



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGÍA

“Caracterización del efecto del extracto metanólico
de la corteza de *Bursera morelensis* sobre
Leishmania mexicana.”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

PRESENTA:

ANA JUDITH GARCÍA LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. MARCO AURELIO RODRÍGUEZ MONROY

Los Reyes Iztacala, Edo. México, 2015





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 por ser un guía para todos nosotros, por su motivación día a día, por haberme aceptado en el laboratorio y porque gracias a él se realizó este trabajo.

Al M. en C. Oscar de Jesús Nieto Yáñez por la ayuda que ofrece en todo momento, el apoyo en al realizar cada técnica, la paciencia y tiempo que nos brinda.

A la Dra. María Margarita Canales Martínez porque siempre nos impulsa a dar lo mejor de nosotros, a no quedarnos con lo que ya tenemos a buscar más y por brindarnos el material para realizar este trabajo.

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

A la M. en C. Ma. de los Ángeles Sanabria al M. en C. Luis Barbo Hernández, a la Dra. María Margarita Canales Martínez, al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy y a la 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

Una vez un compañero me dijo que la parte de las dedicatorias había sido la más difícil para él y la verdad yo pensé: ¿difícil?, difícil canular ratones, pero ahora que me tocó a mí lo entiendo, deje esta parte para el último porque según yo era lo más fácil y ya me di cuenta que no es así que lo deje para el último momento porque la verdad sí es muy difícil plasmar lo que sientes. Tengo tanto que agradecer y a tantas personas que la verdad no se ni por donde comenzar, y es que hay tantas personas que forman parte de mi vida que la hacen muy especial, otras que ya partieron pero que también tengo mucho que agradecerles porque sin ellas yo no estaría aquí y algunas más que ya salieron de mi vida pero que de igual forma fueron importantes en ella.

Porque para mí no hay una mejor mujer ni mejor madre, esta tesis se la dedico especialmente a mi mamá Ana María, por su apoyo incondicional siempre, para que yo estudiara, el impulso a siempre ser mejor persona, a no quedarme callada si algo no me parecía, ella no lo sabe pero al verla todos los días como llegaba del trabajo cansada y se quedaba dormida en la mesa un ratito para despertarse y poder ayudarnos con la tarea y hacer la comida, al siempre ser la última en dormirse y la primera en levantarse, nunca te quejaste de nada mamá aunque se veía en tu carita el cansancio, con todos sus sacrificios me inspiraba a seguir adelante a no rendirme jamás pero sobre todo me enseñaste que se tiene que luchar por lo que se quiere. A tí te dedico mi tesis mamá, porque nunca tomaste el camino fácil aunque hubiera sido mejor para tí, siempre pensaste primero en nosotras, siempre fuiste una amiga para mí, juntas peleamos por estar mejor y espero así siga siendo Te quiero y te amo mucho.

A mis hermanas Angélica y Marilú a las cuales amo con todo mi corazón, por ser mis mejores amigas, mis confidentes por quien yo luchaba día a día, porque aunque yo siempre me quejaba de lo que me decía mi mamá que tenía que ser un ejemplo para ustedes por ser la mayor, yo no les decía nada pero lo intentaba, sólo les quiero decir que no las cambiaría por nadie aunque nos peleamos y dejemos de hablar yo siempre voy a estar para ustedes y sé que ustedes lo estarán para mí.

Angie hermanita eres una gran mujer y sé que serás una gran esposa y madre ya te quiero ver con tu pancita, gracias por todos tus consejos y por tratar siempre de ayudarme.

Malalu ah niña aunque me saques canas verdes sabes que te adoro y que siempre lo hare, que eres muy terca pero creo que es parte de tu encanto gracias por mí Sam y por dejarme ser su madrina porque esa niña trajo mucha luz a nuestras vidas, con sólo una sonrisa de ella se te olvida un mal día, espero siempre me dejes cuidarla.

A mis abuelitos: Julia y Rogelio que aunque ya no están conmigo, todos los días pienso en ustedes, recuerdo sus voces , sus caritas todos los momentos que pase con ustedes, el tiempo que vivimos juntos y como me consentían, recuerdo esos momentos e instantáneamente se forma en mí cara una sonrisa. Sé que ya están juntos cuidándonos a todos y riéndose de todas las travesuras de sus nietos que siempre los amaremos. Siempre los llevare en mi corazón.

A todas mis tías: Irma, Lulú, Graciela, Betty y Sagrario porque siempre fui su sobrina favorita jajajajaja por cuidarme y llevarme para todos lados donde iban, a y a mi tía Lulú por enseñarme a hablar y cuidarme cuando era pequeña.

A toda la familia López Ramírez por siempre creer en mí y en mi buen sentido de la organización jajaja y que nunca dejemos de reunirnos ya sea para recordar a los abuelitos o para pasar un buen rato todos juntos.

A ti amor Rubén porque aunque todo lo nuestro ha sido diferente y muy rápido es algo muy especial, gracias por impulsarme a terminar esta meta y sé que juntos cumpliremos muchas más, gracias también por el regalo hermoso que me diste nunca lo olvidare y sé que tú tampoco Eres mi persona y créeme que quiero que esto que tenemos dure por mucho mucho tiempo.

A todos mis amigos de la carrera Karen, Vanessa, Leslie Roxana, Sandra Oscar, Yunuem, Carito, Yetzabelli, Izumy y Alonso, porque por ustedes es que todas las prácticas de campo, las salidas a bailar y hasta hacer los trabajos que nos dejaban son inolvidables.

Vanessa Karen y Leslie mis comadres que nunca me dejan sola que ya sea para hablar de penas o para divertirnos un rato siempre están conmigo por lo menos por mensajitos, las quiero mucho y nunca olvidare nuestras pedamadas.

Chicos del laboratorio de Inmuno Oscar, Nelly, Rubén, Gustavo, Mario, Vanessa, Mike, Acoyani, Daniela y Pilar, me gusta mucho este equipo de trabajo es un orgullo y un placer trabajar con ustedes, la verdad siento que nos acoplamos muy bien para trabajar bueno, también para divertirnos jajajajaja hay un equilibrio en todo lo que hacemos.

Laboratorio de Farma Rebeca, Ana, Karlita, Miriam, Juan Carlos, Michelle, Javier, Esly, porque también son parte importante del equipo de trabajo además de que nos divertimos todos juntos.

Profe Marco de verdad es nuestro padre académico y un verdadero amigo gracias porque se preocupa por nosotros nos aconseja y hasta nos cuida, nunca olvidare la vez que me dijo: “¿Y a ti quien te dio permiso de tener novio?” la verdad es que sentí muy bonito que se preocupara por mí, gracias por entenderme y apoyarme cuando más lo necesite. Me gusta mucho trabajar con usted la verdad es que yo creo que no pude haber encontrado mejor laboratorio para hacer mi licyt ni mejores personas, cuando vamos a los congresos me siento muy orgullosa de pertenecer a su equipo de trabajo.

Doctora Verdín que aunque ya no está entre nosotros dejo muchas enseñanzas y ganas de vivir íntensamente todos los días, gracias porque aprendí cosas que no sabía sobre histología y sé que faltaron muchas más.

A la profesora Margarita por sus sabios consejos y por siempre jalarnos las orejas cuando lo necesitamos, por aguantarnos en su casa y por decirnos que podemos hacer más.

Oscar Nieto: de grande quiero ser como tú, hablando enserio de verdad te admiro mucho, eres una persona muy comprometida, siempre das el 100% a todo lo que llevas acabo, nos ayudas en nuestros proyectos aunque tú tengas que hacer mil cosas más.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
Tipos de Leishmaniosis	3
Leishmaniosis Cutánea	3
Distribución	5
Ciclo de vida	7
Tratamiento	10
Medicina Tradicional	14
Metabolitos secundarios	14
Clasificación de los metabolitos secundarios.....	15
Fenoles	16
Terpenos.....	17
Alcaloides.....	19
Género <i>Bursera</i>	20
OBJETIVOS	22
General	22
Particulares	22
MATERIAL Y METODOS	23
Colecta de material	23
Obtención del extracto	23
Mantenimiento de la cepa <i>L. mexicana</i>	23
Infección de ratones con <i>L. mexicana</i>	23
Determinación del efecto <i>in vitro</i> del extracto metanólico de la corteza de <i>B. morelensis</i> sobre promastigotes de <i>L. mexicana</i>	24
Monitoreo del tamaño de la lesión	24
Carga parasitaria por dilución limitante	25

Obtención de suero.....	25
Detección de citocinas en sueros por la técnica de ELISA.	25
Determinación de la composición química del extracto por medio de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.	26
Histología.....	26
RESULTADOS	28
Rendimiento del Extracto	28
Para <i>B. morelensis</i> se obtuvieron 236 g de extracto metanólico crudo, que corresponden al 19.66% del rendimiento total, de un total de 1200 g de corteza de la planta (Tabla 1).	28
Determinación del efecto <i>in vitro</i> del extracto metanólico de la corteza de <i>B. morelensis</i> sobre promastigotes de <i>L. mexicana</i>	28
Tamaño de la inflamación.....	31
Carga Parasitaria.....	34
Cuantificar citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias por la técnica de ELISA ..	34
Determinación de la composición química del extracto por medio de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas	36
Cuadro 2: Compuestos identificados en la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.	38
Histología.....	40
DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	46
REFERENCIAS	47
APÉNDICES	55
Apéndice 1	55
TAXONOMÍA.....	55
Apéndice 2	58
Zona de colecta	58
Clima.....	58

Hidrografía	59
Edafología	59
Vegetación.....	59
Población.....	60
Apéndice 3	61
Técnica histológica	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Manifestaciones clínicas causadas por Leishmaniosis..	5
Figura 2. Distribución geográfica de la leishmaniosis a nivel mundial.	6
Figura 3. Distribución de la Leishmaniosis cutánea localizada en México.....	7
Figura 4. Vector de la leishmaniosis y estadios de la <i>Leishmania sp.</i>	9
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Leishmania sp.</i>	9
Figura 6: Ejemplo de Fenol (Auronas)	17
Figura 7: Ejemplo de los terpenos (Isopreno)	19
Figura 8: Ejemplo de alcaloides (Cafeína).....	20
Figura 9: Curva del efecto anti-leishmánico..	29
Figura 10: Efecto in-vitro del medicamento Estibogluconato de Sodio	30
Figura 11: Efecto in-vitro del medicamento Anfotericina B.....	30
Figura 12: Inoculación de <i>L. mexicana</i>	31
Figura 13: 13A Aplicación del extracto de <i>B. morelensis</i> en gel.	32
Figura 14: Monitoreo de la lesión hasta la semana nueve post-infección.....	32
Figura 15: Grafica de la última semana, donde se observa que hay una mayor diferencia significativa en esta semana de tratamiento.	33
Figura 16: Tamaño de la lesión a la semana ocho post-infección.	33
Figura 17: Carga parasitaria por dilución limitante.	34
Figura 18: Cuantificación de IL-4.	35
Figura 19: Cuantificación de TNF- α	36
Figura 20: La identificación de los compuestos se hizo con base a su espectro de masa.	37
Figura 21: Obtención de la lesión generada por <i>L. mexicana</i>	40
Figura 22: Cortes histológicos de heridas dorsales de los ratones.....	41
Figura 23: Cortes histológicos de piel sana de ratón.	42
Figura 24: Cortes histológicos de piel sana de ratón.	43
Figura 25: Árbol de <i>B. morelensis</i> tomada en el poblado de San Rafael Coxcatlán, Puebla.	57
Figura 26: Corteza de <i>B. morelensis</i>	57
Figura 27: Ubicación geográfica del poblado de San Rafael Coxcatlán, Puebla.....	58
Figura 28: Proceso Histológico hasta la inclusión del tejido.	63
Figura 29: Proceso de corte.	64
Figura 30: Descripción del proceso para la tinción con Hematoxilina-Eosina.	68

RESUMEN

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria de alta prevalencia en las áreas tropicales y subtropicales del mundo causada por distintas especies de protozoarios del género *Leishmania*, transmitida por insectos dípteros hematófagos (mosquito de la arena). La leishmaniosis produce casos en alrededor de 88 países de todo el mundo, con una población total de 350 millones de personas, lo que constituye un grave problema de salud pública. En México es provocada por *Leishmania mexicana*, la cual puede producir leishmaniosis cutánea que se manifiesta con infecciones ulcerosas. Estos parásitos han generado gran resistencia hacia los tratamientos de primera línea ya que se han administrado desde hace 40 años, por lo que se han tenido que usar medicamentos más tóxicos lo que provoca daño en diferentes órganos del cuerpo. Por este motivo la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a la medicina tradicional como una opción para el desarrollo de nuevos fármacos.

Estudios recientes demuestran que plantas del género *Bursera* presentan propiedades anti-microbianas, por ello se probó la actividad *in-vitro* e *in-vivo* del extracto de *B. morelensis* sobre ratones infectados de manera subcutánea con *L. mexicana*, presentando actividad anti-leishmánica con una CL₅₀ de 0.213 mg/mL. El área infectada se monitoreo durante 9 semanas, observando que los ratones tratados con gel al 10% del extracto de *B. morelensis* tuvieron un crecimiento de la lesión más lento, que los ratones que no se les aplicó el extracto, ya que la lesión de estos midió más de 1 cm mientras que el grupo tratado midió 0.5 cm. Se determinó la carga parasitaria de las heridas de los ratones experimentales por dilución limitante en la novena semana posterior a la infección obteniendo una visible disminución de los parásitos con 6.63×10^6 contra un 9.78×10^6 del grupo control. Por otra parte se obtuvieron los cortes histológicos de las lesiones provocadas por el parásito, a partir de los cuales se encontraron histiocitos con amastigotes de leishmania el grupo control mientras que el grupo tratado con extracto no observó ningún parásito. Se determinó la composición química del extracto por medio de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas identificando seis metabolitos secundarios de los cuales el Lanosterol y el Cicloartenol fueron los más abundantes. Finalmente se cuantificaron citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias empleando la técnica de ELISA revelando que el extracto provoca una exacerbación de las citocinas anti-inflamatorias que fue la IL-4 de 4538.816 pg/mL para el grupo con tratamiento y para el grupo control fue de 225.645 pg/mL mientras que en las citocinas

pro-inflamatorias que fue TNF- α hay una disminución de estas para el grupo con tratamiento 58.498 pg/mL y para el grupo control fue de 246.954 pg/mL.

Palabras clave: Extracto, parásito e inflamación.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis es una parasitosis causada por diferentes especies de protozoarios intracelulares obligados pertenecientes al género *Leishmania*; englobados en la familia Trypanosomatidae (orden Kinetoplastida), transmitida al ser humano cuando una hembra hematófaga de dípteros del género *Lutzomyia* (en América) o *Phlebotomus* (en Europa, Asia y África), muerde al hospedero para alimentarse. Esta enfermedad se caracteriza por comprometer la piel, mucosas y vísceras, según la especie de *Leishmania* y la respuesta inmune del huésped [1].

Tipos de Leishmaniosis

Aproximadamente 30 especies de parásitos pertenecientes al género *Leishmania* han sido identificadas, y al menos 21 de estos organismos son patógenos para los mamíferos. La leishmaniosis puede clasificarse en tres formas principales: la leishmaniosis cutánea (LC) que se presenta en dos variantes: leishmaniosis cutánea localizada (LCL) y leishmaniosis cutánea difusa (LCD) provocada por las especies *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania tropica*, *Leishmania aethiopica* y *Leishmania major*; la leishmaniosis mucocutánea (LMC) que al igual que la LC puede ser provocada por *Leishmania mexicana* y *Leishmania braziliensis* principalmente y la leishmaniosis visceral (LV o Kala-Azar) que es transmitida principalmente por *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum*, *Leishmania chagasi*, y *Leishmania donovani* [2].

Leishmaniosis Cutánea

Existen dos formas clínicas principales de LC; la leishmaniosis cutánea localizada (LCL) y la leishmaniosis cutánea difusa (LCD). Clínicamente se observan una o pocas lesiones localizadas en cualquier parte de la superficie corporal a predominio de áreas expuestas. Característicamente luego de la picadura de la mosca infectada, se presenta una pápula eritematosa infiltrada que crece en el transcurso de pocas semanas formando una placa que posteriormente se ulcera. La úlcera es de bordes infiltrados, eritemato-violáceos, el fondo es granuloso con presencia de secreción serohemática y puede infectarse secundariamente por bacterias patógenas que provocan la producción de secreción purulenta, costras y material necrótico, en este caso las úlceras son dolorosas y de no recibir tratamiento tienden a la cronicidad. Puede haber lesiones satélites

inflamatorias y cordones linfáticos rodeando la úlcera, así como, también pueden estar presentes adenopatías satélites en las zonas de drenaje linfático regional [3].

La LCL se caracteriza por la aparición de una o múltiples pápulas que aumentan de tamaño en áreas expuestas; presentan la característica de ulcerarse, además de que se localizan principalmente en las extremidades inferiores, que es en las zonas donde principalmente el vector muerde al hospedero para alimentarse. Típicamente cursan con linfadenopatía y lesiones satélites. La lesión puede demorar entre tres y 18 meses para curar en más del 90% de los casos. El período de incubación oscila entre dos a ocho semanas. Las principales especies causantes de este tipo de parasitosis son *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. tropica*, *L. aethiopica* y *L. major*. Una variante de la LCL es la leishmaniosis recidivans, que se caracteriza por la aparición de lesiones tuberculoides alrededor de las cicatrices de úlceras cutáneas curadas. Las lesiones tienen una cuenta baja de parásitos en la biopsia y tienden a ser resistentes al tratamiento [4].

LCD ocurre en un huésped anérgico con pobre respuesta inmune celular. La enfermedad se caracteriza por la presencia de nódulos aislados o agrupados, máculas, pápulas, placas infiltradas y en algunos casos lesiones verrugosas. Las lesiones muestran generalmente límites imprecisos que se confunden con la piel normal, dando a la enfermedad un aspecto que recuerda a la lepra lepromatosa. La enfermedad parece iniciarse bajo la forma de lesiones localizadas, de aspecto nodular o en placa infiltrada que poco a poco se disemina por todo el cuerpo. El examen histopatológico revela frecuentemente atrofia de la epidermis y la presencia en la dermis de granulomas bien constituidos, donde predominan células con citoplasma vacuolizado, llenas de parásitos. Estas lesiones no se curan espontáneamente y tienden a la recaída después del tratamiento, la enfermedad no invade órganos internos. La leishmaniosis cutánea difusa puede ser causada por *L. aethiopica*. En América Central y Sudamérica es más comúnmente causada por la *L. mexicana* y *L. amazonensis* [4].



Figura 1. Manifestaciones clínicas causadas por Leishmaniosis. De izquierda a derecha: Leishmaniosis mucocutánea, Leishmaniosis cutánea, Leishmaniosis visceral.

La leishmaniosis cutánea o “Úlcera del Chiclero” es causada por la especie *Leishmania mexicana*, es endémica de nuestro país y fue descrita por primera vez en 1912 en el estado de Yucatán, donde se observaron casos en hombres que se dedicaban a extraer goma del árbol del chicle. Actualmente se ha identificado en el Suroeste de México, Veracruz, San Luis Potosí, Tamaulipas, Nuevo León, Coahuila, Michoacán, Jalisco y Nayarit. La manifestación clínica de la “Úlcera del Chiclero” se caracteriza por lesiones en el cartílago auricular que puede llegar a la necrosis total y se presenta inflamación en los ganglios linfáticos cercanos al sitio de infección (**Figura 1A**) [5].

Distribución

La leishmaniosis está considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en la categoría I de las enfermedades infecciosas (situación emergente e incontrolada); se reporta al menos en 88 países (66 del Viejo Mundo y 22 del Nuevo Mundo) en todos los continentes (**Figura 2**). Se calcula que viven en zonas activas de leishmaniosis alrededor de 350 millones de personas, las cuales se encuentran en riesgo de adquirir la enfermedad, por lo que se estiman alrededor de 2 millones de nuevos casos cada año, de los cuales al menos 1.5 millones son casos de leishmaniosis cutánea [6].

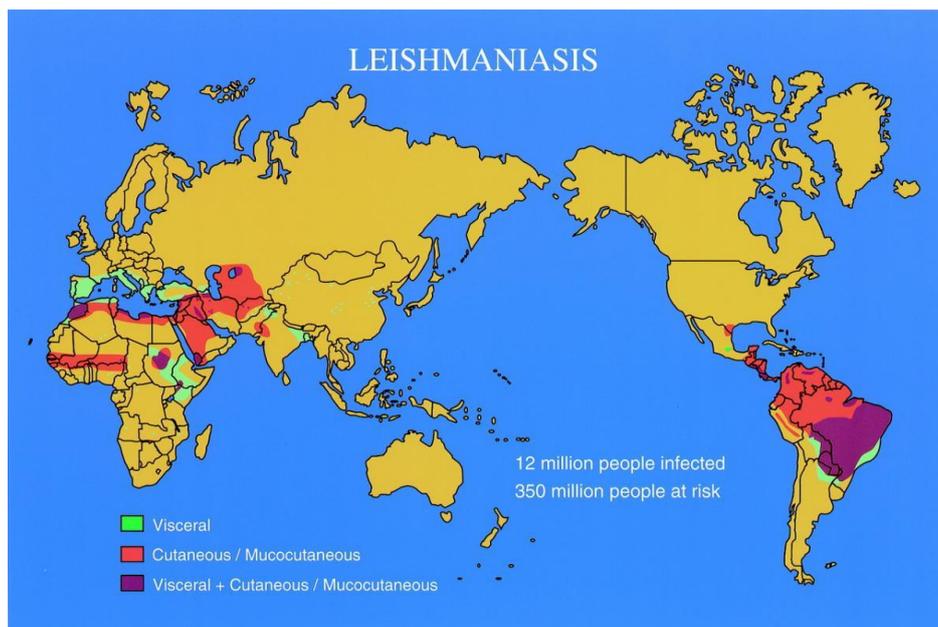


Figura 2. Distribución geográfica de la leishmaniosis a nivel mundial.

La leishmaniosis cutánea y mucocutánea (**Figura 1A y 1B**) son una enfermedad de alta prevalencia en muchas áreas tropicales y subtropicales del mundo. Descrita en 22 países de América, extendiéndose desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina [7]. Esta enfermedad constituye un grave problema de salud pública por los altos costos que representa a nivel psicológico, socio-cultural y económico [8]. Estos aspectos son de gran impacto para que la leishmaniosis conjuntamente con la malaria, esquistosomiosis, filariosis, tripanosomiasis y la hanseniosis, sean consideradas por la OMS como las seis enfermedades tropicales de mayor importancia en términos de investigación para hallar nuevos métodos de prevención, diagnóstico y tratamiento [9]. Los países donde se estima el 90% de los casos de leishmaniosis cutánea son en Afganistán, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudita, Siria y México [10].

En México, la leishmaniosis visceral (**Figura 1C**) es endémica en Guerrero y Morelos; la leishmaniosis mucocutánea en Tabasco y Chiapas; y la cutánea en Campeche, Chiapas, Coahuila, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Tamaulipas, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz, Yucatán y Sinaloa. Los estados del sureste mexicano son los más afectados por este padecimiento. En el Caribe mexicano, la manifestación más común es la cutánea localizada (**Figura 3**), conocida también como “Úlcera del chiclero” y representa 99% de los casos nuevos en esta zona. El agente causal es *L. mexicana* [6].



Figura 3. Distribución de la Leishmaniosis cutánea localizada en México.

Ciclo de vida

Leishmania es heterogénea y completa su ciclo biológico usando dos huéspedes. Se pueden producir diferentes ciclos: Primero, principalmente silvestre, donde el parásito circula entre los reservorios naturales, y mantiene el ciclo con la participación de los vectores propios de la zona endémica. En un segundo ciclo, los vectores infectados pueden atacar al hombre y a los animales domésticos o peridomésticos. Se puede producir un tercer ciclo, en el que el propio enfermo con leishmaniosis se constituye en reservorio [2].

El ciclo empieza cuando el vector toma sangre de un vertebrado infectado para alimentarse, (**Figura 4A**) e ingiere macrófagos infectados con amastigotes presentes dentro de la piel. La transformación del amastigote a promastigote ocurre dentro de las siguientes 24 a 48 horas. Los promastigotes se multiplican activamente por división binaria longitudinal. Algunos quedan libres desde el inicio en el lumen intestinal; otros se adhieren a la pared por hemidesmosomas. Después de la replicación en el intestino, los promastigotes migran al esófago y la faringe. En el tubo digestivo de la hembra del vector, los promastigotes son estructuras piriformes o fusiformes que presenta la extremidad posterior más delgada que la anterior, su cuerpo es flexible y se mueve por la acción de un flagelo libre situado en la parte posterior que es casi de igual tamaño que el cuerpo; el núcleo se localiza en el centro de la célula y el cinetoplasto entre el núcleo y la extremidad anterior somática; el rizonema parte del cinetoplasto y se continúa con el flagelo libre. Cuando el vector infectado pica a un huésped le inocular entre 10 y 100

promastigotes presentes en la probóscide y que penetran en la dermis. La saliva del mosquito tiene un rol en el establecimiento de la infección, debido a que reduce la producción del óxido nítrico por los macrófagos activados. En los vectores excesivamente infectados, la probóscide está congestionada, lo que hace difícil alimentarse, por lo que el mosquito realiza múltiples picaduras e inoculaciones. Los promastigotes no migran activamente hacia los macrófagos, permanecen en el espacio intercelular y activan el complemento por una vía alternativa, que inicia la acumulación de neutrófilos y macrófagos. Aunque muchos promastigotes son destruidos por los leucocitos polimorfonucleares, unos pocos se transforman en amastigotes en las células del sistema reticuloendotelial, en un periodo de tres a cuatro horas en promedio, permanecen en estadio estacionario por 36 horas aproximadamente y, luego, empiezan a reproducirse. La adhesión entre el parásito y los macrófagos es una etapa fundamental para la invasión de las células del huésped. Han sido identificados numerosos receptores, entre los más importantes la glicoproteína 63 (gp63) y el lipofosfoglicano (LPG), que son usados por los parásitos para adherirse a los macrófagos. Las especies de *Leishmania* han desarrollado varios mecanismos para resistir la actividad digestiva y antimicrobiana de las células fagocíticas. Los amastigotes son más resistentes que los promastigotes a los mecanismos antimicrobianos inducidos por citocinas dependientes del oxígeno, lo que refleja una adaptación al crecimiento intracelular [11].

Los promastigotes metacíclicos maduros son acumulados en la parte media del intestino y son regurgitados e inoculados en la piel, los cuales invaden y son fagocitados por células locales como macrófagos, células de Langerhans y células reclutadas inmediatamente por el hospedero incluyendo neutrófilos. Estos promastigotes se transforman a amastigotes (**Figura 2B y 2C**), después de 12-24 horas pos-infección [2].

Después de la transformación, los amastigotes se multiplican dentro de los macrófagos provocando su ruptura y así liberándolos para infectar otros macrófagos. Los macrófagos infectados pueden localizarse en la piel como es el caso de leishmaniosis cutánea formando una úlcera [12].

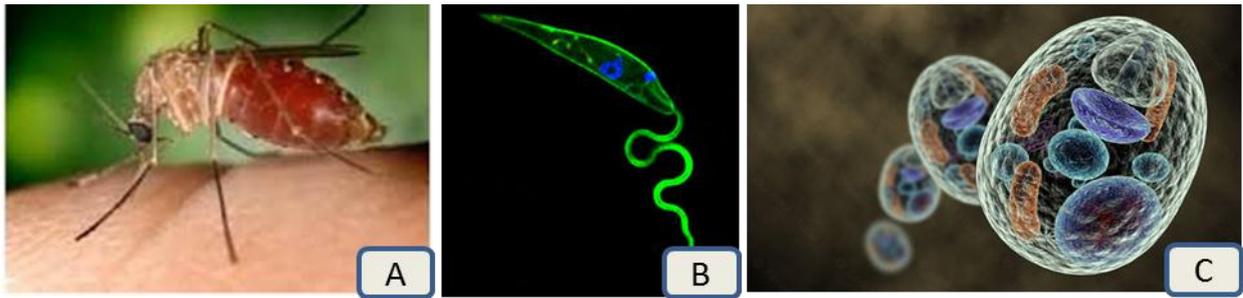


Figura 4. Vector de la leishmaniosis y estadios de la *Leishmania* sp. A) Insecto vector del género *Lutzomyia* sp, B) la forma infectiva (promastigotes), C) forma no infectiva (amastigotes).

El ciclo termina (**Figura 5**) cuando otro vector se alimenta de un huésped infectado, al hacer esto ingiere células parasitadas con amastigotes los cuales se transforman en promastigotes procíclicos en el intestino del vector, se dividen, migran a la probólide donde aguardan para infectar a un nuevo huésped [2].

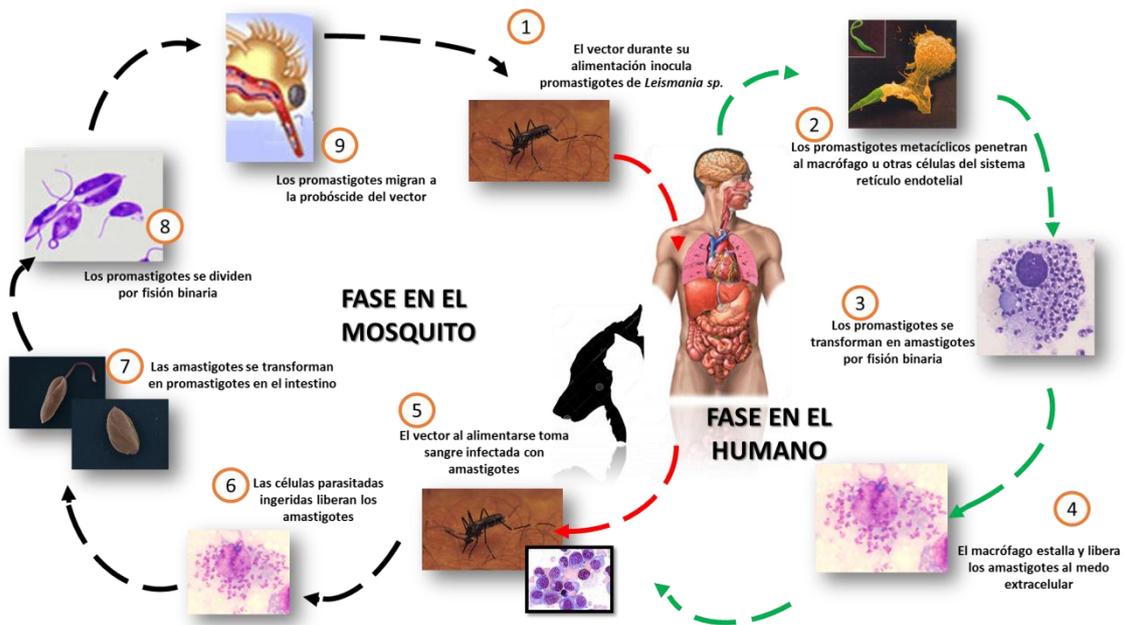


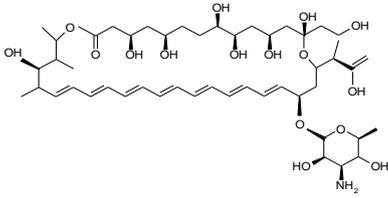
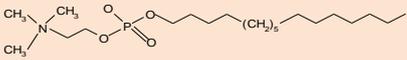
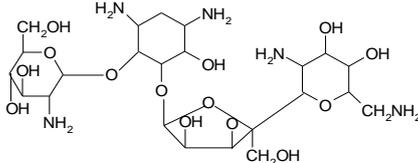
Figura 5. Ciclo de vida de *Leishmania* sp. (1) Los amastigotes son adquiridos a través de macrófagos infectados por las hembras de *Lutzomyia* al alimentarse del reservorio, (2) son liberados en su tracto digestivo donde se transforman en promastigotes, se multiplican y son transmitidos a otros reservorios cuando el vector se alimenta nuevamente. (3). En el hospedero los promastigotes son fagocitados por los macrófagos, (4) revertidos a su forma intracelular, lisan a la célula hospedera, se liberan e infectan a otras células (5).

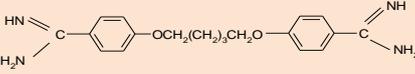
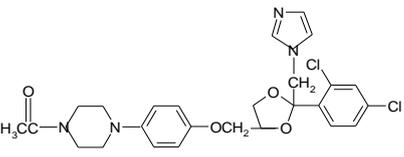
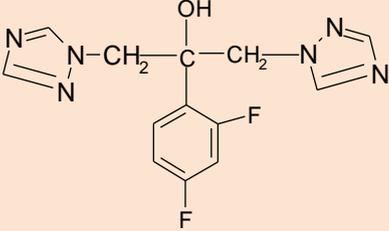
Tratamiento

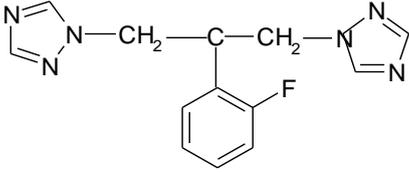
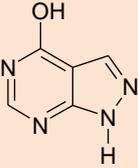
Todos los tratamientos convencionales implican un elevado costo, falta de efectividad en muchos casos, resistencia (ya que estos han sido usados por más de 40 años) y diversos efectos secundarios. La primera línea de tratamiento está constituida por los antimoniales pentavalentes: antimoniato de meglumina (Glucantime) y Estibogluconato de sodio (Pentostam). Son fármacos de elección a pesar de los inconvenientes mencionados y los diversos efectos secundarios: alteraciones en la función hepática, pancreatitis bioquímica, aplanamiento de ondas T en el electrocardiograma (ECG), mialgias, artralgias, trombocitopenia. Otros fármacos sistémicos (o de segunda línea) utilizados son: Anfotericina B, Anfotericina B liposomal (AmBisome), Paromomicina, Sitamaquina, del cual se han reportado efectos renales adversos [13] y Pentamidina, prácticamente en desuso por su toxicidad. Entre los fármacos orales, se emplean: Miltefosina un antineoplásico con efecto teratogénico, aceptado en India para tratamiento de la leishmaniosis visceral (desde 2002) y en América para tratar lesiones cutáneas y mucocutáneas (de acuerdo a las especies causantes de la infección), Ketoconazol e Itraconazol. Cabe mencionar que se han identificado un gran número de recaídas con el tratamiento basado en Miltefosina (**Cuadro 1**) lo cual se considera un problema para los programas de control en otros países [14].

Cuadro 1: Medicamentos para el tratamiento de la leishmaniosis, su estructura química, mecanismo de acción y sus efectos secundarios

Medicamento	Estructura química	Mecanismo de acción	Efectos secundarios
<p>Estibogluconato de sodio (Pentostam)</p> <p>y</p> <p>Antimoniato de meglumina (Glucantime)</p>		<p>Destruye los amastigotes dentro de los fagolisosomas macrofágicos. Tal reducción surge preferentemente en la etapa de amastigote intracelular, actúan interfiriendo en el sistema redox de la tripanotona [15].</p>	<p>El efecto más temido y común es la cardiotoxicidad, la función hepática y renal puede deteriorarse, se ha descrito la aparición de pancreatitis, puede presentarse anemia aplásica, hemolítica, leucopenia trombocitopenia y hasta la muerte repentina [15].</p>

<p>Anfotericina B</p>		<p>Su actividad depende, de su afinidad por los esteroides de membrana, principalmente ergosterol, permitiendo la aparición de poros o canales permeables al agua y pequeños cationes e iones, puede incluir el daño oxidativo de las células blanco, al menos <i>in-vitro</i> <i>Leishmania</i> tiene una composición de esteroides similar a la de los hongos patógenos, y el fármaco se liga a dichos esteroides preferentemente y no al colesterol del hospedador [15].</p>	<p>La anemia hipocrómica normocítica es común a causa de una disminución en la producción de eritropoyetina, además puede aparecer cefalalgia, náusea, vómito, malestar general, reducción de peso, flebitis en sitios de venoclisis periférica. Más raro puede aparecer trombocitopenia o leucopenia leve [15].</p>
<p>Miltefosina (Impavido)</p>		<p>Entre los posibles blancos farmacológicos en que actuaría están la proteínas C; la biosíntesis de fosfatidilcolina, en la cual la miltefosina inhibe la CTP: fosfolina citidililtransfera y la biosíntesis de la esfingomielina, situación en la cual los mayores niveles de ceramida celular pudieran desencadenar la apoptosis [15].</p>	<p>Se puede presentar vómitos y diarrea como efectos adversos más frecuentes hasta en 60% de los pacientes. En la rata se observó un posible efecto en la fertilidad de los machos [15].</p>
<p>Paramomicina o aminosidina</p>		<p>Se une a la subunidad ribosomal 30S bloqueando la síntesis de proteínas y disminuyendo la fidelidad de la traducción de mRNA en el ribosoma; además de perturbar la estructura y permeabilidad de la membrana citoplasmática [15].</p>	<p>Dolor local en el sitio de la inyección y proteinuria. Su uso tópico en ungüento, se puede acompañar de reacciones leves y pasajeras tales como dolor, e induración no pruriginosa alrededor de la úlcera [15].</p>

<p>Pentamidina</p>		<p>Se acumula en el interior de la mitocondria y entre los efectos tempranos está la desintegración de cinetoplasto y el colapso del potencial de membrana mitocondrial [15].</p>	<p>Su uso parenteral puede acompañarse de reacciones alarmantes y algunas veces peligrosas incluyendo taquicardia, mareos, cefalea y vómitos, pancreatitis e hipoglicemias y paradójicamente, hiperglicemias y diabetes insulino-dependiente [15].</p>
<p>Ketoconazol (Nizoral)</p>		<p>Su mecanismo de acción se explica por su capacidad de inhibir la enzima 14-α-demetilasa, una enzima del sistema microsomal oxidativo dependiente del citocromo P450. De esta forma deteriora la biosíntesis de esteroides de membrana y la función de sistemas enzimáticos conduciendo a la acumulación de 14 α metilesteroides [15].</p>	<p>Los más comunes son náuseas, vómitos, anorexia, caída del cabello, anomalías endocrinológicas, como ginecomastia, disminución del deseo sexual e impotencia, trastornos menstruales en las mujeres, además de que está demostrada la aparición de hepatitis inducida por esta droga, potencialmente fatal [15].</p>
<p>Fluconazol (Diflucan)</p>		<p>Es un bistriazol fluorado que comparte el mecanismo de acción del ketoconazol, pero con mejor perfil farmacocinético, mejor tolerancia y menor toxicidad. Su uso se ha descrito en pacientes VIH positivos con leishmaniasis visceral. Además constituye una opción terapéutica en pacientes que han desarrollado efectos adversos a los antimoniales pentavalentes [15].</p>	<p>Tiene efectos importantes sobre el sistema nervioso central, los ganglios autonómicos y las uniones neuromusculares. Sus efectos tóxicos sistémicos incluyen sensación de asfixia, tinnitus, disgeusia, vértigo y mareos, cuando las dosis se incrementan pueden ocurrir convulsiones, coma y depresión respiratoria [15].</p>

<p>Lidocaína (Xilocaína)</p>		<p>Su uso en la terapia anti-leishmania ha mostrado una respuesta favorable sin que se conozca el mecanismo mediante el cual se explica su actividad, cabría esperar que modifique desfavorablemente la permeabilidad de las membranas del parásito, alterando su umbral de excitabilidad eléctrica [15].</p>	<p>Se ha reportado malestar general, retención urinaria aguda, cefaleas, mialgias, fiebre, dolor abdominal, reacción pruriginosa leve, erupción con maculopápulas y eventualmente lesiones exfoliativas, urticarianas o purpúricas e incluso síndrome de Stevens-Johnson. Menos frecuentemente leucopenia, leucocitosis o eosinofilia transitoria [15].</p>
<p>Alopurinol (Aluron)</p>		<p>Basándose en estudios bioquímicos y enzimáticos se cree que afecta las purinas y los ácidos nucleicos de estos parásitos [15].</p>	<p>Ocasionalmente hepatomegalia, mayores niveles de transaminasas en plasma e insuficiencia renal progresiva [15].</p>

Desde hace unos años, el empleo de plantas medicinales y de productos derivados de las mismas está aumentando de manera importante. Esto se debe a una serie de factores, el público hoy en día tiene más problemas con la sobre prescripción y el mal uso de antibióticos de patente [16].

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 [17], los cuales en su gran mayoría, son resistentes a los antibióticos y requieren tratamientos alternativos más costosos y, muchas veces, de mayor toxicidad, como en los tratamientos utilizados para la leishmaniosis, haciendo cada vez menos efectivos los viejos medicamentos [18].

Medicina Tradicional

Actualmente la medicina tradicional representa una opción importante de respuesta ante las necesidades de atención a la salud, es reconocida hoy como un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos, un componente esencial del patrimonio tangible e intangible de las culturas del mundo, un acervo de información, recursos y prácticas para el desarrollo y el bienestar, y un factor de identidad de numerosos pueblos del planeta [19 y 20]. Datos de la OMS señalan que alrededor del 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para atender sus necesidades primarias de asistencia médica [19].

En México se estima que existen cerca de 3103 especies de plantas que son usadas en la medicina tradicional, de las cuales casi una tercera parte 1024 son empleadas para tratar malestares del tracto digestivo, 473 especies para padecimientos estomacales, 247 para enfermedades respiratorias y 277 para enfermedades cutáneas [21 y 22]. Además de que México no sólo se distingue por su diversidad de recursos naturales y culturales sino también por el alto índice de endemismo, es decir, de especies que solamente se encuentran dentro de los límites geopolíticos del país [23]. 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 [24].

Metabolitos secundarios

Un aspecto metabólico que distingue el reino animal del vegetal y fungí es la capacidad de las plantas y los hongos para producir sustancias que no son esenciales para su supervivencia. A esas sustancias se les denomina metabolitos secundarios, los animales superiores raramente los producen, si acaso pueden ser encontrados ocasionalmente en insectos y otros invertebrados [25 y 26].

Por tanto, los vegetales, además de metabolitos primarios, tales como carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, poliaminas, citocromos, clorofilas e intermediarios metabólicos de las vías anabólicas y catabólicas, también producen metabolitos secundarios, es decir, sustancias que no parecen participar directamente en el crecimiento o desarrollo, sustancias que no son necesarias para que un organismo pueda existir como tal, sino que simplemente aportan al individuo que las produce una ventaja para responder a estímulos del entorno [27].

En un principio, los metabolitos primarios y los secundarios no se pueden diferenciar con base a su estructura química, molécula precursora u orígenes biosintéticos. En ausencia de una distinción válida entre ambos tipos de metabolitos con base a su estructura o bioquímica, se tiene en cuenta su función, de modo que serán metabolitos primarios aquellos que participan en la nutrición y procesos metabólicos esenciales para la planta, mientras que metabolitos secundarios serán los que permitan interacciones ecológicas de la planta con su entorno. Es decir, algunos metabolitos secundarios sólo están presentes en determinadas especies y cumplen una función ecológica específica, como por ejemplo, atraer a los insectos para transferirles el polen, o a animales para que éstos consuman sus frutos y así poder diseminar sus semillas; también pueden actuar como pesticidas naturales de defensa contra herbívoros o microorganismos patógenos, incluso como agentes alelopáticos (sustancias que permiten la competición entre especies vegetales), también se pueden sintetizar metabolitos secundarios en respuesta a daño en algún tejido de la planta, así como, contra la luz ultra violeta (UV) y otros agentes físicos agresivos, incluso actuar como señales para la comunicación entre plantas con microorganismos simbioses [28].

No obstante, en la mayoría de las plantas, la cantidad de carbono, nitrógeno o azufre orgánicos presentes en metabolitos secundarios es demasiado bajo como para considerarlos como de reservas para el metabolismo primario. Hoy día se sabe que lejos de ser meros anacronismos metabólicos, y como se ha mencionado anteriormente, los metabolitos secundarios son importantes para la interacción de la planta con su entorno [29].

Clasificación de los metabolitos secundarios

Existen gran cantidad de tipos de metabolitos secundarios en plantas y se pueden clasificar según la presencia o no de nitrógeno en su composición, no obstante, los tres grupos de metabolitos secundarios más importantes en plantas son los **terpenoides** (o isoprenoides), **fenilpropanoides** (o compuestos fenólicos) y los **alcaloides** (este último grupo lleva nitrógeno en su estructura). Los terpenoides derivan del isopentenil difosfato (IPP) y se conocen unos 25000. Los alcaloides contienen uno o más átomos de nitrógeno y derivan principalmente de aminoácidos, de ellos se conocen unos 12000. Mientras que los aproximadamente 8000 fenilpropanoides provienen de las llamadas vías biosintéticas del shikimato o del malato/acetato [25 y 26].

Fenoles

La mayoría de estos compuestos funcionan como constituyentes de la pared celular, hay muchos compuestos fenólicos que sirven para proteger a la planta, dar una naturaleza u otra a la madera, establecer el color de la flor o contribuir sustancialmente a los sabores y olores. Estas y otras funciones llevadas a cabo por los compuestos fenólicos son esenciales para la supervivencia de las plantas vasculares. Sobre el 40% del carbono orgánico de la biosfera se presenta en forma de compuestos fenólicos vegetales los cuales derivan principalmente de llamadas vías biosintéticas del shikimato o del malato/acetato [27].

Dentro de este grupo se encuentran los fenoles, quinonas, flavonas y flavonoides, de los cuales se sabe tienen actividad bactericida para *Pseudomonas*, inhiben el crecimiento *in-vitro* de *Vibrio cholerae*, *Streptococcus* y otras bacterias; actividad antiviral y astringente, entre otras propiedades biológicas [17]. También se clasifica en ligninas, lignanos, suberinas, flavonoides, coumarinas, furanocoumarinas y estilbenos. En ramas, troncos, semillas, etc. las ligninas refuerzan las paredes celulares especializadas, permitiéndoles soportar el masivo peso en tierra y transportar agua y minerales desde la raíz a las hojas. Estrechamente relacionados con las ligninas, los lignanos pueden variar desde dímeros a grandes oligómeros. Los lignanos pueden, por ejemplo, tanto ayudar a defenderse de patógenos como actuar de anti-oxidantes en flores, semillas, frutos, tallos, cortezas, hojas y raíces. Los tejidos suberizados contienen capas alternativas de sustancias estructurales hidrofóbicas (alifáticas) e hidrofílicas (fenólicas). Presente en cortezas, raíces y determinados tejidos peridérmicos (por ejemplo en la cáscara de la papa), esas sustancias estructurales, llamadas suberinas, funcionan proveyendo de una barrera protectora que limita los efectos de la desecación atmosférica y el ataque de patógenos. Los flavonoides constituyen un grupo diverso con más de 4500 compuestos. Entre sus subclases están las antocianinas (pigmentos), proantocianidinas o taninos condensados (repelente de herbívoros y protectores de la madera), e isoflavonoides (productos de defensa y moléculas de señalización). Las coumarinas, furanocoumarinas y estilbenos protegen frente al ataque bacteriano y de hongos patógenos, repelen herbívoros e inhiben la germinación de las semillas. Muchos otros compuestos fenólicos también juegan un papel defensivo o imparten sabores y olores característicos a cada material vegetal [30].

Engloban un grupo de metabolitos secundarios de una gran variabilidad tanto estructural como de función, producidos por plantas en respuesta a estrés de tipo biótico y abiótico de diversa naturaleza. Todos ellos se caracterizan por poseer un esqueleto carbonado del tipo C_6C_3 ; se piensa que su principal función en plantas es la de establecer barreras físicas que frenen la expansión del patógeno y también ejercer una acción protectora de las células vegetales frente a la generación de especies de oxígeno activo como consecuencia de una infección patogénica. Se hallan presentes en todas las partes de las plantas, algunas clases se encuentran más ampliamente distribuidas que otras, por lo que son más comunes las flavonas y, flavonoles, y más restringidas en su ocurrencia las isoflavonas, las chalconas y auronas. La acción farmacológica de los flavonoides son bien conocidas, como dilatadores de las coronarias (proantocianidinas de *Crataegus*), colerético, estrógena y diurética; al igual que la acción anti-microbiana de flavonoides prenilados y otros fenoles y la actividad anti-fúngica de las isoflavonas [28 y 30].

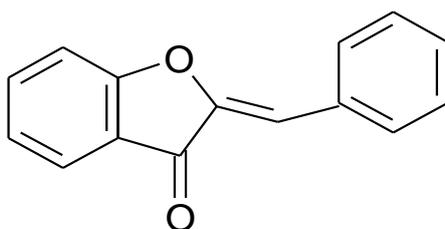


Figura 6: Ejemplo de Fenol (Auronas)

Terpenos

Los **terpenoides** son compuestos formados por repeticiones de una molécula de cinco átomos de carbono llamada isopreno. Todos los terpenos, tanto los que participan del metabolismo primario como los más de 25,000 metabolitos secundarios, son derivados del compuesto Isopentenil difosfato o 5-carbono isopentenil difosfato (IPP) que se forman en la vía del ácido mevalónico. Es un grupo grande de metabolitos con actividad biológica importante. Están distribuidos ampliamente en las plantas y muchos de ellos tienen funciones fisiológicas primarias. La distribución de unos pocos de ellos en las plantas es más restringida, como los que forman los aceites esenciales, entre otros [32]. Son activos contra bacterias, virus, hongos y protozoarios [19]. Así pues, los

terpenoides se clasifican por el número de unidades de isopreno que los compongan [31].

Isopreno (hemiterpenos): es el terpenoide más simple, es un producto volátil producido por los tejidos fotosintéticos. Se cree que el isopreno lo producen ciertas plantas para hacer frente a las altas temperaturas. El isopreno a su vez, participa en cierta medida en la producción del ozono de la tropósfera [32].

Monoterpenos (formados por dos moléculas de isopreno): los monoterpenos suelen ser los componentes de las esencias volátiles de las flores y de los aceites esenciales de las hierbas y especias, en los que los monoterpenos pueden constituir incluso el 5% del peso seco de la planta. Los monoterpenos se pueden aislar tanto por destilación como por extracción y son utilizados para la producción industrial de sabores y perfumes [33].

Sesquiterpenos (formados por tres moléculas de isopreno): al igual que los monoterpenos, muchos sesquiterpenos aparecen en los aceites esenciales. A su vez, muchos sesquiterpenos actúan como fitoalexinas (antibióticos producidos por las plantas en respuesta al ataque de microorganismos) y como agentes repelentes de herbívoros [31].

Diterpenos (formados por cuatro moléculas de isopreno): a este grupo pertenecen el fitol (que forma parte de la estructura de las clorofilas); hormonas giberelinas; ácidos resinosos de coníferas y especies de leguminosas; fitoalexinas y numerosos metabolitos farmacológicamente importantes, como es el caso del taxol, un agente anticancerígeno encontrado a muy bajas concentraciones en el la corteza del tejo (0,01% del peso seco), y la forskolina, un compuesto utilizado para tratar el glaucoma [32].

Triterpenos (formados por seis moléculas de isopreno): a este grupo pertenecen los brasinosteroides (que son otro tipo de hormonas vegetales), los fitoesteroles, que componen las membranas celulares, algunas fitoalexinas, y compuestos que forman parte de las ceras (recubren y protegen los frutos, tal como es el caso del ácido oleanólico de las uvas) [33].

Tetraterpenos (formados por ocho moléculas de isopreno): a este grupo pertenecen los carotenos, que son pigmentos que poseen funciones importantes en la fotosíntesis [31].

Politerpenos (formados por más de ocho moléculas de isopreno): en este grupo encontramos la plastoquinona y la ubiquinona, que son moléculas antioxidantes que participan en la cadena transportadora de electrones de la fotosíntesis y de la respiración celular respectivamente [32].

Meroterpenos son moléculas mixtas que llevan en su composición isopreno, así por ejemplo, la vincristina y la vinblastina, que son alcaloides con propiedades anticancerígenas, contienen fragmentos de terpenoides en su estructura. Otros ejemplos son las hormonas vegetales citoquininas y algunos fenilpropanoides que contienen cadenas de isopreno. Además, hay muchas proteínas que gracias a su unión covalente a cadenas de isopreno, pueden quedar ancladas a las membranas celulares [25 y 26].

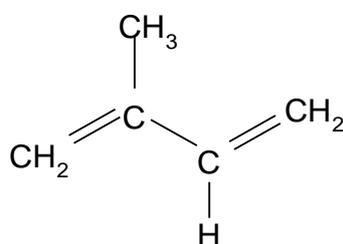


Figura 7: Ejemplo de los terpenos (Isopreno)

Alcaloides

Los alcaloides se definen generalmente como sustancias de origen vegetal que poseen nitrógeno en su composición y que son farmacológicamente activas.

La mayoría de los alcaloides conocidos derivan de aminoácidos, tales como triptófano/triptamina, tirosina, fenilalanina, lisina, ornitina/ arginina, histidina, ácido antranílico o ácido nicotínico. Sin embargo, los alcaloides también pueden derivar de purinas (ej. cafeína), terpenoides “aminados” (ej. aconita), o de alcaloides esteroidales, como se han encontrado en plantas de las familias Solanaceae y Liliaceae. Los alcaloides también pueden derivar de poliquétidos derivados de acetato, donde el nitrógeno del grupo amino es introducido en el alcaloide [27]. Son fisiológicamente activos en los animales, aún en bajas concentraciones, por lo que son muy usados en medicina [29]. Se ha reportado que tienen efecto contra parásitos como *Giardia*, *Entamoeba*, *Trypanosoma* y *Plasmodium* [16].

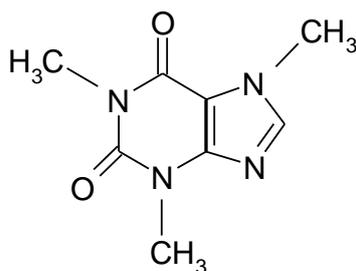


Figura 8: Ejemplo de alcaloides (Caféina)

Género *Bursera*

El género *Bursera* ha sido estudiado por presentar diversos metabolitos secundarios, se le atribuyen algunos usos medicinales, ha sido utilizado como antiséptico para curaciones dentales, en heridas de la piel como cicatrizante y contra enfermedades respiratorias. 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 [34].

Las *Burseras* son árboles y arbustos que se distribuyen principalmente en la selva baja caducifolia de todo México, el centro de mayor diversidad, con 80 especies reportadas [35], en América se ubican desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Perú. Este grupo taxonómico se caracteriza por ser árboles de porte bajo a medio muy ramificados o algunas veces arbustos de hoja decidua con una altura de 5-15 m. Su corteza puede ser gris, amarilla o roja, algunas especies tienen corteza exfoliante, como *Bursera morelensis*, además son caducifolios y florecen cuando comienza la época de lluvias [36]. Es un género muy importante desde el punto de vista ecológico, ya que domina la selva baja caducifolia principalmente en lugares no perturbados.

Se ha encontrado que muchas de las especies que pertenecen al género *Bursera* presentan componentes que son buenos candidatos para inducir una amplia gama de efectos biológicos, como anti-oxidantes, anti-plaquetarios, anti-virales, anti-bacteriales, insecticidas anti-fúngicos y anti-parasitarios [37, 38 y 39]. Así como estudios sobre las propiedades medicinales, sobre *B. schlechtendalii* la cual muestra un efecto antitumoral debido a un compuesto llamado podofilotoxina [40].

Dentro de las especies de *Bursera* endémicas poco conocidas se encuentra *Bursera morelensis* Ramírez de distribución disyunta (distribución geográfica conocida: Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí)

[35] (**Apéndice 2**), utilizada en forma medicinal en San Rafael, Coxcatlán, para lavar heridas.

Se encontraron trabajos donde se utilizó aceite esencial de *B. morelensis* el uso de los aceites esenciales es múltiple y variado, pueden ser como antisépticos, en contra de microorganismos como bacterias Gram positivas o bacterias Gram negativas e incluso frente a hongos productores de micosis y ciertas levaduras (*Candida sp.*) [41 y 29]. También puede tener propiedades anti-espasmódicas, sedantes, acciones irritantes, analgésicas y anti-inflamatorias [29], lo cual lo hace una alternativa potencial para la medicina en contra de varias enfermedades infecciosas que tienen que ser estudiadas [42].

Hay pocos estudios sobre *B. morelensis* entre los que destacan Jolad [43], el cual permitió separar e identificar a partir del exudado seco, la deoxipodofilotoxina y un nuevo lignano denominado “morelensino”, mismos que presentaron actividad anticancerígena. Dentro de los estudios que se tienen sobre las especies del género *Bursera* se ha comprobado que presentan propiedades anti-inflamatorias, anti-bacteriales, presencia de nuevos terpenos, relación de terpenos con su morfología y distribución, estudio quimiotaxonómicos, así como bioinsecticidas, por mencionar algunos.

López 2011 [44] realizó un estudio sobre el aceite esencial de *B. morelensis* para conocer su composición química y evaluar algunas de sus propiedades anti-microbianas sobre bacterias y hongos filamentosos. Encontrando que el aceite esencial presenta inhibición clara para el crecimiento de tres de cinco cepas de hongos, así como en las bacterias donde el aceite esencial mostró inhibición en la mayoría de las 16 cepas que se probaron.

Tomando en cuenta lo antes mencionado sobre la actividad anti-bacteriana, anti-inflamatoria, anti-micótica, su uso para aliviar heridas que no pueden sanar o para aliviar infecciones en la piel en San Rafael, Coxcatlán, Puebla. Surgió el interés de estudiar su probable actividad sobre *L. mexicana*, planteando los siguientes objetivos.

OBJETIVOS

General

- ☞ Caracterizar el efecto *anti-leishmánico in-vitro* e *in-vivo* del extracto metanólico de *Bursera morelensis* sobre la lesión cutánea generada por *Leishmania mexicana*.

Particulares

- ☞ Determinar el efecto *in-vitro* del extracto de la corteza de *B. morelensis* sobre los promastigotes de *L. mexicana* por la técnica de viabilidad celular por MTT.
- ☞ Determinar el efecto *in-vivo* del extracto de la corteza de *B. morelensis* sobre el tamaño de las lesiones cutáneas producidas por *L. mexicana*.
- ☞ Analizar la carga parasitaria de *L. mexicana* por medio de la técnica de dilución limitante.
- ☞ Cuantificar citocinas *pro-inflamatorias* y *anti-inflamatorias* por la técnica de ELISA sándwich.
- ☞ Determinar la composición química del extracto metanólico por medio de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.
- ☞ Realizar cortes histológicos a partir de la lesión generada por *L. mexicana* para evaluar la actividad *anti-inflamatoria* del extracto de la corteza de *B. morelensis*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Colecta de material

El material vegetal fue colectado durante los meses de marzo, abril, junio, agosto, septiembre, octubre, en San Rafael, Coxcatlán, Puebla a finales del año 2011 y principios de 2012 (**Apéndice 2**). Se trabajó sólo con la corteza, el material se cortó en trozos pequeños.

Obtención del extracto

El extracto metanólico de la corteza se obtuvo por el método de maceración [45]. Se pesó la corteza seca y se colocó en trozos en un matraz con metanol (MeOH), se obtuvo el extracto metanólico crudo de la corteza, el cual se filtró y destiló a presión reducida en un rotavapor (IKA HM10 digital). El extracto se colocó en un recipiente de vidrio con la finalidad de completar la evaporación del solvente. El rendimiento del extracto se determinó por diferencia de peso con relación al peso seco de la planta.

Mantenimiento de la cepa *L. mexicana*

Se aislaron promastigotes de *L. mexicana* con la cepa (MNYC/BZ/M379) donado por la Dra. Miriam Rodríguez Sosa del laboratorio cinco de la UBIMED de la FES-Iztacala (UNAM). A partir de ratones previamente infectados en 5 mL de medio de cultivo Schneider suplementado con 10% de SFB inactivado y antibiótico al 1% (Gentamicina) para obtener la fase estacionaria del parásito; subsiguientemente fueron cultivados en botellas de cultivo con medio Schneider a 28°C [46]. Posteriormente se cuantificaron en la cámara de Neubauer,

Infección de ratones con *L. mexicana*

Se infectaron de manera subcutánea ratones BALB/c machos de seis semanas de edad en la parte posterior cerca de la base de la cola. Los ratones fueron rasurados para hacer más fácil la infección y el monitoreo del tamaño de la lesión. Se infectaron a los ratones con un inóculo de 50 µL de PBS que contenía 2×10^6 promastigotes de *L. mexicana* con jeringas de insulina. Los ratones fueron mantenidos en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala durante 10 semanas posteriores a la infección [46].

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

Grupos de ratones	<i>n</i>
1	3

Se utilizaron promastigotes en la fase exponencial, los cuales se resuspendieron en medio Schneider suplementado con SFB y 100 mg de Gentamicina/mL. Los parásitos se colocaron en placas de cultivo celular de 96 pozos (2.5×10^4 promastigotes en 100 μ L de medio, en cada pozo) y se pusieron a interactuar con diferentes concentraciones del extracto metanólico de *B. morelensis* disuelto en DMSO y medio Schneider con una proporción 1:1, (desde 10 mg/mL hasta 0.009 mg/mL) durante 48 horas a 22°C, una vez transcurrido el tiempo se retiró el extracto. Como control negativo se dejaron en la placa tres pozos a los que no se les agregó extracto; por otra parte, se utilizó como control positivo el Estibogluconato de sodio (desde 25 mg/mL hasta 0.012 mg/mL) y la Anfotericina B (desde 62.5 μ g/mL hasta 0.030 μ g/mL) debido a que son los medicamentos que se ocupan en el tratamiento de la leishmaniosis. La interacción de los medicamentos con los promastigotes de *L. mexicana* se evaluó a las 24 y 48 horas. La viabilidad de los parásitos se evaluó con el método modificado del ensayo de MTT [47] donde la cantidad de sales de formazán producidas es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas. Las sales de formazán producidas se cuantificaron en un lector de ELISA (Thermo electron MULTIESCAN EX) a una longitud de onda de 492 nm, los valores se graficaron para obtener la CL₅₀.

Monitoreo del tamaño de la lesión

A los ratones infectados con *L. mexicana* se les aplicó de manera tópica dos veces al día 200 μ L del extracto de *B. morelensis* y se monitoreo el tamaño de la lesión de los ratones experimentales con un vernier analítico (Mitutoyo ABSOLUTE), tomando el promedio del largo y ancho de la inflamación del sitio de infección. Se utilizaron tres grupos de ratones, cada grupo con una $n=3$, el primer grupo fue el de los ratones infectados pero sin tratamiento del extracto, el segundo grupo infectado de igual manera

pero a ellos se les aplicó el extracto de *B. morelensis* y al último grupo fue el control negativo el cual no se encontraban infectados y tampoco se les aplicó el extracto.

Carga parasitaria por dilución limitante

Se determinó la carga parasitaria de las heridas de los ratones experimentales por dilución limitante en la quinta y novena semana posterior a la infección. Brevemente se maceraron las heridas de cada ratón en cajas Petri (6x) (Nunclun Surfase) con medio Schneider suplementado con 10% de SFB complementado y 1% de antibiótico (Penicilina Glutamina) (in vitrogen). Se centrifugó a 2700 rpm por 10 minutos. El botón celular se resuspendió con 500 μ L de medio Schneider y se sembró en placas de cultivo de 96 pozos (Costar) (dilución 1:10) y se siguió la dilución hasta el pozo 12 (diluciones dobles), se mantuvo a 28°C durante 24 horas para su visualización a microscopio óptico invertido (Motic AE31) considerando el último punto de titulación un pozo antes cuando desaparecen los parásitos.

Obtención de suero

Se obtuvo sangre de la vena caudal de los ratones las semanas 1, 3, 5, 7 y 9 después de la infección. Se utilizó una caja de madera con un foco de 60 watts para inducir la dilatación de la vena caudal y de esta manera facilitar el sangrado. Con un bisturí se les hizo un corte en la vena más notoria para obtener de 500 a 700 μ L de sangre en tubos Eppendorf. Los tubos fueron mantenidos a baja temperatura hasta su centrifugación durante 10 minutos a 3500 rpm. Se recuperó el suero en tubos nuevos y se fueron debidamente etiquetados. Las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su uso para la determinación de citocinas.

Detección de citocinas en sueros por la técnica de ELISA.

Las citocinas fueron evaluadas en suero de las semanas post-infección por medio de la técnica de ELISA y de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Peprotech). Las placas de 96 pozos (high binding, Costar) fueron sensibilizadas con 100 μ L por pozo del anticuerpo de captura (purified antimouse IL-4 y TFN- α) diluido en PBS a una concentración de 1 μ g/mL. Se cubrió la placa y se dejó incubar toda la noche a 4°C. Pasada la incubación fue lavada tres veces usando buffer de lavado PBS-Tween 0.05% (PBS T). Posteriormente la placa se secó y se bloqueó con 100 μ L de buffer de bloqueo PBS-BSA 1% (100 μ L por pozo) y se dejó incubar por dos horas a temperatura ambiente. Después se lavó la placa cuatro veces con PBS-T, y se procedió a realizar la

curva de citocina recombinante murina por duplicado en los primeros pozos de la placa. La curva se realizó utilizando concentraciones de 2000-1.95 pg/mL. A los pozos restantes se agregó 50 µL de las muestras de los sueros y se incubaron toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la placa cuatro veces con PBS-T y se agregó el anticuerpo biotinilado diluido en PBS-BSA a una concentración de 0.5 µg/mL, y se agregó 100 µL de streptavidin peroxidasa diluida 1:2000 en PBS-BSA 1% dejando incubar a temperatura ambiente por 30 minutos. Después de la incubación la placa se lavó seis veces con PBS-T y se añadió a cada placa 10 µL de ABTS y 100µL de H₂O₂ al 3%, y se dejó incubar por 15 minutos a temperatura ambiente procediendo después a leer la placa en un lector de ELISA (Thermo electron MULTIESCAN EX) a 405 nm.

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

La identificación de los componentes químicos de las muestras del extracto metanólico de *B. morelensis* se realizó mediante una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) empleando un cromatógrafo de gases HP 6890 acoplado a un espectrómetro de masas modelo HP 5973, equipado con el software Chemstation. La identificación de los compuestos se llevó a cabo por medio de la base de datos Wiley 275. Se utilizó una columna capilar HP-5 5% de fenil metil siloxano de 30 metros de largo, 0.32 mm; 0.25 µm espesor de diámetro interno y película de 0.25 µm.

Las condiciones de la cromatografía fueron: temperatura inicial del horno 70°C (0.5 minutos), 70-150°C (15°C/minutos), 150-220°C (20°C/minutos), 220-310°C (25°C/minutos), 310°C (5 minutos), interface 180°C. El tipo de inyección fue split y la cantidad de muestra empleada fue de 2 µL de una solución de 1 mg de extracto en 1 mL de metanol grado HPLC. El gas de acarreo fue Helio (3.43 Psi), velocidad de flujo 1.6 mL/min; energía de ionización 70 eV; intervalo de masa 30-550.

Histología

Se sacrificaron a los ratones a las nueve semanas post-infección y se hicieron cortes histológicos de las heridas dorsales. Se fijaron en fijador de zinc, se realizó la técnica histológica (**Apéndice 3**) y se hicieron cortes de la piel en el micrótopo, por último a

los cortes obtenidos se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (H Y E), para identificar daño tisular, así como infiltrado celular y los histiocitos. [48].

RESULTADOS

Rendimiento del Extracto

Para *B. morelensis* se obtuvieron 236 g de extracto metanólico crudo, que corresponden al 19.66% del rendimiento total, de un total de 1200 g de corteza de la planta (**Tabla 1**).

Tabla 1: Rendimiento del extracto metanólico de *B. morelensis*.

Extracto (g)	Rendimiento (%)
236	19.66

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

La actividad *anti-leishmánica* del extracto metanólico de *B. morelensis* se midió mediante la técnica de viabilidad celular por MTT, en éste, existe una relación directa entre la absorbancia obtenida en la medición y el número de células metabólicamente activas. Las concentraciones utilizadas para determinar el efecto *anti-leishmánico* (desde 10 a 0.004 mg/mL) muestran un efecto de dosis dependiente contra promastigotes de *L. mexicana* de, es decir, que a una mayor concentración del extracto metanólico de *B. morelensis* existirá una tasa mayor de mortalidad de promastigotes se obtuvo una $CL_{50} = 0.213$ mg/mL (**Figura 9**). Aunado a lo anterior, se observó que posee un efecto parasiticida directo en promastigotes *L. mexicana*, ya que se obtuvo el 100% de mortalidad a una concentración de 50 mg/mL.

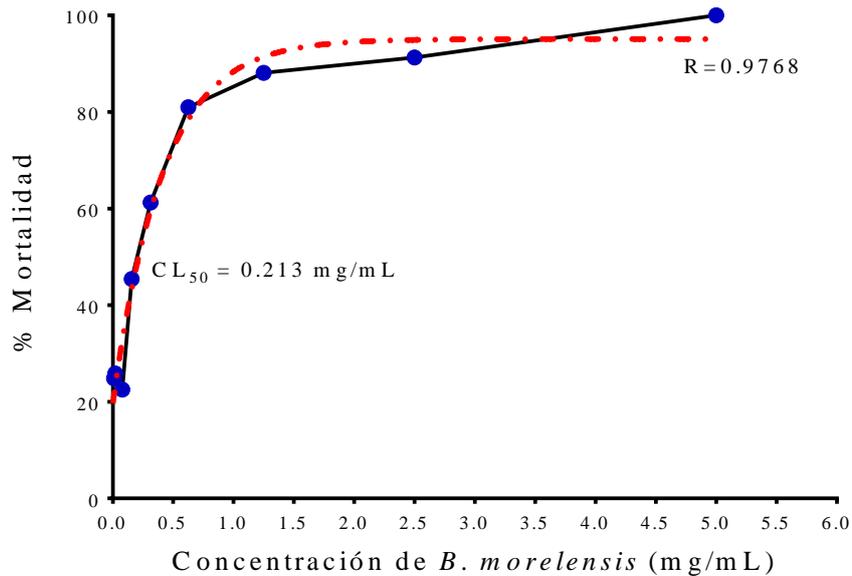


Figura 9: Curva del efecto anti-leishmánico. Interacción tras 48 horas con diferentes concentraciones del extracto de *B. morelensis* (desde 10 a 0.004 mg/mL) contra promastigotes de *L. mexicana* (2.5×10^4). Como se puede observar el efecto del extracto es dosis dependiente, reportándose una $CL_{50} = 0.213$ mg/mL.

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 [49], por lo cual se evaluó el efecto sobre la misma población de parásitos. La determinación de la CL_{50} a concentraciones de 0.0048-10 mg/ml, con un tiempo de interacción de 48 horas y los medicamentos ya mencionados (**Figuras 10 y 11**).

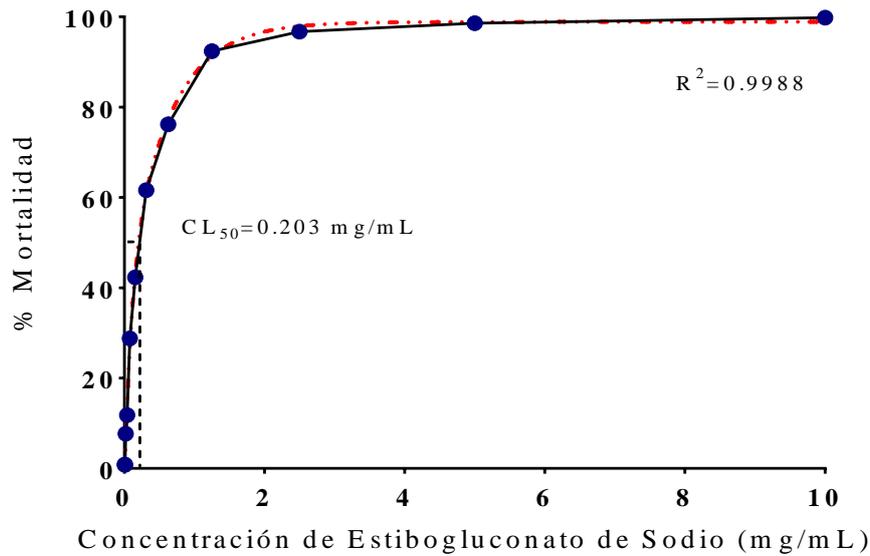


Figura 10: Efecto *in-vitro* del medicamento Estibogluconato de Sodio [100 mg/mL] a concentraciones ascendente (0.0048-10 mg/mL) sobre fase promastigote de *L. mexicana*, en un tiempo de incubación de 48 horas, la CL_{50} alcanzada fue 0.203 mg/mL.

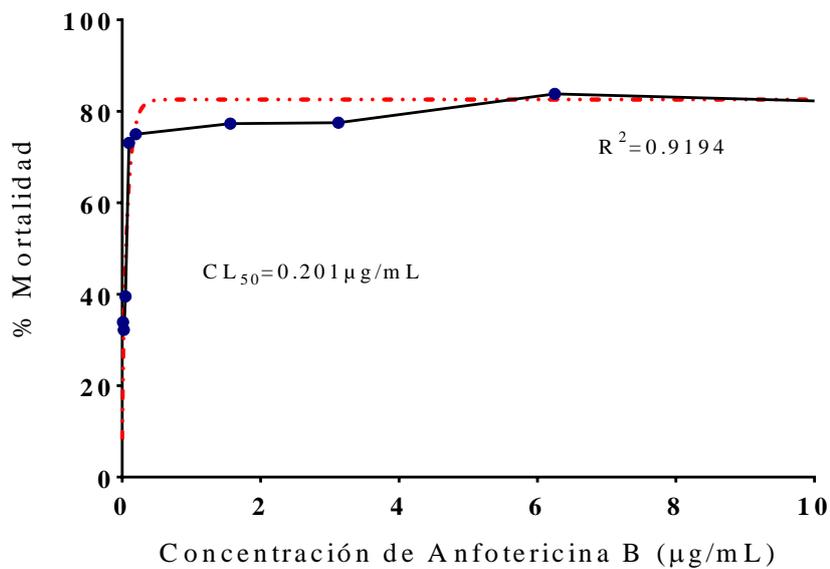


Figura 11: Efecto *in-vitro* del medicamento Anfotericina B a diferentes concentraciones (0.0048-10 mg/mL) sobre fase promastigote de *L. mexicana*, el tiempo de incubación 48 horas.

Con los resultados obtenidos en este experimento se observó que el extracto de *B. morelensis* posee un efecto *in-vitro* anti-leishmánico en el crecimiento de los promastigotes de *L. mexicana*, la cual es la fase infectiva de este parásito.

Tamaño de la inflamación

Para medir el efecto *in-vivo* que presenta *B. morelensis* sobre *L. mexicana* se inocularon ratones con promastigotes de *L. mexicana* (**Figura 12**). Seguido de la inoculación de 2×10^6 promastigotes de *L. mexicana* se les aplicó gel al 10% de *B. morelensis* (ratones con tratamiento) comparándose con un grupo positivo (ratones inoculados con *L. mexicana* pero sin tratamiento (**Figura 13A**), y se monitoreo semanalmente el tamaño de la lesión en los ratones experimentales hasta la semana nueve post-infección con un vernier electrónico (**Figura 13B**). La medición tuvo como propósito observar el desarrollo de la inflamación en cuanto los ratones a los que se les aplicó el extracto de *B. morelensis* y los ratones control y así determinar, si el extracto de *B. morelensis* interviene en el desarrollo de la inflamación causada por *L. mexicana*. Los ratones control desarrollaron una lesión progresiva llegando casi a 1 cm de diámetro. En contraste con los ratones con tratamiento tuvieron una lesión más pequeña (menos de 0.5 cm) durante el periodo de estudio (**Figura 14**). Lo que indica que responden de una manera más eficiente, controlando la infección causada por *L. mexicana* observándose directamente en el tamaño de la lesión (**Figura 16**). Se puede apreciar que esta diferencia fue más notoria en la última semana de estudio por lo cual se graficó esta última (**Figura 15**).



Figura 12: Inoculación de *L. mexicana*. Se infectaron de manera subcutánea ratones BALB/c machos de seis semanas de edad en la parte posterior cerca de la base de la cola. Los ratones fueron rasurados para hacer más fácil la infección y el monitoreo del tamaño de la lesión. Para producir la lesión se inocularon 2×10^6 promastigotes de *L. mexicana*.



Figura 13: 13A Aplicación del extracto de *B. morelensis* en gel. Se les aplicó dos veces al día 100 μ L de este en la base de la cola donde se encontraba la lesión. 13B Se dio seguimiento diario a la lesión midiéndola con un vernier electrónico

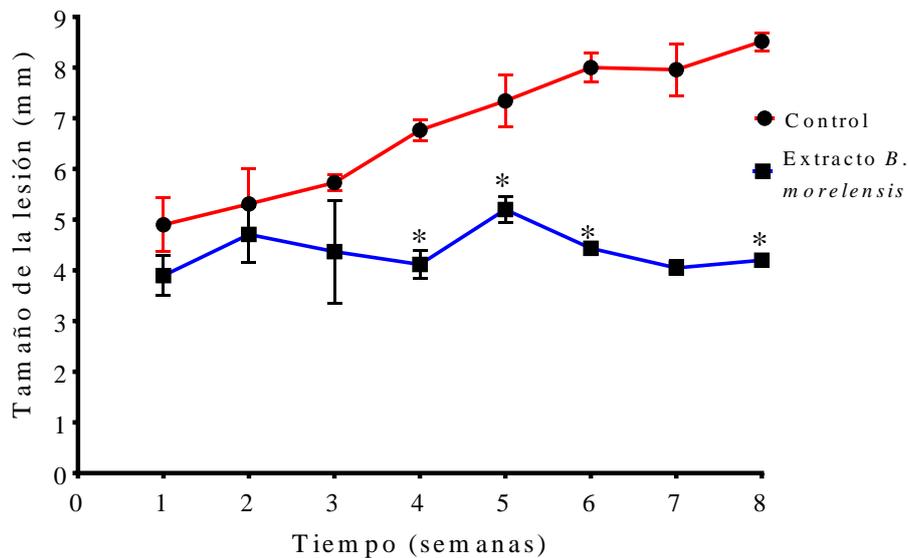


Figura 14: Monitoreo de la lesión hasta la semana nueve post-infección de ratones BALB/c ♂ donde se puede observar diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de la inflamación en ratones con tratamiento y ratones sin tratamiento. Los datos están expresados como la media (milímetros) \pm ES. $P < 0.05$ T-students; Graphpad Prism. = valor significativo. ($n=8$).

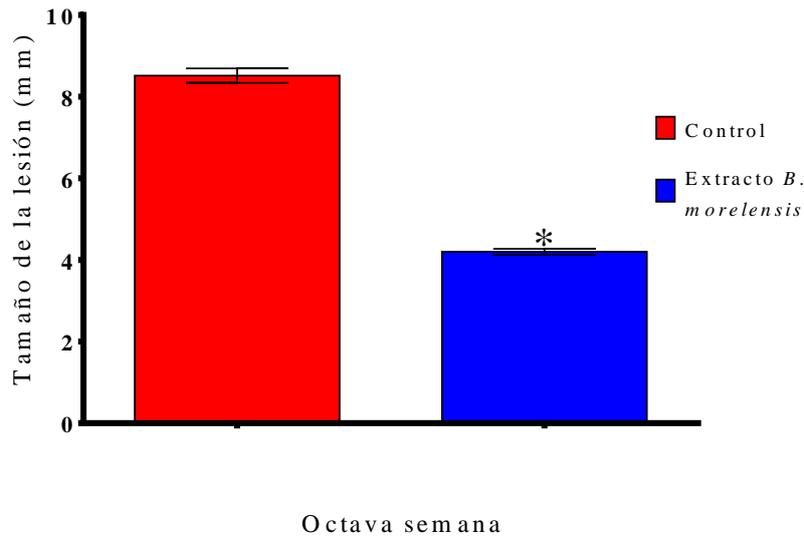


Figura 15: Grafica de la última semana, donde se observa que hay una mayor diferencia significativa en esta semana de tratamiento.

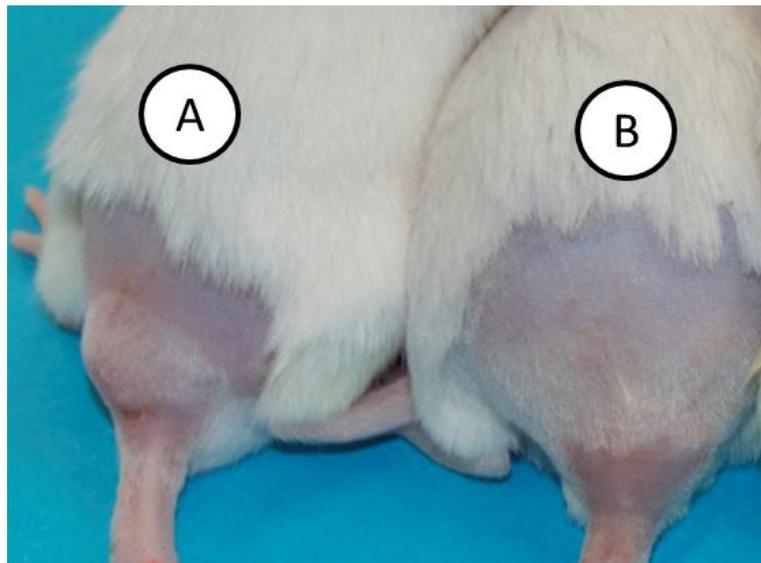


Figura 16: Tamaño de la lesión a la semana ocho post-infección. Se pueden observar las diferencias entre los dos grupos experimentales. En los ratones BALB/c ♂ sin tratamiento la lesión es de gran tamaño (**Figura 13A**) midiendo más de 1 cm. Por otra parte, los ratones BALB/c ♂ con tratamiento (*B. morelensis*) exhiben una lesión de tamaño menor a 0,5 cm.

Carga Parasitaria

La carga parasitaria se determinó con el fin de comparar la cantidad de parásitos de la lesión entre los dos grupos experimentales. Considerando que la carga parasitaria está directamente relacionada con la ingestión de amastigotes de *Leishmania* por los vectores biológicos. Se encontró una cantidad significativamente menor $6,63 \pm 0,082$ en los ratones tratados con el extracto de *B. morelensis* en comparación con el grupo de ratones no tratados $9,6 \pm 0,175$ (**Figura 17**). Esto se puede corroborar con la disminución que hubo en el tamaño de la lesión de los ratones.

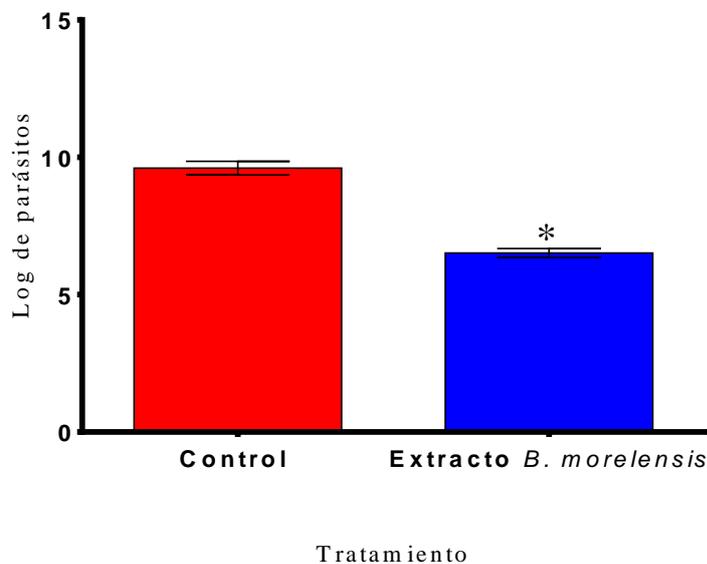


Figura 17: Carga parasitaria por dilución limitante. Gráfica de la carga parasitaria a la semana nueve post-infección, se muestra la diferencia entre los dos grupos experimentales. Se observa una disminución significativa de la carga parasitaria en el grupo tratado con el extracto de *B. morelensis* respecto al control. Los valores se dan como el medio de la titulación parásito logaritmo \pm SD. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando Prism 6. La significación de las diferencias se determinó con la prueba de t no apareado (dos colas) con corrección de Welch. * $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Cuantificar citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias por la técnica de ELISA

Con el propósito de determinar si la presencia del extracto de *B. morelensis* afectaba la reacción de alguna citocina de la inmunidad adaptativa, se analizó por ELISA IL-4 y TNF- α en los ratones BALB/c ♂ infectados con *Leishmania mexicana* y el control negativo. Se obtuvieron y se analizaron los sueros de 1, 3, 5, 7, 6 y 9 semanas post-infección.

La IL-4 es una citocina anti-inflamatoria que produce un mejor ambiente para el desarrollo de la leishmaniosis por lo que inhibe el desarrollo de la respuesta de tipo Th1, en cambio TNF- α que es una citocina pro-inflamatoria, no crea un ambiente propicio para que se desarrolle la enfermedad. En la **Figura 18** se muestra que hay un aumento considerable que es de 4538.816 pg/mL de IL-4 en los ratones a los que se les aplicó tópicamente *B. morelensis*, y que es más evidente en la semana tres, mientras que a los ratones sin tratamiento se observa que la citocina IL-4 se mantiene constante y muy baja 225.645 pg/mL. En contraste con la producción de TNF- α (**Figura 19**) que se vio disminuida con un 58.498 pg/mL en los ratones con tratamiento y para el grupo control fue de 246.954 pg/mL, ya que es una citocina pro-inflamatoria se esperaba que el control (que son los ratones sin ningún tratamiento pero infectados con *L. mexicana*) aumentara y el tratamiento con *B. morelensis* disminuyera.

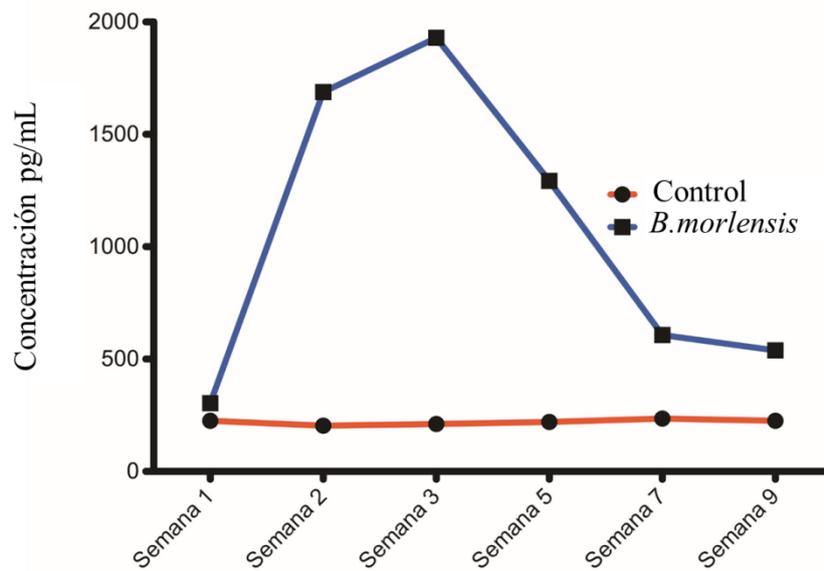


Figura 18: Cuantificación de IL-4. Se observa como el extracto de *B. morelensis* provoca un aumento en la IL-4 respecto al control, en la semana tres es más evidente este aumento de la citocina pero conforme van pasando las semanas disminuye llegando a estar casi a la misma concentración que el control.

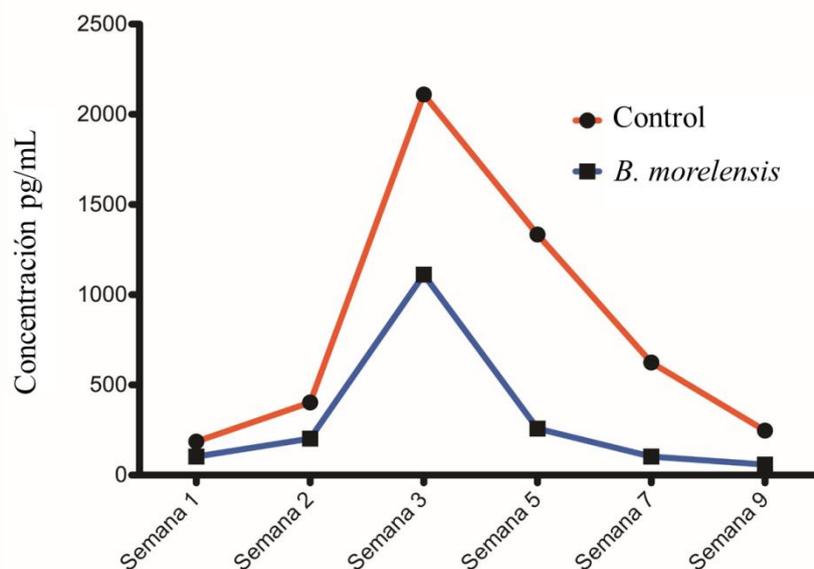


Figura 19: Cuantificación de TNF- α . Se observa como la citocina pro-inflamatoria en *B. morelensis* es baja en comparación con el control ambos se disparan en la semana tres pero en *B. morelensis* es menor, a medida de que pasan las semanas estas citocinas llegan a estar casi a la misma concentración.

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

Por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas que es una herramienta potente para separar, identificar y cuantificar los componentes volátiles y semivolátiles de mezclas complejas (CG-EM) se obtuvieron los compuestos presentes en las muestras de *B. morelensis* (**Figura 20**) Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico con base al tiempo de retención y la abundancia de dichos compuestos en el extracto y se identifica mediante su respectivo espectro de masas obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas estos están representados en el **Cuadro 2**. Es importante resaltar el hecho de que no todos los picos que se presentan en la figura pudieron ser identificados con el CG-EM, esto se debe a que en la base de datos aún no se han identificado todos los metabolitos secundarios que pueden poseer las plantas, por lo que se analizan con respecto a los patrones conocidos hasta el momento. Sin embargo, abre la posibilidad de encontrar compuestos dentro de este extracto que no se hayan descrito anteriormente al aislar cada uno de los metabolitos secundarios presentes dentro del mismo.

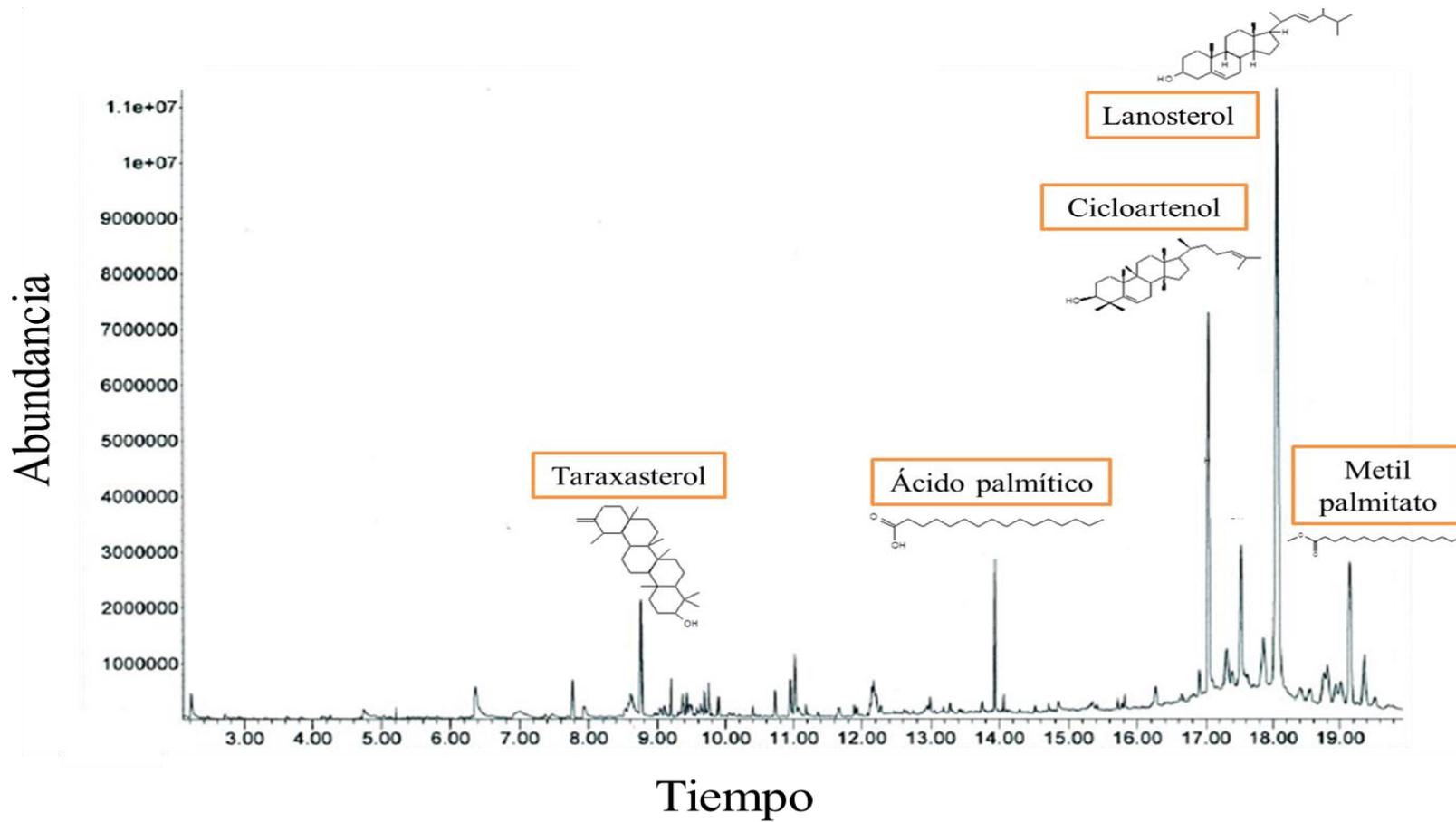
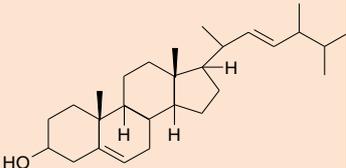
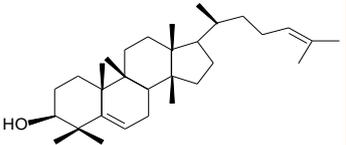
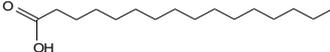
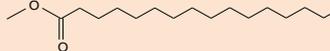
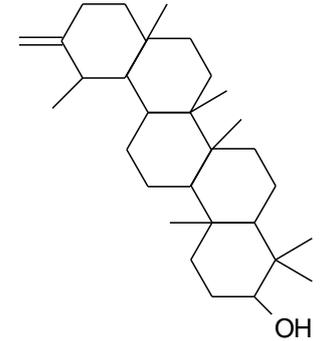


Figura 20: La identificación de los compuestos se hizo con base a su espectro de masa.

En el análisis del extracto de *B. morelensis* se identificaron seis metabolitos secundarios, ácidos grasos y terpenos, los cuales se presentan en el **Cuadro 2** donde se puede observar también su estructura química, el porcentaje de abundancia, las propiedades medicinales que se han registrado y por último el tipo de compuesto que es. El compuesto con mayor porcentaje de abundancia fue el Lanosterol con una abundancia de 42.82%, seguido del Cicloartenol con una composición de 19.46% mientras que los compuestos con menos abundancia fueron el metil palmitato con una composición de 3.33% y el Ácido Palmítico con una composición del 4.52%.

Cuadro 2: Compuestos identificados en la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

COMPUESTO	ESTRUCTURA QUIMICA	ABUNDANCIA %	PROPIEDADES BIOLÓGICAS	TIPO DE COMPUESTO
Lanosterol		45.82	Induce desacoplamiento mitocondrial y protege las neuronas dopaminérgicas de la muerte celular en un modelo para la enfermedad de Parkinson [50]	Terpeno
Cicloartenol		19.46	Potencial de actividad citotóxica frente a diferentes líneas celulares de cáncer humano [51].	Terpeno

Ácido palmítico		4.52	<p>Tiene actividad anti-inflamatoria, ya que reduce la citocina TNF-α en el pulmón, contrarresta la infiltración de las células inflamatorias y por lo tanto la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y regula los efectos de las citocinas [52].</p> <p>Reduce el edema plantar de ratas inducido por carragenina y disminuye la prostaglandina E2 en los exudados inflamatorios.</p>	Ácido graso
Metil palmitato		3.33	Anti-inflamatorio [53]	Ácido graso
Taraxasterol		3.22	Anti-inflamatorio [54].	Terpeno

Histología

A la semana nueve post-infección se sacrificaron a los ratones BALB/c ♂, para obtener la lesión generada por *L. mexicana* en los tres grupos experimentales **Figura 21**. Las lesiones de *Leishmania* se caracterizan por la presencia en la dermis de numerosos macrófagos entremezclados con linfocitos y una cantidad variable de células plasmáticas. Los macrófagos que se han podido localizar en los cortes histológicos de muestras con *Leishmania* se les conoce como histiocitos (macrófagos con promastigotes de *Leishmania*) (**Figura 23A**). También se puede encontrar cambios secundarios es decir un infiltrado inflamatorio agudo (**Figura 22B**). Que es más evidente en los ratones que fueron tratados con *B. morelensis* así como un cambio en el grosor de la epidermis que también es más evidente en el grupo de ratones al que se le aplicó *B. morelensis* ya que hay un aumento significativo en el tamaño de éste como se observa en la **Figura 24C**.

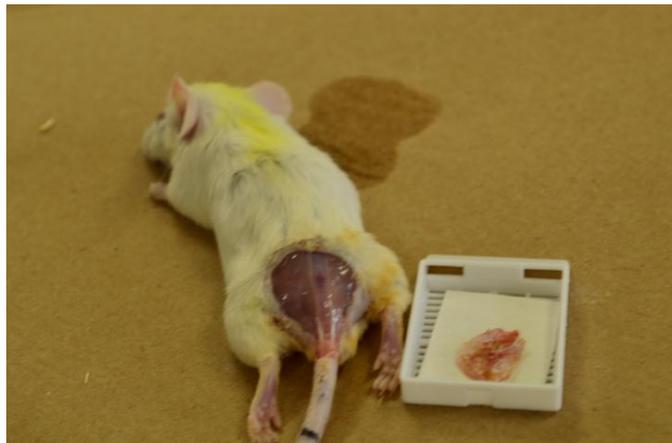


Figura 21: Obtención de la lesión generada por *L. mexicana* a las nueve semanas post-infección, la piel se colocó en un cassette de histología para ser procesado posteriormente.

+

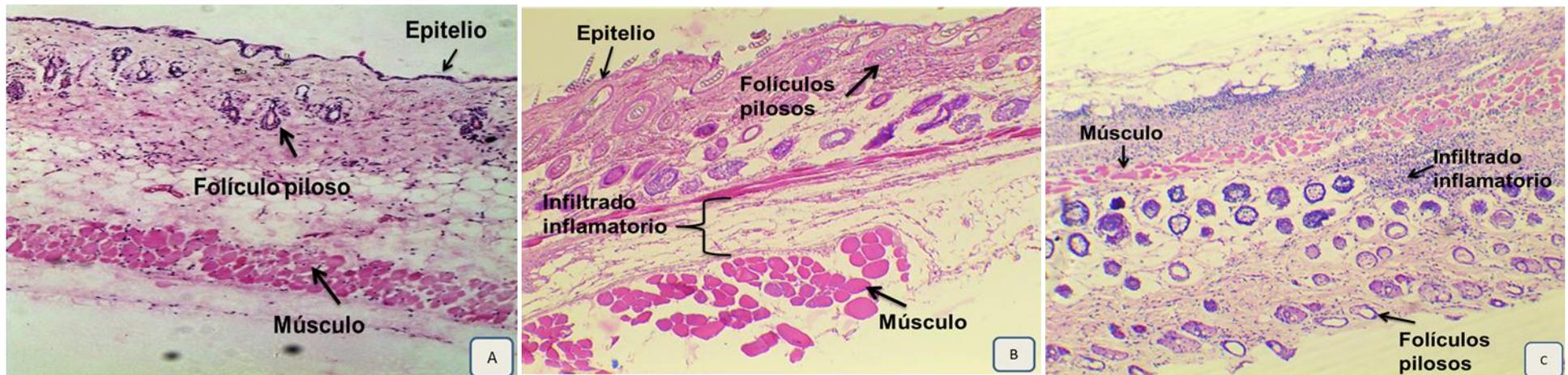


Figura 22: Cortes histológicos de heridas dorsales de los ratones: (control negativo A), control positivo (B) y tratamiento (C), a 10 x y Tinción H y E a nueve semanas post-infección con *L. mexicana*. En la primera imagen podemos observar como no se aprecia ningún daño en el tejido, se observa músculo bien definido, fólculos pilares, epitelio sin alteraciones en el músculo y no hay infiltrado inflamatorio. Mientras que en la segunda imagen se aprecia gran infiltrado inflamatorio que afecta el músculo, el epitelio se encuentra un poco comprometido y hay mayor cantidad de fólculos pilosos, y en la tercera imagen se observa un poco de daño en el músculo.

Muestran a diferentes magnificaciones a 10 x (A), 20 x (B) y 40 x (C).

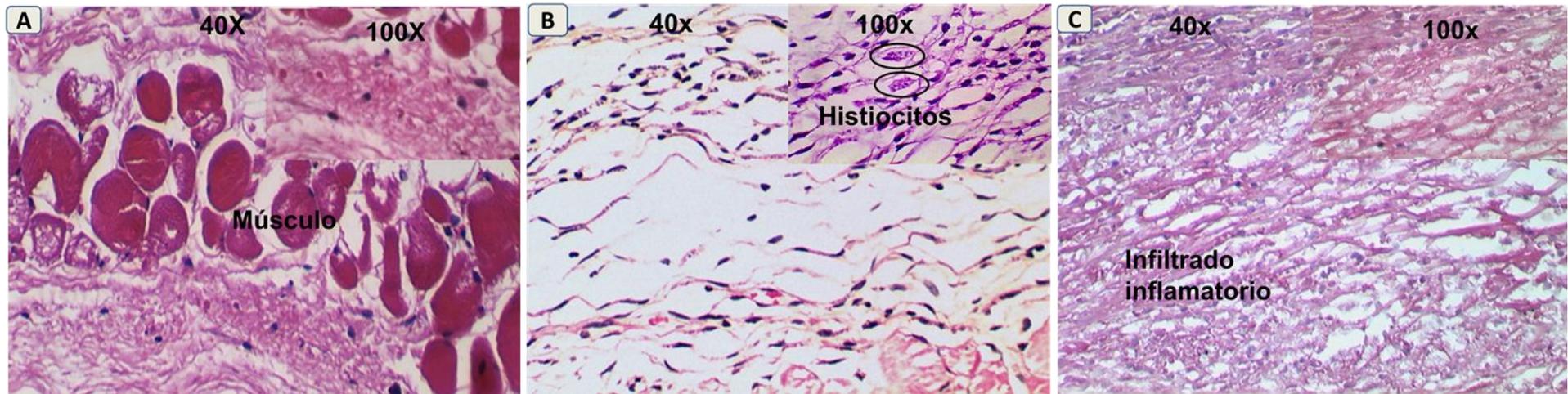


Figura 23: Cortes histológicos de piel sana de ratón (control negativo A), control positivo (B) y tratamiento (C), a 40 x y 100 x, Tinción H y E. En la figura 16 A, observamos la piel sana de un ratón donde podemos apreciar que no hay daños en sus diferentes estructuras. En la figura 16 B a 40 x como el daño es más evidente en la musculatura y hay gran cantidad de infiltrado inflamatorio pero a 100 x podemos ver la presencia de varios histiocitos que son los que contienen a los protozoos de *L. mexicana* Cortes histológicos de piel de ratón infectada con *Leishmania*. Por ultimo en la figura 16 C se observa en menor cantidad infiltrado inflamatorio a 40 x pero a 100 x no se encontró ningún histiocito.

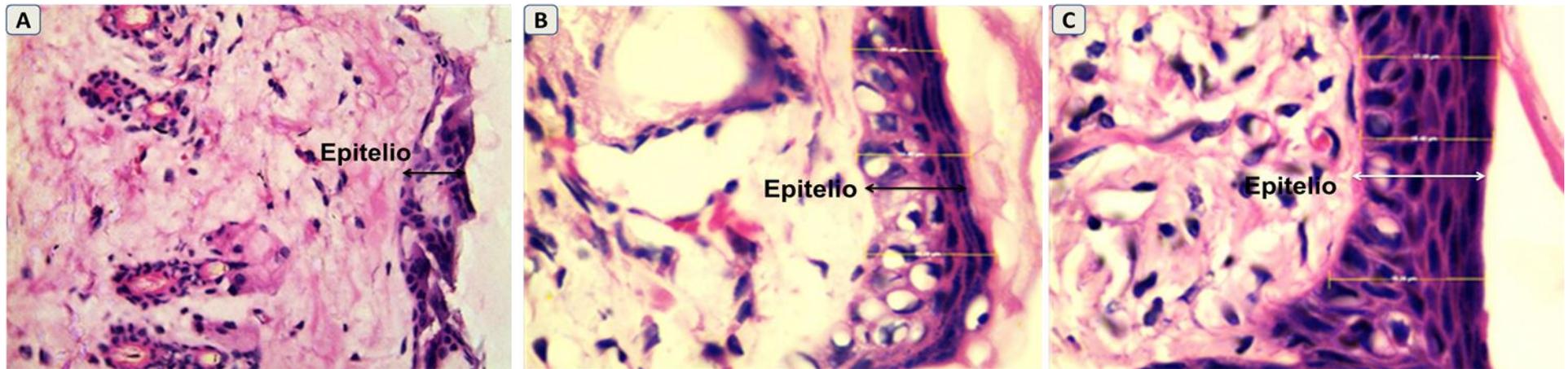


Figura 24: Cortes histológicos de piel sana de ratón (control negativo A), control positivo (B) y tratamiento (C), a 40 X. Tinción H y E. En la figura 17 A podemos observar un epitelio de piel normal, en la figura 17 B se aprecia como hay un aumento en el tamaño del epitelio de la piel en comparación con el epitelio del ratón sano. Y en la figura 17 C hay un engrosamiento mayor en el epitelio de la piel en comparación con la piel normal, esta fue tratada con *B.morelensis*. Para comprobar que hubo un aumento en el tamaño del epitelio se hicieron mediciones en cada corte corroborando que hay una diferencia significativa.

DISCUSIÓN

La leishmaniosis es una parasitosis de gran importancia a nivel mundial y que en los últimos años ha aumentado su frecuencia y distribución en México. Este es el único reporte del efecto del extracto metanólico de *Bursera morelensis* contra *L. mexicana* ya que los únicos reportes que se tienen son de ameba y *Acanthamoeba* Vásquez y Rodríguez [30 y 55]. El extracto de *B. morelensis* mostro una $CL_{50} = 0.213$ mg/mL contra amastigotes de *L. mexicana*. Estos resultados corroboran que el extracto tiene un efecto leishmanico, como el estudio reportado por García [38], donde se presenta la actividad que tiene *B. simaruba* contra *L. amazonensis*.

Se han hecho estudios con otras especies de Burseras como *B. fagaroides* donde se demostró que el extracto etanólico de esta tiene una actividad sobre el crecimiento de *Entamoeba histolytica* Rosas [56].

Una vez demostrada la actividad *in-vitro* del extracto, se decidió investigar con un modelo *in-vivo*, aplicando gel al 10% de *B. morelensis* en la lesión que se generó con *L. mexicana* se encontró que reduce significativamente el tamaño de la lesión (**Figura 13**) lo que dio pie al siguiente estudio que se realizó, que fue carga parasitaria, donde se reportó una cantidad significativamente menor en la carga parasitaria en el grupo de ratones tratados con *B. morelensis* (**Figura 14**), esto concuerda con la actividad reportada de otros extractos que demuestran que la aplicación tópica de extractos de estas plantas reducen el tamaño de la lesión. (Ngure y Ostan) [57 y 58].

En la composición química que se realizó por medio de la Cromatografía de Gases (EG-EM) y donde se encontró que los compuestos más abundantes son el Cicloartenol y el Lanosterol, nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Silva y Maes [59 y 60] donde menciono que la presencia de Lanosterol puede tener un efecto anti-leishmánico. El Cicloartenol como se menciona anteriormente no tiene reportes de la actividad anti-leishmánica, se sabe que este grupo de compuestos tienen una gran actividad anti-parasitaria contra estos organismos, el Cicloartenol que según lo reportado por Sureshkumar [50] tiene un potencial de actividad citotóxica frente a diferentes líneas celulares de cáncer humano el Lanosterol se cree detiene el crecimiento de la lesión. Se encontraron otros compuestos con diferentes actividades como por ejemplo el ácido palmítico que incrementa la apoptosis en las células progenitoras del endotelio [60]. El

Taraxasterol presenta una actividad anti-inflamatoria porque bloquea la ruta NF- κ B [62].

Para corroborar si el efecto del extracto es directamente sobre el parásito o si induce un efecto inmunomodulador se midieron la expresión de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias ya que una respuesta inflamatoria le confiere protección al hospedero.

El extracto favorece la expresión de la citocina IL-4 (anti-inflamatoria) y la disminución de la citocina TNF- α (pro-inflamatoria), por lo que se puede suponer que el extracto actúa directamente sobre la viabilidad del parásito, tal vez induciendo apoptosis u otro mecanismo celular, ya que si no fuese el caso el ambiente favorecido por la expresión de IL-4 se vería reflejado en el progreso de la lesión y la infección. Por lo anterior se cree que el extracto promueve la producción de IL-4 en mayor proporción que TNF- α , esto concuerda con diversos reportes donde se menciona que las plantas de este género tienen propiedades en la regulación de procesos inflamatorios [49]; por lo que es probable que el efecto sobre la lesión se debe a un efecto sobre el parásito y no a un estímulo en la respuesta inmune. Para corroborar esto, se realizaron cortes histológicos para ver la presencia o ausencia de parásitos en el grupo control y en el tratamiento.

En los cortes histológicos que se realizaron, el grupo de ratones con tratamiento (gel al 10% de *B. morelensis*) no se encontraron histiocitos con promastigotes de *L. mexicana* mientras que en los ratones sin tratamiento si se observaron dichos histiocitos. Debido a la carencia de estos en nuestro grupo con tratamiento, nos hace suponer que el gel tuvo una actividad directa sobre el parásito.

Otro aspecto que hay que resaltar es el engrosamiento de la epidermis que se observó principalmente en el grupo tratado con el gel de *B. morelensis*, esto nos remite al uso tradicional como cicatrizante que le dan a *B. morelensis* [63 y 64]. Este dato es importante ya que además de tener actividad antiparasitaria ayuda a la regeneración del epitelio dañado por la infección de la *Leishmania*.

CONCLUSIONES

El extracto metanólico de *B. morelensis* presenta un efecto:

- ✔ Anti-leishmanico tanto *in-vitro* como *in-vivo*
- ✔ *In-vitro* sobre los promastigotes de *Leishmania mexicana*.
- ✔ *In-vivo* disminuyó el tamaño de la lesión.
- ✔ El extracto disminuyó la carga parasitaria.
- ✔ Los compuestos químicos encontrados en la corteza de *B. morelensis*, son en su mayoría Cicloartenol y Lanosterol.

REFERENCIAS

1. Magill AJ. 1995. Epidemiology of the leishmaniasis. *Dermatology Clin.* 13:505-2.
2. Salazar, P., Tejeda, S. y López, H. 2010. Reacción de antígenos de *Leishmania (Leishmania) mexicana* con sueros de pacientes con leishmaniosis cutánea de Sinaloa, México. 52:165-169.
3. González, F. y Zerpa, O. 2004. Leishmaniasis cutánea en la infancia. *Dermatology Pediatr Lat Venezuela.* 2(2): 97-108.
4. Grevelink S, Lerner E. Leishmaniasis.1996. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 34: 257 – 70.
5. Cabello, R. 2007. Microbiología y Parasitología Humana. Panamericana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ed. 1750 p.
6. Melvin, Y. Silva, S. Dueñas, R. y Jaramillo, P. 2008. Leishmaniasis Cutánea Diseminada: Reporte de Dos Casos en Santander, Colombia. 11 (1): 145-150.
7. Grimaldi Jr, G., Tesh, R., McMahon-Pratt, D. 1989. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 41: 687-725.
8. Calmet, J. 1992. Risk factors and *leishmaniasis*: possible contributions for control strategies. In: Wijeyaratne, P., Goodman, T., Espinal, C. *Leishmaniasis Control Strategies: A critical evaluation of IDRC-supported research.* Ottawa. 206-222 pp.
9. Ashford, R. W. 1992. Desjeux, P., De Raadt, P. Estimation of population at risk of infection and number of cases of leishmaniasis. *Parasitology Today.* 8:104-105.
10. Velasco-Castrejón O, Guzmán-Bracho C, Cruz-Rodríguez J, González-Domínguez F. 1991. Las leishmaniasis con especial referencia a México. *Publicación técnica del IndRE:* 7:1-47.

11. Alexander, J., A.R. Satoskar y D.G. Russell. 1999. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *Journal of Cell Science*. 112: 2993-3002.
12. The Center for Disease Control (TCDC). 2008. Parasites and health: leishmaniasis. En línea: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/leishmaniasis.htm>. Consultado: 27 enero 2014
13. Ampuero, J. 2000. *Leishmaniasis*. El Instituto Nacional de Salud (INS). Perú. 28-32 pp.
14. Rai K, Cuypers B, Bhattarai NR, Uranw S, Berg M, Ostyn B, Dujardin JC, Rijal S, Vanaerschot M. 2013. Observation Relapse after Treatment with Miltefosine for Visceral Leishmaniasis Is Associated with Increased Infectivity of the Infecting *Leishmania donovani* Strain. 11-13 pp.
15. Vásquez, L. 2009. Terapéutica anti-leishmania: revisando el pasado el presente y el futuro. *Gac Médica Caracas*. 117(2):93-111
16. Araujo JD, Salas RA. 2008. Actividad antimicrobiana de plantas. *Científica*. 6:6-18.
17. 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.
18. Álvarez, L. M. E., Isaza, M. G., Echeverry L. H., 2005. Efecto Antibacteriano *In Vitro* De *Austroeupeatorium inulaefolium* H.B.K. (*Salvia Amarga*) Y *Ludwigia Polygonoides* H.B.K. (*Clavo De Laguna*). *Revista Ciencias Básicas Biosalud*, 14: 46 – 55.
19. Osorio, D.E.J., 2009. Aspectos básicos de Farmacognosia. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. 129 p.
20. Del Pozo, E. X. A., 2006. Extracción, caracterización y determinación de la actividad antibacteriana y antimicótica del aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratos* (DC) stapf). Tesis de Grado. Sede Sangolqui. Facultad de Ingeniería en biotecnología. 142 p.
21. Kakuko Y., Fumico A., Ariaki N., Hiraku O., Lozada P., López V., Estrada M., Aguilar A., Reyes Chilpa. 2005. Antibacterial activity of crude extracts from

- Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(2):293-299
22. Argueta, A., Gallardo, M., 1994. Atlas de plantas de la medicina tradicional mexicana. 3 vols. Instituto Nacional Indigenista. México D.F. 1786 p.
23. 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 15/02/2014.
24. Dávila, A. P., Medina, L. R., Ramírez, R. A., Salinas, T. A. y Tenório, P., 1995. Análisis de la flora del Valle de Tehucán-Cuicatlán: endemismo y diversidad. En: Linares, E., Dávila P., Chiang, F., Bye, R. y Elías, T. (eds). Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 33-41 pp.
25. Lock, O. 2007. Capítulo IV. Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios. En: Castillo, G.I. y I. Martínez. 2007. *Manual de fitoterapia*. España. 41-64 pp.
26. Zacarés, S.L. 2008. Nuevas aportaciones al metabolismo secundario del tomate. Identificación y estudio de moléculas implicadas en la respuesta a la infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Tesis para obtener el grado de Doctorado. Universitat Nacional Politècnica de Valencia. España. 158 p.
27. García, D.E. 2004. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y Forrajes*. 27:112.
28. Sepúlveda, J.G., H. Porta y M. Rocha. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(3): 355-363.
29. Kuklinski C. Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. España: Omega, 2000. Willians, C.A. y Grayer, R.J. 2004. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Products Reports*. 21: 539-573.

30. Vázquez, C. R. 2010. Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de bellotas de ciprés (*Cupressus sempervirens var horizontalis*) y semilla de brócoli (*Brassica oleraceae var italica*) sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. 94 p.
31. Palá, J. 2002. Contribución al conocimiento de los aceites esenciales del género "*L. eryngium*", en la Península Ibérica. Tesis para obtener el grado de Doctor en Biología. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Biología. 269 p.
32. Roberts, S. C. 2007. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nature chemical biology*. 3(7) 87-95.
33. Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. Fisiología Vegetal. Castello de la Plana: Publicaciones de la Universidad Jaume. 534 p
34. Rzedowski, J. y Kruse, H., 1979. Algunas tendencias evolutivas en *Bursera* (Burseraceae). *Taxón* 28 (1,2/3), 103-116.
35. Rzedowski, J., Medina L. R., Calderón, 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.
36. Bonfil, C., P. E. Mendoza, and J. Ulloa. 2007. Root and callus development in cuttings of seven species of the genus *Bursera*. *Agrociencia*. 41: 103-109
37. Martínez, J., Sulbarán de Ferrer, B., Ojeda de Rodríguez, G., Ferrer, A., Nava R., 2003. Actividad antibacteriana del aceite esencial de la mandarina. *Revista de la Facultad de Agronomía*. 20: 502-512.
38. Alzamora, L., Morales, L., Armas, L., Fernandez, G., 2001. Medicina tradicional en el Perú: Actividad antimicrobiana in-vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. *Anales de Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. 62(2), 156-161.
39. Garcia, M., L. Monzote, R. Scull, y P. Herrera. 2012. Activity of Cuban Plants Extracts against *Leishmania amazonensis*. *ISRN pharmacology*. 2012: 104540.

40. Cole, J.R., E. Bianchi y E.R. Trumbull. 1969. Antitumor agents from *Bursera microphylla* (Burseraceae). II. Isolation of a new lignan-burseran. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 58: 175-176.
41. Hammer, K. A., Carson, C. F. & Riley, T. V., 2004. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53, 1081-1085.
42. Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M., and Ignacimuthu, S. 2006. In Vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BioMed Central Complementary and Alternative Medicine*. 6, 39-46.
43. Jolad, S.D., R.M Wiedhopf & J.R. Cole, 1977. "Cytotoxic agents from *Bursera morelensis* (Burseraceae): deoxypodophyllotoxin and a new lignan, 5'-desmethoxydeoxypodophyllotoxin". *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 66(6):892-3.
44. López, H. L. 2011. Propiedades medicinales y determinación de los compuestos del aceite esencial de *Bursera morelensis* Ramírez. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 37-41 pp.
45. Domínguez, X.A. 1973. Métodos de Investigación fitoquímica. Ed. Limusa. México. 281 p.
46. Ruiz, H. P. 2014. Actividad anti-leishmánica del extracto metanólico de *Bursera aptera* Ramírez. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 58 p.
47. Dutta, A., S. Bandyopadhyay, C. Mandal y M. Chatterjee. 2005. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of indian visceral leishmaniasis. *Parasitology Internacional*. 54:119-122.
48. Prophet, E. Mills, B. Arrington, J. Sobin, L. 1992. Métodos Histotecnológicos. Instituto de Patología de las fuerzas Armadas de los Estados Unidos de America (AFIP). 15-57 pp.

49. Catalán, M. y Montejo, J. 2006. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y Farmacocinética. Revista Iberoamericana de Micología. 23:39-49.
50. Lim L, Jackson-Lewis V, Wong LC, Shui GH, Goh AX, Kesavapany S, et al. Lanosterol induces mitochondrial uncoupling and protects dopaminergic neurons from cell death in a model for Parkinson's disease. Cell death and differentiation. 2012; 19: 416-427.
51. Sureshkumar D, Senthilraja P, Kalavathy S. 2012. In-silico docking analysis of *Calotropis gigantea* (L.) R.Br derived compound against anti-cervical cancer activity. World Research Journal of Computer-Aided Drug Design. 1:4.
52. Sharawy MH, El-Agamy DS, Shalaby AA, Ammar el SM. 2013. Protective effects of methyl palmitate against silica-induced pulmonary fibrosis in rats. International immunopharmacology.16:191-198.
53. Van Arman, C.G., A.J. Begany, L.M. Miller y H.H. Pless. 1965. Some details of the inflammations caused by Yeast and Carrageenin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 150:328-333.
54. Zhang X, Xiong H, Liu L. 2012. Effects of taraxasterol on inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. Journal of ethnopharmacology. 141:206-211.
55. 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.
56. 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.
57. Ngure PK, Ng'ang'a Z, Ingonga J, Rukunga G, Tonui WK. 2009. In vivo efficacy of oral and intraperitoneal administration of extracts of *Warburgia ugandensis* (Canellaceae) in experimental treatment of Old World cutaneous

- leishmaniasis caused by *Leishmania major*. Afr J Tradit Complement Altern Med. 6(2):207-12.
58. Ostan I, et al. 2007. In vitro and in vivo activities of *Haplophyllum myrtifolium* against *Leishmania tropica*. New Microbiol. 30(4):439-45.
59. Silva AA, et al. 2014. Activity of cycloartane-type triterpenes and sterols isolated from *Musa paradisiaca* fruit peel against *Leishmania infantum* chagasi. Phytomedicine 21(11):1419-23.
60. Maes L, et al. 2004. In vitro and in vivo activities of a triterpenoid saponin extract (PX-6518) from the plant *Maesa balansae* against visceral *leishmania* species. Antimicrob Agents Chemother 48(1):130-6.
61. Jiang H, Liang C, Liu X, Jiang Q, He Z, Wu J, et al. 2010. Palmitic acid promotes endothelial progenitor cells apoptosis via p38 and JNK mitogen-activated protein kinase pathways. Atherosclerosis. 210:71-77.
62. Zhang X, Xiong H, Liu L. 2012. Effects of taraxasterol on inflammatory responses in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. Journal of ethnopharmacology. 141:206-211.
63. 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.
64. Espinosa, L. 2012. Estudio comparativo de la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Bursera schelchtendalii* Engler. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
65. García, M.E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. 3ª ed. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF. 252 p.
66. Martínez, J. M. 2002. Actividad antiinflamatoria de *Porophyllum tagetoides*. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 47 pp.

67. Medina, S.J. 2000. Determinación del vigor y estado reproductivo de *Stenocereus stellatus* (Cactáceas) a lo largo de una cronosecuencia edáfica. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. 35 p.
68. Valiente, B.L. 1991. Patrones de precipitación en el valle semiárido de Tehuacán, Puebla, México. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. 65 p.
69. Valiente-Banuet, a., A. Alcantara, P. Dávila, N. Flores-Hernández, M.C. Arismendi, J. Ortega-Ramírez y J.A. Soriano. 2000. La vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 67:25-75.
70. Salcedo-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.
71. Fernández, B. Ma. N. 1999. Análisis de la dinámica de comunidades vegetales con relación a la evolución del paisaje, en la zona semiárida de Coxcatlán, Puebla. Tesis para obtener el grado de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF. 98 p.
72. Rosas, L.R. 2003. Estudio etnobotánico de San Rafael-Coxcatlán. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 94 p.
73. Secretaría de Salud. Censo de población 2001. Casa de salud de la Comunidad. Instituto Mexicano del Seguro Social. Ayuntamiento de Coxcatlán, Puebla, México. 10 p.
74. Rzedowski, J. 1992. Proyecto Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. En: Memoria de la primera Muestra "Los Recursos Vegetales de Michoacán". Morelia, Michoacán. 120-123 p.

APÉNDICES

Apéndice 1

TAXONOMÍA

Reino Plantae

Subreino Tracheobionta

División Magnoliophyta

Clase Magnoliopsida

Subclase Rosidae

Orden Sapindales

Familia Burseraceae

Género *Bursera*

Epíteto específico *B. morelensis*

Determinador Rzedowski, J.

Fecha determinación 1978

Bursera morelensis Ramírez

Es un árbol dioico, hasta de 10 m de alto (**Figura 25**), con abundante resina aceitosa con olor a aguarrás en la corteza y en las partes verdes, glabro, aunque algunas porciones muy tiernas cubiertas con papilas blanquecinas diminutas; tronco hasta de 40 cm de diámetro, su corteza externa rojiza (**Figura 26**), exfoliante en láminas delgadas; hojas de cinco a 11 cm de largo y 1.5 a 3. de ancho, peciolo acanalado, de uno a dos cm de largo, foliolos 33 a 45, raquis con alas inconspicuas, los foliolos sésiles o subsésiles, linear-oblongos a linear-lanceolados, de siete a 17 mm de largo y 1.6 a 2.5 mm de ancho, disminuyendo de tamaño hacia los extremos de la hoja, ápice agudo, margen entero, la nervadura central conspicua, las laterales poco marcadas, peciolo acanalado,

de uno a dos cm de largo; catafilos inconspicuos, pronto caedizos; las flores masculinas en inflorescencias racimosas o paniculadas hasta de cinco cm de largo, provistas de bracteolas filiformes a subuladas, caedizas, flores en su gran mayoría pentámeras, a veces algunas 3 o 4 meras, lóbulos del cáliz angostamente triangulares, de 0.7 a 1.3 mm de largo, agudos en el ápice, pétalos amarillentos a verdosos o blanquecinos, oblongos a lanceolados, de tres a seis mm de largo, cuculados, estambres todos aproximadamente al mismo nivel, filamentos de ± 1 mm de largo, anteras oblongas, de 1.5 a 2 mm de largo; las flores femeninas por lo común solitarias, a veces por pares o en una panícula corta, por lo general trímeras, a veces algunas 4 o 5-meras, similares en forma y tamaño a las masculinas, anteras de los estaminodios de ± 1 mm de largo, ovario trilocular; pedúnculos en fruto notablemente engrosados y encorvados, “drupa” trivalvada, oblicuamente ovoide, de cinco a 10 mm de largo y cuatro a seis mm de ancho, más o menos pronunciadamente apiculada, el hueso recubierto totalmente por un pseudoarilo amarillo.

Este árbol es un componente ocasional del bosque tropical caducifolio, pero en la región de la flora más frecuentemente forma bosquetes o se presenta en forma aislada en medio del matorral xerófilo, sobre todo en laderas de pendiente pronunciada de cañadas profundas, preferentemente de exposición sur. De una altitud 600-1500 msnm. Florece de abril a junio. Permanece con follaje de mayo a noviembre (diciembre). La especie es muy común en la parte oriental de la depresión del Balsas, extendiéndose hacia los valles de los ríos Tehuantepec y Papaloapan; también reaparece en forma dispersa en los cañones de muchos de los afluentes del río Pánuco. San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, México, Morelos, Puebla, Guerrero, Oaxaca. Nombres comunes: cuajote, palo mulato, copalillo y papelillo



Figura 25: Árbol de *B. morelensis* tomada en el poblado de San Rafael Coxcatlán, Puebla.



Figura 26: Corteza de *B. morelensis*.

Apéndice 2

Zona de colecta

La especie *B. morelensis* se colectó en el poblado de San Rafael, municipio de Coxcatlán, que se localiza al sureste de Tehuacán, en el valle de Tehuacán-Cuicatlán, entre 18°12' y 18°14' de latitud norte, así como 97°07' y 97°09' de longitud oeste (Figura 27), con un rango de altitud de 957 a 1400 msnm.

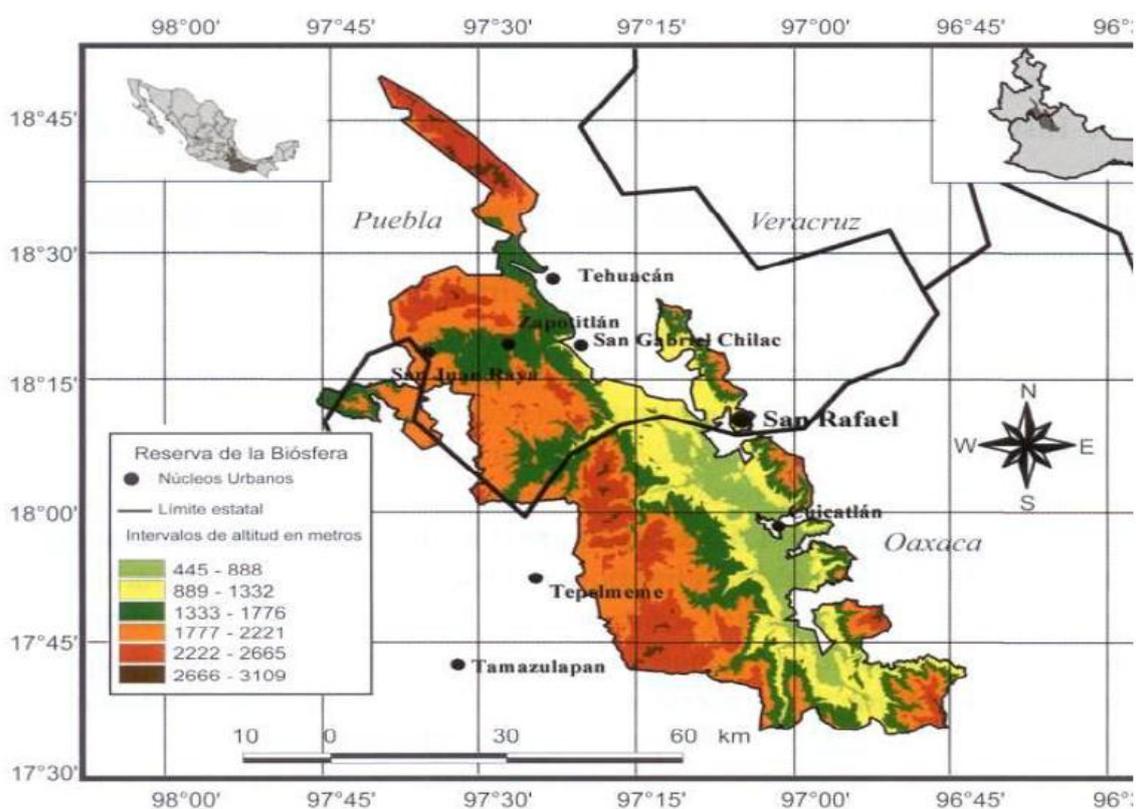


Figura 27: Ubicación geográfica del poblado de San Rafael Coxcatlán, Puebla.

Clima

El clima es de tipo Bs (h') W'' (w) de acuerdo con la clasificación de Koeppen, modificado por García [64], el cual corresponde a un tipo seco o árido con lluvias en verano y temperatura media anual de 22°C, que varía entre 25°C en abril y mayo, y 18°C en enero [73]. Se 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 [74]. En 1998 los 763.7 mm de precipitación duplicaron el promedio anual, concentrándose en los meses de junio a noviembre.

Hidrografía

El sureste de Puebla se encuentra irrigado por el Río Salado. La parte sur del Valle de Tehuacán-Cuicatlán es drenado por el Río Grande o Tomellin, que fluye al norte desde Oaxaca; uniéndose cerca de Quitepec los dos forman el Río de Santo Domingo, el cual corta la Sierra Madre de Oaxaca en dirección este y eventualmente se vuelve el Río Papaloapan. El Río Tehuacán encuentra su camino al oeste del Cerro Colorado, para entrar en el Valle de México cerca de San Diego, Chalma. Este pequeño río el cual se convierte en el Río Salado, se une por un número de cortas ramificaciones hasta alcanzar la Sierra Madre de Oaxaca en el noreste [54].

Edafología

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

Vegetación

La vegetación predominante es un bosque tropical caducifolio, donde *Escontria chiotilla* (F.A.C. Weber) Rose y *Pachycerus weberi* (J. Couleter) Backeberg son particularmente abundantes [66].

Fernández [71], reconoció por nivel topográfico los siguientes tipos de vegetación en San Rafael: Cordonal de *P. weberi*, que se caracteriza por el predominio de cactáceas columnares (cardones).

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

Cuajiotal con especies dominantes como *Bursera morelensis* Ramírez, *Mimosa polyantha* (Brandege), *Fouqueiria formosa* (Kunth), así como arbustos y hierbas como

Sanvitalia fructicosa (Helms), localizada aproximadamente a 1.5-3.5 m por encima del nivel basal.

Fouquieria con especies dominantes como *F. formosa*, *Bursera aptera* (Ramírez), *M. polyantha*, *Ceiba parvifolia* (Rose), *Manihotoides pasiflora* (Brandege), *Senna wislizeni* (DC), *M. Luisiana* (Brandege) y *S. fructicosa*.

En un estudio etnobotánico realizado en San Rafael [51], se determinó un total de 374 especies pertenecientes a 249 géneros y 87 familias botánicas, de las cuales 368 especies fueron registradas con uno o más usos (18% son usadas como plantas medicinales). Las familias con un mayor número de especies fueron Ateraceae, Cactaceae, Solanaceae, Araceae y Euphorbiaceae, que corresponden a las familias más representativas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

Población

La comunidad de San Rafael, es relativamente joven. Se fundó a principios del siglo XX y cuenta con 298 habitantes (151 mujeres y 147 hombres) [52]. 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 [51].

Apéndice 3

Técnica histológica

Las muestras fueron fijadas en fijador de zinc, los tres pasos del procesamiento de tejidos-deshidratación, aclaramiento e infiltración son pasos secuenciales designados para remover toda el agua que se pueda extraer de los tejidos y reemplazarla con un medio que se solidifique para así permitir el corte de estos tejidos.

Para el paso de la deshidratación se prefieren los alcoholes isopropílico o etílico. El uso de alcoholes graduados que vayan de la concentración más baja hasta la más alta es de rutina.

El butanol, uno de los muchos agentes aclarantes, es generalmente para la inclusión rutinaria en parafina por su compatibilidad con muchos tipos y tamaños de especímenes.

a) Deshidratación

No	Acción	Porcentaje (%)	Tiempo
1	Sumergir en alcohol etílico	70	2 h
2	Sumergir en alcohol etílico	80	2 h
3	Sumergir en alcohol etílico	90	2 h
4	Sumergir en alcohol etílico	100	1 h
5	Sumergir en alcohol etílico	100	1 h

Nota: En alcohol absoluto no dejar más de 1 hora en cada uno o se endurecerá el tejido.

b) Impregnación en el solvente (a este paso también se le denomina aclaración o aclaramiento).

No	Acción	Tiempo
6	Sumergir en butanol al 100%	1 h
7	Sumergir en butanol al 100%	1 h

Nota: No sobrepasar el tiempo ya que endurecerá el tejido.

c) Infiltración

No	Acción	Tiempo
8	Meter las muestras en parafina I	24 h
9	Meter las muestras en parafina II	24 h

Nota: Se quedaran en parafina II hasta que se incluyan

d) Inclusión de Tejidos

Inclusión es el proceso de rodear un tejido con una sustancia firme tal como parafina para poder obtener secciones bien delgadas. La parafina es el medio de inclusión más usado. La parafina es una mezcla de hidrocarburos sólidos derivados del petróleo. La parafina es blanca o incolora, más o menos translúcida. El molde elegido se llena con parafina caliente pura, con una pinza calentada en un mechero para prevenir que la parafina se adhiera a las pinzas, se toma el tejido y se orienta una de sus superficies (aquella que se pondrá en contacto con la navaja) se sumerge al interior del molde, suavemente se oprimen las superficies del tejido contra la capa sólida que lo va a mantener en la posición deseada ya que la parafina ha empezado a solidificarse. La parafina deberá solidificarse en aproximadamente 15 minutos el molde es entonces separado de la cajilla de inclusión (**Figura 28**).

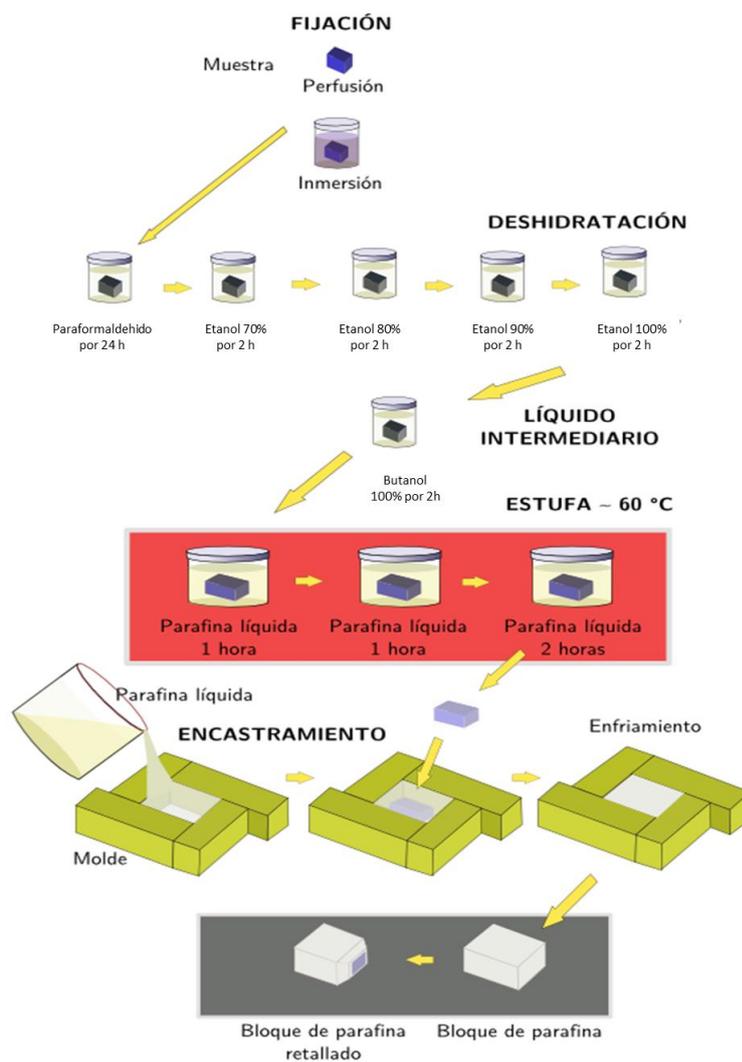


Figura 28: Proceso Histológico hasta la inclusión del tejido.

f) Microtomía (obtención de los cortes)

El bloque se coloca en el micrótom, este debe ser donde se observe toda la superficie del tejido y esté libre de desgarramientos, líneas, dobleces o distorsión celular. Una vez que se sujeta firmemente el bloque deseado en el micrótom, se comienza a rebajar hasta alcanzar el tejido deseado. A partir de ese momento los cortes que se realizarán serán de un grosor de 5 micras, dichos cortes se extenderán sobre portaobjetos con la ayuda de Ruyter y una parrilla (**Figura 29**).

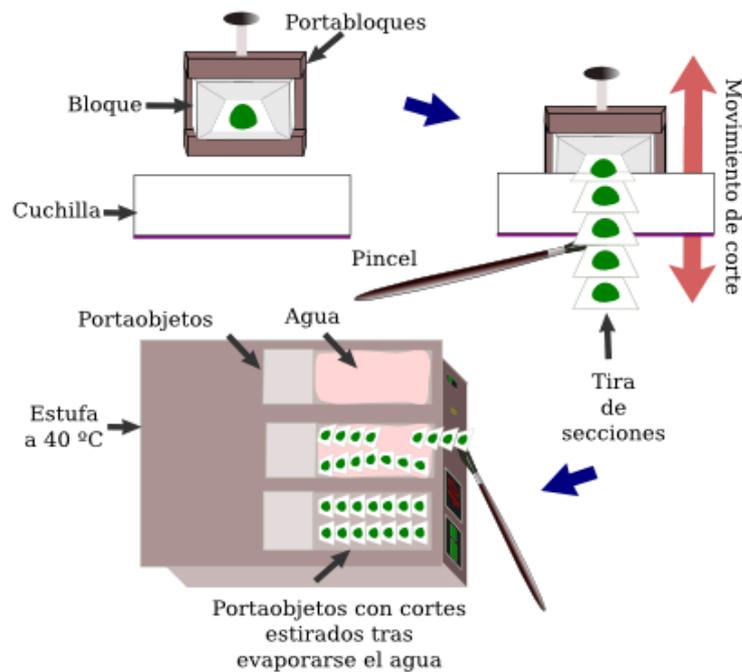


Figura 29: Proceso de corte.

e) Tinción Hematoxilina-Eosina (H & E)

La hematoxilina es un colorante natural, en combinación con sales de aluminio, hierro cromo, cobre o tungsteno es una tinción nuclear excelente. El agente colorante activo, la hematina, se forma por la oxidación de la hematoxilina. Este proceso conocido como “maduración”, ocurre espontáneamente si la solución de hematoxilina se deja en reposo por varios días. Sin embargo las soluciones de hematoxilina pueden usarse inmediatamente si se usa un agente oxidante como el yodato de sodio o el óxido de mercurio.

La coloración de Hematoxilina-Eosina consiste en la tinción de:

a) Los núcleos mediante una hematoxilina, los núcleos se colorean de azul, azul morado, violeta, pardo oscuro o negro, dependiendo de los agentes oxidantes y mordientes que se utilizaron.

b) El citoplasma y material extracelular utilizando la eosina que les confiere diversos grados de color rosado.

El procedimiento de coloración (tren de tinción) de H & E es el siguiente:

1. Desparafinar las muestras

No	Acción	Tiempo
1	Desparafinar las muestras en la parrilla	12 h
2	Sumergir las muestras en Xilol I	15 min
3	Sumergir las muestras en Xilol II	15 s

2. Hidratar los cortes en baños decrecientes de alcohol

No	Acción	Porcentaje (%)	Tiempo
4	Lavar en alcohol etílico	100	15 s
5	Lavar en alcohol etílico	95	15 s
6	Lavar en alcohol etílico	80	15 s
7	Lavar en alcohol etílico	70	15 s
8	Lavar en agua corriente	---	15 s

3. Colorear con la solución de hematoxilina

En este paso es conveniente respetar el tiempo de coloración que recomienda cada tipo de solución de hematoxilina. Dependiendo de la fórmula de preparación el tiempo puede variar de 3-20 minutos.

La hematoxilina de uso más frecuente es la “Hematoxilina aluminica de Harris” con un tiempo de 3-5 minutos.

4. Lavado

No	Acción	Tiempo
9	Lavar las muestras en agua corriente	15 s

5. Diferenciar

Observar las muestras y en caso de observar un exceso de colorante, lavar nuevamente.

6. Virar al color azul

No	Acción	Tiempo
10	Lavar las muestras en sustancias alcalinas como: <ul style="list-style-type: none">• Agua amoniacal• Carbonato de litio al 1%• Solución de bicarbonato de sodio al 2%	15 s
11	Lavar las muestras en agua corriente	15 s

Nota: En el caso de la solución salina, utilizar la que se tiene en el laboratorio

7. Colorear con Eosina

Colorear con una solución alcohólica o acuosa de eosina por 7min.

*El tiempo que la laminilla pasará en esta solución dependerá de la antigüedad de la solución, entre más tiempo tenga, más tiempo se tiene que dejar.

8. Deshidratar en baños crecientes de alcohol etílico

No	Acción	Porcentaje (%)	Tiempo
12	Sumergir en alcohol etílico	70	15 s
13	Sumergir en alcohol etílico	80	15 s
14	Sumergir en alcohol etílico	90	15 s
15	Sumergir en alcohol etílico	100	15 s

9. Diafanizar o aclarar empleando Xilol

No	Acción	Tiempo
16	Lavar las muestras en Xilol I	15 s
17	Sumergir en Xilol II hasta que se monte la muestra.	----

g) Montaje

Concluido el proceso de la tinción de los cortes, éstos se deben colocar en condiciones de protección y de poderlos utilizar infinidad de veces sin que se deterioren. Para alcanzar tales propósitos se recurre al último procedimiento que es el montaje.

Este procedimiento consiste en colocar encima del corte teñido y diafanizado una gota de una sustancia adherente, diluida, generalmente en Xilol (resina natural como el bálsamo de Canadá o resinas sintéticas, cuyos índices de refracción son similares a los del vidrio) y encima de ellos, una laminilla cubreobjetos, cuidando que no queden burbujas de aire entre la resina (**Figura 30**).

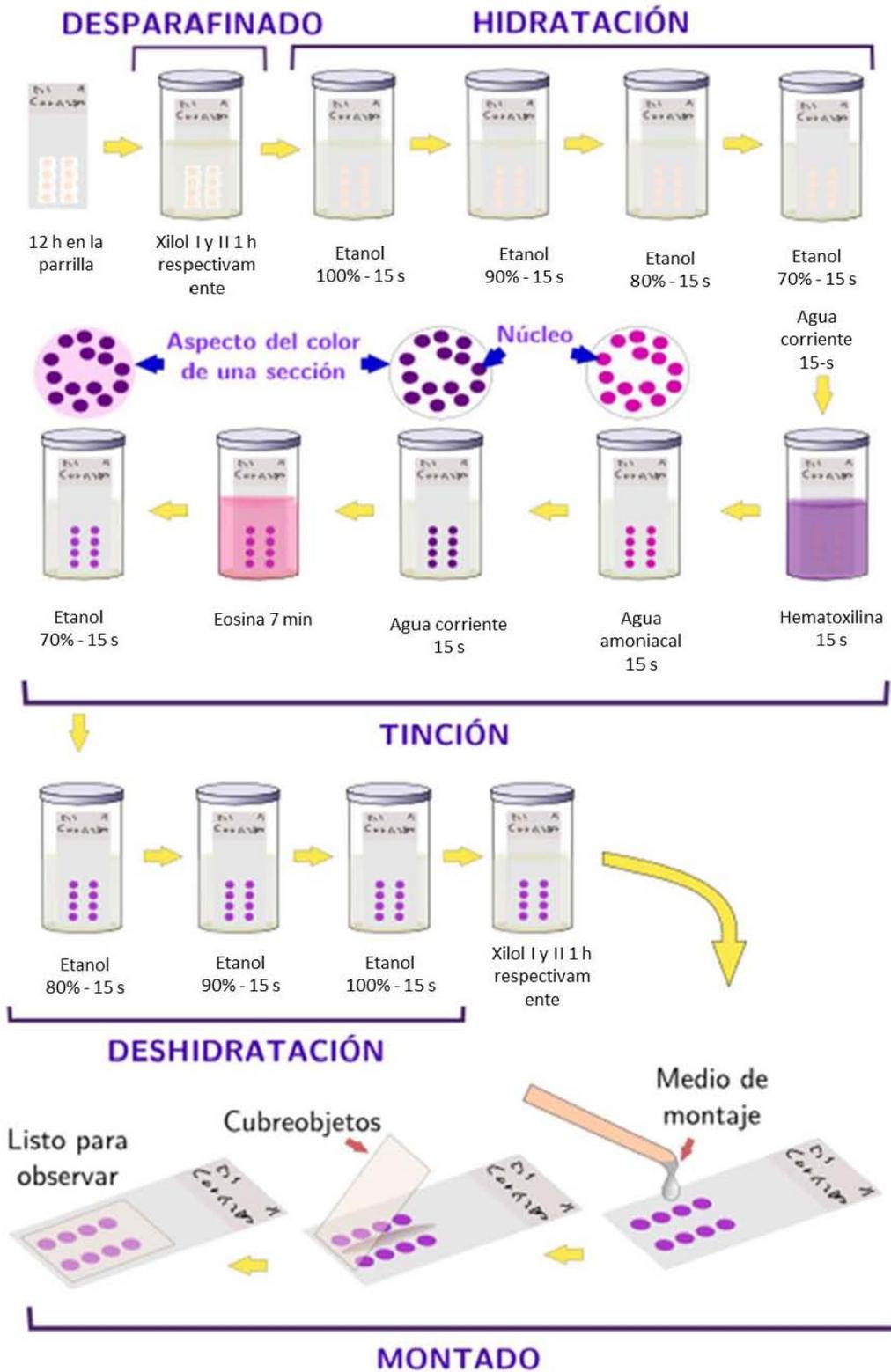


Figura 30: Descripción del proceso para la tinción con Hematoxilina-Eosina.