Margarita Canales Martínez, Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy, Dra. Eva Aguirre Hernández, M. en C. Karla Stephanie Martínez Elizalde, por su tiempo invertido en la revisión del trabajo.

Este trabajo fue financiado por PAPIIT IN213713, IN211614, IN212412.

Dedicatorias

Este trabajo está dedicado a mi **Ma**, por todo el tiempo y esfuerzo invertido en mí, por cada uno de sus consejos y llamadas de atención que solo tú me diste cuando los merecía, además de las esperanzas en mí, sabiendo que yo saldría adelante y no me dejaste caer en ningún momento. Este trabajo es tuyo también, Te Quiero Muchísimo.

A mi **Papá**, por todo el esfuerzo que haces día a día para que la familia salga adelante, siempre nos dices que la escuela es lo único que nos vas a dejar, este es un paso más en esta vida, un paso de toda la familia.

A mi hermana **Tintilin**, este es un esfuerzo de todos, me tocó ser el primero pero atrás vienen tú y el Fer, échale los kilos hermana. PAZ

A mi carnalito, **Fer** este es el primero de 3 trabajos de titulación, sigue la Jacque y luego tú, esto es solo un ejemplo de que si se puede.

A **Mayra**, que a pesar de cualquier cosa, sigues siendo una persona muy importante en mi vida, durante la carrera fuiste un gran impulso para seguir adelante, compartimos tiempo, experiencias, risas, compartimos parte de nuestra vida. Gracias por todo May May.

A mi Banda Ciencias, **May, Daf, Yair, Oscar, Luis, Eu, Marivi**, por estos años de amistad, en las buenas y en las malas, apoyándonos mutuamente para salir adelante. Paz hermanos.

A mis valedores del labo, **Sensei, Alonso, Nelly, Judith, Vane, Mario**, por el coto que se arma en el laboratorio, risas y desmadre. Paz hermanos.

A mis vales del labo de Farma que nos apoyaron a lo largo de este sinuoso camino, y que estuvieron alentándonos a seguir adelante.

A las Chicas de Odonto, Ximena, Belén, Aris, Karen gracias por las reuniones que arman en su lab, además de las buenas charlas.

Al Doc. Marco, ha sido un ejemplo a seguir y una meta a alcanzar, ante cualquier problema siempre encuentra una solución; por aquellas conversaciones que iban de lo académico hasta lo cotidiano, de lo intangible a lo concreto, aquel consejo de tener un plan B, lo puse en marcha. ¡Muchas Gracias Ese Doc!

A la Doc. Margarita, por el apoyo incondicional en el día a día, por sus palabras de aliento a lo largo de los experimentos, sus comentarios, apreciaciones y críticas que hicieron que esta tesis resultara mejor de lo que proyectaba.

Por último y no menos importante a mi amigo Román, que el poco tiempo que llevamos de conocernos, en un proyecto que inicialmente a no muchos convencía, pero hoy está por los cielos y como tú has dicho “En esta vida nada esta pelado, tienes que darle y seguirle dando día con día, el punto es no rendirse y seguir tú sueño”.

**“Que sea difícil no implica que sea imposible,
que sea imposible no implica que vaya a rendirme”**

Chojín.

ÍNDICE GENERAL

<i>Índice General</i>	<i>A</i>
1. RESUMEN	1
2. Introducción	2
2.1. Leishmaniosis	2
2.2. Formas clínicas de la Leishmaniosis	2
2.2.1. Leishmaniosis Cutánea Localizada (LCL)	2
2.2.2. Leishmaniosis cutánea diseminada o difusa (LCD).	3
2.2.3. Leishmaniosis mucocutánea.	4
2.2.4. Importancia Médica y Distribución	4
2.3. Género <i>Leishmania</i> y Características del Agente.	6
2.3.1. Morfología y ciclo de vida.	7
2.4. Tratamiento	9
2.5. Metabolitos Primarios y Secundarios	10
2.5.1. Metabolismo Primario.	10
2.5.2. Metabolismo Secundario	10
2.5.3. Clases de Metabolitos de acuerdo a Avalos, 2009.	12
2.6. Medicina Tradicional	13
2.7. Descripción botánica del género <i>Bursera</i>	14
2.7.1. Distribución del género	14
1.8.2 Características de <i>B. arida</i>	15
1.8.3 Usos Tradicionales	18
1.8.4 Farmacología de <i>B. arida</i>	19
3. Justificación	20
4. OBJETIVO GENERAL	21
4.1. OBJETIVOS PARTICULARES	21
5. Materiales y metodos	22
Colecta de material.	22
Obtención del extracto.	22
Infección de ratones con <i>L. mexicana</i> .	22
Mantenimiento de la cepa <i>Leishmania mexicana</i>	23
Curva patrón para los ensayos de viabilidad de los promastigotes de <i>L. mexicana</i> .	23
Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antileishmánica.	23
Análisis por citometría de flujo la externalización de fosfatidilserina en promastigotes de <i>L. mexicana</i> .	24
Determinación de la composición química del extracto por medio de Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas.	25

Evaluación de la actividad antiinflamatoria mediante el modelo de Inflamación edema plantar inducido por carragenina. _____	25
Prueba de citotoxicidad celular <i>in vitro</i> con Cristal Violeta. _____	26
6. Resultados _____	26
Rendimiento del Extracto _____	26
Realización de la curva patrón. _____	26
Porcentaje de mortalidad, evaluado mediante el ensayo de viabilidad celular por MTT. _____	27
Determinación del efecto apoptótico en promastigotes inducida por el extracto utilizando el kit de Anexina V por citometría de flujo. _____	30
Citotoxicidad con macrófagos _____	31
Composición química del extracto de <i>B. arida</i> por CG-EM. _____	33
Actividad anti-inflamatoria del extracto metanólico de <i>B. arida</i>, mediante el modelo de edema plantar generado por carragenina. _____	34
7. Discusión _____	36
8. Conclusiones _____	40
9. REFERENCIAS. _____	41
10. Apéndices. _____	53
10.1. Apéndice 1. _____	53
10.1.2. Zona de Colecta _____	53
10.1.3. Clima _____	53
10.1.4. Hidrografía. _____	54
10.1.5. Edafología _____	54
10.1.6. Vegetación _____	54
10.1.7. Población. _____	55
10.2. Apéndice 2. _____	55
10.2.1. Citometría de Flujo. _____	55
10.3. Apéndice 3. _____	56
10.3.1. Tinción de Cristal Violeta (Badisa et al 2003). _____	56
10.4 . Apéndice 4. _____	57

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Individuo del género <i>Lutzomyia</i> _____	2
Figura 2. Lesión ulcerosa típica de LCL _____	3
Figura 3. Leishmaniosis cutánea difusa _____	3
Figura 4. Leishmaniosis mucocutánea _____	4
Figura 5. Regionalización actual de la parasitosis en nuestro país. _____	5

<i>Cuadro 1.- Especies de Leishmania que afectan al ser humano.</i>	6
<i>Figura 6. Morfología de los promastigotes y amastigotes de Leishmania mexicana</i>	7
<i>Figura 7. Ciclo de vida de Leishmania</i>	8
<i>Figura 8. Elementos básicos del metabolismo primario y en relación con el metabolismo secundario de plantas.</i>	11
<i>Figura 9. Anatomía vegetal de B. arida.</i>	17
<i>Cuadro 2. Datos etnobotánicos de B. arida (Rose) Standl, 1929.</i>	18
<i>Cuadro 3: Rendimiento del extracto metanólico de B. arida.</i>	26
<i>Figura 10. Curva patrón de promastigotes de L. mexicana.</i>	27
<i>Figura 11. Estimación de la CL₅₀ contra promastigotes de L. mexicana.</i>	28
<i>Figura 12. Efecto in vitro del medicamento Estibogluconato de Sodio.</i>	29
<i>Figura 13. Efecto in vitro del medicamento Anfotericina B.</i>	29
<i>Cuadro 4. Cuadro de tratamientos utilizados.</i>	30
<i>Figura 14. Dotplots de apoptosis celular.</i>	31
<i>Figura 15. Interacción del extracto de B. arida sobre macrófagos de la línea celular P388.</i>	32
<i>Cuadro 5 Compuestos determinados del extracto metanólico de B. arida en el CG-E.</i>	33
<i>Figura 16. Porcentajes de la cinética de inflamación del extracto de B. arida.</i>	35
<i>Figura 17. Evaluación de la actividad anti-inflamatoria del extracto de B. arida.</i>	36
<i>Figura 21. Poblado de San Rafael</i>	53
<i>Figura 22. Cromatograma del extracto metanólico de B. arida (CG-EM).</i>	57
<i>Figura 23. Patrón de fragmentación generado por: A) Base de datos WILEY 275; B: Pirogallol, detectado en el extracto metanólico de B. arida.</i>	58
<i>Figura 24. Patrón de fragmentación generado por: A) Base de datos WILEY 275; B: Metyl Palmítato detectado en el extracto metanólico de B. arida.</i>	59
<i>Figura 25. Patrón de fragmentación generado por: A) Base de datos WILEY 275; B: Ácido Palmítico detectado en el extracto metanólico de B. arida.</i>	60
<i>Figura 26. Patrón de fragmentación generado por: A) Base de datos WILEY 275; B: 2-Mercaptobenzotiazol detectado en el extracto metanólico de B. arida.</i>	61
<i>Figura 27. Patrón de fragmentación generado por: A) Base de datos WILEY 275; B: Metyl Lignocerato detectado en el extracto metanólico de B. arida.</i>	62
<i>Figura 28. Patrón de fragmentación generado por: A) Base de datos WILEY 275; B: Clionasterol detectado en el extracto metanólico de B. arida.</i>	63
<i>Figura 29. Patrón de fragmentación generado por: A) Base de datos WILEY 275; B: 2-Austrobailignano detectado en el extracto metanólico de B. arida.</i>	64
<i>Figura 30. Patrón de fragmentación generado por: A) Base de datos WILEY 275; B: Moretenol detectado en el extracto metanólico de B. arida.</i>	65

1. RESUMEN

En México, recientemente se ha documentado un incremento en el número de casos de Leishmaniosis cutánea localizada (LCL) causada por *Leishmania mexicana*. Después de 40 años de uso, los fármacos utilizados siguen siendo caros, además de presentar efectos secundarios, y resistencia generada por parte de los parásitos hacia estos tratamientos. Debido a esto, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para combatir esta enfermedad. Una de estas alternativas son productos naturales derivados de plantas medicinales como *Bursera arida* que presentaban una alta eficiencia en el tratamiento, las vías respiratorias, los trastornos intestinales de piel. En esta tesis se evaluó el efecto *in vitro* del extracto metanólico de *B. arida* sobre promastigotes de *L. mexicana* por el método de la viabilidad celular con MTT; Posteriormente, se evaluó la generación de apoptosis por el extracto en promastigotes *L. mexicana*, por medio del análisis de citometría de flujo con Anexina V-kit IP. Se midió la actividad anti-inflamatoria del extracto sobre el modelo de edema plantar generado por carragenina. El ensayo de citotoxicidad del extracto sobre la P-388 macrófagos se evaluó por el método de Cristal Violeta y, finalmente, se determinó la composición química del extracto por CG-EM.

El extracto de *B. arida* presentó actividad anti-leishmanica con una CL_{50} de 0,012 mg / ml; El extracto generó apoptosis en un 3% del cultivo, cabe destacar que generó una mortalidad del 70% lo cual indica una alta actividad contra leishmania. Se identificaron y se relaciona mucho con la actividad antileishmanica, apoptótica y anti-inflamatoria 6 compuestos del extracto metanólico: Pirogallol, metil palmitato, ácido palmítico, 2-mercaptobenzotiasol, lignocerato de metilo, clionasterol, 2-Austrobailignano y Moretenol; El extracto también generó inhibición de la inflamación cercana al 60% en la concentración de 500 mg / kg; Finalmente, se encontró que el extracto es citotóxico de acuerdo con los criterios de la CNI ($IC_{50} < 0.0048 \text{ mg/ml}$). Nuestros resultados sugieren que el extracto de *B. arida* muestra la actividad antileishmanica, genera un porcentaje mayor de necrosis que de apoptosis, además de inhibir la inflamación y es citotóxico. Estas propiedades biológicas se pueden explicar sobre la base de la composición química de los mismos.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Leishmaniosis

El término Leishmaniosis se refiere a un grupo de enfermedades parasitarias causada por distintas especies ubicadas dentro del género *Leishmania*, que presenta un estado flagelado ó promastigote y un estado aflagelar ó amastigote, el cual se trasmite al ser humano y a otros mamíferos, siendo el agente de transmisión la picadura de mosquitos hematófagos pilosos del género *Lutzomyia* en el continente Americano (Figura 1) y del género *Phlebotomus* en el sur de Europa, Asia y África (WHO, 2012; Velazco, 1991).



Figura 1. Individuo del género *Lutzomyia*

2.2. Formas clínicas de la Leishmaniosis

2.2.1. Leishmaniosis Cutánea Localizada (LCL)

La LCL se caracteriza por tener un nódulo único que tiende a ulcerarse, dicha úlcera es generalmente redonda, con bordes duros, hundimiento central con fondo limpio e indoloro, mientras no exista una segunda infección por bacterias u hongos (Figura 2). Esta parasitosis se puede curar espontáneamente en un periodo de 6 meses a 2 años, pero cuando se localiza en la parte superior de la oreja dicha infección es crónica y degenerativa pudiendo llevar a la mutilación del pabellón auricular.

En nuestro país esta forma clínica se le conoce como úlcera de los chicleiros, y la especie responsable es *L. mexicana* (OPS, 1994; Velazco, 1994; Becker 2006).



Figura 2. Lesión ulcerosa típica de LCL (WHO/TDR/Crump).

2.2.2. Leishmaniosis cutánea diseminada o difusa (LCD).

Esta es la forma crónica, se disemina por vía linfática o muy rara vez vía sanguínea donde se desarrollan múltiples nódulos que contienen una gran cantidad de parásitos por toda la piel, extremidades inferiores y superiores, tórax y espalda, con excepción de cuero cabelludo, palmas de manos y pies (Figura 3) (Velazco, 1994, Becker 2006).

Las lesiones provocadas no tienden a ulcerarse, con excepción de que en etapas muy avanzadas ocurra la invasión de mucosas orales y/o nasales (Velazco, 1994; Becker, 2006; Cunningham, 2002).



Figura 3. Leishmaniosis cutánea difusa o diseminada (WHO/TDR/Crump).

2.2.3. Leishmaniosis mucocutánea.

Este tipo de Leishmaniosis es de evolución crónica causada por *L. braziliensis*. Esta enfermedad causa grandes desfiguraciones, ya que las lesiones afectan a la mucosa nasal y orofaringe. También es conocida como “espundia” se manifiesta desde algunos meses hasta algunos años después de que la lesión cutánea inicial ha sanado completa o parcialmente (García, 2001).

El proceso inflamatorio a lo largo de la mucosa provoca que el paciente tenga cierta dificultad para respirar y ocasionalmente presencia de sangrados en las mucosas afectadas. Posteriormente pueden desarrollarse ulceraciones cubiertas por un exudado mucopurulento ó producirse hipertrofia de los tejidos del labio superior y la nariz. La destrucción de tejido blando y cartílago llega a ser tan severa que ocasiona pérdida de labios, parte blanda de la nariz y paladar blando. Las lesiones no llegan a curarse y la enfermedad progresa, el individuo puede morir pero debido a una infección secundaria (Figura 4) (García, 2001; Markle y Makhoul, 2004).

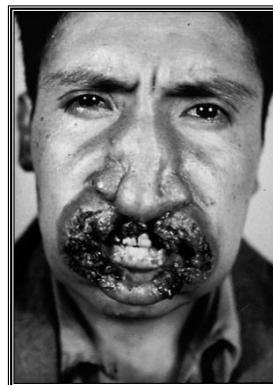


Figura 4. Leishmaniosis mucocutánea (WHO/TDR/Crump).

2.2.4. Importancia Médica y Distribución

Esta enfermedad es endémica de 88 países, en el año 2000 se estimó que esta enfermedad afectaba a cerca de 12 millones de individuos de estos entre 1.5 y 2 millones fueron casos clínicos (Desjeuz, 2004; Piscopo y Mallia, 2006).

En nuestro país, la leishmaniosis es una enfermedad que fue presentada en 1912 por Seidelin, la cual denominó úlcera de los chicleros, debido a que las lesiones se

presentan con mayor frecuencia en personas dedicadas a esta actividad. El 75% de los casos corresponden a leishmaniosis cutánea que se caracteriza por úlceras que ocasionan invalidez y cicatrices desfigurantes, el 25% corresponde a la forma visceral, que es la más severa y sin tratamiento es mortal (Fátima *et al* ,2001).

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

En México la leishmaniosis ha sido reportada en 19 estados de la República. La enfermedad no es de notificación obligatoria, por lo tanto, la prevalencia e incidencia de casos son difíciles de conocer; se estima que anualmente se presentan 400 casos nuevos de leishmaniosis en el país (Becker, 2006).



Figura 5. Muestra la regionalización actual de la parasitosis en nuestro país.

Esta enfermedad es altamente endémica de la región sureste de nuestro país, la población en riesgo incluye a más de nueve millones de habitantes en 149 municipios de 13 estados (Figura 5) (Secretaría de Salud, 2008).

2.3. Género *Leishmania* y Características del Agente.

El agente etiológico es un protozooario dimórfico que pertenece a la familia Trypanosomatidae, del género *Leishmania* (orden *Kinetoplastidia*). Morfológicamente todas las especies son similares, con diferencias en el comportamiento biológico, inmunológico, tipo de enfermedad y distribución geográfica. En el continente americano, existen reconocidas un total de 20 especies del género *Leishmania*, llamadas Leishmanias neotropicales, de las cuales 14 son conocidas porque infectan al hombre (Cuadro 1) (Rainson et al., 1994; Lainson, 1997).

Cuadro 1.- Especies de *Leishmania* que afectan al ser humano.

<i>Subgenero Leishmania</i>	<i>Autor</i>
<i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	Cunha & Chagas, 1937
<i>L. (L.) enrietti</i>	Muñiz & Medina, 1948
<i>L. (L.) mexicana</i>	Garnham, 1962
<i>L. (L.) pifanoi</i>	Medina & Romero, 1962
<i>L. (L.) hertigi</i>	Herrer, 1971
<i>L. (L.) amazonensis</i>	Lainson & Shaw, 1972
<i>L. (L.) deanei</i>	Lainson & Shaw, 1977
<i>L. (L.) aristidesi</i>	Lainson & Shaw, 1979
<i>L. (L.) garnhami</i>	Scorza y Col., 1979
<i>L. (L.) venezuelensis</i>	Bonfante-Garrido, 1980
Subgénero <i>Viannia</i>	Lainson & Shaw, 1987
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	Matta, 1916
<i>L. (V.) peruviana</i>	Velez, 1913
<i>L. (V.) guyanensis</i>	Floch, 1954
<i>L. (V.) panamensis</i>	Lainson & Shaw, 1972
<i>L. (V.) lainsoni</i>	Silveira y col., 1987
<i>L. (V.) shawi</i>	Lainson y col., 1989

<i>L. (V.) naiffi</i>	Lainson & Shaw, 1989
<i>L. (V.) colombiensis</i>	Kreutzer y col., 1991

2.3.1. Morfología y ciclo de vida.

Durante el ciclo de vida del género *Leishmania*, se presentan 2 formas de vida. El promastigote es la forma flagelada del parásito y durante este estadio se encuentra de forma extracelular, se replica en el tracto digestivo del mosquito transmisor. Este estadio tiene forma alargada, son móviles y el cuerpo mide entre 1.5 y 6.5 μm de diámetro por 15 a 20 μm de largo, mientras que el flagelo posee una longitud entre 15 y 15 μm (Figura 6). Presenta un núcleo localizado en el centro del cuerpo y un cinetoplasto (carácter único del orden *Kinetoplastida*), el flagelo nace en el cuerpo basal (delante del cinetoplasto) el cual emerge del paquete flagelar (Handman, 2001; Cunningham, 2002; Besteiro *et al.*, 2007).

El amastigote es el estadio intracelular de este parásito, este reside en la vacuola parasitófora de las células fagocíticas del hospedero que es un vertebrado, los amastigotes tienen una forma redonda u ovoidal, no tienen movimiento y miden de 2-4 μm consideradas dentro de las células nucleadas más pequeñas (Handman, 2001; Cunningham, 2002; Besteiro *et al.*, 2007).

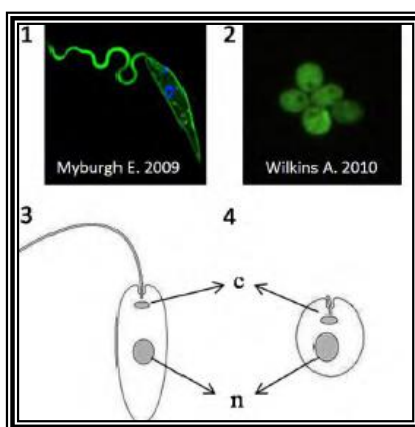


Figura 6. Morfología de los promastigotes y amastigotes de *Leishmania*. Micrografía y esquemas de promastigotes (1 y 3) y amastigotes (2 y 4); C, cinetoplasto; n, núcleo.

La infección por *Leishmania* inicia cuando un mosquito hematófago infectado con el promastigote, y este a su vez pica al huésped sano e inocular los promastigotes los cuales son fagocitados por los macrófagos de la piel. Una vez en el interior del macrófago los promastigotes permanecen en el fagolisosoma, en donde las condiciones ácidas promueven la transformación en amastigotes. Estos amastigotes se multiplican por fisión binaria y como consecuencia la célula hospedera se lisa, y los parásitos son liberados. Estos a su vez invaden otra célula fagocítica y vuelven a proliferar. Pueden circular por sangre o el líquido tisular, hasta que nuevamente son ingeridos por el mosquito y los amastigotes se transforman en promastigotes que se transforman en el tracto digestivo del mosquito. Los promastigotes maduros migran a la probóscide y el mosquito cuando pica regurgita el parásito, infectando así otras células del sistema fagocítico, cerrando así el ciclo de vida (Figura 7) (OPS, 1994).



Figura 7. Ciclo de vida de *Leishmania*

Su diagnóstico se realiza mediante un raspado de la lesión para un examen histológico o aspirado de los nódulos linfáticos para el cultivo del parásito, detectando citocinas del sistema inmune así como anticuerpos específicos de *Leishmania*.

2.4. Tratamiento

Los tratamientos convencionales comprenden a los antimoniales pentavalentes: antimoniato de meglumina (Glucantime) y estibogluconato de sodio (Pentostam). Entre los fármacos orales, se emplean: Miltefosine, un antineoplásico con efecto teratogénico, aceptado en India para el tratamiento de la leishmaniosis visceral y en América para tratar lesiones cutáneas y mucocutáneas, ketoconazol e itraconazol. Otros fármacos que actúan a nivel sistémico son: Anfotericina B, Anfotericina B liposomal (AmBisome), pentamidina (Actúa sobre síntesis de proteínas y ácidos nucleicos), paromomicina y sitamaquina (Inhibe la cadena respiratoria del parásito) (Biagi *et al.*, 2005).. En los casos de LCL, se considera a los antimoniales sistémicos o intralesionales como el tratamiento de elección. Algunos métodos físicos son eficaces en lesiones pequeñas: crioterapia, ungüento de paromomicina, e imiquimod (antiviral con características inmunomoduladoras), empleado conjuntamente con antimoniales (Álvarez *et al.*, 2005).

Estos son los fármacos de elección a pesar de su elevado costo, falta de efectividad en muchos casos, resistencias y diversos efectos secundarios como: alteraciones en la función hepática, pancreatitis bioquímica, aplanamiento de ondas T en el ECG, mialgias, artralgias, trombocitopenia y otros. En su gran mayoría, son resistentes a los antibióticos y requieren tratamientos alternativos más costosos y, muchas veces, de mayor toxicidad. La resistencia se extiende a antimicóticos, antimaláricos haciendo cada vez menos efectivos los viejos medicamentos (Álvarez *et al.*, 2005).

Los fármacos mencionados generan efectos secundarios, con la excepción de AmBisome que presenta menos efectos adversos, y tienen un alto costo. Así mismo, se han identificado farmacorresistencias. Varios antígenos son candidatos potenciales en el desarrollo de vacunas. También se están realizando estudios con proteínas recombinantes (Álvarez *et al.*, 2005). Actualmente la medicina se desarrolla en medio de una crisis global de resistencia a los antimicrobianos, descrita para patógenos tanto en el ambiente hospitalario como ambulatorio (La Barca y Araos, 2009).

Desde hace unos años la OMS ha considerado que la investigación en plantas usadas en la medicina tradicional, es un campo de estudio esencial y de alta prioridad, por lo cual

el empleo de plantas medicinales y de productos derivados de las mismas está aumentando de manera importante (Araujo y Salas, 2008).

2.5. Metabolitos Primarios y Secundarios

2.5.1. Metabolismo Primario.

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo constituye el metabolismo. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en moléculas comunes a todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos. Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas y desempeñando las mismas funciones. Se denominan metabolitos primarios (Figura 8) (Ávalos y Pérez - Urría, 2009).

2.5.2. Metabolismo Secundario

Pero a diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios (también denominados productos secundarios) (Ávalos y Pérez - Urría, 2009).

Los metabolitos secundarios además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, difieren también de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (Ávalos y Pérez - Urría, 2009).

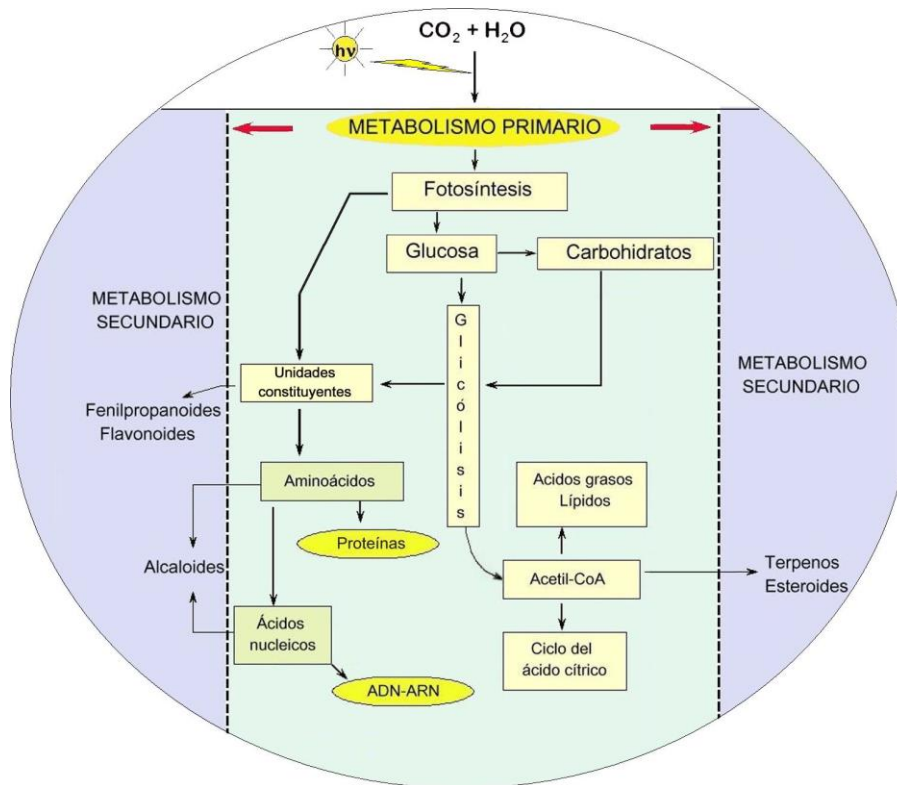


Figura 8. Elementos básicos del metabolismo primario y en relación con el metabolismo secundario de plantas.

Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o atrayendo a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas (Ávalos y Pérez - Urria, 2009).

Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales (Ávalos y Pérez - Urria, 2009). Un ejemplo de ello son los aceites esenciales los cuales se acumulan en estructuras secretoras especializadas ubicadas en diferentes partes de la anatomía de las plantas, en hojas, flores, tallos, raíces, corteza, frutos y semillas (Vargas y Bottia, 2008).

2.5.3. Clases de Metabolitos de acuerdo a Avalos, 2009.

Los metabolitos secundarios se agrupan en cuatro clases principales:

Terpenos: Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes). La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Entre los metabolitos primarios se encuentran hormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas) carotenoides, clorofilas y plastoquinonas (fotosíntesis), ubiquinonas (respiración) y esteroides (de gran importancia en la estructura de membranas) (Ávalos y Pérez - Urría, 2009).

Compuestos fenólicos: Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos. En el contexto del metabolismo, los aminoácidos aromáticos se pueden dirigir tanto al metabolismo primario como al metabolismo secundario. Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo (Ávalos y Pérez - Urría, 2009).

Glicósidos: Los glicósidos son metabolitos vegetales de gran importancia. Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardiacos y glicósidos cianogénicos. Una cuarta familia, los glucosinolatos, se incluyen en este grupo debido a su estructura similar a los glicósidos (Ávalos y Pérez - Urría, 2009).

Alcaloides: Estos son una gran familia de más de 15 000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como la mescalina o la colchicina, por ejemplo. Se encuentran en el 20% aproximadamente de las plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas.

En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas la mayoría de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajante muscular, tranquilizante, antitusivos o analgésicos. Son sintetizados comúnmente a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina (Ávalos y Pérez - Urria, 2009).

2.6. Medicina Tradicional

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 (Morón y Jardinez, 1997).

Debido a esto el mundo ha volteado la vista al mundo botánico, del cual se sabe que las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico. Para defenderse del daño ocasionado por la herida y el ataque por insectos o microorganismos patógenos, las plantas sintetizan enzimas que degradan la pared celular de microorganismos o que tienen la capacidad de inactivar tóxicos de origen microbiano (Sepúlveda *et al.*, 2004). Así mismo y como parte de la protección química, otra estrategia utilizada por las plantas es la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, en contra de herbívoros o con actividad antioxidante (Croteau *et al.*, 2000). La síntesis activa de metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como:

- a) El consumo de herbívoros (artrópodos y vertebrados).
- b) El ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos.
- c) La competencia por el espacio de suelo, luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas.
- d) La exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Sepúlveda *et al.*, 2004).

México no solamente se distingue por su diversidad de recursos naturales, y culturales sino también por su alto índice de endemismos, es decir, de especies que solamente se encuentran dentro de los límites geopolíticos del país (INE, 2007). Tal es el caso del valle de Tehuacán–Cuicatlán el cual está constituido por un mosaico de comunidades vegetales, generando un alto porcentaje de especies de plantas endémicas (Smith, 1965 a, b; Villaseñor, 1992; Dávila *et al.*, 1995; Dávila *et al.*, 2002a; Méndez *et al.*, 2004). De manera particular, en México existe una gran tradición en el uso de plantas como remedios naturales, dentro de los cuales en su mayoría el estudio bioquímico ha sido escaso. Tal es el caso de las especies del género *Bursera*, mismas que han sido reconocidas como un género de importante diversidad en México (Rzedowski *et al.*, 2004) y que a su vez se le 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 (Syamasundar *et al.*, 1995; Peraza *et al.*, 1995).

Estos usos son muy acentuados entre los habitantes del poblado de San Rafael en el municipio de Coxcatlán, Puebla, localidad que se encuentra dentro del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, mismo que ha sido reconocido con una vasta flora medicinal y sobre todo con especies de este género (Medina, 2008). Este género cuenta con un poco más de 100 especies a nivel mundial; sin embargo la mayoría de ellas son exclusivas del país, distribuyéndose principalmente a lo largo de la costa del Pacífico (Rzedowski y Kruse, 1979). Pertenece a la familia Burseraceae, y ha sido una fuente importante de resinas, medicinas, aceites esenciales y perfumes.

2.7. Descripción botánica del género *Bursera*

2.7.1. Distribución del género

Existe un total de 18 géneros de la familia Burseraceae, de los cuales tres están presentes en México: *Beiselia* (1 especie), *Bursera* (85 especies) y *Protium* (2 especies) (Rzedowski y Kruse 1979 y 2005, Medina, 2008). *Bursera* cuenta con poco más de 100

especies a nivel mundial; sin embargo la mayoría de ellas son exclusivas del país, distribuyéndose principalmente a lo largo de la costa del Pacífico (Rzedowski y Kruse, 1979).

Los representantes de *Bursera* son mayormente árboles o algunas veces arbustos, de hoja decidua, que constituyen un elemento característico y no pocas veces dominante o codominante de los bosques tropicales caducifolios de México, donde habitan preferentemente en altitudes entre 0 y 1800 m. Son árboles o arbustos, deciduos o perennifolios, dioicos o poligamodioicos, corteza con conductos resiníferos y laticíferos. Hojas alternas, rara vez opuestas, pinnado-compuestas, ocasionalmente bipinnadas, 3-folioladas o 1-folioladas, exestipuladas. Inflorescencias axilares o terminales, cimosas, paniculadas, pseudoracimos, fasciculadas o flores solitarias. Flores generalmente unisexuales, actinomorfas, 3-5(-6)-meras, imbricadas o valvadas; sépalos connatos o libres; pétalos, libres o fusionados en un tubo, rara vez ausentes; estambres 1-2 series, en igual número que los pétalos o el doble (estaminodios en flores femeninas), filamentos libres, insertos debajo o encima del disco, anteras ditecas, dehiscencia longitudinal, disco anular, cupuliforme o inconspicuo; ovario súpero, 2-5-carpelar (-12 en *Beiselia*), 2-5-locular, placentación axilar, óvulos (1-)2 por lóculo, estilo corto o ausente, estigma 2-5-lobulado (pistilo vestigial en flores masculinas). Frutos drupáceos 2-5-valvados, con pericarpo carnoso, luego dehiscentes, o cápsulas; huesos 1-5, generalmente monospermos, con endocarpo leñoso, cubiertos frecuentemente por un pseudoarilo; semillas sin endospermo, embrión recto, ocasionalmente aladas (Medina 2008).

2.7.2 Características de *B. arida*

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 (Medina 2008).

Los aceites esenciales son volátiles, naturales, son una mezcla de compuestos (terpenos, alcoholes, éteres, esterres, fenoles, cetonas, aldehídos) caracterizados por tener un fuerte aroma y ser sintetizados por las plantas como metabolitos secundarios, conocidos por sus propiedades antisépticas, como bactericidas, virucidas, fungicidas, también por sus propiedades medicinales y sus fragancias, han sido utilizados por el hombre para embalsamar a los muertos, preservar los alimentos y como antimicrobianos, analgésicos, sedantes, antiinflamatorios, espasmolíticos y anestésicos locales. En la naturaleza, los aceites esenciales juegan un papel importante para las plantas, dándoles protección contra las bacterias, virus, hongos, insectos y contra herbívoros. También atraen a los insectos para que sirvan como dispersores de polen y de semillas (Bakkali, 2008).

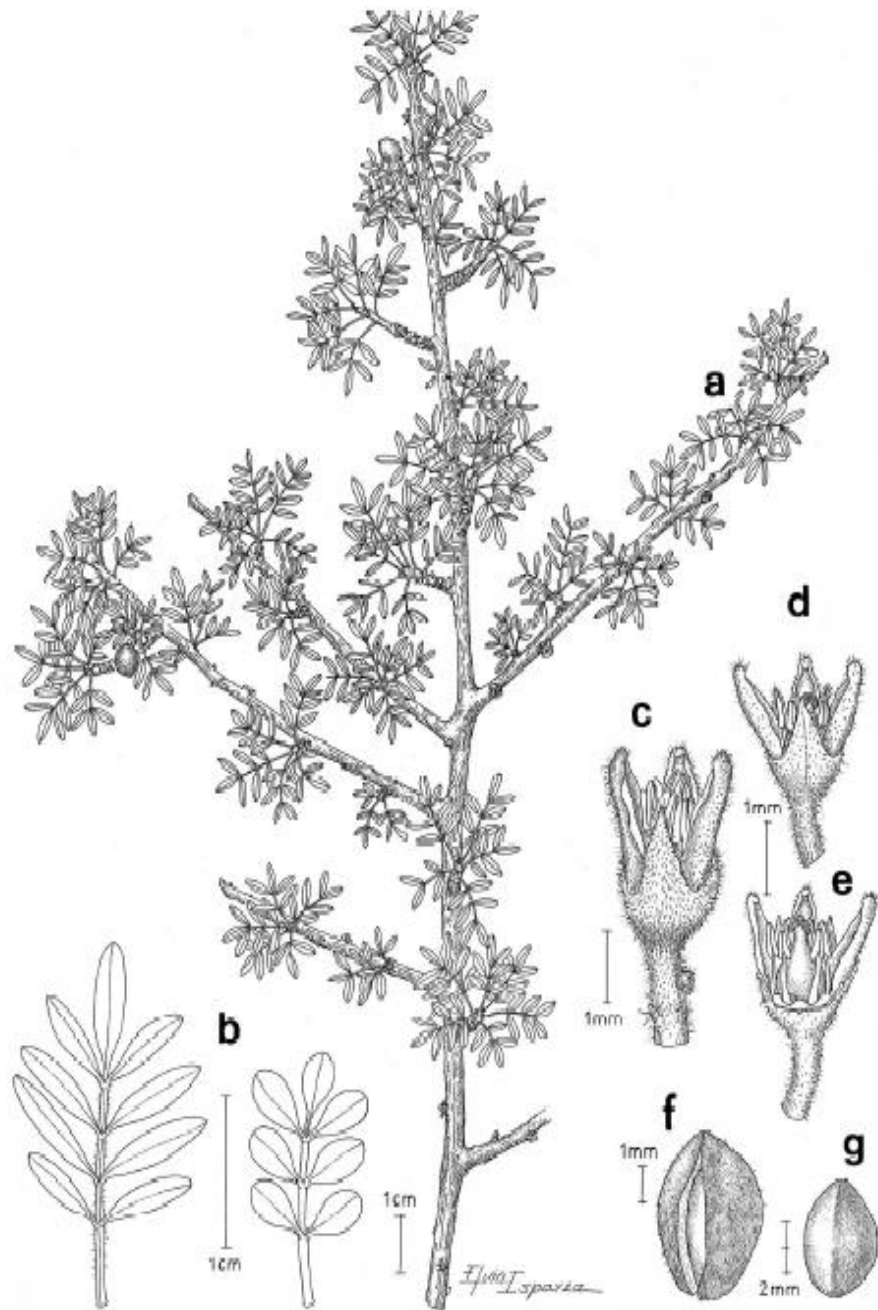


Figura 9. Anatomía vegetal de *B. arida*.

(a) ramas con hojas y frutos, (b) variantes de hoja, (c) flor masculina, (d) flor femenina en vista externa (e) flor femenina desprovista de un segmento para mostrar el disco nectarífero, los estaminodios y el gineceo, (f) fruto y (g) hueso (Rzedowski, 2004).

2.7.3 Usos Tradicionales

Acerca del uso local y modo de empleo tradicional de *B. arida* (Figura 11), flora del municipio de Zapotitlán Salinas, Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla, donde la planta de *B. arida* se emplea como desinfectante utilizando la goma que exuda cuando es dañada mecánicamente, es utilizada, para el dolor de muelas y para torcer el ombligo de los recién nacidos. Los trozos de tallo son utilizados como remedio para la tos. Además se le atribuyen propiedades antidepresivas.

También destaca el estudio realizado por Canales *et al.*, (2006) sobre la consistencia y distribución del conocimiento tradicional de la flora medicinal de San Rafael, en el municipio de Coxcatlán, Puebla, reportando así, el uso del exudado de la planta *B. arida* en infecciones de heridas, fuegos, algodoncillo y granos en la piel. Empleándose “el juguito” directo sobre la parte afectada al hacer un corte al tronco de la planta.

Cuadro 2. Datos etnobotánicos de *B. arida* (Rose) Standl, 1929.

	Nombre común	Lugar	Año	Parte usada	Uso	Forma de uso
<i>Bursera arida</i> (Rose) Standl, 1929.	Copalillo Cuajote	Mpo. Zapotitlán Salinas, Valle de Zapotitlán Salinas, Puebla.	Arias et al., 2000	Goma, trozos de tallo	Desinfectante, dolor de muelas, para torcer el ombligo de recién nacidos, tos tiene propiedades antidepresivas.	Utilizan la goma que exuda cuando es dañada mecánicamente. Los trozos de tallo son utilizados como remedio para la tos.
	Aceitillo	San Rafael Coxcatlán	Dávila et al., 2002b	Exudado	Medicinal	
	Cabrestillo Zapotillo	Cuenca de Papaloapan, México: Teotitlán, Tehuacán, Coxcatlán, Coixtlahuaca,	Rzedowski, et al., 2004, 2005; Medina, 2008.	Tronco	Horcones para casas	

		Zapotitlán				
	Aceitillo	San Rafael Mpo. Coxcatlán, Valle de Tehuacán Cuicatlán	Canales et al., 2006.	Exudado	Infección de heridas, fuegos, algodoncillo, granos en la piel.	Se hace un corte al tronco de la planta y “el juguito” que escurre, se coloca directo sobre la parte afectada.

2.7.4 Farmacología de *B. arida*

Los extractos de *B. arida* presentan alto grado de efectividad en el tratamiento de afecciones intestinales (*E. coli*, *V. cholera*, *Y. enterocolitica*) respiratorias (*S. aureus*, *S. pneumoniae*), de piel (*S. aureus*, *S. epidermidis*) fuegos, algodoncillo (*C. albicans*). (Rojas, 2012). *B. simaruba* es utilizada para tratar algunas afecciones como úlceras, golpes, y en forma de ungüento con actividad cicatrizante en pequeñas heridas (Abbad *et al*, 1996). En Venezuela algunas especies del género son utilizadas en el tratamiento de artritis reumatoide y como auxiliar en tratamientos antiinflamatorios (Carretero, 2008).

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente los casos de leishmaniosis son más frecuentes y en algunos países son considerados problemas de salud pública, aunado a esto, los medicamentos utilizados como primera línea en el tratamiento de esta enfermedad, tales como Glucantime y Pentostam son suministrados desde hace más de 40 años y cada vez tienen menor efectividad, además presentan efectos secundarios, los tratamientos son muy largos y se ha generado una gran resistencia del parásito hacia dichos medicamentos, lo cual nos ha llevado a la necesidad de recurrir al uso de productos naturales, los cuales ofrecen propiedades parecidas a los fármacos y con una gran diversidad estructural. Esto involucra a las plantas medicinales como una alternativa contra el parásito de la leishmaniosis.

Un ejemplo de esto es lo expuesto en *Dutta et al.*, (2007), donde se reportaron estudios que han establecido la eficacia de extractos o exudados de *Aloe vera*, en contra de promastigotes de *L. braziliensis*, *L. mexicana*, *L. tropica*, *L. major* y *L. infantum*. También se han descrito efectos relacionados con apoptosis al utilizar fármacos como miltefosina (Verma y Dey, 2004), anfotericina B (Lee, 2002) y la camptotecina (Sen et al. 2004). Efectos similares se han descrito con productos naturales derivados de *Aloe vera* como compuestos antileishmánicos ya que pueden inducir una muerte celular parecida a la apoptosis. Algunos de estos compuestos como polisacáridos, triterpenos y poliamidas parecen estar implicados los mismos que podemos encontrar en el género *Bursera* (Reynoso-Orozco et al, 2008).

La medicina tradicional nos da un acercamiento a los efectos antimicrobianos, antimicóticos, que poseen una gran cantidad de plantas. En nuestro país encontramos a las pertenecientes al género *Bursera*. Estas propiedades que han sido comprobadas para *B. arida* son las que (a pesar de no tener un antecedente etnobotánico de su uso en el tratamiento de infecciones causadas por *Leishmania* sp.) nos permiten suponer que esta especie de *Bursera* sea un buen candidato para evaluar su actividad sobre *L. mexicana*, ya que como se mencionó anteriormente uno de los medicamentos utilizados contra la leishmaniosis, es Anfotericina B, un antifúngico y precisamente el extracto de *B. arida* presentó actividad sobre diversas especies de hongos patógenos (Rojas, 2012). Además cabe mencionar que una complicación que agrava más las lesiones cutáneas generadas

por la parasitosis, es que estas tienden a ulcerarse y a infectarse con bacterias u hongos, Vázquez en 2012 reportó la actividad antibacteriana del extracto de esta planta contra bacterias Gram+ y Gram-. Estos antecedentes sustentan la posibilidad de que el extracto metanólico de *B. arida* contenga metabolitos secundarios que puedan ser eficaces contra el parásito *L. mexicana*.

4. OBJETIVO GENERAL

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

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener por maceración el extracto metanólico de la corteza de *B. arida*.
2. Determinar el efecto *in vitro* del extracto metanólico de la corteza de *B. arida* sobre los promastigotes de *L. mexicana* mediante la técnica de viabilidad celular con MTT.
3. Evaluar la citotoxicidad del extracto metanólico de la corteza de *B. arida* sobre macrófagos.
4. Determinar si el extracto metanólico de *B. arida* es inductor de apoptosis.
5. Determinar la composición química del extracto mediante análisis de Cromatografía de Gases.
6. Evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto de la corteza de *B. arida* mediante el modelo de edema plantar por carragenina.

5. MATERIALES Y METODOS

Colecta de material.

El material vegetal necesario de *Bursera arida* se colectó durante los meses de marzo abril, junio, agosto, septiembre, octubre, en el año 2012 en San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Se separó el material en hojas, frutos, las ramas se cortaron en trozos pequeños y corteza.

Obtención del extracto.

El extracto de la corteza de *B. arida* se obtuvo por el método de maceración (Domínguez, 1973). Se pesó la corteza seca y se colocó en trozos en un matraz, se obtuvo el extracto metanólico crudo (MeOH) de la corteza, el cual se filtró y destiló a presión reducida en un rotavapor. El extracto se colocó en charolas de vidrio con la finalidad de completar la evaporación del solvente. Para obtener las fracciones metanólicas libres de compuestos no polares (MeOH₂). El rendimiento del extracto se determinó por diferencia de peso con relación al peso seco de la planta.

Infección de ratones con *L. mexicana*.

Ratones BALB/c machos de 6 semanas de edad y peso similar, fueron inoculados en la base de la cola con un inóculo de 50 µl de PBS y 2X10⁶ parásitos en fase promastigote de *L. mexicana* con ayuda de jeringas de insulina (1000 µl). Los ratones fueron rasurados con anterioridad en la zona de infección, para hacer más fácil la inoculación. Los ratones se mantuvieron en el bioterio durante 10 semanas posteriores a la infección, se mantuvo una temperatura constante de 26-28° con variabilidad de 2°C, la humedad ambiental se mantuvo entre 40-60% HR. Se monitoreo el tamaño de la lesión de los ratones.

Mantenimiento de la cepa *Leishmania mexicana*

El parásito de *L. mexicana* se obtuvo a partir de un ratón previamente infectado con la cepa (MNYC/BZ/M379) donado por Dra. Miriam Rodríguez Sosa, Laboratorio 5 UBIMED. FES Iztacala UNAM. Se obtuvo la lesión la cual fue macerada en 5 ml de medio de cultivo Schneider suplementado con 10% de SFB inactivado y antibiótico Gentamicina [100mg/ml], ésta se incubó en botellas de cultivo con medio Schneider a 28° C durante 24 hrs. De las botellas de cultivo se obtiene el sobrenadante, el cual es colocado en tubos de 15 ml y posteriormente centrifugados a 2500 r.p.m por 10 minutos, la pastilla obtenida se mantiene con medio de cultivo y se deja inmóvil durante una hora. Posteriormente se obtiene el sobrenadante donde se encuentran la fase móvil del parásito y se cuantificó en la cámara de Neubauer.

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

En una placa de cultivo de 96 pozos, fueron sembrados en 200µl de medio de cultivo, diferentes cantidades parásitos en fase promastigote de *L. mexicana* (desde 1×10^7 hasta 9,765 promastigotes), a cada uno de los pozos se les agrego 25µl de MTT (3-[4,5 dimetilazol-2 y 1]-2,5 difeniltetrasolio bromuro) (5mg/ml) (método modificado del ensayo de Dutta *et al.*, 2005), y se incubaron por 4 horas a una temperatura de 37°C. Posteriormente se retiró el sobrenadante y se agregó 100µl de dimetil sulfóxido (DMSO), la placa se deja en reposo y oscuridad durante 15 minutos. Como último paso, se leyó la absorbancia en un lector de ELISA a 492 nm. Los datos obtenidos de los valores de absorbancia generados por un número de células específicos, fueron graficados para obtener la curva patrón.

Evaluación *in vitro* de la actividad antileishmánica.

Se utilizaron promastigotes en la fase exponencial, los cuales fueron resuspendidos en medio Schneider suplementado con SFB y 100mg de gentamicina/ ml⁻¹. Los parásitos se pusieron en placas de cultivo celular de 96 pozos (5×10^7 promastigotes en 100µL de medio, en cada pozo) e interactuaron con diferentes concentraciones del extracto de *Bursera arida* durante 72 h a 22 °C; una vez transcurrido el tiempo se retiró el extracto. La viabilidad de los parásitos fue evaluada

usando el método modificado del ensayo de MTT (Dutta *et al.*, 2005) donde la cantidad de sales de formazan producidas es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas. Las sales de formazan producidas se analizaron en un lector de ELISA a una longitud de onda 492 nm, los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron en la curva patrón y se graficaron para obtener la concentración letal media, en el que la mitad de la población (CL50). Para el control positivo se utilizaron como referencia Pentostam y Anfotericina B, ambos empleados en el tratamiento contra la leishmaniosis.

Análisis por citometría de flujo la externalización de fosfatidilserina en promastigotes de *L. mexicana*.

Para determinar si el mecanismo de acción de muerte celular en promastigotes de *L. mexicana* por el extracto de *B. arida* implica un proceso de apoptosis ó necrosis, Se realizó una doble tinción con Annexina V conjugada a un fluorocromo color verde (FITC) además de Ioduro de Propidio conjugado con un fluorocromo color rojo (IP), como se describe previamente (Mehta y Shaha, 2004). Anexina V es una molécula que presenta afinidad por la fosfatidilserina la cual se encuentra normalmente presente a nivel intracelular, sin embargo cuando existe un proceso apoptótico se genera externalización de ésta molécula, en la membrana por lo que se le considera un indicador de éste proceso; por otro lado IP presenta afinidad por el DNA de la célula lo cual es un indicador de disrupción de la membrana y por ende muerte celular.

Los promastigotes se incubaron con (0,213 mg ml, 24 h); posteriormente las células se centrifugaron (2.500 rpm x 5 min) , se lavaron dos veces con PBS (0,02 M, pH 7,2) y se resuspendieron en buffer de unión a Annexina - V (10 mM HEPES , NaCl 140 mM , CaCl₂ 2,5 mM , pH 7,4) . Después se añadieron la Annexina V-FITC y el IP, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Apéndice 2), y se incubaron durante 30 min en oscuridad a 25 °C. La Adquisición de datos se realizó en un citómetro de flujo FACS Calibur (BD) y se analizaron con el programa CellQuest.

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

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

Evaluación de la actividad antiinflamatoria mediante el modelo de Inflamación edema plantar inducido por carragenina.

A seis grupos de ratas (n=6) en ayuno de 14 horas, con libre acceso de agua, se les administró oralmente, mediante una cánula: 250, 500, 750 mg/kg del extracto metanólico del extracto de la corteza *B. arida*. Nuestro grupo control positivo recibió Dexametasona [1.0 mg/kg] disuelta en 300 µl de solución salina estéril, el grupo control negativo recibió solución salina estéril [10 ml/kg] por vía oral. Una hora después se les inyectó 100 µl de carragenina [1%] en el cojinete plantar de la pata trasera derecha y en la pata izquierda se inyectó solución salina el cual fue el vehículo del inóculo de la carragenina. El volumen se midió antes y después de la inyección de carragenina con ayuda de un Micrómetro (Mitutoyo modelo ID-C1012EXBS), a los tiempos 0, 1, 2, 3 y 4 horas después de la inyección. Después se procedió al sacrificio en la cámara de CO₂. Se utilizará la siguiente ecuación para el cálculo del porcentaje de inhibición de la inflamación.

$$\% \text{ de inflamación} = (T_f - T_i / T_f) * 100$$

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

Prueba de citotoxicidad celular *in vitro* con Cristal Violeta.

Para la realización de este experimento se mantuvo una línea de macrófagos de ratón leucémico, en medio DMEM-F12 (Sigma), suplementado con suero fetal bovino al 10% (GIBCO) y 100 µg/ml de antibiótico antimicótico (Anfotericina B). Las células obtenidas pasaron a cultivo en una incubadora con atmósfera del 5% de CO₂ a 37°C. En cajas de cultivo de 96 pozos se colocaron 15,000 células por pozo con presencia de las diferentes concentraciones de extracto cuyos valores fueron obtenidos en los experimentos *in vitro*. La evaluación fue mediante la técnica de Viabilidad Celular de Cristal Violeta con base al protocolo reportado por Badisa *et al.*, (2003). Para la interpretación de los resultados se tomó en cuenta el criterio del Instituto Nacional de Cáncer (NCI) que establece que un extracto es considerado como citotóxico cuando el valor de CL₅₀ es menor de 0.20 mg/ml

6. RESULTADOS

Rendimiento del Extracto

El rendimiento del extracto metanólico de *B. arida* correspondió al 18.54% con respecto al total del peso seco de la planta que fue de 401.7 g (Cuadro 3).

Cuadro 3: Rendimiento del extracto metanólico de *B. arida*.

Extracto (g)	Rendimiento (%)
74.4641	18.54

Realización de la curva patrón.

La curva patrón se realizó colocando en una caja de cultivo de 96 pozos distintas cantidades de promastigotes, (desde 1×10^7 hasta 9765), posteriormente mediante la técnica de viabilidad celular MTT, se midió la absorbancia generada por las diferentes

concentraciones de parásitos en los distintos pozos. La curva patrón nos muestra las distintas absorbancias generadas, posteriormente los resultados generados en los experimentos de interacción extracto-parásito fueron interpolados en ésta gráfica, la cual nos ayuda a determinar la cantidad de parásitos vivos después de la interacción.

Curva Patrón

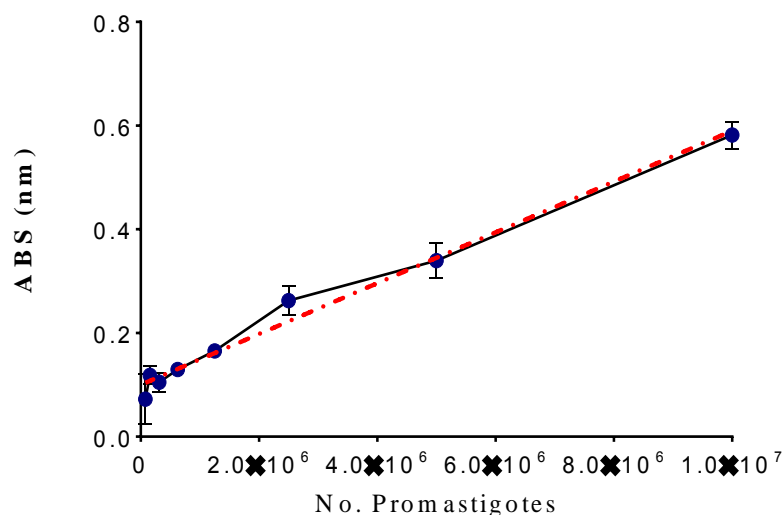


Figura 10. Curva patrón de promastigotes de *L. mexicana*, obtenida con el ensayo MTT, aquí se muestra la absorbancia que presentan distintas cantidades de promastigotes (desde 1×10^7 hasta 9,765); en color rojo la curva del modelo matemático.

Porcentaje de mortalidad, evaluado mediante el ensayo de viabilidad celular por MTT.

La actividad anti-leishmánica del extracto metanólico de *B. arida* se realizó por el ensayo de MTT, en este ensayo existe una relación directa entre el número de células metabólicamente activas y la absorbancia obtenida. La determinación del efecto anti-leishmánico a concentraciones 10 a 0,009 mg/ml, muestra un efecto dosis dependiente contra promastigotes de *L. mexicana*, la CL_{50} alcanzada fue 0.012 mg/ml. Como se puede observar, la curva muestra un comportamiento dosis dependiente. (Figura 12). Por lo que podemos decir que el extracto metanólico de *B. arida* posee un efecto anti-leishmánico sobre la fase promastigote de *L. mexicana* (Tabla 3)

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

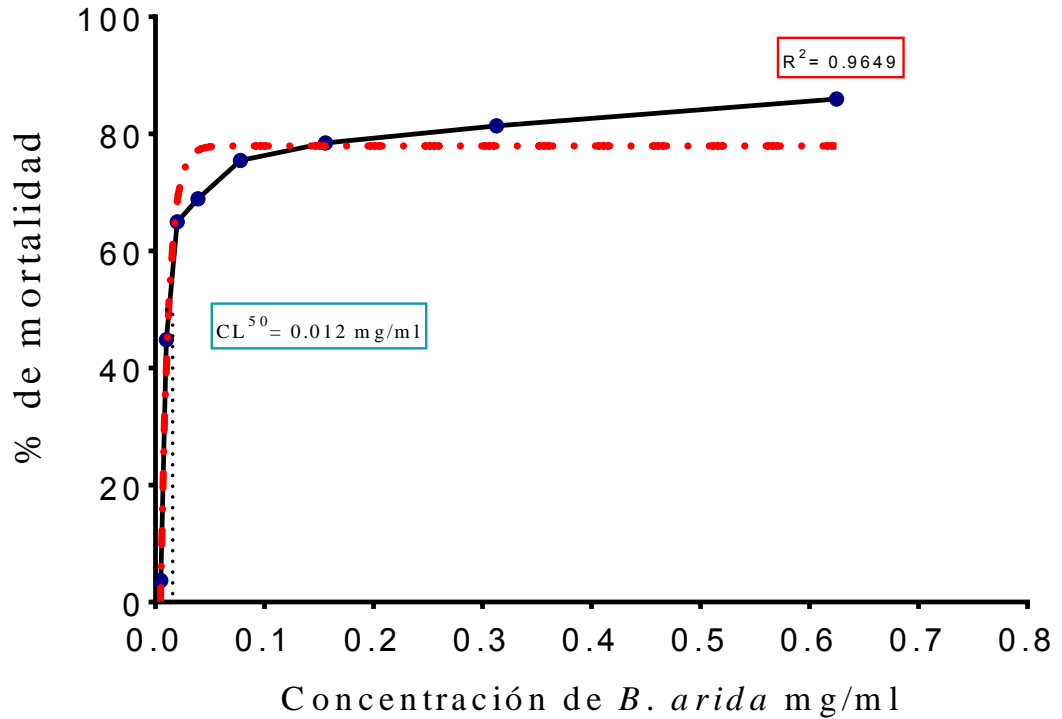


Figura 11. Estimación de la CL_{50} contra promastigotes de *L. mexicana*, se incubaron 2.5×10^4 en 100 μ l, expuestos a concentraciones del extracto de *B. arida*, con un tiempo de incubación de 48 hrs.

Los fármacos utilizados como primera línea de acción en el tratamiento contra leishmaniosis comprenden a los antimoniales pentavalentes como el PENTOSTAM (Estibogluconato de sodio) y otros como Anfotericina B, la cual se fija a los esteroides de la membrana de células eucariotas pero no de los procariotas. Como consecuencia de esta fijación se producen alteraciones en la estructura de la membrana, probablemente por la formación de poros compuestos de pequeños agregados de anfotericina B y esteroides. Estos defectos originan una despolarización de la membrana y un aumento de la permeabilidad para protones y cationes monovalentes (Catalán, 2006), por lo cual probamos el efecto sobre la misma población de parásitos. La determinación de la DL_{50} a concentraciones de 0.0048- 10 mg/ml, con un tiempo de interacción de 48 hrs y los medicamentos ya mencionados (Figuras 13 y 14)

Determinación de la DL₅₀ del Estibogluconato de sodio 48h

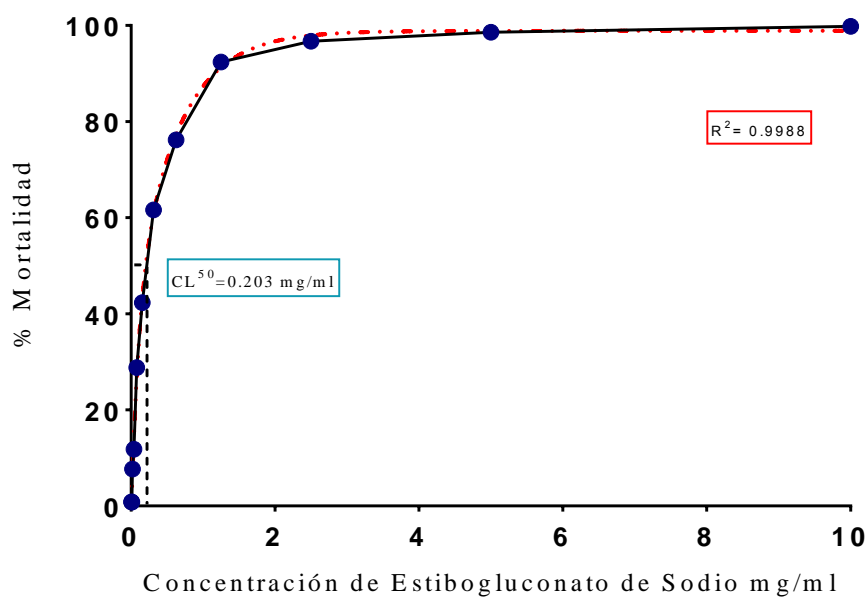


Figura 12. Efecto *in vitro* del medicamento Estibogluconato de Sodio [100 mg/ml] a concentraciones descendientes (0.0048- 10 mg/ml) sobre fase promastigote de *L. mexicana*, el tiempo de incubación y 48 hrs, la DL₅₀ alcanzada fue 0.203 mg/ml.

Determinación de la DL₅₀ de Anfotericina B 48h

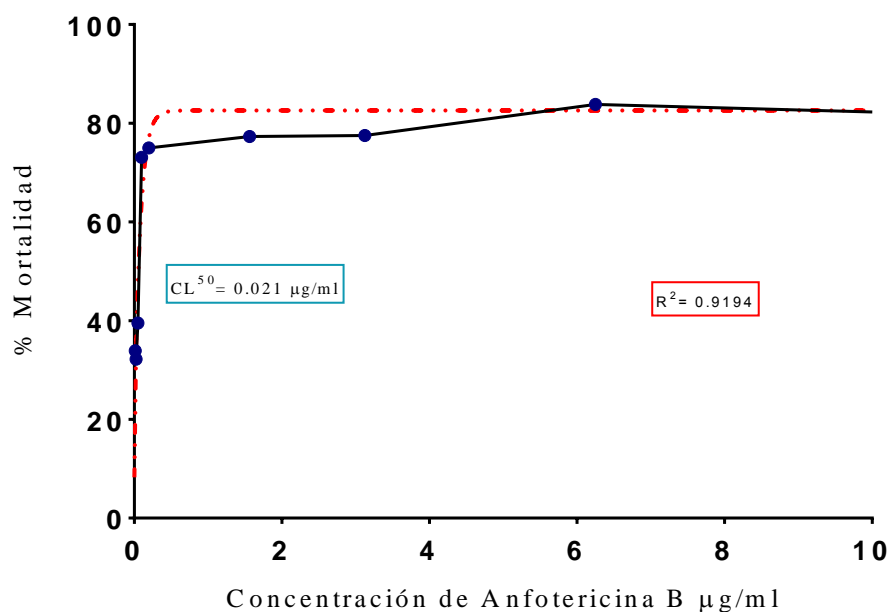


Figura 13. Efecto *in vitro* del medicamento Anfotericina B [250 µg/ml] a concentraciones descendientes (0.0048- 10 mg/ml) sobre fase promastigote de *L. mexicana*, el tiempo de incubación 48 hrs.

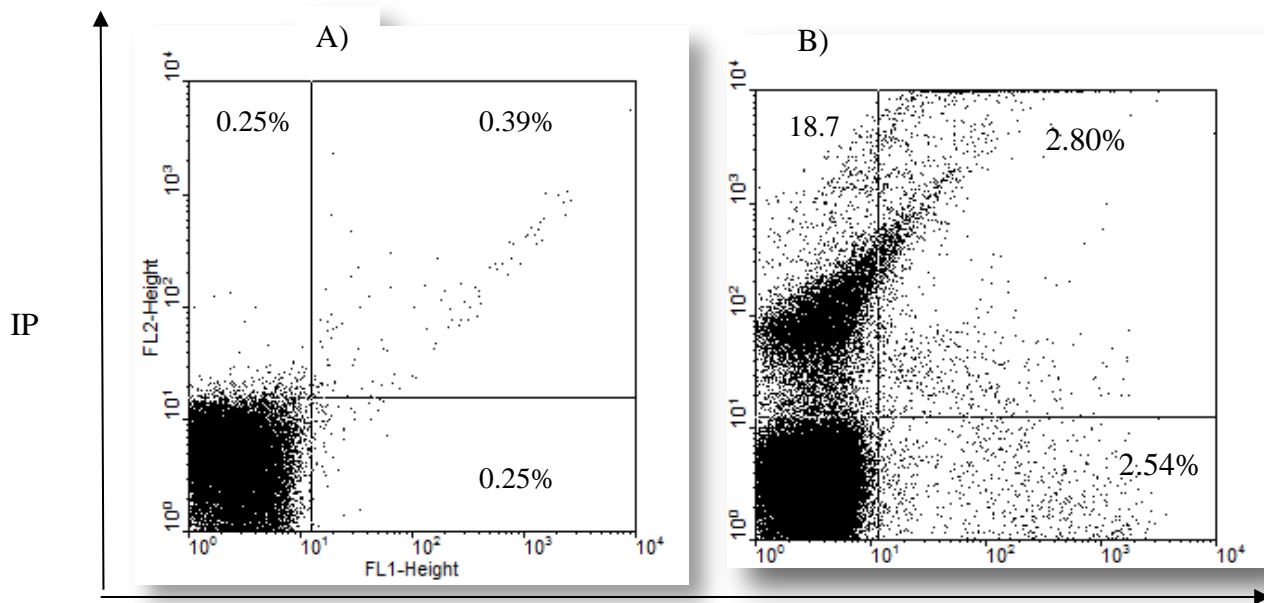
La DL_{50} alcanzada fue de 1.239 $\mu\text{g/ml}$ y 0.021 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. En todas las curvas se observa en color rojo la curva de los valores matemáticos para el ensayo. Observamos que la dosis más baja utilizada es la de Anfotericina B, seguida del tratamiento con el extracto de *B. arida* y por último el fármaco Estibogluconato de Sodio (Cuadro 4).

Cuadro 4. Tabla de tratamientos utilizados.

<i>Tratamiento</i>	<i>CL₅₀ 48 hrs.</i>
Extracto metanólico de <i>B. arida</i>	0.012 mg/ml
Fármaco (Estibogluconato de sodio)	0.203 mg/ml
Anfotericina B	0.021 $\mu\text{g/ml}$

Determinación del efecto apoptótico en promastigotes inducida por el extracto utilizando el kit de Anexina V por citometría de flujo.

La interacción de la DL_{50} del extracto de *B. arida* alcanzada en el experimento previo, frente a promastigotes de *L. mexicana*, nos llevó a determinar el mecanismo por el cual las células dejaban de ser viables, por lo que se continuo con el procedimiento señalado en el apéndice 2, después de 4 horas se leyó y en un citómetro de flujo, se contabilizó un total de 100000 eventos o células. Se obtuvieron los dotplots (figura 15). Los resultados obtenidos señalan que en el cuadrante positivo para anexina V de la interacción con el extracto presentó un 2.80% de apoptosis; mientras que el control presentó un 0.39% de apoptosis. Por otra parte en el cuadrante positivo para PI fue de 18.75% para la interacción con el extracto, mientras que para el control fue de 0.25% (Figura 15). Los resultados nos sugieren que si se llevan a cabo procesos de apoptosis durante la interacción, pero que además existe necrosis en los promastigotes.



Anexina V

Figura 14. Dotplots de apoptosis celular, (A) muestra el control, donde la apoptosis alcanzó 0.05%, mientras que en nuestro experimental (B), se alcanzó un 2.54% de apoptosis, mientras que la necrosis alcanzó un 18.75%.

Citotoxicidad con macrófagos

La actividad citotóxica del extracto de *B. arida*, se evaluó con diferentes concentraciones del extracto [0.004 -10 mg/ml] frente a macrófagos de la línea celular P388, la CL_{50} que determina la concentración a la cual inhibe el crecimiento del 50% de la población, fue calculado con respecto al Instituto Nacional de Cáncer (NCI) que establece que un extracto es considerado como citotóxico cuando el valor de la CL_{50} es igual o menor a 0.20 mg/ml. la CL_{50} .

Determinación de la citotoxicidad celular de *B. arida*

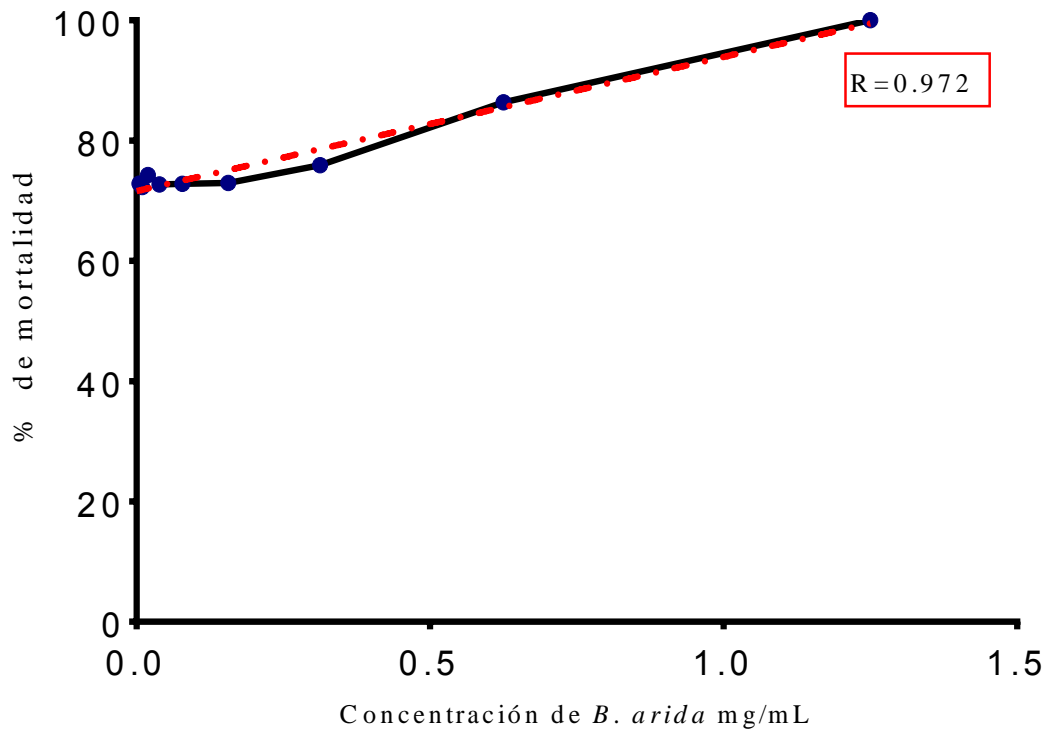


Figura 15. Interacción del extracto de *B. arida* sobre macrófagos de la línea celular P388.

Las concentraciones utilizadas [0.0048- 10 mg/ml] presentaron muy altos índices de mortalidad en las células, la cual alcanzó su mayor índice en [1.25 mg/ml]. La CL_{50} no fue encontrada, ya que la dosis más baja [0.0048 mg/ml] alcanzó una mortalidad del 72% de la población (figura 16), este resultado muestra que el extracto metanólico de *B. arida* si es tóxico de acuerdo al INC.

Composición química del extracto de *B. arida* por CG-EM.

El análisis cromatográfico del extracto metanólico de *B. arida*, muestra la presencia de compuestos de tipo Terpeno y ácidos grasos, que han sido descritos anteriormente con distintas actividades biológicas (Cuadro 5). Cabe destacar que no todos los compuestos encontrados se pudieron identificar, esto debido a que los resultados se cotejan con una base de datos en la que a pesar de contener una gran cantidad de compuestos, no son todos los existentes. Aunado a lo anterior, dado que el extracto es metanólico, muy probablemente se encuentre compuestos no volátiles y es motivo por el que no se hayan identificado. Por lo que Espinoza (En proceso) está realizando un análisis fitoquímico más detallado. Se muestran los cromatogramas obtenidos por el extracto, y los generados por cada uno de los compuestos junto con los datos por la base de datos (Apéndice 4).

Cuadro 5: Compuestos determinados del extracto metanólico de *B. arida* en el CG-EM

Compuestos de <i>Bursera arida</i>	Abundancia	Tiempo de Retención	Actividad	Referencia
Pirogallol	55.43	6.378	Antioxidante, antibacteriano, antifúngico, inhibidor de caspazas, antiprotozoario.	Abe <i>et al</i> , 2002, Tasdemir <i>et al</i> , 2006; Yong <i>et al</i> , 2009.
Metil palmitato	4.71	10.729	Actividad antiinflamatoria, reduce TNF- α , contrarresta infiltración de células pro-inflamatorias y genera especies reactivas de oxígeno.	Saedd <i>et al</i> .2012; Cai <i>et al</i> 2005.
Ácido palmítico	3.04	10.948	Generador de apoptosis.	Park, 2014; Shan, 2013.
2-Mercaptobenzotiasol	2.47	11.067		
Lignocerato de	9.49	14.723		

metilo				
Clionasterol	3.91	17.293.	Actividad citotóxica contra líneas cancerígenas humanas.	Jutiviboonsuk <i>et al</i> , 2005.
2-Austrobailignano	16.4	17.548	Actividad citotóxica.	Robles <i>et al</i> , 2010
Moretenol	4.55	17.845	En planta antidiabética.	Conforti <i>et al</i> , 2005.

Actividad anti-inflamatoria del extracto metanólico de *B. arida*, mediante el modelo de edema plantar generado por carragenina.

Con base a los compuestos químicos encontrados mediante al análisis CG-EM, algunos de los compuestos tienen efecto anti-inflamatorio, uno de estos es Metil-Palmitato el cual se ha descrito como reductor de TNF- α , igualmente contrarresta la filtración de células proinflamatorias. Por lo que se probó el efecto anti-inflamatorio del extracto metanólico de *B. arida*, mediante el modelo de inducción de edema en el cojinete plantar de rata, como inductor de la inflamación fue utilizado carragenina [1%], está asociado directamente con la producción de prostaglandinas. Las concentraciones [250, 500, 750 mg/kg] presentaron actividad al disminuir el porcentaje de inflamación a un 43.40%, 37.74% y 43.58%. Los datos son expresados en porcentajes de inflamación, tomando como referencia la generada por carragenina (Figura 17).

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

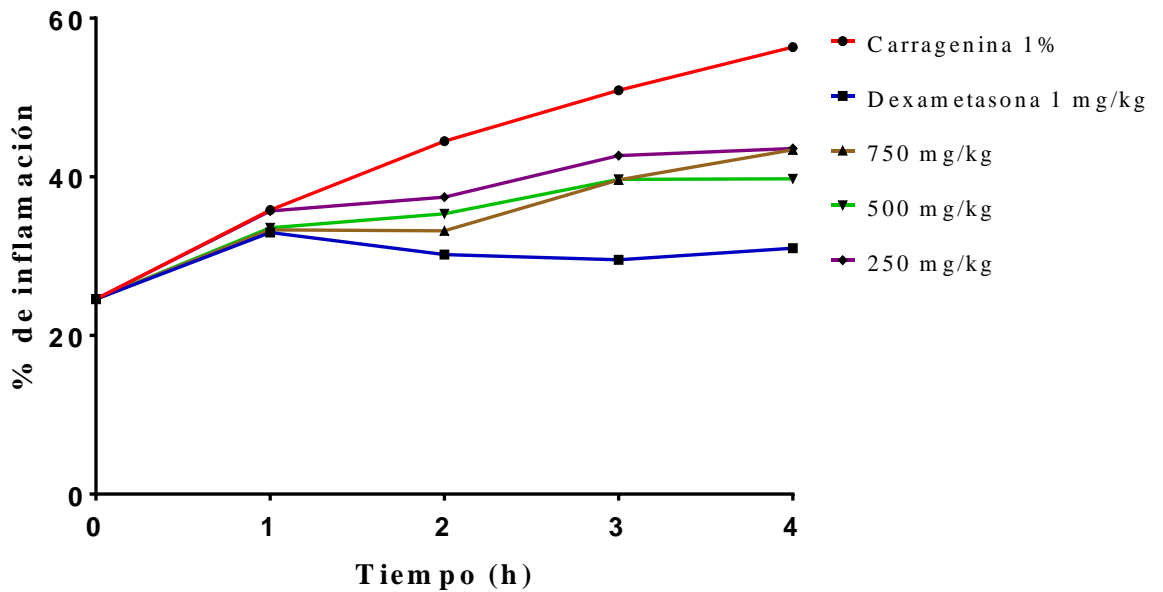


Figura 16. Porcentajes de la cinética de inflamación del extracto de *B. arida*, utilizando como control negativo carragenina (1%) y como control positivo dexametasona (1 mg/kg). La disminución es alrededor del 40 % en [250 y 750 mg/kg], en la concentración de 500 mg/kg muestra un mejor efecto.

Al observar los gráficos, resalta que la concentración que tuvo un mejor efecto anti-inflamatorio fue 500 mg/kg, con 60.25%, 750 mg/kg, presentó 56.59% y la concentración de 250 mg/kg presentó 56.41%. Estos porcentajes fueron comparables con el fármaco Dexametasona, que alcanzó el 69% de inhibición de la inflamación. Para corroborar si existían o no diferencias significativas entre las concentraciones, se realizó un análisis estadístico (ANOVA de dos vías; $\alpha=0.05$) y se encontró que no existen diferencias significativas entre las concentraciones.

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

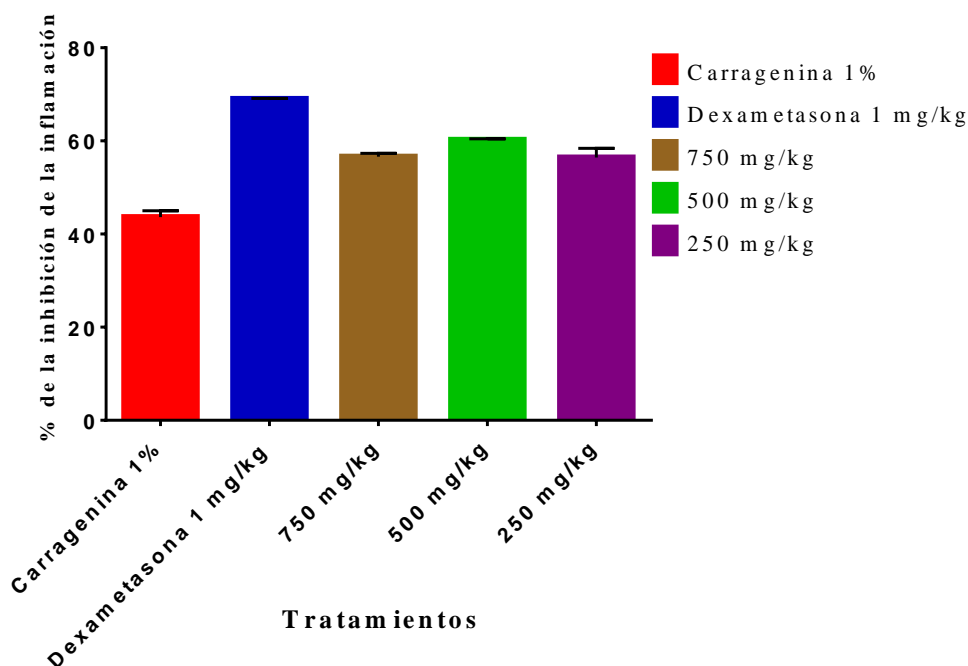


Figura 17. Evaluación de la actividad anti-inflamatoria del extracto de *B. arida*, se muestra el porcentaje de inhibición de la inflamación, el valor más alto es dado por Dexametasona (70%), seguida de [500 mg/kg] con una inhibición del 60%.

7. DISCUSIÓN

Este estudio es el primero en el que se reporta la actividad anti-leishmánica del extracto metanólico de *B. arida*, debido a que no existe ninguna referencia bibliográfica sobre ésta especie que refiera actividad anti-leishmánica. Sin embargo existen reportes de otras plantas del mismo género que tienen efectos anti-leishmánicos como *B. áptera* frente a *L. mexicana* (Ruíz, 2014). Asimismo, se ha reportado *B. simaruba* y *B. graveolens* presentan actividad anti-leishmánica contra amastigotes de *L. amazonensis*, con una de CL_{50} de $163.3 \pm 1.8 \mu\text{g/ml}$ y $36.7 \mu\text{g/ml}$; igualmente encontramos reportes como antiprotozoarios *B. áptera*, *B. arida* y *B. morelensis* cuyos extractos metanólicos presentan actividad amebicida frente a la ameba de vida libre *Naegleria fowleri* (Rodríguez, 2014). El extracto etanólico de *B. fagaroides*, presenta actividad contra el crecimiento *in vitro* de *Entamoeba histolytica*, un parásito protozoario causante de

amebiasis intestinal, el valor correspondiente a una total inhibición del crecimiento de *E. histolytica* es de 4mg/ml (Rosas *et al.*, 2008). *B. copallifera* y *B. Grandifolia*, fueron usados para evaluar la actividad anti-helmíntica, al probarse frente a la larva infectiva de *Haemonchus contortus*, donde el extracto acetónico y etanólico presentaron inhibición del crecimiento de 66% y 76.3% respectivamente (López *et al.*, 2008).

La fase promastigote es la fase infectiva del parásito, por lo cual fue ésta sobre la que se midió la actividad anti-leishmánica del extracto de *B. arida*, la determinación del efecto antileishmánico a concentraciones 10 a 0,009 mg/ml, muestra un efecto dosis dependiente donde la CL_{50} fue 0.012 mg/ml o 12 μ g/ml. Ruíz en el presente año demuestra que el extracto metanólico de *B. áptera* tiene efecto anti-leishmánico, frente a *L. mexicana*, la CL_{50} reportada es de 0.408 mg/ml, si comparamos los resultados obtenidos en este estudio nos damos cuenta que la concentración obtenida por *B. arida* es mucho menor, lo cual sugiere una mayor eficacia del extracto de *B. arida*. Para comparar nuestros resultados se eligieron 2 de los medicamentos utilizados en el tratamiento de la leishmaniosis, el primero de ellos Estibogluconato de Sodio, la DL_{50} encontrada 0.0203 mg/ml en un tiempo de 48 hrs. El segundo tratamiento es el antimicótico Anfotericina B, el cual presenta reacciones adversas, siendo la principal la nefrotoxicidad (Catalán, 2006), éste último presentó una alta efectividad con una DL_{50} a las 48 hrs 0.021 μ g/ml.

Con respecto a la composición química algunos de los compuestos encontrados en el análisis fitoquímico por CG-EM, se describen en la bibliografía como antiprotozoarios, uno de ellos es el pirogallol, el presenta actividad anti-leishmánica al inhibir el crecimiento en amastigotes de *L. donovani* con una IC_{50} de 4.8 μ g/ml. Junto con su precursor el ácido gálico y catecol, presentaron actividad frente a *Trypanosoma cruzi* a una concentración > 30 μ g/ml (Tasdemir *et al.*, 2006). Otro compuesto encontrado es el Austrobailignano-2, cuya actividad está ligada directamente a la disminución de la capacidad infectiva del parásito, mostró una MC_{100} de 75 μ g/ml, este valor muestra la concentración a la cual los epimastigotes son inmovilizados, inhibiendo así la capacidad de poder infectar células adyacentes (Abe *et al.*, 2002).

Por otra parte otros compuestos encontrados se mencionan como generadores de apoptosis; la apoptosis o muerte celular programada es un proceso controlado, y hasta cierto punto es irreversible, en el que se lleva a cabo la desintegración celular y en el que usualmente no se generan reacciones inflamatorias (Fulda, 2010) en este estudio se encontró que el extracto metanólico de *B. arida* es generador de apoptosis en un 2.54%, pero aún mayor es el porcentaje alcanzado de necrosis que alcanzó un 18.75% lo cual indica un mecanismo de acción muy agresivo que lleva a la disrupción de la membrana celular y por ende la desintegración de la misma. Dentro de los compuestos encontrados en el análisis se encuentra el pirogalol es un compuesto polifenólico inductor de apoptosis en distintos tipos de células. Se evaluó el efecto en el crecimiento de células endoteliales, especialmente en pulmonares (Yong *et al*, 2009). Algunos polifenoles como Acido Gálico, pirogalol, Epigallocatequina además presenta actividad altamente citotóxica frente a la línea celular HEK293T Y K562, además que fue reportado como inductor de apoptosis e inhibidor de células tumorales humanas (Mitsuhashi, *et al*, 2008). El ácido palmítico, otro compuesto encontrado en el análisis fitoquímico el cual se ha sugerido como inductor de apoptosis acompañado de autofagia a través de disfunción mitocondrial asociado a estrés oxidativo (Park, 2014; Shan, 2013).

Algunos de los compuestos encontrados en el análisis fitoquímico se describen en la bibliografía como antiprotozoarios, uno de ellos es el pirogalol, el presenta actividad anti-leishmánica al inhibir el crecimiento en amastigotes de *L. donovani* con una CL₅₀ de 4.8 µg/ml. Junto con su precursor el ácido gálico y catecol, presentaron actividad frente a *Trypanosoma cruzi* a una concentración > 30 µg/ml (Tasdemir *et al*, 2006). Otro compuesto encontrado es el Austrobailignano-2, cuya actividad está ligada directamente a la disminución de la capacidad infectiva del parásito, mostró una MC₁₀₀ de 75 µg/ml, este valor muestra la concentración a la cual los epimastigotes son inmovilizados, inhibiendo así la capacidad de poder infectar células adyacentes (Abe *et al*, 2002).

Es importante recalcar que algunas de las especies del género *Bursera* son utilizadas dentro de la medicina tradicional, por sus propiedades antiinflamatorias, en especial las formas arbóreas producen resinas que son utilizadas de manera tópica para evitar infecciones bacterianas en heridas o disminuir la inflamación en alguna lesión.

Las concentraciones utilizadas en el ensayo (250, 500 y 750 mg/kg) presentaron actividad al inhibir la inflamación entre 56.41% y 60.25% comparable con los datos obtenidos del fármaco dexametasona, el cual es un fármaco ya utilizado de manera comercial. Estudios preliminares demuestran que el extracto hexánico de hojas de *B. simaruba* presenta actividad antiinflamatoria a nivel sistémico en la formación de edema plantar en rata (Abad *et al.*, 1996), además el extracto con hexano y cloroformo de la corteza de *B. simaruba* presentan acción antiinflamatoria al inhibir el edema inducido por aceite de croton en la oreja de ratón, esto mediante aplicaciones tópicas, presentando disminución 83% y 73% respectivamente, comparable con el medicamento Indometazona (Sosa *et al.*, 2002). De igual forma el extracto hexánico de las hojas de *B. simaruba* presenta actividad antiinflamatoria, al disminuir la inflamación del edema plantar generado en por carragenina, la administración oral del extracto hexánico, muestra una máximo inhibitorio de 83% comparado con el medicamento de referencia Fenilbutazona (Carretero, *et al.*, 2008).

Dentro de los compuestos encontrados en el análisis químico del extracto metanólico de *B. arida*, ubicamos al Metil palmitato (MP), estudios previos demuestran que este compuesto puro presenta actividad antiinflamatoria (Saeed *et al.*, 2012, Cai *et al.*, 2005, El-Demerdash, 2011). El pre-tratamiento Metil Palmitato, presenta disminución significativa del edema generado por carragenina en pata, el volumen disminuyó 55.7% con respecto al fármaco Indometacina que generó una disminución del 76%, en edema generado por aceite de Croton, en la zona de la oreja, el tratamiento con MP causó una disminución del 43% del edema comparable al fármaco Indometacina que disminuyó 50% la inflamación generada (Saeed *et al.* 2012). El tratamiento de Metil palmitato genera inhibición de citocinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α además que induce la producción de citocinas antiinflamatorias como IL-10 y contrarresta la infiltración de células pro-inflamatorias (Saeed *et al.*, 2012, Cai *et al.*, 2005). Es importante tomar en cuenta que los estudios de la actividad anti-leishmánica y generación de apoptosis del extracto metanólico de *B. arida* se realizaron con modelos experimentales *in vitro* por lo que es necesario realizarlos en modelos experimentales *in vivo*. Debido a lo anterior surgió la necesidad de determinar la citotoxicidad del extracto y se encontró que efectivamente, éste es citotóxico, ya que de las concentraciones utilizadas, [0.0048- 10 mg/ml], la concentración más baja fue de 0.004 mg/ml, la cual inhibió aproximadamente al 72 % de la población, y siguiendo el

criterio del INC, el cual menciona que para un producto natural obtener una CL_{50} es menor a 0. 20mg/ml será catalogado como tóxico. Esto concuerda con lo reportado para otras especies del mismo género. *B. klugii* mostró actividad citotóxica frente a la misma línea de macrófagos P-388 y frente a células de carcinoma epidermoide humano de nasofaringe (Jolad *et al*, 1977). *B. tonkinensis* presenta actividad frente a LNCaP (Células de cáncer de próstata humanas), KB (Carcinoma epidermoide oral humano) y células Col 2 (células de Cáncer de colon) (Jutiviboonsuk *et al*, 2005). *B. fagaroides* presenta actividad citotóxica positiva frente a células de linfoma murino L5178Y (Rojas *et al* 2012). *B. tomentosa* presenta actividad citotóxica positiva frente a línea de células tumorales humanas Col-205 y CSC-1595 (Robles *et al*, 2010). Algunos de los compuestos encontrados en el análisis fitoquímico son reconocidos como compuestos citotóxicos, uno de ellos es 2-Austrobailignano, el cual se sugiere con actividad de inhibir la polimerización de la tubulina.

8. CONCLUSIONES

- El extracto metanólico de *B. árida* tiene efecto *in vitro* sobre promastigotes de *Leishmania mexicana*.
- El extracto de *B. arida* tiene un efecto citotóxico frente a la línea celular P-388, una línea de macrófagos de ratón leucémico.
- El extracto metanólico de la corteza de *B. arida* produce necrosis y apoptosis en promastigotes de *Leishmania mexicana*.
- El extracto metanólico de *B. arida* presenta actividad antiinflamatoria, sobre el modelo de edema plantar generado por carragenina.
- La composición química del extracto metanólico de *B. arida*, presenta varios compuestos con diferentes actividades biológicas, entre las que se encuentran, anti-bacterianos, anti-micóticos, anti-inflamatorios, inductores de apoptosis, anti-oxidantes y anti-cancerígenos.

9. REFERENCIAS.

1. Abad, M., Bermejo, P., Carretero, E., Martínez, C., Norguera, B., Villar, A., 1996. Antiinflammatory activity of some medicinal plant extracts from Venezuela. *Journal of Ethnopharmacology*. 55: 63-68.
2. Abe, F., Nagafuji, S., Yamauchi, T., Okabe, H., Maki, J., Higo, H., Akahane, H., Aguilar, A., Jiménez, M., Reyes, R. 2002. Trypanocidal Constituents in Plants 1. Evaluation of Some Mexican Plants for Their Trypanocidal Activity and Active Constituents in Guaco, Roots of *Aristolochia taliscana*. *Biological Pharmacology Bulletin*. 25(9): 1188—1191
3. Álvarez, L. M. E., Isaza, M. G., Echeverry L. H., 2005. Efecto Antibacteriano *In Vitro* De *Austroepatorium inulaefolium* H.B.K. (*Salvia Amarga*) Y *Ludwigia Polygonoides* H.B.K. (*Clavo De Laguna*). *Revista Ciencias Básicas Biosalud*, 14: 46 – 55.
4. Araujo, D. J., Salas, A. R., 2008. Actividad antimicrobiana de plantas. *Revista Científica*. 6: 6-18.
5. Arias, T. A. A., Valverde, V. M. T., Reyes, S. J., 2000. Las plantas de la región de Zapotitlan Salinas Puebla. Secretaria del Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca. Instituto Nacional de Ecología. México. 78 pp.
6. Ávalos, A., Pérez-Urria, E., 2009. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 113-145.
7. Badisa, R., Tzakou, O., Couladis, M. y Pilarinou E. 2003. Cytotoxic activities of some Greek Labiatae herbs. *Phytotherapy Research*. 17: 472-476.
8. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils. A review. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 446-475.

9. Becker, I., 2006. Leishmaniosis. En: Flisher, A y Perez-Tamayo, R. eds. Aprendizaje en Parasitología Basado en Problemas. Editores de Textos Mexicanos, ETM. México D.F. Capitulo 41.
10. Besteiro, S., Williams, R., Coombs, G., Mottram, J., 2007. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. International. Journal Parasitology. 37.
11. Biagi, F., Tay, J., Alvarez, R., Gutiérrez, M., 2005. Protozoos. Leishmaniosis Cutánea.
<http://www.drscope.com/privados/generales/parasitologia/Leishmaniasis.html>
12. Cai, P., Kaphalia, B., Ansari, G. 2005. Methyl palmitate. Inhibitor o phagocytosis in primary rat Kupffer cells. Toxicology El Sevier. 210; 197-204.
13. Canales, M. M., Hernández, D. T., Caballero, N. J., Romo de V. R. A., Durán, D. Á., Lira S. R., 2006. Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional de las plantas medicinales en San Rafael, Coxcatlán, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla, México Acta Botánica Mexicana 75, 21.
14. Carretero, M. E. López-Pérez, J. L. Abad, M. Bermejo, P. Tillet, S. Israel, A. Noguera, B. 2008. Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extracts and fractions from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves. Journal of Ethnopharmacology, 116: 11–15.
15. Catalán, M. y Montejo, J. 2006. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y Farmacocinética. Revista Iberoamericana de Micología. 23:39-49.
16. Conforti, F., Loizzo, M., Statti, A. y Menichini, F. 2005. Comparative radical scavenging and antidiabetic activities of methanolic extract and fraction from *Achillea linguistica* All. Biological Pharmacology Bulletin. 28 (9): 1791—1794.

17. Croteau, R., Kutchan, T. M. y Lewis, N. G. 2000. Natural Products (Secondary metabolites). En: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. Eds. 2002. Biochemistry and Molecular Biology of plants. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. 1250-1318.
18. Cunningham, A. C. 2002. Parasitic adaptive mechanism in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol* 72:132.
19. Dávila, A. P., Medina, L. R., Ramírez, R. A., Salinas, T. A., Tenorio, P., 1995. Análisis de la flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: endemismo y diversidad. Citado en Linares, E., Dávila P., Chiang, F., Bye, R. y Elias, T. (eds.). Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 33-41.
20. Dávila, A. P., Arizmendi, M. Del C, Valiente-Banuet A., Villaseñor, J. L, Casas, A. y Lira R., 2002a. Biological diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, México. *Biodiversity and Conservation*. 11: 421-442.
21. Dávila, A. P., Lira, S. R., Paredes, F. M., Blanckaert, I. y Rosas, L. R., 2002b. La Flora útil de dos comunidades indígenas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: Zapotitlán Salinas y San Rafael Coxcatlán, Puebla. Informe final del proyecto T015. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. 33 p.
22. Desjeuz P. 2004. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comparative Immunology Microbiology Infected*.
23. Domínguez, X.A. 1973. Métodos de Investigación fitoquímica. Ed. Limusa. México. 281 pp.

24. Dutta, A., Bandyopadhyay, S., Mandal C., Chatterjee M. 2005. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitology International*. 54:119-122.
25. Dutta, A., Bandyopadhyay, S., Mandal C., Chatterjee M. 2007. *Aloe vera* leaf exudate induces a caspase-independent cell death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of Medical Microbiology*. 56: 629-636.
26. El-Demerdash, E. 2011. Anti-inflammatory and antifibrotic effects of methyl palmitate. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 254: 238-244.
27. Fatima, L., Ana De la C., Zoila, L., Felipe, S. 2011. Boletín Epidemiológico.50: 28- 50. 11-17.
28. Fernández, B. Ma. N. 1999. Análisis de la dinámica de comunidades vegetales con relación a la evolución del paisaje, en la zona semiárida de Coxcatlán, Puebla. Tesis para obtener el grado de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF. 98 pp.
29. García, L., 2001. Leishmaniasis. En: *Diagnostic Medical Parasitology*. American Society for Microbiology Press, 4ta edición. Washington D.C. Cap 8.
30. García, M.E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 3^a ed. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF. 252 pp.
31. Gerán, R., Greenberg, N., Macdonald, M., Schumacher, A. y Abbot. B. 1972. Protocols for screening chemical against animal tumor and other biological systems. *Cancer Chemo. Reprod.* 3: 1-103.

32. Gillet, J. B., 1980. *Commiphora* (Burseraceae) in South America and its relationships to *Bursera*. Kew Bulletin. 34: 569-587.
33. Handman, E. 2001. Leishmaniasis: Current status of vaccine development. Clinic Microbiology Review.
34. INE (Instituto Nacional de Ecología) 2007. Diversidad ecológica y biológica de México. México D. F. disponible en línea: <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/2/int.html>. Última actualización 15/11/2007.
35. International *Leishmania* Network. PAHO and the Brazilian Research Council. <http://www.bdf.fat.org.br/leishnet>.
36. Jolad, S., Wiedhopf, R., Cole, J., 1977. Cytotoxic agents from *Bursera klugii* (Burseraceae) I: Isolation of saponins A and B. Journal of Pharmaceutical Science. 66:889-890.
37. Jutiviboonsuk, A., Zhang, H., Teng-Tan, G., Ma, C., Hung, N., Cuong, N., Bunyapraphatsara, N., 2005. Bioactive constituents from root of *Bursera tonkinensis*. Phytochemistry. 66: 2745-2751.
38. Lainson, R. 1997. On *Leishmania enriettii* and other enigmatic *Leishmania* species of the neotropics. Memórias del Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
39. La Barca, L. J., y Araos B. R. 2009. Resistencia antimicrobiana: problema en aumento y soluciones escasas. Revista Chilena de Infectología. 26 (1): 8-9.
40. Lee, N., Bertholet, S., Debrabant, A., Muller, J., Duncan, R. & Nakhasi, H. L. 2002. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. Cell Death Differ. 9: 53-64.

41. López, U., Salinas, D. O., Mendoza de Gives, P., López-Arellano, M.E., Liébano-Hernández, H., Valladares-Cisneros, G., Arias-Ataide, D.M., Hernández-Velázquez, V. 2008. In vitro nematicidal effects of medicinal plants from the Sierra de Huautla Biosphere Reserve, Morelos, México against *Haemonchus contortus* infective larvae. *Journal of Helminthology*. 82; 25-31.
42. Markle, W., Makhoul H. 2004. Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. *Am. Fam. Physician*. 69 (6); 1445-1460.
43. Medina, L. R., 2008. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 66. Burseraceae. Primera edición. Instituto de biología, UNAM. 1-76.
44. Medina, S.J. 2000. Determinación del vigor y estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (Cactáceas) a lo largo de una cronosecuencia edáfica. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. 35 pp.
45. Mehta, A. y Shaha, C. 2004. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *Journal of Biology and Chemistry*. 279, 11798-11813.
46. Méndez, L. I., Ortiz, E., Villaseñor, J. L., 2004. Las Magnoliophyta endémicas de la porción xerofítica de la provincia florística del Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México. *Serie Botánica*. 75(1): 87-104.
47. Mitsuhashi, S., Saito, A., Nakajima, N., Shima, H., Ubukata, M. 2008. Pyrogallol structure and a polyphenol is involved in apoptosis-induction on HEK293T and K562 cells. *Molecules*. 1,3: 2998-3006. ISSN 1420-3049.

48. Morón, R. F. J., Jardinez, M. J. B. 1997. La medicina tradicional en las universidades médicas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2 (1): 35-41.
49. Murray, P.R., Rosenthal, K., Pfaller, M. 2005. *Medical Microbiology*. ELSEVIER MOSBY. Staed, E.U.A., 870-876.
50. Organización Panamericana de la Salud /Organización Mundial de la Salud. 1994. *Epidemiología, Diagnóstico, Tratamiento y Control de la Leishmaniasis en América Latina*. Taller Interamericano sobre la Leishmaniasis en las Américas. Nicaragua.
51. Palacios, L. E., 2005. *Economía y plantas medicinales*. Facultad de Ciencias Económicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, CSI. *Boletín*. 52: 28-32 pp.
52. Park, E., Lee, A., Park, S., Kim, J., Cho. M. 2014 Multiple pathways are involved in palmitic acid-induced toxicity. *Food and Chemical Toxicology*. 67-26
53. Peraza, S. S. R., Salazar, A. N. E., Peña, R. L. M. J. 1995. A new triterpene from the resin of *Bursera simaruba*. *Journal of Natural Products*. 58: 271-274.
54. Piscopo, T. V., Mallia, A. C. 2006. *Leishmaniasis*. *Postgraduates Medical Journal*. 82.
55. Ranson, R., Shaw, J., Silveira, F., De Souza, A., Braga, R. Ishikawa, E. 1994. *The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

56. Reynoso-Orozco, R., Delgado-Moreno, J.I., Puebla-Pérez, A.M., Calvo-Méndez, C., Can, D., Velázquez-Magaña, S., Santerre, A., 2008. Difluorometil ornitina y extracto acuoso de *Bursera fagaroides* en el modelo de linfoma murino L5178Y en ratones Balb/c: Comparación de su efecto en el metabolismo de las poliaminas. *Revista Salud Animal (CENSA)*.
57. Robles, C., Téllez, A., Rojas, C., Riveros, T. 2010. Efectos citotóxicos *in vitro* de extractos y fracciones de *Bursera tomentosa* (Lacq.) Triana & Planch., Burseraceae, frente a líneas celulares tumorales humanas. *Brazilian Journal of pharmacognosy*. 20(4): 588-593.
58. Rodríguez, M. 2014. Efecto amebicida de los extractos metanólicos de tres especies del género *Bursera* contra *Naegleria Fowleri*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
59. Rojas, A., Mendieta, M., Antúnez, M., Salas, E., Marquina, S., Villareal, M., Puebla, A., Delgado, J., Alvarez, L. 2012. Cytotoxic podophyllotoxin type-Lignans from the steam bark of *Bursera fagaroides* var. *fagaroides*. *Molecules*. ISSN 1420-3049. 7, 9506-9519.
60. Rojas, B. 2012. Variación temporal en la composición química del aceite esencial de *Bursera arida* (rose) standl., y validación de su actividad antimicrobiana. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
61. Rosas-Arreguín, P., Arteaga-Nieto, P., Reynoso-Orozco, R., Villagómez-Castro, J., Sabanero-López, M., Puebla-Pérez, A., Calvo-Méndez, C. 2008. *Bursera fagaroides*, effect of an ethanolic extract on ornithine decarboxylase (ODC) activity *in vitro* and on the growth of *Entamoeba histolytica*. *Experimental Parasitology*. 119; 398-402.

62. Rosas, L.R. 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 94.
63. Ruíz, P. 2014. Actividad anti-leishmánica del extracto metanólico de *Bursera Aptera* Ramírez. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
64. Rzedowski, J., Kruse, H. 1979. Algunas tendencias evolutivas en *Bursera* (Burseraceae). *Taxón* 28 (1,2/3), 103-116.
65. Rzedowski, J., Medina, L. R., Calderón, R. G., 2004. Las especies de *Bursera* de la cuenca del río Papaloapan, México. *Acta Botánica Mexicana*. 66: 23-151.
66. Rzedowski, J., Medina, R., Calderón, R, G., 2005, Inventario del conocimiento taxonómico, así como de la diversidad y del endemismo regionales de las especies mexicanas de *Bursera* (Burseraceae). *Acta Botánica Mexicana*. 70: 85-111.
67. Saeed, N., El- Demerdash, E., Abdel, H., Abbasi, F., Abdel-Naim, A., 2012. Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat model. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 264: 84-93.
68. Salacedo-Sánchez, B. 1997. Insectos precortesianos de la cueva de Coxcatlán, del Valle de Tehuacán, Puebla. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. 6-10 pp.
69. Salaiza, S. 2001. Análisis del Perfil Celular y Análisis Cualitativo de Linfocitos y T Citotóxicos CD8+ en Pacientes con Leishmaniasis Cutáneas Localizada y

Difusa y su Correlación con el Tratamiento. Tesis para obtener grado de Doctor en Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, UNAM. México.

70. Sepúlveda, G., Porta, H., Rocha, M. 2004. La participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 355-363.
71. Sen, N., Das, B. B., Ganguly, A., Mukherjee, T., Tripathi, G., Bandyopadhyay, S., Rakshit, S., Sen, T. & Majumder, H. K. 2040. Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *Cell Death Differ*. 11: 924–936.
72. Shan, X., Miao S., Fan R., Song, C., Wu G., Wan, Z., Zhu J., Sun, G., Zha, W., Mu, W., Zhou, G., Chen, Y. 2013. Suppression of Grb2 expression improved hepatic steatosis, oxidative stress, and apoptosis induced by palmitic acid in vitro partly through insulin signaling alteration. *In Vitro Cell.Development Biology*. 49:576–582 DOI 10.1007/s11626-013-9646-9
73. Smith, C. E., 1965a. Flora, Tehuacán Valley. *Fieldiana Botany*.31: 50-100.
74. Smith, C. E., 1965b. Agriculture, Tehuacán Valley. *Fieldiana Botany*. 31: 101-143.
75. Song, Y., Zhang, H., Chang, C., Bollag, D. 1994. Cytotoxic cyclolignans from *Koelreuteria henryi*. *Journal of Natural Products*. 57(12):1670-4
76. Sosa, S., Balick, M. J, Arvigo, R., Esposito, R.G., Pizza, C., Altinier, G., Tubaro, A. 2002, Screeninig of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants. *Journal of Ethnopharmacology*.81: 2122-215.

77. Standley, P. C., 1923. Trees and shrubs of México. Contributions. From the United States National Herbarium. 23: 542-552.
78. Syamasundar, K. V., Mallavarapu, G. R., Muralikrishna, E. 1995. Two triterpenoid lactones from the resin of *Bursera delpechiana*. *Phytochemistry*.40: 337-339.
79. Tasdemir, D., Kaiser, M., Brun, M., Yardley, V., Schmidt, T., Tosun, F., Ru'edi. 2006. Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Flavonoids and Their Analogues: In Vitro, In Vivo, Structure-Activity Relationship, and Quantitative Structure-Activity Relationship Studies. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 1352–1364 Vol. 50, No. 4.
80. Valiente, B.L. 1991. Patrones de precipitación en el valle semiárido de Tehuacán, Puebla, México. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. 65 pp.
81. Valiente-Banuet, a., A. Alcantara, P. Dávila, N. Flores-Hernández, M.C. Arismendi, J. OrtegaRamírez y J.A. Soriano. 2000. La vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín dela Sociedad Botánica de México*. 67:25-75.
82. Van Arman, C.G., A.J. Begany, L.M. Miller y H.H. Pless. 1965. Some details of the inflammations caused by Yeast and Carrageenan. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 150: 328-333.
83. Vargas, R., Bottia, J. 2008. Estudio de la composición química de los aceites esenciales de 6 especies de vegetales cultivadas en los municipios de Bolivar y El Peñon-Santander, Colombia. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química.

84. Velasco, C. O. 1991. La magnitud de una infección endémica, las Leishmaniasis en la seroepidemiología en México. Publicación Técnica No 9. INDRE. Secretaria de Salud México.
85. Velasco, C. O., Guzmán B. C., Rias, S. B. 1994. Las Leishmaniasis. Con especial referencia a México. Publicación Técnica del INDRE. Secretaria de Salud México.
86. Verma, N. K. & Dey, C. S. 2004. Possible mechanism of miltefosinemediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother.* 48: 3010–3015.
87. Villaseñor, J. L., 1992. Los parques nacionales y otras áreas protegidas y su papel en la conservación de la riqueza florística. *Boletín del Instituto de Botánica, Universidad de Guadalajara.* 1: 119-130.
88. Secretaría de Salud. 2008. Programa de acción específico 2007-2010. Enfermedades transmitidas por vector. México DF. 70 p.
89. Shinya, M., Akiko, S., Noriyuki M., Hiroshi, S., Makoto, U. 2008. Pyrogallol Structure in Polyphenols is Involved in Apoptosis-induction on HEK293T and K562 Cells. *Molecules*, 13, 2998-3006; DOI: 10.3390/molecules13122998.
90. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. <http://www.dgepi.salud.gob.mx/sinave/index.htm>.
91. World Health Organization (WHO). 2012. Leishmaniasis En Línea: <http://www.who.int/tdr/diseases-topics/leishmaniasis/en/>.
92. Yong, H., Hwa, J., Bo, Y. Sung, Suhn, H., Woo, H., 2010. Pyrogallol-induced endothelial cell death is related to GSH depletion rather than ROS level changes *Oncology Reports.* 23: 287-292.

10. APÉNDICES.

10.1. Apéndice 1.

10.1.2. Zona de Colecta

La especie *Bursera arida* se colectó en el poblado de San Rafael, municipio de Coxcatlán, que se localiza al sureste de Tehuacán, en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, entre 18°12' y 18°14' de latitud norte, así como 97°07' y 97°09' de longitud oeste, con un rango de altitud de 957 a 1400 m.s.n.m. (Fig. 21).

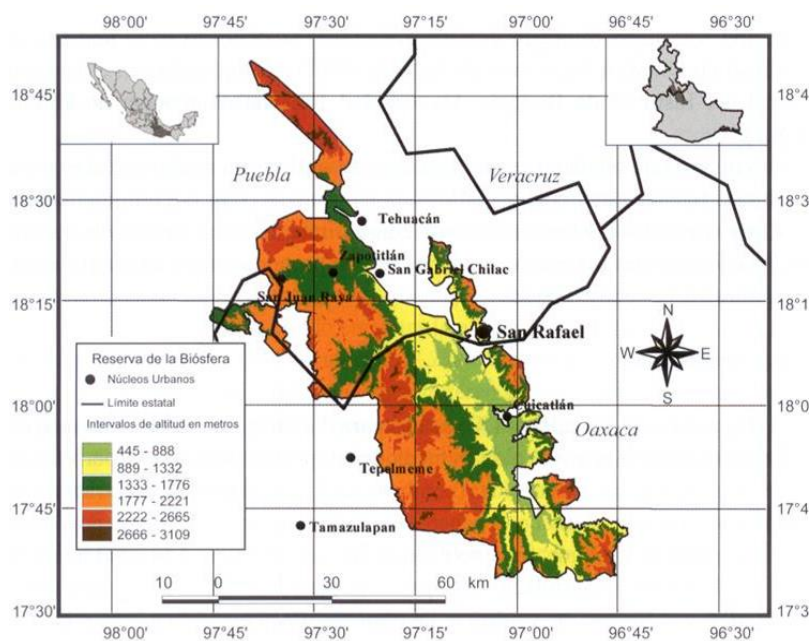


Figura 21. Poblado de San Rafael

10.1.3. Clima

El clima es de tipo Bs (h') w'' (w) de acuerdo con la clasificación de Köppen, modificado por García (1981), 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 (Medina, 2000). Valiente (1991) calcula una precipitación anual de 364.6 mm para la zona; cerca de los 386.57 mm registrada en 1988 en la estación climática Tilapa, situada a 3.25 Km al sur de la zona de estudio. En 1998 los 763.7 mm de precipitación casi duplicaron el promedio anual, concentrándose en los meses de junio a noviembre.

10.1.4. 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 (Salcedo-Sánchez, 1997).

10.1.5. 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.

10.1.6. 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 (Valiente-Banuet et al., 2000). Fernández (1999), 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), *Fouquieria 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 *Fouquieria formosa*, *Bursera aptera* (Ramírez), *Mimosa polyantha*, *Ceiba parvifolia* (Rose), *Manihotoides pasiflora* (Brandege), *Senna wisliseni* (DC), *Mimosa luisiana* (Brandege) y *Sanvitalia*

fruticosa. 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 fruticosa*.

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

10.1.7. Población.

La comunidad de San Rafael, es relativamente joven. Se fundó a principios del siglo XX y cuenta con 298 habitantes (151 mujeres y 147 hombres) (Secretaría de Salud, 2001). La mayor parte de la población actual es nativa de San Rafael y la actividad económica más 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 (Rosas, 2003).

10.2. Apéndice 2.

10.2.1. Citometría de Flujo.

1. Inducir el proceso de apoptosis usando el metodo a probar. Preparar un control negativo e incubar las células en ausencia del agente inductor.
2. Cosechar las células después de la incubación y lavar con PBS.
3. Preparar 1x buffer de unión a anexina. P.e. para 10 ensayos, agregar 1 ml 5x buffer de unión a anexina (componente C) con 4 ml de agua desionizada.
4. Preparar una solución de trabajo 100 µL sobre 1 mg/mL de solución stock de PI (Componente B) en 100 µL 1x de buffer de unión a anexina.

5. Centrifugar nuevamente las células lavadas (Paso 2), desechar el sobrenadante y resuspender las células en 1x de buffer de unión a anexina.
6. Agregue 5µL de FITC anexina V (componente A) y 1 µL de la solución de trabajo de PI 100 µg/mL (preparado en el paso 4) para cada 100 µL de células en suspensión.
7. Incubar las células a temperatura ambiente por 15 minutos.
8. Después del periodo de incubación, agrega 400 µL de 1x buffer de unión a anexina, mezclar suavemente y mantener las muestras en hielo.
9. Tan pronto como sea posible, analice las células teñidas por citometría de flujo, midiendo la emisión de fluorescencia entre 530 nm-575 nm. La población debe separarse en tres grupos: células vivas se mostrarán solo a bajos niveles de fluorescencia, células apoptóticas muestran fluorescencia verde y células muertas muestran fluorescencia roja y verde.

10.3. Apéndice 3.

10.3.1. Tinción de Cristal Violeta (Badisa et al 2003).

1. Se elimina el medio de la placa de cultivo de 96 pozos sacudiéndola, después de lo cual se lava dos veces suavemente con PBS 1X estéril.
2. Con 50 µL de glutaraldehído 1 % por 5 minutos se fijan las células.
3. Se retira el resto de glutaraldehído y se lava suavemente dos veces con PBS 1X estéril y se agregan 100 µL de solución de Cristal Violeta a todos los pozos.
4. Se incuba de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad y se elimina el exceso de colorante sacudiendo la placa.
5. Nuevamente se lava la placa con solución salina o PBS 1X. con 50 µL de ácido acético al 10% se solubilizan las células y se procede a leer en un lector de ELISA a una longitud de onda de 595 nm.

10.4. Apéndice 4.

Determinación de los compuestos presentes en el extracto metanólico de *B. arida* por medio de Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM)

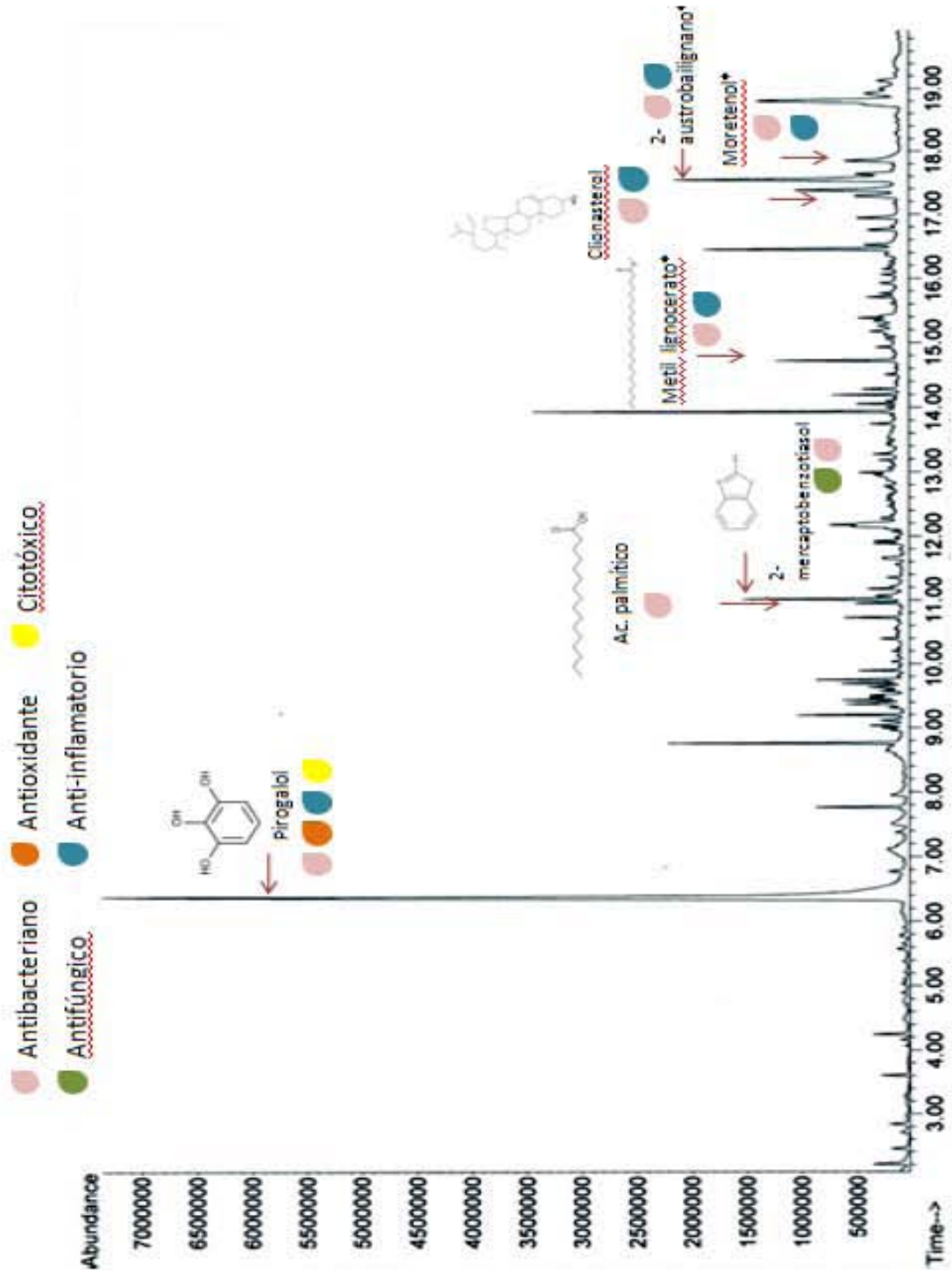
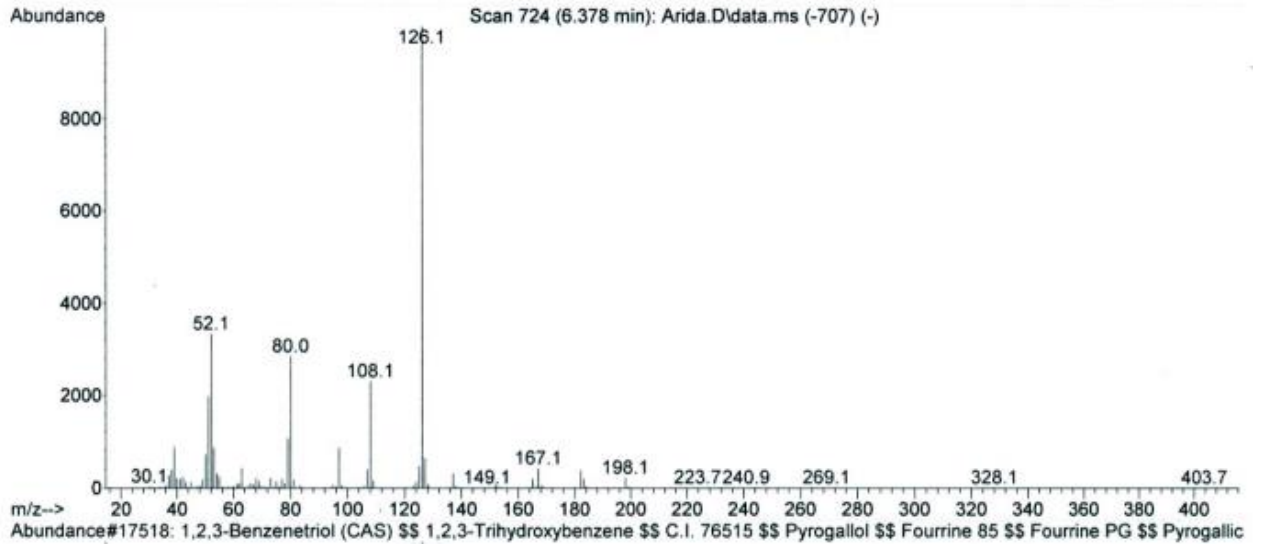


Figura 22. Cromatograma del extracto metanólico de *B. arida* (CG-EM). Análisis realizado en el Laboratorio Nacional de Prevención y Control de Dopaje, CONADE.

A)



B)

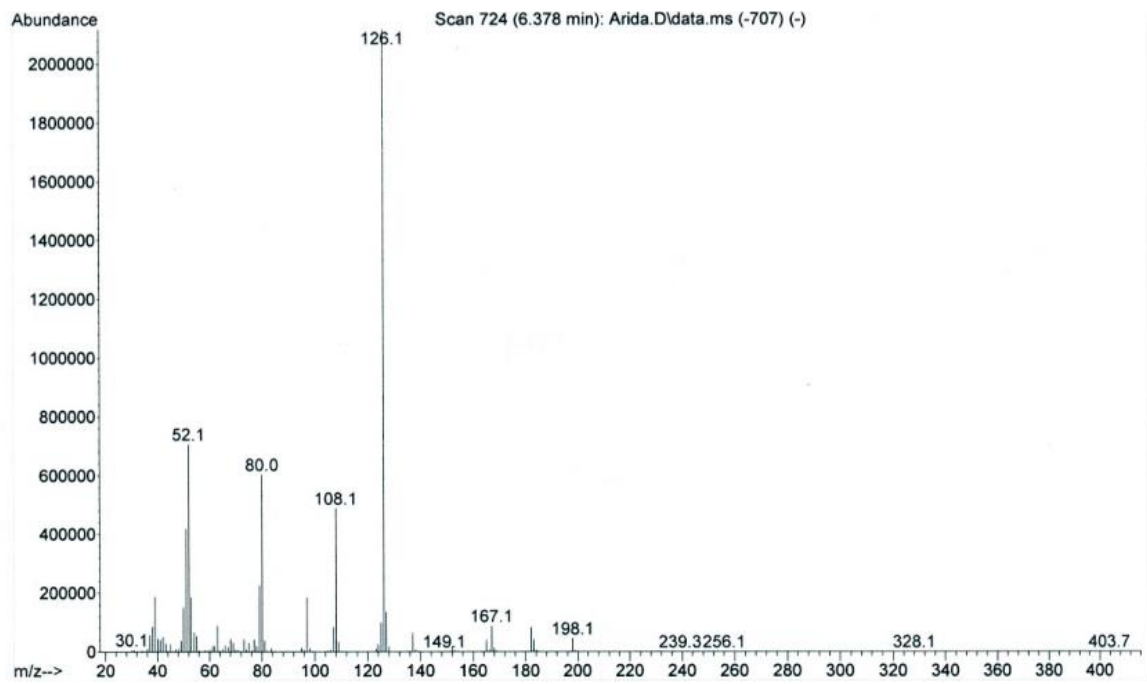
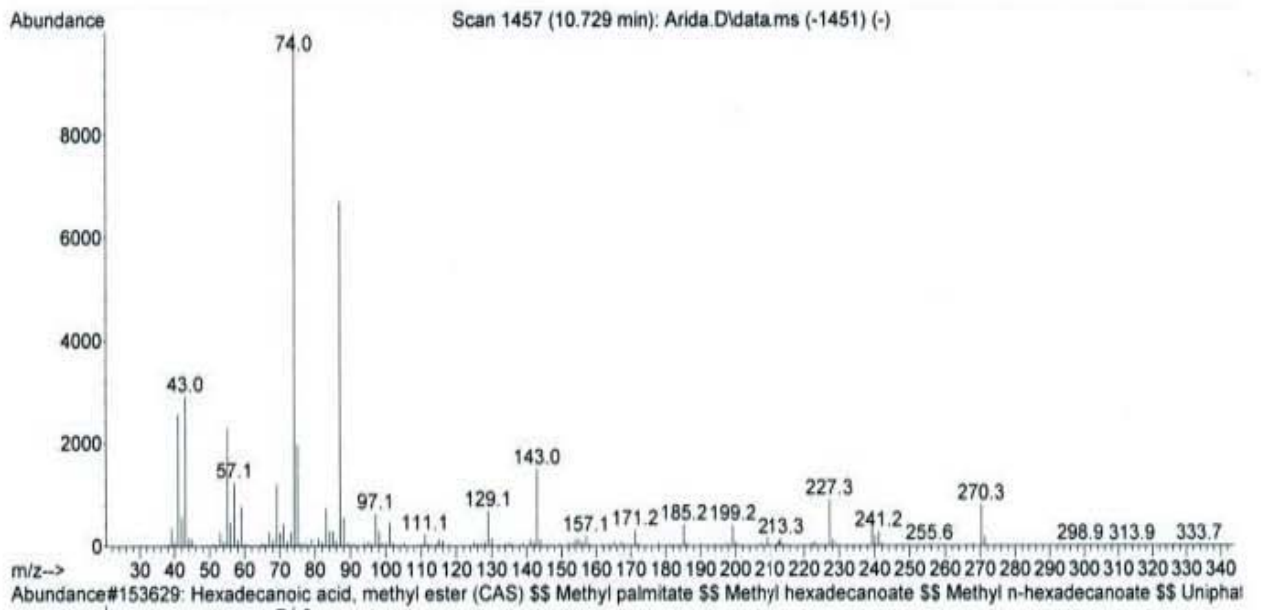


Figura 23. Patrón de fragmentación generado por: A) Base de datos WILEY 275; B: Pirogallol, detectado en el extracto metanólico de *B. arida*.

A)



B)

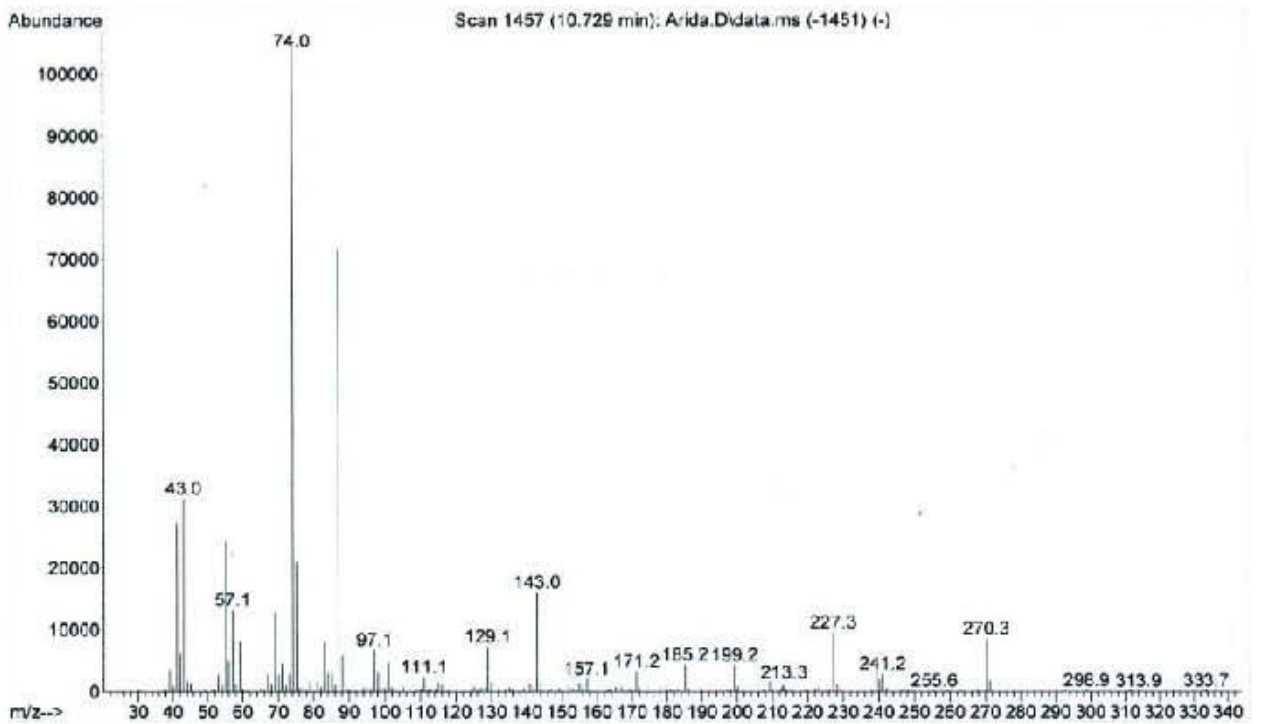
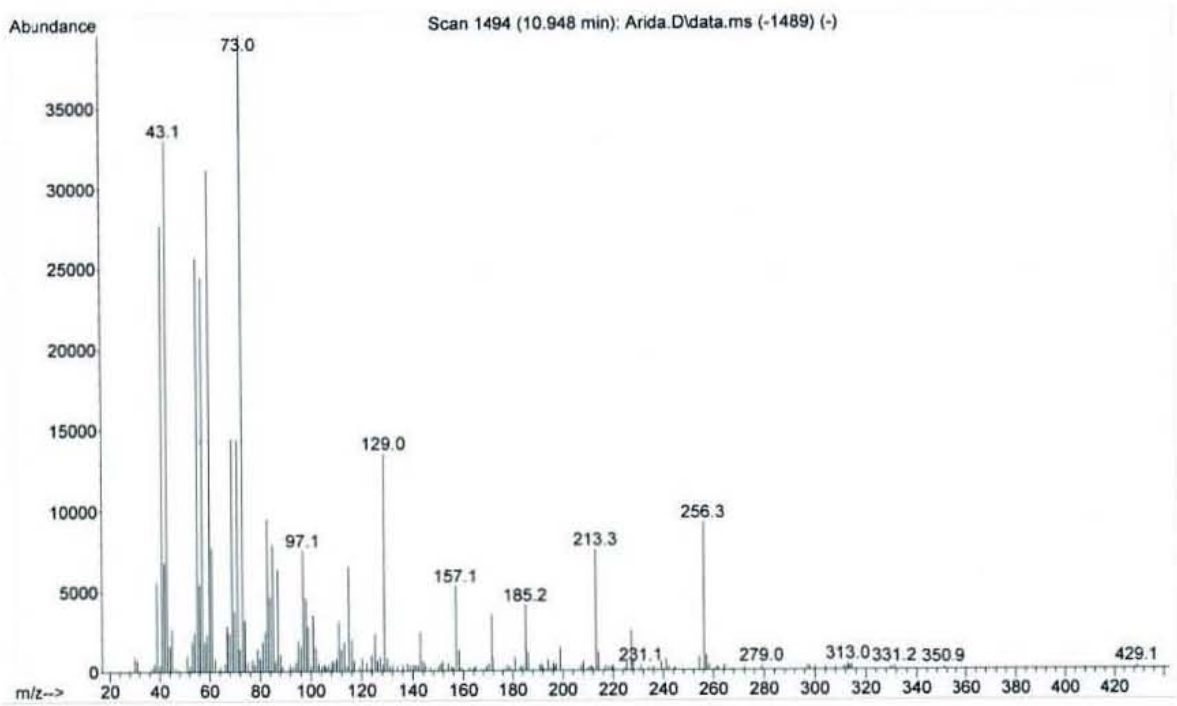


Figura 24. Patrón de fragmentación generado por: A) Base de datos WILEY 275; B: Metyl Palmitato detectado en el extracto metanólico de *B. arida*.

A)



B)

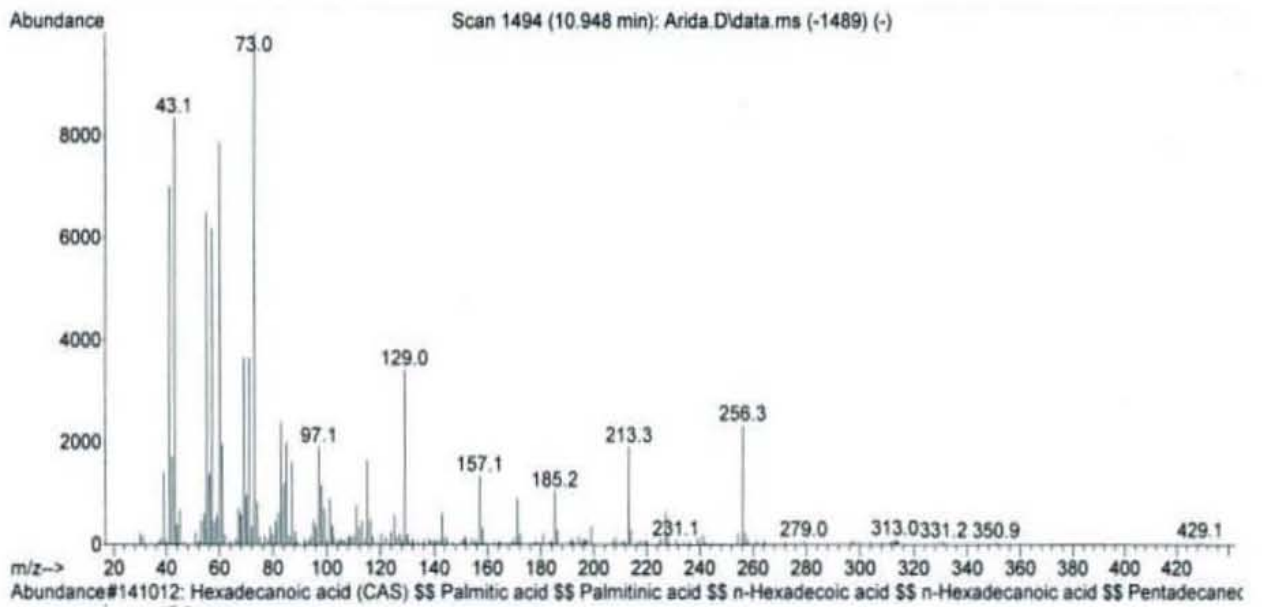
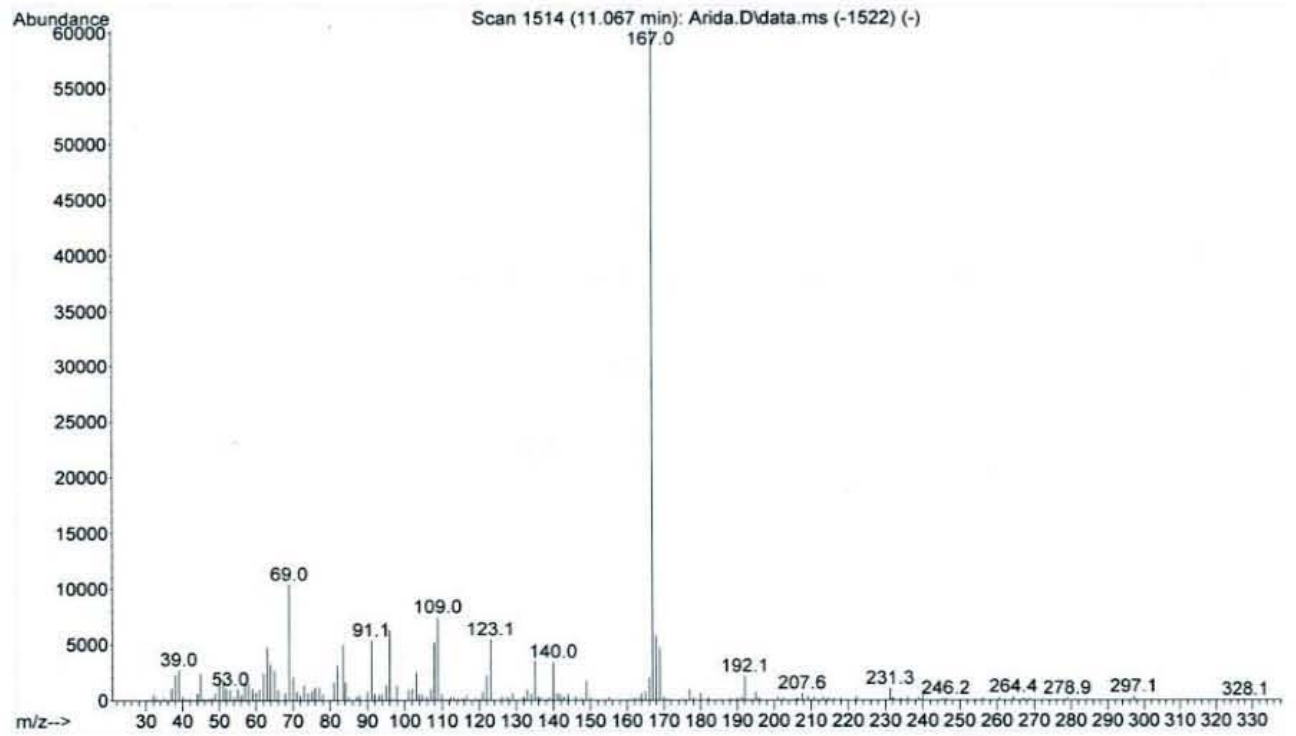


Figura 25. Patrón de fragmentación generado por: A) Base de datos WILEY 275; B) Ácido Palmítico detectado en el extracto metanólico de *B. arida*.

A)



B)

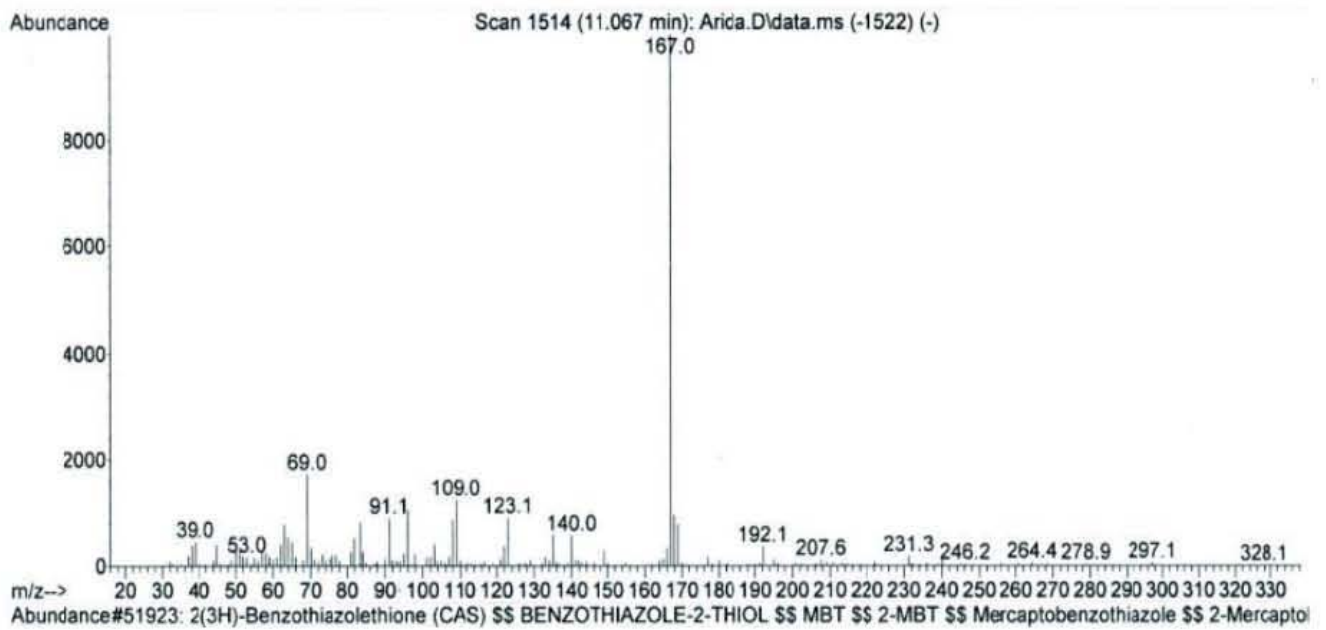
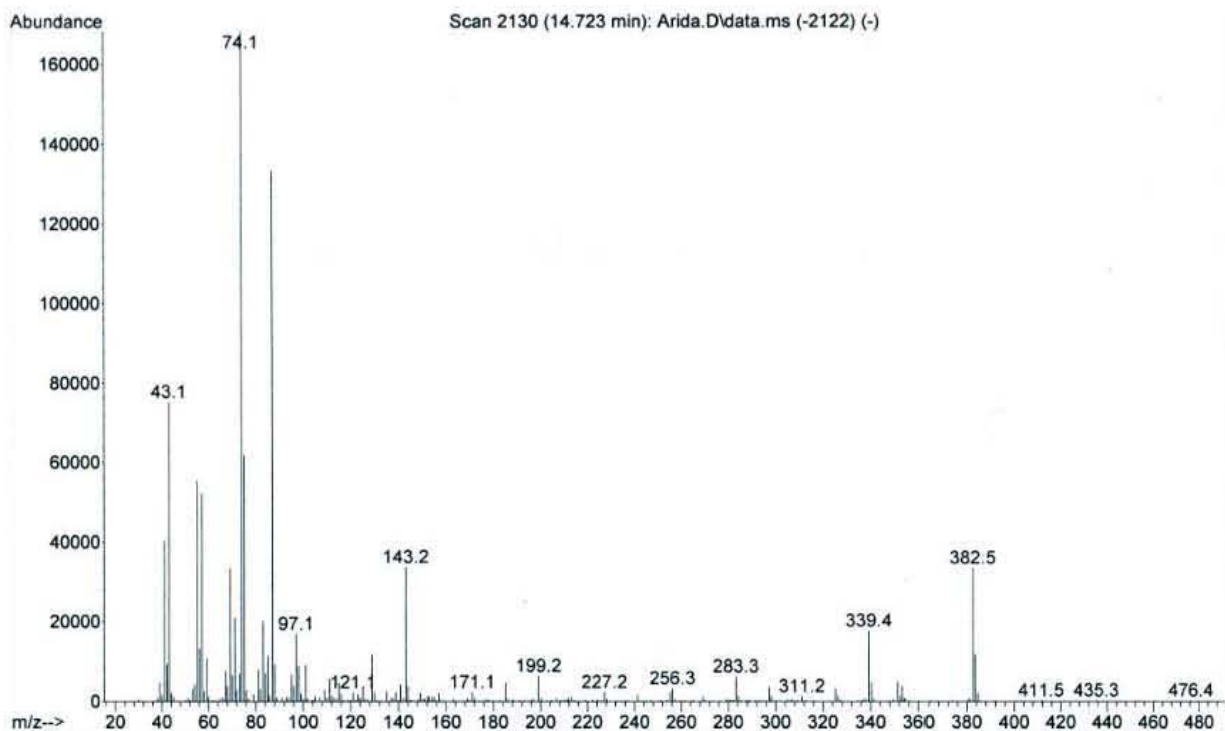


Figura 26. Patrón de fragmentación generado por: A) Base de datos WILEY 275; B: 2-Mercaptobenzotiazol detectado en el extracto metanólico de B. arida.

A)



B)

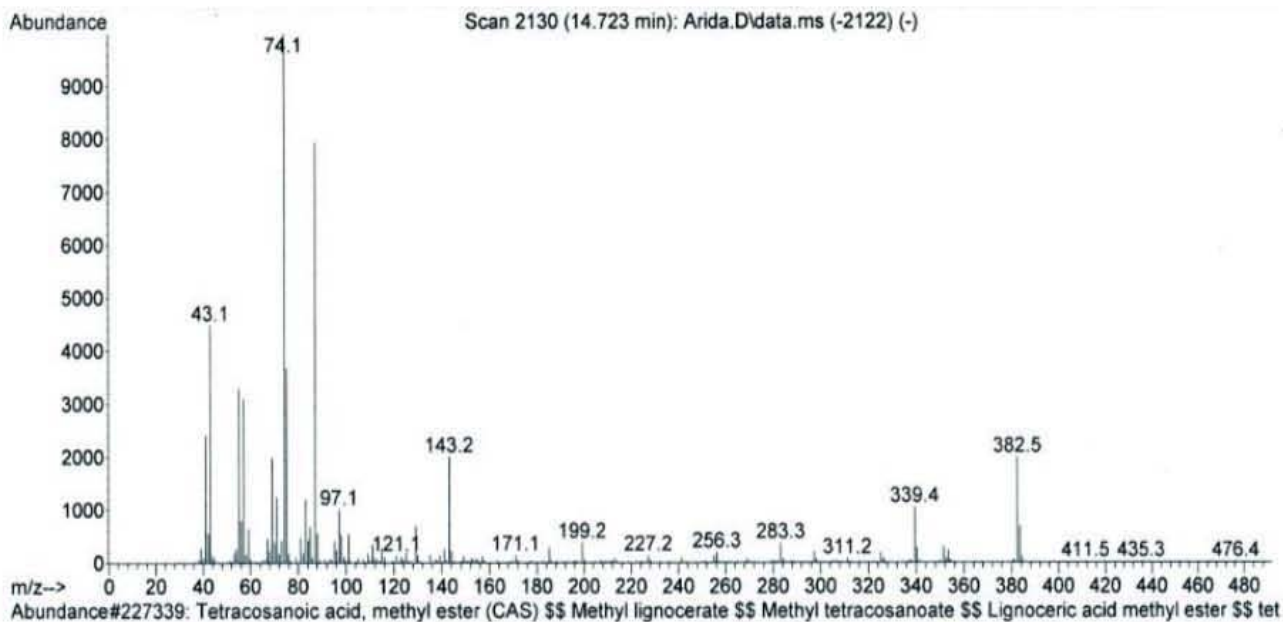
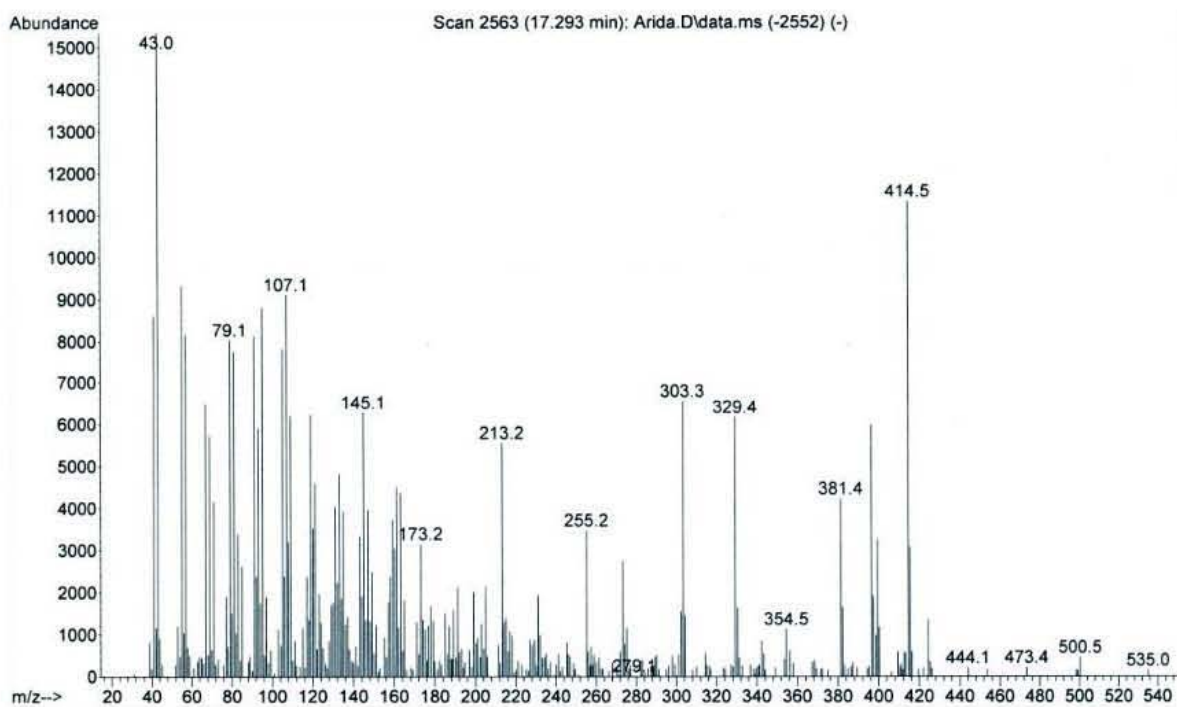


Figura 27. Patrón de fragmentación generado por: A) Base de datos WILEY 275; B) Metyl Lignocerato detectado en el extracto metanólico de *B. arida*.

A)



B)

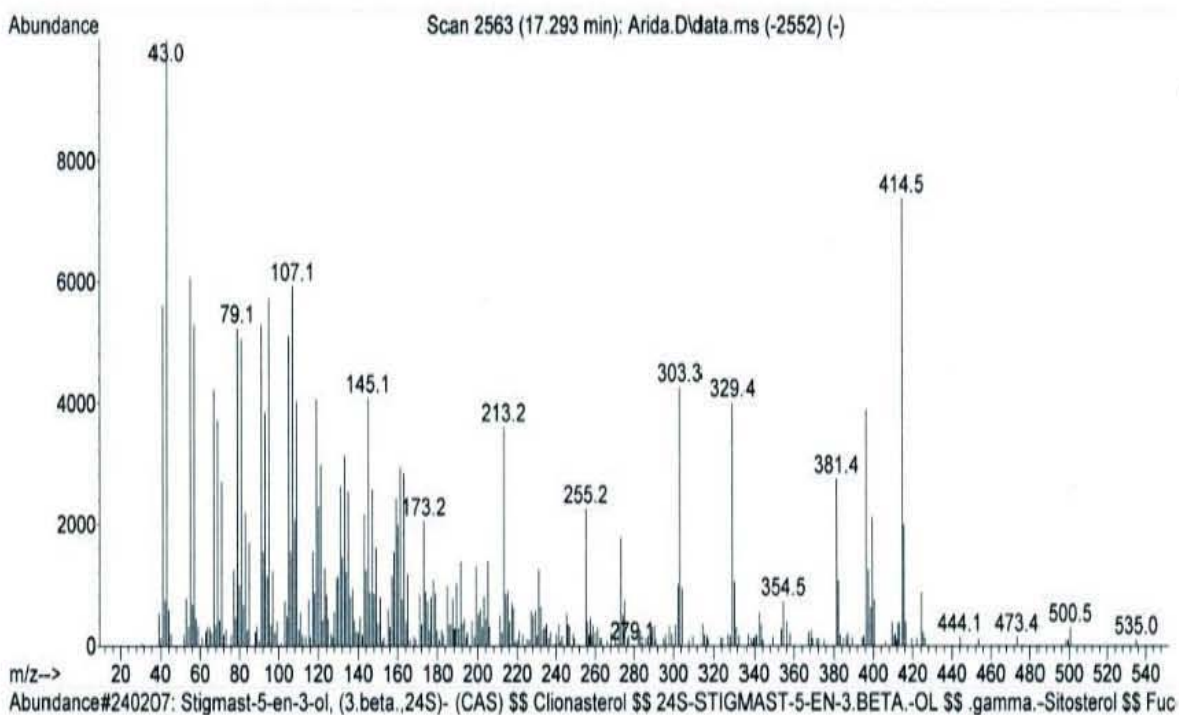
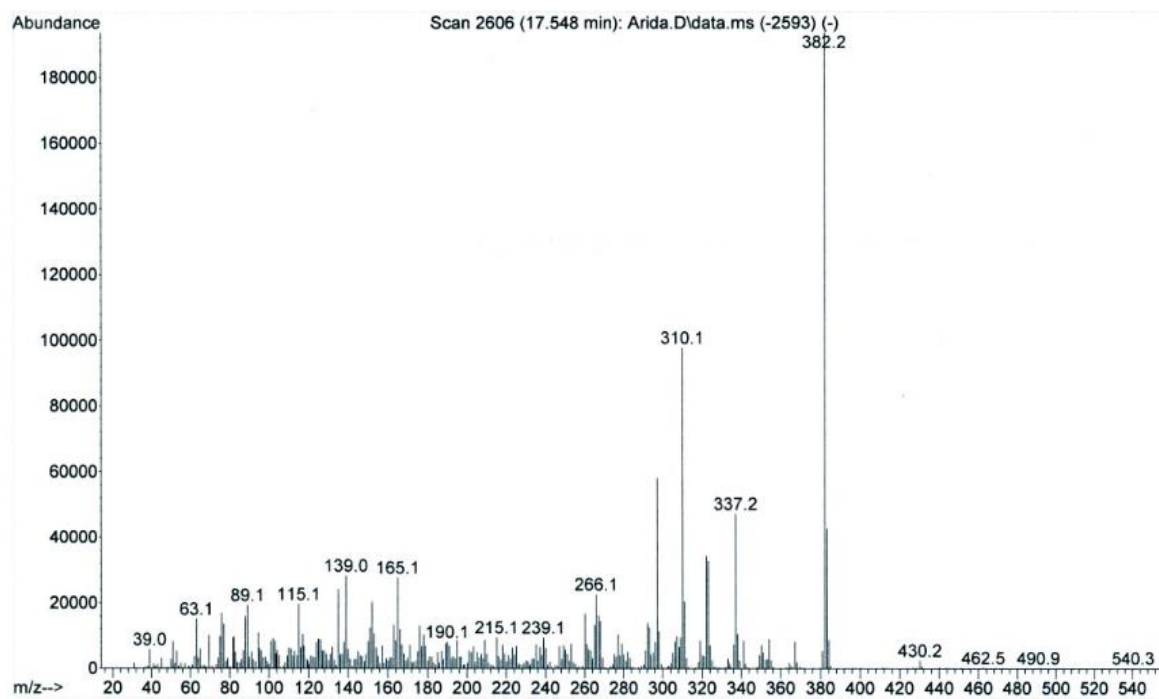


Figura 28. Patrón de fragmentación generado por: A) Base de datos WILEY 275; B) Clionasterol detectado en el extracto metanólico de *B. arida*.

A)



B)

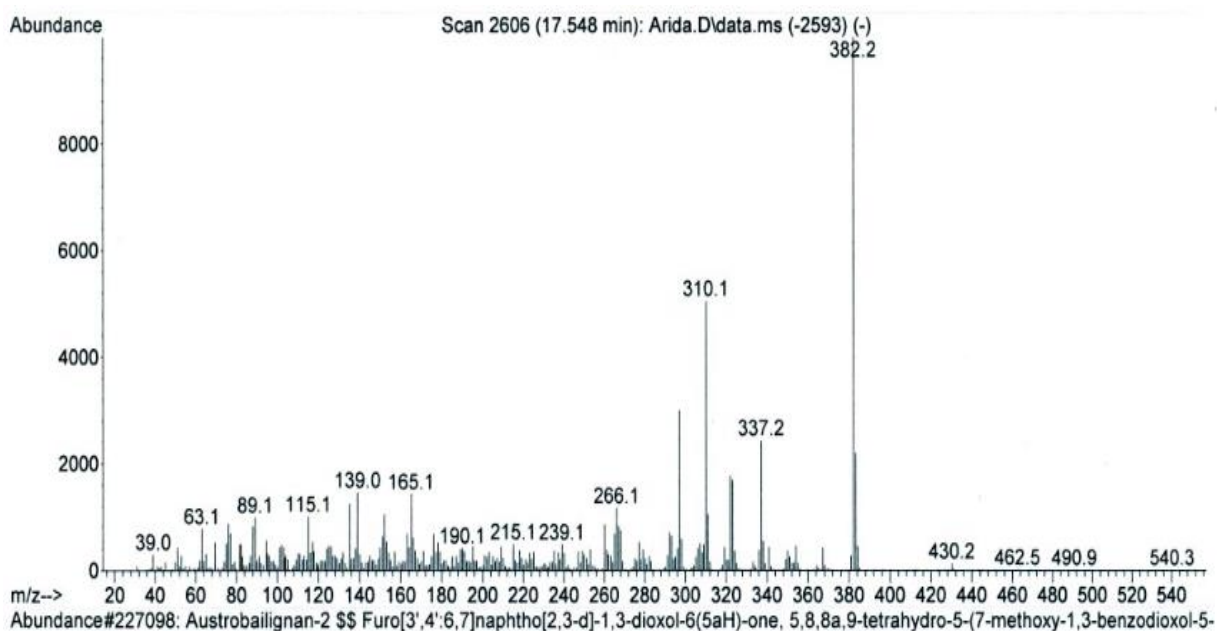
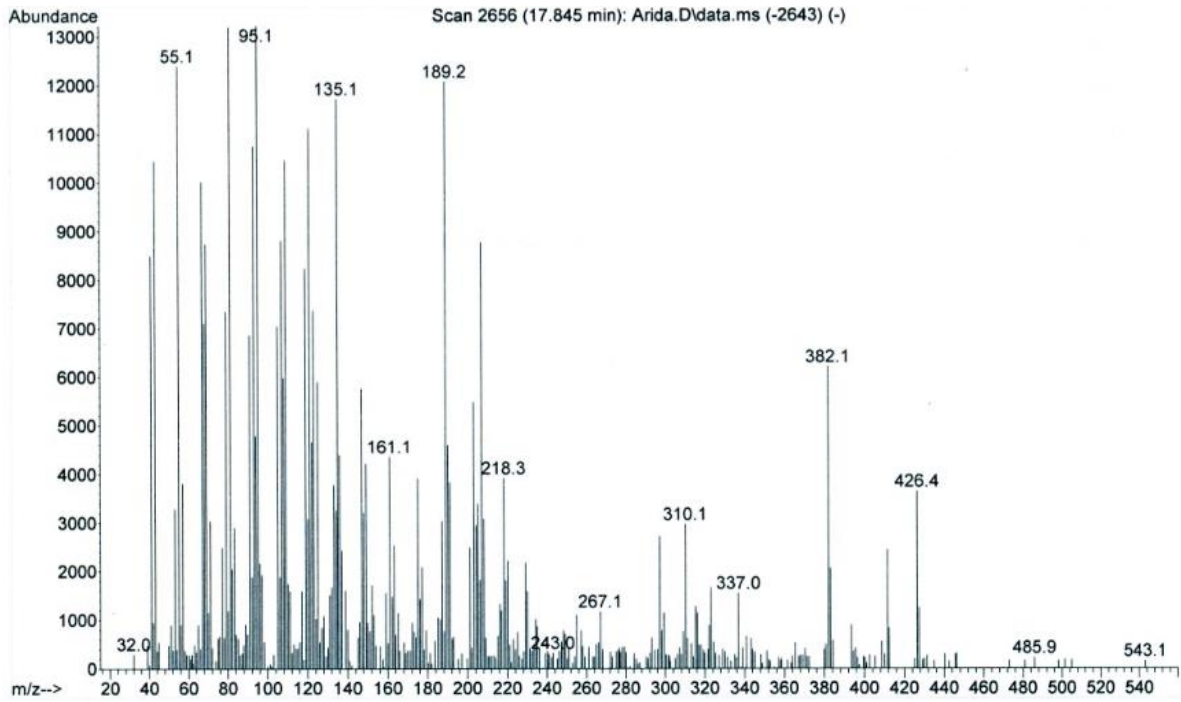


Figura 29. Patrón de fragmentación generado por: A) Base de datos WILEY 275; B: 2- Austrobailignano detectado en el extracto metanólico de B. arida.

A)



B)

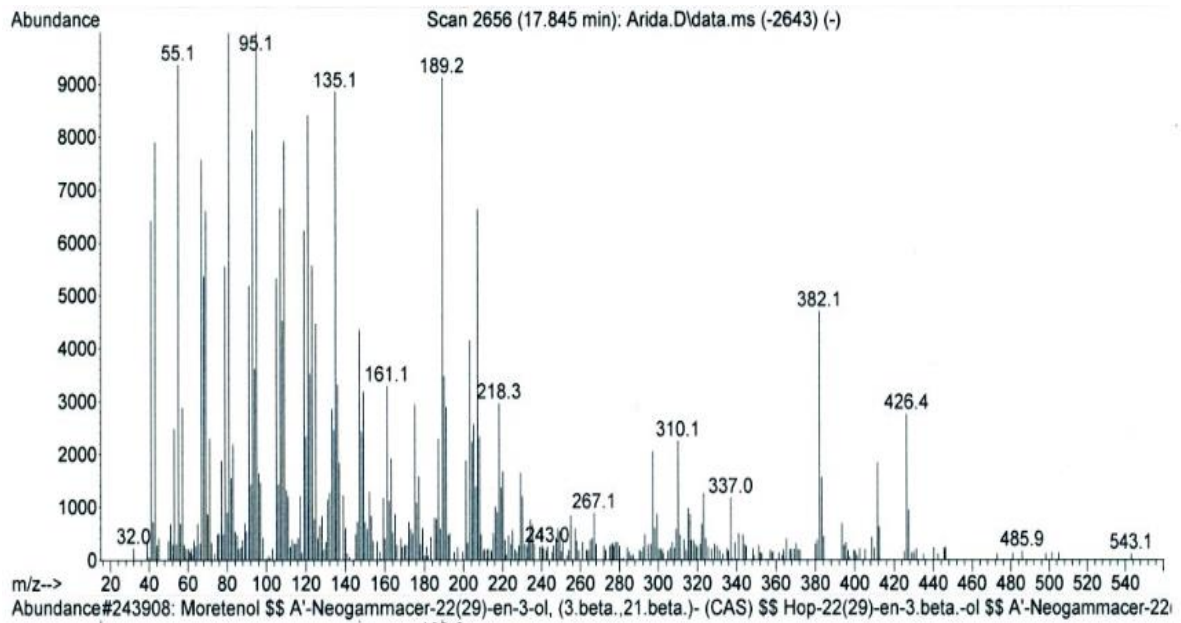


Figura 30. Patrón de fragmentación generado por: A) Base de datos WILEY 275; B: Moretenol detectado en el extracto metanólico de *B. arida*.