



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LA
CORTEZA DE *Bursera arida* SOBRE *Leishmania mexicana***

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

P R E S E N T A:

AVILA GONZALEZ JESSICA VANESSA

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARCO AURELIO RODRÍGUEZ MONROY

Los reyes Iztalaca, Tlalnepantla, Edo. de México

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 Estudios Superiores Iztacala.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy por su apoyo, consejos, paciencia, tiempo invertido en este trabajo, por ser una gran persona.

Al M. en C. Óscar de Jesús Nieto Yáñez por su apoyo, experiencias y consejos compartidos durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Ma. Margarita Canales Martínez por haber aportado el material vegetal, pero aún más importante por sus consejos, opiniones y apoyo durante la realización de este proyecto.

A la Dra. Miriam Rodríguez Sosa por aportar la cepa de parásitos durante el trabajo de investigación.

A los revisores de esta tesis por su tiempo invertido en la revisión de este trabajo.

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

Dedicatorias

A mis padres, por su apoyo incondicional, por su paciencia, por siempre querer lo mejor para mí, por nunca dejarme sola, nunca voy a poder pagarles todo lo que han hecho por mí, y aunque no siempre demuestro lo que siento saben que los quiero muchísimo.

A mi hermano porque aunque a veces no nos llevamos muy bien siempre has estado cerca apoyándome en los momentos difíciles.

A mi tía y primas, por estar cerca apoyándome, por sus consejos y sobre todo por creer en mí.

A mis amigas Judith, Karen, Lesly, Roxana, por los buenos momentos que hemos pasado juntas, por siempre apoyarme, escucharme y darme consejos, por tantas risas y experiencias. Gracias amigas.

A mis amigos y compañeros de equipo Mario, Óscar, Izumy, Michael, el tiempo que convivimos fue muy importante en mi vida, de verdad gracias por su paciencia y apoyo.

A mis amigos de carrera Melanie, Elena, Dulce, Sandra, Óscar, Yunuem, Caro, Mariela, Mirna, Jossimar.

A mis amigos y compañeros del laboratorio Óscar, Nelly, Gustavo, Alonso, Acoyani, Miguel, Rubén, Daniela, Pilar, por su apoyo, risas y experiencias. Gracias.

Al Dr. Marco por su apoyo, paciencia, confianza, por sus consejos, pláticas y congresos. De verdad mil gracias por todo.

A la Dra. Margarita por su apoyo, confianza, paciencia, por sus comentarios y críticas para la realización de esta tesis. Gracias por todo.

Índice general

ÍNDICE DE FIGURAS	IV
RESUMEN	- 1 -
INTRODUCCIÓN	- 3 -
Leishmaniosis	- 3 -
<i>Distribución</i>	- 3 -
<i>Ciclo de vida</i>	- 3 -
<i>Cuadro clínico</i>	- 5 -
<i>Tratamiento</i>	- 8 -
Medicina tradicional.....	- 13 -
Metabolitos secundarios.....	- 15 -
<i>Terpenoides o isoprenoides</i>	- 15 -
<i>Alcaloides</i>	- 15 -
<i>Fenoles simples C₆</i>	- 16 -
<i>Ácidos fenólicos C₆-C₁</i>	- 17 -
<i>Cumarinas C₆-C₁</i>	- 17 -
<i>Quinonas</i>	- 17 -
<i>Taninos</i>	- 18 -
<i>Lignanós</i>	- 18 -
2.1.7.9. <i>Flavonoides</i>	- 19 -
Género <i>Bursera</i>	- 19 -
JUSTIFICACIÓN	- 21 -
OBJETIVOS	- 22 -
MATERIALES Y MÉTODOS	- 23 -
Obtención del extracto.	- 23 -
Mantenimiento de la cepa <i>Leishmania mexicana</i>	- 23 -
Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antileishmánica.	- 23 -
Infección de ratones con <i>L. mexicana</i>	- 24 -
Carga parasitaria por dilución limitante.....	- 24 -
Determinación del efecto del extracto de <i>B. arida</i> en la producción de citocinas (TNF- α e IL-4) mediante la técnica de ELISA.	- 24 -
Cortes histológicos	- 25 -
Determinación de la composición química del extracto por medio de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.....	- 26 -
RESULTADOS	-27-
Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antileishmánica de la corteza de <i>B. arida</i> por la técnica de viabilidad celular por MTT.	- 27 -
Evaluación del efecto <i>in vivo</i> del extracto metanólico de la corteza de <i>B. arida</i> sobre el tamaño de la lesión producida por <i>L. mexicana</i>	- 28 -
Determinación de la carga parasitaria en las lesiones producidas por <i>L. mexicana</i>	- 28 -
Determinación del efecto del extracto de <i>B. arida</i> en la producción de citocinas (TNF- α e IL-4) mediante la técnica de ELISA.	- 29 -
Obtención de cortes histológicos para demostrar <i>in situ</i> el efecto del extracto sobre la lesión. ...	- 30 -
Determinación de la composición química del extracto de <i>B. arida</i> por medio de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.	- 31 -

DISCUSIÓN.....	- 33 -
CONCLUSIONES.....	- 37 -
LITERATURA CITADA.....	- 38 -
APÉNDICE.....	- 44 -
Zona de colecta.....	- 44 -
Clima.....	- 44 -
Hidrografía.....	- 45 -
Edafología.....	- 45 -
Vegetación.....	- 45 -
Población.....	- 46 -

Índice de figuras

Fig. 1. Vector transmisor de <i>Leishmania</i> (Géneros <i>Phlebotomus</i> y <i>Lutzomyia</i>).....	- 4 -
Fig. 2. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	- 5 -
Fig. 3. Leishmaniosis mucosa o mucocutánea.....	- 6 -
Fig. 4. Leishmaniosis visceral.....	- 7 -
Fig. 5. Leishmaniosis cutánea.....	- 8 -
Fig. 6. Estructura química de estibogluconato de sodio.....	- 9 -
Fig. 7. Estructura química de Pentamidina.....	- 10 -
Fig. 8. Estructura química de Anfotericina B.....	- 12 -
Fig. 9. Estructura química de Isopreno.....	- 15 -
Fig. 10. Ejemplos de alcaloides.....	- 16 -
Fig. 11. Ejemplos de estructura química de fenoles.....	- 16 -
Fig. 12. Ejemplos de ácidos fenólicos.....	- 17 -
Fig. 13. Ejemplo de estructura química de Cumarina.....	- 17 -
Fig. 14. Ejemplos de Quinonas.....	- 18 -
Fig. 15. Ejemplo de estructura química de Taninos.....	- 18 -
Fig. 16. Ejemplos de Lignanós.....	- 19 -
Fig. 17. Estructura química de Flavonoides.....	- 19 -
Fig. 18. Árbol de <i>Bursera arida</i>	- 21 -
Fig. 19. A) Curva del efecto antileishmánico. Evaluación de la CL ₅₀ contra promastigotes de <i>Leishmania mexicana</i> . B) Efecto in vitro del medicamento Estibogluconato de sodio [100mg/ml]. C) Efecto in vitro del medicamento Anfotericina B [250µg/ml].....	- 27 -
Fig. 20. Monitoreo de la lesión hasta la semana ocho durante la infección.....	- 28 -
Fig. 21. Carga parasitaria por dilución limitante.....	- 29 -
Fig. 22. Concentración de citocinas (TNF-α e IL-4).....	- 30 -
Fig. 23. Fotografía de histiocito a un aumento de 100X.....	- 30 -
Fig. 24. Cortes histológicos de las lesiones provocadas por <i>L. mexicana</i>	- 31 -
Fig. 25. Ubicación geográfica del poblado de San Rafael Coxcatlan, Puebla.....	- 44 -

Resumen

La leishmaniosis es una enfermedad producida por parásitos intracelulares del género *Leishmania*, esta enfermedad es transmitida por la picadura de moscas chupadoras de sangre (géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*) contaminadas a partir de humanos o animales infectados.

La leishmaniosis tiene una amplia distribución geográfica, es endémica en 88 países del mundo y abarca zonas tropicales y subtropicales. En la República Mexicana se han reportado casos de leishmaniosis en 19 estados.

El tratamiento de la Leishmaniosis no es fácil y está limitado a unos cuantos medicamentos que no siempre son eficaces y se asocian a importantes efectos adversos.

La necesidad de encontrar medicamentos que superen las desventajas que ofrecen los medicamentos que están disponibles en el mercado sustenta la búsqueda y el desarrollo de nuevos compuestos para el tratamiento de la enfermedad. Actualmente no existe ningún tratamiento tópico para tratar la leishmaniosis cutánea.

Debido a esto resulta necesario buscar nuevas alternativas terapéuticas para combatir esta enfermedad, una de estas alternativas es el uso de productos naturales derivados de plantas medicinales como *Bursera arida*, la cual ha sido reportada con uso para el tratamiento de problemas intestinales, respiratorios y enfermedades en la piel. En esta tesis se evaluó la actividad antileishmánica de la corteza de *B. arida* por la técnica de viabilidad celular por MTT, se evaluó el efecto *in vivo* del extracto sobre el tamaño de la lesión producida por *Leishmania mexicana*. Posteriormente se determinó el efecto del extracto en la producción de citocinas (TNF- α e IL-4) mediante la técnica de ELISA. Se determinó la carga parasitaria en las lesiones mediante la técnica de dilución limitante. A continuación se realizaron cortes histológicos para demostrar *in situ* el efecto del extracto sobre la lesión. Finalmente se determinó la composición química del extracto de *B. arida* por medio de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

El extracto de *B. arida* presentó actividad antileishmánica en la fase de promastigote, mostrando una actividad dosis dependiente con una CL₅₀ de 0.012 mg/ml. Se identificaron ocho metabolitos secundarios con diferentes actividades biológicas entre las que se encuentran antiinflamatorios, actividad contra protozoarios, anticancerígenos. Se presentó una disminución *in vivo* sobre el tamaño de la lesión y en la carga parasitaria. El extracto metanólico de *B. arida* presentó una disminución en la producción de citocinas proinflamatorias y un aumento en las citocinas antiinflamatorias (TNF- α e IL-4), y

finalmente el extracto metanólico de la corteza de *B. arida* presentó una disminución *in situ* sobre la cantidad de histiocitos e infiltrado inflamatorio en la lesión producida por *L. mexicana*.

Introducción

Leishmaniosis

La leishmaniosis es una enfermedad producida por parásitos intracelulares del orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae* y género *Leishmania*. La enfermedad es transmitida por la picadura de moscas chupadoras de sangre (géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*) contaminadas a partir de humanos (leishmaniosis antroponótica) o animales infectados (leishmaniosis zoonótica) (1).

Distribución

La leishmaniosis tiene una amplia distribución geográfica, es endémica en 88 países del mundo y abarca zonas tropicales y subtropicales. En América ha sido descrita en 24 países (2).

La incidencia global de leishmaniosis se estima a dos millones de casos por año y está aumentando rápidamente, lo que hace que sea una prioridad para el programa de enfermedades tropicales de la Organización Mundial de la Salud (OMS). De los dos millones de nuevos casos de leishmaniosis que se producen cada año, aproximadamente tres cuartas partes son casos de leishmaniosis cutánea (3).

En la República Mexicana se han reportado casos de leishmaniosis en 19 estados (4).

La leishmaniosis actualmente se ha identificado en el suroeste de México, Veracruz, San Luis Potosí, Tamaulipas, Nuevo León, Coahuila, Michoacán y Nayarit. La manifestación clínica de “La úlcera del chiclero” se caracteriza por lesiones en el cartílago auricular que puede llegar a la necrosis total y se presenta inflamación en los ganglios linfáticos cercanos al sitio de infección (4).

Ciclo de vida

El ciclo biológico del parásito *Leishmania* es asexual y heteroxeno, comprende el paso alternativo entre la forma de amastigote, que se localiza en las células del sistema fagocítico mononuclear del mamífero hospedador y la forma de promastigote, que parasita al vector invertebrado (Fig. 2)

En los tejidos del huésped (hombre, cánidos, roedores), los parásitos se encuentran en forma de amastigote con una morfología ovalada o redondeada, es inmóvil y mide entre dos a tres micras de diámetro. El núcleo es voluminoso, esférico y generalmente excéntrico. Próximo al núcleo se encuentra el cinetoplasto, una estructura mitocondrial especializada que contiene ADN extracelular. El cinetoplasto tiene forma bacilar y está

asociado a un flagelo rudimentario que no se extiende fuera del parásito, por lo que es poco visible y se le conoce como rizoplasto. Los amastigotes son fagocitados por los macrófagos de piel y tejido celular subcutáneo, donde se reproducen intracelularmente por fisión binaria hasta que provocan el estallido celular y pasan a parasitar nuevas células. Al picar la mosca chupadora de sangre (*Phlebotomus* y *Lutzomyia*) (Fig. 1) en la piel del vertebrado se forma una lesión con sangre y macrófagos de la dermis en donde están los parásitos, este material es succionado y llega a la luz del tubo digestivo de la mosca; allí los parásitos se alargan, desarrollan rápidamente el flagelo y constituyen las formas móviles o promastigotes, de forma alargada, que presentan una longitud de aproximadamente 20 micras. Tienen un núcleo central oval, un cinetoplasto terminal o subterminal, y en la parte anterior del parásito se origina un flagelo casi de igual longitud que el cuerpo. Cuando los estadios intermedios llegan a promastigotes metacíclicos migran hacia la probóscide del vector y son inoculados cuando éstos intentan tomar sus alimentos. Existe predilección de ciertas especies de *Leishmania* para reproducirse en diferentes partes del tubo digestivo del vector, lo cual ha dado lugar a una clasificación en tres grupos: Hypopyloria en la parte posterior del tubo digestivo, Suprapyloria en la anterior y Perípyloria en ambas partes. La reproducción también se hace por división binaria. Los promastigotes infectantes migran a la parte anterior del insecto desde el intestino a la faringe y aparato bucal (picador-perforador) hasta que son inoculados, al comienzo de la picadura a un nuevo huésped, éstos son captados por los macrófagos de piel y tejido celular subcutáneo y pueden alcanzar las mucosas como ocurre con *L. braziliensis*, o macrófagos de bazo, hígado, médula ósea y ganglios linfáticos como en el caso de *L. donovani* o *L. infantum*.

El tiempo que toma el vector para ser infectante es de aproximadamente 10 días.

En la naturaleza, la infección de los vectores es baja, por lo tanto se requiere que piquen repetidas veces (5).



Fig. 1. Vector transmisor de *Leishmania* (Géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*).

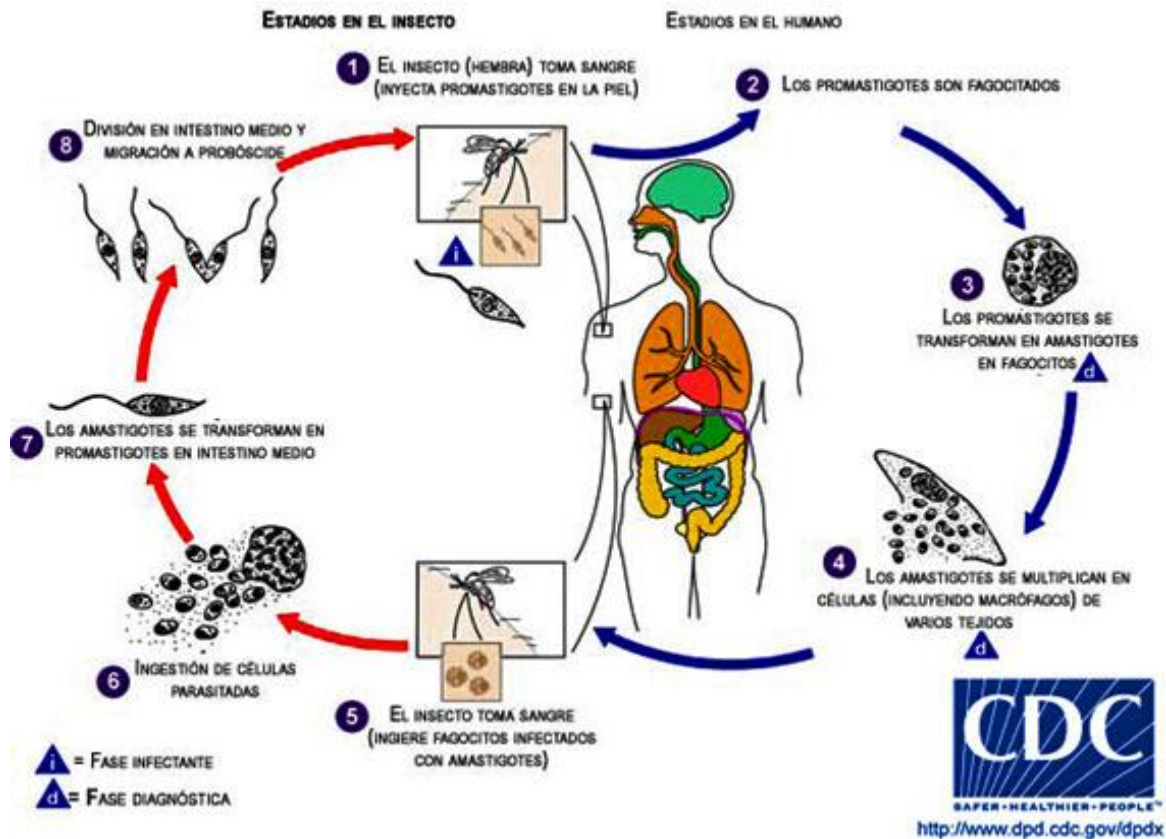


Fig. 2. Ciclo de vida de *Leishmania*.

Cuadro clínico

Las leishmaniosis son zoonosis que pueden afectar la piel, las mucosas o las vísceras resultado del parasitismo del protozoo flagelado del género *Leishmania* en los macrófagos, introducido al organismo por la picadura de un insecto flebótomo. Las presentaciones clínicas de la enfermedad varían de acuerdo con la especie de *Leishmania*, la respuesta inmune del hospedero y el estado evolutivo de la enfermedad. La especie infectante está determinada por el vector que la transmite; y a su vez la presencia del vector está determinada por las condiciones ecológicas de cada región. Las formas de presentación clínica de leishmaniasis son: la forma cutánea, mucosa o mucocutánea y visceral (6).

Leishmaniosis mucocutánea

La leishmaniosis mucosa o mucocutánea es una forma de leishmaniosis que ocurre como resultado de la diseminación linfohematógena del parásito. La forma deformante de la enfermedad puede causar mortalidad y se puede presentar de manera simultánea con las lesiones cutáneas o en el periodo de los dos a tres años siguientes de las lesiones en piel o por contigüidad. Afecta las mucosas de las vías áreas superiores (nariz, faringe, boca, laringe, tráquea) (Fig.3). De 3 a 5% de los pacientes con Leishmaniosis cutánea pueden desarrollar lesiones mucosas y está relacionada con especies mucotrópicas de *L. braziliensis*. El 50% de los casos se manifiesta durante los dos primeros años posteriores a la aparición de la úlcera cutánea inicial (6).

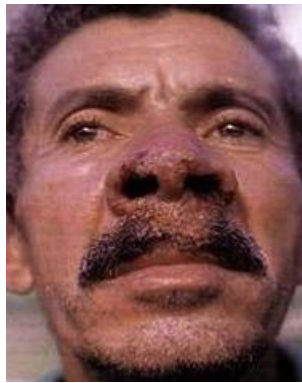


Fig. 3. Leishmaniosis mucosa o mucocutánea.

Leishmaniosis visceral

La leishmaniosis visceral es una enfermedad de progresión lenta del sistema retículoendotelial. Su importancia radica en que una vez iniciado su cuadro clínico, en ausencia de tratamiento, puede ser mortal (6).

Se caracteriza por fiebre, esplenomegalia y/o hepatomegalia, poliadenopatías, anemia, leucopenia, trombocitopenia y debilidad progresiva (Fig.4). La fiebre tiene comienzo gradual o repentino, es persistente e irregular. Se puede presentar diarrea e infecciones respiratorias. En estudios de foco se ha determinado la presencia de cuadros subclínicos dados por leve pero persistente hepatomegalia que pueden evolucionar hacia la resolución espontánea (6).

La puerta de entrada del parásito al hombre o a los animales es la piel, a través de la picadura del vector. Por mecanismos que son desconocidos migran a hígado, médula

ósea y bazo, alterando la arquitectura esplénica y produciendo reacciones granulomatosas auto limitadas a nivel hepático (6).

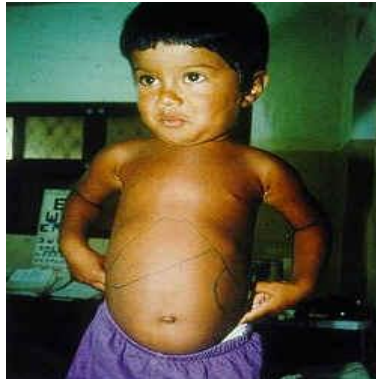


Fig. 4. Leishmaniosis visceral.

Leishmaniosis cutánea

La leishmaniosis cutánea (LC), existe dos formas clínicas principales: LC localizada (LCL) y LC difusa (LCD) (7).

Las formas clínicas varían desde lesiones cerradas como pápulas, nódulos y placas que pueden ser de aspecto verrugoso hasta las formas úlceradas (Fig.5). La úlcera es redondeada, de bordes elevados, eritematosos, acordonados, con centro granulomatoso limpio y base infiltrada. Regularmente son indoloras y de crecimiento lento. Cuando hay sobreinfección bacteriana se tornan dolorosas, de fondo sucio, secreción purulenta, recubiertas por costra de aspecto mielisérico, eritema periférico y signos inflamatorios locales. Se pueden presentar como lesiones únicas o múltiples y ocasionalmente como lesiones erisipeloides. La enfermedad puede tornarse crónica luego de 12 semanas sin cierre de la úlcera o con la transformación de la misma en una placa verrugosa de bordes elevados recubiertos con escamas y/o costras que coinciden con los borde de la cicatriz de la lesión inicial. Entre los diagnósticos diferenciales para leishmaniosis cutánea se deben considerar:

Lesiones ulcerosas: úlceras traumáticas, úlceras vasculares y linfáticas, piógenas, esporotricosis fija y linfangítica, paracoccidioidomicosis, tuberculosis cutánea (TBC), úlceras por micobacterias atípicas, pioderma gangrenoso y tumores malignos ulcerados, e infecciones por cocos gram positivos. Lesiones papulosas, nodulares o en placas: picaduras de insecto con formación de granuloma, lepra, sarcoidosis, psoriasis. Lesiones verrugosas: cromomicosis, tuberculosis verrugosa, histoplasmosis, lobomicosis, carcinomas espinocelulares. Formas linfangíticas: esporotricosis, úlceras por micobacterias atípicas (6).



Fig. 5. Leishmaniosis cutánea.

Tratamiento

El tratamiento de la Leishmaniosis no es fácil y está limitado a unos cuantos medicamentos que no siempre son eficaces y se asocian a importantes efectos adversos. Se cree que en algunos casos que muestran curación clínica, el parásito no ha sido eliminado totalmente del cuerpo, esto probablemente se debe a las complejas interacciones que se dan entre el parásito y el sistema inmune del ser humano. El género *Leishmania* ha desarrollado numerosas estrategias para poder evadir la respuesta inmune, tales como la inhibición de la función de los macrófagos y la alteración de las vías de señalización intracelular (7).

El arsenal terapéutico disponible para el tratamiento de la Leishmaniosis, así como de otras enfermedades tropicales es bastante precario. En la actualidad existen dos series de medicamentos en uso: los antimoniales y los no-antimoniales. El tratamiento básico de la enfermedad consiste en la administración de estibogluconato sódico (Pentostam), antimoniato de Nmetil- glucamina (Glucantime), ambas drogas de primera generación y pentamidina o anfotericina B, ambas de segunda generación.

Antimoniales

A pesar de que estos fármacos son los de primera línea, presentan una eficacia limitada y algunas veces toxicidad y efectos adversos significantes. Dentro de los compuestos antimoniales destacan los complejos de antimonio trivalentes tales como el tartrato de antimonio y potasio (tartrato emético), antimoniato de bis-catecol-3,5-disulfonato sódico (Stibophen, Repodral, Fuadina) y tioglicolato de sodio y antimonio, los antimoniales pentavalentes como el antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime, antimoniato de meglumina), gluconato sódico de antimonio(V)m (Pentostan, Solustibosan,

estibogluconato sódico) (Fig.6.) y estibamina (nombre comercial de la urea estibamina). Sin embargo, debido a la cardiotoxicidad y a la intolerancia gastrointestinal de los antimoniales trivalentes, Sb(III), son los pentavalentes, Sb(V), los que presentan mayor uso terapéutico. Entre los medicamentos antimoniales más consumidos en el mundo, se destacan el Pentostan, Glucantime y el Solustibosan (7).

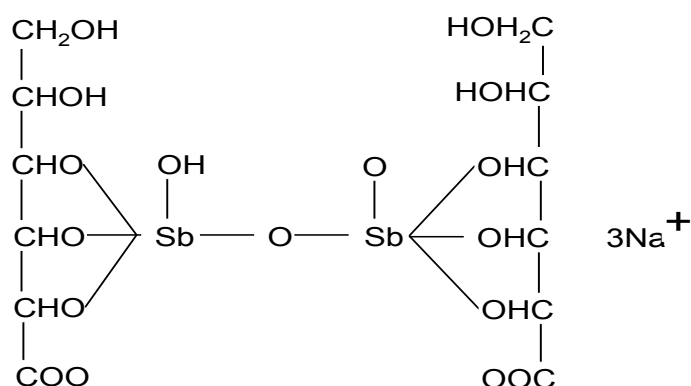


Fig. 6. Estructura química de estibogluconato de sodio.

En relación a la resistencia, se observa que una vez que esta es establecida para complejos trivalentes, se produce paralelamente una alta incidencia en la resistencia a complejos pentavalentes. Sin embargo se ha observado también un aumento de la susceptibilidad a drogas de segunda generación como la pentamidina y anfotericina B lo cual podría explicarse por la intervención de distintos sistemas de transporte que utilizan los compuestos antimoniales y fármacos orgánicos. Una alternativa a la reducción de la toxicidad es el uso de nuevos sistemas de liberación tales como liposomas, nanotecnología y polímeros (7).

Mecanismo de acción de antimoniales pentavalentes

El blanco de los agentes quimioterápicos en leishmaniasis es el amastigote intracelular que escapa de los mecanismos naturales de destrucción y que sobrevive y se multiplica dentro de la vacuola parasitófora del macrófago tisular cuyo pH ácido facilita la nutrición y la homeostasis del parásito (8).

Las diversas especies de *Leishmania* aparentemente ocupan macrófagos distintos y ejercen actividades de adaptación variadas, lo que podría explicar, al menos en parte, la diversidad en la respuesta a los medicamentos. Los mecanismos de acción de los antimoniales pentavalentes aún no están totalmente dilucidados pero sabemos que la

forma pentavalente del antimonio se transforma dentro del amastigote en antimonio trivalente que es más tóxico y mata al parásito por acción sobre la enzima reductasa que depende de tiol (TDR1) y por inhibición de la tripanotión reductasa, afectando de esta manera la vía del metabolismo tiol que participa en la síntesis de deoxirribonucleótidos, en la conjugación, secuestro y transporte de metales y medicamentos, en la depuración de radicales tóxicos del oxígeno. Al inhibirse las enzimas involucradas en el metabolismo tiol, el parásito queda expuesto intracelularmente a la acción de los metabolitos reactivos del oxígeno que lo matan (8).

En los parásitos resistentes a Sb V hay niveles aumentados de las enzimas del metabolismo tiol antes mencionadas, que depuran los radicales tóxicos del oxígeno eliminando este mecanismo de ataque al parásito y permitiendo la preservación y multiplicación de los amastigotes dentro de los macrófagos. Hay, además, una modificación en el transporte del medicamento que frena su ingreso y acelera la salida del parásito disminuyendo las concentraciones citoplasmáticas que podrían ser fatales para el microorganismo (8).

Pentamidina

La pentamidina es la droga de segunda generación más comúnmente recomendada a pesar de que también presente efectos adversos significantes y requiera la administración parenteral. En la forma catiónica puede presentarse como isotionato o clorhidrato. La pentamidina es una molécula de gran interés en el tratamiento de leishmaniosis visceral y mucocutánea insensible a antimoniales pentavalentes (Fig.7). La alta toxicidad de esta droga, con relatos de muerte repentina, es un factor limitante de su empleo terapéutico. Dentro de los principales efectos adversos o colaterales están la hipoglicemia, hipotensión, alteraciones cardiológicas y nefrotoxicidad (8).

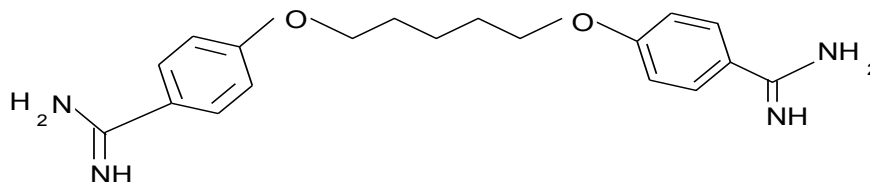


Fig. 7. Estructura química de Pentamidina.

Mecanismo de acción de la Pentamidina

Se ha reportado que el isetionato de pentamidina tiene efectos sobre el sistema inmune ya que actúa como inmunomodulador, específicamente altera la secreción de citocinas, elementos claves en la respuesta celular frente a microorganismos. Se ha observado que

el isetionato de pentamidina inhibe la producción de varias citocinas que participan en el proceso inflamatorio como la IL-1 β , TNF- α en macrófagos de rata y en seres humanos infectados con *Pneumocystis carinii* respectivamente. La IL-6 y citocinas quimiotácticas (MCP-1, GRO- α e IL-8) en experimentos con sangre total humana también se han visto moduladas por el isetionato de pentamidina. Además, se ha determinado que el isetionato de pentamidina exhibe toxicidad selectiva sobre esplenocitos, situación observada en cepas de ratón susceptibles a *Leishmania* (9).

La pentaminida es una diamidina aromática, que ha sido usada clínicamente para tratar enfermedades como la tripanosomiasis, leishmaniosis y neumonía causada por *P. carinii* por más de 70 años; este fármaco es considerado una alternativa en el tratamiento de la leishmaniosis para casos de resistencia (cada vez más frecuentes) a los antimoniales pentavalentes (SbV) y hasta el momento no se ha elucidado con claridad su mecanismo de acción (9).

Se postula que posiblemente el isetionato de pentamidina, ingresa a la célula parasítica por una vía mediada por transportadores que reconocen diamidinas con alta afinidad y, acumula rápidamente en la mitocondria, donde se une al kinetoplasto, lo cual puede generar la disminución o el colapso del potencial de la membrana mitocondrial (9).

Anfotericina B

La anfotericina B, es un antibiótico macrólido derivado de una cepa de *Streptomyces nodosus* (Fig.8.) pertenece al grupo de los fármacos leishmanicidas de segunda generación y es usado extensivamente en el caso de fallas en el tratamiento con compuestos antimoniales. A pesar de su elevada toxicidad y de requerir también administración parenteral, la anfotericina B ha sido propuesta como agente terapéutico de primera línea para la leishmaniasis visceral y para la infección sistémica por hongos (10).

Estudios clínicos de fase II con una forma liposomal de anfotericina B mostraron que es de hecho menos tóxica que la forma inyectable convencional, reduciendo considerablemente su nefrotoxicidad (10).

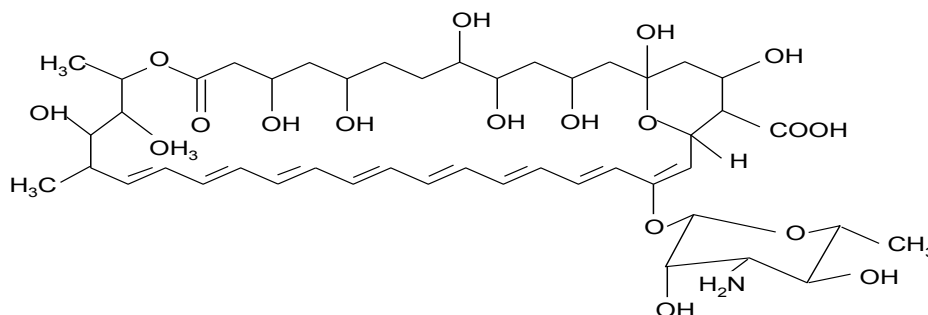


Fig. 8. Estructura química de Anfotericina B.

El mecanismo de acción, así como de toxicidad, envuelve la formación de poros artificiales a lo largo de la membrana celular del parásito y del huésped, alterando la permeabilidad selectiva a cationes y llevando a la muerte celular (10).

En el caso de *Leishmania*, la letalidad del antibiótico es agravada por lisis coloidal osmótica debido al influjo iónico exacerbado. Ya en el caso de los hongos, a pesar de que la pared celular reduce este influjo osmótico, la alteración del pH interno debido a la permeabilidad a H^+/OH^- produce también daños celulares. La anfotericina B también interfiere en la síntesis del ergosterol, un importante componente de la membrana (10).

Durante más de 50 años los derivados de antimonio pentavalente han sido los medicamentos de elección. En la actualidad, el pentostam (gluconato sódico de antimonio) y el glucantime (antimoniato de meglumina) son las formas de antimonio pentavalente existentes en el mercado. Éstas no son eficaces contra todas las especies, resultan en particular poco sensibles *L. aethiopica* y *L. major*. Su eficacia contra las especies normalmente susceptibles no es de cien por ciento y es cada vez mayor el número de cepas que desarrollan resistencia a los derivados de antimonio pentavalente. Su uso ha sido limitado por los efectos adversos, y es causa frecuente de interrupción del tratamiento. De la anfotericina B se han desarrollado formulaciones en lípidos (alphocil y ambisone) con menor toxicidad y adecuada eficacia, pero el precio no es accesible a la mayoría de la población afectada. La anfotericina B es un antifúngico de potente actividad *in vitro* e *in vivo* contra *Leishmania*, no obstante, puede causar anafilaxis, trombocitopenia, dolor generalizado, convulsiones, fiebre, escalofríos, flebitis, anorexia, anemia, insuficiencia renal (glomerulolubular) e hipocalcemia (10).

La pentamidina y la Anfotericina B son medicamentos de segunda línea y se emplean en pacientes que no responden al tratamiento con antimonio pentavalente. La pentamidina,

por excretarse en forma prolongada, permite, a diferencia de los Sb V, su administración en días alternos, pero tiene el inconveniente de ser más tóxica y más costosa que el Sb V. Por su parte, la Anfotericina B es muy efectiva para cualquiera de las formas clínicas, pero debido a su toxicidad se requiere una administración intrahospitalaria. Aunque existe una formulación liposomal de Anfotericina B menos tóxica, su costo es mayor, lo que dificulta su consecución, especialmente en países en vías de desarrollo, donde la leishmaniosis es endémica y los gobiernos subsidian los tratamientos (11).

La necesidad de encontrar medicamentos que superen las desventajas que ofrecen los medicamentos que están disponibles en el mercado sustenta la búsqueda y el desarrollo de nuevos compuestos para el tratamiento de la enfermedad. Actualmente no existe ningún tratamiento tópico para tratar la leishmaniosis cutánea (11).

Los productos naturales o compuestos derivados de ellos proporcionan una fuente valiosa de medicamentos gracias al contenido de numerosas moléculas con una variedad de actividades farmacológicas. La inmensa diversidad química y el amplio rango de actividades biológicas de las plantas han permitido el desarrollo de miles de drogas farmacológicas. Es así como en los últimos 25 años, de 1010 nuevas sustancias aprobadas para el manejo clínico de diferentes enfermedades, 490 (48,5%) son de origen natural (11).

Medicina tradicional

La medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales.

En diversos estudios se ha puesto en evidencia que la medicina tradicional se utiliza ampliamente en las distintas regiones del mundo para el tratamiento de un importante número de enfermedades y padecimientos. En África, aproximadamente 80% de la población recurre a la medicina tradicional para resolver sus problemas de salud. En Asia y Latinoamérica, las poblaciones siguen utilizando la medicina tradicional como resultado de circunstancias históricas y creencias culturales. En China, 40% de la atención sanitaria está a cargo de la medicina tradicional. Se estima que en los países latinoamericanos más de 50% de la población sigue atendiendo y percibiendo sus problemas de salud de acuerdo con los patrones de su medicina tradicional (12).

El 80% de la población mundial, más de cuatro mil millones de personas, utiliza las plantas como principal remedio medicinal, según nos señala la OMS (13).

En México el uso de plantas medicinales es una tradición cultural acumulada a través de los siglos en relación al conocimiento del uso tradicional de la flora (14).

Son plantas medicinales todas aquellas que contienen en alguno de sus órganos principios activos, los cuales administrados en dosis suficientes producen efectos curativos en las enfermedades de los hombres y de los animales en general. Se calcula que de las 260.000 especies de plantas que se conocen en la actualidad el 10% se pueden considerar medicinales, es decir, se encuentran recogidas dentro de los tratados médicos de fitoterapia, modernos y de épocas pasadas. Evidentemente sobre todo en las regiones ecuatoriales, la proporción de especies medicinales puede variar sensiblemente de este porcentaje, ya que ni siquiera se conoce la totalidad de la flora (15).

En la medicina tradicional mexicana el uso de plantas en forma de extractos crudos, infusiones o yesos es una práctica generalizada para el tratamiento común de infecciones. Hay una extensa bibliografía etnobotánica que describe las especies más frecuentes utilizadas por la población para curar enfermedades gastrointestinales, infecciones respiratorias, urinarias y de la piel (16).

Las propiedades curativas de las plantas medicinales se deben a diversas sustancias químicas que han desarrollado para su defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico, para defenderse del daño ocasionado por la herida y el ataque por insectos o microorganismos patógenos, las plantas sintetizan enzimas que degradan la pared celular de microorganismos o que tienen la capacidad de inactivar toxinas de origen microbiano. La composición y estructura de la pared celular vegetal también cambian, formando una barrera más rígida y menos digerible para los insectos. Estas respuestas de defensa a su vez se combinan con el desarrollo de estructuras contra sus depredadores, tales como las espinas, las espigas, los tricomas y los pelos glandulares, así mismo y como parte de la protección química, otra estrategia utilizada por las plantas es la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, en contra de herbívoros o con actividad antioxidante. Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que no solamente tienen una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como en el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y

dispersores de las semillas y frutos, sino también, una síntesis activa de metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: el consumo por herbívoros, el ataque por microorganismos, competencia por el espacio de suelo, luz y nutrientes entre las diferentes especies de plantas exposición a la luz u otros factores de estrés abiótico.

En la actualidad se conocen aproximadamente 20, 000 estructuras de metabolitos secundarios que por su composición química son clasificados en dos grupos principales, nitrogenados y no nitrogenados. Los metabolitos que contienen nitrógenos incluyen a los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los metabolitos secundarios no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides (17).

Metabolitos secundarios

Terpenoides o isoprenoides

Se derivan de la fusión de unidades de cinco carbonos llamada isopreno (C₅) (Fig.9.) y se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que los forman. En plantas, los isoprenos básicos para la síntesis de terpenos son el isopentil pirofosfato (IPP) o su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Para sus síntesis existen dos vías, una es la ruta del mevalonato y que se realiza en los plastidios. Los sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos se producen en el citosol y en el retículo endoplásmico, mientras que los monoterpenos, diterpenos, tetraterpenos y algunas quinonas preniladas se originan en los plástidos. Los terpenoides tienen actividad antimicrobiana, gran actividad antioxidante, por lo cual son de gran importancia para las plantas (17).

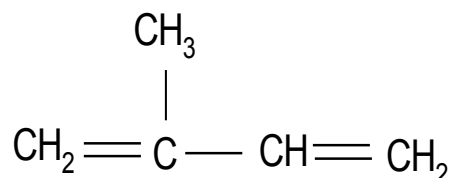


Fig. 9. Estructura química de Isopreno.

Alcaloides

Son compuestos heterocíclicos que generalmente se sintetizan a partir de aminoácidos tales como triptófano, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina y ornitina solos o combinados con terpenoides; también se pueden derivar de purinas y del acetato de los policétidos.

Los alcaloides se pueden dividir en: alcaloides isoquinolínicos, alcaloides quinolizidínicos, alcaloides pirrolizidínicos, alcaloides tropánicos y alcaloides indólicos (17).

Se llaman alcaloides (de álcali, alcalinos, y oide, parecido a, en forma de) a aquellos metabolitos secundarios de las plantas sintetizados generalmente a partir de aminoácidos, son por tanto nitrogenados. Son básicos (excepto colchicina), y poseen acción fisiológica intensa en los animales aún a bajas dosis con efectos psicoactivos, por lo que son muy usados en medicina para tratar problemas de la mente y calmar el dolor. Ejemplos conocidos son la cocaína, la morfina, la atropina, la colchicina, la quinina, cafeína, quinina (Fig. 10) es empleada en el tratamiento de la malaria, antibacteriana (18).

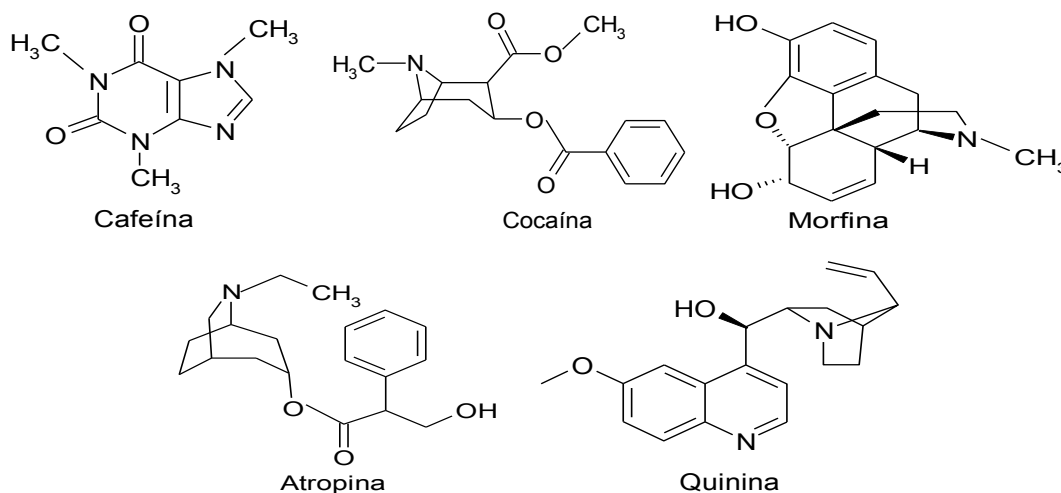


Fig. 10. Ejemplos de alcaloides.

Fenoles simples C₆

En este grupo se incluyen compuestos poco abundantes en la naturaleza y de escaso valor terapéutico a excepción de la hidroquinona que en forma de glucósido se localiza en algunas plantas medicinales pertenecientes a las familias *Ericaceae* y *Rosaceae*. De todas ellas las más empleadas por su poder antiséptico de vías urinarias son la guayaba y algunos tipos de brezo. Se clasifican a su vez en Difenoles: catecol y resorcinol, Monofenoles: fenol, y Trifenoles: pirogalol, florogucinol y hidroxi- hidroquinona (Fig.11) (18).

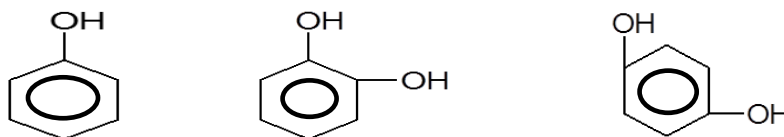


Fig. 11. Ejemplos de estructura química de fenoles.

Ácidos fenólicos C₆-C₁

Los ácidos fenólicos que tienen interés terapéutico son derivados del ácido benzoico o del ácido cinámico (cafeico, ferúlico, p-cumarico) (Fig.12). Entre las plantas medicinales que poseen ácidos fenólicos se destaca la alcachofa con actividad colerética, el ortosifón con actividad diurética y la equinácea empleada por sus propiedades inmunoestimulantes. Igualmente se incluye reina de los prados y sauce, que poseen derivados del ácido salicílico con actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética (18).

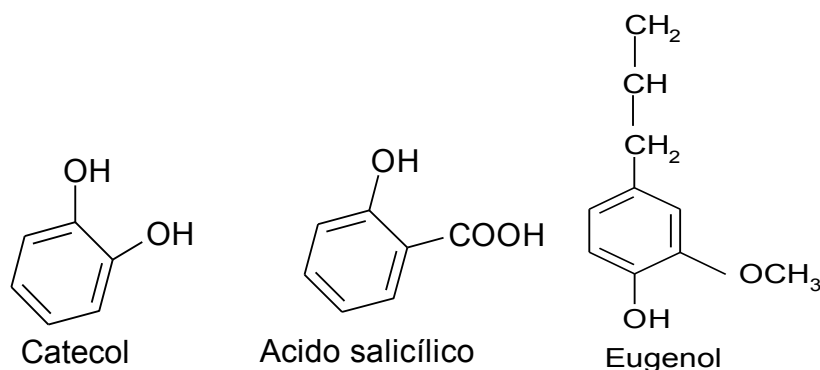


Fig. 12. Ejemplos de ácidos fenólicos.

Cumarinas C₆-C₁

Este grupo tiene efectos sobre el sistema vascular tanto en territorio arterial como venoso y su utilidad en el tratamiento de algunas alteraciones de la piel como por ejemplo la psoriasis debido a sus propiedades fotosensibilizantes, viznadina, piranocumarina con efectos vasodilatadores presentes en el *Amni visnaga* (Fig.13). También antimicrobianos y anticoagulantes (18).

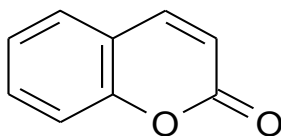


Fig. 13. Ejemplo de estructura química de Cumarina.

Quinonas

Las quinonas (Fig.14) son muy abundantes en la naturaleza, las plantas que contienen estos compuestos son especies vegetales que pueden comportarse como laxantes o como purgantes según las dosis administradas. Las antraquinonas se encuentran en forma natural en algunas plantas (Espino Cerval y el género *Aloe*), hongos, líquenes. Los derivados naturales de la antraquinona son glucósidos con acción laxante y purgante

sumamente potente. En la terapéutica farmacológica la antraquinona pertenece a la categoría de catárticos y se usan en la terapia contra el estreñimiento. Se encuentran en las hojas, vainas, raíces y semillas de diversas plantas como el sen, el ruibarbo y la frágula. Dependiendo del grado de complejidad de su estructura química pueden clasificarse en: Benzoquinonas, Antraquinonas, Naftoquinonas (18).

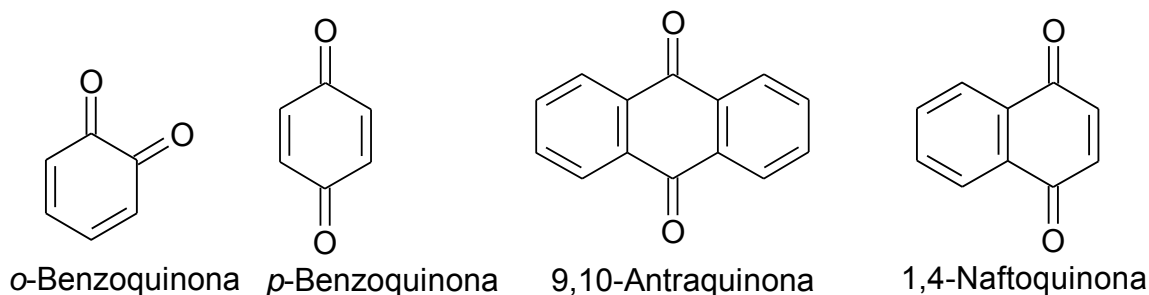


Fig. 14. Ejemplos de Quinonas.

Taninos

Los taninos son compuestos polifenólicos, más o menos complejos, de origen vegetal, masa molecular relativamente elevada (Fig.15) sabor astringente, conocidos y empleados desde hace muchos siglos por su propiedad de ser capaces de convertir la piel en cuero, es decir de curtir las pieles (18).

De las actividades farmacológicas de los taninos podemos destacar sus propiedades astringentes, tanto por vía interna como tópica. Entre las plantas se encuentran *Rosaceae*, que se emplean en forma de infusiones o gargarismos por su poder astringente. Los frutos de taya (*Caesalpinia spinosa*) son antibacterianos. Las hojas de zarzamora (*Rubus fruticosus* L) como antidiarreico ligero o las hijas de frambueso (*Rubus idaeus* L) utilizadas tradicionalmente en el tratamiento de una amplia variedad de trastornos femeninos (18).

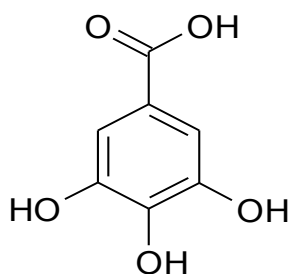


Fig. 15. Ejemplo de estructura química de Taninos.

Lignanós

Están formados por dos unidades de fenilpropano, C₆ – C₃ unidades por enlaces entre las posiciones β y β (Fig.16). Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se

encuentra la podofilotoxina, que se emplea en el tratamiento de condilomas, en quimioterapias (18).

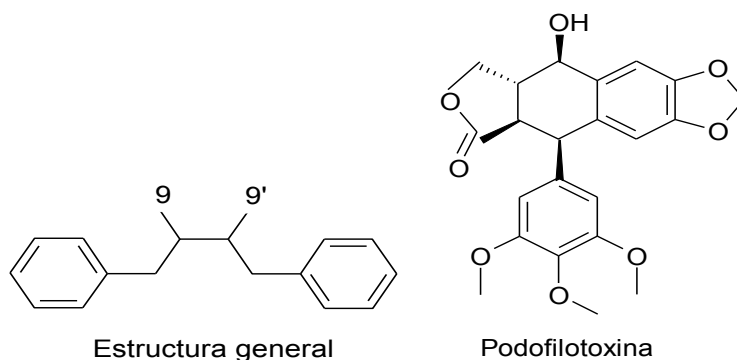


Fig. 16. Ejemplos de Lignanos.

2.1.7.9. Flavonoides

Son moléculas que tienen dos anillos bencénicos (o aromáticos) unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono, puesto que cada anillo bencénico tiene 6 átomos de carbono, los autores los denominan simplemente como compuestos $C_6C_3C_6$ (Fig.17).

Los flavonoides se encuentran tanto en estado libre como glicosidado, constituyen el grupo más amplio de los fenoles naturales.

Algunas actividades terapéuticas de los flavonoides son: antihemorrágicos, anti-arrítmicos vasodilatador (naringenina, eriodictyol y luteolina), antiinflamatoria (isoflavanquinonas, biflavonoides), anticancerígenos (quercetina y la rutina), entre otras (18).

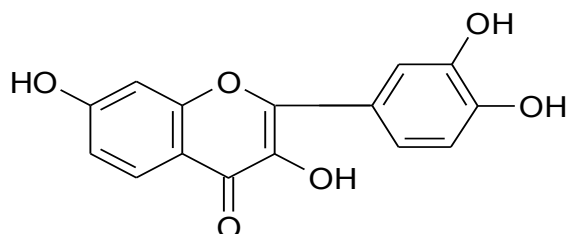


Fig. 17. Estructura química de Flavonoides.

Género *Bursera*

El género *Bursera* incluye cerca de un centenar de especies de árboles leñosos que se distribuyen desde el sur de los Estados Unidos hasta Perú y el sur de Brasil. Su centro de diversidad es México, donde hay más de 80 especies. Tanto por el número de especies como por su abundancia, el género destaca sobre todo en la vertiente del Pacífico y en la depresión del Balsas. Generalmente son árboles de tamaño bajo o medio (5 a 15 m); su corteza es gris, amarilla o roja, delgada y con frecuencia exfoliante. La gran mayoría de sus especies son caducifolias en la temporada seca y florecen al final de la misma.

Los árboles del género *Bursera* son relevantes porque son elementos constitutivos de muchas comunidades naturales y son dominantes en algunas, especialmente en las selvas bajas caducifolia, no se presentan o son poco frecuentes en sitios perturbados. Por ello, su propagación resulta importante, pues su establecimiento en sitios perturbados permite acelerar la sucesión y ayuda a restablecer la composición y estructura de las comunidades naturales, que es el objetivo de la restauración ecológica (19).

La familia incluye 18 géneros y centenares de especies con usos documentados desde la antigüedad como fuente importante de resinas y aceites esenciales.

Los copales pertenecen al género *Bursera*, el cual posee alrededor de 100 especies distribuidas exclusivamente en el continente americano.

Todas pierden sus hojas en la época seca del año y florecen al final de la misma. Generalmente son dioicas, es decir, que las flores femeninas y masculinas son producidas por individuos distintos y se desarrollan previa o simultáneamente a las nuevas hojas.

Dentro de *Bursera* hay dos grupos naturales o secciones: la sección *Bursera*, que incluye los mulatos y cuajotes, y la sección *Bullockia*, donde se encuentran los copales.

En la sección *Bullockia*, hay dos grupos bien definidos: *copallifera* y *glabrifolia*, siendo este último, el grupo de distribución más amplia dentro de *Bursera* (20).

Las clasificaciones prehispánicas reconocían dos grupos entre las especies del género *Bursera*, los cuajotes ['quáuitl' = árbol, 'xiotl' = lepra] los cuales corresponden a las especies de la sección *Bursera* distinguibles por sus cortezas exfoliantes, y los copales ['copalli' = incienso] que corresponden a las de la sección *Bullockia*. En lengua náhuatl, el vocablo "copal" se aplicó a toda planta productora de resina, la cual desprende aroma al quemarse. *Bursera* es un miembro prominente y característico tanto de la flora como de la vegetación de México (20).

En San Rafael, Coxcatlán, Puebla plantas del género *Bursera* son usadas por los habitantes como un remedio tradicional en el tratamiento de heridas, un ejemplo es el exudado de *Bursera arida* que es usado para tratar algunas enfermedades en la piel (21).

Bursera arida (Rose) Standl (Fig.18), es endémica de la región limítrofe entre Puebla y Oaxaca. Es una planta a menudo arbustiva, habitante de matorrales xerófilos, su distribución geográfica conocida: Oaxaca y Puebla.



Fig. 18. Árbol de *Bursera arida*.

Se ha encontrado que muchas especies pertenecientes al género *Bursera* presentan algunos efectos biológicos. El aceite esencial de *B. arida* tiene actividad antimicrobiana sobre algunas cepas bacterianas, entre las más sensibles se reportaron *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae*; y contra hongos (*Candida albicans*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus sp.*) (22)

También se ha reportado que el extracto del tallo de *B. copallifera* tiene un efecto nematocida 66%, mientras que los extractos hexánicos de hojas de *Bursera copallifera* y *B. grandifolia* mostraron dicha actividad moderada (40%) (23).

B. glabrifolia se emplea para el tratamiento de picaduras de alacrán; los ungüentos se usan para aliviar los síntomas del resfriado; la inhalación del humo de la combustión de la resina es un remedio para calmar el dolor de cabeza (24).

Justificación

Debido a la alta toxicidad y poca eficacia de los fármacos usados en el tratamiento de leishmaniosis resulta necesario encontrar nuevos tratamientos eficaces contra la infección, una alternativa puede ser el uso de productos naturales, como son extractos de plantas medicinales.

La medicina tradicional nos proporciona información acerca de los efectos antimicrobianos y antimicóticos que poseen una gran cantidad de plantas. En México plantas del género *Bursera* han sido descritas con estas actividades biológicas como el extracto de *B. simaruba* que presenta actividad anti fúngica, siendo más activo contra *Candida krusei* (25).

Ha sido reportado que el extracto etanólico a partir de tallos de *B. fagaroides* presenta inhibición *in vitro* en el crecimiento de *Entamoeba histolytica* (26).

Se ha reportado por Espinosa (27) la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *B. schelechtendalii* sobre algunas cepas bacterianas, entre las cuales las más sensibles fueron *Streptococcus pneumoniae* y *Escherichia coli*, así como la actividad antimicótica del aceite sobre *Candida albicans* y *C. glabrata*.

Anfotericina B es un fármaco utilizado para el tratamiento de esta enfermedad y es un anti fúngico, y al ser descrita la actividad precisamente el extracto de *B arida* sobre diversas especies de hongos patógenos.

Estos antecedentes apoyan la posibilidad de que el extracto metanólico de la corteza de *B. arida* contenga metabolitos secundarios que puedan ser eficaces contra *L. mexicana*.

A pesar de no tener un antecedente etnobotánico de su uso en el tratamiento de infecciones causadas por *Leishmania sp.* se puede suponer que la especie de *B. arida* podría ser un buen candidato para evaluar su actividad sobre las lesiones producidas por *L. mexicana*.

Objetivo general

Determinar el efecto *in vivo* del extracto metanólico de la corteza de *B. arida* sobre la lesión cutánea provocada por *Leishmania mexicana*.

Objetivos particulares

- Evaluar la actividad antileishmánica de la corteza de *B. arida* por la técnica de viabilidad celular por MTT.
- Evaluar el efecto *in vivo* del extracto metanólico de la corteza de *B. arida* sobre el tamaño de la lesión producida por *L. mexicana*.
- Determinar la carga parasitaria en las lesiones producidas por *L. mexicana*.
- Determinar el efecto del extracto de *B. arida* en la producción de citocinas (TNF- α e IL-4) mediante la técnica de ELISA.
- Demostrar *in situ* el efecto del extracto sobre la lesión por medio de cortes histológicos.
- Determinar la composición química del extracto de *B. arida* por medio de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

Materiales y métodos

Obtención del extracto.

El extracto de la corteza de *B. arida* fue donado por la Dra. María Margarita Canales Martínez del laboratorio de Farmacognosia de la UBIPRO. El material vegetal necesario de la especie de *Bursera arida* se colectó en el año 2011 en San Rafael, Coxcatlán, Puebla (Apéndice 1). Se obtuvo por el método de maceración (28). Se pesó las cortezas secas y se colocaron en trozos en un matraz, se obtuvo el extracto metanólico, el cual se filtró y destiló a presión reducida en un rotavapor. El extracto se colocó en recipientes 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. Posteriormente se preparó un gel del extracto a una concentración de 0.02 mg/ml para aplicarlo de manera tópica sobre la lesión.

Mantenimiento de la cepa *Leishmania mexicana*.

El parásito *L. mexicana* se obtuvo a partir de un ratón previamente infectado con la cepa (MNYC/BZ/M379) donado por la Dra. Miriam Rodríguez Sosa del laboratorio 5 de la UBIMED. Se aislaron amastigotes de la lesión de ratones infectados en 5 ml de medio de cultivo Schneider suplementado con 10% de SFB inactivado y antibiótico al 1% (penicilina y Glutamina, Gibco) para obtener la fase estacionaria de promastigote, y fueron cultivados en botellas de cultivo con medio Schneider a 28° C y posteriormente fueron cuantificados en la cámara de Neubauer.

Evaluación *in vitro* de la actividad anti-leshmánica.

Se utilizaron promastigotes en la fase exponencial, los cuales fueron resuspendidos en medio Schneider suplementado con SFB y 100 mg de gentamicina/ ml⁻¹. Los parásitos se pusieron en placas de cultivo celular de 96 pozos (5X10⁷ promastigotes en 100 µl de medio, en cada pozo) e interactuaron en diferentes concentraciones del extracto de *Bursera arida* durante 72 h a 22 °C; una vez transcurrido el tiempo se centrifugó para posteriormente retirar el extracto. La viabilidad de los parásitos fue evaluada usando el método modificado del ensayo de MTT (29) donde la cantidad de sales de formazan producidas es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas. Las sales de formazan producidas se analizaron en un lector de ELISA a una longitud de onda de 492 nm, los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron en la curva patrón y se graficaron para obtener la concentración letal media (C₅₀) (concentración a la cual la

mitad de la población muere). Para el control positivo se utilizaron como referencia Pentostam y Anfotericina B, ambos empleados en el tratamiento contra la leishmaniosis.

Infección de ratones con *L. mexicana*.

Se infectó de manera subcutánea 3 grupos (n=3) de ratones BALB/c machos del mismo peso y de 6 semanas de edad en la parte posterior cerca de la base de la cola. Los ratones fueron rasurados para hacer más fácil la infección. Se infectó a los ratones con un inóculo de 50 µl de PBS que contenían 2×10^6 promastigotes de *L. mexicana* con jeringas de insulina. Los ratones se mantuvieron en el bioterio durante 10 semanas posteriores a la infección se monitoreo el tamaño de la lesión de los ratones midiendo ancho y largo de la lesión con un vernier electrónico cada dos semanas y se obtuvo sangre para posteriormente obtener el suero.

Carga parasitaria por dilución limitante

Se determinó la carga parasitaria de las heridas de los ratones por dilución limitante a las 10 semanas posteriores a la infección. Se maceró 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 Vitro). Se centrifugó a 2500 rpm por 10 minutos. El botón celular se resuspendió con 500 µl de medio Schneider y se sembró en placas de cultivo de 96 pozos (Costar) a una dilución 1:100 y 1:10 (cada una por triplicado), y se siguió la dilución hasta el pozo 12 (diluciones 1/2), se mantuvo a 28°C durante 24 h para su visualización a microscopio óptico invertido (Motic, AE31) se consideró el último punto de titulación un pozo antes de cuando desaparecen los parásitos.

Determinación del efecto del extracto de *B. arida* en la producción de citocinas (TNF-α e IL-4) mediante la técnica de ELISA.

Después de obtener el suero de la sangre de los ratones se determinó el efecto del extracto en la producción de citocinas TNFα e IL-4 por medio de la prueba de ELISA.

1. Se sensibilizó la placa agregando el Kit (anticuerpo de captura)
2. Se bloqueó los espacios vacíos con albúmina y se esperó 4 horas.
3. Se puso 25 µl de suero en cada pozo de la placa (grupo control y al grupo que se le aplicó el extracto de *B. arida*), posteriormente se puso el anticuerpo de detección, se agregó el sustrato el cual dio un color, se midió la cantidad de antígeno por la intensidad de color a 405 nm, esto se hizo en un lector de ELISA.

Cortes histológicos

Después de sacrificar a los ratones se obtuvieron las lesiones, posteriormente se fijaron las muestras en formol, después de la fijación se lavaron las muestras, se deshidrataron en alcohol a concentraciones crecientes para la eliminación de agua, y se incluyeron en parafina, se obtuvieron los cortes mediante un microtomo. Posteriormente se tiñieron las muestras mediante la técnica de H & E.

El procedimiento de coloración de H & E fue el siguiente:

		Tiempo
1. Quitar exceso de parafina:	Xilol	10 lavados
	Xilol	10 lavados
2. Hidratar los cortes en baños decrecientes de alcohol	Alcohol absoluto (100%)	10 lavados
	Alcohol absoluto (100%)	10 lavados
	Alcohol de 95%	10 lavados
	Alcohol de 95%	10 lavados
	Alcohol de 70%	10 lavados
	Agua corriente	10 lavados
	Agua destilada	10 lavados
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 a 20 minutos.	La hematoxilina de uso más frecuente es la hematoxilina aluminica de Harris	3 a 5 minutos
4. Lavado en agua destilada (1 baño)	Agua destilada	10 lavados
5. Diferenciar , para eliminar el exceso de colorante, se emplea alcohol ácido, hasta que los núcleos y los componentes basófilos de las células sean los únicos que permanezcan teñidos	Alcohol ácido Agua corriente	10 lavados
6. Virar al color azul , empleando soluciones de: <input type="checkbox"/> Sustancias alcalinas como agua amoniacal <input type="checkbox"/> Solución de bicarbonato de sodio al 2% <input type="checkbox"/> Carbonato de litio al 1%.	Lavar en agua corriente	1 lavado rápido
	Lavar en agua destilada (1 baño)	1 lavado

7. Colorear con una solución alcohólica o acuosa de eosina		3 a 5 minutos
8. Deshidratar en baños crecientes de alcohol etílico	Alcohol de 70%	10 lavados
	Alcohol 95 %	10 lavados
	Alcohol 95%	10 lavados
	Alcohol absoluto (100%)	10 lavados
	Alcohol absoluto (100%)	10 lavados
9. Diafanizar o aclarar empleando xilol	Xilol	10 lavados
	Xilol	Hasta el montaje

En estas condiciones los tejidos están preparados para realizar en ellos el montaje.

Para el montaje se colocó encima del corte coloreado y diafanizado una gota de resina. A continuación se dejó que el xilol se evaporara, y la resina adquiriera solidez suficiente (30).

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

El análisis del extracto metanólico de la corteza de *B. arida* se realizó mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM). Se empleó un Cromatógrafo modelo 6850 acoplado a un Espectrómetro de masas modelo 5975C marca Agilent Technologies con una columna HNS-MS, de 30 metros de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y película de 0.25 µm; el tipo de inyección fue Split y la cantidad de muestra empleada fue de 1 µl partiendo de una disolución de 1mg/ml. Las condiciones de separación fueron a una temperatura inicial de 70 °C durante dos minutos aumentando con dos rampas de calentamiento, la primera a 20 °C por minuto hasta 230 °C; y la segunda, aumentando a 8 °C por minuto hasta los 280 °C y se mantuvo durante cinco minutos; el gas de acarreo fue He. El flujo inicial de la columna fue de 1 ml/min, con una presión de 61.85 kPa (8.77 psi) y una velocidad lineal de 30 cm/s. El tiempo total del análisis fue de 21.25 minutos. El rango de masas detectado fue de 35 m/z a 750 m/z, la muestra se ionizó por impacto electrónico a 70 eV. La identificación de los compuestos se llevó a cabo por medio de la base de datos de la biblioteca NIST Version 8.0.

Resultados

Evaluación *in vitro* de la actividad antileishmánica de la corteza de *B. arida* por la técnica de viabilidad celular por MTT.

De la evaluación del extracto metanólico de la corteza de *B. arida* sobre *Leishmania mexicana*, mediante la técnica de MTT a concentraciones de 10 a 0,009mg/ml, se observó una relación directa entre el número de células metabólicamente activas y la absorbancia, se observa un efecto dosis dependiente contra promastigotes de *L. mexicana*, es decir que a mayor concentración del extracto existe una tasa mayor de mortalidad de promastigotes (Fig.19.A), la CL₅₀ alcanzada fue de 0.021mg/ml, mientras que con el fármaco de primera línea, el estibogluconato la CL₅₀ fue de 0.2030 mg/ml, es decir, no existe diferencia significativa entre la CL₅₀ del extracto y el fármaco (Fig.19. B). Por lo que respecta a la anfotericina B se registró una CL₅₀ de 0.021 µg/ml (Fig.19. C), lo que deja claro que de este fármaco su actividad antileishmánica no está en discusión, pero si su alta toxicidad.

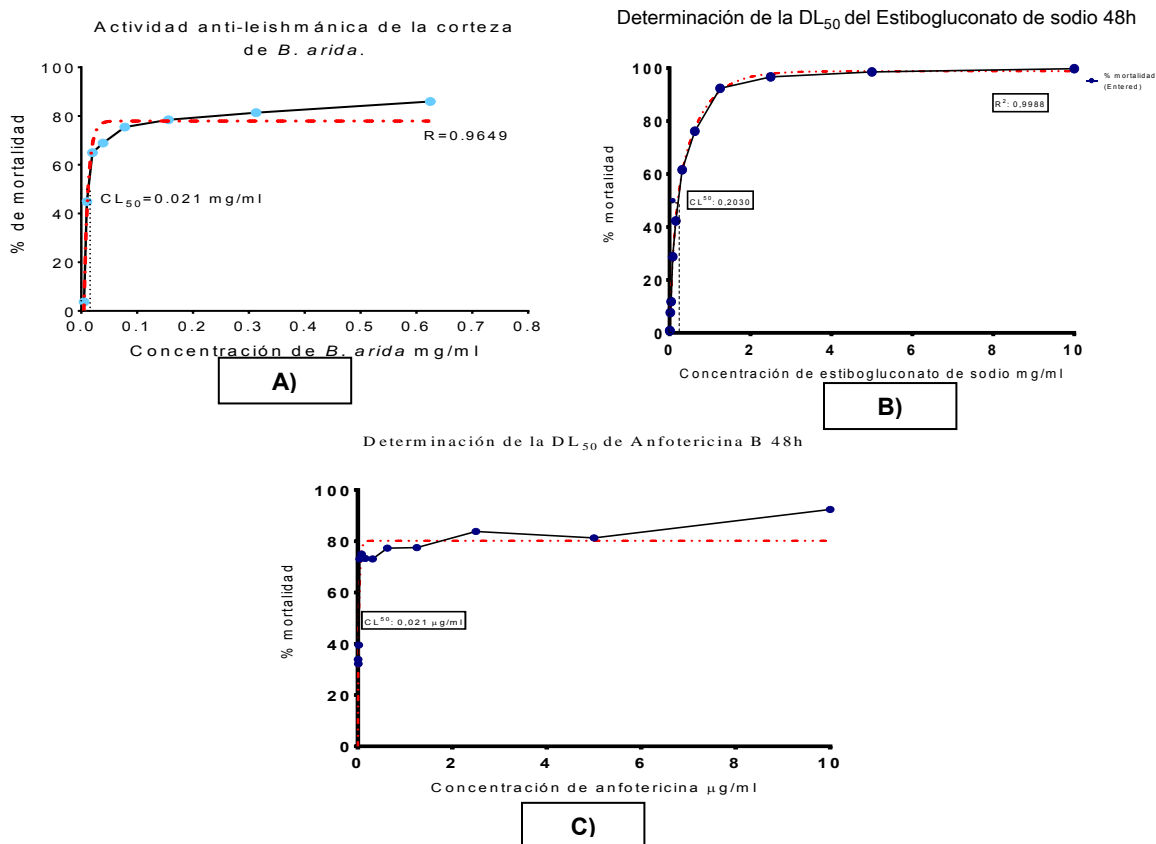


Fig. 19. A) Curva del efecto antileishmánico. Evaluación de la CL₅₀ contra promastigotes de *Leishmania mexicana*. B) Efecto *in vitro* del medicamento Estibogluconato de sodio [100mg/ml]. C) Efecto *in vitro* del medicamento Anfotericina B [250µg/ml].

Evaluación del efecto *in vivo* del extracto metanólico de la corteza de *B. arida* sobre el tamaño de la lesión producida por *L. mexicana*.

Se monitoreó cada dos semanas el tamaño de la lesión hasta la semana ocho de la infección para evaluar la actividad *in vivo* del extracto. Se obtuvo que los ratones del grupo control desarrollaron una lesión progresiva, en contraste con los ratones a los que se les aplicó el extracto que tuvieron una lesión más pequeña durante el periodo de estudio (Fig. 20).

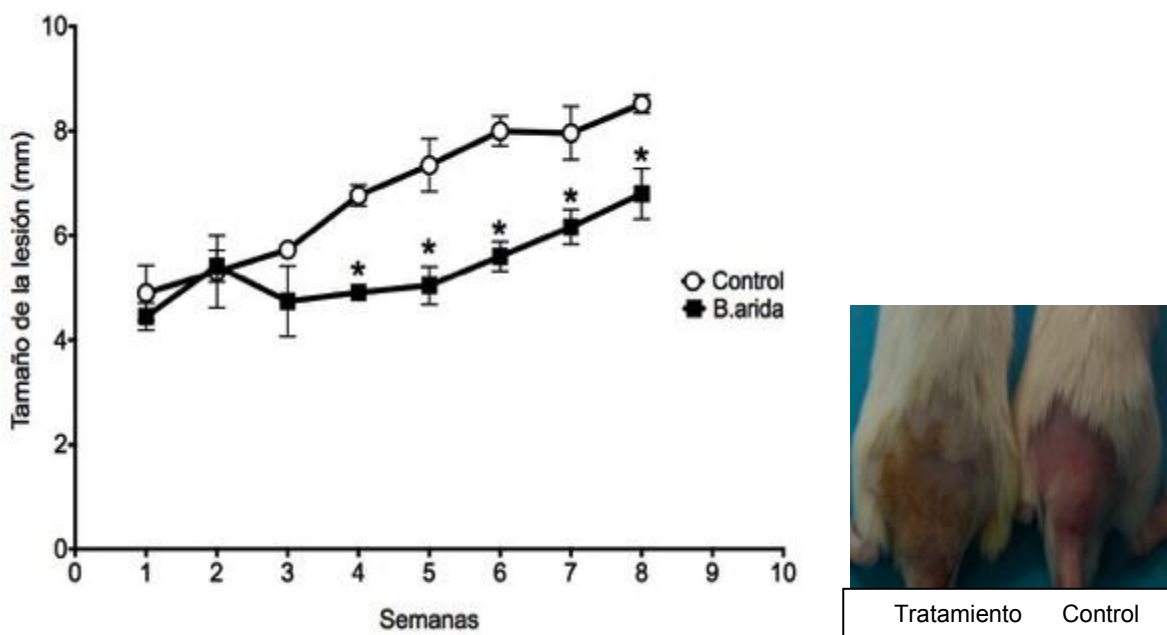


Fig. 20. Monitoreo de la lesión hasta la semana ocho durante la infección.

Se realizó una prueba múltiple de t, donde el valor de P fue menor a 0.05, se observó que en la semana 1, 2 y 3 no hay diferencias significativas, mientras que a partir de la semana 4 sí hubo diferencias significativas.

Determinación de la carga parasitaria en las lesiones producidas por *L. mexicana*

La carga parasitaria se determinó con el fin de comparar la cantidad de parásitos en la lesión dorsal (sitio de infección) y relacionarlo con el tamaño de la misma. Al contrastar la cantidad de parásitos obtenidos por medio de la dilución limitante se encontró una cantidad significativamente menor en la carga parasitaria en los ratones con tratamiento en contraste con los ratones del grupo control. (Fig. 21).

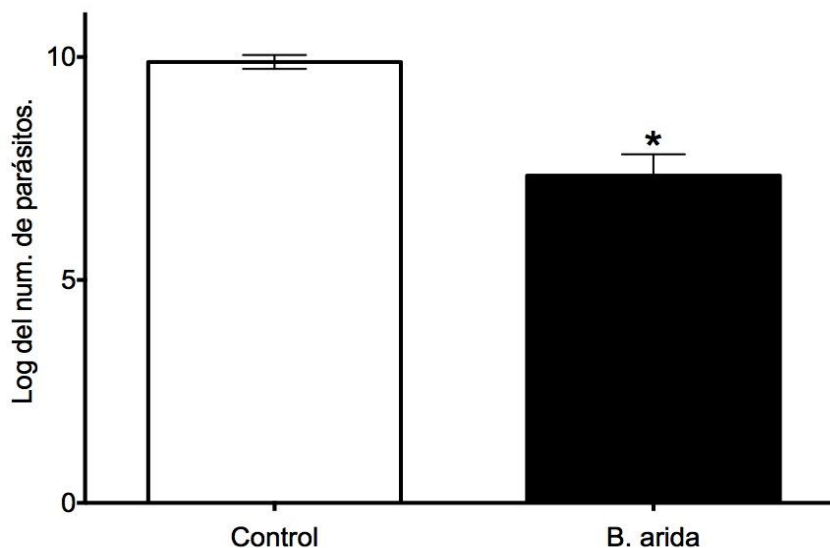


Fig. 21. Carga parasitaria por dilución limitante. Grafica de carga parasitaria donde se muestra que los ratones control tuvieron mayor número de parásitos que los ratones con tratamiento. Las cifras corresponden al \log_{10} del número de promastigotes. Se realizó una prueba de t con un valor de significancia de $P= 0.05$, se obtuvo que si hay diferencia significativa entre el grupo control y el tratamiento.

Determinación del efecto del extracto de *B. arida* en la producción de citocinas (TNF- α e IL-4) mediante la técnica de ELISA.

Para saber si el extracto provocó una respuesta inmunomoduladora se realizó una prueba de ELISA con los sueros obtenidos cada dos semanas de la sangre de los ratones durante la infección.

En los resultados obtenidos con el extracto de *B. arida* se observó que hubo una baja producción de citocinas TNF- α durante la infección (Fig. 22. A) esta citocina participa en la eliminación efectiva del parásito, es de tipo Th1 y activa a los macrófagos por lo cual se podría decir que al tener una baja producción se presenta un ambiente inmunológico propicio para *L. mexicana*, en contraste con la alta producción de IL-4 durante la infección (Fig. 22.B) y al ser esta interleucina de tipo Th2 conduce a la inhibición de los mecanismos leishmanicidas en los macrófagos. La respuesta Th2 no sólo evita la muerte del parásito, sino también le asegura nutrientes para favorecer su crecimiento. Sin embargo IL-4 es una citocina anti-inflamatoria al bloquear la síntesis de TNF- α por lo que se podría suponer que el extracto tuvo un efecto anti-inflamatorio, por lo cual se podría justificar el hecho que el tamaño de la lesión fuera bajo y se podría decir que el extracto tuvo un efecto sobre el parásito, para corroborar lo anterior se realizaron cortes histológicos de las lesiones.

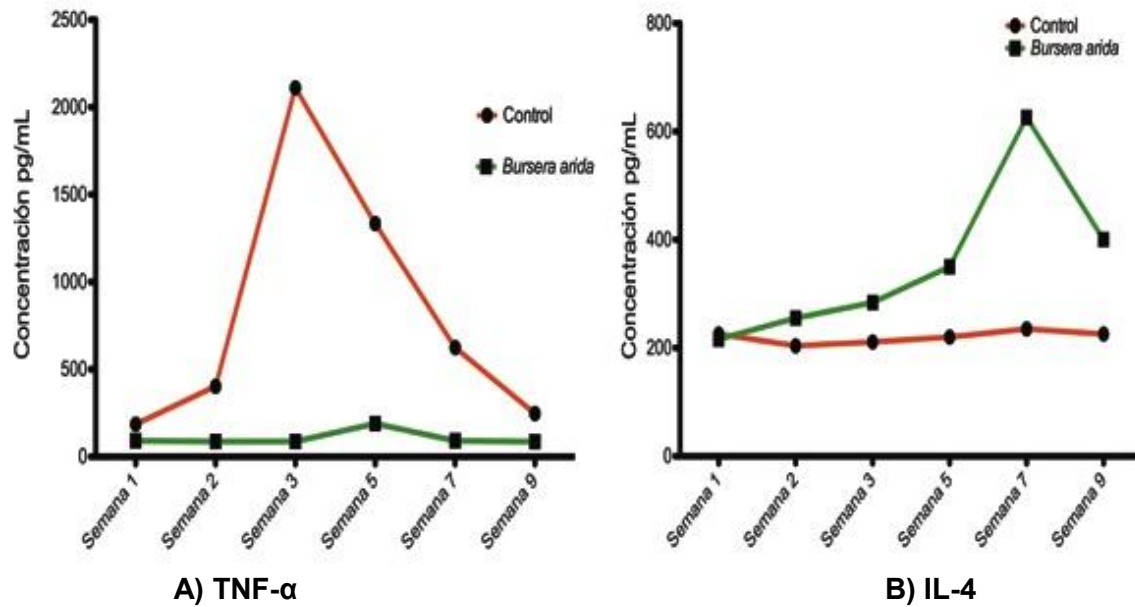


Fig. 22. A) Concentración de citocinas TNF-α B) Concentración de citocinas IL-4 durante la infección. Datos expresados en pg/ml.

Obtención de cortes histológicos para demostrar *in situ* el efecto del extracto sobre la lesión.

Para corroborar la actividad directa sobre el parásito del extracto se realizaron cortes histológicos de las lesiones producidas por *L. mexicana* para saber si también tenía un efecto directo sobre los histiocitos que contienen al parásito (Fig.23).

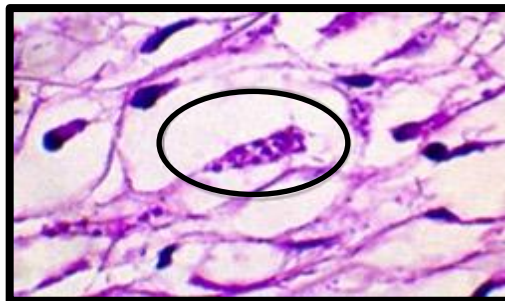


Fig. 23. Fotografía de histiocito a un aumento de 100X (Control positivo).

En el grupo al que se le aplicó el extracto de *B. arida* no se observan histiocitos, sólo se observa infiltrado inflamatorio, mientras que en el control positivo se observan histiocitos (Fig. 24).

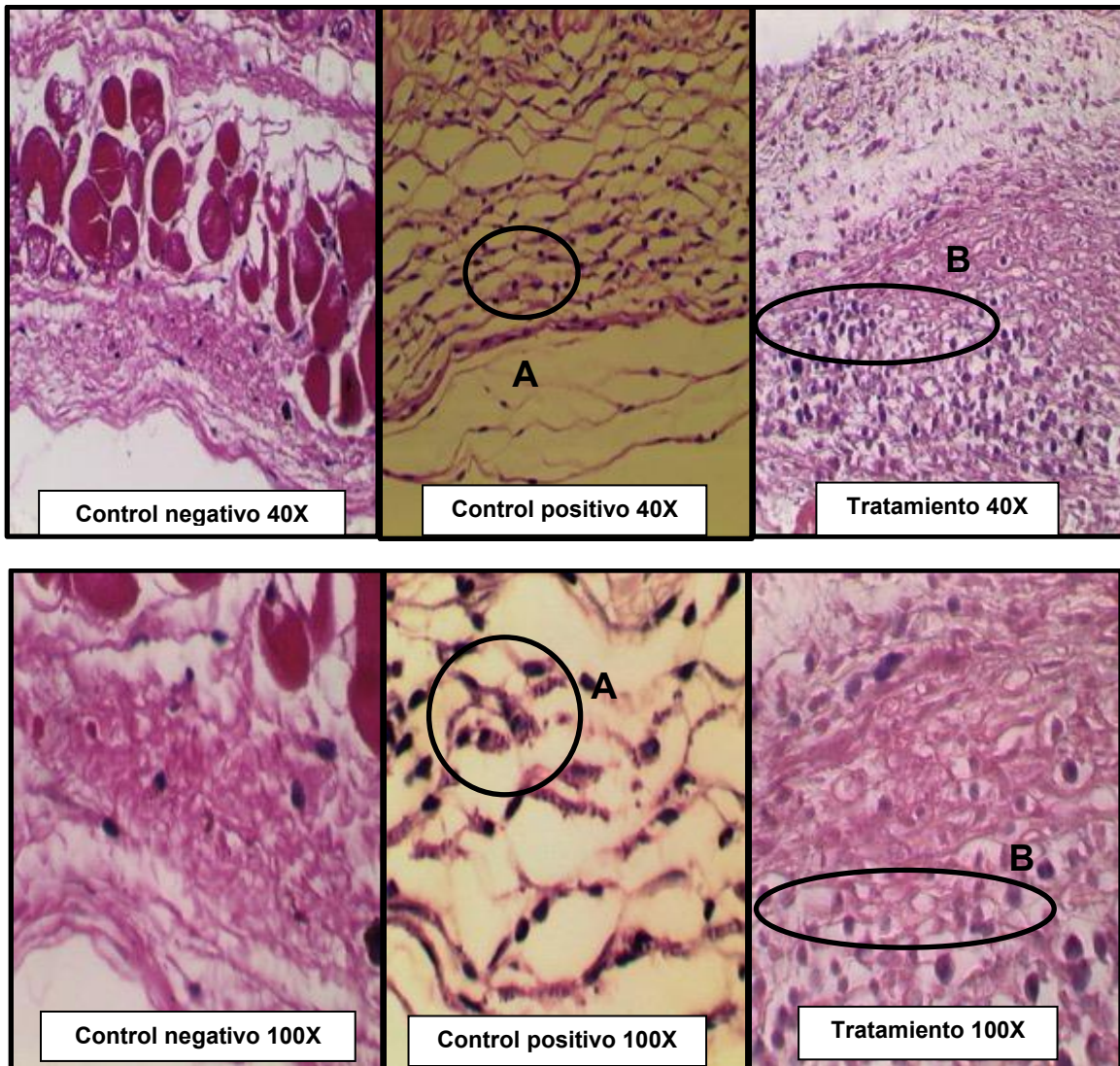


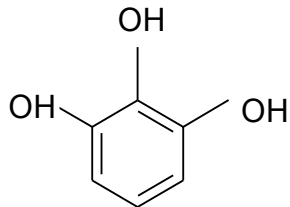
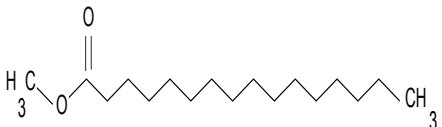
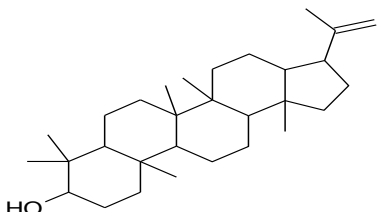
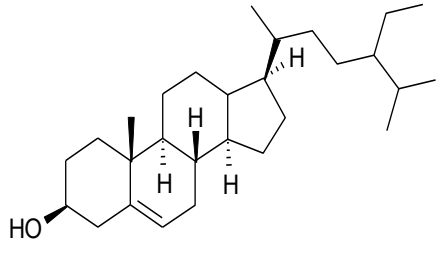
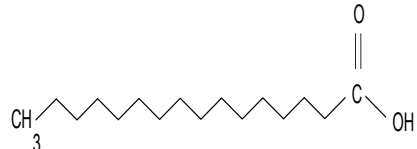
Fig. 24. Cortes histológicos de las lesiones provocadas por *L. mexicana*. Comparando el tratamiento, control negativo y positivo se observó una cantidad considerable de histiocitos en el control positivo, mientras que en el tratamiento no se observan histiocitos, sólo se observa infiltrado inflamatorio. A= Histiocitos, B= Infiltrado inflamatorio.

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

Se identificaron ocho metabolitos secundarios mediante una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) del extracto de la corteza de *B. arida*, de los cuales existen reportes de actividades biológicas (Cuadro 1). El análisis muestra la presencia de compuestos de tipo polifenoles, lignanos, terpenos y ácidos grasos.

Se puede observar que el compuesto que tuvo un mayor porcentaje fue el pirogallol con un 55.43 %, siguiendo 2-austrobailgnano con un 16.40%, Lignocerato de metilo 9.49%,

metil palmitato 4.71%, moretenol 4.55%, cicloartenol 3.91%, ácido palmítico 3.04% y 2-mercaptobenzotiasol con un 2.47%. Cabe mencionar que el pirogalol, metil palmitato y moretenol tienen ciertas actividades biológicas que hacen suponer que el extracto de *B. arida* tiene actividad anti-inflamatoria y contra *L. mexicana*.

Compuesto	Porcentaje de abundancia	Actividad biológica	Estructura química
Pirogalol	55.43	Antioxidante, inhibidor de COX – 2 Actividad anticancerígena, antibacteriano anti fúngico inhibidor de caspazas, antiprotozoario.	
Metil palmitato	4.71	Actividad anti-inflamatoria, reduce TNF α , contrarresta infiltración de células pro inflamatorias.	
Moretenol	4.55	Antiinflamatoria	
Clionasterol	3.91	Actividad citotóxica contra líneas cancerígenas humanas.	
Ácido palmítico	3.04	Generador de muerte celular y apoptosis.	

Cuadro 1. Compuestos detectados en el extracto metanólico de la corteza de *B. arida* mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas. Porcentaje de abundancia y actividades biológicas.

Discusión

En este estudio se reporta por primera vez, la actividad *in vivo* contra *Leishmania* mexicana del extracto metanólico de la corteza de *Bursera arida*.

El tratamiento contra leishmaniosis en cualquiera de sus formas clínicas está dirigido a la erradicación de los amastigotes y reducción del tamaño de las lesiones, promoviendo la cura. Dicho tratamiento, se realiza en primera instancia con compuestos de antimonio pentavalente como el estibogluconato de sodio y el antimonio de meglumina, y en segunda instancia con otras drogas, como la anfotericina B, el isotionato de la pentamidina y miltefosina. Sin embargo, el empleo de dichos fármacos tiene varias desventajas que dificultan el tratamiento adecuado de los casos (31).

Entre los factores adversos a los tratamientos actualmente disponibles están los esquemas terapéuticos prolongados, con altas dosis de medicamentos, los considerables efectos adversos tales como mialgias, artralgias, anorexia, náuseas y dolor de cabeza en el caso de los antimoniales, y los altos costos, estimulan que muchos pacientes no concluyan el tratamiento, lo que favorece la reactivación de la lesión, el compromiso en mucosas y la aparición de resistencia al medicamento (31).

Todas las desventajas asociadas a los medicamentos disponibles han evidenciado la necesidad urgente de encontrar nuevas estrategias terapéuticas para el manejo de la enfermedad, lo que implica trabajar en forma decidida en el descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos. (31). Considerando la problemática de los fármacos utilizados para el tratamiento de la enfermedad y que el extracto disminuyó el tamaño de la lesión, nuestros resultados ofrecen una alternativa para proponer un tratamiento tópico.

Para probar la actividad del extracto, se corroboró la actividad *in vitro* y se obtuvo una CL_{50} de 0.021 mg/ml, mientras que con el estibogluconato la CL_{50} fue de 0.2030 mg/ml, no existe diferencia significativa entre la CL_{50} del extracto y el fármaco. Para anfotericina B se registró una CL_{50} de 0.021 μ g/ml lo cual muestra su actividad antileishmánica, sin embargo este fármaco es muy tóxico.

La concentración obtenida con extracto de *B. arida* es muy semejante a la reportada en un estudio previo, donde la CL_{50} fue de 0.012 mg/ml (32). Es importante mencionar que con respecto a los estudios *in vitro*, hay reportes de que algunas de las especies pertenecientes al género *Bursera* presentan actividad importante contra diferentes especies de *Leishmania*, variando la CL_{50} para cada caso, como por ejemplo, *B. aptera*

presentó una CL₅₀ contra *L. mexicana* de 0.408 mg/ml y de *B. simaruba* se ha reportado una actividad antileishmánica contra amastigotes de *L. amazonensis* con una CL₅₀ de 163.3± 1.6µg/ml (33,34). Por lo que se considera que al menos con respecto a estos dos casos la susceptibilidad de *L. mexicana* al extracto metanólico de *B. arida* es muy alta.

Además de la actividad antileishmánica se ha reportado que el extracto de *B. arida* tiene actividad contra protozoarios como es el caso de *Naegleria fowleri* (35), protozooario que sólo es susceptible a anfotericina B lo que nos lleva a suponer que puede tener actividad contra una gran gama de protozoarios, como se ha reportado que el extracto etanólico a partir de tallos de *Bursera fagaroides* presenta inhibición *in vitro* en el crecimiento de *Entamoeba histolytica* (23).

Para evaluar el efecto *in vivo* sobre la lesión se monitoreó el tamaño de esta. Se observó una disminución la cual fue estadísticamente significativa con respecto al grupo control, esto de alguna manera se puede correlacionar con los datos encontrados en la actividad *in vitro* que muestran que *L. mexicana* es altamente susceptible al extracto de *B. arida* (32). Este resultado es muy importante ya que por primero vez se prueba un tratamiento tópico sobre las lesiones dérmicas que produce *L. mexicana*.

El hecho de que haya una disminución del tamaño de la lesión puede implicar un éxito en la aplicación tópica del extracto contra esta infección, al respecto solo ha sido reportado el tratamiento a nivel tópico combinando miltefosina oral y paromomicina en donde se observó una reducción estadísticamente significativa en el tamaño de la lesión y en la carga parasitaria así como una recuperación completa de las úlceras producida por *L. major* (36). En nuestros resultados no podemos confirmar una recuperación completa ya que solo se evaluó el efecto a lo largo de ocho semanas. Además, cabe mencionar que los fármacos referidos son utilizados para tratar la leishmaniosis visceral y fueron probados en *L. major* que es una especie asociada al desarrollo de leishmaniosis cutánea, haciendo una comparación con nuestros resultados obtenidos con *B. arida* se observó una cierta similitud al haber una reducción en el tamaño de la lesión y en la carga parasitaria.

Para comprobar si el extracto tuvo un efecto directo sobre el parásito se hicieron cortes histológicos y se cuantificó la carga parasitaria para determinar la presencia o ausencia de amastigotes. En el grupo al que se le aplicó el extracto de *B. arida* se observó una

reducción en el número de parásitos y hubo diferencias significativas con respecto al grupo sin tratamiento con un valor de $p < 0.05$ en el ensayo de dilución limitante.

Por histología fue imposible detectar histiocitos con *Leishmania* en el grupo al que se le aplicó el extracto de *B. arida*, sólo se observó infiltrado inflamatorio mientras que en el control positivo se observaron histiocitos y mayor cantidad de infiltrado inflamatorio, por lo que se puede suponer que el extracto tuvo un efecto directo sobre *L. mexicana*, esto se puede corroborar con un estudio que se hizo en ratones infectados con *L. amazonensis* tratados con derivados de pirazol carbohidrazida donde se reportó que la epidermis y dermis tenían niveles más bajos de infiltrado inflamatorio en comparación con los ratones del grupo control. En la dermis de los animales del tratamiento, el número de macrófagos que contienen parásitos intracelulares fueron mucho menores que en los animales del grupo control (37). Si bien es cierto que estos derivados del pirazol presentan reducciones importantes tanto en infiltrado inflamatorio como en carga parasitaria, hay que considerar que se trata de un compuesto puro y nuestros resultados corresponden a un extracto.

En la leishmaniosis, la eliminación del parásito parece depender de la activación de la célula hospedera y se ha observado que la producción de citocinas activadoras de macrófagos se correlaciona con la recuperación, en tanto que las citocinas que desactivan al macrófago se correlacionan con la afección. Tal vez por esa razón se piensa que el mecanismo por el cual se activa una respuesta Th1 o Th2 es de vital importancia para dirigir la reacción inmunitaria hacia la protección y recuperación (Th1) o susceptibilidad y patogenicidad (Th2) (38).

En la infección por *L. major* en el modelo de ratón BALB/c el desarrollo de la enfermedad y su difusión se ha asociado con una respuesta inmune Th2, que es dominado por IL-4. Múltiples informes sugieren sin embargo, que tales respuestas inmunes no se observan en los humanos (38).

En los resultados obtenidos con el extracto de *B. arida* se observó que hubo una baja producción de citocinas TNF- α durante la infección, esta citocina participa en la eliminación efectiva del parásito, es de tipo Th1 y activa a los macrófagos por lo cual se podría decir que al tener una baja producción se presenta un ambiente inmunológico propicio para *L. mexicana*, en contraste con la alta producción de IL-4 durante la infección y al ser esta interleucina de tipo Th2 conduce a la inhibición de los mecanismos leishmanicidas en los macrófagos. La respuesta Th2 no sólo evita la muerte del parásito,

si no también le asegura nutrientes para favorecer su crecimiento. Con lo anterior, se esperaría que al haber un incremento de IL-4 y disminución de TNF α , la infección siguiera su curso y por ende habría un aumento en el tamaño de la lesión y de la carga parasitaria en las mismas. Sin embargo esto ocurriría si se trata de explicar sólo desde un punto de vista inmunológico o un papel inmunomodulador del extracto, pero integrando los resultados anteriores, donde se observa una alta susceptibilidad de *L. mexicana* al extracto, una reducción de la lesión y carga parasitaria podemos decir que el extracto tuvo un efecto sobre el parásito, por lo que al eliminarlo, se aumenta la expresión de citocinas antiinflamatorias para regenerar el tejido lesionado.

El desarrollo de la inflamación causada por *L. mexicana* se puede suponer que fue mediado por compuestos detectados en el extracto de la corteza de *B. arida*, ya que han sido reportadas diversas actividades biológicas de plantas del mismo género, por lo cual se decidió realizar el análisis fitoquímico del extracto metanólico de la corteza de *B. arida* para entender su actividad antileishmánica (25, 26).

De los ocho metabolitos secundarios encontrados mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) se encontró que el compuesto que tuvo mayor porcentaje de abundancia fue el pirogallol con un 55.43 % el cual ha sido reportado con actividad antileishmánica contra amastigotes de *L. donovani* con una CL_{50} de 4.8 μ g/ml (39).

Otro compuesto detectado fue 2-austrobailignano con un porcentaje de abundancia de 16.40% el cual ha sido descrito con actividad contra epimastigotes de *T. cruzi*, (40) donde se describe que a una concentración de MC_{100} de 70 μ g/ml los epimastigotes fueron inmovilizados influyendo en su capacidad infectiva.

También fue detectado el metil palmitato con un 4.71% de abundancia, y el ácido palmítico con un 3.04% de abundancia, los cuales han sido reportados con actividad contra protozoarios (*Giardia lamblia*) con una IC_{50} >300 para cada compuesto aislado. (41). Moretenol con un 4.55% de abundancia ha sido reportado con actividad significativa antiinflamatoria (42) así mismo el cicloartenol 3.91% ha sido reportado con actividad antiinflamatoria (43).

El 2-mercaptobenzotiasol con un 2.47% de abundancia ha sido reportado con actividades antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatoria, antitumoral, antiamebiana, antihelmíntico (44).

Conclusiones

- ↻ Se comprueba por primera vez la actividad del extracto de *B. arida* sobre el desarrollo de *L. mexicana*.
- ↻ El extracto metanólico de la corteza de *Bursera arida* tuvo un efecto antileishmánico.
- ↻ El extracto metanólico de la corteza de *Bursera arida* provocó una reducción en el tamaño de la lesión y carga parasitaria.
- ↻ La composición química del extracto metanólico de la corteza de *B. arida* presenta varios compuestos con diferentes actividades biológicas entre las que se encuentran antiinflamatorios, antiprotozoarios y anticancerígenos.

Literatura citada

1. Montalvo, A. M., Sifontes, S., Montano, I., Espino, A.M. (2000). Necesidad del uso de cromógenos para cuantificar promastigotes de *Leishmania* en placas de 96 pozos. Rev. Cubana Med. Trop [En línea]. 52(2): 95-100.
2. Zegarra, R y Sánchez, L. (2005). Leishmaniasis cutánea: presentación en placa verrucosa. Dermatología Peruana. 15(1).
3. Grogl, M., Hickman, M., Ellis, W., Hudson, T., Lazo, J., Sharlow, E., Jhonson, J., Berman, J.(2013). Review: Drug Discovery Algorithm for Cutaneous Leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 88(2):216–221.
4. Becker, I., Carrada, G., Gudiño, M., González, C., Berzunza, M., Rivas, B., Velasco, O. (2005). Análisis de Leishmaniasis en México. Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM. 31-33 p.
5. Choquehuanca, J. (2011). Estandarización de pruebas de ELISA tipo indirecto para la determinación de los niveles de anticuerpos IgG e IgE antileishmania, como método complementario para el diagnóstico de la enfermedad. Tesis de licenciatura. Bioquímica. Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Instituto de Servicios de Laboratorios de Diagnostico e Investigación en Salud (SELADIS). 19-21 p.
6. Rojas, D., Zambrano, P., Ayala, M., Parra, E., Padilla, J., Escobar, J. (2010). Guía de atención clínica integral del paciente con Leishmaniasis. Ministerio de la Protección Social República de Colombia Dirección General de Salud Pública. Instituto Nacional de Salud Organización Panamericana de la Salud OPS/OMS. Convenio de Cooperación Técnica con el Ministerio de la Protección Social. 9-53 p.
7. Ríos, J.M y Sousa, O. (2010). Inmunología en la infección por *Leishmania*: conceptos actuales. Rev méd cient. 23(1):19-31.
8. Soto, J y Soto, P. (2006). Miltefosina oral para el tratamiento de la leishmaniasis. Biomédica [En línea]. 26(1):207-217.
9. Torres, E. (2013). Expresión génica delIL-12, IL-6 Y TNF- α en células dendríticas humanas infectadas *in vitro* con *Leishmania (V.) guyanensis* y tratadas con pentamidina. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia. 9 p.

10. Gil, E., Cunha, L., Goncalves, A., Souza, R., Valderrama, A., (2007). Importancia de los Compuestos Inorgánicos en el tratamiento de la Leishmaniasis. Latin American Journal of Pharmacy (formerly Acta Farmacéutica Bonaerense) Lat. Am. J. Pharm. 26 (3): 454-61.
11. Ríos, Y., Otero, A., Muñoz, D., Echeverry, M., Robledo, S., Yepes, M. (2008). Actividad citotóxica y leishmanicida *in vitro* del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla*). Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. 37(2).
12. Berenzon, S., Ito-Sugiyama, E., Vargas, L.A. (2006). Enfermedades y padecimientos por los que se recurre a terapeutas tradicionales de la Ciudad de México. Salud Pública Méx. 48:45-56.
13. Beyra, A., León, M. C., Iglesias, E., Ferrándiz, D., Herrera, R., Volpato, G., Godínez, D., Guimaraes, M., Álvarez, R. (2004). Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba). Anales del Jardín Botánico de Madrid. 61(2): 185-204.
14. 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. Biología. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 5 p.
15. Cosme, I. (2008). El uso de las plantas medicinales. Revista Intercultural. Universidad Veracruzana Intercultural. 23-26 p.
16. Navarro ,V., Villarreal, M.L., Rojas, G., Lozoya, X., (1996). Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. Journal of Ethnopharmacology. 53:143-147.
17. Sepúlveda, G., Porta, H., Rocha, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista mexicana de fitopatología. 21(3).
18. Soto, M. (2013). Clase de metabolitos secundarios y ruta de ácido shikímico. Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Farmacia y bioquímica. [En línea] <http://www.slideshare.net/maryluz/clase-de-metabolitos-secundarios-y-ruta-de-acido-shikimico-por-qf-maril-roxana-soto-vsquez>.

19. Bonfil, C., Mendoza, P., Ulloa, J. (2007). Enraizamiento y formación de callos en estacas de siete especies del género *Bursera*. *Agrociencia*. 41(1):103-109.
20. Espinosa, D., Ruiz, R., Becerra, R. (2009). Copales, Diversidad Biológica. CONABIO. [En línea] <http://www.biodiversidad.gob.mx/usos/copales/copales.html>.
21. Serrano, R., Hernández, T., Vázquez, B., Segura, D., Anaya, A.L., Jiménez, M., Canales, M. (2011). Propiedades antiinflamatoria, analgésica y antioxidante de la corteza de *Bursera morelensis* Ramírez, de San Rafael, Coxcatlan, Puebla. *Rev. Latinoamer. Quim.* 38 (Suplemento Especial)
22. Biabiany, M., Roumy, V., Hennebelle, T., Francois, N., Sendid, B., Pottier, M., Aliouat el, M., Rouaud, I., Lohezic-Le Devehat, F., Joseph, H., *et al.* (2013). Antifungal activity of 10 Guadeloupean plants. *Phytotherapy research* : PTR 27, 1640-1645.
23. Rosas-Arreguin, P., Arteaga-Nieto, P., Reynoso-Orozco, R., Villagomez-Castro, J.C., Sabanero-Lopez, M., Puebla-Perez, A.M., and Calvo-Mendez, 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.
24. Rojas, B. (2012). Variación temporal en la composición química del aceite esencial de *Bursera arida* (Rose) (Standl), y validación de su actividad antimicrobiana. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 68 p.
25. Espinosa, L. (2012). Estudio comparativo de la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Bursera Schlechtendalii Engler*. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 35 p.
26. Lopez-Aroche, U., Salinas-Sanchez, D.O., Mendoza de Gives, P., Lopez-Arellano, M.E., Liebano-Hernandez, E., Valladares-Cisneros, G., Arias-Ataide, D.M., y Hernandez-Velazquez, V. (2008). *In vitro* nematocidal effects of medicinal plants from the Sierra de Huautla, Biosphere Reserve, Morelos, México against *Haemonchus contortus* infective larvae. *Journal of helminthology* 82, 25-31.

27. Peters, C.M., Purata S. E, Chibnik M, Brosi B.J, López A. M y Ambrosio M. (2003). The life and times of *Bursera glabrifolia* (HBK) Engl. in México: A parable for ethnobotany Economic Botany. 57(4): 431-441.
28. Domínguez, X.A. (1973). Métodos de Investigación fitoquímica. Ed. Limusa. México. 281 p.
29. Dutta, A., Bandyopadhyay, S., Mandal, C., and Chatterjee, M. (2005). Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. Parasitology international 54, 119-122.
30. Montalvo. C. E. (2010). Técnica histológica. [En línea] http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/PDF/Portal%20de%20Recursos%20en%20Linea/Apuntes/3_tecnica_histologica.pdf
31. Mesa, C., Muñoz, D., Echeverry, M., Velez, I., Robledo, S. (2010). Susceptibilidad *in vitro* a infección por *Leishmania* y sensibilidad a medicamentos difiere según tipo de macrófagos. Salud UIS 42: 200-211.
32. Gorgua, G. (2014). Actividad antileishmánica del extracto metanólico de *Bursera arida* (Rose) Standl. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. 57 p.
33. Ruiz, A.P. (2014). Actividad antileishmánica del extracto metanólico de *B. aptera* Ramírez. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 45p.
34. García, M., Monzote, L., Scull, R., and Herrera, P. (2012). Activity of Cuban Plants Extracts against *Leishmania amazonensis*. ISRN pharmacology 2012, 104540.
35. Rodríguez, M. (2014). Efecto amebicida de los extractos metanólicos de tres especies del género *Bursera* contra *Naegleia fowleri*. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 48p.
36. Aguiar, M.G., Silva, D.L., Nunan, F.A., Nunan, E.A., Fernandes, A.P., and Ferreira, L.A. (2009). Combined topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) major* leads to reduction in both

lesion size and systemic parasite burdens. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 64, 1234-1240.

37. Charret, K.S., Lagrota-Candido, J., Carvalho-Pinto, C.E., Hottz, C.F., Lira, M.L., Rodrigues, R.F., Gomes, A.O., Bernardino, A.M., Canto-Cavalheiro, M.M., Leon, L.L., and Amaral, V.F. (2013). The histopathological and immunological pattern of CBA mice infected with *Leishmania amazonensis* after treatment with pyrazole carbohydrazide derivatives. *Experimental parasitology* 133, 201-210.

38. Hernandez-Ruiz, J., and Becker, I. (2006). [CD8+ cytotoxic lymphocytes in cutaneous leishmaniasis]. *Salud pública de México* 48, 430-439.

39. Melby, P.C., Andrade-Narvaez, F.J., Darnell, B.J., Valencia-Pacheco, G., Tryon, V.V., and Palomo-Cetina, A. (1994). Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. *Infection and immunity*. 62, 837-842.

40. Andreani, G., Ouellet, M., Menasria, R., Gomez, A.M., Barat, C., and Tremblay, M.J. (2015). *Leishmania infantum* amastigotes trigger a subpopulation of human B cells with an immunoregulatory phenotype. *PLoS neglected tropical diseases* 9, e0003543.

41. Abe, F., Nagafuji, S., Yamauchi, T., Okabe, H., Maki, J., Higo, H., Akahane, H., Aguilar, A., Jimenez-Estrada, M., and Reyes-Chilpa, R. (2002). Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in Guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. *Biological & pharmaceutical bulletin* 25, 1188-1191.

42. Kuldeep, L., Rupinder, K., Shveta, S., Amit, K., Singh, S. (2014). Antiinflammatory agents from plants-Part III. *Indian Journal of natural products and resources*. 5(2):121-128

43. Romero, J.C., Martinez-Vazquez, A., Herrera, M.P., Martinez-Mayorga, K., Parra-Delgado, H., Perez-Flores, F.J., Martinez-Vazquez, M. (2014). Synthesis, anti-inflammatory activity and modeling studies of cycloartane-type terpenes derivatives isolated from *Parthenium argentatum*. *Bioorganic & medicinal chemistry* 22, 6893-6898.

44. Azam, M.A., and Suresh, B. (2012). Biological activities of 2-mercaptobenzothiazole derivatives: a review. *Scientia pharmaceutica* 80, 789-823.

45. García, M. E. (1981). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen. 3a ed. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF. 252 p.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. Valiente, A, Alcántara, A., Dávila, P., Flores- Hernández, N., Arismendi, M.C., Ortega-Ramírez, J. y Soriano, J. A. (2000). La vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Boletín de la Sociedad Botánica de México. 67:25-75.
50. 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.
51. 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.
52. INEGI y CONEVAL. (2010). http://www.sedesol.gob.mx/work/models/SEDESOL/Informes_pobreza/2014/Municipios/Puebla/Puebla_035.pdf.

Apéndice

Zona de colecta.

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

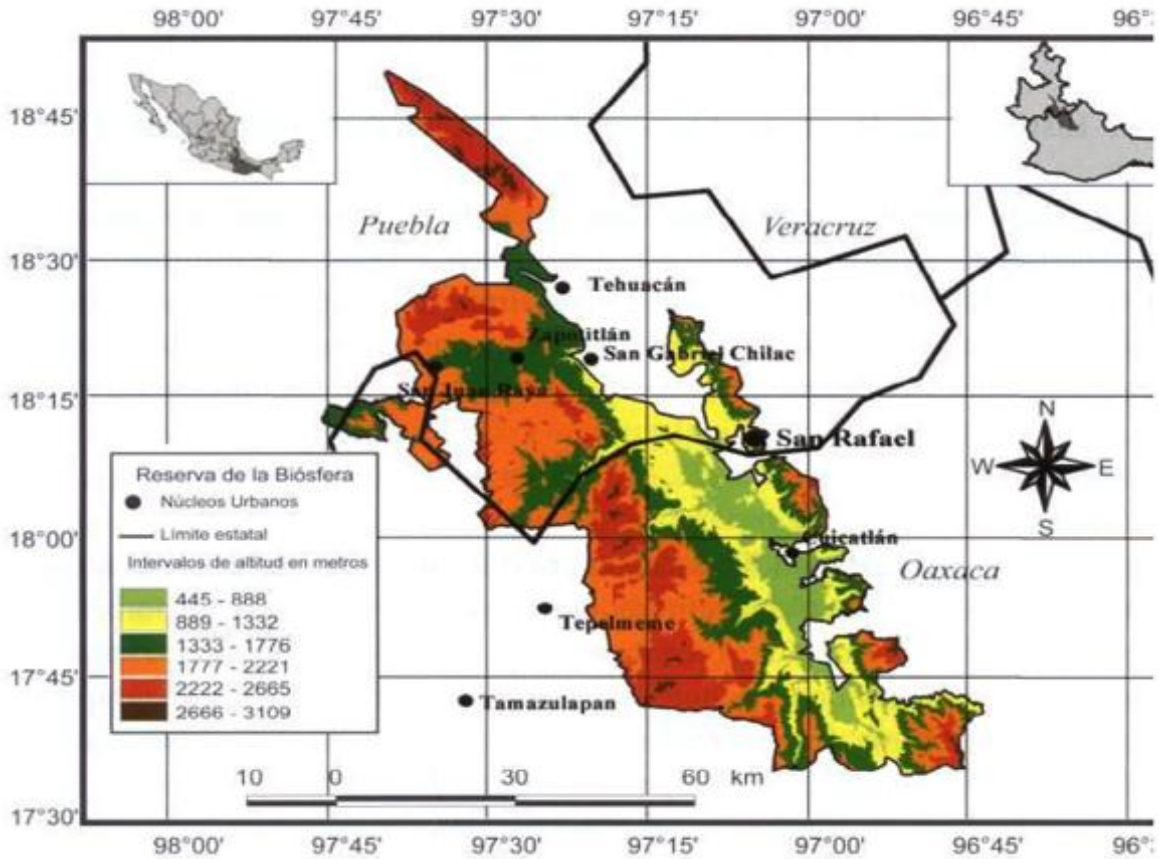


Fig. 25. Ubicación geográfica del poblado de San Rafael Coxcatlan, Puebla.

Clima

El clima es de tipo Bs (h') W'' (w) de acuerdo con la clasificación de Koeppen, modificado por García (45), 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 (46). Valiente (47) calcula una precipitación anual de 364.6 mm para la zona; cerca de los 386.57 mm registrada en 1988 en la estación climática Tilapa, situada a 3.25 Km al sur de la zona de estudio. En 1998 los 763.7 mm de precipitación duplicaron el promedio anual, concentrándose en los meses de junio a noviembre.

Hidrografía

El sureste de Puebla se encuentra irrigado por el Río Salado. La parte sur del Valle de Tehuacán-Cuicatlán es drenado por el Río Grande o Tomellin, que fluye al norte desde Oaxaca; uniéndose cerca de Quitepec los dos forman el Río de Santo Domingo, el cual corta la Sierra Madre de Oaxaca en dirección este y eventualmente se vuelve el Río Papaloapan. El Río Tehuacán encuentra su camino al oeste del Cerro Colorado, para entrar en el Valle de México cerca de San Diego, Chalma. Este pequeño río el cual se convierte en el Río Salado, se une por un número de cortas ramificaciones hasta alcanzar la Sierra Madre de Oaxaca en el noreste (48).

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 hápílicos.

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 (49).

Fernández (50), 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* (Brandeggee), *Fouqueiria formosa* (Kunth), así como arbustos y hierbas como *Sanvitalia fructicosa* (Helms), localizada aproximadamente a 1.5-3.5 m por encima del nivel basal.

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

La población total del municipio de Coxcatlan Puebla en 2010 fue de 19,639 personas, lo cual representa el 0.3% de la población en el estado

La mayor parte de la población actual es nativa de San Rafael y la actividad económica más importantes es la agricultura, cuyo principal ingreso proviene del cultivo de la caña de azúcar. También se dedican a la cría de ganado caprino, la recolección de frutos, semillas, leña y madera para diversos fines (52).