



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
LABORATORIO DE INMUNOBIOLOGÍA

“Actividad anti-leishmánica del propóleo de Chihuahua”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

Balderas Cordero Daniela

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MARCO AURELIO RODRÍGUEZ MONROY



Los Reyes Iztacala, Edo. de México, 2016



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por abrirme sus puertas y darme una excelente formación académica.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy , al M. en C. Oscar Nieto de Jesús Yáñez y al Lic. Alonso Ruíz Hurtado por su tiempo, enseñanzas, consejos, por compartir sus conocimientos y experiencias, por su compromiso y dedicación para la realización de este trabajo.

A la Dra. Ma. Margarita Canales Martínez por su paciencia, colaboración, compromiso, entrega y apoyo para la realización de este proyecto de investigación.

A la Dra. Miriam Rodríguez Sosa por proporcionar durante toda la realización del trabajo la cepa de parásitos necesaria para la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Santiago Martínez Calvillo

A la Dra. Miriam Rodríguez Sosa

Y a la Mtra. María de los Ángeles Sanabria Espinoza

Por sus consejos y por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis.

Al Ingeniero Martín Balcorta Baeza por recolectar y proporcionar el propóleo de Chihuahua necesario para realizar los experimentos del presente estudio.

Este trabajo fue financiado por PAPIIT IN212215, IN211614, IN213713.

Dedicatorias

Dedico esta TESIS con especial cariño a mi FAMILIA que son mi motivación y mi motor todos los días, que me han apoyado en todo momento y que siempre me han brindado el respaldo necesario para salir adelante.

*Primero que nada a ti **Papá**, quiero agradecerte por darme tanto amor y cariño desde que llegue a este mundo, por guiarme en este maravilloso e impredecible viaje llamado VIDA. Eres un Hombre admirable, trabajador, comprometido, exitoso y definitivamente mi mayor ejemplo. Toda mi formación, educación, valores y la mujer que soy te lo debo a ti. Esta princesa no creció frágil porque su rey le enseñó a ser una guerrera, a creer en la bondad de la gente y siempre ayudar al otro, me alientas a soñar en grande, me haz dado las armas y los medios para alcanzar mis sueños y me has enseñado a trabajar duro por lo que quiero, me mantienes centrada, me haz dado la fortaleza para salir adelante ante cualquier dificultad y lo mas importante de todo me haz dado tu amor y apoyo incondicional **TE AMO CON EL ALMA PAPA!!***

*A mi mejor amiga mi **Mamá**, que no agradecerte mami, definitivamente si estoy concluyendo esta etapa de mi vida es por TI, por tus consejos, por tu regaños, por no dejar que me rinda, por alentarme, por escucharme, por apoyarme incondicionalmente, eres mi confidente, mi fortaleza y una mujer extraordinaria. Eres la mujer más admirable en mi vida, por ese coraje al afrontar la vida, por tu paciencia, por el inmenso amor que irradias, por la hermosa familia que has construido, por desvivirte por hacernos felices, por ser una excelente madre, guía y profesionalista, por todas tus virtudes, tu bondad, alegría, paciencia y tu fortaleza para sobrepasar cualquier adversidad. Gracias por cada una de tus enseñanzas, por sentirte tan orgullosa de mi siempre, por apoyarme en mis locuras y alentarme a alcanzar mis ideales. Esta tesis te la dedico a ti mamá por creer en mi , motivarme y estar a mi lado en cada momento de mi vida, en mis éxitos y fracasos siempre con una sonrisa, un abrazo cálido y tu amor infinito. No pude haberle pedido mejor regalo a la vida que tenerte como mi madre **TE AMO!!***

*A mi hermana **Pawii**..Hermosura eres un ángel en mi vida, gracias por hacerme el día con tus ocurrencias, tu espontaneidad, tu risa, tu talento, tu compañía y ese brillo que te caracteriza eres **GRANDE** solo hace falta que tu lo creas y en unos años te veré dar este gran paso a ti también. Siempre luchó por ser mejor y darte el ejemplo eres mi orgullo chaparra te adoro!!*

*A. **Mario** el mejor amigo y hermano que pude haber encontrado, guapo no me queda mas que agradecerte por cada consejo, risa, ridiculez, babosada, llanto juntos pero sobretodo por haber llegado a mi vida y darme una amistad tan sincera y tan fuerte. Gracias por centrarme, creer en mi, hacerme reflexionar, por sacar la mejor versión de mi misma, ponerme los pies en la tierra cuando es necesario y apoyarme incondicionalmente. Una rosa se deshace un castillo se derrumba pero nuestra amistad durara hasta la tumba.....*

*A **Pify** mi primera amiga de la carrera, pequeña aun no lo puedo creer desde el primer día hasta ahora juntas, recuerdo cuando este momento se veía tan lejano, cuando dudamos varias veces si estábamos en la carrera correcta, cuando venias hacer tareas en mi casa y no hacíamos absolutamente nada, cuando me pegabas tus nervios antes de los exámenes pff tantos recuerdos y lo que nos falta por vivir juntas. Gracias por enseñarme de plantitas jajaja no es cierto gracias por ser la amiga mas fiel, leal, honesta, noble y tierna que he tenido, gracias*

por escucharme, darme un abrazo cuando lo necesitaba y darme tu apoyo cuando sentía que ya no podría más, por tu confianza pero sobretodo por brindarme tu sincera amistad. Te quiero muchísimo pequeña !!

A **Jesus**, llegaste a mi vida de la manera mas inesperada y mas hermosa... bailando. Gracias por luchar por mi desde un principio, por todos tus detalles y por todo lo que haces por mi. Por tu optimismo a pesar de las circunstancias, por tu muy peculiar forma de ver la vida (que me estas pegando), por ser tan ambicioso, emprendedor, trabajador, alegre y convertir cada momento juntos en algo mágico. Por llenarme con tu amor, confianza, respeto, paciencia, por creer en mi y alentarme a seguir mis sueños por mas inalcanzables que parezcan, por dejarme ser parte de tu vida, por no rendirme ante nada ni nadie, por apoyarme en cada cosa que hago, por no dejar que el miedo me controle, por tus consejos, tu compañía, tus abrazos, tu sinceridad ,por ser el mejor cómplice, amigo y novio pero sobretodo por amarme tanto y hacerme tan feliz. TE AMO!!

A **George**.... fuiste, eres y serás una persona muy importante en mi vida. Gracias por sacarme de mi zona de confort, por enseñarme que el único que puede limitarse es uno mismo, por haberme hecho hacer cosas que jamás pensé que haría y que disfruto demasiado, por apoyarme en cada paso bueno o malo que he dado, por hacerme enfrentar mi miedos, por hacerme ver la vida de otra manera, por hacerme valorar las cosas mas sencillas, por llevarme por el camino de la biología, por tanto amor, por ser mi soporte, mi amigo, en su momento mi pareja, mi confidente, mi apoyo y mi mas fiel aliado durante tanto tiempo. Descubrir juntos esta carrera fue inolvidable. Gracias por no dejarme caer ni rendirme nunca, por hacerme ver la luz y mostrarme el camino con una sonrisa. Te Quiero!!

A mi sensei **Alonso**, te estoy muy muy agradecida, aunque tengamos nuestras diferencias parte de este gran paso en mi vida te lo debo a ti, desde el inicio que me enseñaste donde estaba cada cosa en el laboratorio y cada detalle de las técnicas hasta a usar algunos programas. Sin duda no pude haber pedido mejor maestro, aprendí demasiado de ti, de tu compromiso, de tu disciplina, tu constancia, de tu forma de ser tan exigente y perfeccionista, eres un gran ejemplo a seguir para mi. Este trabajo lo hicimos juntos y sin tu ayuda y tu horas de enseñanzas esto no hubiera sido posible de corazón GRACIAS. Solo tu y yo sabemos cuantas horas de trabajo, de frustraciones, alegrías, decepciones y festejos nos dieron nuestros parásitos. GRACIAS!!

A mi segunda casa, el laboratorio de **Inmunobiología**

A **Nelly** y **Oscar** aparte de ser seres humanos increíbles por tantas enseñanzas tanto académicas como de vida, por su paciencia, entrega, dedicación y compromiso los admiro mucho. A **Gus**, **Don Ru**, **Vane**, **Judith**, **Fany**, **Mike**, **Mario**, **Less** por tantos momentos compartidos, por ayudarme, apoyarme y por hacerme sentir parte de esta familia Gracias chicos los quiero!!

Al laboratorio de **Farmacognosia** a **Rebeca**, **Hatziri**, **Michael**, **Mara**, **José**, **Alicia**, **Manuel**, **Emmanuel**, **Marlene**, **Karlita**, **Judith** y **Ana** por sus consejos y apoyo a lo largo de este camino.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-----------|
| Resumen | 1 |
| Introducción | 3 |
| Leishmaniosis | 3 |
| Importancia Médica | 4 |
| Tipos de Leishmaniosis..... | 5 |
| Leishmaniosis cutánea (LC) | 6 |
| Leishmaniosis cutánea difusa (LCD)..... | 8 |
| Leishmaniosis cutánea localizada (LCL)..... | 9 |
| Leishmaniosis cutánea localizada en México | 9 |
| Leishmania | 11 |
| Morfología | 11 |
| Ciclo de Vida de <i>Leishmania</i> | 12 |
| Leishmaniosis cutánea por <i>L. mexicana</i> | 13 |
| Respuesta inmunológica | 14 |
| Respuesta inmune celular innata..... | 14 |
| Inmunidad adquirida | 15 |
| La respuesta de citocinas en el modelo murino | 15 |
| La respuesta de citocinas en la leishmaniosis humana | 16 |
| Tratamiento farmacológico | 17 |
| Productos Naturales | 19 |
| Historia del propóleo | 20 |
| Propóleo | 22 |
| Obtención..... | 23 |
| Recolección..... | 23 |
| Composición Química | 24 |
| Propiedades biológicas..... | 25 |
| Metabolitos Secundarios | 27 |
| Fenoles | 27 |
| Terpenos..... | 29 |
| Compuestos secundarios nitrogenados | 29 |
| Antecedentes | 30 |
| Justificación | 31 |
| Hipótesis | 32 |
| Objetivo | 32 |
| Objetivos particulares. | 32 |
| Material y Métodos | 33 |

| | |
|---|-----------|
| Colecta de material | 33 |
| Obtención del extracto..... | 33 |
| Animales de laboratorio | 33 |
| Mantenimiento de la cepa de <i>L. mexicana</i> | 33 |
| Infección de ratones con <i>L. mexicana</i> | 34 |
| Curva patrón para los ensayos de viabilidad de los promastigotes de <i>L. mexicana</i> | 34 |
| Determinación del efecto <i>in vitro</i> del e-EtOH del propóleo de Chihuahua sobre promastigotes de <i>L. mexicana</i> | 34 |
| Estandarización cultivo de amastigotes | 35 |
| Evaluación de la actividad <i>in vivo</i> sobre amastigotes de <i>L. mexicana</i> en un modelo murino de leishmaniosis cutánea..... | 35 |
| Tamaño de la lesión | 35 |
| Determinación de la carga parasitaria..... | 36 |
| Concentración de fenoles totales (CFT)..... | 36 |
| Cuantificación de flavonoides | 36 |
| Capacidad antioxidante..... | 36 |
| Partición del e-EtOH del propóleo de Chihuahua | 37 |
| Caracterización química | 37 |
| Cromatografía Líquida De Alta Resolución (HPLC) | 37 |
| Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) | 37 |
| Citocinas..... | 38 |
| Resultados..... | 39 |
| Obtención del extracto..... | 39 |
| Actividad anti-leishmánica <i>in vitro</i> del e-EtOH del propóleo de Chihuahua sobre promastigotes de <i>L. mexicana</i>. | 39 |
| Estandarización de la técnica para el cultivo de amastigotes de <i>L. mexicana</i>..... | 41 |
| Actividad anti-leishmánica <i>in vitro</i> del e-EtOH del propóleo de Chihuahua sobre amastigotes de <i>L. mexicana</i>. | 41 |
| Efecto anti-leishmánico <i>in vivo</i> sobre amastigotes de <i>L. mexicana</i> en un modelo murino de leishmaniosis cutánea..... | 42 |
| Disminución del tamaño de la lesión | 42 |
| Disminución de la carga parasitaria..... | 43 |
| Determinación de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante del e-EtOH del propóleo de Chihuahua. | 44 |
| Particiones del e-EtOH del propóleo de Chihuahua..... | 44 |
| Caracterización química | 45 |
| Cromatografía Líquida De Alta Resolución (HPLC) | 45 |
| Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) | 51 |
| Efecto del e-EtOH de propóleo de Chihuahua en el perfil de citocinas Th2. | 56 |
| Discusión | 57 |

| | |
|---------------------------|-----------|
| Conclusiones | 64 |
| Referencias..... | 64 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Ejemplar del género <i>Lutzomyia</i> | 4 |
| Figura 2. Niña con leishmaniosis visceral | 6 |
| Figura 3. Paciente con leishmaniosis mucocutánea | 6 |
| Figura 4. Niño con leishmaniosis cutánea | 7 |
| Figura 5. Distribución global de la leishmaniosis cutánea | 8 |
| Figura 6. Distribución y número de casos encontrados de leishmaniosis cutánea en México ... | 10 |
| Figura 8. Morfología de los estadios del género <i>Leishmania</i> | 11 |
| Figura 9. Formas de <i>Leishmania</i> en el vector y en el humano | 12 |
| Figura 10. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> | 13 |
| Figura 11. Respuesta inmune en el modelo de leishmaniosis murina | 16 |
| Figura 12. Diversas estructuras de compuestos fenólicos | 28 |
| Figura 13. Estructura química de los flavonoides..... | 29 |
| Figura 14. Isopreno, estructura básica de los terpenos. | 29 |
| Figura 15. Rendimiento del e-EtOH del propóleo de Chihuahua..... | 39 |
| Figura 16. Curva de crecimiento de los promastigotes de <i>L. mexicana</i> | 40 |
| Figura 17. Curva del efecto inhibitorio <i>in vitro</i> del propóleo de Chihuahua sobre promastigotes de <i>L. mexicana</i> | 40 |
| Figura 18. Número de amastigotes de <i>L.mexicana</i> a diferentes valores de pH. | 41 |
| Figura 19. Curva del efecto anti-leishmánico del propóleo de Chihuahua sobre amastigotes de <i>L. mexicana</i> | 42 |
| Figura 20. Curva del efecto <i>in vivo</i> del propóleo de Chihuahua..... | 43 |
| Figura 21. Carga parasitaria | 43 |
| Figura 22. Capacidad antioxidante del propóleo de Chihuahua | 44 |
| Figura 23. Rendimiento de las 3 particiones del e-EtOH del propóleo de Chihuahua | 45 |
| Figura 24. Cromatograma del HPLC de la partición hexánica del e-EtOH del propóleo de Chihuahua | 46 |

| | |
|---|----|
| Figura 25. Cromatograma del HPLC de la partición diclorometánica del e-EtOH del propóleo de Chihuahua | 47 |
| Figura 26. Cromatograma del HPLC de la partición metanólica del e-EtOH del propóleo de Chihuahua | 48 |
| Figura 27. Cromatografía de gases de la partición hexánica del e-EtOH del propóleo de Chihuahua | 52 |
| Figura 28. Cromatografía de gases de la partición con diclorometano del e-EtOH del propóleo de Chihuahua | 53 |
| Figura 29. Cromatografía de gases de la partición metanólica del e-EtOH del propóleo de Chihuahua | 54 |
| Figura 30. Concentración de las citocinas IL-4 e IL-10 | 56 |
| Figura 31. Esquema del los estadios del ciclo vital de un flebótomo | 81 |
| Figura 32. Ubicación del apiario donde se realizó la colecta del propóleo de Chihuahua | 82 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Especies de <i>Leishmania</i> causantes de las distintas formas clínicas de leishmaniosis en el hombre | 5 |
| Cuadro 2. Especies causantes de leishmaniosis cutánea. | 7 |
| Cuadro 3. Ventajas y desventajas del tratamiento farmacéutico para la leishmaniosis | 18 |
| Cuadro 4. Tiempo de retención y $\lambda_{\text{máx}}$ de la partición hexánica del e-EtOH del propóleo de Chihuahua. | 46 |
| Cuadro 5. Tiempo de retención y $\lambda_{\text{máx}}$ de la partición diclorometánica del e-EtOH del propóleo de Chihuahua. | 47 |
| Cuadro 6. Tiempo de retención y $\lambda_{\text{máx}}$ de la partición metanólica del e-EtOH del propóleo de Chihuahua. | 49 |
| Cuadro 7. Reportes de las actividades biológicas presentes en los compuestos identificados mediante HPLC en las 3 particiones del propóleo de Chihuahua. | 50 |
| Cuadro 8. Compuestos presentes en la partición hexánica del e-EtOH del propóleo de Chihuahua. | 52 |
| Cuadro 9. Compuestos presentes en la partición diclorometánica del e-EtOH del propóleo de Chihuahua. | 53 |
| Cuadro 10. Compuestos presentes en la partición metanólica del e-EtOH del propóleo de Chihuahua. | 54 |

| | |
|--|-----------|
| Cuadro 11. Actividades biológicas reportadas para los compuestos identificados mediante GC-MS en las 3 particiones del propóleo de Chihuahua..... | 55 |
| Cuadro 12. Concentraciones para preparar la curva patrón con ac. gálico | 83 |
| Cuadro 13. Concentraciones para la curva patrón de quercetina | 84 |

ÍNDICE DE APÉNDICES

| | |
|--|-----------|
| Apéndice 1. Biología del vector | 80 |
| Apéndice 2. Zona de Colecta..... | 81 |
| Apéndice 3. Concentración de fenoles totales (CFT)..... | 83 |
| Apéndice 4. Cuantificación de flavonoides | 84 |
| Apéndice 5. Actividad antioxidante..... | 85 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|--|
| CA₅₀ | Concentración antioxidante media |
| CF₅₀ | Concentración fungicida media |
| CFT | Concentración de fenoles totales |
| CL₅₀ | Concentración letal media |
| DPPH | 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil |
| e-EtOH | Extracto etanólico |
| e AG | Equivalentes de ácido gálico |
| e Q | Equivalentes de quercetina |
| FESI | Facultad de Estudios Superiores Iztacala |
| GC-MS | Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas |
| HPLC | Cromatografía Líquida de Alta Resolución |
| IL | Interleucina |
| LC | Leishmaniosis cutánea |
| LCD | Leishmaniosis cutánea difusa |
| LCL | Leishmaniosis cutánea localizada |
| LMC | Leishmaniosis mucocutánea |
| LV | Leishmaniosis visceral |
| µg | Microgramos |
| mg | Miligramos |
| MTT | Bromuro de [3-4, 5- dimetiltiazo-2-ilo] -2,5-difeniltetrazolio |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| SFB | Suero fetal bovino |

Resumen

El propóleo es una sustancia producida por las abejas a partir de diversas especies de plantas. Su composición química es muy variable, ya que depende del origen botánico, estación del año, de la parte de la planta que sea recolectada, así como de las condiciones geográficas y climáticas. Desde la antigüedad ha sido ampliamente reconocido por sus abundantes propiedades biológicas entre las que destacan la actividad anti-inflamatoria, antibacteriana, antioxidante y cicatrizante; en los últimos años se ha demostrado su potente actividad como anti-parasitario. *Leishmania*, es un género de protozoos parásitos intracelulares, causante de la enfermedad conocida como leishmaniosis. La terapia existente para esta patología se basa en medicamentos que han demostrado ser ineficientes y tener graves efectos secundarios debido a su alta toxicidad, aunado a que el parásito ha desarrollado resistencia debido a que estos tratamientos se han utilizado por más de 90 años. Por ello surge la necesidad de buscar nuevas alternativas para el tratamiento de esta enfermedad; diversos autores sugieren que los productos naturales representan una importante y prometedora alternativa para descubrir nuevas moléculas que sean útiles para el tratamiento de este padecimiento, por lo cual en el presente estudio se evaluó el efecto del extracto etanólico (e-EtOH) de propóleo de Chihuahua sobre *Leishmania mexicana*. Cabe destacar que la información terapéutica respecto a propóleos mexicanos es muy limitada.

La obtención del e-EtOH del propóleo de Chihuahua se realizó por el método de maceración. Se demostró la actividad anti-leishmánica *in vitro* del propóleo de Chihuahua sobre promastigotes y amastigotes de *L. mexicana*, encontrándose una CL₅₀ de 0.039 mg/mL y 0.0082 mg/mL, respectivamente con el método de viabilidad celular con MTT. Se estandarizó la técnica para el cultivo de amastigotes de *L. mexicana* donde se observó que el óptimo crecimiento se da suplementando medio Schneider con 20% SFB a un pH de 5.4 e incubando a una temperatura de 37°C. Posteriormente se evaluó la actividad *in vivo*, se midió el tamaño de la lesión durante el periodo de tratamiento y se determinó la carga parasitaria de las lesiones mediante la técnica de dilución limitante. Los resultados mostraron una disminución significativa en el tamaño y la carga parasitaria de las lesiones tratadas con propóleo comparadas con el grupo control. Para determinar la composición química del propóleo se evaluó la concentración de fenoles totales (CFT) por medio del reactivo de Folin-Ciocalteu, donde se encontró que 314 mg e AG/g extracto

son fenoles; se realizó la cuantificación de flavonoides donde se obtuvo que 62.58 μg e Q/g extracto son flavonoides y se determinó la actividad antioxidante por medio del método de reducción del radical DPPH, se obtuvo un valor de CA_{50} de 15.75 $\mu\text{g/mL}$, lo que nos indica que el propóleo tiene una buena capacidad antioxidante. Asimismo, se realizó la caracterización química de los metabolitos secundarios presentes en el propóleo, mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS). Con base en el tiempo de retención y la UV máxima de cada muestra, se identificaron por HPLC 9 compuestos, también se encontró la presencia de algunos flavonoles, flavanonas, fenoles y fenantrenos. De acuerdo al tiempo de retención y a patrones de fragmentación se identificaron mediante GC-MS 23 compuestos más, la mayoría de ellos ac. grasos. Finalmente se evaluó la concentración de las citocinas IL-4 e IL-10 en suero con el kit Bio-Plex Pro Assays de la marca BIO-RAD, donde se encontró una disminución de estas citocinas anti-inflamatorias en el grupo tratado con propóleo comparado con el grupo control. Se concluye que el extracto etanólico de propóleo de Chihuahua posee un efecto anti-leishmánico directo sobre *L. mexicana*; esta actividad se le atribuye al efecto sinérgico de los compuestos identificados en el propóleo, los cuales comparados con la bibliografía respaldan los resultados encontrados. Cabe destacar que ésta es la primera vez que se propone una alternativa tópica a base de un producto natural como el propóleo para el tratamiento de esta patología.

Introducción

Las enfermedades infecciosas tienen un impacto significativo en la salud humana; una gran variedad de estas enfermedades son causadas por parásitos propiciados por condiciones de pobreza, las cuales son denominadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como “enfermedades tropicales desatendidas”. Cerca de mil millones de personas de todo el mundo, principalmente en las regiones tropicales, sufren de por lo menos una de estas enfermedades. Entre éstas, destacan las infecciones causadas por protozoarios, tales como la enfermedad de Chagas, la enfermedad africana del sueño y la leishmaniosis; estos protozoos parásitos son responsables de una alta tasa de mortalidad y morbilidad cada año. La situación actual se ve agravada por el hecho de que la mayoría de las personas que viven en estos países, tienen bajos ingresos, lo cual hace que no sea económicamente atractivo para las industrias farmacéuticas invertir en el desarrollo de nuevas terapias para estas patologías; incluso la incidencia mundial de éstas es cada vez mayor aunado a que las terapias existentes se basan en medicamentos que se han utilizado desde hace más de 9 décadas, presentando diversos efectos secundarios con repercusiones importantes a la salud y que no se encuentran disponibles para las poblaciones afectadas. Por ello, existe una urgente necesidad de descubrir y desarrollar drogas nuevas seguras y accesibles; por lo cual los productos naturales representan una importante y prometedora alternativa para descubrir nuevas moléculas que sean útiles para el tratamiento de estos padecimientos (Ndjonka *et al.*, 2013, Seminal Workshop, 2011).

Leishmaniosis

La leishmaniosis es una enfermedad zoonótica y antroponótica parasitaria causada por distintas especies de protozoarios intracelulares obligados dimórficos del género *Leishmania*, los cuales son transmitidos al hombre y a otros mamíferos a través de la picadura de flebotomos hembra infectados, éstos son un grupo de insectos hematófagos, pertenecientes a los géneros *Phlebotomus* en Europa, Asia y África; y *Lutzomyia* en América (Figura 1) (Berrueta, 2014; OMS, 2014; CDC, 2013) (Apéndice 1).

De las 30 especies conocidas que pueden infectar mamíferos, 21 pueden causar algún tipo de leishmaniosis en el hombre provocando un conjunto de síndromes clínicos que pueden implicar la piel, las mucosas y las vísceras (Berrueta, 2014; PAHO, 2013).



Figura 1. Ejemplar del género *Lutzomyia*.

Importancia Médica

Según la OMS, las leishmaniosis están entre las seis enfermedades tropicales y las dos parasitosis más importantes en el mundo. La distribución mundial de esta patología está limitada por la presencia del vector en climas cálidos. La enfermedad es endémica en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo y está considerada por la OMS como una de las enfermedades tropicales desatendidas (López, 2012; Ndjonka *et al.*, 2013).

La leishmaniosis se encuentra abarcando un amplio espectro de ecosistemas, que va desde las selvas tropicales de América Central y América del Sur hasta los desiertos de Asia occidental; ésta prevalece en 98 países, 3 territorios y 5 continentes. Se estiman 1.3 millones de casos nuevos al año, aunque en realidad solamente se reporta la mitad; debido a ello se considera que aproximadamente hay 350 millones de personas en riesgo de contraer leishmaniosis y tanto la mortalidad como la morbilidad de esta enfermedad a nivel mundial muestran una preocupante tendencia que va en aumento (OMS, 2010; CDC, 2013; OMS, 2013).

Esta enfermedad afecta a las poblaciones más pobres del planeta, se encuentra asociada a la malnutrición, a los desplazamientos poblacionales, a las malas condiciones de vivienda, a la debilidad del sistema inmunitario, a la falta de recursos, a cambios ambientales (urbanización) y a cambios climáticos (OMS, 2014).

Tipos de Leishmaniosis

Dependiendo de la especie de *Leishmania* que causa la infección y de la respuesta inmunológica del hospedero, la enfermedad puede presentarse en distintas formas clínicas, causando daños en órganos internos como hígado, bazo y médula ósea (leishmaniosis visceral); mucosas (leishmaniosis mucocutánea) y en la piel (leishmaniosis cutánea) (OMS, 2013; CDC, 2013; Wilkins, 2010). Las especies de *Leishmania* causantes de cada uno de estos tipos de leishmaniosis se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Especies de *Leishmania* causantes de las distintas formas clínicas de leishmaniosis en el hombre (Basado en OMS 2010 y Berrueta, 2014).

| Leishmaniosis: | Visceral | Cutánea | Mucocutánea |
|----------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------|
| Viejo mundo | <i>L. donovani</i> | <i>L. infantum</i> | <i>L. infantum</i> |
| | <i>L. infantum</i> | <i>L. tropica</i> (antroponótica) | <i>L. tropica</i> |
| | (<i>chagasi</i>) | <i>L. major</i> (zoonótica) | <i>L. major</i> |
| | | <i>L. aethiopica</i> | |
| | | <i>L. donovani</i> | |
| Nuevo Mundo | <i>L. infantum</i> | <i>L. infantum</i> | <i>L. braziliensis</i> |
| | | <i>L. mexicana</i> | <i>L. panamensis</i> |
| | | <i>L. braziliensis</i> | |
| | | <i>L. panamensis</i> | |
| | | <i>L. guyanensis</i> | |
| | | <i>L. peruviana</i> | |
| | <i>L. amazonensis</i> | | |

Leishmaniosis visceral o kala-azar (LV)

La LV se caracteriza por episodios irregulares de fiebre, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia y anemia (Figura 2). Es altamente endémica en el subcontinente Indio y África oriental. Se estima que cada año se producen en el mundo entre 200 000 y 400 000 nuevos casos de leishmaniosis visceral, más del 90% de ellos en seis países: Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Sudán y Sudán del Sur. Puede llegar a ser mortal si no se trata (OMS, 2014).



Figura 2. Niña con leishmaniosis visceral en cuyo vientre se ha marcado el aumento de tamaño del hígado y del bazo. Distrito de Libo Kemkem, Etiopía (OMS, 2014-2).

Leishmaniosis mucocutánea (LMC)

La LMC conduce a la destrucción parcial o completa de las membranas mucosas de la nariz, la boca y la garganta (Figura 3), aparece como una complicación del mal tratamiento de la leishmaniosis cutánea. Aproximadamente un 90% de los casos de este tipo, se producen en Brasil, Bolivia y Perú (OMS, 2014).



Figura 3. Paciente con leishmaniosis mucocutánea (Ampuero, 2000).

Leishmaniosis cutánea (LC)

Es la forma más común de la enfermedad, provoca úlceras en las zonas expuestas del cuerpo y deja cicatrices permanentes y discapacidades graves (Figura 4). Se calcula que cada año se producen en el mundo entre 0.7 y 1.3 millones de casos nuevos, aproximadamente un 95% de los casos de leishmaniosis cutánea se producen en América, la cuenca del Mediterráneo, Oriente

Medio y Asia Central. Más de dos terceras partes de los casos nuevos aparecen en seis países: Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, República Islámica de Irán y República Árabe de Siria (OMS, 2014).



Figura 4. Niño de Kabul (Afganistán) con leishmaniosis cutánea (OMS, 2014-2).

La LC es la forma de la infección con mayor distribución a nivel mundial (Figura 5). Las características clínicas de esta parasitosis tienden a presentar variaciones entre las regiones y dentro de una misma región, dependiendo de las especies del parásito (Cuadro 2) o del tipo de ciclo zoonótico en cuestión, del estado inmunitario del paciente y, quizá de un condicionamiento genético de la respuesta del paciente (OMS, 2010).

Cuadro 2. Especies causantes de leishmaniosis cutánea.

| Viejo Mundo (Eurasia y África) | Nuevo Mundo (América, Oceanía) |
|--|--|
| <i>L. tropica</i> | <i>L. mexicana</i> |
| <i>L. major</i> | <i>L. braziliensis</i> |
| <i>L. aethiopica</i> | <i>L. panamensis</i> |
| <i>L. infantum</i> | <i>L. guyanensis</i> |
| <i>L. donovani</i> | <i>L. peruviana</i> |

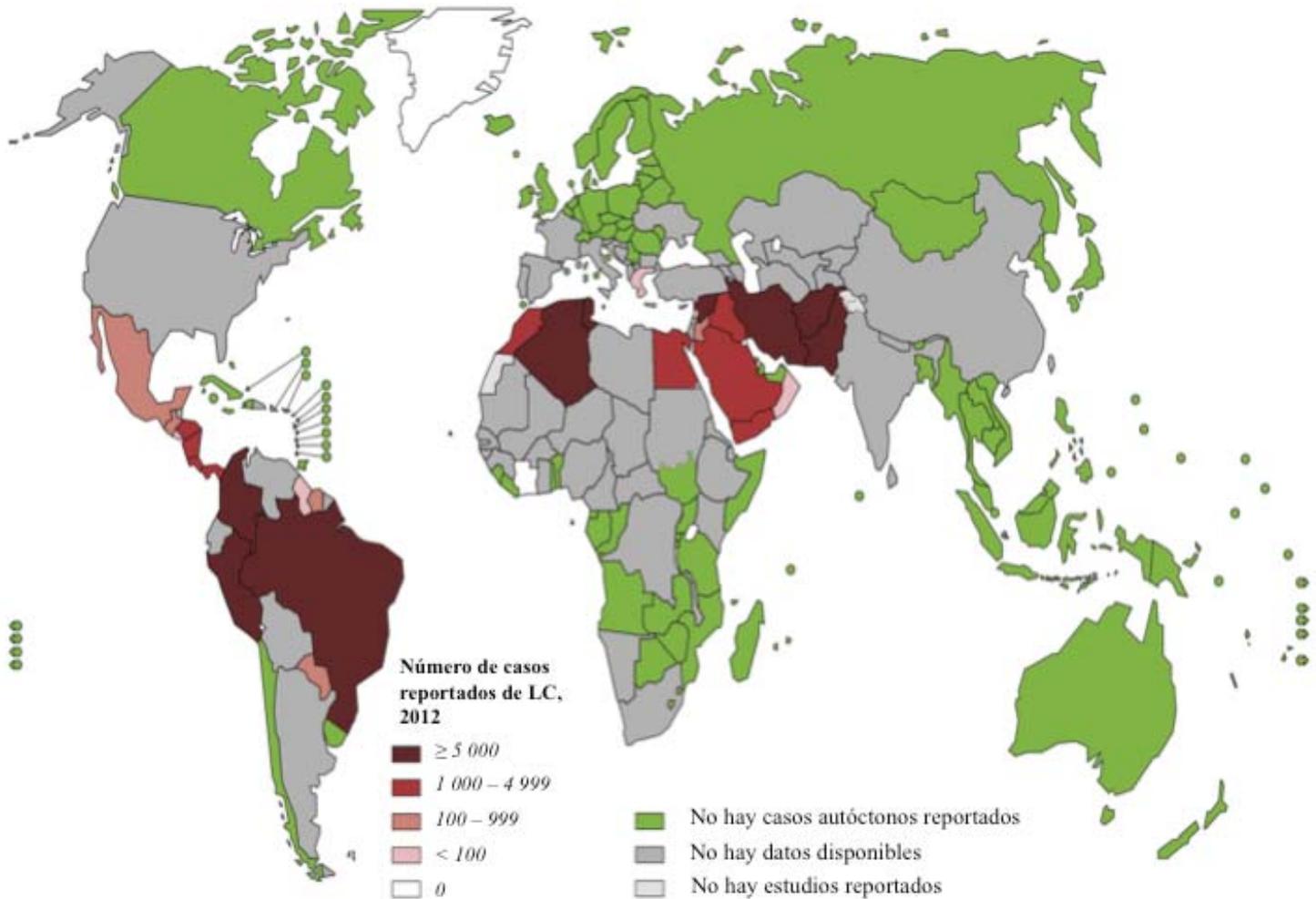


Figura 5. Distribución global de la leishmaniosis cutánea en el 2012. De: World Health Organization Map Production: Control of neglected Tropical Diseases (NTD)(Berrueta, 2014).

Se consideran dos cuadros clínicos cutáneos: leishmaniosis cutánea localizada (**LCL**), generalmente limitada al sitio de inoculación gracias a una respuesta inmune celular que la contiene, y leishmaniosis cutánea diseminada (**LCD**) caracterizada por una pobre respuesta inmune celular, que permite la diseminación no controlada en piel (Berrueta, 2014).

Leishmaniosis cutánea difusa (LCD)

La **LCD** se presenta como consecuencia de factores inmunes del hospedero, asociada a ciertas especies del parásito, hasta ahora a *L. mexicana* y *L. amazonensis*. Se caracteriza por lesiones nodulares con gran número de parásitos, diseminadas sobre todo en las superficies extensoras de

los miembros y en la cara, aunque prácticamente aparecen en todo el tegumento, con excepción del cuero cabelludo, regiones inguinal y axilar, genitales externos, plantas y palmas, aunque se han reportado excepciones. En este tipo de infección, no existe ulceración, la enfermedad es de curso crónico, se presentan resistencias a los medicamentos y las recidivas tras el tratamiento son frecuentes (OMS, 2010; Berrueta, 2014).

Leishmaniosis cutánea localizada (LCL)

La LCL es causada por *L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, y *L. peruviana* (Berrueta, 2014). Las lesiones pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo, pero generalmente se originan en el punto de inoculación (sitio de la mordedura) como una mácula seguida de una pápula que crece lentamente, se ulcera y se extiende para formar una lesión crateriforme redondeada u ovalada, o bien evolucionan como lesiones nodulares, las cuales pueden aparecer semanas, meses o incluso años después de la infección; en el centro se forma una costra que acaba desprendiéndose y deja al descubierto la úlcera, la cual se cura gradualmente, dejando una cicatriz deprimida con alteración de la pigmentación. Frecuentemente aparecen nódulos satélite en el borde de la lesión; estas heridas pueden llegar a producir lesiones destructivas, desfigurantes e incluso discapacitantes (OMS, 2010; Berrueta, 2014).

En un análisis realizado en varios países, entre el año 2010 y 2013 se observó un aumento en el número de casos reportados de leishmaniosis cutánea y mucocutánea, entre estos países se encuentra México (PAHO, 2015).

Leishmaniosis cutánea localizada en México

En México la leishmaniosis se ha identificado en 22 entidades federativas en las 3 formas clínicas. La mayoría de los casos corresponden a LCL, la cual se ha reportado en al menos 20 estados, principalmente en el sureste del país en los estados de Veracruz, Tabasco, Oaxaca, Chiapas, Nayarit, Yucatán, Quintana Roo y Campeche (Figura 6). También se han encontrado casos en Coahuila, Nuevo León y Tamaulipas, Hidalgo y San Luis Potosí. La especie identificada ha sido *Leishmania mexicana*; en Nayarit y Campeche se han identificado las especies *L. mexicana* y/o *L. braziliensis* (López, 2012; Berrueta, 2014). Es importante resaltar

que la leishmaniosis cutánea del Nuevo Mundo raramente se resuelve de manera espontánea y su evolución puede ser grave (OMS, 2010).

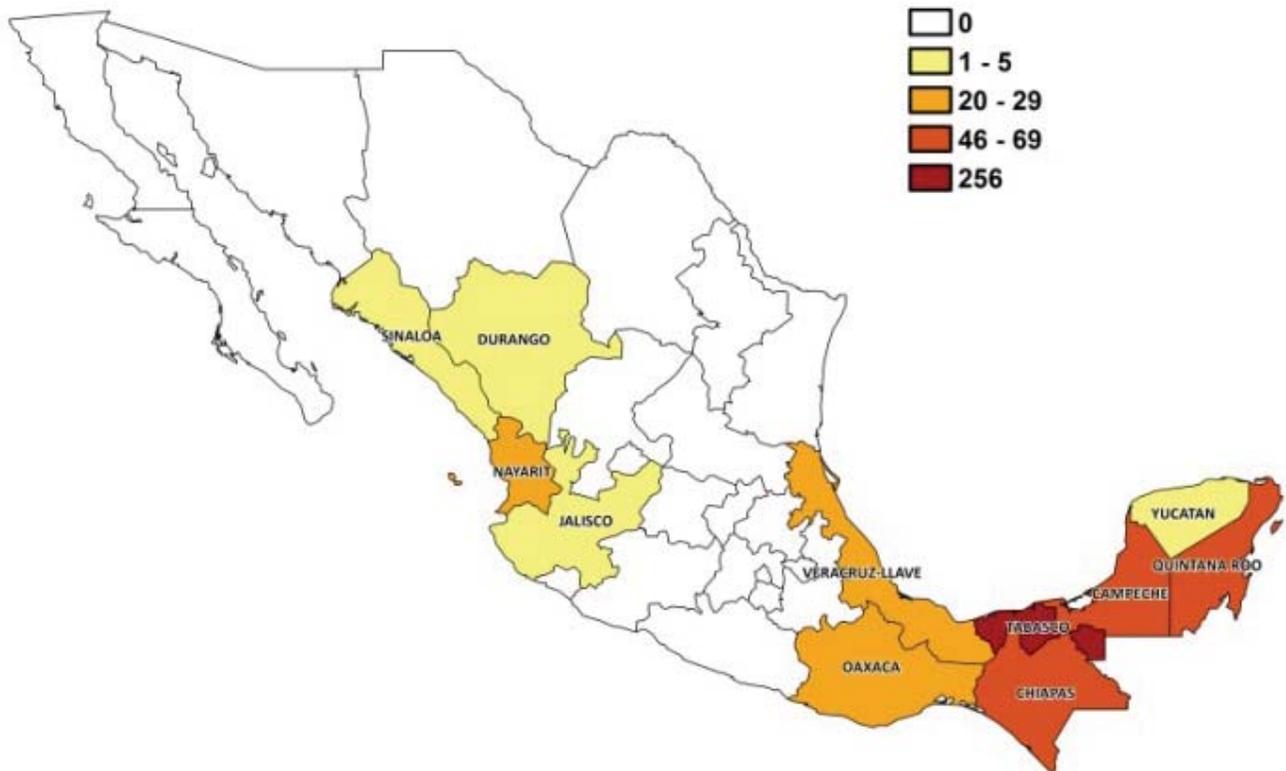


Figura 6. Distribución y número de casos encontrados de leishmaniosis cutánea en México en el año 2009 (Alvar *et al.*, 2012).

En el sur de México, la leishmaniosis cutánea también es conocida como “úlceras del chiclero”, ésta es causada por la especie *L. mexicana*, la cual es endémica de nuestro país. Fue descrita por primera vez en 1912 en el estado de Yucatán, donde se observaron casos en hombres que se dedicaban a extraer goma del árbol del chicle. La manifestación clínica de la “úlceras del chiclero” se caracteriza por lesiones en el cartílago auricular que puede llegar a la necrosis total y se presenta inflamación en los ganglios linfáticos cercanos al sitio de infección (Figura 7) (Wilkins, 2010).

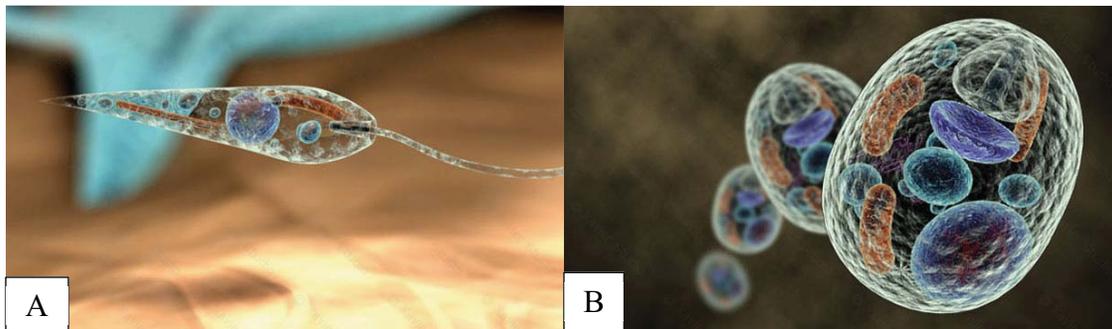


Figura 7. Lesión del cartílago auricular

Leishmania

Morfología

Leishmania, en los hospederos mamíferos se localiza en macrófagos y células dendríticas (células de Langerhans en la piel); la fase infectante, el promastigote (metacíclico), es elongado, extracelular, se desarrolla y multiplica en el tracto digestivo de los insectos transmisores; mide 10 - 20 μm , sin contar la longitud de un único flagelo, cuyo tamaño oscila entre 15 - 25 μm ; presenta un gran núcleo central, ribosomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, vesículas y una mitocondria. El cinetoplasto, el cual es una subestructura de la mitocondria, con DNA único y se encuentra asociado al bolsillo flagelar y al cuerpo basal del flagelo; aparece como una banda granular dentro de la mitocondria, el axonema que se origina en el cuerpo basal está contenido dentro del bolsillo flagelar (Figura 8, A). La forma replicativa y patogénica de *Leishmania*, el amastigote, puede ser redondo u oval, es la fase intracelular, reside y se multiplica en fagolisosomas dentro de fagocitos mononucleares de los hospederos. Mide 2 - 4 μm ; cuentan con un gran núcleo y un cinetoplasto pequeño (Figura 8, B) (Berrueta, 2014).



© 2006 Kenneth Xavier Probst. All Rights Reserved

Figura 8. Morfología de los estadios del género *Leishmania*; (A) promastigote de *L. donovani* y (B) amastigote de *L. donovani*.

La infección por *Leishmania* involucra un proceso de adherencia, entrada y establecimiento del parásito en los macrófagos. La entrada del parásito en los fagocitos mononucleares está mediada por interacciones específicas entre los receptores de membrana del macrófago y los ligandos localizados en la superficie del parásito. Los ligandos involucrados en la adherencia e invasión son moléculas propias de la membrana del parásito, la glicoproteína de 63 kDa (gp63) y el lipofosfoglicano (LPG). Una vez que suceden estas interacciones específicas, los promastigotes

entran en el macrófago del hospedero donde se transforman en amastigotes con capacidad para resistir los mecanismos de defensa intracelular (Figura 9) (Lenis, 1998).

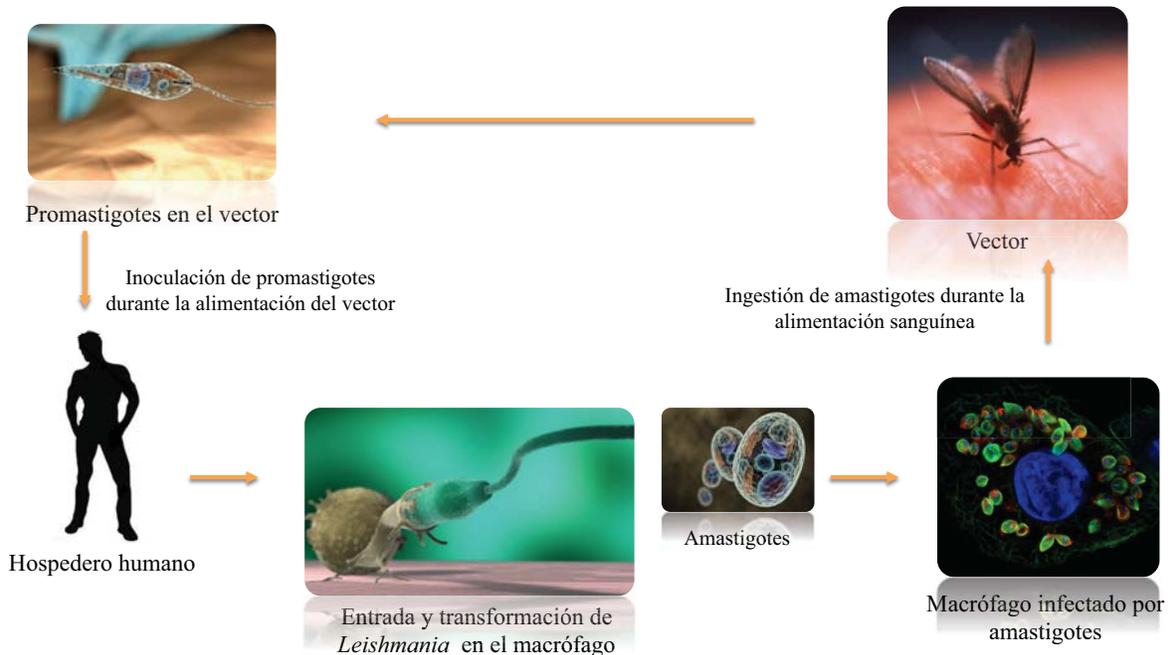


Figura 9. Formas de *Leishmania* en el vector y en el humano. Se presentan las dos formas de su ciclo de vida; los promastigotes y los amastigotes (modificado de Lenis, 1998).

Ciclo de Vida de *Leishmania*

La fase infectiva en el ciclo de vida del parásito tiene 2 etapas, la que ocurre en el humano y la que se presenta en el insecto. En el flebótomo, el parásito se encuentra en el intestino y es inoculado en la piel de un hospedero vertebrado a través de su probóscide durante la mordedura mientras ocurre la ingesta de sangre, cuando la mosca inyecta la etapa infecciosa (promastigotes metacíclicos). Éstos últimos, al llegar a la herida de punción, son fagocitados por los macrófagos y otros tipos de células fagocíticas mononucleares; dentro de estas células se transforman en la etapa patogénica (amastigotes). Éstos últimos se reproducen rápidamente por fisión binaria, lisan el macrófago y proceden a infectar otras células fagocíticas mononucleares. El parásito, el hospedero y otros factores en conjunto, determinan si la infección se vuelve sintomática y el tipo de leishmaniosis que se desarrolle en el hospedero (CDC, 2013); aunado a la intensidad de la respuesta inflamatoria, la cual es un importante factor determinante de la medida en que la enfermedad permanezca localizada y de las secuelas clínicas de la infección (OMS, 1996). El ciclo de infección del flebótomo inicia cuando éste ingiere células infectadas durante su

alimentación (mordedura), los amastigotes se transforman en promastigotes en su intestino y migran a la probóscide, para dar inicio al ciclo nuevamente (CDC, 2013) (Figura 10).

Los vectores se infectan al ingerir sangre de reservorios animales que incluyen perezosos, marsupiales, perros y roedores infectados con las especies patógenas para el hombre (Lenis, 1998).

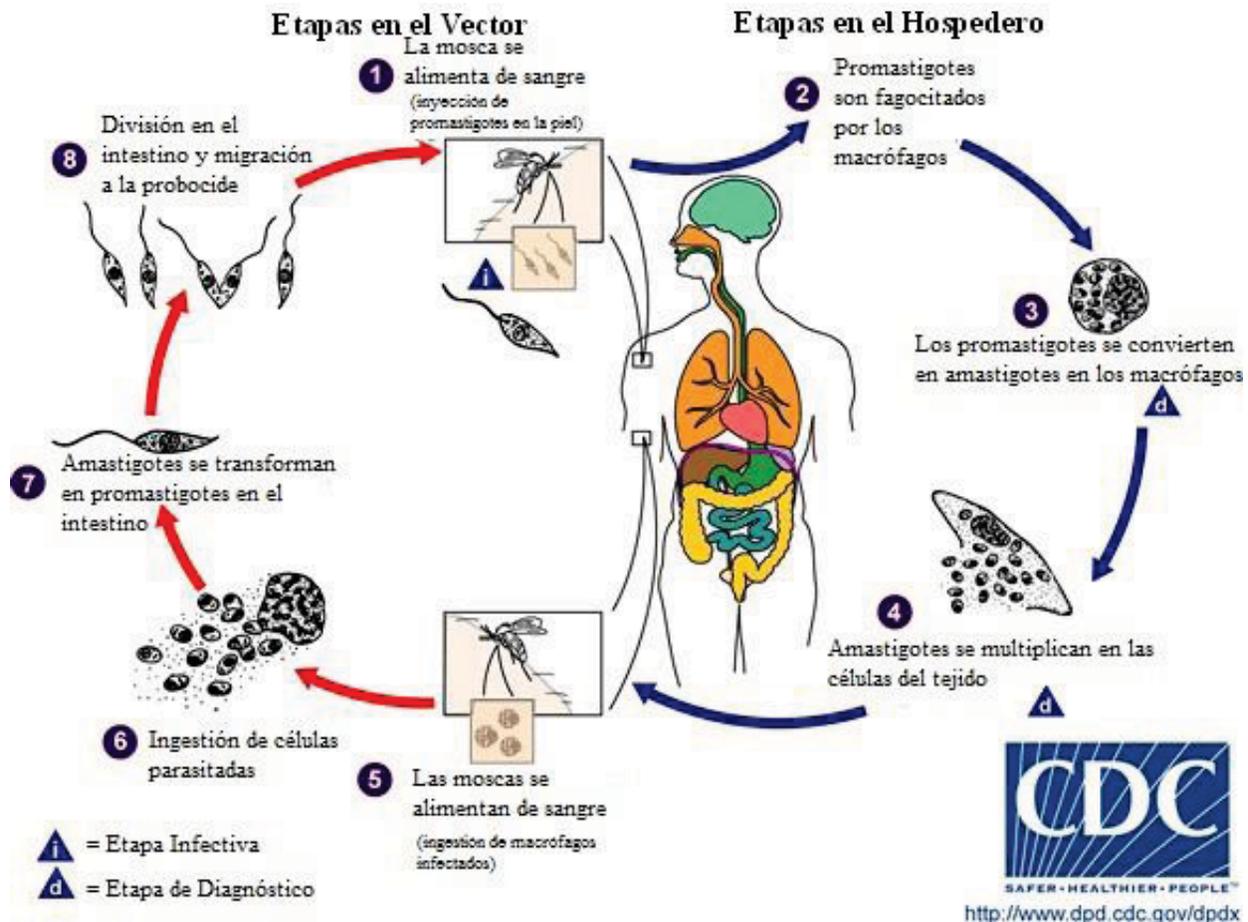


Figura 10. Ciclo de vida de *Leishmania* (CDC, 2013).

Leishmaniosis cutánea por *L. mexicana*

Distribución geográfica: Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, EE.UU., Guatemala, Guayana Francesa, México, Perú, Surinam y Venezuela.

Los vectores confirmados son *Lutzomyia olmeca olmeca*, *L. ayacuchensis*, *L. flaviscutellata* y *L. longipalpis*; aunque hay muchas otras especies sospechosas. Los huéspedes reservorios son una gran variedad de roedores y marsupiales de la selva, implicadas en el ciclo de transmisión de

L. mexicana. El roedor *Otodylomys* spp. conocido comúnmente como rata trepadora orejuda es el huésped primario en Belice y en la península de Yucatán, México (OMS, 2010).

Respuesta inmunológica

El control de *Leishmania* en el huésped es mediado por las respuestas inmunitarias innata y adaptativa. La inmunidad innata actúa en la fase inicial de la infección y se encuentra mediada por los macrófagos, mientras que la inmunidad adaptativa es específica para el antígeno y se desencadena cuando los linfocitos del sistema inmune reconocen determinantes antigénicos del patógeno que han sido previamente presentados a los linfocitos T. La inmunidad mediada por células T desempeña un papel central en las respuestas del huésped a patógenos intracelulares (Lenis, 1998; Antonelli *et al.*, 2005; OMS, 2010).

La respuesta inflamatoria inducida por la picadura del vector y la inoculación del parásito atrae células fagocíticas (macrófagos y células de Langerhans) que actúan como células presentadoras de antígenos a los linfocitos T, necesarios para iniciar la modulación de la respuesta inmune de tipo celular. Las células fagocíticas tienen la capacidad de eliminar patógenos intracelulares por medio de diferentes mecanismos, los cuales pueden ser potenciados por las citocinas producidas por los linfocitos T y conllevar a la eliminación del microorganismo fagocitado. La producción de citocinas al inicio de la infección determinará el perfil subsecuente de citocinas y el establecimiento, o no, del parásito, participando en la resolución o exacerbación de la leishmaniosis (Lenis, 1998). En la LCL, se induce una fuerte respuesta de tipo celular mediada por citocinas, igual que la producción de anticuerpos específicos para el parásito (OMS, 2010).

Respuesta inmune celular innata

La respuesta inmune celular incluye diferentes componentes, entre ellos se encuentra la producción de citocinas por diferentes células del sistema inmune (OMS, 2010).

En el caso de la leishmaniosis experimental en el modelo murino, la activación de los macrófagos por citocinas como el interferón gamma (IFN- γ) constituye un mecanismo efector importante para la eliminación de parásitos intracelulares mediante la producción de óxido nítrico (ON), el cual muestra un efecto leishmanicida. En la leishmaniosis humana, se ha demostrado la producción de peróxido de hidrógeno, por los macrófagos luego de la infección

con *Leishmania*, como un mecanismo para la eliminación del parásito (Lenis, 1998). Las células asesinas naturales (naturalkiller) o NK, también están involucradas, ya que estas células pueden controlar localmente la diseminación del parásito mediante la producción de IFN- γ , la regulación del macrófago y la eliminación de los parásitos (Lenis, 1998; OMS, 2010).

Inmunidad adquirida

En el modelo murino, una vez degradado el parásito por los macrófagos, los antígenos de *Leishmania* son presentados a los linfocitos T y se inicia la respuesta inmune de tipo celular mediada principalmente por linfocitos T CD4⁺. Estos linfocitos se diferencian en subpoblaciones productoras de citocinas que pueden favorecer o no la resolución de la enfermedad. Las células T CD8⁺ también se encuentran involucradas, principalmente en la respuesta de memoria y resistencia a la reinfección por *Leishmania*, caracterizada por una producción alta y rápida de IFN- γ (Lenis, 1998; Hernández-Ruiz y Becker, 2006).

La resolución de la infección depende de los mecanismos de respuesta inmune mediada por células Th (CD4⁺) y sus productos; las células efectoras Th1 son las que se asocian con el control de la infección o con una respuesta cicatrizante a través de la producción de IFN- γ y la posterior producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) por parte de los macrófagos activados debido a la acción del IFN- γ ; por su parte, las células efectoras Th2 se asocian con el desarrollo de formas graves de la enfermedad por medio de la producción de interleucina (IL) 4 e IL-10 (Zuluaga y Robledo, 2004).

La respuesta de citocinas en el modelo murino

En el modelo murino, está claramente definido el perfil de citocinas que se produce. Las citocinas que se asocian con el control y la cura de la enfermedad en los ratones resistentes son de respuesta tipo Th1, tales como el IFN- γ y TNF- α ; por el contrario, las citocinas de tipo Th2 como las interleucinas IL-4 e IL-10, promueven la exacerbación de la enfermedad (Figura 11) (Lenis, 1998). Cabe mencionar que los diferentes tipos de células colaboradoras se inactivan mutuamente.

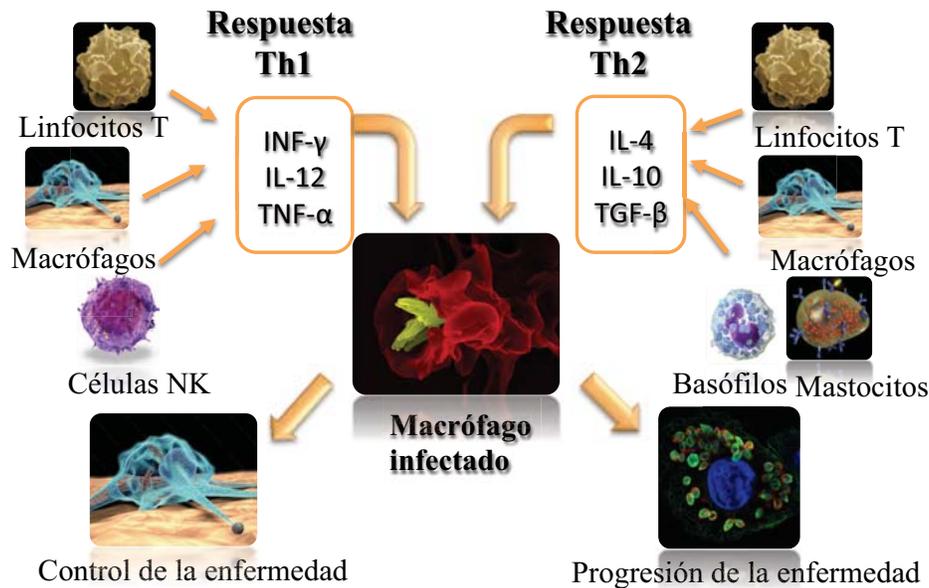


Figura 11. Respuesta inmune en el modelo de leishmaniosis murina (modificado de Lenis, 1998).

La respuesta de citocinas en la leishmaniosis humana

En la leishmaniosis humana no existe un patrón claro de diferenciación de linfocitos T; por el contrario, se ha observado una mezcla o coexistencia de citocinas tipo Th1 y Th2. En las lesiones cutáneas localizadas de leishmaniosis humana, se han encontrado perfiles de citocinas Th1 y Th2 muy variables, se presenta una mezcla con predominio de IFN- γ y TNF- α y niveles bajos de IL-4 e IL-10.

La IL-4 inhibe la expresión de genes para la producción de la IL-1 α y el TNF- α por los monocitos humanos, alterando así las funciones inmunorreguladoras y efectoras del macrófago e impidiendo la eliminación del parásito.

La IL-10, por su parte, tiene la capacidad de bloquear la proliferación de células mononucleares de la sangre periférica estimuladas con *Leishmania*, favoreciendo la replicación no controlada de parásitos en los macrófagos del hospedero y la progresión de la enfermedad, se le ha asociado a las lesiones crónicas. Como se puede apreciar, la IL-4 y la IL-10 pueden contribuir a la progresión de la leishmaniosis tanto en el modelo murino como en los humanos (Lenis, 1998; Kane y Mosser, 2001; OMS, 2010).

En estudios de leishmaniosis cutánea causada por *L. mexicana*, los pacientes con lesiones con un tiempo de evolución mayor de cuatro meses presentan una alta expresión de genes para IL-1 α , TNF- α e IL-10 en sus lesiones, en comparación con pacientes con lesiones con un tiempo de evolución menor de dos meses, lo que sugiere que la IL-10 juega un papel importante en la patogénesis de las formas crónicas de la leishmaniosis cutánea.

En el otro extremo, está la producción de IFN- γ por las células de individuos con leishmaniosis autocicatrizante que coincide con la capacidad de esta citocina para controlar la multiplicación del parásito y la progresión de la enfermedad (Lenis, 1998). Un buen pronóstico para la LCL se relaciona con el predominio de una respuesta Th1, ya que esto conduce a la producción de IFN- γ , TNF- α y la activación de los macrófagos infectados por el parásito (Antonelli *et al.*, 2005).

Las respuestas inmunitarias, tanto excesivas como deficientes, pueden conducir a presentaciones crónicas de la enfermedad lo cual representa una problemática desde el punto de vista terapéutico (OMS, 2010).

Tratamiento farmacológico

Los fármacos pentavalentes derivados del antimonio (SbV) como el estibogluconato de sodio (Pentostam) y el antimoniato de meglumina (Glucantime) han sido utilizados por más de 9 décadas a nivel global, como agentes terapéuticos de primera línea para el tratamiento de la leishmaniosis (OPS, 2013). La adaptación y respuesta de los pacientes a este tratamiento presenta dificultades dada la toxicidad del fármaco y lo doloroso de éste, pues consiste en 20 inyecciones de material oleoso (González *et al.*, 2008). Sin embargo, cada vez son más frecuentes los reportes de falla terapéutica, lo cual se traduce en la resistencia del parásito al antimonio, aunado a factores vinculados al hospedero, como inmunodepresión debido al VIH o desnutrición (Aït-Oudhia *et al.*, 2011).

Como fármacos de segunda línea se utilizan la anfotericina B y la pentamidina, compuestos mucho más tóxicos que los SbV, por lo que sólo se recomiendan en casos de contraindicación, intolerancia o resistencia a los antimoniales (Oliveira *et al.*, 2011). Sin embargo, otros medicamentos para las diferentes formas clínicas de las leishmaniosis como la pentoxifilina, la

miltefosina y ketoconazol, son ejemplos de compuestos alternativos utilizados para tratar esta parasitosis, pero no existe consenso sobre cuál es el mejor (OPS, 2013).

Las respuestas a los tratamientos mencionados anteriormente han sido heterogéneas, dependiendo de la especie del parásito, localización geográfica, el perfil inmuno-genético de las personas afectadas y la relación del parásito con sus vectores, reservorios y hospederos; así como la complejidad clínica y epidemiológica de la enfermedad. Usualmente, estos medicamentos sistémicos recomendados para el tratamiento de la leishmaniosis causan efectos adversos, que son asociados al tiempo y el uso del fármaco (Cuadro 3)(OPS, 2013).

En investigaciones realizadas por Oliveira (*et al.*, 2011), se observó que los efectos adversos clínicos más frecuentes de los antimoniales pentavalentes y pentamidina fueron dolor musculoesquelético, trastornos gastrointestinales y dolor de cabeza de leve a moderado, alteraciones cardíacas, incremento en las enzimas del hígado y páncreas. Los pacientes tratados con anfotericina B liposomal presentaron disnea leve y eritema. Los efectos adversos asociados con la miltefosina fueron vómitos, náuseas, cinetosis, dolor de cabeza, diarrea y un aumento de leve a moderado de las aminotransferasas y la creatinina.

Cuadro 3. Ventajas y desventajas del tratamiento farmacéutico para la leishmaniosis (Nieto-Yañez, 2016).

| Medicamento | Ventaja | Desventaja |
|---|---|---|
| Antimoniales Pentavalentes (Sbv) | Tratamiento de primera línea, estable, buena eficacia. | Poco accesible, toxicidad, mal cumplimiento del paciente debido a un tratamiento prolongado, falta de respuesta (India y Nepal), poca eficacia en los casos de VIH. |
| Anfotericina B (AmB) | Alta eficacia, 90-96% de los pacientes sanan con una sola dosis (India y Bangladesh). | Altamente tóxico, la eficacia de la dosis no está bien establecida para diferentes regiones (África), posible generación de resistencia (India) |
| Miltefosina (MIL) | Tratamiento oral, alta eficacia 90-94%, el paciente termina más fácil el tratamiento. | Teratogénico, graves efectos secundarios gastrointestinales (Nepal e India). |
| Paromicina (Par) | Alta eficacia en India (93-95%) y en el este de África (85%). | Requiere un tratamiento prolongado, hepatotóxico y ototóxico. |
| Combinaciones: AmB+MIL, AmB+Par, MIL + Par, Sbv + Par. | Corta duración de tratamiento, reduce la toxicidad, reduce la generación de resistencia hacia el medicamento. | La dosis y la efectividad varían dependiendo de la región geográfica y el parásito. |

Debido a la inexistencia de un régimen terapéutico basado en evidencias para las leishmaniosis cutánea (OMS, 2010), a la reducida eficacia y a las limitaciones de las opciones terapéuticas utilizadas actualmente, ya que la mayoría de estos fármacos tienen efectos adversos e incluso tóxicos para el organismo, hacen que sea necesaria la búsqueda y el desarrollo de una nueva alternativa de tratamiento.

Una fuente importante en la búsqueda de nuevos compuestos antiprotozoarios es la naturaleza misma. La OMS ha estimado que aproximadamente el 80 % de los habitantes a nivel mundial han utilizado la medicina tradicional en sus cuidados de salud (Laza *et al.*, 2003; Seminal Workshop, 2011). Al respecto, el Programa de Enfermedades Tropicales de la OMS, en colaboración con el Programa de Investigación de descubrimiento de fármacos, han considerado que la búsqueda de productos naturales derivados de plantas para el tratamiento de enfermedades parasitarias es un campo de estudio esencial y de alta prioridad. Por lo tanto, el descubrimiento de agentes terapéuticos nuevos y seguros derivados de productos naturales contra la leishmaniosis es marcadamente importante (Santana *et al.*, 2014).

Productos Naturales

La investigación académica juega un papel importante en el descubrimiento de nuevos compuestos activos, elucidación de nuevos mecanismos y el desarrollo de nuevas estrategias para combatir este tipo de parásitos, una fuente relevante para el descubrimiento de este tipo de compuestos es la naturaleza. Los productos naturales tienen una larga tradición como medicamentos contra las enfermedades infecciosas y representan buenas opciones de investigación, ya que son un campo prácticamente inexplorado de diversidad química que pueden servir como excelentes patrones para la síntesis de nuevas moléculas biológicamente activas (Seminal Workshop, 2011).

Los productos naturales incluyen un grupo grande y diverso de sustancias a partir de una variedad de fuentes, por lo general de origen prebiótico, microbiano, vegetal o animal. Como productos químicos, los productos naturales incluyen varias clases de compuestos, tales como terpenoides, policétidos, aminoácidos, péptidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, bases de ácido nucleico, ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN), entre otros. Estos

productos no son casualidades de la naturaleza, lo más probable es que sean una expresión natural de la creciente complejidad de los organismos (Cox, 2005).

Se estima que dos terceras partes de la población mundial aún cuenta con los remedios de la medicina tradicional, basados principalmente en plantas, debido a la disponibilidad o accesibilidad limitada de la medicina moderna. El interés en las fuentes naturales para proporcionar tratamientos para el dolor, paliativos o curativos para una variedad de enfermedades o el uso recreativo se remonta a los primeros puntos de la historia y muchos de estos agentes continúan existiendo de una u otra forma como tratamientos a distintas manifestaciones clínicas. La OMS estima que aproximadamente el 80% de la población mundial se basa en las medicinas tradicionales como fuentes para su atención primaria de salud (Cox, 2005; Osorio *et al.*, 2006).

Los productos naturales constituyen una fuente de nuevas alternativas de fármacos y nuevos enfoques terapéuticos; esto es porque el grado de diversidad química que se encuentra en los productos naturales es más amplio que el de cualquier otra fuente, y el grado de novedad de la estructura molecular que se encuentra en los productos naturales es mayor que la determinada a partir de cualquier otra fuente (Cox, 2005).

Un producto natural muy reconocido y utilizado por sus diversas propiedades biológicas es el propóleo, éste no sólo es un material de construcción, es el "arma química" más importante de las abejas contra microorganismos patógenos y ha sido utilizado por el hombre desde la antigüedad como un remedio (Bankova, 2005).

Historia del propóleo

El propóleo de ninguna manera es un descubrimiento nuevo, su uso se remonta a los tiempos antiguos, al menos desde el año 300 a.C. y ha sido utilizado como un medicamento en la medicina local y popular en muchas partes del mundo, tanto a nivel interno como externo (Marcucci, 1995; Sforcin, 2007). En el antiguo Egipto fue utilizado con fines de conservación, para embalsamar cadáveres; así como para aliviar dolencias. Asimismo, la cultura griega y la romana eran conscientes de sus cualidades curativas e hicieron extensivo su uso como una medicina. Incluso los antiguos judíos consideraban a *tzori* (la palabra hebrea para propóleo)

como una medicina, sus propiedades terapéuticas se mencionan en todo el Antiguo Testamento. En Judea, se ha colectado en todo el mar muerto por cerca de 1,500 años y ha logrado fama gracias a su aroma y propiedades medicinales. Más de 15 autores griegos y romanos informaron sobre la preparación y aplicación del propóleo, el llamado tercer producto natural de las abejas (junto a la miel y la cera).

En la antigüedad, sus propiedades fueron mencionadas en diferentes escritos, en el tratado *Historia Animalium* en el libro IX (cuyo autor es anónimo) se menciona como una cura para las contusiones y llagas supurantes; en la antigua Grecia, se decía que Hipócrates utilizó el propóleo para curar heridas y úlceras, tanto externas como internas; y Dioscórides en su principal obra *De Materia Medica*, lo menciona como una sustancia suave y fácil de extender a manera de ungüento, buena para la extracción de espinas y astillas. Los romanos también veneraban al propóleo ampliamente; Plinio el Viejo en su célebre *Historia Nature* describe el uso práctico de esta sustancia, según él, tenía la propiedad de extraer picaduras y todos los cuerpos extraños al organismo, dispersar tumores, madurar induraciones, aliviar dolores de los nervios, y cicatrizar úlceras de la naturaleza más obstinada. En el siglo I d.C., Cornelio Celso en su obra *De Medicina Celsus*, también menciona al propóleo como un medicamento cuya acción promueve la supuración de heridas y para el tratamiento de abscesos. En manuscritos persas, el propóleo se describe como un fármaco contra eczemas, mialgia y reumatismo (Kuropatnicki *et al.*, 2013).

En la Edad Media el uso del propóleo no era un tema muy popular, por ende su uso en la medicina convencional desapareció; sin embargo el conocimiento de sus propiedades curativas sobrevivió en la medicina tradicional junto con pocos manuscritos; en ellos, algunas fuentes del siglo XII describen preparaciones medicinales que contenían propóleo, utilizadas para el tratamiento de infecciones orales y faríngeas, así como caries dentales. Años después, el interés por el propóleo regresó a Europa, trayendo consigo un interés en la antigua enseñanza de la medicina, junto con el redescubrimiento de remedios y tratamientos olvidados (Kuropatnicki *et al.*, 2013).

En el siglo XVII, el propóleo ya se encontraba incluido en las farmacopeas de Inglaterra como ingrediente principal en ungüentos de curación; a principios del siglo XIX el propóleo fue estudiado y descrito por Nicolas Louis Vauquelin, un naturalista, farmacéutico y químico

francés; años más tarde, en la década de 1960, Derevici (*et al.*, 1965) mostró que el propóleo es responsable de la menor incidencia de bacterias dentro de la colmena; probando así su efecto antibacteriano (Kuropatnicki *et al.*, 2013).

A finales de los 60's y principios de los 70's, el Dr. Karl Lund Aagaard, mejor conocido como el "Dr. Propolis", realizó una serie de estudios en Dinamarca, sobre más de 50 000 pacientes, mostrando resultados prometedores en cuanto a la eficacia del propóleo en el tratamiento de: cáncer, infección de las vías urinarias, hinchazón de la garganta, gota, heridas abiertas, congestión nasal, resfriados, gripe, bronquitis, gastritis, enfermedad periodontal, infecciones intestinales, úlceras, neumonía, artritis, enfermedades en los pulmones, dolores de cabeza, la enfermedad de Parkinson, infecciones biliares, esclerosis, deficiencias de circulación, conjuntivitis, ronquera, entre otras; evidenciando su eficacia en un amplio espectro de padecimientos; así como el hecho de que casi no produce efectos secundarios (Kuropatnicki *et al.*, 2013).

La investigación sobre la composición química del propóleo se inició a principios del siglo XX y se continuó después de la Segunda Guerra Mundial. Los avances en los métodos analíticos cromatográficos han permitido la separación y extracción de varios componentes de propóleos, sólo ha sido en el último siglo que los científicos han sido capaces de demostrar que el propóleo es tan activo e importante como nuestros antepasados pensaban (Kuropatnicki *et al.*, 2013).

Propóleo

El propóleo, conocido comúnmente como "propolis", es una sustancia resinosa producida por las abejas (*Apis mellifera*) mediante la adición de cera y secreciones salivales al material resinoso, gomoso o balsámico que recolectan de diversas especies de plantas. En función del origen botánico de la resina y de la época de recolección, difiere en color (de amarillo claro a castaño oscuro), sabor (amargo, ligeramente picante o insípido) y consistencia, ya que a temperaturas de 45 a 250°C el propóleo es una sustancia suave, flexible y muy pegajosa, mientras que por debajo de 15°C, se vuelve duro y quebradizo. Etimológicamente, la palabra griega propóleo compuesta por "pro" (a favor o en defensa) y "polis" (ciudad), como definición nos dice que es "la defensa de la colmena" (Salatino *et al.*, 2005; Sforcin, 2007; Navarro *et al.* 2009; Vargas- Sánchez *et al.*, 2013).

Las abejas en la colmena lo utilizan con diversos fines como: sellar agujeros en sus panales, reducir las vías de acceso, recubrir y aislar restos de animales que se hayan introducido en la colmena, consolidar componentes estructurales, barnizar el interior de las celdillas con fines desinfectantes (Sforcin, 2007; Navarro *et al.*, 2009). Respecto a ello, actualmente existen reportes de su eficacia antiséptica y propiedades antimicrobianas (Salatino *et al.*, 2005), actuando como antibiótico natural, agente antiviral y antimicótico (Hernández *et al.*, 2005), llegando a proteger a la colonia de enfermedades (Salatino *et al.*, 2005); también lo utilizan para evitar vibraciones (Navarro *et al.*, 2009), como aislante, protegiendo a la colmena contra el flujo de aire, impermeabilizante y de igual forma lo utilizan para mantener la humedad constante en el interior de la colmena (Seeley y Morse, 1976; Salatino *et al.*, 2005; Kuropatnicki *et al.*, 2013).

Obtención

Las fuentes a base de las cuales se elabora el propóleo son tres principalmente: el exudado de las plantas, las sustancias secretadas del metabolismo de las abejas y los materiales introducidos durante la elaboración del propóleo; se cree que esto es lo que le confiere sus características y propiedades medicinales (Rivera, 2013).

Para iniciar con la fabricación del propóleo, las abejas colectan la materia prima, como las partículas resinosas que se encuentran en las yemas, brotes y pecíolos de diferentes vegetales, tales como: álamo, olmo, sauce, abedul, castaño de indias, pino, abeto y roble. Posteriormente con sus mandíbulas agarran y trabajan la resina, dentro de su mandíbula donde desemboca un conducto que proviene de las glándulas mandibulares y que da salida a secreciones (ácido 10-hidroxidecenoico) de color claro que tiene la finalidad de ablandar y hacer más manejable la resina, finalmente con ayuda de su tercer par de patas traseras, concentran y compactan la resina para transferirla a su corbícula. Al ingresar a la colmena, se dirigen al lugar donde es requerido, ya sea con fines desinfectantes, para cerrar grietas o reducir vías de accesos. El producto final es lo que conocemos como propóleo (Farré *et al.*, 2004; Bankova, 2009; Rivera, 2013).

Recolección

La recolección es realizada por un apicultor, mediante la colocación de una rejilla de nylon, sobre los paneles de la colmena; ésta presenta agujeros de 1.5 por 3 mm, por donde las abejas

(12-13mm) no pueden pasar, por lo que por su instinto de supervivencia se ven en la necesidad de cubrir los agujeros para impedir la entrada de agentes externos. En un periodo de 1 a 6 meses la rejilla será cubierta por propóleo, posteriormente ésta se extrae de la colmena y se introduce en un congelador a una temperatura de -10 o -20°C por 1 hora, con la finalidad de que se congele por trozos y en forma de escamas, obtenga rigidez, fragilidad y de esta manera con una espátula de acero inoxidable sin mucho filo será desprendida fácilmente. El propóleo recogido en trozos se limpia con ayuda de pinzas cuidando de retirar contaminantes macroscópicos como abejas, trozos de madera y pasto. Finalmente es colocado en frascos ámbar para protegerlo de la luz y en lugares frescos, limpios, cerrados y se entrega para su elaboración en extracto etanólico o en polvo. Se calcula que una colmena produce anualmente entre 150 y 300 gramos de propóleo, dependiendo de la ubicación geográfica, la cantidad de flora en el área y de los factores climatológicos (Farré *et al.*, 2004).

Composición Química

El propóleo no tiene una composición química definida, ya que es muy compleja y variable en las diferentes regiones y de colmena a colmena (Bankova, 2009; Sforcin, 2007; Marcucci *et al.*, 2001), debido principalmente a su origen botánico, la estación del año, las condiciones geográficas y climáticas donde se encuentren las plantas que producen las resinas (Marcucci, 1995; Hernández *et al.*, 2005; Lotfy, 2006; Sforcin 2007) e incluso la parte de la planta que sea recolectada por las abejas para su fabricación. No obstante, de manera general están constituidos por 50% resinas, 30% cera, 10% aceites esenciales y aromáticos, 5% polen y un 5% de otros compuestos orgánicos (Burdock, 1998; Sforcin, 2007; Miguel *et al.*, 2010). Actualmente se conoce que los diferentes propóleos del mundo presentan dentro de su composición química más de 300 compuestos tales como polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres, ácidos aromáticos, benzopirenos), terpenoides, aldehídos fenólicos, sesquiterpenos quinonas, cumarinas, aminoácidos, aceites esenciales, esteroides y compuestos inorgánicos (Marcucci, 1995; Lotfy, 2006; Sforcin, 2007). En cada muestra de propóleos normalmente son identificados de 80 a 100 compuestos químicos (Marcucci *et al.*, 2001). Las diferencias cualitativas y cuantitativas de cada uno de estos compuestos químicos, traen como consecuencia que las actividades biológicas del propóleo de diferentes áreas fitogeográficas y periodos de tiempo, varíen en gran medida (Kumazawa *et al.*, 2004; Lotfy, 2006).

Un ejemplo de la gran diversidad en cuanto a la composición química, se da con los propóleos de las regiones tropicales, ya que son químicamente distintos a los reportados en las zonas templadas. En estas últimas zonas, encontradas en el hemisferio norte, las abejas recolectan propóleos sólo en verano, fines de primavera y principios del otoño; por lo cual, las muestras procedentes de zonas templadas tales como Europa, Asia y el Norte de América, se caracterizan por tener una composición química similar; reportando principalmente compuestos de tipo fenólicos, como agliconas flavonoides (flavonas y flavanonas), ácidos aromáticos y sus ésteres (Bankova, 2005 y 2009).

La composición química de los propóleos de las regiones áridas y semiáridas también es distinta, el trabajo de investigación en propóleos de este tipo de regiones es muy limitado. Sin embargo, en nuestro país, investigaciones de propóleos con origen de regiones áridas y semiáridas en el Estado de Sonora han reportado que los compuestos que mayoritariamente constituyen estas resinas son flavonoides y el éster fenílico del ácido cafeico, pinocembrina, 3-acetato de pinobanksina y crisina (Hernández *et al.*, 2007).

Debido a que el propóleo contiene una gran cantidad de compuestos fenólicos, en específico flavonoides, es considerado como un material multifactorial, esto quiere decir que posee diversas propiedades medicinales entre las que se destacan antibacterianas, antivirales, antifúngicas, antiinflamatoria, anticancerígenas, antitumorales, antiulcéricas, antioxidante, cicatrizante, propiedades fitoinhedoras, entre otras. Gracias a todas estas propiedades, este material ha sido altamente explotado en la industria alimentaria, cosmetológica y en la medicina naturista (Uzel *et al.*, 2005; Lotti *et al.*, 2010).

Propiedades biológicas

Debido a su popularidad en la medicina tradicional, el propóleo se ha convertido en objeto de intensos estudios farmacológicos y químicos durante los últimos 30 años (Bankova, 2005).

Las muestras de propóleos de distintas zonas geográficas y climáticas, presentan composiciones químicas completamente diferentes lo que da como resultado la gran diversidad de actividades biológicas que se han reportado para este producto natural (Bankova, 2005).

Es por ello, que los propóleos poseen un amplio espectro de actividades biológicas tales como antimicrobiana, antifúngica, antiviral y antiproliferativa, entre otras. En la literatura existe una gran cantidad de datos publicados acerca de todas estas actividades biológicas, los cuales se basan en evaluar los efectos de extractos y compuestos aislados e identificados en propóleos de diferentes partes del mundo tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (Rivera, 2013).

Investigaciones realizadas con diferentes propóleos de distintas partes del mundo durante los últimos años, han confirmado propiedades: antiinflamatorias, inmunomoduladoras, antitumorales, antiproliferativas *in vitro*, antimicrobianas, hipotensoras, hepatoprotectoras, actúa en la disminución de los niveles de colesterol, antibacteriales, antifúngicas, antivirales, citotóxicas, antibióticas, antimutagénicas, antioxidantes, antisépticas, anticaries, así como capacidad cicatrizante y anestésica; se ha utilizado con eficacia en el tratamiento de la dermatología, laringología, problemas ginecológicos, enfermedades neurodegenerativas, y en el tratamiento de quemaduras y úlceras (Marcucci, 1995; Kumazawa *et al.*, 2004; Hernández *et al.*, 2005; Lotfy, 2006; Hernández *et al.*, 2007; Orsi *et al.*, 2007; Sforcin, 2007; Velázquez *et al.*, 2007; da Silva *et al.*, 2013; Kuropatnicki *et al.*, 2013; Bankova *et al.*, 2014); recientemente ha mostrado actividad antiparasitaria (Sforcin, 2007; Dantas *et al.*, 2009) sobre diferentes cepas como *Acanthamoeba* (Topalkara *et al.*, 2007) y ha demostrado su eficacia como antiprotozoario sobre géneros como: *Giardia*, *Eimeria* (Marcucci, 1995), *Trichomonas* (Marcucci, 1995; Lotfy, 2006), *Trypanosoma* (Dantas *et al.*, 2006; Lotfy, 2006), *Plasmodium* (Kaewmuangmoon, 2012), y *Leishmania* (Marcucci, 1995; Machado *et al.*, 2007; da Silva *et al.*, 2013).

En investigaciones realizadas en nuestro país, en el estado de México, está reportada su actividad fungistática y fungicida (Quintero-Mora *et al.*, 2008); y en los propóleos de Sonora hasta ahora estudiados se han presentado diferentes actividades biológicas como son: antibacteriana (Velázquez *et al.*, 2007), antioxidante (Velázquez *et al.*, 2007), antiproliferativa *in vitro* y antiparasitaria (Hernández *et al.*, 2007).

Todas estas propiedades y actividades del propóleo son atribuidas a distintos compuestos químicos denominados metabolitos secundarios, los cuales son producidos por las plantas para su propia protección contra depredadores y enfermedades.

Metabolitos Secundarios

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico. Como parte de la respuesta de la defensa química contra el daño que ocasionan las heridas y el ataque de microorganismos patógenos en las plantas superiores, se induce la síntesis y acumulación de compuestos de bajo peso molecular, conocidos como metabolitos secundarios (MS), los cuales son compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento (Sepúlveda *et al.*, 2003; Almaraz-Abarca *et al.*, 2008).

Los MS son importantes en la respuesta de defensa de las plantas, restringiendo la invasión y/o matando directamente al microorganismo patógeno, por su capacidad antioxidante contribuyen al mantenimiento del estado de óxido-reducción de la célula vegetal, desempeñan funciones de protección contra la radiación ultravioleta, contra posibles daños causados por cambios rápidos de temperatura, contra daño oxidativo y contra el ataque de microorganismos y de herbívoros, ya sean estos últimos insectos, reptiles, aves o mamíferos (Sepúlveda *et al.*, 2003; Almaraz-Abarca *et al.*, 2008).

En la actualidad se conocen aproximadamente 20,000 estructuras de MS que por su composición química son clasificados en dos grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los MS que contienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los MS no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides. La variedad estructural dentro de un mismo grupo de MS está dada por modificaciones químicas a una estructura básica, originadas por reacciones químicas, tales como la hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y la glucosilación (Sepúlveda *et al.*, 2003).

De manera muy general, los metabolitos secundarios son clasificados de acuerdo a su origen biosintético en tres grandes grupos: los fenoles, los terpenos y los compuestos secundarios nitrogenados.

Fenoles

Los compuestos fenólicos, también llamados fenoles o polifenoles vegetales, son sustancias que poseen al menos un anillo aromático con un radical hidroxilo sustituyente en su estructura

química, o sea un grupo fenólico. El fenol mismo se encuentra como un producto natural en el reino vegetal, pero es más común que los compuestos fenólicos tengan dos o más grupos hidroxilo (Figura 12) (Almaraz-Abarca *et al.*, 2008).

De todos los metabolitos secundarios los polifenoles son los más ampliamente distribuidos dentro del reino vegetal y quizá los más diversos. La diversidad de los fenoles vegetales se ve reflejada en la clasificación de Harborne (1989), este autor reconoce 13 grupos de polifenoles y los identifica según su esqueleto básico de átomos de carbono (Almaraz-Abarca *et al.*, 2008).

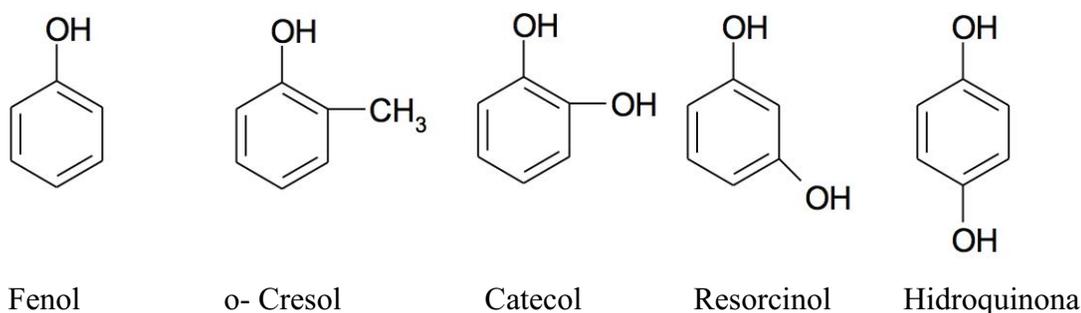


Figura 12. Diversas estructuras de compuestos fenólicos.

De esta diversidad de compuestos fenólicos vegetales, los flavonoides (C₆-C₃-C₆) son los que tienen la distribución más amplia dentro del reino vegetal y son los más abundantes y diversos. La diversidad química de los flavonoides (Figura 13) está dada principalmente por diferencias en el nivel de oxidación del anillo heterocíclico. Esta diversidad permite clasificar al grupo de los flavonoides en diferentes tipos. Las principales clases de flavonoides son los siguientes: las flavonas y los flavonoles, los flavanoides, las antocianinas y los isoflavonoides (Almaraz-Abarca *et al.*, 2008).

Los flavonoides pueden limitar la invasión de algunos microorganismos patógenos y tienen una actividad antioxidante amplia dependiendo del sustituyente del hidróxilo de su anillo fenólico, pueden actuar como agentes quelantes (capaces de formar compuestos estables) de los iones de hierro y de cobre, como productores de radicales como es el radical hidróxilo y reaccionar con moléculas como el ácido hipocloroso nitroso y producir compuestos con una menor capacidad oxidativa, contribuyendo así con el ajuste del estado de óxido-reducción celular desencadenado durante el estrés (Sepúlveda *et al.*, 2003; Almaraz-Abarca *et al.*, 2008).

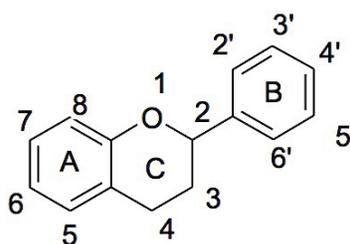


Figura 13. Estructura química de los flavonoides.

Terpenos

Los terpenos, también llamados terpenoides o isoprenoides, se derivan de la fusión de unidades de cinco carbonos llamadas isopreno (C₅) (Figura 14) y se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que los forman. Los terpenoides son de vital importancia para las plantas principalmente por su capacidad antioxidante, por la protección que brindan contra el daño causado por la foto-oxidación y por las altas temperaturas (Sepúlveda *et al.*, 2003; Almaraz-Abarca *et al.*, 2008).

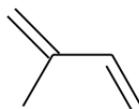


Figura 14. Isopreno, estructura básica de los terpenos.

Compuestos secundarios nitrogenados

Este grupo de compuestos secundarios es químicamente muy heterogéneo. La mayoría de ellos son sintetizados en las plantas a partir de aminoácidos comunes. Pertenecen a este grupo de compuestos secundarios los alcaloides, los glicósidos cianogénicos, los glucosinolatos o glicósidos de aceite de mostaza y los aminoácidos no proteicos. Existen muchas clases de alcaloides según el precursor biosintético del cual provienen. Los alcaloides presentan efectos inhibitorios del crecimiento de microorganismos patógenos, gracias a su capacidad de intercalarse con el DNA, de detener la síntesis de proteínas, inducir la apoptosis e inhibir las enzimas del metabolismo de carbohidratos (Sepúlveda *et al.*, 2003; Almaraz-Abarca *et al.*, 2008).

El interés actual por el estudio del metabolismo secundario tiene varios matices. Por un lado, prácticamente todos los metabolitos secundarios conocidos tienen algún tipo de actividad,

llámese antibacteriana, antioxidante o anticancerígena, entre otras, y esto es el móvil de programas de búsqueda de compuestos naturales con una particular actividad biológica (Almaraz-Abarca *et al.*, 2008).

Las abejas al utilizar las plantas como fuente para la elaboración del propóleo le confieren ciertos metabolitos secundarios al propóleo y con ello a su vez diversas actividades biológicas, entre ellas se ha demostrado su capacidad anti-leishmánica.

Antecedentes

Ayres y colaboradores en el 2007 demostraron que 4 extractos etanólicos de propóleos de distintas regiones de Brasil redujeron la infección por *L. amazonensis* en macrófagos peritoneales a partir de una concentración de 25 µg/mL. La carga parasitaria de los macrófagos se vió reducida sin resultar tóxico para los promastigotes y amastigotes extracelulares, por lo que sugieren que los componentes del propóleo intensifican el mecanismo de activación de los macrófagos que conduce a la muerte de *L. amazonensis*.

Extractos de muestras de propóleos recolectados en Brasil y Bulgaria fueron probados contra *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. chagasi* y *L. major*. Teniendo en cuenta las diferencias químicas entre los extractos y el comportamiento de los parásitos, se observaron diferencias significativas en las actividades leishmanicidas, encontraron valores de CL₅₀ en el intervalo de 2.8 a 229.3 µg/mL. El análisis mostró que los extractos búlgaros fueron más activos que los brasileños (Machado, 2007).

Resultados *in vitro* mostraron que muestras de propóleos de Hatay y Bursa (Turquía), disminuyeron significativamente la proliferación de *L. infantum* y *L. tropica*; sin embargo, encontraron que el propóleo Bursa era más eficaz que el propóleo Hatay contra promastigotes de *Leishmania*. Estos dos productos naturales pueden ser agentes útiles en la prevención de las infecciones por *Leishmania* (Durán *et al.*, 2011).

Un estudio reciente ha informado el potencial de propóleos marrones (BP) de Cuba contra protozoos de los géneros *Plasmodium*, *Trypanosoma* y *Leishmania* (Monzote *et al.*, 2012).

Un propóleo café (BP) de una zona semiárida de Brasil se reportó con buena actividad antileishmánica, ya que mostró una inhibición significativa en el crecimiento de promastigotes de *L. amazonensis* y demostró ser eficaz en la reducción de la infección de macrófagos murinos y el número de amastigotes internalizados en estas células (Santana *et al.*, 2014).

Da Silva y colaboradores (2013) mostraron una acción directa de propóleos recolectados en Botucatu, Sao Paulo, Brasil, sobre *L. braziliensis*, demostrando efectos inmunomoduladores en macrófagos murinos. Atribuyeron los efectos observados a los compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos aromáticos, y benzopyranes), di- y triterpenos, y aceites esenciales presentes en la muestra de propóleo.

En nuestro equipo de trabajo se realizó un estudio que demostró diferentes actividades biológicas de propóleos de distintas partes de la República Mexicana. Se destaca al propóleo de Chihuahua con la mejor actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*; también se reportó una buena actividad anti-inflamatoria en un modelo de edema plantar inducido con carragenina, una potente actividad antifúngica contra *Tricophyton mentagrophytes*, encontrado una concentración fungicida media de (CF₅₀) de 2.15 mg/mL. También se demostró que el propóleo de Chihuahua presenta una buena capacidad cicatrizante (Datos no publicados).

Justificación

Actualmente los medicamentos de primera línea utilizados para el tratamiento de la leishmaniosis consisten en antimoniales pentavalentes; sin embargo han demostrado tener graves efectos secundarios y han resultado ser ineficientes, ya que el parásito ha desarrollado resistencia a estos compuestos, aunado al hecho de que son compuestos muy tóxicos y económicamente inaccesibles. Por ello surge la necesidad de buscar compuestos con actividad anti-leishmánica más seguros y eficaces, para desarrollar nuevas alternativas para el tratamiento de esta enfermedad; por lo cual, los compuestos de origen natural constituyen una buena opción gracias a los metabolitos secundarios que contienen. Con base a los antecedentes que existen en cuanto a la eficacia de propóleos de diferentes regiones como antiparasitarios y antiprotozoarios, los reportes en cuanto a su actividad anti-leishmánica sobre diferentes especies del género

Leishmania, aunado a los metabolitos secundarios que contiene; así como la evidencia existente de que el propóleo de Chihuahua presenta actividades antibacteriana, anti-inflamatoria, cicatrizante y antifúngica, hacen del propóleo de Chihuahua una prometedora opción para el desarrollo de una nueva alternativa de tratamiento.

Hipótesis

Si se ha demostrado que propóleos de diferentes regiones del mundo tienen actividad contra algunas especies del género *Leishmania*, y si el propóleo de Chihuahua ha demostrado tener actividad antiparasitaria, antiprotozoaria, antiinflamatoria y cicatrizante, se propone al propóleo de Chihuahua como un buen candidato a presentar actividad anti-leishmánica contra *L. mexicana*.

Objetivo: Determinar la actividad anti-leishmánica del propóleo de Chihuahua.

Objetivos particulares.

1. Determinar el efecto anti-leishmánico *in vitro* del extracto etanólico del propóleo de Chihuahua sobre promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* por MTT.
2. Estandarizar la técnica para el cultivo de amastigotes de *L. mexicana*
3. Evaluar la actividad anti-leishmánica *in vivo* sobre amastigotes de *L. mexicana* en un modelo murino de leishmaniosis cutánea, determinando el tamaño de la lesión y la carga parasitaria por dilución limitante.
4. Determinar la concentración de fenoles totales (CFT) del propóleo de Chihuahua por medio del reactivo de Folin-Ciocalteu.
5. Evaluar cuantitativamente los flavonoides presentes en el propóleo de Chihuahua.
6. Determinar la actividad antioxidante del propóleo de Chihuahua mediante el método de reducción de radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracial (DPPH).
7. Realizar la caracterización química de los metabolitos secundarios presentes en el propóleo de Chihuahua mediante el análisis de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) comparando con estándares.
8. Evaluar la presencia de las citocinas IL-4 e IL-10 en suero de ratones infectados con *L. mexicana* y de ratones infectados tratados con propóleo de Chihuahua.

Material y Métodos

Colecta de material

El propóleo necesario para realizar los ensayos de este proyecto, se obtuvo de un apiario ubicado en Ejido Concordia, en la zona centro del estado de Chihuahua que abarca los municipios de Aquiles Serdán y Chihuahua (apéndice 2). Se separó y se limpió para eliminar desechos de origen animal y vegetal que pudiera contener.

Obtención del extracto

El extracto de propóleo se obtuvo por el método de maceración (Domínguez, 1973). Se determinó el peso del propóleo en seco y se colocó en un matraz; con ello se obtuvo el extracto etanólico (e-EtOH) crudo del propóleo, el cual se filtró y destiló a presión reducida en un rotavapor. El extracto resultante, se colocó en charolas de vidrio con la finalidad de completar la evaporación del solvente. El rendimiento del extracto se determinó por diferencia de peso con relación al peso seco del propóleo.

Animales de laboratorio

Se utilizaron 12 ratones de origen genético BALB/c hembras de 4-6 semanas de edad, los cuales fueron proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI), UNAM. Fueron mantenidos bajo condiciones de laboratorio, con comida y agua *ad-libitum*. El cuidado y procedimiento de los animales se realizó de acuerdo con la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Mantenimiento de la cepa de *L. mexicana*

El inóculo de *L. mexicana* se obtuvo a partir de un ratón previamente infectado con la cepa (MNYC/BZ/M379) donada por la Dra. Miriam Rodríguez Sosa de la FESI, UNAM. Se aislaron promastigotes de la lesión de los ratones infectados en 5 mL de medio de cultivo Schneider suplementado con 10% de SFB inactivado y antibiótico al 1% (Gentamicina) para obtener la fase estacionaria del parásito; después fueron colocados en botellas de cultivo con medio Schneider a 28° C. Posteriormente se cuantificaron en una cámara de Neubauer (Ruiz, 2014).

Infección de ratones con *L. mexicana*

Se infectaron los ratones BALB/c de manera subcutánea en la parte posterior, cerca de la base de la cola. Los ratones fueron rasurados para hacer más sencilla la infección, en seguida fueron infectados con un inóculo de 50 μL de PBS que contenía 1×10^6 promastigotes de *L. mexicana* con jeringas de insulina (Ruiz, 2014). Los ratones se mantuvieron en el bioterio de la FESI durante las 10 semanas posteriores a la infección.

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

En una placa de cultivo de 96 pozos se sembraron diferentes cantidades de promastigotes de *L. mexicana* (desde 1×10^7 hasta 9,765 promastigotes) en 200 μL de medio de cultivo, posteriormente a todos los pozos se les agregaron 25 μL (5mg/mL) de MTT (bromuro de [3-4, 5-dimetiltiazolo-2-il] -2,5-difeniltetrazolio) (método modificado del ensayo de Dutta et al., 2005), y se incubaron por un tiempo de cuatro horas a una temperatura de 37°C. Al término de este tiempo se centrifugó la placa a 2500 rpm durante cinco minutos y se retiró el sobrenadante, quedando únicamente con la pastilla, a la cual se le agregaron posteriormente 100 μL de dimetil sulfóxido (DMSO) y se dejó reposar la placa 15 min en oscuridad (se utilizaron como blanco tres pozos de la placa que no contenían células a los que se le agregaron 100 μL de DMSO). Por último se leyó la absorbancia a 492 nm en un lector para ELISA; los datos de número de células y los valores de absorbancia se graficaron posteriormente.

Determinación del efecto *in vitro* del e-EtOH del propóleo de Chihuahua sobre promastigotes de *L. mexicana*

Se utilizaron promastigotes de la fase exponencial, los cuales fueron resuspendidos en medio Schneider suplementado con 10% SFB y 100 mg de gentamicina/mL. Los parásitos se colocaron en placas de cultivo celular de 96 pozos (2.5×10^4 promastigotes en 100 μL de medio, en cada pozo) e interactuaron con diferentes concentraciones del e-EtOH del propóleo de Chihuahua (desde 10 mg/mL hasta 0.009 mg/mL) durante 48 h a 22 °C; como control negativo se dejaron en la placa tres pozos a los que no se les agregó extracto. La viabilidad de los parásitos se evaluó con el método modificado del ensayo de MTT (Dutta *et al.*, 2005) donde la cantidad de sales de formazán producidas fue directamente proporcional al número de células metabólicamente activas. Las sales de formazán producidas se cuantificaron en un lector de ELISA a una longitud

de onda de 492 nm, los valores de absorbancia obtenidos se interpolaron en la curva patrón y se graficaron para obtener la concentración letal media (CL₅₀).

Estandarización cultivo de amastigotes

Se sacrificaron ratones previamente infectados en la base de la cola con un inóculo de 5×10^6 promastigotes de *L. mexicana*, a los cuales previamente se les dejó evolucionar la lesión durante 8 semanas. En condiciones de esterilidad, se realizó una incisión en la zona de la herida y ésta se colocó en una caja Petri con Medio Schneider (suplementado con 20% SFB; 1% de Gentamicina; pH: 4.7), posteriormente se maceró la lesión usando el émbolo de una jeringa de 10 mL; se colocaron 5×10^6 amastigotes en una botella de cultivo que contenía 5 mL de medio Schneider con una variedad de condiciones de pH (4.7, 5 y 5.4) y distintos porcentajes de suero fetal bovino (SFB) (20%, 25% y 30%)(método modificado del ensayo de Bates *et al.*, 1992).

Para realizar la curva patrón, se recuperó el cultivo a las 96 h de incubación en un tubo de 50 mL y se centrifugó a 1500 rpm durante 15 min a temperatura ambiente; se decantó el sobrenadante y se recuperó la pastilla, la cual se homogeneizó en 1 mL de solución salina para posteriormente hacer el conteo del número de amastigotes en la cámara de Neubauer y se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente para el ensayo con promastigotes.

La interacción del propóleo con amastigotes de *L. mexicana* se realizó con diferentes concentraciones del e-EtOH de propóleo (diluciones seriadas de 10 a 0.004 mg/mL) y se evaluó a las 96 h con el método de MTT anteriormente descrito.

Evaluación de la actividad *in vivo* sobre amastigotes de *L. mexicana* en un modelo murino de leishmaniosis cutánea

Tamaño de la lesión

12 ratones BALB/c fueron inoculados con 2×10^6 promastigotes de *L. mexicana*. A 6 ratones se les aplicó diariamente un gel que contenía el e-EtOH de propóleo de Chihuahua al 10% de manera tópica sobre el área de la lesión durante 9 semanas; los otros 6 ratones infectados fueron el grupo control. Se midió el tamaño de la lesión de ambos grupos una vez por semana con un vernier electrónico (Mitutoyo, Japan) y se expresó como la diferencia de tamaño entre las

lesiones tratadas con extracto y las que no estuvieron sometidas al tratamiento (Kane *et al.*, 2001).

Determinación de la carga parasitaria

La carga parasitaria de las lesiones se determinó mediante la técnica de dilución limitante, donde la suspensión que contenía los parásitos (obtenida de lesiones extirpadas como se describió anteriormente), se diluyó en serie 10 veces (diluciones 1:2), con 2 concentraciones del extracto (2 y 20 μL) en 200 μL de medio Schneider en placas de 96 pozos, este ensayo se realizó por duplicado para las muestras de cada ratón. Las placas se incubaron durante 24 h a 27 °C, posteriormente se examinaron los pozos en el microscopio invertido para observar el crecimiento del parásito (Satoskar *et al.*, 2001). Se obtuvo el logaritmo para determinar el número de parásitos.

Concentración de fenoles totales (CFT)

Para determinar la composición química del propóleo se evaluó la concentración de fenoles totales (CFT) por espectrofotometría (apéndice 3), con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, por medio del reactivo de Folin-Ciocalteu. El estándar de referencia fue el ácido gálico, por su estabilidad y estructura fenólica. Las muestras se prepararon a una solución estándar (0.2 mg/mL). El ensayo se realizó por triplicado (Singleton *et al.*, 1999). Los resultados fueron expresados en mg equivalentes de ácido gálico por g de extracto (mg e AG/g extracto).

Cuantificación de flavonoides

Se realizó la cuantificación de flavonoides con base en la técnica descrita por Ramamoorthy y Bono (2007) (apéndice 4); para ello, se empleó una curva patrón de quercetina. Los resultados fueron expresados en μg equivalentes de quercetina por g de extracto (μg e Q/g extracto).

Capacidad antioxidante

Se determinó la actividad antioxidante mediante el método de reducción del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidracil (DPPH)(apéndice 5) método modificado de Murillo (2006), para obtener la capacidad antioxidante media (CA_{50}) del propóleo de Chihuahua.

Partición del e-EtOH del propóleo de Chihuahua

Se realizó un fraccionamiento del e-EtOH del propóleo de Chihuahua utilizando un sistema de partición con solventes de diferente polaridad (hexano, diclorometano y metanol) a partir de 1 g del extracto.

Caracterización química

Se realizó la caracterización química de las 3 particiones del propóleo de Chihuahua previamente mencionadas, con el fin de comparar los resultados con los estándares de la biblioteca del equipo y poder determinar los metabolitos secundarios que se encontraban presentes en nuestro propóleo, mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC por sus siglas en inglés) y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).

Cromatografía Líquida De Alta Resolución (HPLC)

Se inyectaron al equipo 30 μ L del extracto de propóleo a una concentración de 3mg/mL, con las siguientes condiciones: columna Discovery C-18, con las siguientes características: 250 \times 4.6 mm con un tamaño de partícula 5 μ m, se corrió de forma isocrática con una mezcla de MeOH-acetonitrilo-agua (25-25-50), acidulada al 1% con ácido fórmico, con un flujo de 1 mL/min y con un detector de arreglo de diodos (DAD) a una longitud de onda de 260nm y realizando un barrido completo de 200-400 nm. También se inyectaron 30 μ L de cada uno de los 15 estándares (Vainillina, Quercetina, Catequina, Luteolina, Pinocembrina, Crisina, Baicaleina, Myricetina, Naringenina, Naringina, Ácido Gálico, Catecol, Apigenina, Acacetina, Camferol) con los que se cuenta en el laboratorio a una concentración de 1mg/mL.

Esta técnica, para la separación de mezclas complejas y la identificación de compuestos de alto peso molecular, es una excelente alternativa a la fitoquímica analítica clásica y una potente herramienta para la evaluación rápida de la composición de los productos naturales en bruto, tales como el propóleo (Machado *et al.*, 2007).

Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)

Para llevar a cabo el análisis de GC-MS, se inyectó en el equipo 1 μ L del extracto de propóleo a una concentración de 3mg/mL. Se empleó un cromatógrafo 6850 Network GC System de

Agilent Technologies acoplado a un espectrómetro de masas 5975C VL MSD con detector de triple eje, de la misma marca, equipado con una columna capilar RTX de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de grosor, compuesta de dimetil polisiloxano (95 %) y fenil polisiloxano (5 %). El modo de inyección utilizado fue un Split, radio 80:1, flujo de corrida 37cm/seg. La temperatura del horno se programó de la siguiente forma: temperatura inicial de 70 °C durante dos minutos tras lo cual se incrementó a 8 °C/min hasta alcanzar los 270°C y después a 10 °C/min durante seis minutos. El tiempo total fue de 75 minutos; temperatura de la línea de transferencia 290 °C. Los espectros de masas que fueron obtenidos por impacto electrónico; se obtuvieron con una energía de ionización de 70 electrón Volts (eV) y se detectaron en un rango de masa desde 35 a 600 m/z. Se empleó helio como gas de arrastre. La identificación de los compuestos se llevó a cabo por medio de la base de datos de la biblioteca NIST (Linstrom y Mallard, 2013) y la PubMed Compound del National Center of Biotechnology Information (NCBI).

Citocinas

Los ratones de ambos grupos experimentales fueron sangrados cada 15 días durante 8 semanas (4 veces), para evaluar las citocinas en suero (IL-4 e IL-10) con el kit Bio-Plex Pro Assays de la marca BIO-RAD de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La adquisición de datos se llevó a cabo con el aparato Bio-Plex MAGPIX multiplex reader, el cual es un sistema para los inmunoensayos basado en perlas magnéticas, posteriormente los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism 6.

Resultados

Obtención del extracto

El e-EtOH de propóleo de Chihuahua, se obtuvo a partir de 300 g de propóleo seco, el cual previamente se limpió; fue macerado con 1 L de etanol obteniéndose un rendimiento de 67.5% (202.45g) (Figura 15).

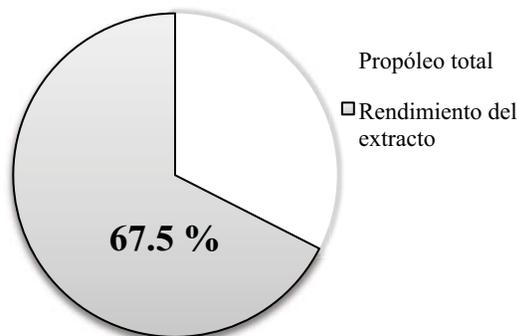


Figura 15. Rendimiento del e-EtOH del propóleo de Chihuahua.

Actividad anti-leishmánica *in vitro* del e-EtOH del propóleo de Chihuahua sobre promastigotes de *L. mexicana*.

Se realizó una curva de crecimiento con los promastigotes de *L. mexicana* evaluados a 3 diferentes tiempos (24, 48 y 72 horas) (Figura 16), para determinar la hora óptima para realizar las interacciones de éstos con el propóleo de Chihuahua. Se observó que el mayor crecimiento de promastigotes se dio a las 48 h con un 64.7% de incremento de la población total, seguida de las 72 h donde se encontró el 23.13% y por último las 24 h donde tan sólo se observó el 12.17%. Con estos resultados se estableció que 48 h era el mejor tiempo para la interacción.

Con respecto a la interacción *in vitro* a las 48 h de incubación del extracto con los promastigotes de *L. mexicana* (2.5×10^4), se obtuvo una CL₅₀ de 0.039 mg/mL; lo cual nos indica que a esta concentración del extracto se inhibe el crecimiento de la mitad de la población de promastigotes de *L. mexicana*. Los datos obtenidos a partir de este ensayo se expresaron en porcentaje de mortalidad de promastigotes de *L. mexicana* (Figura 17); se observó que la interacción del extracto con respecto al porcentaje de mortalidad de los promastigotes es de tipo dosis

dependiente, es decir, que a una concentración mayor del e-EtOH de propóleo de Chihuahua existe una tasa mayor de mortalidad de promastigotes.

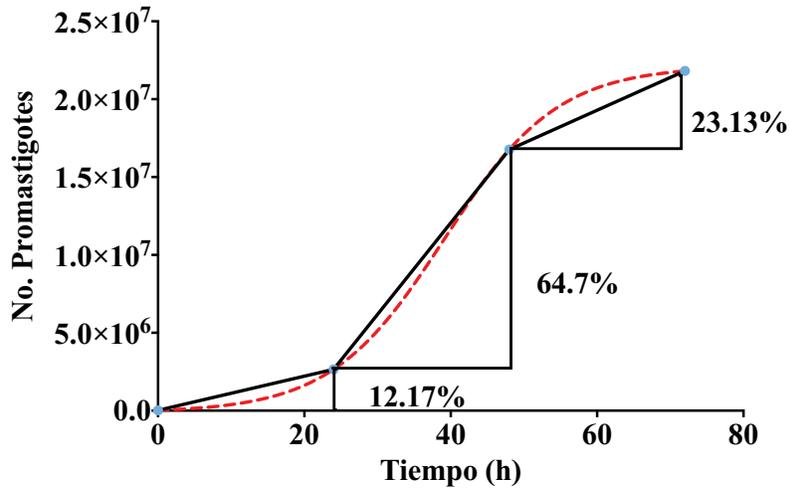


Figura 16. Curva de crecimiento de los promastigotes de *L. mexicana* evaluados a 24, 48 y 72 h. Se muestra en color rojo la curva del modelo matemático del ensayo con respecto al modelo experimental que se encuentra en color negro. Se observa el mayor crecimiento a las 48 h.

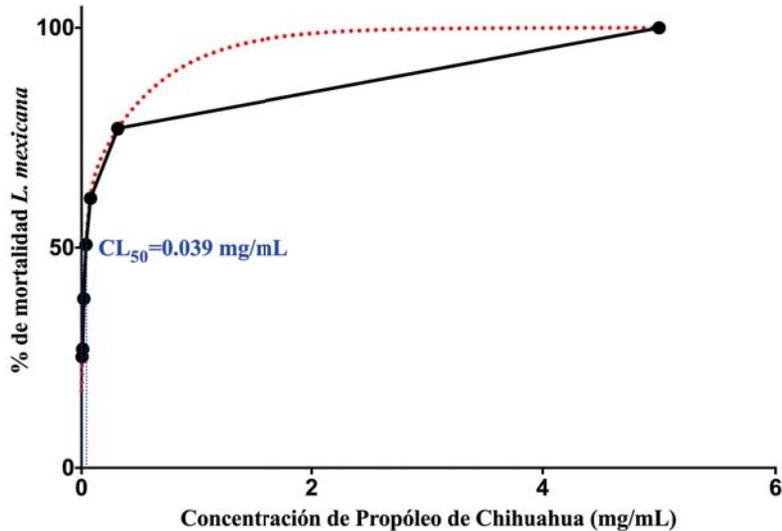


Figura 17. Curva del efecto inhibitorio *in vitro* del propóleo de Chihuahua sobre promastigotes de *L. mexicana*. Muestra la relación entre diferentes concentraciones del extracto y el porcentaje de mortalidad de promastigotes de *L. mexicana* tras 48 h de interacción. Se observa una curva de tipo dosis-dependiente con una $CL_{50} = 0.039$ mg/mL.

Estandarización de la técnica para el cultivo de amastigotes de *L. mexicana*.

El amastigote (estadio intracelular de *Leishmania*) es el causante del desarrollo de la enfermedad en humanos y en otros tipos de mamíferos, es por ello que en el presente estudio se estandarizó la técnica para poder cultivar este estadio y poder proceder a realizar estudios con esta fase

Los amastigotes de *L. mexicana*, aislados de lesiones de ratones infectados, fueron incubados con 3 valores distintos de pH y contados a las 96 h de incubación. Se encontró la mayor cantidad de parásitos en el pH de 5.4, posteriormente en el de 4.7 y por último en el de 5, con 2.77×10^7 , 1.61×10^7 , y 9.4×10^6 amastigotes respectivamente (Figura 18). Además, los cultivos fueron suplementados con distintos porcentajes de SFB y se observó que el óptimo crecimiento se da suplementando el medio Schneider con 20% SFB a una temperatura de 37 °C (datos no publicados).

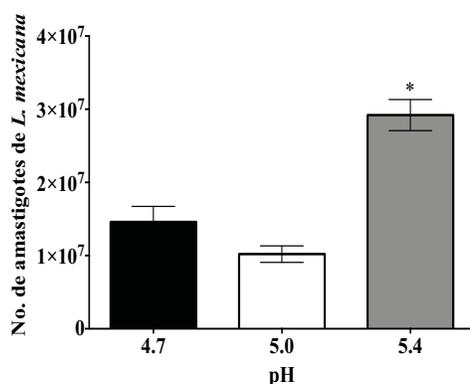


Figura 18. Número de amastigotes de *L.mexicana* a diferentes valores de pH. *Muestra diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la carga parasitaria ($P < 0.005$).

Actividad anti-leishmánica *in vitro* del e-EtOH del propóleo de Chihuahua sobre amastigotes de *L. mexicana*.

De la interacción *in vitro* del extracto de propóleo con los amastigotes de *L. mexicana* a las 96 h se obtuvo una CL_{50} de 0.0082 mg/mL, los datos se expresan en porcentaje de mortalidad de amastigotes de *L. mexicana* (Figura 19). Se muestra una curva dosis-dependiente, por lo que se demuestra el efecto anti-leishmánico que tiene el propóleo de Chihuahua sobre este estadio patógeno del parásito, con concentraciones mínimas.

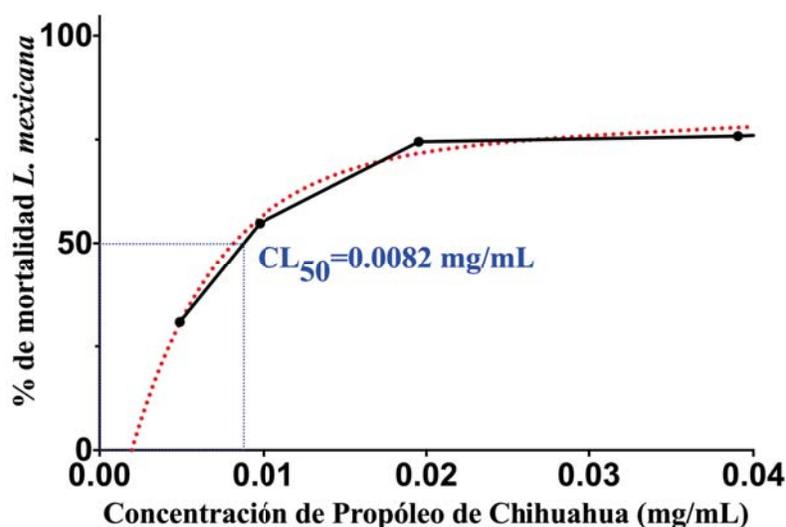


Figura 19. Curva del efecto anti-leishmánico del propóleo de Chihuahua sobre amastigotes de *L. mexicana*. Muestra la relación entre diferentes concentraciones del extracto y el porcentaje de mortalidad de amastigotes de *L. mexicana* tras 96 h de interacción. Se observa una curva de tipo dosis-dependiente con una $CL_{50}= 0.0082 \text{ mg/mL}$.

Efecto anti-leishmánico *in vivo* sobre amastigotes de *L. mexicana* en un modelo murino de leishmaniosis cutánea.

Disminución del tamaño de la lesión

En cuanto a la actividad *in vivo*, se evaluó el tamaño de la lesión durante las 9 semanas de tratamiento, el cual consistió en aplicar de manera tópica un gel de propóleo de Chihuahua al 10% sobre el área de la lesión. Se encontró que los ratones del grupo control desarrollaron una lesión gradual hasta llegar casi a 1 cm de diámetro, mientras que los ratones a los que se les aplicó el tratamiento tuvieron una lesión significativamente más pequeña (menos de 0.5 cm) a partir de la quinta semana de haber iniciado el tratamiento (Figura 20).

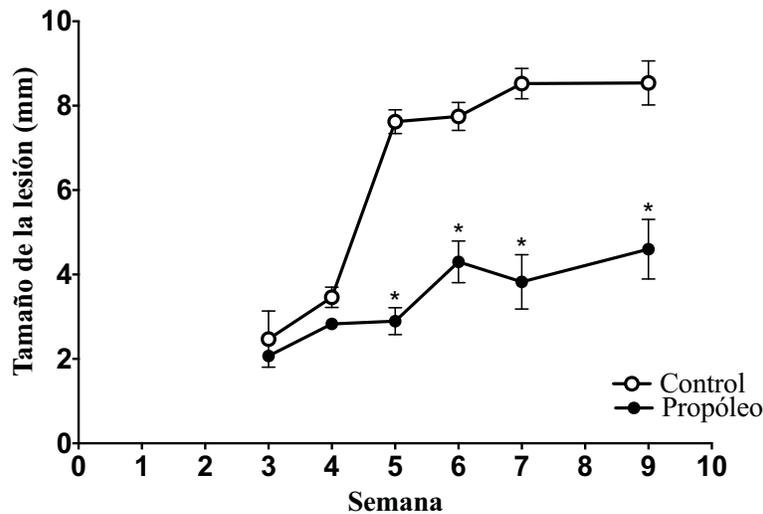


Figura 20. Curva del efecto *in vivo* del propóleo de Chihuahua. Se observa la evolución del tamaño de las lesiones durante el periodo de tratamiento. *Muestra diferencias estadísticamente significativas en el tamaño de la lesión con respecto al control sin tratamiento ($P < 0.005$). “t” de student, GraphPad Prism software.

Disminución de la carga parasitaria

Con respecto a la carga parasitaria evaluada mediante la técnica de dilución limitante, se observó una disminución estadísticamente significativa de la carga parasitaria en los ratones tratados con el propóleo de Chihuahua con respecto al grupo control sin tratamiento (Figura 21).

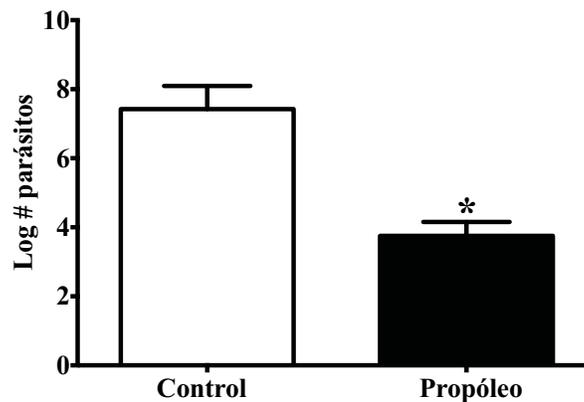


Figura 21. Carga parasitaria evaluada a las 9 semanas de haber iniciado el tratamiento con propóleo. La columna blanca muestra el grupo control y la columna negra el modelo experimental al cual se le aplicó el gel de propóleo al 10%. * Muestra diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la carga parasitaria ($P < 0.005$). “t” de student, GraphPad Prism software

Determinación de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante del e-EtOH del propóleo de Chihuahua.

Respecto al análisis fitoquímico del e-EtOH del propóleo de Chihuahua, se encontró que 314 mg e AG/g extracto son compuestos fenólicos (31.4%), y 62.58 μg e Q/g extracto fueron flavonoides (6.2%); además se encontró una capacidad antioxidante media (CA_{50}) de 1.89 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la quercetina y de 15.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el propóleo de Chihuahua (Figura 22).

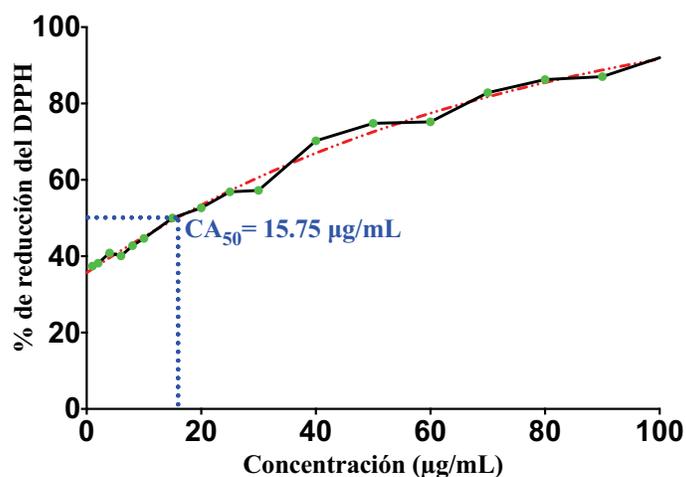


Figura 22. Capacidad antioxidante del propóleo de Chihuahua.

Particiones del e-EtOH del propóleo de Chihuahua.

Se realizó un fraccionamiento del e-EtOH del propóleo de Chihuahua utilizando solventes de baja (hexano), mediana (diclorometano) y alta (metanol) polaridad; con la finalidad de identificar los compuestos presentes en el propóleo, desde el más polar hasta el menos polar.

El rendimiento obtenido para cada fracción se calculó con relación al peso del e-EtOH seco de partida (1 g). Los rendimientos de cada una de las particiones se muestran en la figura 23; el mayor porcentaje se observó en la fracción de mayor polaridad (metanol).

El estudio fitoquímico de estas fracciones permitió establecer la presencia de distintos tipos de metabolitos secundarios, principalmente flavonoides, así como de algunos ácidos grasos.

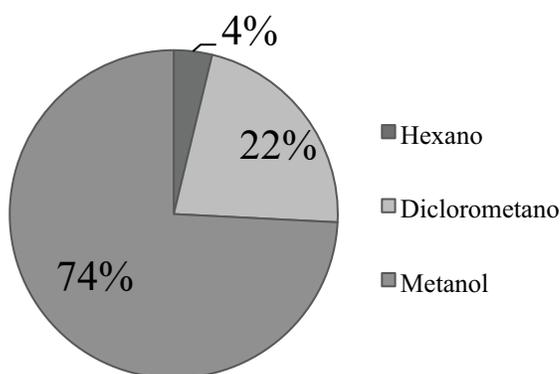


Figura 23. Rendimiento obtenido de las 3 particiones del e-EtOH del propóleo de Chihuahua.

Caracterización química

Cromatografía Líquida De Alta Resolución (HPLC)

Los espectros de absorción de las particiones con hexano, diclorometano y metanol del propóleo de Chihuahua que fueron obtenidos mediante el análisis por medio de HPLC se muestran en la figura 24, 25 y 26 respectivamente. Asimismo, en los cuadros 4, 5 y 6 se muestran las máximas absorciones bajo luz ultra violeta ($\lambda_{\text{máx}}$), el tiempo de retención de cada uno de los compuestos encontrados, así como su estructura. La muestra de propóleo fue comparada con 15 estándares de flavonoides para poder identificar en el propóleo de Chihuahua, compuestos como la Naringina, Pinocembrina, Crisina, Naringenina, Acacetina, Catequina, Quercetina, Camferol y Luteolina; también se encontró la presencia de algunos flavonoles, flavanonas, fenoles y fenantrenos.

Los 9 flavonoides identificados se reportan con actividad antioxidante, anti-inflamatoria y anti-leishmánica, como se muestra en el cuadro 7.

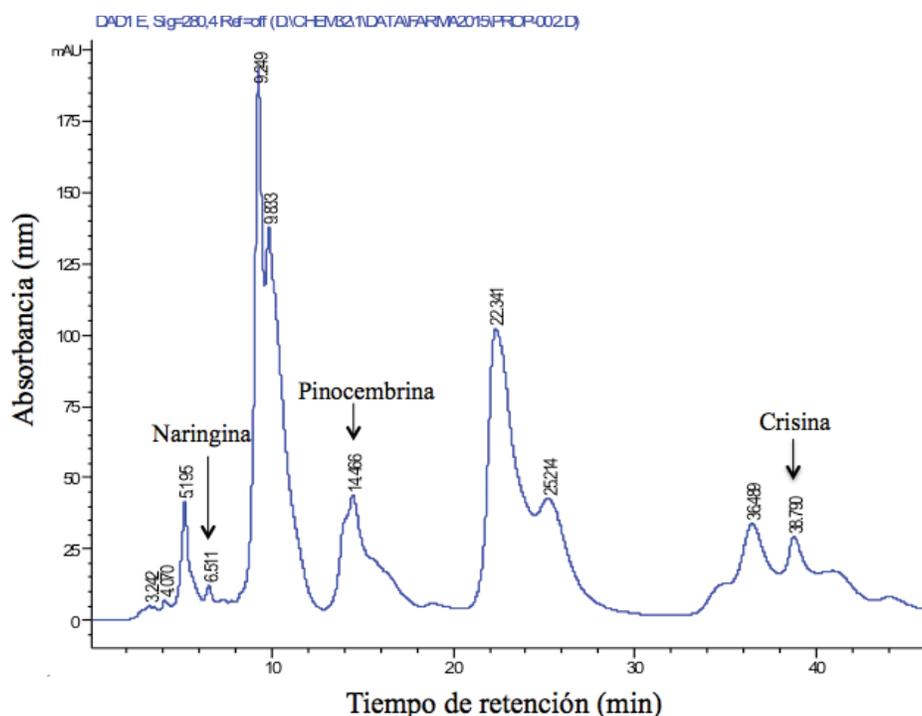


Figura 24. Cromatograma del HPLC de la partición hexánica del e-EtOH del propóleo de Chihuahua.

Cuadro 4. Tiempo de retención y $\lambda_{\text{máx}}$ de la partición hexánica del e-EtOH del propóleo de Chihuahua.

| No. Compuesto | Tiempo de Retención (min) | $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) | Compuesto | Estructura química |
|---------------|---------------------------|-----------------------------|--------------|--------------------|
| 1 | 3.24 | 218, 280 | N.I. | |
| 2 | 4.07 | 228, 280 | N.I. | |
| 3 | 6.51 | 222, 270, 288 | Naringina | |
| 4 | 14.46 | 210, 290 | Pinocembrina | |
| 5 | 36.48 | 266, 292, 360 | Flavonol | |
| 6 | 38.78 | 208, 268, 356 | Crisina | |

N.I. = No identificado

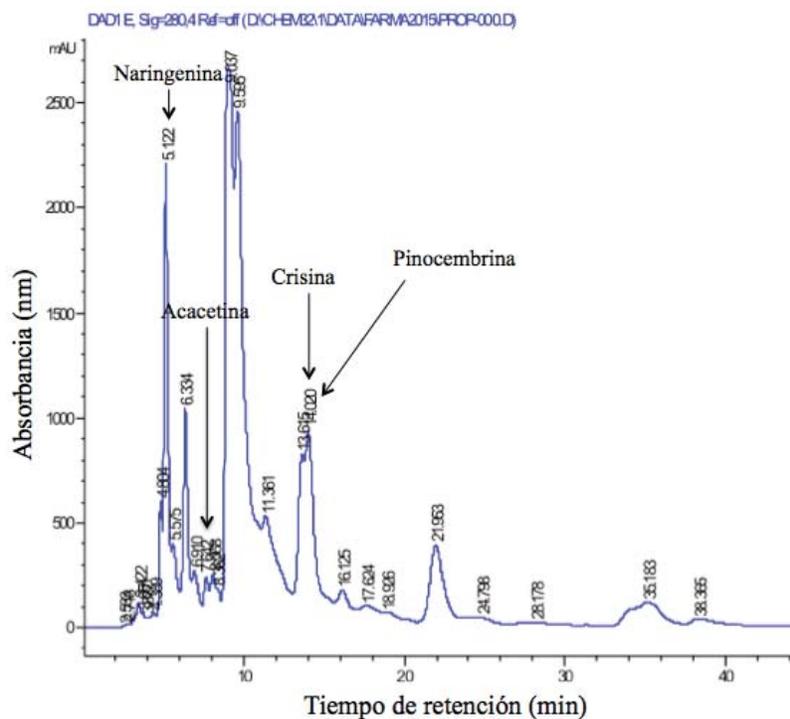
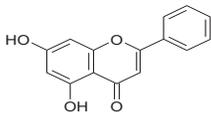
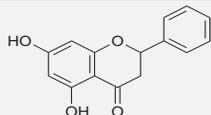


Figura 25. Cromatograma del HPLC de la partición diclorometánica del e-EtOH del propóleo de Chihuahua.

Cuadro 5. Tiempo de retención y $\lambda_{\text{máx}}$ de la partición diclorometánica del e-EtOH del propóleo de Chihuahua.

| No. Compuesto | Tiempo de Retención (min) | $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) | Compuesto | Estructura química |
|---------------|---------------------------|-----------------------------|-------------|--------------------|
| 1 | 3.41 | 222, 298, 310 | Flavanona | |
| 2 | 3.64 | 292 | Fenol | |
| 3 | 3.87 | 224, 288 | Fenol | |
| 4 | 4.37 | 228, 288 | Fenol | |
| 5 | 5.12 | 216, 294 | Naringenina | |
| 6 | 7.63 | 210, 266, 350 | Acacetina | |
| 7 | 8.36 | 254, 266, 294, 354 | Fenantreno | |

| | | | | |
|----|-------|---------------|--------------|---|
| 8 | 9.03 | 274, 298, 332 | Flavanona | |
| 9 | 11.36 | 266,292,354 | Flavonol | |
| 10 | 13.60 | 210,268,312 | Crisina |  |
| 11 | 14.01 | 210, 290 | Pinocembrina |  |
| 12 | 16.13 | 266,296,368 | Flavonol | |
| 13 | 17.62 | 268,294,362 | Flavonol | |
| 14 | 19.92 | 270,294,368 | Flavonol | |
| 15 | 38.35 | 268,294,364 | Flavonol | |

N.I. = No identificado

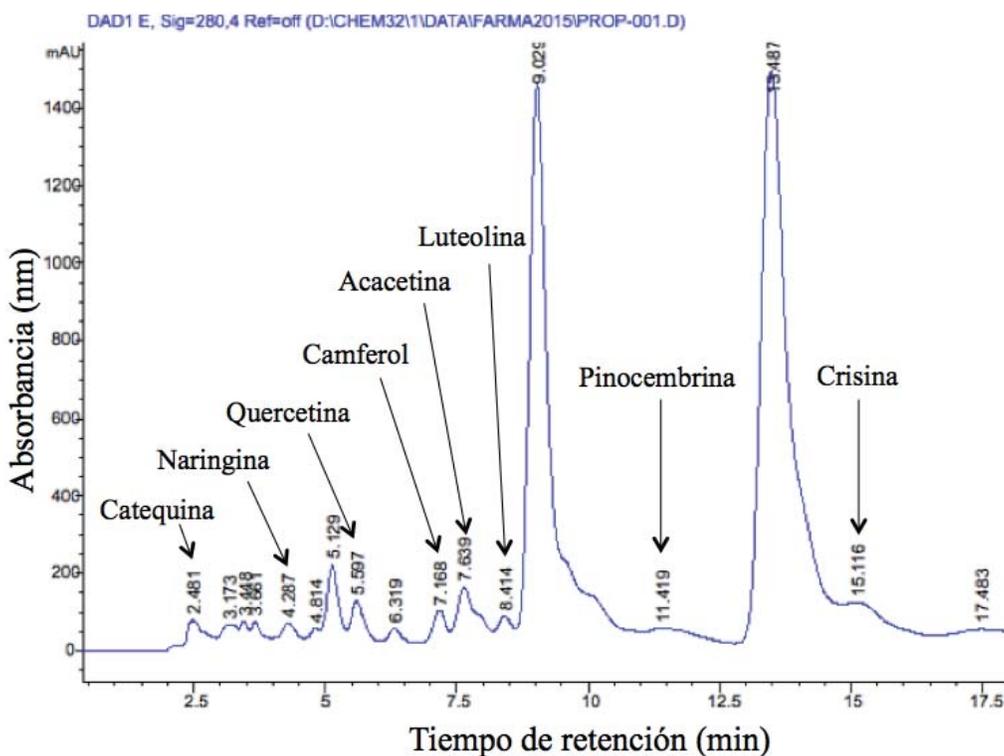
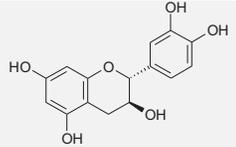
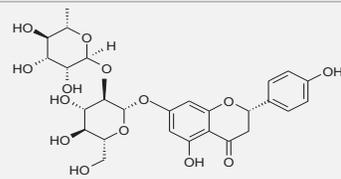
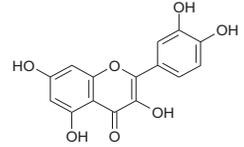
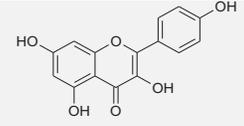
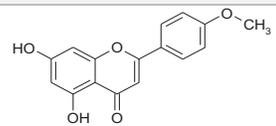
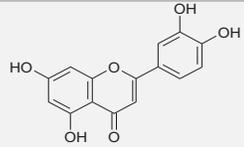
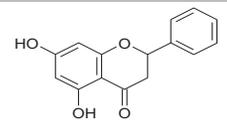
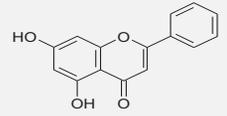


Figura 26. Cromatograma del HPLC de la partición metanólica del e-EtOH del propóleo de Chihuahua.

Cuadro 6. Tiempo de retención y $\lambda_{\text{máx}}$ de la partición metanólica del e-EtOH del propóleo de Chihuahua.

| No. Compuesto | Tiempo de Retención (min) | $\lambda_{\text{máx}}$ (nm) | Compuesto | Estructura química |
|---------------|---------------------------|-----------------------------|--------------|---|
| 1 | 2.46 | 218, 276 | Catequina |  |
| 2 | 3.14 | 216, 288, 328 | Flavanona | |
| 3 | 3.44 | 218, 288, 320 | Flavanona | |
| 4 | 3.65 | 216, 294, 326 | Flavanona | |
| 5 | 4.27 | 208, 228, 284 | Naringina |  |
| 6 | 5.59 | 202, 256, 356 | Quercetina |  |
| 7 | 7.17 | 220, 266, 366 | Camferol |  |
| 8 | 7.63 | 210, 266, 346 | Acacetina |  |
| 9 | 8.4 | 204, 254, 266, 356 | Luteolina |  |
| 10 | 11.41 | 210, 290 | Pinocembrina |  |
| 11 | 15.11 | 210, 266, 312 | Crisina |  |

N.I. = No identificado

Cuadro 7. Reportes de las actividades biológicas presentes en los compuestos identificados mediante HPLC en las 3 particiones del propóleo de Chihuahua.

| Actividad / Compuesto | Anti-inflamatoria | Anti-leishmánica | Antioxidante |
|-----------------------|--|---|---|
| Acacetina | Pinzon <i>et al.</i> , 2011. Carballo-Villalobos <i>et al.</i> , 2014. | da Silva Filho <i>et al.</i> , 2009. | Ahn <i>et al.</i> , 2009. Sun <i>et al.</i> , 2012. Boussouar <i>et al.</i> , 2013. |
| Catequina | Afsar <i>et al.</i> , 2015. | Tasdemir <i>et al.</i> , 2006. | Kalogeropoulos <i>et al.</i> , 2009. |
| Crisina | Ahad <i>et al.</i> , 2014. Kurek-Górecka <i>et al.</i> , 2013. Catchpole <i>et al.</i> , 2015 Rauf <i>et al.</i> , 2015 | Pérez-Victoria <i>et al.</i> , 2001 Tasdemir <i>et al.</i> , 2006. Ribeiro <i>et al.</i> , 2015 | Kalogeropoulos <i>et al.</i> , 2009. Lima <i>et al.</i> , 2009. Sathiavelu <i>et al.</i> , 2009. Zunini <i>et al.</i> , 2010. Pushpavalli <i>et al.</i> , 2010. Fabris <i>et al.</i> , 2013. |
| Camferol | Kurek-Górecka <i>et al.</i> , 2013. | Tasdemir <i>et al.</i> , 2006. | Ahn <i>et al.</i> , 2009. Kalogeropoulos <i>et al.</i> , 2009. Zunini <i>et al.</i> , 2010. Fabris <i>et al.</i> , 2013. |
| Luteolina | López-Lázaro, 2009. | Mitra <i>et al.</i> , 2000. Tasdemir <i>et al.</i> , 2006. | López-Lázaro, 2009 Zunini <i>et al.</i> , 2010. |
| Naringenina | Bodet <i>et al.</i> , 2008. Tsai <i>et al.</i> , 2012. Pinho-Ribeiro <i>et al.</i> , 2016 | Tasdemir <i>et al.</i> , 2006. Shimizu <i>et al.</i> , 2012. | Kalogeropoulos <i>et al.</i> , 2009. Cavia-Saiz <i>et al.</i> , 2010. Turkkan <i>et al.</i> , 2012. Fabris <i>et al.</i> , 2013. Nishimura <i>et al.</i> , 2013. Alam <i>et al.</i> , 2014. |
| Naringina | Ribeiro <i>et al.</i> , 2008. | Venkatesan <i>et al.</i> , 2011. | Jeon <i>et al.</i> , 2001. |
| Pinocembrina | Rasul <i>et al.</i> , 2013. Cavendish <i>et al.</i> , 2015. Catchpole <i>et al.</i> , 2015. Lan <i>et al.</i> , 2016. | Salvador <i>et al.</i> , 2009. | Kalogeropoulos <i>et al.</i> , 2009. Lima <i>et al.</i> , 2009. Zunini <i>et al.</i> , 2010. Fabris <i>et al.</i> , 2013. Rasul <i>et al.</i> , 2013. |
| Quercetina | Kurek-Górecka <i>et al.</i> , 2013. Cavendish <i>et al.</i> , 2015. Kaidama y Gacche, 2015. | Sarkar <i>et al.</i> , 2002. Roy <i>et al.</i> , 2012. | Kalogeropoulos <i>et al.</i> , 2009. Zunini <i>et al.</i> , 2010. Fabris <i>et al.</i> , 2013. Nishimura <i>et al.</i> , 2013. |

Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS)

Las 3 particiones del e-EtOH del propóleo de Chihuahua fueron sometidas a un análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas. Los espectros se muestran en las figuras 27-29, pudiéndose observar diferencias entre los componentes de cada fracción. En los cuadros 8-10 se presentan los compuestos que se identificaron en cada una de las particiones, el tiempo de retención y el porcentaje de abundancia de estos compuestos. La identificación fue realizada con base en los tiempos de retención y fue confirmada por comparación de los espectros de masas con los de la base de datos NIST.

Para la partición hexánica, de acuerdo al tiempo de retención y por sus patrones de fragmentación se identificaron 12 compuestos que forman parte del extracto etanólico siendo el mayoritario el Éster metílico del ácido 9 - octadecenoico con un 20.11%, seguido del 14-metil-, metil éster del ácido pentadecanóico con 18.65% y 2-Nonadecanona con 14.47%, como se muestra en el cuadro 8.

En la partición diclorometánica se identificaron 5 compuestos, siendo el mayoritario la pinocembrina con 89.02%, los otros 4 compuestos representan menos del 2.5% como se muestra en el cuadro 9.

En la partición metanólica se identificaron 6 compuestos, el más abundante nuevamente fue la Pinocembrina con 10.273%, los siguientes 5 compuestos representan menos del 3% como se muestra en el cuadro 10.

Algunos de los compuestos identificados en las particiones presentan diferentes actividades biológicas relacionadas con las actividades evaluadas en el presente estudio, las cuales se muestran en el cuadro 11. Cabe destacar que la Crisina y la Pinocembrina son compuestos que también se identificaron en el HPLC por lo cual sus actividades se muestran en el cuadro 7.

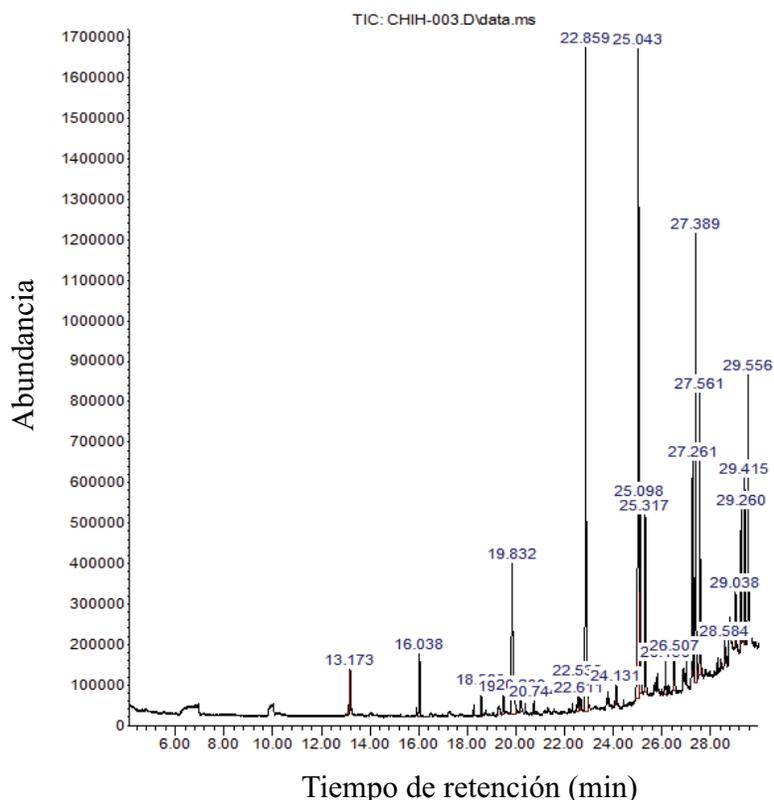


Figura 27. Cromatografía de gases de la partición hexánica del e-EtOH del propóleo de Chihuahua.

Cuadro 8. Compuestos presentes en la partición hexánica del e-EtOH del propóleo de Chihuahua.

| Nombre | Tiempo de Retención (min) | Porcentaje de abundancia | Tipo de compuesto | Estructura química |
|---|---------------------------|--------------------------|-------------------|--------------------|
| α bisabolol | 19.832 | 7.529% | Sesquiterpeno | |
| Miristato de metilo | 20.200 | 0.664% | Ácido graso | |
| 14-metil-, metil éster del ácido pentadecanoico | 22.859 | 18.651% | Ácido graso | |
| Éster metílico del ácido 9 - octadecanoico | 25.043 | 20.113% | Ácido graso | |
| 2-Heptadecanona | 25.098 | 5.144% | Cetona | |
| Éster metílico del ácido octadecanoico | 25.317 | 4.550% | Ácido graso | |
| Eicosano | 26.156 | 7.806% | Alcano | |

| | | | | |
|---|--------|---------|-------------|--|
| E-3-Pentadecen-2-ol | 26.507 | 1.112% | Alcohol | |
| 2-Nonadecanona | 27.389 | 14.466% | Cetona | |
| Metil 18-metilnonadecanoato | 27.561 | 6.435% | Ácido graso | |
| Metil éster del ácido heneicosanoico | 28.584 | 0.445% | Ácido graso | |
| Metil éster del ácido behénico | 29.556 | 5.999% | Ácido graso | |

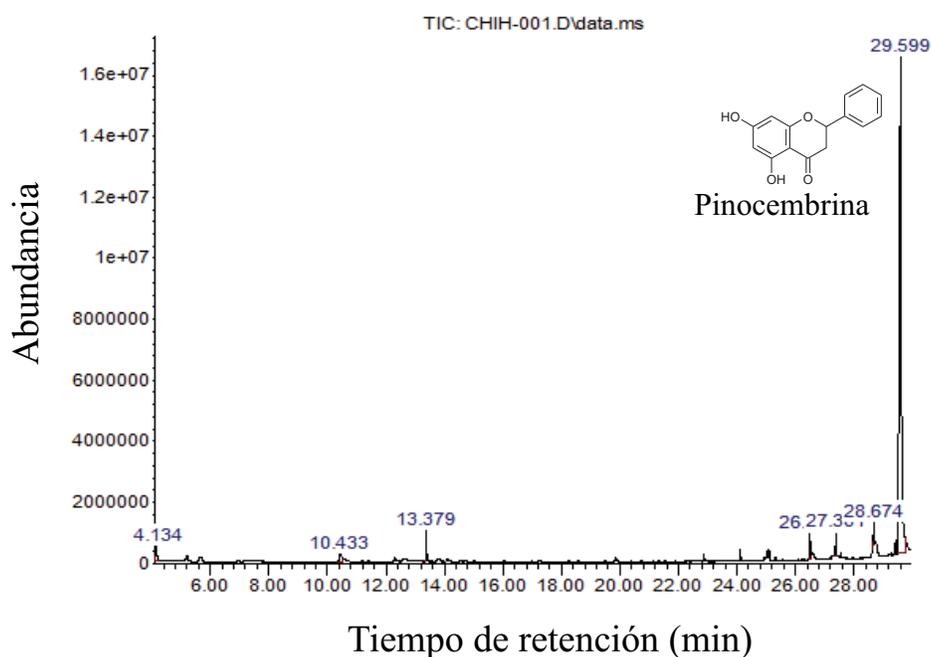
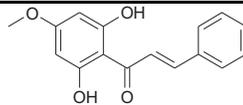
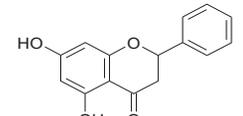


Figura 28. Cromatografía de gases de la partición con diclorometano del e-EtOH del propóleo de Chihuahua.

Cuadro 9. Compuestos presentes en la partición diclorometánica del e-EtOH del propóleo de Chihuahua.

| Nombre | Tiempo de Retención (min) | Porcentaje de abundancia | Tipo de compuesto | Estructura química |
|-----------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------|--------------------|
| Fenilacetona | 10.433 | 1.55% | Fenol-Cetona | |
| N.I. | 13.379 | 2.35% | | |
| 2-Nonadecanona | 27.381 | 1.67 % | Cetona | |

| | | | | |
|-------------------------------|--------|--------|-----------|---|
| Chalcona pinostrobrina | 28.674 | 1.62% | Chalcona |  |
| Pinocembrina | 29.599 | 89.02% | Flavanona |  |

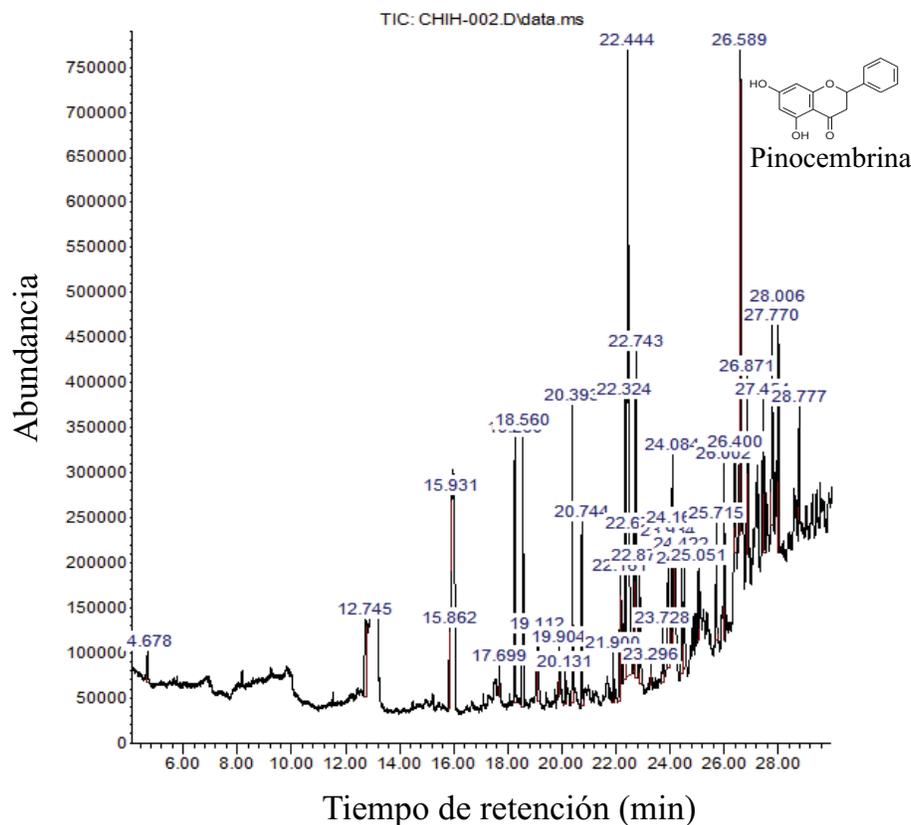
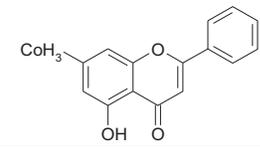
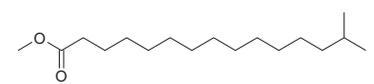
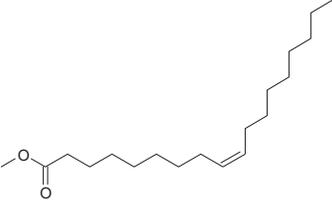
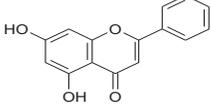
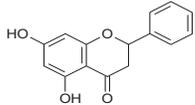
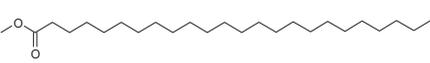


Figura 29. Cromatografía de gases de la partición metanólica del e-EtOH del propóleo de Chihuahua.

Cuadro 10. Compuestos presentes en la partición metanólica del e-EtOH del propóleo de Chihuahua.

| Nombre | Tiempo de Retención (min) | Porcentaje de abundancia | Tipo de compuesto | Estructura química |
|-----------------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------------|---|
| Tectocrisina | 22.161 | 2.270% | Flavona |  |
| Isohexadecanoato de metilo | 22.876 | 2.438% | Ácido graso |  |

| | | | | |
|--|--------|---------|-----------------------------|---|
| Ester metílico del ácido oléico | 25.051 | 1.009% | Ácido graso |  |
| Crisina | 26.400 | 2.275% | Flavona |  |
| Pinocembrina | 26.589 | 10.273% | Flavanona |  |
| Tetracosanoato de metilo | 26.871 | 2.954% | Ácido graso (monoglicérido) |  |

Cuadro 11. Actividades biológicas reportadas para los compuestos identificados mediante GC-MS en las 3 particiones del propóleo de Chihuahua.

| Compuesto | Actividades biológicas | Referencias |
|--------------------------------------|------------------------|--|
| α bisabolol | • Anti-inflamatoria | • Gupta <i>et al.</i> , 2010. |
| | • Anti-leishmánica | • Kamatou y Viljoen, 2010. |
| 2-Heptadecanona | • Anti-trypanosoma | • Corpas-López <i>et al.</i> , 2015. |
| | • Anti-inflamatoria | • Silva <i>et al.</i> , 2014. |
| Fenilacetona | • Anti-leishmánica | • Wang <i>et al.</i> , 2005 |
| | • Antioxidante | • Ferreira <i>et al.</i> , 2010 |
| | | • Rahman y Soory, 2006 |
| Chalcona pinostrobrina | • Anti-inflamatoria | • Tuchinda <i>et al.</i> , 2002. |
| | • Anti-leishmánica | • Torres-Santos <i>et al.</i> , 1999 ^a Torres-Santos <i>et al.</i> , 1999 ^b |
| | • Antioxidante | • Tan <i>et al.</i> , 2015. |
| Tectocrisina | • Anti-inflamatoria | • Catchpole <i>et al.</i> , 2015. |
| | • Anti-leishmánica | • Salvador <i>et al.</i> , 2009. |
| | • Antioxidante | • Lima <i>et al.</i> , 2009. |

Efecto del e-EtOH de propóleo de Chihuahua en el perfil de citocinas Th2.

Es bien conocido que las infecciones por *L. mexicana*, al igual que otras especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo, resultan en el desarrollo de lesiones crónicas, progresivas, que no sanan y de gravedad variable, asociadas principalmente a una respuesta dominante de tipo Th2 (Buxbaum *et al.*, 2003; Padigel *et al.*, 2003; Pollock *et al.*, 2003). Por ello, en el presente estudio se decidió evaluar 2 citocinas características de la respuesta tipo Th2 (IL-4 e IL-10), para el modelo de *Leishmania*.

El perfil de las citocinas IL-4 e IL-10 medidas en suero, en ambos grupos experimentales (control y tratamiento), durante las 9 semanas de tratamiento se muestra en la figura 30-A y B respectivamente. Se puede observar un incremento de ambas interleucinas en el grupo control, comparado con el grupo tratado con propóleo; teniendo un pico a los 30 días donde la IL-10 es la más abundante, seguida de la IL-4; posteriormente hay un decremento, la IL-10 disminuye drásticamente seguida de la IL-4.

El grupo tratado con el propóleo de Chihuahua, presentó un comportamiento similar al control, pero con menor concentración de estas citocinas. Se observa un incremento gradual de las citocinas con un pico máximo a los 30 días, pero con menor concentración que el grupo control, siendo la IL-10 la más abundante, seguida de la IL-4; posteriormente hay un decaimiento menor de estas citocinas.

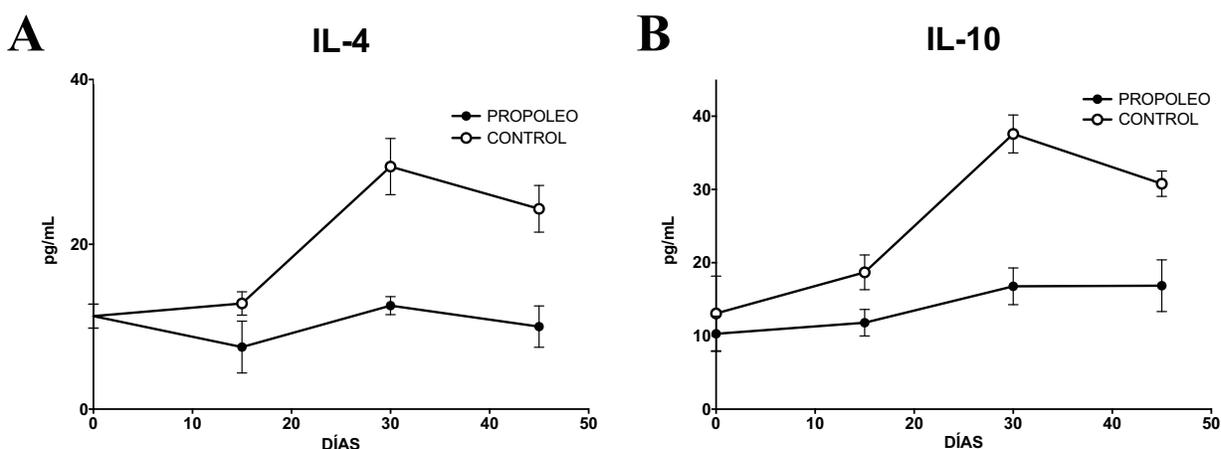


Figura 30. Concentración de las citocinas IL-4 (A) e IL-10 (B) en suero, durante el periodo de tratamiento en ambos grupos experimentales.

Discusión

El descubrimiento de nuevos compuestos con propiedades anti-leishmánicas e inmunomoduladoras es esencial para el desarrollo de nuevas alternativas para el tratamiento de la leishmaniosis. Sforcin y Bankova (2011) han señalado que el propóleo tiene un gran potencial para el desarrollo de nuevos fármacos. La información respecto a la actividad de propóleos mexicanos es muy limitada, por lo cual el presente estudio contribuye al conocimiento de este producto de la colmena. Éste es el primer estudio que se realiza sobre la actividad anti-leishmánica del extracto etanólico de propóleo de Chihuahua sobre ambos estadios de desarrollo de *L. mexicana*, debido a que no existe ningún reporte en la bibliografía que refiera esta actividad a propóleos mexicanos.

De la interacción *in vitro* a las 48 h de incubación del e-EtOH de propóleo de Chihuahua con los promastigotes de *L. mexicana*, se obtuvo una CL₅₀ de 0.039 mg/mL, la cual es una concentración inhibitoria menor comparada con otros autores e incluso con fármacos de referencia. Dutta en el 2007 realizó un estudio para determinar la actividad anti-leishmánica de un extracto de *Aloe vera*, donde probó diferentes especies de *Leishmania* y determinó la CL₅₀ para promastigotes y amastigotes. Para promastigotes *L. trópica* y *L. mayor*, causantes de leishmaniosis cutánea reportó una CL₅₀ de 0.176 mg/mL y 0.1025 mg/mL respectivamente. Durán *et al.* en el 2008 reportó un propóleo de Adana, Turquía, con capacidad de inhibir completamente el crecimiento celular de promastigotes de *L. trópica* a concentraciones de 0.250, 0.500 y 0.750 mg/mL. Por otro lado, Durán *et al.* (2011) reportó la actividad anti-leishmánica de 2 propóleos de distintas zonas de Turquía con valores de CL₅₀ de 0.175 mg/mL y 0.35 mg/mL para promastigotes de *L. trópica*. En el 2013, da Silva *y* colaboradores reportaron un propóleo brasileño el cual impidió la proliferación de promastigotes de *L. braziliensis* a las 24 h utilizando 0.1 mg/mL; esta concentración mostró el mismo efecto antiproliferativo que el fármaco utilizado de referencia Glucantime 0.25 mg/mL, después de 96 h de incubación. Ruiz en el 2014 realizó una interacción *in vitro* con los promastigotes de *L. mexicana* y los fármacos de referencia utilizados actualmente, donde determinó que el valor de CL₅₀ para el estibogluconato de sodio tras 48 h de interacción fue de 0.491 mg/mL y para la anfotericina B de 0.042 mg/mL.

Como se puede observar todas las concentraciones previamente mencionadas fueron mayores a las obtenidas con el propóleo de Chihuahua (0.039 mg/mL), incluso el valor de la anfotericina B (0.042 mg/mL) es prácticamente igual al encontrado con el propóleo de Chihuahua, lo cual nos demuestra la potente actividad anti-leishmánica que presenta este propóleo.

Se encontró que los amastigotes de *L. mexicana* tuvieron un crecimiento óptimo en medio Schneider suplementado con 20% SFB, pH de 5.4 y a una temperatura de 37 °C; estas condiciones concuerdan con lo reportado por Bates y colaboradores en 1992.

En el presente estudio, se determinó una CL_{50} de 0.0082 mg/mL para los amastigotes *L. mexicana*, este dato demuestra el efecto anti-leishmánico del propóleo de Chihuahua y comparado con otros estudios es una concentración similar y en algunos casos esta por debajo de lo reportado en la bibliografía. Dutta (2007) reporta una CL_{50} de 0.006 mg/mL de un extracto de hoja de *Aloe Vera* contra amastigotes de *L. donovani*. En el mismo año Ayres y colaboradores (2007), llevaron a cabo experimentos para estudiar el efecto de extractos etanólicos de distintos propóleos brasileños en cultivos de macrófagos infectados por *L. amazonensis*, reportaron una concentración de 0.025 mg/mL, la cual a las 72 h mostró una reducción significativa del porcentaje de infección y del número de parásitos intracelulares. Santana en el 2014, reporta un propóleo café de Brasil el cual mostró una disminución significativa dosis-dependiente en las tasas de infección de macrófagos tratados con amastigotes de *L. amazonensis* a una concentración de 0.00625 mg/mL a las 48 h de incubación.

La disminución significativa en el tamaño de la lesión en los ratones tratados con el propóleo de Chihuahua comparada con el grupo control, indica que los primeros responden de manera eficaz, controlando el daño ocasionado por *L. mexicana*, observándose un efecto directo de nuestro extracto sobre los amastigotes de *L. mexicana* contenidos en las lesiones. Este resultado podría ser atribuido a cierta actividad anti-inflamatoria que pudiera tener el propóleo de Chihuahua. Con respecto a ello, Rivera (2013) reportó 2 propóleos mexicanos, uno de Guanajuato y uno del Edo. de México los cuales presentaron una importante actividad antiinflamatoria en un modelo de edema plantar con carragenina. Además, varios estudios han demostrado que el propóleo tiene propiedades anti-inflamatorias, acelera la regeneración de tejidos (epitelización) y la división celular en la curación de heridas, previene y detiene el desarrollo de procesos inflamatorios,

exhibe una acción antimicrobiana y acorta el tiempo de cicatrización, dichas actividades están directamente relacionadas con las flavononas (Ramos y Miranda, 2007; Salmón, 2014; da Silva *et al.*, 2015). Esto concuerda con los compuestos encontrados en la caracterización química del propóleo de Chihuahua, ya que mediante HPLC se identificaron algunos compuestos fenólicos de este tipo.

Por otra parte, el hecho de se haya registrado una disminución significativa de la carga parasitaria en el grupo experimental comparado con el grupo control, nos sugiere la posibilidad de que el propóleo además de su propiedad anti-inflamatoria tiene la capacidad de inhibir el crecimiento *in vivo*, de este estadio patógeno de *L. mexicana*.

Como se mencionó anteriormente, los tratamientos utilizados para tratar la leishmaniosis son sistémicos; cabe destacar que ésta es la primera vez que se propone una alternativa tópica a base de un producto natural como el propóleo para el tratamiento de esta patología.

La actividad anti-leishmánica encontrada es atribuida a la composición química del propóleo, ya que éste se encuentra conformado por compuestos fenólicos, principalmente flavonoides, los cuales varían en estructura y concentración dependiendo de la región, la flora y la temporada en que sea colectado el propóleo; de hecho se sabe que gran parte de las actividades biológicas y terapéuticas de los propóleos se debe a la presencia de flavonoides (Salmón, 2014). Con respecto a ello, da Silva *et al.*, (2013) mencionan que los flavonoides y otros compuestos fenólicos se encuentran involucrados en la actividad anti-leishmánica de promastigotes de *L. major*, *L. chagasi* y *L. braziliensis*. Asimismo, diversos estudios han demostrado una correlación directa entre el contenido de fenoles totales y actividades biológicas presentes en los propóleos, como actividades antioxidante y antimicrobiana (Kumazawa *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2008), lo cual concuerda con los resultados en cuanto a la concentración de fenoles totales, de flavonoides así como la actividad antioxidante, encontrados en el presente estudio.

Al-Fatimi *et al.*, 2007 refieren que concentraciones menores a 96.6 µg/mL para extractos, se consideran con capacidad antioxidante adecuada. Basandonos en este criterio, podemos afirmar que el propóleo de Chihuahua (15.75 µg/mL) posee una adecuada capacidad antioxidante. Rivera (2013) determinó la capacidad antioxidante del propóleo de Guanajuato y del Edo. de México,

encontrando que las CA_{50} fueron de $78.63\mu\text{g/mL}$ y $8.48\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Asimismo, algunos autores mencionan a los fenoles y flavonoides contenidos en los propóleos como potentes antioxidantes que han demostrado ser capaces de eliminar los radicales que interfieren con el metabolismo normal de las células, protegiendo a la membrana celular contra la peroxidación lipídica (Kuropatnicki *et al.* 2013; Salmón 2014).

Con respecto a la composición química, Sahinler y Kaftanoglu (2005) determinaron la composición química del propóleo de Adana (Turquía), el análisis químico indicó que las muestras contenían altas concentraciones de ácidos grasos, terpenos, ésteres e hidrocarburos; la actividad inhibitoria que presentó este propóleo contra *L. mayor* se le atribuye a estos compuestos; el éster metílico del ácido 9-octadecanoico (ácido graso) fue uno de los compuestos encontrados en el propóleo de Adana, el cual también se identificó en el propóleo de Chihuahua. Bankova (2009) señala que propóleos europeos de diferentes localidades han demostrado la presencia de flavonoides aglyconas, ácidos fenólicos y sus ésteres. Rivera (2013) identificó mediante GC-MS y HPLC compuestos presentes en el propóleo de Guanajuato y en el del Edo. de México. Mediante GC-MS encontró la presencia de compuestos como: Pinocembrina, Metil éster del ácido oleico, Metil éster del ácido palmítico, Naringenina, Ácido palmítico, entre otros. Mediante el análisis de HPLC, identificó: Pinocembrina, flavanonas, flavonoles, fenilpropanoides, fenoles, isoflavonas y flavonoides. Se pudieron observar diferencias entre las proporciones de los componentes de cada propóleo, pero en general los más abundantes fueron Pinocembrina, Naringenina y otros compuestos fenólicos; algunos de estos compuestos coinciden con los encontrados en el propóleo de Chihuahua. Salmón (2014) menciona que entre los compuestos orgánicos y minerales que se reportan para el propóleo se encuentran más de 40 flavonoides (flavonas, flavanoles y flavononas), compuestos fenólicos, aldehídos aromáticos alifáticos, compuestos terpénicos, ácidos grasos, aminoácidos, vitaminas y oligoelementos; algunos de ellos a los cuales se les atribuyen importantes propiedades farmacológicas. Varios estudios han demostrado que los alcaloides, flavanonas, di- y triterpenoides, chalconas y polifenoles son compuestos fitoquímicos con efectos antileishmánicos (Kolodziej *et al.*, 2001 ; Grecco *et al.*, 2010 ; Sawadogo *et al.*, 2012). Todos estos reportes concuerdan con los compuestos identificados en el presente estudio mediante HPLC y GC-MS. Esta gran diversidad

química en las diferentes muestras de propóleos tienen el potencial de proporcionar valiosas propiedades a los componentes activos (Bankova, 2009).

Pero además del efecto de los componentes individuales, los efectos sinérgicos de varios compuestos pueden ser responsables de las diferentes actividades farmacológicas de los propóleos. Sforcin *et al.*, (2011) sugieren que las propiedades biológicas generales de propóleo se deben a una mezcla natural de sus componentes y que un sólo constituyente del propóleo no tiene una actividad mayor que la del extracto total. Por lo cual, al evaluar las actividades biológicas del propóleo no se debe descartar un efecto sinérgico entre los diferentes compuestos que se encuentran en este producto natural (da Silva *et al.*, 2013). Es por ello que se sugiere que los compuestos encontrados en el propóleo de Chihuahua actúan en sinergismo y con base a la bibliografía que valida las distintas propiedades biológicas de los compuestos encontrados (cuadro 7 y 11), se les atribuye la actividad anti-leishmánica encontrada en el presente estudio.

Como se mencionó anteriormente la infección por *L. mexicana* está caracterizada por causar lesiones crónicas y progresivas sin cura, asociadas principalmente a una respuesta de tipo Th2 con secreción de IL-4 e IL-10, éstas últimas se caracterizan por tener un efecto anti-inflamatorio. El efecto típico en modelos de *Leishmania* del nuevo mundo, es el aumento de este tipo de citocinas, lo cual le favorece al parásito y le confiere éxito para su proliferación en el huésped, como se observó en los resultados obtenidos en el grupo control. En cambio en nuestro grupo tratado con propóleo de Chihuahua, el perfil de estas citocinas se presenta en concentraciones menores, esto concuerda con los datos obtenidos en cuanto al tamaño de la lesión y las cargas parasitarias encontrada en las lesiones, donde se observó una disminución significativa en comparación con el control.

Esta actividad de los propóleos se encuentra ampliamente reportada. Artículos recientes han proporcionado información de la influencia de los propóleos en el sistema inmunológico (Sforcin *et al.*, 2007; Sforcin *et al.*, 2011). Varios trabajos demuestran que el propóleo estimula tanto la inmunidad inespecífica como la específica, así como la celular (linfocitos T) y la humoral (linfocitos B); también se ha comprobado que estimula la actividad de los macrófagos a casi el doble y aumenta el número de linfocitos, incrementando la respuesta inmune (Salmón, 2014). Un propóleo brasileño mostró acción directa sobre *L. braziliensis* y efectos inmunomoduladores en

macrófagos murinos, a pesar de que se ha reportado que el parásito afecta las vías de activación de la célula; estos efectos fueron asociados a la presencia de compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos aromáticos y benzopiranos), di- y triterpenos, así como aceites esenciales identificados en la muestra de propóleo (da Silva *et al.*, 2013).

Estudios previos han establecido que la producción de IL-4 durante las etapas iniciales de la infección por *Leishmania* en ratones BALB/c susceptibles desempeña un papel dominante en la dirección de la diferenciación de las células T CD4 en células efectoras de tipo Th2 (Scott *et al.*, 1988; Heinzl *et al.*, 1991). Se ha reportado que al administrar tratamientos anti-IL-4 en ratones BALB/c antes de la infección con *L. major* o *L. amazonensis* se puede reducir la carga parasitaria y controlar la infección (Sadick *et al.*, 1990; Alfonso y Scott, 1993). Del mismo modo, otros autores mencionan que ratones BALB/c deficientes de IL-4 han mejorado la resistencia a infecciones por *L. mexicana* y *L. amazonensis* (Satoskar *et al.*, 1997; Alexander *et al.*, 2002). Se ha demostrado que la IL-4 juega un papel fundamental en infecciones que no sanan de modelos murinos causadas por *L. mexicana*. Por lo tanto, la inhibición de la producción de IL-4 o la señalización mediada por IL-4 en ratones BALB/c resulta en la inducción de una respuesta Th1 y la incapacidad para desarrollar lesiones por infecciones con *L. mexicana* (Pollock *et al.*, 2003). El propóleo de Chihuahua redujo la concentración de esta citocina a partir del día 15 post-infección en comparación con el control, lo que podría explicarnos la disminución del tamaño de la lesión y de la carga parasitaria.

La producción de IL-10 también se correlaciona con la progresión de la lesión en pacientes con leishmaniosis cutánea (Padigel *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2007; Salhi *et al.*, 2008). Kane y Mosser (2001) reportan que ratones BALB/c deficientes de IL-10 desarrollan pequeñas o menor cantidad de lesiones en comparación con el grupo control después de haber sido infectados con altas dosis de parásitos de *L. major*. Padigel *et al.*, (2003) sugieren que a pesar de que la IL-10 no es el mediador dominante de la susceptibilidad de los ratones BALB/c en la infección con *L. mexicana* y *L. amazonensis*, juega un papel importante en la regulación del desarrollo de una respuesta de tipo Th1 protectora. Encontraron que un tratamiento con anti-IL-4 ayudó tanto a ratones deficientes de IL-10 como al grupo control a controlar la infección por *L. mexicana*, como se evidenció en la reducción de tamaño y de la carga parasitaria de sus lesiones, aunque

solamente los ratones deficientes de IL-10 resolvieron totalmente sus lesiones y redujeron el número de parásitos a niveles insignificantes. Esto concuerda con la disminución de la carga parasitaria encontrada en las lesiones tratadas con el propóleo de Chihuahua y el comportamiento de esta citocina en este mismo grupo. Incluso la disminución estadísticamente significativa de la carga parasitaria la encontraron después de las 5 semanas post-infección, esto coincide con el pico encontrado a los 30 días de esta citocina en nuestro modelo. El estudio de Padigel *et al.*, (2003) confirma que la producción de IL-4 en ratones deficientes de IL-10 juega un papel significativo en la incapacidad de estos ratones para controlar la infección, ya que los ratones deficientes de IL-10 tratados con anti-IL-4, resolvieron la infección de manera más eficaz y tenían significativamente menos parásitos en sus lesiones en comparación con los ratones BALB/c tratados de manera similar. Sus resultados sugieren que tanto la IL-4 como IL-10 juegan papeles importantes en la susceptibilidad a la infección con especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo y que la depleción de ambas citocinas puede ser necesaria para el desarrollo de resistencia.

Considerando la actividad anti-leishmánica, inmunomoduladora, antioxidante y anti-inflamatoria (Dantas *et al.*, 2006; Ayres *et al.*, 2007 ; Sforcin, 2007 ;Sforcin y Bankova 2011; da Silva *et al.*, 2013; da Silva *et al.*, 2015) que han mostrado propóleos de diferentes regiones en distintos modelos, aunado a los resultados encontrados en el presente estudio, hacen que el propóleo de Chihuahua constituya un producto natural muy prometedor para el desarrollo de un tratamiento tópico para la leishmaniosis.

Conclusiones

El e-EtOH de propóleo de Chihuahua:

- Demostró inhibir el crecimiento de ambos estadios de *L. mexicana* con concentraciones mínimas del extracto *in vitro*.
- Disminuyó significativamente el tamaño y el número de parásitos presentes en las lesiones *in vivo*.
- Mostró una elevada proporción de fenoles y flavonoides, así como una buena capacidad antioxidante.
- Demostró la presencia de diversos compuestos fenólicos a los cuales se les han atribuido propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes y anti-leishmánicas.
- Disminuyó las citocinas anti-inflamatorias IL-4 e IL-10 en suero de ratones infectados con *L. mexicana*.
- Representa una prometedora alternativa para el desarrollo de un tratamiento alternativo tópico para la leishmaniosis.
- Es un punto de partida para futuras investigaciones.

Referencias

- Afsar, T., M.R. Khan, S. Razak, S. Ullah y B. Mirza. 2015. Antipyretic, anti-inflammatory and analgesic activity of *Acacia hydaspica* R. Parker and its phytochemical analysis. *BMC complementary and alternative medicine*. 15(1):132-136.
- Ahad, A., A.A. Ganai, M. Mujeeb y W.A. Siddiqui. 2014. Chrysin, an anti-inflammatory molecule, abrogates renal dysfunction in type 2 diabetic rats. *Toxicology and applied pharmacology*. 279(1): 1-7.
- Ahn, M.R., K. Kunimasa, S. Kumazawa, T. Nakayama, K. Kaji, Y. Uto, H. Hori, H. Nagasawa y T. Ohta. 2009. Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Molecular nutrition & food research*. 53(5): 643-651.

- Aït-Oudhia, K., E. Gazanion , B. Vergnes , B. Oury y D. Sereno. 2011. Leishmania antimony resistance: what we know what we can learn from the field. *Journal of Parasitology Research*. 109:1225–1232.
- Alam, M. A., N. Subhan, M.M. Rahman, S.J. Uddin, H.M. Reza y S.D. Sarker. 2014. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*. 5: 404-417.
- Alexander, J., F. Brombacher, H.A. McGachy, A.N.J. McKenzie, W. Walker y K.C. Carter. 2002. An essential role for IL-13 in maintaining a non-healing response following *Leishmania mexicana* infection. *European journal of immunology*. 32(10): 2923-2933.
- Al-Fatimi M., M. Wurster, G. Schröder, U. Lindequist. 2007. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants of Yemen. *Journal of Ethnopharmacology*. 111:657-666.
- Alfonso, L.C., y P. Scott. 1993. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infection and Immunity*. 61(7): 2952-2959.
- Almaraz-Abarca, N., J. A. Ávila-Reyes, E. A. Delgado-Alvarado, N. Naranjo-Jiménez y J. Herrera- Corral. 2008. El metabolismo secundario de las plantas, un nuevo concepto. *Vidsupra*.1(3): 38-47
- Alvar, J., I. D. Vélez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, M. den Boer, and the WHO Leishmaniasis Control Team. 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One*. 7(5): e35671.
- Ampuero, V.S.J. 2000. Leishmaniasis: Módulo técnico. Universidad de Brasília, Brasil. En línea: http://bvs.minsa.gob.pe/local/OGEI/795_MS-OGE106.pdf
- Anderson, C. F., M. Oukka, V.J. Kuchroo y D. Sacks. 2007. CD4+ CD25– Foxp3– Th1 cells are the source of IL-10–mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *The Journal of experimental medicine*. 204(2): 285-297.
- Antonelli, L.R., W.O. Dutra, R.P. Almeida, O. Bacellar, E.M. Carvalho y K.J. Gollob. 2005. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunology Letters*. 101(2):226-230.

- Ayres, C.D., M.C. Marcucci y S. Giorgio. 2007. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 102(2): 215-220.
- Bankova, V. 2005. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*. 100(1): 114-117.
- Bankova, V. 2009. Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. 1(2): 23- 28.
- Bankova, V., M. Popova y B. Trusheva. 2014. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chemistry Central Journal*. 8:28
- Bates, P.A., C.D. Robertson, L. Tetley y G.H. Coombs. 1992. Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. *Parasitology*. 105:193-202
- Berrueta, U.T. 2014. Leishmaniosis o Leishmaniasis. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Recursos en parasitología. En línea: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/leishmaniosis.html>.
- Bodet, C., V.D. La, F. Epifano y D. Grenier. 2008. Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and ex vivo human whole-blood models. *Journal of periodontal research*. 43(4): 400-407.
- Boussouar, A., C. Barette, R. Nadon, A. Saint-Léger, N. Broucqsault, A. Ottaviani, A. Firozoussen, Y. Lu, L. Lafanechere, E. Gilson, F. Magdinier y J. Ye. 2013. Acacetin and chrysin, two polyphenolic compounds, alleviate telomeric position effect in human cells. *Molecular Therapy—Nucleic Acids*. 2(8): e116.
- Burdock, G.A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*. 36(4):347-363.
- Buxbaum, L.U., H. Denise, G.H. Coombs, J. Alexander, J.C. Mottram y P.Scott. 2003. Cysteine protease B of *Leishmania mexicana* inhibits host Th1 responses and protective immunity. *The Journal of Immunology*. 171(7): 3711-3717.
- Carballo-Villalobos, A.I., M.E. González-Trujano y F.J. López-Muñoz. 2014. Evidence of mechanism of action of anti-inflammatory/antinociceptive activities of acacetin. *European journal of pain*. 18:396-405.

- Catchpole, O., K. Mitchell, S. Bloor, P. Davis y A. Suddes. 2015. Antiproliferative activity of New Zealand propolis and phenolic compounds vs human colorectal adenocarcinoma cells. *Fitoterapia*. 106:167-174.
- Cavendish, R. L., J.D.S. Santos, R.B. Neto, A.O. Paixão, J.V. Oliveira, E.D. de Araujo, A.A.B. e Silva, S.M. Thomazzi, J.C. Cardoso y M.Z. E. D. Gomes. 2015. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. *Journal of ethnopharmacology*. 173: 127-133.
- Cavia-Saiz, M., M.D. Busto, M.C. Pilar-Izquierdo, N. Ortega, M. Perez-Mateos y P. Muñiz. 2010. Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90(7): 1238-1244.
- CDC. 2013. Leishmaniasis. En línea: <http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>.
- Choi Y. M., D.O. Noh, S.Y. Cho, H.J. Suh, K.M. Kim y J.M. Kim. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT-Food Science and Technology*. 39(7):756-761.
- Corpas-López, V., F. Morillas-Márquez, M.C. Navarro-Moll, G. Merino-Espinosa, V. Díaz-Sáez y J. Marín-Sánchez. 2015. (-)- α -Bisabolol, a Promising Oral Compound for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. *Journal of natural products*. 78(6): 1202-1207.
- Cox, G.S. 2005. Drug Discovery Handbook. Wiley-Interscience, Hoboken, NJ. pp. 72
- Dantas, A.P., K. Salomão, H. S. Barbosa, S. L. De Castro. 2006. The effect of Bulgarian propolis against *Trypanosoma cruzi* and during its interaction with host cells. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 101(2):207-211.
- Dantas-Torres, F., M. F. Melo, L. A. Figueredo y S. P. Brandao-Filho. 2009. Ectoparasite infestation on rural dogs in the municipality of São Vicente Férrer, Pernambuco, Northeastern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 18 (3): 75-77.
- da Silva Filho, A. A., D.O. Resende, M.J. Fukui, F.F. Santos, P.M. Pauletti, W.R. Cunha, M.L.A. Silva, L.E. Gregório, J.K. Bastos y N.P.D. Nanayakkara. 2009. In vitro antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Fitoterapia*. 80(8): 478-482.

- da Silva, S.S., G.D.S. Thomé, A.H.D. Cataneo, M.M. Miranda, I. Felipe, C.G.T.D.J. Andrade, M. A. E. Watanabe, G. M. Piana, J. M. Sforcin, W. R. Pavanelli e I. Conchon-Costa. 2013. Brazilian propolis antileishmanial and immunomodulatory effects. *Evidence-based complementary and alternative medicine*.
- da Silva, S. S., S.S. Mizokami, J.R. Fanti, M.M. Miranda, N.Y. Kawakami, F.H. Teixeira, E.J.A. Araújo, C. Panis, M.A.E. Watanabe, J.M. Sforcin, W.R. Pavanelli, W.A. Verri, I. Felipe e I. Conchon-Costa. 2015. Propolis reduces *Leishmania amazonensis*-induced inflammation in the liver of BALB/c mice. *Parasitology research*. 115: 1557-1566.
- Derevici, A., A. Popesco y N. Popesco. 1965. Biological properties of propolis. *Revue de Pathologie Comparee*. 2: 21-24.
- Domínguez, X.A. 1973. Métodos de Investigación fitoquímica. Ed. Limusa. México. 281 p.
- Duran, G., N. Duran, G. Culha, B. Ozcan, H. Oztas y B. Ozer. 2008. In vitro antileishmanial activity of Adana propolis samples on *Leishmania tropica*: a preliminary study. *Parasitology research*. 102(6): 1217-1225.
- Durán, N., M. Muz, G. Culha, G. Duran y B. Ozer. 2011. GC-MS analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types. *Parasitology Research*. 108:95-105
- Dutta, A., S., Bandyopadhyay, C. Mandal, y M. Chatterjee. 2005. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. *Parasitology international*. 54(2): 119-122.
- Dutta, A., G. Mandal, C. Mandal y M. Chaterjee. 2007. In vitro antileishmanial activity of Aloe vera leaf exudate: A potential herbal therapy in leishmaniasis. *Glycoconjugate journal*. 24(1):81-86.
- Fabris, S., M. Bertelle, O. Astafyeva, E. Gregoris, R. Zangrando, A. Gambaro, G. Pace, P. Lima y R. Stevanato. 2013. Antioxidant properties and chemical composition relationship of Europeans and Brazilians propolis. *Pharmacology & Pharmacy*. 4(1): 46-51.
- Farré, R., I. Frasset y A. Sanchez. 2004. El propolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*. 45(1):21-43.
- Ferreira, M. G. P., A.M. Kayano, I. Silva-Jardim, T.O.D. Silva, J.P. Zuliani, V.A. Facundo, L.D.A. Calderon, A.D. Almeida-e-Silva, P. Ciancaglioni y R.G. Stábeli. 2010. Antileishmanial activity of 3-(3, 4, 5-trimethoxyphenyl) propanoic acid purified from

- Amazonian *Piper tuberculatum* Jacq., Piperaceae, fruits. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 20(6): 1003-1006.
- Gobiernos municipales. 2014. En línea: http://www.aquilesserdan.gob.mx/Contenido/plantilla5.asp?cve_canal=14681&Portal=aquilesserdan .
- González, U., M. Pinart, L. Reveiz y J. Alvar. 2008. Intervenciones para la leishmaniasis cutánea en países del Viejo Mundo. En línea: <http://www.update-software.com/BCP/BCPGetDocument.asp?DocumentID=CD005067>.
- Grecco, S. S., J.Q. Reimão, A.G. Tempone, P. Sartorelli, P. Romoff, M.J.P. Ferreira, O.A. Fávero y J.H.G. Lago. 2010. Isolation of an antileishmanial and antitrypanosomal flavanone from the leaves of *Baccharis retusa* DC.(Asteraceae). *Parasitology research*. 106(5): 1245-1248.
- Gupta, V., P. Mittal, P. Bansal, S.L. Khokra y D. Kaushik. 2010. Pharmacological potential of *Matricaria recutita*-A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. 2(1): 12-16.
- Harborne, J. B. 1989. General Procedures and Measurement of Total Phenolics". *Methods in Plant Biochemistry*. London, Academic Press. 1:1-27.
- Heinzel, F. P., M.D. Sadick, S.S. Mutha y R.M. Locksley. 1991. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88(16): 7011-7015.
- Hernández, M., S.C.Lazo, Junod, M.J., Arancibia, M.J., Flores, S.R., Valencia, A.E. y E.V. Valenzuela. 2005. Características Organolépticas y Físico-Químicas de Propóleos de la Provincia de Ñuble, VIII Región, Chile. *ALAN* . 55(4): 374-380.
- Hernández, J., F. M. Goycoolea , J. Quintero, A. Acosta, M. Castañeda, Z. Domínguez , R. Robles, L. Vazquez-Moreno, E. F. Velazquez , H. Astiazaran , E. Lugo, C. Velazquez. 2007. Sonoran Propolis: Chemical Composition and Antiproliferative Activity on Cancer Cell Lines. *Planta medica*. 73(14): 1469-1474.
- Hernández-Ruíz, J. e I. Becker. 2006. Linfocitos T citotóxicos CD8+ en la leishmaniasis cutánea. *Salud Pública de México*. 48 (5):430-439.

- Jeon, S. M., S.H. Bok, M.K. Jang, M. K. Lee, K.T. Nam, Y.B. Park, S.J. Rhee y M.S. Choi. 2001. Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol-fed rabbits. *Life Sciences*. 69(24): 2855-2866.
- Kaewmuangmoon, J., P. Nonthapa, A. Rattanawanee, P. Winayanuwattikun y C. Chanchao. 2012. Preliminary screening for various bioactivities in honey and propolis extracts from Thai Bees. *European Journal of Medicinal Plants*. 2(2): 74-92.
- Kaidama, W. M. y R.N. Gacche. 2015. Anti-Inflammatory Activity of Quercetin in Acute and Chronic Phases of Inflammation in Guinea Pigs. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*. 3(2): 129-136.
- Kalogeropoulos, N., S.J. Konteles, E. Troullidou, I. Mourtzinou y V.T. Karathanos. 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*. 116(2): 452-461.
- Kamatou, G.P.P. y A.M. Viljoen. 2010. A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 87(1): 1-7.
- Kane, M.M. y D.M. Moser. 2001. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *The Journal of Immunology*. 166(2): 1141-1147.
- Kolodziej, H., O. Kayser, A.F. Kiderlen, H. Ito, T. Hatano, T. Yoshida, y L.Y. Foo. 2001. Proanthocyanidins and Related Compounds: Antileishmanial Activity and Modulatory Effects on Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor- α Release in the Murine Macrophage-Like Cell Line RAW 264.7. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 24(9): 1016-1021.
- Kumazawa, S., T. Hamasaka, y T. Nakayama. 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*. 84(3): 329-339.
- Kurek-Górecka, A., A. Rzepecka-Stojko, M. Górecki, J. Stojko, M. Sosada y G. Świerczek-Zięba. 2013. Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis. *Molecules*. 19(1):78-101.
- Kuropatnicki, K. A., E. Szliszka y W. Krol. 2013. Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013 (1): 1-11.

- Lan, X., W. Wang, Q. Li y J. Wang. 2016. The Natural Flavonoid Pinocembrin: Molecular Targets and Potential Therapeutic Applications. *Molecular neurobiology*. 53:1794-1801.
- Laza, L.D., I.L. Rodríguez y G.C. Sardina. 2003. Descubrimiento y desarrollo de agentes anticancerígenos derivados de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 8:(3)
- Lenis, M.A. 1998. La respuesta celular inmune en la leishmaniasis cutánea americana. *Biomédica*. 18 (4): 274-284
- Lima, B., A. Tapia, L. Luna, M.P. Fabani, G. Schmeda-Hirschmann, N.S. Podio, D. Wunderlin y G.E. Feresin. 2009. Main flavonoids, DPPH activity, and metal content allow determination of the geographical origin of propolis from the Province of San Juan (Argentina). *Journal of agricultural and food chemistry*. 57(7): 2691-2698.
- Linstrom, P. J. y W.G. Mallard. 2013. NIST standard reference database number 69, NIST Chemistry WebBook.
- López-Lázaro, M. 2009. Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 9(1): 31-59.
- López, C.S. 2012. Laboratorio de Leishmania. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos. En línea: http://www.indre.salud.gob.mx/interior/leishmaniasis_en_mexico.html.
- Lotfy, M. 2006. Review: Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 7:22-31.
- Lotti, C., M.C. Fernández, A.L. Piccinelli, O. Cuesta-Rubio, I.M. Hernández y L. Rastrelli. 2010. Chemical constituents of red Mexican propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*. 58(4): 2209-2213.
- Machado, G.M.D.C., L.L. Leon, S.L. de Castro. 2007. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of Leishmania. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 102(1): 73-77.
- Marcucci, M.C. 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 26, 83-99.

- Marcucci, M.C., F. Ferreres, C. García-Viguera, V.S. Bankova, S.L. De Castro, A.P. Dantas, P.H.M. Valente y N. Paulino. 2001. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*. 74: 105–112.
- Miguel, M. G., S. Nunes, S.A. Dandlen, A.M. Cavaco, y M.D. Antune. 2010. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. 48(12): 3418-3423.
- Mittra, B., A. Saha, A.R. Chowdhury, C. Pal, S. Mandal, S. Mukhopadhyay, S. Bandyopadhyay y H.K. Majumder. 2000. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. *Molecular medicine*. 6(6): 527-541.
- Monzote, L., O. Cuesta-Rubio, M. C. Fernández, I. M. Hernandez, J. Fraga, K. Pérez, M. Kerstens, L. Maes y P. Cos. 2012. In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 107(8):978-984.
- Moreira L., Dias L. G., Pereira J. A., y L. Estevinho. 2008. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 3482-3485.
- Murillo, F. 2006. Actividad antioxidante in vitro de las bebidas de frutas. *Revista Tecnológica Alfa editores técnicos*. pp. 27.
- Navarro, R., M. Aguilera y F. Bórquez. 2009. Resultados y lecciones en desarrollo de productos a base de propóleos. Proyecto de innovación en: IX Región de La Araucanía. En línea: http://200.111.68.14/gsd/collect/publicac/index/assoc/HASHea7e.dir/48_Libro_Propoleo.pdf.
- Ndjonka, D., L.N. Rapado, A.M. Silber, E. Liebau, y C. Wrenger. 2013. Natural Products as a Source for Treating Neglected Parasitic Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 14: 3395-3439.
- Nieto-Yañez, O. 2016. Tesis en proceso.
- Nishimura, F. D. C. Y., A.C. De Almeida, B.A. Ratti, T. Ueda-Nakamura, C.V. Nakamura, V.F. Ximenes y S.D.O. Silva. 2013. Antioxidant effects of quercetin and naringenin are associated with impaired neutrophil microbicidal activity. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013.

- Oliveira, L.F., A. O. Schubach, M. M. Martins, S. L. Passos, R. V. Oliveira, M. C. Marzochi y C. A. Andrade. 2011. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta tropica*. 118(2): 87-96.
- OMS. 1996. Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos: Medicamentos utilizados en las enfermedades parasitarias. Segunda edición. En línea: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jh2924s/2.4.html>.
- OMS. 2010. Control de la leishmaniasis: informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de la leishmaniasis. Serie de Informes Técnicos. 2-3, 5-13, 18-19, 42-44.
- OMS. 2013. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO Report on Neglected Tropical Diseases. 67-71.
- OMS. 2014. Leishmaniasis. En línea: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>.
- OMS. 2014-2. En línea: <http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2014/photos/leishmaniasis/es/>
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2013. Leishmaniasis en las Américas: recomendaciones para el tratamiento. Washington, DC. pp.1-27
- Orsi, R. O., J.M. Sforcin, S.R.C. Funari, A. Fernandez-Jr., P. Rodrigues, V. Bankova. 2007. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on Salmonella serovars. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 13(4):748-757.
- Osorio, D.E.J., G.L.P. Montoya y G.J. Arango. 2006. Productos naturales alcaloidales con actividad antiprotozoaria. *Vitae*. 13(1): 61-84.
- Padigel, U. M., J. Alexander y J.P. Farrell. 2003. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. *The Journal of Immunology*. 171(7): 3705-3710.
- PAHO (Pan American Health Organization). 2013. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas. En línea: <http://www.paho.org/leishmaniasis>
- PAHO (Pan American Health Organization). 2015. Leishmaniasis: informe epidemiológico de las Américas. En línea:

http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754

- Pérez-Victoria, J.M., F.J. Pérez-Victoria, G. Conseil, M. Maitrejean, G. Comte, D. Barron, A. Di Pietro, S. Castanys y F. Gamarro. 2001. High-Affinity Binding of Silybin Derivatives to the Nucleotide-Binding Domain of a *Leishmania tropica* P-Glycoprotein-Like Transporter and Chemosensitization of a Multidrug-Resistant Parasite to Daunomycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 45(2): 439-446.
- Pinho-Ribeiro, F. A., A.C. Zarpelon, V. Fattori, M.F. Manchope, S.S. Mizokami, R. Casagrande, W.A. Verri. 2016. Naringenin reduces inflammatory pain in mice. *Neuropharmacology*. 105: 508-519.
- Pinzon, L. C., M.M. Uy, K.H. Sze, M. Wang e I.K. Chu. 2011. Isolation and characterization of antimicrobial, anti-inflammatory. *Journal of Medicinal Plants Research*. 5(13): 2729-2735.
- Pollock, K. G., K.S. McNeil, J.C. Mottram, R.E. Lyons, J.M. Brewer, P. Scott, G.H. Coombs y J. Alexander. 2003. The *Leishmania mexicana* cysteine protease, CPB2. 8, induces potent Th2 responses. *The Journal of Immunology*. 170(4): 1746-1753.
- Pushpavalli, G., P. Kalaiarasi, C. Veeramani y K.V. Pugalendi. 2010. Effect of chrysin on hepatoprotective and antioxidant status in D-galactosamine-induced hepatitis in rats. *European journal of pharmacology*. 631(1): 36-41.
- Quintero-Mora, M. L., A. Londoño-Orozco, F. Hernández-Hernández, P. Manzano-Gayosso, R. López-Martínez, C.I Soto-Zárate, L. Carrillo-Miranda, G. Penieres-Carrillo, C.G. García-Tovar y T.A. Cruz-Sánchez. 2008. Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro de *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 25(1):22-26.
- Rahman, Z. A. y M. Soory. 2006. Antioxidant effects of glutathione and IGF in a hyperglycaemic cell culture model of fibroblasts: some actions of advanced glycaemic end products (AGE) and nicotine. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*. 6(3): 279-286.
- Ramamoorthy, P. K., y A. Bono. 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology*. 2(1):70-80.

- Rasul, A., F.M. Millimouno, W. Ali Eltayb, M. Ali, J. Li y X. Li. 2013. Pinocembrin: a novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. *BioMed research international*. 2013.
- Ramos, A.F.N., J.D. Miranda. 2007. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. 13(4): 697-710.
- Rauf, A., R. Khan, M. Raza, H. Khan, S. Pervez, V. De Feo, F. Maione y N. Mascolo. 2015. Suppression of inflammatory response by chrysin, a flavone isolated from *Potentilla evestita* Th. Wolf. In silico predictive study on its mechanistic effect. *Fitoterapia*. 103: 129-135.
- Ribeiro, I. A., J. Rocha, B. Sepodes, H. Mota-Filipe y M.H. Ribeiro. 2008. Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 52: 13-18.
- Ribeiro, F.F., F.J. Junior, M.S. da Silva, M.T. Scotti y L. Scotti. 2015. Computational and Investigative Study of Flavonoids Active Against *Typanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. *Natural product communications*. 10(6):917-920.
- Rivera, Y.N. 2013. Comparación de las propiedades biológicas del propóleo de diferentes estados de la República Mexicana. Tesis para obtener el título de maestro en Ciencias de la Salud. Escuela Superior de Medicina. 145 pp.
- Roy, P., S. Das, R.G. Auddy y A. Mukherjee. 2012. Biological targeting and drug delivery in control of Leishmaniasis. *Journal of cell and animal biology*. 6(6): 73-87.
- Ruiz, H.P.A. 2014. Actividad anti-leishmánica del extracto metanólico de *Bursera aptera* Ramírez. Tesis para obtener grado de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Estado de México. 73 p.
- Sadick, M. D., F.P. Heinzl, B.J. Holaday, R.T. Pu, R.S. Dawkins y R.M. Locksley. 1990. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. Evidence for a T cell-dependent, interferon gamma-independent mechanism. *The Journal of experimental medicine*. 171(1): 115-127.
- Sahinler, N. y O. Kaftanoglu. 2005. Natural product propolis: chemical composition. *Natural Product Research*. 19(2): 183-188.

- Salatino, A., E. W. Teixeira, G. Negri, y D. Message. 2005. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2(1):33-38.
- Salhi, A., V. Rodrigues, F. Santoro, H. Dessen, A. Romano, L.R. Castellano, M. Sertorio, S. Rafati, C. Chevillard, A. Prata, A. Alcaïs. 2008. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. *The Journal of Immunology*. 180(9): 6139-6148.
- Salmón, N.V. 2014. El propóleo, otro recurso terapéutico en la práctica clínica. Departamento de Enfermería E.U.E “Casa salud Valdecilla”, Universidad de Cantabria.
- Salvador, M. J., F.T. Sartori, A.C.B. Sacilotto, E.M. Pral, S.C. Alfieri y W. Vichnewski. 2009. Bioactivity of flavonoids isolated from *Lychnophora markgravii* against *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Zeitschrift für Naturforschung C, Journal of biosciences*. 64: 509-512.
- Santana, L.C., S. M. P. Carneiro, L.B. Caland-Neto, D.D. Arcanjo, J.M. Moita-Neto, A.M.G.L. Citó, y F.A.A. Carvalho, F. A. A. 2014. Brazilian brown propolis elicits antileishmanial effect against promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Natural product research*. 28(5): 340-343.
- Sarkar S., S. Mandal, J. Sinha, S. Mukhopadhyay, N. Das y M.K. Basu. 2002. Quercetin; Critical evaluation as an antileishmanial agent in vivo in hamsters using different vesicular delivery modes. *Journal of drug targeting*. 10(8): 573-578.
- Sathiavelu, J., G.J. Senapathy, R. Devaraj y N. Namasivayam. 2009. Hepatoprotective effect of chrysin on prooxidant-antioxidant status during ethanol-induced toxicity in female albino rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 61(6): 809-817.
- Satoskar, A., F. Brombacher, W.J. Dai, I. McInnes, F.Y. Liew, J. Alexander y W. Walker. 1997. SCID mice reconstituted with IL-4-deficient lymphocytes, but not immunocompetent lymphocytes, are resistant to cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Immunology*. 159(10): 5005-5013.
- Satoskar, A. R., M. Bozza, M.R. Sosa, G. Lin y J.R. David. 2001. Migration-inhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *Leishmania major* infection. *Infection and immunity*. 69(2): 906-911.

- Sawadogo, W. R., G. Le Douaron, A. Maciuk, C. Bories, P.M. Loiseau, B. Figadère, I.P. Guisson y O.G. Nacoulma. 2012. In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activities of five medicinal plants from Burkina Faso. *Parasitology research*. 110(5): 1779-1783.
- Scott, P., P. Natovitz, R.L. Coffman, E. Pearce y A. Sher. 1988. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis: T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *The Journal of experimental medicine*. 168(5): 1675-1684.
- Seeley, T.D. y R. A. Morse. 1976. The nest of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux*. 23(4):495-512.
- Seminal Workshop for a Research Network Natural Products against Neglected Diseases. 2011. En línea:
http://www.unimuenster.de/imperia/md/content/pharmazeutische_biologie/symposiumneglecteddiseases/finalreport_web.pdf
- Sepúlveda, J. G., H. P. Ducoing y M. R. Sosa. 2003. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(3):355-363
- Sforcin, M.J. 2007. Propolis and the immune system: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. 113: 1-14.
- Sforcin, J. M., y V. Bankova. 2011. Propolis: is there a potential for the development of new drugs?. *Journal of ethnopharmacology*. 133(2):253-260.
- Shimizu, T., F. Lin, M. Hasegawa, K. Okada, H. Nojiri y H. Yamane. 2012. Purification and identification of naringenin 7-O-methyltransferase, a key enzyme in biosynthesis of flavonoid phytoalexin sakuranetin in rice. *Journal of Biological Chemistry*. 287(23): 19315-19325.
- Silva, C. V., F.C.C. Bomfim, M.A.V.D. Santos y E.S. Velozo. 2014. Estudo fitoquímico e avaliação in vitro da atividade anti-Trypanosoma cruzi cepa Y de *Pilocarpus spicatus* St. Hil.(Rutaceae). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 16(4): 812-818.
- Singleton, V. L., R. Orthofer, R.R.M. Lamuela. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*. 299: 152-178.

- Sun, J., Y. Huang, G. Sun, X. Sun, M. Qin y D. Zhao. 2012. Study on in vitro antioxidant activity of flavonoids contained in Hebei balmy chrysanthemum and structure-activity relationship. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica*. 37(13): 1958-1962.
- Tan, B. C., S.K. Tan, S.M. Wong, N. Ata, N.A. Rahman y N. Khalid. 2015. Distribution of Flavonoids and Cyclohexenyl Chalcone Derivatives in Conventional Propagated and In Vitro-Derived Field-Grown *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015.
- Tasdemir, D., M. Kaiser, R. Brun, V. Yardley, T.J. Schmidt, F. Tosun y P. Ruedi. 2006. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 50(4): 1352-1364.
- Topalkara, A., A. Vural, Z.d. Polat, M. I. Toker, M. K. Arici, F. Ozan y A. Cetin. 2007. *In vitro* amoebicidal activity of propolis on *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 23(1): 40-45.
- Torres-Santos, E. C., D.L. Moreira, M.A.C. Kaplan, M.N. Meirelles y B. Rossi-Bergmann. 1999a. Selective effect of 2', 6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43(5):1234-1241.
- Torres-Santos, E. C., J.M. Rodrigues, D.L. Moreira, M.A.C. Kaplan y B. Rossi-Bergmann. 1999b. Improvement of in vitro and in vivo antileishmanial activities of 2', 6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone by entrapment in poly (d, l-lactide) nanoparticles. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 43(7): 1776-1778.
- Tsai, S. J., C.S. Huang, M.C. Mong, W.Y. Kam, H. Y., Huang y M.C. Yin. 2012. Anti-inflammatory and antifibrotic effects of naringenin in diabetic mice. *Journal of agricultural and food chemistry*. 60(1): 514-521.
- Tuchinda, P., V. Reutrakul, P. Claeson, U. Pongprayoon, T. Sematong, T. Santisuk y W.C. Taylor. 2002. Anti-inflammatory cyclohexenyl chalcone derivatives in *Boesenbergia pandurata*. *Phytochemistry*. 59(2):169-173.
- Türkkan, B., M. Özyürek, M. Bener, K. Güçlü y R. Apak. 2012. Synthesis, characterization and antioxidant capacity of naringenin-oxime. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 85(1):235-240.

- Uzel, A., K. Sorkun, Özent-Önçağ, D. Çoğulu, Ö. Gençay y B. Salih. 2005. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological research*. 160(2):189-195.
- Vargas- Sánchez, R.D., G. R. Torrescano-Urrutia y A. Sánchez-Escalante. 2013. El propóleo: conservador potencial para la industria alimentaria. *Interciencia*. 38(10): 705-711.
- Velázquez, C., M. Navarro, A. Acosta, A. Angulo, Z. Domínguez, R. Robles, R. Robles-Zepeda, E. Lugo, F.M. Goycoolea, E.F. Velázquez, H. Astiazaran y J. Hernández. 2007. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology*. 103(5): 1747-1756.
- Venkatesan, S. K., P. Saudagar, A.K. Shukla y V.K. Dubey. 2011. Screening natural products database for identification of potential antileishmanial chemotherapeutic agents. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*. 3: 217-231.
- Wang, L. W., H.J. Su, S.H. Day, L.T. Tsao, S.Z. Yang, J.P. Wang y C.N. Lin. 2005. New phenylpropane and anti-inflammatory diterpene derivatives from *Amentotaxus formosana*. *Planta medica*. 71(4): 344-348.
- Wilkins, R.A.A. 2010. Efecto de los amastigotes de *Leishmania mexicana* en la regulación de la óxido nítrico sintasa en células dendríticas de ratón. Tesis para obtener el título de Biólogo. Facultad de Ciencias. pp 94.
- Zuluaga, M y S. M. Robledo. 2004. Las células de Langerhans en la inmunidad a leishmaniasis. *Biomédica*. 24:302-17
- Zunini, M. P., C. Rojas, S.D. Paula, I. Elingold, E.A. Migliaro, M.B. Casanova, F.I. Restuccia, S.A. Morales y M. Dubin. 2010. Phenolic contents and antioxidant activity in Central-Southern Uruguayan propolis extracts. *Journal of the Chilean Chemical Society*. 55(1): 141-146.

Apéndice 1. Biología del vector

Los vectores transmisores de *Leishmania* son dípteros hematófagos, pertenecientes a la familia Psychodidae y a la subfamilia Phlebotominae; conocidos comúnmente como moscas de la arena. De las aproximadamente 800 especies de flebótomos, sólo 93 son vectores confirmados o probables de *Leishmania* sin embargo, constantemente se van añadiendo más especies a esa lista (PAHO, 2013; OMS, 2010).

En América el género *Lutzomyia* es el más importante, con más de 400 especies identificadas. Sin embargo, poco más de 50 especies se consideran involucradas en la transmisión de *Leishmania* en la región; aunque hay flebótomos de otros géneros que pican al ser humano, los únicos vectores comprobados de enfermedad humana son las especies y subespecies de *Phlebotomus* en el Viejo Mundo, y de *Lutzomyia* (*sensu* Young) en el Nuevo Mundo (OMS, 2010; PAHO, 2013).

Cada especie de flebótomo tiene una biología singular y compleja, que abarca todos los aspectos de la reproducción, alimentación, dispersión y otras actividades que repercuten directamente en la epidemiología de la leishmaniosis y el control de los vectores.

En la figura No. 31 se muestra esquemáticamente el ciclo vital de los flebótomos. Los huevos, larvas y pupas se desarrollan en micro hábitats húmedos y ricos en materia orgánica, y no son acuáticos. No se pueden definir periodos precisos para el desarrollo de las diferentes fases, porque dependen de la temperatura ambiente, pero se sabe que las temperaturas bajas alargan los tiempos, y las altas los acortan. En el laboratorio los huevos suelen eclosionar en 7 a 10 días. El desarrollo de las larvas tarda como mínimo 3 semanas antes de la conversión en pupas. Las moscas adultas salen de las pupas al cabo de 10 días, y al principio predominan los machos. Las fases preimaginales son muy difíciles de encontrar en la naturaleza y se desconocen los lugares de cría de la mayoría de los vectores.

Las preferencias de los vectores por diferentes vertebrados varían en función de la especie y de la disponibilidad de huéspedes. Durante la alimentación se introducen en el huésped saliva y proteofosfoglicanos, que se cree que participan en el establecimiento de *Leishmania* en la piel de los vertebrados. Sin embargo, un gran número de picaduras no infectadas genera títulos crecientes de anticuerpos contra las proteínas de la saliva, que pueden alterar el curso de infecciones posteriores. Un factor importante es la ingesta de azúcar, la cual es la fuente de energía para los flebótomos, y es importante para el desarrollo de los parásitos en su intestino.

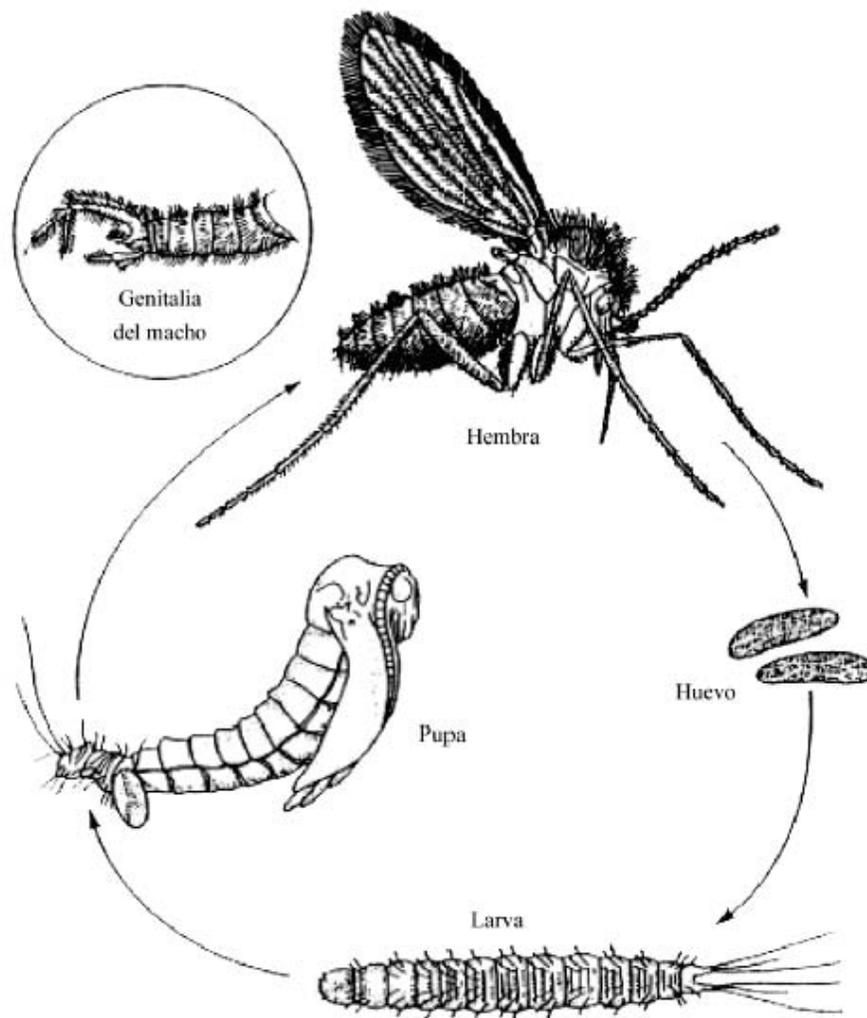


Figura 31. Esquema del los estadios del ciclo vital de un flebótomo (no representado a escala).

Apéndice 2. Zona de Colecta.

El apiario donde se realizó la colecta del propóleo de Chihuahua se encuentra ubicado en Ejido Concordia en la zona centro de Chihuahua, abarca los municipios de Aquiles Serdán y Chihuahua (Figura 32).

Esta zona tiene un clima semiárido, extremo, con una temperatura máxima de 40°C y mínima de -7.4°C. Su vegetación está constituida por xerófilas, herbáceas, arbustos de diferentes tamaños, entremezclados con algunas especies de agaves, yucas y cactáceas leguminosas como el huizache, guamúchil, quiebre hacha, zacates, peyote, bonete, hojosas y chaparral espinoso. La flora más representativa del área donde se encuentra el apiario, son árboles de mezquite (Figura 32) (Gobiernos municipales, 2014).

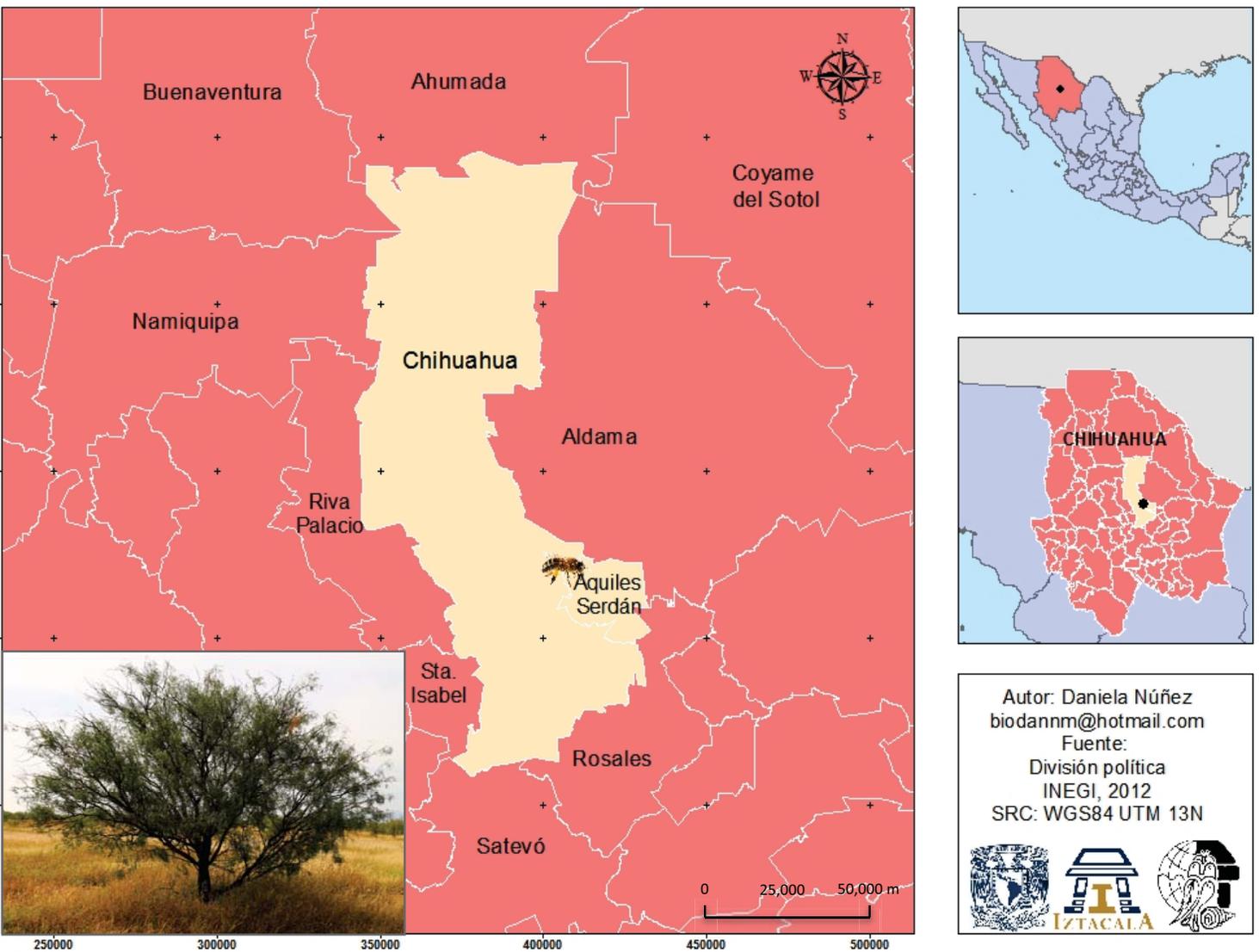


Figura 32. Ubicación del apiario donde se realizó la colecta del propóleo de Chihuahua. Del lado izquierdo árbol de mezquite (*Prosopis*), flora característica de la zona.

Apéndice 3. Concentración de fenoles totales (CFT)

(Método modificado de Singleton *et al.*, 1999)

La concentración de fenoles totales (CFT) se mide por espectrofotometría con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, para ello el agente oxidante que se utiliza es el reactivo de Folin-Ciocalteu. El reactivo consiste en una mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato (coloración amarilla), en el cual el molibdeno y el tungsteno se encuentran en estado de oxidación 6⁺. La reducción con ciertos agentes reductores genera la formación de molibdeno y tungsteno con un promedio de estado de oxidación entre 5⁺ y 6⁺, formando una solución azul.

Se preparará una curva de calibración con ácido gálico, el cual es una pequeña molécula que por su estabilidad y su estructura fenólica, presenta un grupo benceno unido a un grupo -OH.

Se utilizará una solución estándar de ácido gálico de 0.2 mg/mL. A partir de esta solución se tomarán las alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones seriadas de ácido gálico (0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL), a cada una se le agregará el volumen correspondiente de agua destilada para obtener las concentraciones mencionadas a un volumen final de 1 mL (Cuadro 12).

Cuadro 12. Concentraciones para preparar la curva patrón con ac. gálico.

| Tubo B (blanco) | [Ácido gálico] mg/mL | μL patrón | μL agua destilada | mL agua destilada | μL Folin- Coicalteu | mL Na ₂ CO ₃ |
|--------------------|-------------------------|---------------|----------------------|----------------------|------------------------|---------------------------------------|
| 1 | 0.00625 | 31.25 (31) | 968.75 (968.5) | 7 | 500 | 1.5 |
| 2 | 0.0125 | 62.5 | 937.5 | 7 | 500 | 1.5 |
| 3 | 0.025 | 125 | 875 | 7 | 500 | 1.5 |
| 4 | 0.05 | 250 | 750 | 7 | 500 | 1.5 |
| 5 | 0.1 | 500 | 500 | 7 | 500 | 1.5 |
| 6 | 0.2 | 1000 | 0 | 7 | 500 | 1.5 |
| Problema(P) | - | 250 | 750 | 7 | 500 | 1.5 |

Para el análisis de fenoles totales del extracto, se preparará una solución estándar (0.2 mg/mL), se tomará una alícuota de 250 μL de esta y se agregarán 750 μL de agua destilada, para obtener un volumen final de 1 mL a una concentración de 0.05 mg/mL.

Se tomará 1mL de cada una de las concentraciones (ácido gálico y extracto) y se transferirá a un tubo de ensayo con 6 mL de agua destilada, a continuación se adicionarán 500 μL de reactivo Folin-Ciocalteu. Después de cinco minutos se añadirán 1.5 mL de una solución de Na₂CO₃ (200 g/L) y agua hasta completar un volumen de 10 mL.

Después de dos horas de reacción a temperatura ambiente se determinará la absorbancia a 760nm. Cada concentración se determinará por triplicado.

Finalmente se graficará la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de ácido gálico, se realizará un análisis de regresión lineal y se interpolará la absorbancia de la muestra a evaluar. Los resultados se expresarán como equivalentes de ácido gálico o bien en porcentaje.

Apéndice 4. Cuantificación de flavonoides

(Ramamoorthy, 2007)

Se pesarán 2 mg de quercetina y se disolverán en 2 mL de MeOH grado HPLC (Solución stock). De esta solución se tomarán las siguientes alícuotas para la preparación de la curva patrón de quercetina como se muestra en la cuadro 13.

Cuadro 13. Concentraciones para la curva patrón de quercetina.

| [ppm] | µL stock | µL MeOH | [ppm] | µL stock | µL MeOH |
|-------|----------|---------|--------|----------|---------|
| 1 | 1 | 999 | 20 | 20 | 980 |
| 2 | 2 | 998 | 30 | 30 | 970 |
| 3 | 3 | 997 | 40 | 40 | 960 |
| 4 | 4 | 996 | 50 | 50 | 950 |
| 5 | 5 | 995 | 60 | 60 | 940 |
| 6 | 6 | 994 | 70 | 70 | 930 |
| 7 | 7 | 993 | 80 | 80 | 920 |
| 8 | 8 | 992 | 90 | 90 | 910 |
| 9 | 9 | 991 | 100 | 100 | 900 |
| 10 | 10 | 990 | Blanco | 0 | 1000 |

Se pesará 1 mg del extracto etanólico de propóleo de Chihuahua y se disolverá en 5 mL de MeOH grado HPLC (Solución problema). De esta solución problema se tomará 1 mL (se realizará por triplicado).

A todas las soluciones de la curva de calibración y a la muestra problema se le agregarán 1 mL de AlCl₃ al 2% (blanco del problema).

Se vaciarán 200 µL de las soluciones preparadas a partir del stock y del problema en una placa de 96 pozos para ELISA, por triplicado. Después de 10 minutos de reacción en reposo a temperatura ambiente se determinará la absorbancia a 415 nm. Como blanco se utilizarán: un

pozo con una mezcla de 3 mL de stock y 3 mL de MeOH grado HPLC y otro pozo que contendrá una mezcla de MeOH y AlCl₃; se realizará por triplicado.

| | |
|----------------------------|--|
| Problema | 1 mL extracto + 1 mL AlCl₃ |
| Blanco del problema | 200 µL problema + 800 µL MeOH |
| Control negativo | 1 mL MeOH + 1mL AlCl ₃ |

Finalmente se graficará la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de quercetina, se realizará un análisis de regresión lineal y se interpolará el promedio de la absorbancia de la muestra problema para obtener su concentración de flavonoides.

Apéndice 5. Actividad antioxidante

(Murillo, 2006)

La actividad antioxidante se evalúa midiendo el grado de decoloración (desvanecimiento del color violeta intenso a amarillo claro), de una solución metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH) por la adición del compuesto activo a diferentes concentraciones (1-100 ppm), por medio de espectrometría UV-VIS.

En una placa de ELISA se adicionarán 50 µL de la solución problema a diferentes concentraciones (1-100ppm) por triplicado, posteriormente a cada pozo con las concentraciones señaladas, se adicionarán 150 µL de una solución metanólica de DPPH cuya concentración final será de 100g/mL; inmediatamente se protegerá de la luz y se mantendrá en agitación constante durante 30 min a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo se determinará la absorbancia a 540nm en un lector de ELISA SLT Spetra; el control negativo se realizará aplicando 200 µL de metanol en los pozos y como control positivo se utilizará la quercetina a las mismas condiciones que el compuesto problema.

Interpretación de Resultados

Los resultados serán reportados obteniendo el porcentaje de reducción y se calculará con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de reducción} = (C-E/C) * 100$$

En donde:

C= Absorbancia del control positivo (DPPH con metanol)

E= Absorbancia del experimental

(Mezcla DPPH + compuesto problema).