



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Evaluación del tratamiento tópico con extracto de *Cleoserrata serrata*
contra la leishmaniasis cutánea causada por *Leishmania mexicana***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

MOISÉS LOOH HERNÁNDEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. INGEORG DOROTHEA BECKER FAUSER
Cd. Mx. 2023**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

AGRADECIMIENTOS

ACADÉMICOS

A las Instituciones: Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Laboratorio de Inmunoparasitología de la Unidad de Medicina Experimental (UME) de la Facultad de Medicina y a la Facultad de Ciencias, UNAM.

A la Dra. Ingeborg Becker por su paciencia y amabilidad, además del apoyo brindado para esta investigación y los conocimientos transmitidos que serán elementales para mi futuro profesional.

Al Dr. José Sotero Delgado Domínguez y al Dr. Jaime Zamora Chimal por compartir sus conocimientos, su tolerancia y sobre todo la confianza que siempre me brindaron.

A la M. en C. Rocely Buenaventura Cervantes Sarabia de la Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina UNAM, por la disposición de los medios de cultivos axénicos de *Leishmania mexicana* además de su asesoría.

A la Dra. Norma Salaiza Suazo de la Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina UNAM, por su apoyo para los cultivos de *Leishmania mexicana*.

A la M. en C. Adriana Ruiz Remigio de la Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina UNAM, por su ayuda en la técnica de ELISA para la cuantificación de citocinas.

Al financiamiento por parte de UNAM-PAPIIT IG201221 y CONACyT Fronteras 6682 para la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado de este manuscrito: Dra. Ingeborg Dorothea Becker Fauser, Dra. Blanca Estela Rivero Cruz, Dr. Armando Pérez Torres, Dr. Jaime Zamora Chimal y Dr. José Sotero Delgado Domínguez, por su revisión y sus valiosos aportes para el enriquecimiento de este trabajo.

Personales

A mi familia: mi madre, mi padre, mi hermana, mi hermano y mis abuelos, por facilitarme los estudios, además de brindarme las herramientas y el sustento que fueron fundamentales en mi formación académica y personal, además del constante apoyo moral.

A mi familia elegida; Natalia Sánchez, Karen Cortez y Saúl López por brindarme siempre motivación, compañía e impulsarme a mejorar personal y académicamente.

A todos los miembros del laboratorio de Inmunoparasitología de la UME; Mtra. Cristina Cañeda y Zaide Rivera, por su amabilidad y por siempre auxiliarme cuando fue necesario, además de compartirme competencias e instrucciones elementales para el desarrollo de este proyecto.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

<i>Leishmania</i>	1
Leishmaniasis.....	1
Leishmaniasis cutánea (LC).....	2
Tratamientos convencionales.....	4
<i>Cleoserrata serrata</i> y medicina tradicional contra la leishmaniasis cutánea.....	4
Tratamiento tópico.....	7
Ratones BALB/c y C57BL/6 como modelos experimentales en LC.....	9
Papel de los macrófagos en la leishmaniasis.....	11

JUSTIFICACIÓN.....	12
--------------------	----

HIPÓTESIS.....	13
----------------	----

OBJETIVOS.....	13
----------------	----

General

Específicos

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales.....	13
Cultivo de Promastigotes.....	14
Infección de ratones BALB/c y C57BL/6 con <i>L. mexicana</i>	14
Obtención del extracto de <i>C. serrata</i>	14
Tratamiento tópico con extracto de <i>C. serrata</i>	
a) Preparación del vehículo.....	15
b) Preparación del tratamiento.....	15
c) Aplicación del tratamiento.....	16

Evaluación del efecto del tratamiento tópico con extracto de <i>C. serrata</i> durante la progresión de la infección con <i>L. mexicana</i> en ratones BALB/c y C57BL/6	
a) Tamaño de la lesión.....	17
b) Cuantificación de la carga parasitaria en ratones BALB/c.....	17
c) Cuantificación de la carga parasitaria en ratones C57BL/6.....	18
Obtención de macrófagos peritoneales de ratones BALB/c.....	18
Infección y estimulación de macrófagos peritoneales.....	18
Cuantificación de TNF.....	19
Cuantificación de estallido oxidativo.....	19
Análisis estadístico.....	20

RESULTADOS

Evaluación del tratamiento tópico sobre el tamaño de las lesiones de ratones BALB/c infectados con <i>L. mexicana</i>	20
Evaluación del tratamiento tópico sobre la carga parasitaria de las lesiones de ratones BALB/c infectados con <i>L. mexicana</i>	23
Evaluación del tratamiento tópico sobre el tamaño de las lesiones de ratones C57BL/6 infectados con <i>L. mexicana</i>	24
Evaluación del tratamiento tópico sobre la carga parasitaria de las lesiones de ratones C57BL/6 infectados con <i>L. mexicana</i>	26
Análisis del efecto inmunomodulador del extracto de <i>C. serrata</i> sobre macrófagos peritoneales infectados con <i>L. mexicana</i>	27
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIONES.....	32
PERSPECTIVAS.....	32
REFERENCIAS.....	32

INTRODUCCIÓN

Leishmania

El género *Leishmania* es el agente causal de las leishmaniasis, un conjunto de enfermedades transmitidas por la picadura de un vector flebótomo infectado. El género comprende numerosas especies como *L. braziliensis*, *L. donovani*, *L. mexicana* y *L. tropica*, que son patógenas para el ser humano. Todas las especies del género presentan dos estadios: el promastigote flagelado que parasita el intestino del vector y los amastigotes esféricos carentes de flagelo que son parásitos intracelulares del hospedero mamífero (Figura 1 A y B) (Chang K y Fish W, 2019).

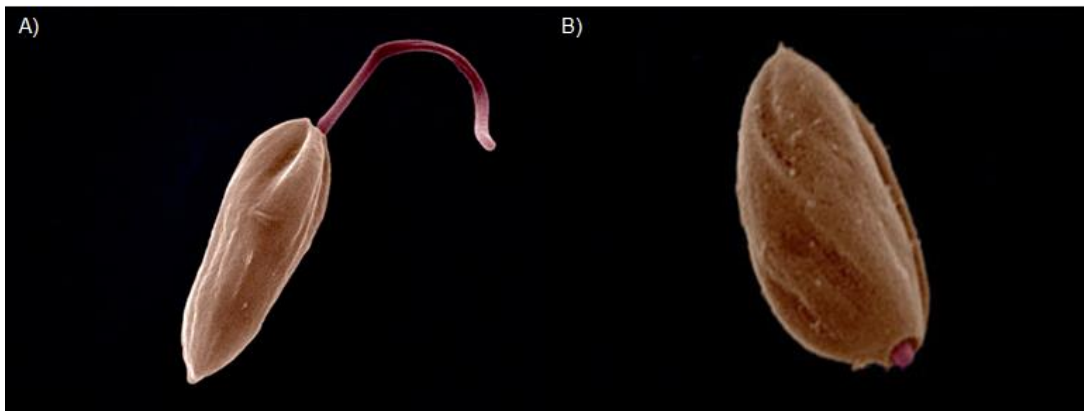


Figura 1. Estadios del parásito *Leishmania mexicana*. A) Promastigote: alargado y flagelado. B) Amastigote: oval y carente de flagelo. Tomado y modificado de Wheeler, 2000.

Leishmaniasis

La leishmaniasis existe en tres formas principales: visceral, cutánea y mucocutánea. Se transmite al hospedero mamífero mediante un vector del género *Phlebotomus*, para las especies de *Leishmania* del viejo mundo, o del género *Lutzomyia*, para las especies del nuevo mundo (Serafim et al. 2021). Cada año se detectan entre 700,000 y 1,000,000 de casos nuevos de leishmaniasis en poblaciones que se caracterizan por malnutrición, malas condiciones de vivienda, y un sistema inmune débil (OMS, 2023).

La infección se inicia cuando el parásito en su estadio de promastigote es inoculado en la piel de un hospedero vertebrado cuando un mosquito hembra infectado se alimenta de sangre. En la piel, el parásito es engullido por fagocitos y dentro vacuolas parasitóforas se

reabsorbe su flagelo y cambia a su estadio de amastigote. Posteriormente, los amastigotes se multiplican por fisión binaria hasta llegar a la célula hospedera, permitiendo al parásito diseminarse a otras células y tejidos. Cuando un mosquito sano se alimenta de un hospedero infectado, el parásito se diferencia a su estadio de promastigote en el intestino del flebótomo, con lo cual se cierra el ciclo de vida de *Leishmania* (Serafim et al. 2021). Este escenario constituye el principal mecanismo de transmisión, permitiendo que los mosquitos adquieran y transmitan la infección entre humanos y reservorios, tales como roedores, cánidos y otros primates. De igual manera, puede haber transmisión entre humanos por trasplantes sanguíneos, de órganos y a través de la placenta (Uribarren, 2017).

Leishmaniasis cutánea

La leishmaniasis cutánea (LC) es la que presenta mayor distribución a nivel mundial. Los principales agentes causales en América son: *Leishmania mexicana*, *L. braziliensis* y *L. panamensis*. En México, Chiapas, Oaxaca, Campeche, Quintana Roo, Tabasco, Yucatán y Veracruz son las principales zonas endémicas (Figura 2), siendo la región de la Chontalpa en Tabasco la principal zona afectada en el país (SUIVE/DGE, 2019). Dentro de la leishmaniasis cutánea se consideran dos cuadros clínicos: la leishmaniasis cutánea localizada (LCL) y la diseminada (LCD). Mientras que la LCD desarrolla la difusión descontrolada del parásito en toda la piel, la LCL se caracteriza por lesiones ulceradas que generalmente se ubican en áreas corporales expuestas (Figura 3). Las lesiones ulceradas frecuentemente se asocian a coinfecciones con bacterias, entre las que se encuentran *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Mycobacterium*, que dificultan el tratamiento del paciente (Álvarez et al. 2012; Borbon et al. 2019).

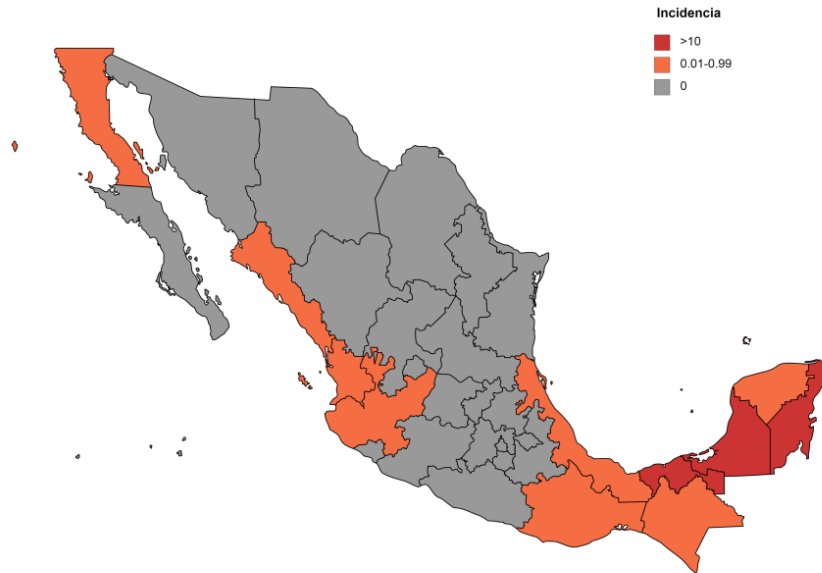


Figura 2. Incidencia de leishmaniasis cutánea en México. La incidencia se muestra respecto a una tasa por cada 100,000 habitantes. Adaptado de SUIVE/DGE, 2019.



Figura 3. Formas clínicas de la leishmaniasis cutánea. A) localizada. B) Diseminada. Tomado y modificado de Mokni 2019.

Tratamientos convencionales

Los medicamentos considerados para el tratamiento de la leishmaniasis son los antimoniales pentavalentes, Glucantime® y Pentostam®, ambos con alta toxicidad, pero eficientes en la eliminación del parásito (Mata et al. 2023). Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la tripanotión reductasa del parásito, que es esencial para su supervivencia debido a que lo protege del estrés oxidativo (Frézard et al. 2013). Sin embargo, el acceso a estos fármacos es restringido (Secretaría de Salud, 2015). Aunado a esto, generan diversos efectos secundarios en los pacientes entre los que se encuentran: dolor, fatiga, trastornos gastrointestinales, aumento de niveles enzimáticos, leucopenia, anemia, pancreatitis, y anormalidades en los electrocardiogramas (Pradhan et al. 2021; Aronson et al. 1998). Adicionalmente, se ha reportado resistencia de los parásitos (*L. donovani*) a los antimoniales pentavalentes, por lo cual ha sido necesario aumentar la dosis del tratamiento para evitar la reaparición de las lesiones y diseminación a otras partes del cuerpo (Costa y Marsden 1986; Croft y Coombs 2003; Mata et al. 2023; Osorio et al. 2005). Debido a esta problemática, se ha considerado establecer medicamentos basados en la medicina tradicional, que de acuerdo a la OMS (2013), es parte importante y a veces subestimada en la salud pública, a pesar de utilizarse para promover la salud, tanto en la prevención como en la terapia de las enfermedades.

***Cleoserrata serrata* y medicina tradicional contra la leishmaniasis cutánea**

Los fitofármacos representan un remedio natural para las enfermedades humanas. Un gran número de metabolitos han sido identificados en diferentes plantas para tratar distintas enfermedades. Una cantidad considerable de reportes se han enfocado en la búsqueda de fitofármacos contra la leishmaniasis cutánea, como lo es el caso de *Cleoserrata serrata*, perteneciente a la familia *Cleomaceae* (Mesa et al. 2017; Alamilla-Fonseca et al. 2018).

Algunas especies de la familia *Cleomaceae* han sido reportadas con actividades farmacológicas relevantes, entre las que destacan: antioxidantes, analgésicos, antiinflamatorios y antimicrobianos (Bose et al. 2007; Bose et al. 2011). Entre los géneros de esta familia se encuentra *Cleome*, que ha sido dividida en dos subgéneros: *Corynandra* y *Cleoserrata* (Iltis y Cochrane, 2007). Juárez-Vázquez y Jiménez-Arellanes (2019) realizaron estudios en los que abordaron las propiedades antiinflamatorias de los miembros de la familia *Cleomaceae*, concluyendo que esta familia conforma una alternativa potencial para el tratamiento de diversas enfermedades debido al gran repertorio de principios activos

que contienen sus miembros, mencionando que los fitoles presentes en los aceites esenciales de *C. serrata* podrían ser los responsables de su actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas y negativas.

C. serrata se describe como una planta herbácea, anual de 30 a 150 cm de largo con un tallo erecto y verde olivo que florece y fructifica todo el año, presentando un olor fuerte y persistente. Además, se refiere que esta planta, conocida en el estado de Tabasco como mastuerzo, es utilizada por los médicos tradicionales para tratar la leishmaniasis. Para su uso la planta es lavada y secada exponiéndola al sol hasta su desecación, posteriormente las hojas son separadas del tallo, y son colocadas en un comal donde se tuestan. Posteriormente las hojas se muelen hasta conseguir un polvo fino que será colocado sobre la lesión previamente lavada y tallada hasta el punto de sangrar para finalmente ser cubierta con vaselina y vendada. Este procedimiento se repite cada 5 a 10 días, hasta que se observa la sanación (Figura 4 A-F) (Alamilla-Fonseca 2018). Alamilla-Fonseca et al. (2018) evaluó el efecto de un extracto de las hojas secas de *C. serrata* sobre *L. mexicana*, demostrando la inhibición del crecimiento de *L. mexicana* de manera dosis-dependiente. Adicionalmente observó que el extracto también elimina bacterias asociadas a las lesiones de la leishmaniasis cutánea como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Borbon et al. 2019). También se ha reportado que la planta *C. serrata* crece en lugares donde hay pacientes con leishmaniasis cutánea como en la región de La Chontalpa, Tabasco, destacando la facilidad de acceso que se tiene a dicha planta para la elaboración de un tratamiento alternativo (Figura 5). Así mismo, ya han sido identificados algunos de los compuestos principales encontrados en un extracto de clorometano-etanol (1:1) de las hojas de la planta *C. serrata* (Tabla 1).

Se desconoce cuál es el compuesto activo que está presente en *C. serrata* que podría tener el efecto contra *Leishmania*, sin embargo, su efectividad *in vitro* y en pacientes tratados por médicos tradicionales hace necesario probar su uso como tratamiento tópico contra la leishmaniasis cutánea.



Figura 4. Preparación de tratamiento con *Cleoserrata serrata* para leishmaniasis cutánea por un médico tradicional de Comalcalco, Tabasco. A) Mastuerzo, B) Desenraizamiento de la planta, C) Lavado, D) Secado, E) Tueste, F) Molienda en papel estraza. Tomado de Alamilla-Fonseca 2018.

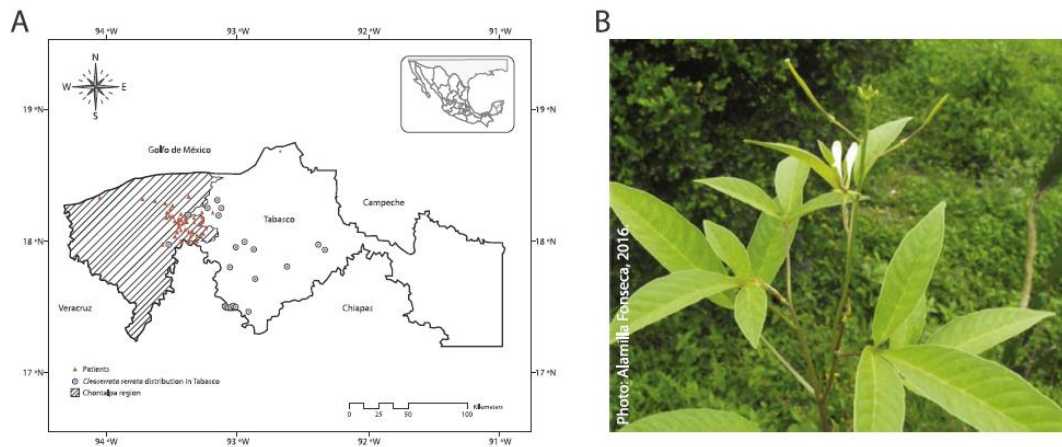


Figura 5. Distribución de *Cleoserrata serrata* en Tabasco. (A) Mapa de la distribución de *Cleoserrata serrata* y pacientes (puntos rojos) reportados con leishmaniasis en La Chontalpa, Tabasco. (B) *Cleoserrata serrata* colectada en La Chontalpa. Tomado de Alamilla-Fonseca et al. 2019.

Tabla 1. Fitocomponentes encontrados en un extracto de la planta *Cleoserrata serrata*

Nombre del compuesto	Tiempo de retención	Fórmula molecular	Peso molecular
Ácido palmítico (ácido hexadecanoico-n)	22.25	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256
Palmitato de etilo (octil palmitato)	22.42	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	284
Vitamina E	33.64	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430
Estigmasterol	34.68	C ₂₉ H ₄₈ O	412
γ-sitosterol	35.22	C ₂₉ H ₅₀ O	414
Fitol	20.95	C ₂₀ H ₄₀ O	278

Adaptado de Juárez-Vázquez et al. 2021.

Tratamiento tópico

Un tratamiento tópico se refiere a un tratamiento dermatológico donde el medicamento no tendrá un efecto sistémico en el organismo (Osborn, 2008). Está constituido por un principio activo que actuará para aliviar la enfermedad y un vehículo que contribuirá a facilitar el paso del principio activo a través de las capas dérmicas (Casas, 2013). El vehículo de elección debe formularse a partir del grado de absorción deseado, así como la localización, las características de la lesión, de la piel donde se ubica y el grado de inflamación provocado (García et al. 2015).

La estructura de la piel puede dividirse simplídicamente en epidermis, dermis e hipodermis. La primera se divide a su vez en diferentes estratos, el más externo se denomina estrato córneo y es la barrera más importante para los mecanismos de difusión de fármacos sobre la piel (Agarwal y Krishnamurthy 2019; Wertz y Downing, 1989). Existen diferentes vehículos que, de acuerdo a sus características, facilitan el paso de los compuestos a través de las capas dérmicas. Algunos tratamientos tópicos como las pastas y los polvos ejercen una acción superficial en la piel sin atravesar este estrato córneo, por lo que son idóneos para lesiones poco profundas (García et al. 2015). La dermis se caracteriza por contener glándulas sudoríparas y sebáceas, folículos, terminaciones nerviosas y poros (Agarwal y Krishnamurthy 2019; Murthy y Shivakumar, 2010). Debido a

que *Leishmania* es inoculada por su vector en esta capa histológica, y que el parásito se replica dentro de los fagocitos presentes en la dermis (Figura 6), este es el tejido blanco al cual deben poder permear los tratamientos tópicos para combatir la infección y con ello la enfermedad (Franco 2003; Menon 2002). Los tratamientos tópicos como los geles y las cremas tienen una absorción media que permite el paso de las moléculas hasta esta capa, por lo que son recomendables para lesiones agudas en áreas anatómicas de piel fina (García et al. 2015). La hipodermis es la capa más interna de la piel y está compuesta por tejido adiposo, fibroblastos, macrófagos y abundantes vasos sanguíneos (Murthy y Shivakumar, 2010), por lo que los tratamientos tópicos dirigidos a esta capa, como las pomadas o los parches, son recomendados para áreas anatómicas de piel gruesa con lesiones secas debido a su alta capacidad de permeabilidad (García et al. 2015).

Existen algunos estudios que reportan tratamiento tópico como alternativa para aliviar la leishmaniasis, sugiriendo que pueden ser alternativas potenciales para tratar esta enfermedad de manera segura y eficiente. Tal es el caso de la paromomicina, un antibiótico que se incluyó en una pomada y se aplicó a 1221 pacientes, encontrando que tiene un efecto leishmanicida sobre especies de *Leishmania* del viejo y del nuevo mundo (Kim et al. 2009).

Por otro lado, también ha sido analizado un extracto hexanólico de la raíz de la planta *Pentalinon andrieuxii* en lesiones de ratones C57BL/6 infectados con *L. mexicana*, encontrándose que su aplicación durante seis semanas redujo significativamente (60%) el tamaño de las lesiones y la carga parasitaria, respecto al grupo control (Lezama-Dávila et al. 2013).

En conjunto, existen diferentes tratamientos tópicos que se han puesto a prueba, así como modelos experimentales que facilitan el estudio de la leishmaniasis y en el hospedero.

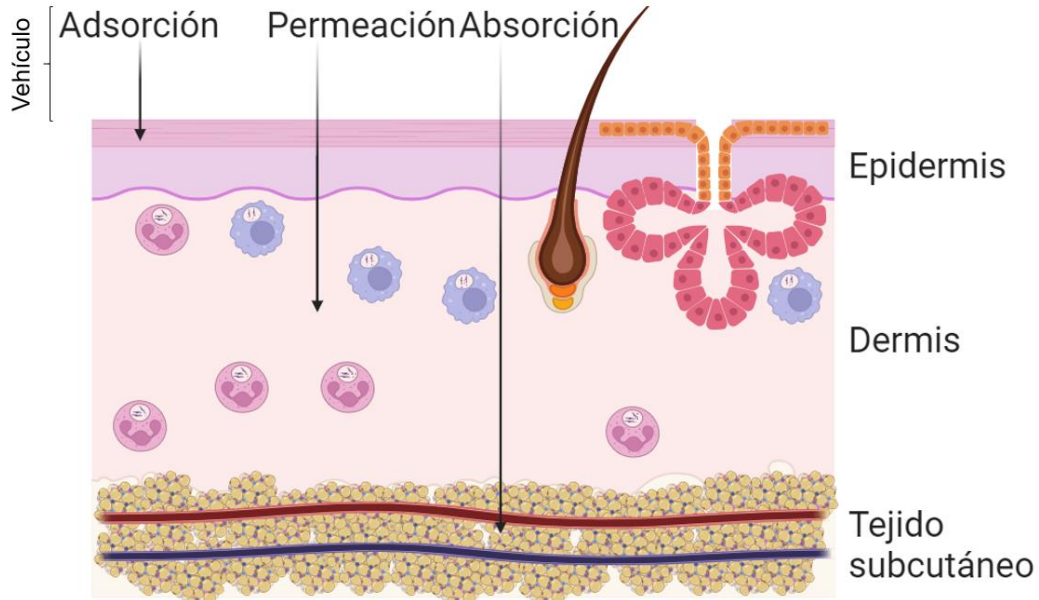


Figura 6. Tratamientos cutáneos y capas histológicas de la piel. Algunos tratamientos tópicos como pastas y polvos ejercen una acción superficial en la epidermis, teniendo un efecto de adsorción. Otros productos como geles y cremas logran una permeación, llegando a la capa de la dermis. En contraste, tratamientos basados en pomadas y parches logran integrarse al tejido subcutáneo, por lo que tienen un efecto de absorción. Adaptado de Ruiz et al. 2010. Elaborado en Biorender.com

Ratones BALB/c y C57BL/6 como modelos experimentales en la LC

Los modelos murinos frecuentemente son utilizados para el estudio de la leishmaniasis cutánea, en los cuales se analizan los tipos celulares y los mecanismos efectores necesarios para el control o la resolución de la enfermedad (Bogdan y Rölinghoff, 1998; Moura et al. 2005). Los modelos de ratones BALB/c y C57BL/6 representan la susceptibilidad y resistencia en la infección por *L. major*, asociando la susceptibilidad con una respuesta Th2 caracterizada por la expresión de citocinas como IL-4 e IL-10, en contraste con la resistencia relacionada con una respuesta Th1, mediada por la producción de IFN- γ y TNF- α , que inducen la síntesis de la enzima iNOS en los macrófagos infectados. Esto culmina con la eliminación del parásito debido a la generación de óxido nítrico como metabolito leishmanicida (Figura 7 A y B) (Murray y Delph-Etienne, 2000; Sacks y Noben-Trauth, 2002). Adicionalmente, ya han sido identificados distintos loci asociados a la resistencia a la infección por *L. major*, que incluyen D6Mit122, D6Mit25, D6Mit339 y D6Mit59, entre otros, encontrados en cepas como C57BL/6 y C57BL/10, y ausentes en

cepas como BALB/c y SWR/J que podrían estar implicados en el bloqueo de la expresión de citocinas como IL-4, IL-10 y TGF- β (Sacks y Noben-Trauth, 2002). Así mismo, algunas células del sistema inmune del hospedero, como los macrófagos, están directamente involucradas en la resolución de la enfermedad.

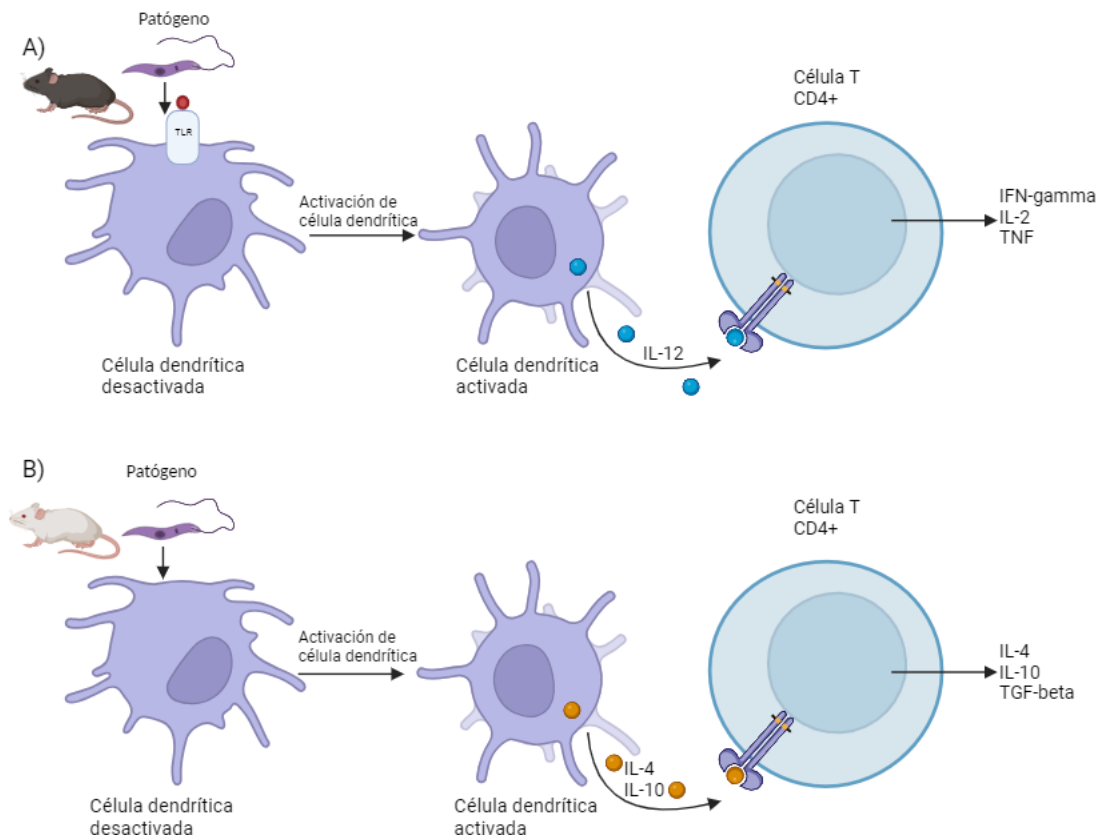


Figura 7. Modelo celular Th1/Th2. En ambos modelos se requiere la presentación de antígenos por células dendríticas a linfocitos T, sin embargo, existen diferencias en las moléculas coestimuladoras que determinan la diferenciación hacia alguna de las dos vías. A) En el desarrollo de una respuesta Th1, algunos patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) inducen la producción de IL-12 por estimulación de receptores TLR (Toll-like receptors), promoviendo la diferenciación de células T naive a células Th1 productoras de IFN-gamma. B) El desarrollo de una respuesta tipo Th2 se asocia con una incapacidad de inducir la producción de IL-12 en células dendríticas. En su lugar, condiciones específicas de antígenos o del tejido inducen la producción de citocinas IL-4 e IL-10, que promueven que las células T naive se diferencian a células Th2 productoras de TGB-beta. Adaptado de Sacks y Noben-Trauth 2002. Elaborado en Biorender.com

Papel de los macrófagos en la leishmaniasis

Los macrófagos son las principales células responsables de la destrucción de los parásitos. Pueden diferenciarse en dos tipos de subpoblaciones dependiendo del microambiente de citocinas en el cual se desarrollen. Estas subpoblaciones son los macrófagos M1 (clásicos) o macrófagos M2 (alternativos) (Gordon y Taylor, 2005). Los macrófagos M1 se inducen durante una respuesta inflamatoria en respuesta a la estimulación con moléculas como lipopolisacárido (LPS), IFN-gama o TNF. Los M1 son pro-inflamatorios y expresan a la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y citocinas como TNF-alfa, IL-1 β e IL-12 (productos de la respuesta Th1). Por otro lado, los macrófagos M2 surgen en respuesta a citocinas anti-inflamatorias como IL-10, IL-4 e IL-13, promoviendo la reparación de tejidos y la inmunosupresión (FIGURA 8) (Butcher y Zhu, 2021; Liew et al. 1990; Mirzaei et al. 2021; Yunna et al. 2020).

La enzima iNOS es esencial para el control del parásito, siendo que los modelos deficientes de esta enzima tienden a ser altamente susceptibles a las infecciones por *L. major* (Costa-da-Silva et al. 2022; Seger y Krebs, 1995). Aunado a esto, otros modelos murinos infectados con *L. major* han revelado diferencias significativas en los mecanismos inmunes dependientes de las especies infectantes de *Leishmania*, principalmente las del Nuevo Mundo (Loría-Cervera y Andrade-Narváez, 2014; Costa-da-Silva et al. 2022). Por ejemplo, en contraste con la resolución de la enfermedad de ratones C57BL/6 infectados con *L. major*, esta misma cepa murina infectada con *L. mexicana* tiende a ser incapaz de resolver la infección, debido a una respuesta dependiente de IFN- γ y STAT4 e independiente de la producción de IL-12 y la presencia de IL-4 y STAT6, generando una respuesta Th2 asociada a un rápido crecimiento de la lesión y falla en la resolución de la enfermedad (Mirzaei et al. 2021; Carneiro et al. 2020).

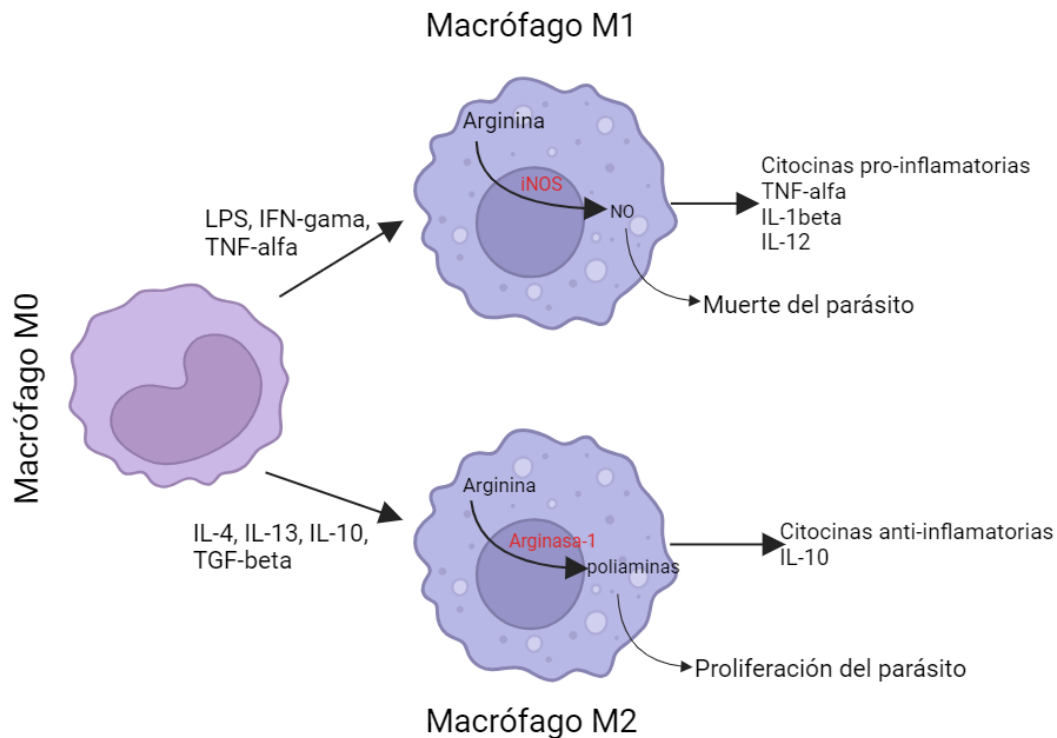


Figura 8. Estados de activación de los macrófagos. Ambas líneas celulares de macrófagos (M1 y M2) proceden de monocitos que maduran y se diferencian de acuerdo al microambiente que las rodea. Estímulos como LPS (lipopolisacárido), IFN- γ o TNF- α promueven el desarrollo del macrófago M1 con capacidad de producir citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-12, promoviendo la eliminación del parásito. Por otro lado, citocinas como IL-4, IL-13, IL-10 o TGF- β promueven la diferenciación hacia macrófagos M2, con capacidad de producir citocinas anti-inflamatorias como IL-10, favoreciendo la proliferación del parásito. Adaptado de Sica y Mantovani, 2012; Gordon y Taylor, 2005; Yunna et al. 2020. Elaborado en Biorender.com

JUSTIFICACIÓN

La leishmaniasis cutánea en México es una enfermedad que se presenta en zonas de escasos recursos donde el tratamiento convencional es de difícil acceso y genera diversos efectos secundarios. *Cleoserrata serrata*, una planta utilizada por médicos tradicionales para tratar las úlceras asociadas a la enfermedad, ha mostrado tener efecto *in vitro* contra *L. mexicana*. Por su ubicación, esta planta es de fácil acceso para los pacientes y podría ser utilizada como tratamiento tópico para curar la enfermedad. En este trabajo se analiza la efectividad de un extracto de las hojas de *Cleoserrata serrata* como posible tratamiento tópico para tratar lesiones cutáneas de ratones infectados con *Leishmania mexicana*.

HIPÓTESIS

El tratamiento tópico con extracto de *Cleoserrata serrata* reduce el tamaño de las lesiones y la carga parasitaria de ratones infectados con *Leishmania mexicana*.

OBJETIVOS

GENERAL

Analizar la efectividad de un tratamiento tópico contra la leishmaniasis cutánea utilizando un extracto de la planta *Cleoserrata serrata*.

ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto del tratamiento tópico midiendo el tamaño de lesiones en ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *L. mexicana*.
- Evaluar el efecto del tratamiento tópico cuantificando la carga parasitaria en ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *L. mexicana*.
- Evaluar el efecto inmunomodulador del extracto de *C. serrata* sobre macrófagos infectados con *L. mexicana* (medición de TNF y estallido oxidativo).

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones BALB/c y C57BL/6 hembras de 8-12 semanas de edad proporcionados por el bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM. Todos los ratones se manipularon de acuerdo a las Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio de la NOM-062-ZOO-1999. Adicionalmente, el proyecto se aprobó por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina, UNAM, con el número FM/DI/088/2017 y número de CICUAL 063-2020/022-CIC-2020. Los ratones se repartieron en jaulas de acrílico donde recibieron alimento y agua *ad libitum* durante todos los experimentos.

Cultivo de promastigotes

Los promastigotes de *L. mexicana* de la cepa MHOM/MX/2011/Lacandona se diferenciaron de aislados de amastigotes de ratones BALB/c infectados. Estos parásitos se aislaron mediante el aspirado de los amastigotes localizados en las lesiones utilizando una jeringa de insulina de 25 G, los cuales se colocaron en medio 199 suplementado al 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) descomplementado por calor a 56°C durante 30 minutos (SFB). Para mantener el cultivo de promastigotes, se cultivaron 1×10^6 parásitos en botellas de 25 cm² a 27°C en medio 199 suplementado con SFB al 10%, y con los antibióticos Penicilina/Estreptomicina al 1%. Los ensayos experimentales se realizaron con promastigotes que se mantenían en cultivo in vitro por un máximo de 5 cambios de medio (pases).

Infección de ratones BALB/c y C57BL/6 con *L. mexicana*

Para las infecciones se tomó una alícuota de 1000 µL del cultivo de promastigotes, la cual se centrifugó a 3202 x g durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante, se añadieron 500 µL de buffer de fosfatos (PBS) al 0.1 M, pH 7.4 y se resuspendió el botón en 1000 µL de PBS 1x (lavado). Se realizaron dos lavados y se contaron los promastigotes/mL con una cámara de Neubauer. Para la cuenta se fijaron los parásitos con glutaraldehído al 0.1% para detener su movilidad. Los ratones BALB/c y C57BL/6 se infectaron subcutáneamente en el cojinete plantar de la pata posterior izquierda con 1×10^5 promastigotes resuspendidos en 20 µL de PBS 1x utilizando jeringas de insulina de 30 G.

Obtención de Extracto de *C. serrata*

Para realizar el extracto de *C. serrata* se utilizaron 0.5 kg de hojas de la planta que se dejaron secar a temperatura ambiente durante siete días. Se pulverizaron las hojas secas en un molino eléctrico con poros de 0.5 mm de diámetro (IKA MF 10), después se realizó un extracto de 10.0 g del pulverizado con una mezcla de clorometano-metanol 1:1 (CH₂Cl₂/MeOH). La mezcla se homogenizó macerando tres veces al día durante siete días a temperatura ambiente. El extracto obtenido se filtró y el disolvente se removió en un rotavapor (BÜCHI R-114). El producto resultante se almacenó en frascos de vidrio a 4°C.

Tratamiento tópico con extracto de *C. serrata*

a) Preparación del vehículo

Se realizaron dos diferentes formulaciones del vehículo, ambas fueron cremas que diferían en la cantidad de urea y en la presencia de glicerol. El primer vehículo contenía 7% de urea (V1), mientras que el segundo vehículo contenía 10% de urea y 22% de glicerol (V2). Ambas formulaciones estaban divididas en tres fases (A, B y C) mezcla de aceites, agua y emulsificante (formulación en proceso de patente).

b) Preparación del tratamiento

El tratamiento tópico con extracto de *C. serrata* se preparó mezclando ambos compuestos (vehículo + extracto de *C. serrata*). Para esto, se cuantificó de manera individual la cantidad de vehículo y de extracto con jeringas de insulina de 30 G. Con cada jeringa se depositó cada compuesto en una jeringa de vidrio de 2 mL por separado. Se conectaron ambas boquillas de las jeringas de vidrio con mangueras para hacer pasar el volumen total de una a otra hasta lograr una mezcla homogénea. Estas mezclas se depositaron en jeringas de insulina para su posterior aplicación a los diferentes grupos experimentales (Tabla 2).

Tabla 2. Componentes de los tratamientos tópicos

Tratamiento	Nombre del grupo experimental	V1 (μg)	V2 (μg)	Extracto de <i>C. serrata</i> (μg)
NA	Sano	0	0	0
	Infectado s/tratamiento	0	0	0
1	V1 C1	10	0	0
2	V1 C2	15	0	0
3	V1 C1 + Extracto	10	0	10
4	V1 C2 + Extracto	15	0	5
5	V2 C1	0	10	0
6	V2 C2	0	15	0
7	V2 C1 + Extracto	0	10	10
8	V2 C2 + Extracto	0	15	5

V1: Vehículo 1; V2: Vehículo 2; C1: Concentración 1; C2: Concentración 2. *Todos los grupos experimentales (1 – 8) fueron infectados con 1×10^5 promastigotes de *L. mexicana*.

c) Aplicación del tratamiento tópico

Cada sujeto experimental recibió la dosis correspondiente de tratamiento después de 18 días de infección, aplicándolo una vez al día durante 33 días en la pata infectada (Figura 9). Se aplicó la cantidad correspondiente en el dorso de la mano izquierda cerca de la base del dedo pulgar, mientras se sujetaba al ratón cómo se describe en Paredes et al. (2008). Posteriormente se tomó el tratamiento tópico con el dedo índice de la mano derecha y con ayuda del dedo pulgar se aplicó cuidadosamente sobre las patas de los ratones dando un ligero masaje.

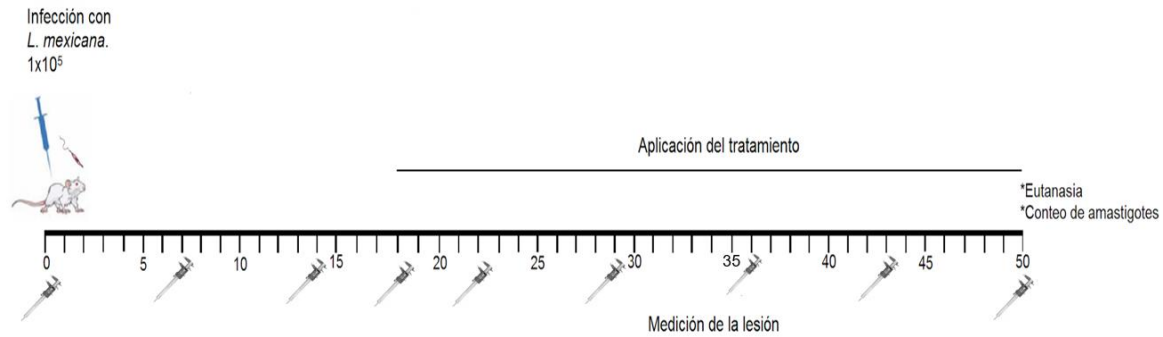


Figura 9: Esquema de aplicación del tratamiento. Después de 18 días de infección, el tratamiento tópico comenzó a aplicarse una vez al día durante 33 días, midiendo las lesiones una vez por semana. Al final del tratamiento los animales fueron sacrificados y se realizó el conteo de amastigotes de las lesiones.

Evaluación del efecto del tratamiento tópico con extracto de *C. serrata* durante la progresión de la infección con *L. mexicana* en ratones BALB/c y C57BL/6

Los dos parámetros que se utilizaron para evaluar la progresión de la enfermedad fueron: el tamaño de la lesión y la cuantificación de la carga parasitaria.

a) Tamaño de la lesión

Se evaluó la progresión de la lesión midiendo una vez por semana el tamaño de la almohadilla plantar con un vernier digital de resolución ± 0.01 mm (Truper® 14388) (Revisar Figura 9).

b) Cuantificación de la carga parasitaria en ratones BALB/c

Los ratones BALB/c infectados y tratados tópicamente fueron sacrificados en una cámara de CO₂. Posteriormente, a cada ratón se le amputó la extremidad infectada y se colectó en un tubo cónico de 15 mL que contenía 2 mL de PBS 1x. La muestra se maceró utilizando PBS 1x en un tamiz con poros de 150 μ m de diámetro. El homogenizado se recolectó en el mismo tubo de 15 mL y se centrifugó a 3202 g por 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y las muestras se fijaron en glutaraldehído al 0.1%. Todas las muestras se aforaron a 10 mL de PBS 1x para utilizarlas como stock. Se tomó 1 mL de las muestras stock y se depositó en un microtubo de 1.5 mL. Los agregados de amastigotes se disgregaron pasando las

muestras siete veces a través de una jeringa de insulina. A partir de 1mL colectado, se realizaron diluciones 1:5 y se tomaron 20 μ L para el conteo de parásitos utilizando una cámara de Neubauer.

c) Cuantificación de la carga parasitaria en ratones C57BL/6

Los ratones C57BL/6 infectados y tratados tópicamente se sacrificaron en una cámara de CO₂. A cada ratón se le amputó la extremidad infectada y se colectó en un tubo cónico de 15 mL que contenía 5 mL de formol. Posteriormente se realizaron cortes histológicos de las muestras y se hicieron tinciones con hematoxilina/eosina para realizar el conteo de amastigotes por mm² mediante fotografías en un microscopio Zeiss Axio Imager M1, utilizando la cámara AxioCam MRc5 y el software AxioVision v.4.6.3. Los conteos de parásitos se realizaron mediante el software imageJ v1.54g.

Obtención de macrófagos peritoneales de ratones BALB/c

Los macrófagos peritoneales se obtuvieron de ratones BALB/c sacrificados en cámara de CO₂. Se inyectaron 10 mL de PBS frío a la cavidad peritoneal de los ratones BALB/c, a los cuales se les hizo un intenso lavado peritoneal durante cinco minutos. Luego se recuperó el PBS con una aguja de calibre 19, y las células se centrifugaron a 800 x g durante 10 minutos a 4°C. El botón celular se resuspendió en medio RPMI 1640 complementado con 10% de SFB. Las células peritoneales se dejaron reposar de 18-24 h en RPMI 1640 suplementado con 100 IU/mL de penicilina, 100 IU/mL de estreptomycin y con SFB (RPMI-SFB) a 37°C con 5% de CO₂ en cajas Petri de 100 x 15 mm de diámetro. Después de 24 h, se contaron las células en cámara de Neubauer utilizando el colorante vital de Azul Tripán. Para los experimentos se cultivaron 1x10⁶ de células peritoneales en 1 mL de RPMI-FBS en placas de cultivo de 24 pozos.

Infección y estimulación de macrófagos peritoneales

Se colocaron 1x10⁶ macrófagos peritoneales resuspendidos en RPMI con 10% SFB y se incubaron a 37° C con 5% de CO₂ durante 24 horas. Posteriormente, los macrófagos peritoneales se incubaron con promastigotes de fase estacionaria en relación 1:10 (célula:parásito) y la placa se centrifugó a 2451 g durante 5 minutos para poner en contacto

los parásitos con las células. Después de incubar la placa a 26°C durante dos horas, los macrófagos peritoneales se lavaron con PBS a temperatura ambiente para retirar los parásitos no internalizados. Por último, las células se incubaron en RPMI-SFB durante 24 h a 37°C. Transcurridas estas 24 h, las células infectadas se estimularon con 10 µg/mL del extracto de *C. serrata* durante 24 h. Como controles se utilizaron células estimuladas con 0.2% de DMSO (vehículo), con 10 µg de peptidoglicano (PG) o se utilizaron células no infectadas y sin estimular. Al término de la estimulación, la placa se centrifugó a 2451 g durante 10 minutos y el sobrenadante se colectó y almacenó a -70°C para la cuantificación de TNF.

Cuantificación de TNF

El TNF se cuantificó en los sobrenadantes de las células infectadas y estimuladas siguiendo el protocolo para la prueba ELISA de citocinas de BD Biosciences. Brevemente, se añadió anticuerpo de captura anti-TNF (BD Biosciences, Pharmingen) a placas de fondo plano EIA/RIA de 96 pozos, el cual se diluyó en Na₂HPO₄ 0.1 M, pH 6 y se dejó incubar toda la noche a 4°C. Los pozos se bloquearon con PBS suplementado con 0.5% de caseína disuelta en 0.1 N de NaOH. Los sobrenadantes de cultivo y la curva estándar de TNF recombinante se incubaron en medio RPMI 1640 toda la noche a 4°C. El TNF se detectó utilizando el anticuerpo de detección biotinilado anti-TNF (BD Biosciences, Pharmingen) diluido en albúmina de suero bovino 1% con 0.05% de Tween 20, dejándose incubar a temperatura ambiente durante 1 h. La reacción se reveló usando un conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Thermo Fisher Scientific, Life Technologies) y 0.005 mg/ml de sustrato de fosfatasa (Sigma-Aldrich). Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro a 405 nm con el software KC4TM v3.4 (González-Tafoya et al. 2020).

Cuantificación de estallido oxidativo

Para el análisis del estallido oxidativo se cuantificaron los intermediarios reactivos de oxígeno (IRO) producidos por los macrófagos peritoneales infectados y estimulados con el extracto de *C. serrata*. Brevemente, las células peritoneales se despegaron de las placas de 24 pozos por acción mecánica utilizando PBS frío y se depositaron en los contenedores estériles del luminómetro. Para medir la producción de IRO por quimioluminiscencia, se añadieron 60 µM de luminol, monitoreando la actividad continuamente durante 30 minutos,

utilizando un luminómetro 1251 LKB (LKB-Wallack, Finlandia) controlado termostáticamente (37°C). Adicionalmente, como control positivo de la producción de especies reactivas de oxígeno, las células fueron estimuladas con 5×10^{-4} de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). El estallido oxidativo se expresó en milivolts (mV) (Salaiza-Suazo et al, 2002).

Análisis estadístico

Todos los resultados presentados se muestran como la media aritmética \pm su desviación estándar. Las comparaciones se realizaron utilizando una prueba no paramétrica *U* de Mann-Whitney, considerando $p \leq 0.05$ como estadísticamente significativo. Todos los datos fueron analizados y graficados utilizando el programa GraphPad Prism v.8.01 para Windows 7.

RESULTADOS

Evaluación del efecto del tratamiento tópico sobre el tamaño de las lesiones de ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*

Para evaluar el efecto del extracto de *C. serrata* sobre la infección con *L. mexicana* se aplicaron dos formulaciones tópicas independientes a los 18 días después de la infección y se evaluó su efectividad durante 33 días. En los primeros 25 días de la aplicación de los tratamientos 1 a 8 (véase tabla 2) no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales (Figura 10).

Los resultados con el uso del vehículo 1 revelaron que:

Grupo 1: las lesiones de los ratones del grupo 1 que recibieron 10 μ g del vehículo 1 tendieron a mantenerse ligeramente más grandes, con un aumento de 0.36 mm (aproximadamente 3% más grandes) respecto a las del grupo control durante todo el experimento.

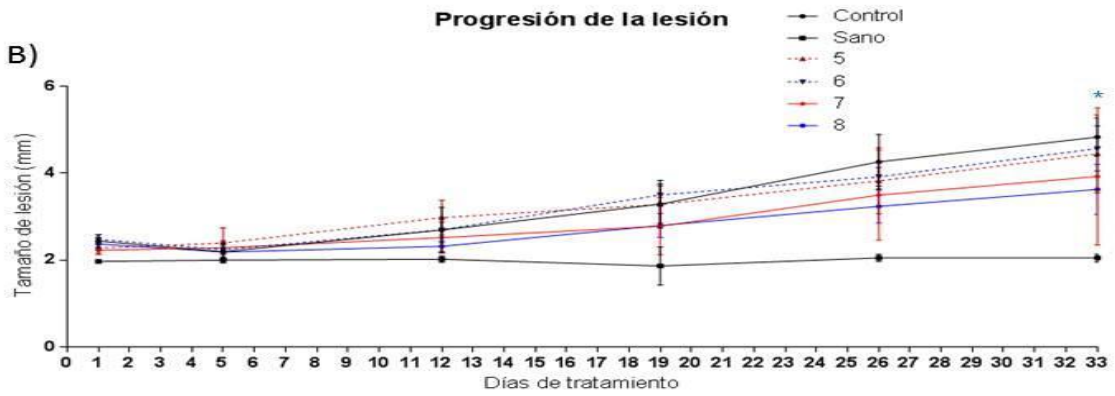
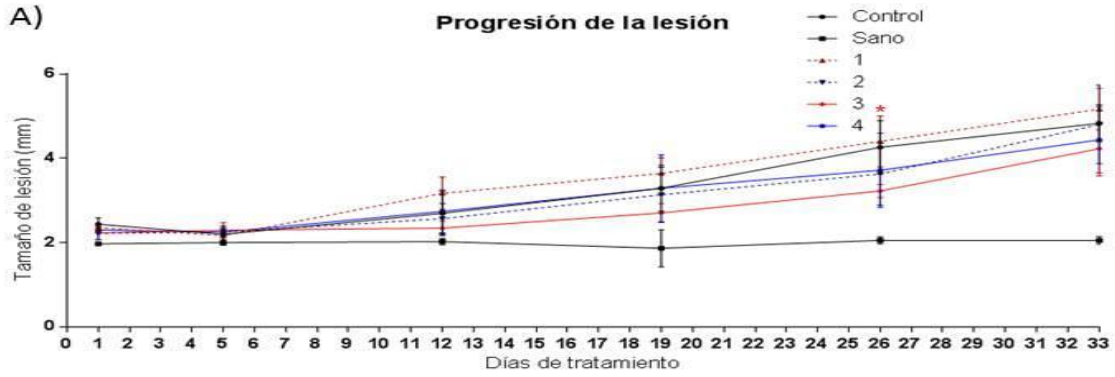
Grupo 2: los animales del grupo 2 que recibieron 15 μ g del vehículo 1 mostraron una tendencia a reducir el tamaño de la lesión por 0.1 mm respecto al grupo control. Sin embargo, las diferencias entre los tamaños de las lesiones de los ratones del grupo control y de las que recibieron únicamente el vehículo, no fueron estadísticamente significativas (Figura 10A).

Grupo 3: los ratones del grupo 3 que recibieron el tratamiento con 10 µg del extracto disuelto en 10 µg del vehículo 1 mostraron una reducción de 0.6 mm en el tamaño de la lesión al día 26 de aplicación del tratamiento, en comparación con el grupo control (aproximadamente 30% de reducción) ($p \leq 0.05$) (Figura 10A y 10C).

Grupo 4: los ratones del grupo 4 que recibieron el tratamiento con 5 µg de extracto disuelto en 15 µg del vehículo 1 mostraron una tendencia en la reducción de 0.4 mm del tamaño (reducción aproximada de 15%) sin embargo, no fue estadísticamente significativo (Figura 10A).

Los resultados obtenidos con el uso del vehículo 2 revelaron que: los ratones del grupo 5 que recibieron 10 µg de vehículo 2 y los ratones del grupo 6 que recibieron 15 µg de vehículo 2, redujeron el tamaño de sus lesiones en menor proporción que cuando se agregaban los extractos, observándose una disminución de 0.1 mm y 0.2 mm, respectivamente. Los ratones del grupo 7, que recibieron el tratamiento con 10 µg de extracto disuelto en 10 µg del vehículo 2 registraron una reducción de 0.9 mm en el tamaño de las lesiones (20 % de reducción), aunque la diferencia no fue significativa con respecto al grupo control (Figura 10B). Los ratones del grupo 8 que recibieron el tratamiento de 5 µg de extracto disuelto en 15 µg de vehículo 2 mostraron una reducción de 1.2 mm aproximadamente (25% de reducción) ($p \leq 0.05$) en el día 33 de la aplicación del tratamiento, respecto al grupo control (Figura 10B y 10C).

En resumen, se observó que los tratamientos que contenían extracto de *C. serrata* redujeron el tamaño de las lesiones. En el caso del vehículo 1, el mayor efecto se observó con la dosis más alta del extracto de *C. serrata* (10 µg), (grupo 3). En el caso del vehículo 2, el mayor efecto se observó con una dosis menor (5 µg) de *C. serrata* (grupo 8). La formulación del vehículo que contenía mayor cantidad de urea y glicerol (vehículo 2) redujo el tamaño de la lesión a menor concentración del extracto, respecto a la formulación que únicamente contenía urea y extracto (vehículo 1). Estos resultados sugieren que el tratamiento tópico usando urea y glicerol en conjunto con el extracto de *C. serrata* sería un potencial tratamiento alternativo contra la leishmaniasis cutánea.



C) Tratamiento	Control	10 μ g vehículo	15 μ g vehículo	10 μ g vehículo + 10 μ g extracto	15 μ g vehículo + 5 μ g extracto
1					
2					

Figura 10. Progresión de la lesión en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* tratados tópicamente con extracto de *C. serrata*. A) Formulación con 7% de urea, utilizada para los

tratamientos con: 10 µg de vehículo (1), 15 µg de vehículo (2), 10 µg extracto + 10 µg vehículo (3) y 5 µg extracto + 15 µg de vehículo (4). B) Formulación con 10% de urea y 22% de glicerol para los tratamientos: 10 µg de vehículo (5), 15 µg de vehículo (6), 10 µg extracto + 10 µg vehículo (7) y 5 µg extracto + 15 µg de vehículo (8). C) Fotografías de los tamaños de las lesiones al día de eutanasia. Los datos se presentan como la media aritmética ± desviación estándar (n=4). Los símbolos (*) representan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre el grupo control y el grupo del mismo color del símbolo.

Evaluación del tratamiento tópico sobre la carga parasitaria de las lesiones de ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*

Una vez que se evaluó el efecto del tratamiento tópico sobre el tamaño de las lesiones, se procedió a realizar el conteo del número de amastigotes presentes en cada lesión. Para ello se obtuvieron las lesiones de los ratones que se infectaron y se trataron tópicamente para contar el número de amastigotes por lesión. En cuanto a la formulación que contenía únicamente urea (vehículo 1), se observó que los grupos 1 y 2 (10 µg y 15 µg de vehículo, respectivamente) no presentaron diferencias significativas en el número de amastigotes, respecto a los ratones infectados sin tratamiento. En contraste, el grupo 3 que recibió la concentración alta de extracto (10 µg de extracto) redujo 1×10^7 ($p \leq 0.05$) la carga parasitaria, con respecto a los ratones infectados sin tratamiento (reducción aproximada de 60%) (Figura 11). El grupo 4 con que fue tratado con la concentración baja de *C. serrata* (5 µg de extracto) únicamente redujo en 4×10^6 el número de amastigotes respecto al grupo control (25% de reducción).

Con la formulación que contenía urea y glicerol (vehículo 2), se observó que los grupos 5 y 6 (10 µg y 15 µg de vehículo, respectivamente) mantienen un número de amastigotes similar al grupo control. En contraste, el grupo 7 tratado con la concentración alta de extracto (10 µg de extracto) logró una reducción de 9×10^6 en el número de amastigotes en comparación con el grupo de ratones infectados sin tratamiento (reducción aproximada de 50%) ($p \leq 0.05$) (Figura 11). Mientras que el grupo 8 que fue tratado con la concentración baja de *C. serrata* (5 µg de extracto), únicamente logró una reducción de 5×10^6 en el número de amastigotes respecto al grupo control (25% de reducción), donde las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Estos resultados sugieren que las concentraciones altas del extracto de *C. serrata* (10 µg de extracto) aplicado con ambas formulaciones redujeron significativamente el número de amastigotes en las lesiones de ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*.

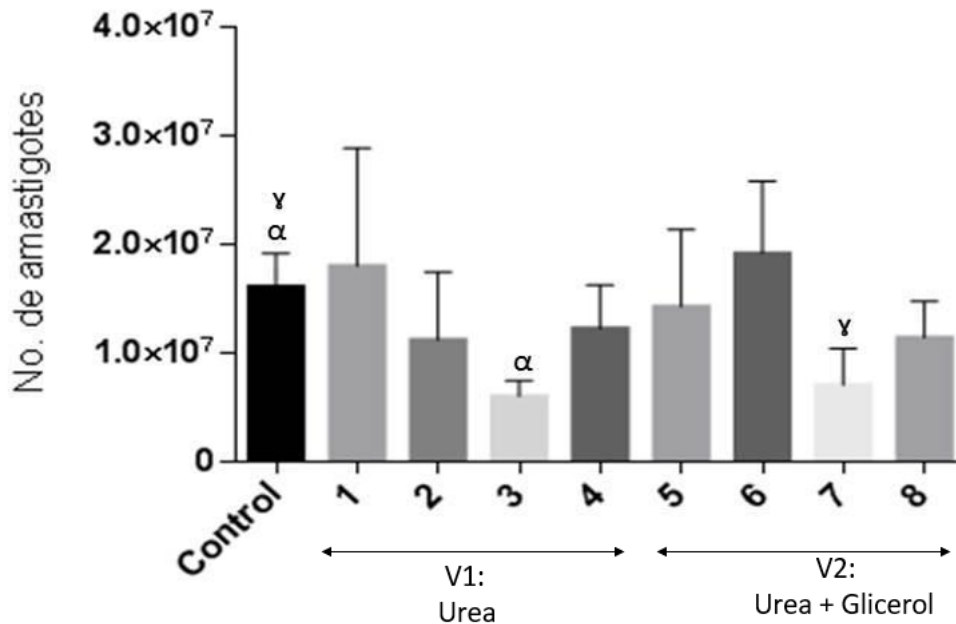


Figura 11. Carga parasitaria en las lesiones de ratones BALB/c infectados con *L. mexicana* y tratados tópicamente con un extracto de *C. serrata*. Los datos se presentan como la media aritmética ± la desviación estándar (n=4). Los símbolos utilizados * y γ representan diferencias significativas (p≤0.05) entre el grupo control y los grupos experimentales. 1: 10 µg de vehículo, 2: 15 µg de vehículo, 3: 10 µg extracto + 10 µg vehículo, 4: 5 µg extracto + 15 µg de vehículo, 5: 10 µg de vehículo, 6: 15 µg de vehículo, 7: 10 µg extracto + 10 µg vehículo, 8: 5 µg extracto + 15 µg de vehículo.

Evaluación del tratamiento tópico sobre el tamaño de las lesiones de ratones C57BL/6 infectados con *L. mexicana*

Después de poner a prueba el tratamiento en ratones BALB/c infectados con *L. mexicana*, evaluamos el efecto del mismo tratamiento sobre ratones C57BL/6, que son más resistentes a la infección por *Leishmania mexicana*. En este modelo únicamente se utilizó el vehículo 2 (revisar formulación de V2, Tabla 2), debido a que se habían obtenido mejores resultados en los estudios realizados con el modelo de infecciones en ratones BALB/c.

Para evaluar el efecto del extracto de *C. serrata* sobre la infección con *L. mexicana*, se infectaron ratones C57BL/6 y 18 días después se inició el tratamiento tópico una vez al día

durante 29 días. Durante los primeros 14 días de la aplicación de los tratamientos, no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales (Figura 12). Las lesiones de los ratones que recibieron únicamente el vehículo se mantienen con tamaños similares a las del grupo control durante todo el experimento, mostrándose ligeramente menores al día 29 de aplicación del tratamiento, sin diferencias significativas respecto al grupo control. Las lesiones de los ratones que recibieron el tratamiento con menor concentración del extracto (5 µg de extracto) tendieron a mantenerse ligeramente menores (1.22 mm) respecto al grupo control (aproximadamente 30%), sin diferencias significativas. En contraste, el tratamiento con mayor concentración del extracto de *C. serrata* (10 µg de extracto) redujo aproximadamente 1.5 mm el tamaño de la lesión en el día 29 de aplicación del tratamiento respecto al grupo control (35% de reducción) ($p \leq 0.05$) (Figura 12 A y B).

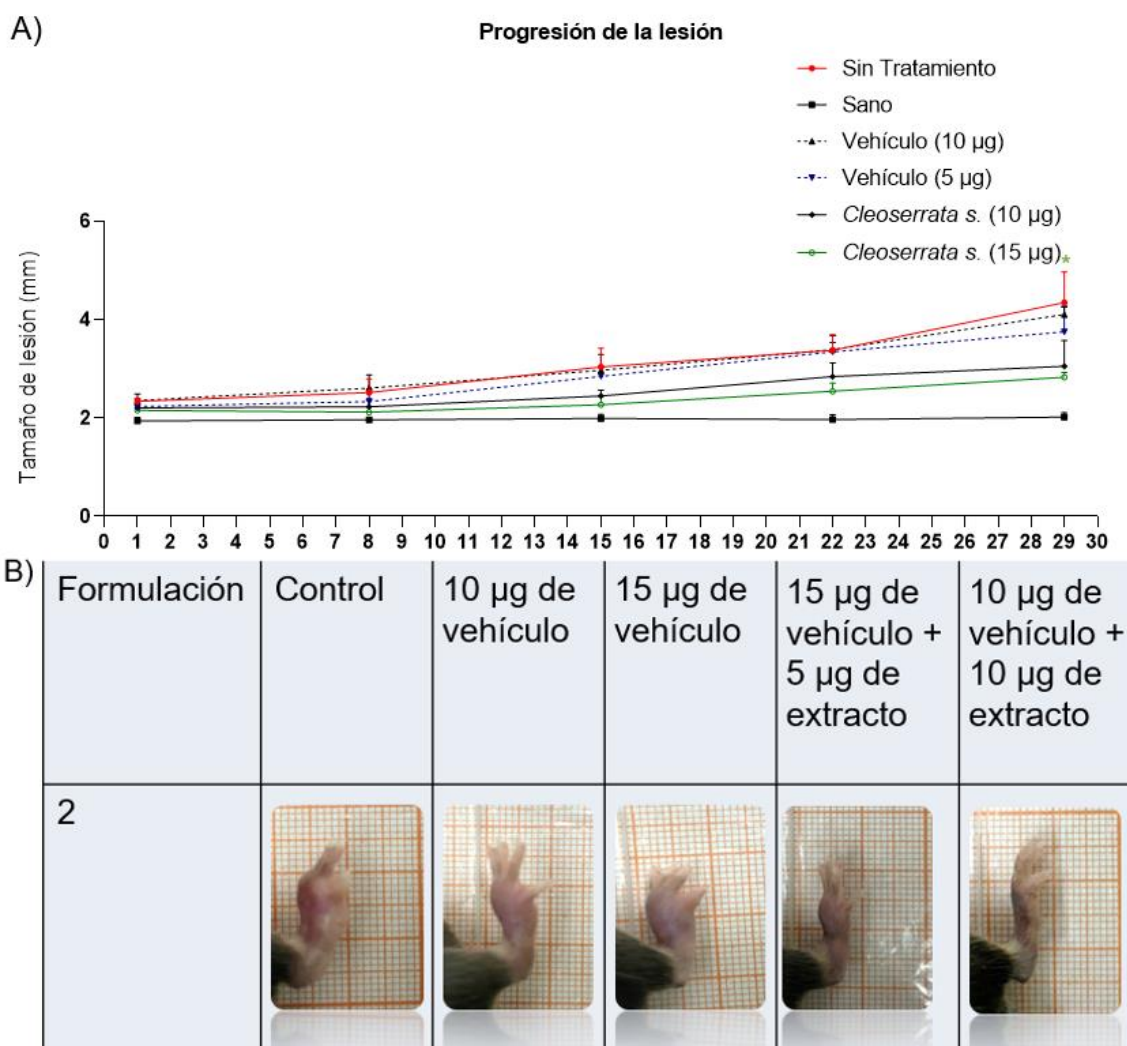


Figura 12. Progresión de la lesión en ratones C57BL/6 infectados con *L. mexicana* tratados tópicamente con extracto de *C. serrata*. A) Formulación con 10% de urea y 22% de glicerol para

los tratamientos: 10 µg de vehículo, 15 µg de vehículo, 10 µg extracto + 10 µg vehículo y 5 µg extracto + 15 µg de vehículo. B) Fotografías representativas de los tamaños de las lesiones al día de la eutanasia. Los datos se presentan como la media aritmética ± desviación estándar (n=5). Los símbolos (*) representan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre el grupo control y el grupo del mismo color del símbolo.

Evaluación del tratamiento tópico sobre la carga parasitaria de las lesiones de ratones C57BL/6 infectados con *L. mexicana*

Después de evaluar el efecto del tratamiento tópico sobre el tamaño de las lesiones, se realizó el conteo del número de amastigotes presentes por mm^2 de lesión. Para ello, se obtuvieron las lesiones de los ratones que se trataron tópicamente y se realizaron cortes histológicos para tomar fotografías de los mismos y realizar el conteo mediante el software ImageJ. Se observó que no había diferencias significativas en la carga parasitaria de los ratones que recibieron únicamente vehículo en relación con el grupo control. Respecto al tratamiento con concentración baja de *C. serrata*, redujo en 716 el número de amastigotes/ mm^2 respecto al grupo control (aproximadamente 22%) ($p \leq 0.05$). Los parásitos de las lesiones que recibieron el tratamiento con mayor concentración de *C. serrata* se redujeron en 1576 amastigotes/ mm^2 (aproximadamente 48% respecto al grupo control) ($p \leq 0.05$) (Figura 13).

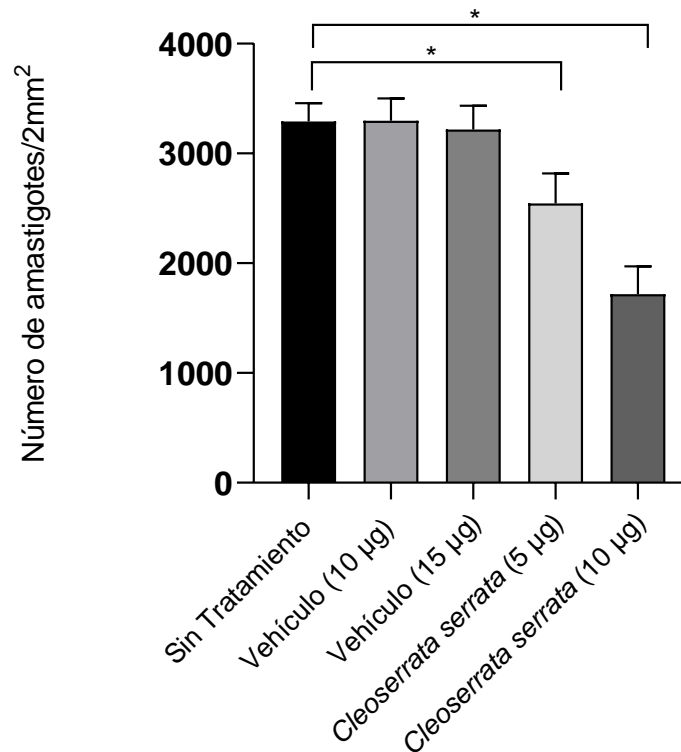


Figura 13. Carga parasitaria en las lesiones de ratones C57BL/6 infectados con *L. mexicana* y tratados tópicamente con un extracto de *C. serrata*. Los datos se presentan como la media aritmética \pm la desviación estándar (n=5). Los símbolos utilizados (*) representan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre el grupo control y los grupos experimentales.

Análisis del efecto inmunomodulador del extracto de *C. serrata* sobre macrófagos peritoneales infectados con *L. mexicana*

Luego de observar la disminución del tamaño de la lesión y la carga parasitaria en los ratones infectados con *L. mexicana* y tratados tópicamente con el extracto de *C. serrata*, se evaluó si la coincubación de dicho extracto con macrófagos infectados, induce la producción de TNF y ROS en estos fagocitos.

Respecto a la expresión de TNF no existen diferencias significativas entre los grupos infectados y su grupo control correspondiente. Sin embargo, los macrófagos infectados y estimulados con el extracto de *C. serrata*, mostraron una tendencia de aumentar la producción de TNF respecto a los que no se estimularon. En cuanto al control positivo, se observó que los macrófagos estimulados con peptidoglicano aumentan importantemente la producción de TNF. Adicionalmente, se observó que los macrófagos estimulados con el

vehículo (DMSO) no inducen la producción de TNF, respecto a los que no fueron estimulados (Figura 14A).

Por otro lado, el análisis del estallido oxidativo, mostró una disminución significativa ($p \leq 0.05$) en la producción de ROS en los macrófagos infectados con respecto a los que no fueron infectados. Sin embargo, cuando los macrófagos infectados fueron estimulados con el extracto de *C. serrata* se observó que el estallido oxidativo aumentó significativamente ($p \leq 0.05$). Adicionalmente, se observó un aumento significativo ($p \leq 0.05$) del estallido oxidativo de los macrófagos estimulados con peptidoglicano respecto a los macrófagos sin infectar. Por último, no se observaron diferencias significativas entre los macrófagos infectados y estimulados con el vehículo (DMSO) y los macrófagos infectados sin tratamiento (Figura 14B).

Estos resultados sugieren que el extracto de *C. serrata* ejerce un efecto inmunomodulador sobre los macrófagos infectados con *L. mexicana*, al inducir un aumento de la producción de TNF y del estallido oxidativo, lo cual podría relacionarse con la disminución de la carga parasitaria observada en los ratones tratados tópicamente con el extracto de *C. serrata*.

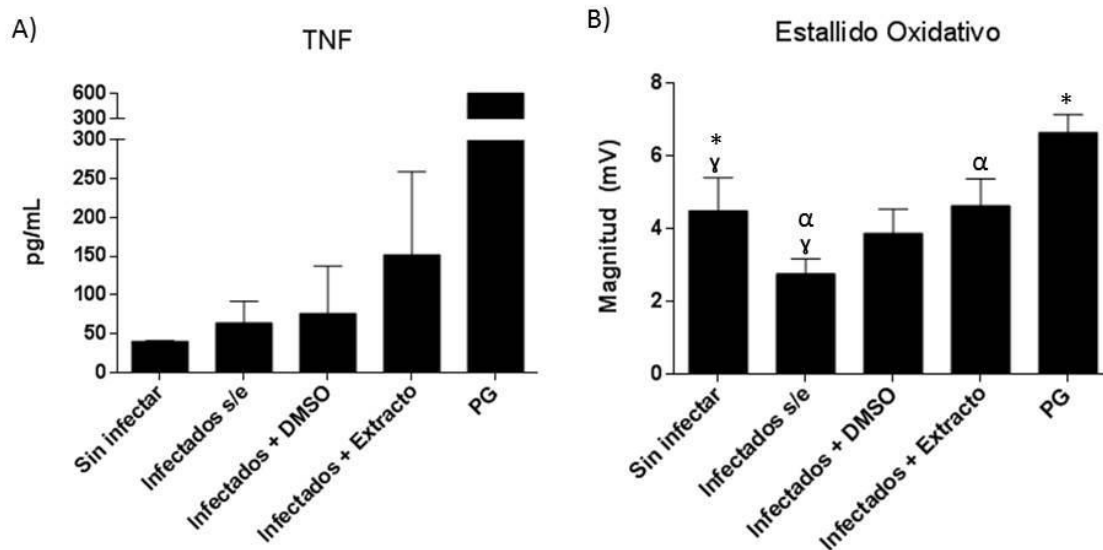


Figura 14. Evaluación del efecto inmunomodulador del extracto de *C. serrata* sobre macrófagos peritoneales infectados con *L. mexicana*. A) Cuantificación de TNF en los sobrenadantes de cultivo. B) Expresión del estallido oxidativo. Los datos se presentan como la media aritmética \pm la desviación estándar ($n=3$). Los símbolos utilizados *, γ y α representan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre el grupo experimental y el grupo control correspondiente. s/e: sin estímulo.

DISCUSIÓN

En México, los tratamientos basados en medicina tradicional son extensos (Caloca, 2000). A nivel mundial la OMS (2013) recomienda establecer reglamentos que permitan la práctica de estas medicinas alternativas para promover la salud. En el trabajo actual se analizó el efecto anti-*Leishmania* que ejerce el extracto de *C. serrata* disuelto en un vehículo para ser utilizado como tratamiento tópico en ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *L. mexicana*. Los resultados mostraron que el extracto de *C. serrata* reduce la carga parasitaria y el tamaño de la lesión en los ratones infectados, lo cual se pudo asociar a un incremento en el estallido oxidativo. Estos resultados confirman el efecto curativo que han observado los médicos tradicionales en la Chontalpa de Tabasco con el uso tópico de *C. serrata* para tratar a pacientes con leishmaniasis cutánea.

La familia *Cleomaceae* y particularmente *Cleoserrata serrata* representan una alternativa de tratamiento para la leishmaniasis cutánea debido a sus principios activos y propiedades analgésicos, antiinflamatorios y antimicrobianos (Bose *et. al.* 2007; Bose *et. al.* 2011; Juárez-Vázquez y Jiménez-Arellanes, 2019; Juárez-Vázquez *et al.* 2021). Se ha reportado que *C. serrata* ejerce un efecto leishmanicida dosis dependiente contra amastigotes de *L. mexicana* en condiciones *in vitro*. (Alamilla-Fonseca *et al.* 2018). Sin embargo, se desconocía su posible efecto *in vivo*, en un modelo animal. Por lo tanto, en el actual estudio se evaluó la efectividad terapéutica del tratamiento tópico del extracto de *C. serrata* en lesiones de ratones BALB/c y C57BL/6 infectados con *L. mexicana*.

La actividad contra *Leishmania* observada en el tratamiento con el extracto de *C. serrata* puede estar relacionada con metabolitos secundarios de la planta como son el fitol, los flavonoides y los terpenoides, que han sido reportados en *C. serrata* (Alamilla *et al.* 2019; Muhaidat *et al.* 2015). Se ha reportado que el fitol reduce el tamaño de lesiones en patas de ratas Wistar a las que se les indujo inflamación mediante la inyección de formaldehído. Aunado a esto, sea reportado que el fitol reduce el reclutamiento de macrófagos y disminuye su producción de citocinas IL-1 β y TNF- α . Así mismo, estudios *in silico* han demostrado que el fitol tiene afinidad con los mediadores COX 1 y 2 y NF- $\kappa\beta$, por lo cual se le atribuyó la inhibición de la respuesta inflamatoria mediada por estas vías (Islam *et al.* 2020; Silva *et al.* 2014).

Por otro lado, los flavonoides se asocian con la activación de NFAT y NF- $\kappa\beta$ que regulan la transcripción de IFN- γ , reduciendo su expresión en células T (Chang *et al.* 2007; Bayat *et al.* 2021). Así mismo, los terpenoides se han relacionado con inhibición en la producción de

óxido nítrico (NO), reduciendo hasta en 50% su producción en células RAW 264.7 respecto al grupo control (Shen et al. 2019). Se desconoce si estos compuestos podrían estar implicados en la activación de la vía clásica de los macrófagos y con la inhibición de algunos de sus mecanismos efectores.

A diferencia de los estudios anteriores, en el trabajo actual se analizó el efecto del extracto total de *C. serrata*, lo cual podría explicar las diferencias observadas en el presente estudio con respecto a las observaciones realizadas con fitol y flavonoides.

En el presente estudio llama la atención que los vehículos utilizados para las aplicaciones de los extractos de *C. serrata*, generaron ligeras disminuciones en el tamaño de las lesiones en los ratones (grupos 2, 5 y 6). Esta disminución podría deberse a la actividad anti-inflamatoria y de reparación de tejidos de los aceites de aguacate y de almendras dulces contenidas en el vehículo, debido a que reducen el número de células proinflamatorias y promueven la síntesis de colágeno (De Oliveira et. al. 2013; Hajhashemi et. al. 2017; Nayak et. al. 2008; Sultana et. al. 2007).

Interesantemente, se obtuvo una mayor disminución del tamaño de las lesiones cuando se aplicó el extracto de *C. serrata* con el vehículo que contenía una mayor cantidad de urea y glicerol. Esto puede explicarse por los resultados del trabajo de Björklund et. al. (2013) que demuestran que ambos compuestos pueden ser utilizados para aumentar la capacidad de permeación al mantener condiciones óptimas de hidratación en el estrato córneo, lo cual permite la difusión de diferentes compuestos a través de las capas histológicas de la piel. Por lo tanto, los tratamientos que contienen mayor cantidad de urea y glicerol potencialmente favorecen la entrada de los componentes del extracto de *C. serrata*, lo cual podría estar relacionado con el mayor efecto anti *Leishmania* observado en la reducción del tamaño de lesión y carga parasitaria.

Los ratones BALB/c y C57BL/6 difieren en su respuesta inmune ante la infección por *Leishmania* (Murray y Delph-Etienne, 2000; Sacks y Noben-Trauth, 2002). Sin embargo, el extracto de *C. serrata* tiende a disminuir el tamaño de la lesión y la carga parasitaria en ambas especies de ratón por igual, lo cual podría atribuirse a una actividad inmunomoduladora del extracto sobre el huésped. Sería importante evaluar la activación de la respuesta inmune en estos modelos de ratón después de ser infectados y tratados con el extracto. El dilucidar las respuestas inmunes de ambas especies de ratón tratadas con el extracto permitiría plantear experimentos que faciliten el rendimiento del tratamiento ante diferentes condiciones experimentales.

El presente estudio reveló que el extracto de *C. serrata* tiende a incrementar la producción de TNF en los macrófagos infectados y tratados in vitro con los extractos, con respecto a los controles infectados que no recibieron estímulo. El TNF puede ejercer un estímulo sobre la NADPH oxidasa, responsable del estallido oxidativo de los fagocitos, con generación de superóxido y otros oxidantes (ej. peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo, hipoaluros, etc) que ejercen efectos microbicidas (Angosto, 2005). Queda por explorarse si este ligero aumento puede tener un efecto sobre la carga parasitaria en macrófagos infectados con *Leishmania mexicana*. Estudios previos han reportado que metabolitos secundarios del extracto de *C. serrata* inhiben NF- κ B en células T, lo cual también inhibiría su producción de TNF (Bayat et al. 2021). Esto contrasta con los resultados obtenidos en el presente trabajo, en el cual se encontró que el extracto de *C. serrata* incrementa la producción de esta citocina en macrófagos. Una posible explicación de esta discrepancia pudiera ser que los metabolitos de *C. serrata* obtenidos en el presente estudio difieran de otros estudios. El presente estudio confirmó que el parásito inhibe el estallido oxidativo en los macrófagos infectados y no estimulados, con respecto a los que no fueron infectados. Este dato puede estar relacionado con reportes previos donde se describe que estas infecciones inhiben la proteína quinasa C (PKC) del macrófago a través de la molécula LPG del parásito, lo que conduce a la inhibición del estallido oxidativo y, por lo tanto, evita la muerte del parásito (Delgado-Domínguez et al. 2010). Interesantemente, esta inhibición se pudo contrarrestar con extractos de *C. serrata*, lo cual incrementa la evidencia del importante potencial inmunoterapéutico de esta planta.

En resumen, aunque el tratamiento de lesiones infectadas con *Leishmania mexicana* con extracto de *C. serrata* tiene menor efectividad que la ejercida por glucantime® y pentostam® a la dosis de 120 mg de SbV/kg, donde se logran reducciones del 80% en el tamaño de las lesiones y de aproximadamente 70% en la carga parasitaria en el día 35 de tratamiento (Pradhan et al. 2022; Henao et al. 2004), el uso de *C. serrata* tiene importantes ventajas, ya que no cursa con los efectos tóxicos secundarios que tienen los fármacos comúnmente utilizados, que incluyen mialgias, artralgias, cefalea y fiebre (Sáenz et al. 1987). Aunado a esto, el uso de *C. serrata* tiene la ventaja de ser de fácil acceso y bajo costo en comparación con los fármacos comerciales que, además del alto costo y de difícil acceso para los pacientes. Otro aspecto importante para promover su uso radica en la incrementada resistencia de los parásitos a los antimoniales pentavalentes como glucantime (Croft y Coombs, 2003; Rocha et al. 1980; Sundar, 2001).

CONCLUSIONES

El tratamiento tópico con extracto de la planta *C. serrata* redujo el tamaño de las lesiones y el número de amastigotes de *L. mexicana* en los animales que recibieron tratamiento respecto al grupo control.

El extracto de *C. serrata* ejerce un efecto inmunomodulador sobre los macrófagos infectados con *L. mexicana*, al inducir un aumento de la producción de TNF y del estallido oxidativo, lo cual podría relacionarse con la disminución de la carga parasitaria observada en los ratones tratados tópicamente con el extracto de *C. serrata*.

Estos resultados presentan un antecedente que plantea el uso de este tratamiento como un medicamento potencial contra la leishmaniasis cutánea.

Perspectivas

En posteriores estudios, se plantea el fraccionamiento del extracto utilizado para evaluar los efectos independientes de sus componentes sobre el parásito e identificar su asociación con la actividad leishmanicida, lo que permitiría optimizar el tratamiento.

REFERENCIAS

- Agarwal S, Krishnamurthy K. 2019. Histology, Skin. StatPearls Publishing. Consultado el 25/09/2023. Disponible en <https://europepmc.org/article/MED/30726010/NBK430685#free-full-text>
- Alamilla-Fonseca L, Domínguez J, Zamora-Chimal J, Cervantes-Sarabia R, Jiménez-Arellanes A, Rivero-Cruz J, Becker I. 2019. *Leishmania mexicana* cell death achieved by *Cleoserrata serrata* (Jacq.) Ittis: Learning from Maya healers. Journal of Ethnopharmacology 211: 180-187.
- Alamilla-Fonseca L. 2018. Estudio de *Cleoserrata serrata* en leishmaniasis. Tesis de doctorado. Consultado el 24/07/2023 de <http://132.248.9.195/ptd2018/diciembre/0783547/Index.html>

- Álvarez A, Fraga J, Monzote L, García M, Fonseca L. 2012. Diagnóstico de la leishmaniasis: de la observación microscópica del parásito a la detección del ADN. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 64(2).
- Angosto M. 2005. Estallido respiratorio de los fagocitos. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* 71: 365-386.
- Aronson E, Wortmann G, Johnson S, Jackson J, Gasser RA, Magill A, Endy T, Coyne P, Grogi M, Benson P, Beard J, Tally J, Gambel J, Kreutzer R, Oster C. 1998. Safety and Efficacy of Intravenous Sodium Stibogluconate in the Treatment of Leishmaniasis: Recent U.S. Military Experience. *Clinical Infectious Diseases*. 27(6):1457-1464.
- Bayat P, Farshchi M, Yousefian M, Mahmoudi M, Yazdian-Robati R. 2021. Flavonoids, the compounds with anti-inflammatory and immunomodulatory properties, as promising tools in multiple sclerosis (MS) therapy: A systematic review of preclinical evidence. *International Immunopharmacology* 95.
- Björklund S, Engblom J, Thuresson K, Sparr E. 2013. Glycerol and urea can be used to increase skin permeability in reduced hydration conditions. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 50: 638-645.
- Bogdan C, Rollinghoff M. 1998. The immune response to *Leishmania*: mechanism of parasite control and evasion. *International Journal of Parasitology* 28:121-34.
- Borbon T, Scorza B, Clay G, de Queiroz F, Sariol A, Bowen J, Chen Y, Zhanbolat B, Parlet C, Valadares D, Cassel S, Nauseef W, Horswill A, Sutterwala F, Wilson M. 2019. Coinfection with *Leishmania major* and *Staphylococcus aureus* enhances the pathologic responses to both microbes through a pathway involving IL-17A. *PLoS neglected tropical diseases* 13(5).
- Bose A, Mondal S, Gupta K, Ghosh T, Dash K, Si S. 2007. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the ethanolic extract and its fractions of the *Cleome rutidosperma*. *Fitoterapia*. 78: 515-520.
- Bose U, Bala V, Ghosh N, Gunasekaran K, Rahman A. 2011. Antinociceptive, cytotoxic and antibacterial activities of the *Cleome viscosa* leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 21(1): 165-169.
- Butcher M, Zhu J. 2021. Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice. *Faculty Reviews* 10(30).
- Caloca J. 2000. *Medicina tradicional en México, México*. INER 150 pp.

- Carneiro M, Lopes M, Hohman L, Campos A, Vieira L, Peters N. 2020. Th1-Th2 Cross-Regulation Controls Early *Leishmania* infection in the Skin by Modulating the Size of the Permissive Monocytic Host Cell Reservoir. *Cell Host & Microbe* 27: 752-768.
- Casas E. 2013. *Terapéutica Dermatológica Práctica*. AEPap ed. Curso de Actualización Pediatría: 65-76.
- Chang K, Fish W. 2019. *In vitro* cultivation of protozoan parasites. Chapter 3: Leishmania. Pp 111-145.
- Chang L, Chiang M, Chang L, Yeh H, El-Safty M. 2007. Flavonoids, centaurein and centaureidin, from *Bidens pilosa*, stimulate IFN-gamma expression. *J Ethnopharmacol* 112: 232-6.
- Costa J, Marsden P. 1986. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a Field Clinic in bahia, Brazil: A report of eight cases. *The journal of tropical medicine and hygiene* 89(6):319-323.
- Costa-da-Silva A, Nascimento O, Ferreira J, Guimaraes-Pinto K, Freire-de-Lima L, Morrot A, Decote-Ricardo D, Filardy A, Freire-de-Lima G. 2022. Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. *Tropical medicine and infectious disease* 7(4): 54.
- Croft L, Coombs H. 2003. Leishmaniasis– current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology* 19(11). <https://doi.org/10.1016/j.pt.2003.09.008>
- De Oliveira P, Franco S, Rodrigues R, Cordeiro P, de Melo G, de Aquino M, Silva A, de Medeiros L, da Silva G, Goes J, de Sousa M. 2013. Effect of semisolid formulation of persea americana mill (avocado) oil on wound healing in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 1-8.
- Delgado-Domínguez J, gonzález-Aguilar H, Aguirre-García M, Gutiérrez-Kobeh L, Berzunza-Cruz M, Ruiz-Remigio A, Robles-Flores M, Becker I. 2010. *Leishmania mexicana* lipophosphoglycan differentially regulates PKCa-induced oxidative burst in macrophages of BALB/c and C57BL/6 mice. *Parasite immunology*. 32: 440-449.
- Franco G (2003) Histología de la piel. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM* 46(4):130-133.
- Frézard F, Demicheli C, Kat C, Reis G, Lizarazo-Jaimes H. 2013. Chemistry of antimony-based drugs in biological systems and studies of their mechanism of action. *Reviews in Inorganic Chemistry*, 33(1), 1–12. <https://doi.org/10.1515/revic-2012-0006>.

- García B, Roig S, Rebollar C. 2015. Unüentos, pomadas, cremas, geles y pastas: ¿es todo lo mismo? *Formación Activa de Pediatría en Atención Primaria*. 8(4): 183-187.
- González-Tafoya E, Diupotex M, Zamora-Chimal J, Salaiza-Suazo N., Ruiz-Remigio A, Becker I. 2020 TNF contributes to T-cell exhaustion in chronic *L. mexicana* infections of mice through PD-L1 up-regulation. *Celular immunology*. 358.
- Gordon S, Taylor P. 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Review. Immunol*. 5: 953-64.
- Hajhashemi M, Rafieian M, Boroujeni A, Miraj S, Memarian S, Keivani A, Haghollahi F. 2017. The effect of Aloe vera gel and sweet almond oil on striae gravidarum in nulliparous women. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 31(13): 1703–1708.
- Iltis H, Cochrane T. 2007. Studies in the *Cleomaeae* V: A New Genus and ten New Combinations for the Flora of North America. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*. 17(4): 447-451.
- Islam M, Ayatollahi S, Zihad S, Sifat N, Khan M, Paul A, Salehi B, Islam T, Mubarak M, Martins N, Sharifi-Rad J. 2020. Phytol anti-inflammatory activity: Pre-clinical assessment and possible mechanism of action elucidation. *Cellular and Molecular Biology*.
- Juárez-Vázquez M, Jiménez-Arellanes M. 2019. Phytochemical investigation, anti-inflammatory and antinociceptive activities from some Species of *Cleomaceae* family: A systematic review. *Advancement in Medicinal Plant Research*. 7(4): 107-128.
- Juárez-Vázquez M, Zamilpa A, León-Díaz R, Martínez-Vázquez M, López-Torres A, Luna-Herrera J, Yépez-Mulia L, Alarcón-Aguilar F, Jiménez-Arellanes M. 2021. Phytochemical Screening and Anti-Inflammatory potential of the Organic extracts from *Cleoserrata serrata* (Jacq.) Iltis. *Pharmacogen Journal* 13 (5): 1225-41.
- Kim D, Chung H, Bleys J, Ghohestani R. 2009. Is Paromomycin an Effective and Safe Treatment Against Cutaneous Leishmaniasis? A Meta-Analysis of 14 Randomized Controlled Trials. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000381>
- Lezama-Dávila C, Pan L, Marquez A, Terrazas C, Oghumu S, Márquez R, Dzib M, Barbi J, Calomeni E, Parinandi N, Kinghorn A, Satoskar A. 2013. *Pentalinon andrieuxii* Root Extract is Effective in the Topical Treatment of Cutaneous

Leishmaniasis Caused by *Leishmania mexicana*. *Phytotherapy Research* 28:909-916. <https://doi.org/10.1002/ptr.5079>

- Liew F, Li Y, Millot S. 1990. Tumor necrosis factor in leishmaniasis II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Immunology*. 71: 556-559.
- Loría-Cervera E, Andrade-Narváez F. 2014. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. *Revista do Instituto Medicina Tropical* 56(1): 1-11.
- Mata A, Rodríguez E, Monge S. 2023. Approach to cutaneous leishmaniasis. *Revista Médica Sinergia* 8(4).
- Menon G. 2002. New insights into skin structure: scratching the surface. *Advanced Drug Delivery Reviews* 54(1): S3-S17.
- Mesa L, Vasquez D, Lutgen P, Vélez I, Restrepo A, Ortiz I, Robledo S. 2017. *In vitro* and *in vivo* antileishmanial activity of *Artemisia annua* z. Leaf powder and its potential usefulness in the treatment of uncomplicated cutaneous leishmaniasis in humans. *Revista de la Sociedad Brasileña de Medicina Tropical*. 50(1): 52-60.
- Mirzaei A, Maleki M, Masoumi E, Maspi N. 2021. A historical review of the role of cytokines involved in leishmaniasis. *Cytokine* 145.
- Mokni M. 2019. Leishmanioses cutanées. *Expertise Médicale Continue en Dermatologie* 146: 232-246.
- Moura R, Novais O, Oliveira F, Clarencio J, Noronha A, Barral A. 2005. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infection and Immunity* 73: 5827-34.
- Muhaidat R, Al-Qudah A, Samir O, Jacob H, Hussein E, Al-Tarawneh N, Bsoul E, Orabi A. 2015. Phytochemical investigation and *in vitro* antibacterial activity of essential oils from *Cleome droserifolia* (Forssk.) Delile and *C. trinervia* Fresen. (*Cleomaceae*). *South African Journal of Botany*. 99: 21-28.
- Murray W, Delph-Etienne S. 2000. Roles of endogenous gamma interferon and macrophage microbicidal mechanisms in host response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity*. 68: 288-93.
- Murthy S, Shivakumar H. 2010. Topical and Transdermal Drug Delivery. *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems*: 1-35.
- Nayak S, Raju S, Chalapathi V. 2008. Wound healing activity of *Persea americana* (avocado) fruit: a preclinical study on rats. *Journal of Wound Care*, 17(3): 123–125.

- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2013. Estrategias de la OMS sobre Medicina Tradicional 2014-2023. Disponible en https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/95008/9789243506098_spa.pdf;jsessionid=D5729F90C7A68FAB97AA613C429AF8B9?sequence=1. Consultada el 23/05/2023.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2023. *Leishmaniasis*. Organización Mundial de la Salud. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Consultada el 23/05/2023.
- Osborn D. 2008. Review of changes in topical drug classification. *Pharmaceutical Technology*. 32: 66-74.
- Osorio E., Robledo S., Arango G., Muskus C. 2005. *Leishmania*: El papel de la glicoproteína P en la mediación de resistencia a medicamentos y estrategias de reversión. *Biomédicas*. 25:242-60
- Paredes F, Yanavilca R, Fernández A, Tarmeño R. 2008. Guía de Manejo y Cuidado de Animales de Laboratorio: Ratón: 40.
- Pradhan S, Schwartz R, Patil A, Grabbe S, Goldust M. 2022. Treatment options for leishmaniasis. *Clinical and Experimental Dermatology*. 47(3): 516-521.
- Rocha R, Sampaio R, Guerra M, Cuba C, Barreto A, Marsden P. 1980. Apparent Glucantime failure in five patients with mucocutaneous leishmaniasis. *The Journal of tropical medicine and hygiene*. 83(4): 131-139.
- Ruiz M, Arias J, Gallardo V. 2010. Skin Creams Made with olive Oil. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. pp: 1133-1141.
- Sacks D, Noben-Trauth N. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nature Review*. 2: 845-58.
- Sáenz R, Paz M, Johnson M, Narváez E, Vásquez M. 1987. Evaluación de la efectividad y toxicidad del pentostam y del Glucantime ® en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. *Revista Médica de Panamá*. 12: 148-147.
- Salaiza-Suazo N, Volkow P, Tamayo R, Moll H, Gillitzer R, Pérez-Torres A, Pérez-Montfort R, Domínguez J, Velasco-Castrejón O, Crippa M, Becker I. 2002. Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. *Tropical Medicine and International Health*. 4(12): 801-811.
- Secretaría de Salud. 2015. Manual para el tratamiento, diagnóstico y control de las leishmaniasis. Subsecretaría de prevención y control de la salud. pp 25-26.

- Seger R, Krebs G. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9: 726-735.
- Serafim T, Coutinho-Abreu C, Dey R, Kissinger R, Valenzuela J, Oliveira F, Kamhawi S. 2021. Leishmaniasis: the act of transmisión. *Trends in Parasitology.*
- Henao H, Osorio Y, Saravia N, Gómez A, Travi B. 2004. Eficacia y toxicidad de los antimoniales pentavalentes (Glucantime y Pentostam) en un modelo animal de leishmaniasis cutánea americana: aplicación de la luminometría. *Biomédica*, 24(4), 393-402.
- Shen T, Wang Y, Zhu Z, Wang X, Tian T. 2019. Ligands and Terpenoids From the Fruits of *Vitex kwangsiensis* and Their Inhibitory Activity on Nitric Oxide Production in Macrophages. *Natural Product Communications* 14(5).
- Sica A, Mantovani A. 2012. Macrophage plasticity and polarization: *in vivo* veritas. *Journal of Clinical Investigation* 122: 787-95.
- Silva R, Sousa F, Damasceno S, Carvalho N, Silva V, Oliveira F, Sousa D, Aragao K, Barbosa A, Reitas R, Medeiros J. 2014. Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. *Fundamental and Clinical Pharmacology.* 28(4): 455-464.
- SUIVE/DGE. 2019. Insidencia de Leishmaniasis cutánea. Consultado el 25/07/2023 de https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2019/incidencia/enfermedad_grupo_edad_entidad_federativa/145.pdf
- Sultana Y, Kohli K, Athar M, Khar K, Aqil M. 2007. Effect of pre-treatment of almond oil on ultraviolet B-induced cutaneous photoaging in mice. *Journal of Cosmetic Dermatology.* 6(1): 14–19.
- Sundar S. 2001. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Tropical Medicine & International Health.* 6(11): 849-854.
- Uribarren T. 2017. LEISHMANIOSIS o LEISHMANIASIS. Facultad de Medicina, UNAM.
- Wertz W, Downing E. 1989. Stratum corneum: Biological and Biochemical considerations. *Transdermal drug delivery: Developmental Issues and Research Initiatives* 1-22.
- Wheeler R. 2000. Scanning electron micrograph of *Leishmania mexicana* parasites.
- Yunna C, Mengru H, Lei W. 2020. Macrophage M1/M2 polarization. *European Journal of Pharmacology.* 877.

