MAESTRÍA EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

Estudio del efecto de la variabilidad geográfica sobre la actividad leishmanicida en poblaciones de *Urechites andrieuxii* Muell. Arg. existentes en la Península de Yucatán

Tesis que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias presenta:

Manuel Jesús Chan Bacab

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México
2000

Agradecimientos

Antes que nada y a nadie a Dios.

En la integración de este trabajo de tesis, la participación del Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez, el Dr. Rafael Durán García y el Dr. Rogelio Pereda fue de gran ayuda por sus generosas enseñanzas e inteligentes sugerencias. Para ellos mi más profundo agradecimiento.

También agradezco de manera especial, a la Dra. Victoria Muñoz, a la Dra. Elfride Balanza y al Dr. Eric de Haro, por la amabilidad y los conocimientos que me brindaron durante mi estancia en el Instituto Boliviano de Biología de Altura (IBBA).

Por otra parte, quiero expresar mi reconocimiento a la QFB. Rocío Borges por la ayuda que en diferentes ocasiones me brindó durante el desarrollo de la metodología. Asimismo, agradezco a la Biol. Celene Espadas por su valiosa ayuda en la edición de la distribución de la especie y a la Dra. María Luisa Villarreal por su disposición para llevar a cabo los estudios citotoxicidad. Finalmente, agradezco al personal de la Unidad de Recursos Naturales del CICY por la ayuda brindada en los diferentes viajes de colecta del material vegetal y al Ing. Enrique Chan por enseñarme a utilizar de manera adecuada y eficientemente los diferentes programas de computación.

Expeso mi gratitud a las autoridades del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría y hacer uso de sus instalaciones. De igual forma, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), al Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología Para el Desarrollo (CYTED). Subprograma X de Química Fina Farmacéutica y a la Universidad Autónoma de Campeche (UAC) por las becas otorgadas durante la realización de este trabajo de investigación.

Finalmente, quiero agradecer de manera muy especial a una institución a la cual estoy orgulloso de pertenecer, mi familia, que a lo largo de mi vida siempre me ha brindado su apoyo moral y económico que me ha permitido tener la fortaleza necesaria para llevar a cabo mis metas.

Contenido

	Resumen	1
	Abstract	2
	Introducción	3
Capítulo I	**Antecedentes**	7
	Leishmaniasis	7
	Metabolitos con actividad leishmanicida	11
	Factores que provocan variabilidad en el contenido de metabolitos secundarios de plantas	31
	Leishmaniasis en México	32
Objetivos		34
Capítulo II	**Materiales y Métodos**	42
	La especie	42
	Distribución de la especie	43
	Selección de los sitios de colecta	43
	Material vegetal	43
	Procedimientos de extracción	43
	Estudios preliminares	43
	Preparación del material vegetal	43
	Infusión	44
	Extracto metanólico	45
	Estudios de naturaleza química	45
	Partición con disolventes orgánicos	45
	Extracción ácido-base	45
	Estudio de variabilidad	46
	Preparación del material vegetal	46
	Extracto metanólico	46
	Actividad biológica	48
	Bioensayo de letalidad contra *Artemia salina*	48
	Prueba de inhibición del desarrollo de promastigotes de *Leishmania* spp.	48
Capítulo III	**Resultados y discusión**	51
Capítulo IV	**Conclusiones y perspectivas**	61
	Conclusiones	61
	Perspectivas	62

Resumen

Urechites andrieuxii Muell. Arg. (Apocynaceae) es una planta trepadora ampliamente distribuida en la Península de Yucatán, donde es conocida comúnmente como bejuco guaco, cantibteac o contrayerba. En la medicina tradicional, esta planta se emplea contra la mordedura de serpientes, para aliviar los disturbios nerviosos y el dolor de cabeza, así como para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea localizada. Esta última enfermedad, conocida comúnmente como úlcera del chiclero, se presenta en forma endémica en la región selvática de la Península de Yucatán.

En el presente estudio se planteó como objetivo principal el determinar el nivel de variabilidad en la actividad leishmanicida en poblaciones naturales de *Urechites andrieuxii*, utilizando para esto la prueba de inhibición del desarrollo de promastigotes de *Leishmania* spp. Los resultados de la evaluación de los extractos metanólicos obtenidos de raíces de individuos pertenecientes a cuatro poblaciones naturales de *U. andrieuxii*, permitió establecer la existencia de variabilidad en el contenido de metabolitos con actividad leishmanicida. La variabilidad observada mostró una relación directa con la humedad del ambiente.

La evaluación de la actividad leishmanicida de las diferentes fracciones, obtenidas de la partición con disolventes de polaridad ascendente y de la extracción ácido-base del extracto metanólico de raíz, permitió establecer que los metabolitos responsables de la actividad leishmanicida son de polaridad baja o media baja, así como de naturaleza ácida o básica.

Los resultados de la evaluación de estas mismas fracciones contra cuatro líneas celulares (OVCAR, KB, UISO y COLON) y en el bioensayo de letalidad contra *Artemia salina* permitió establecer que algunos de estos metabolitos presentan actividad citotóxica, en tanto que otros poseen un índice de selectividad importante para su posible desarrollo como futuros fármacos contra la leishmaniasis.

Abstract

Urechites andrieuxii Muell. Arg. (Apocynaceae) is a climbing plant widely distributed in the Yucatan Peninsula where is commonly known as bejuco guaco, cantibteac or contrayerba. In traditional medicine, this plant is used against snake bites, to alleviate nervous disturbances and headaches, as well as for the treatment of localized cutaneous leishmaniasis. The latter is commonly known as úlcera del chiclero and it is an endemic disease in the sylvatic regions of the Yucatan Peninsula.

The main objetive of the present study was to determine the level of variability in the leishmanicidal activity in natural populations of *Urechites andrieuxii* using the test of growth inhibition of promastigotes of *Leishmania* spp. as an indicator. The results of the evaluation of the methanolic extracts, obtained from the roots of individuals belonging to four natural populations of *Urechites andrieuxii*, showed the existence of variability in the content of metabolites with leishmanicidal activity. The results also showed that the observed variability was directly related to the level of humidity in the environment.

The evaluation of leishmanicidal activity in fractions obtained after partition of the methanolic extract with solvents of increasing polarity, as well as those from an acid-base extraction, indicated that the responsible metabolites for the leishmanicidal activity were of low/medium-low polarity, and of both acidic and basic nature.

Evaluation of the fractions mentioned above against four tumor cell lines (OVCAR, KB, UISO y COLON) and in the brine shrimp bioassay, established that some of the metabolites have significant cytotoxic activity, while others posses an important selectivity index that makes their development as future drugs against the leishmaniasis a possibility.

Introducción

En años recientes, el reino vegetal ha sido objeto de un renovado interés como posible fuente de productos naturales con valor medicinal o de precursores útiles para el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos; esto debido principalmente al surgimiento de cepas de microorganismos resistentes a los fármacos existentes, a los efectos secundarios que presentan algunos de los medicamentos alopáticos y al alto costo que implica la producción de fármacos por medio de síntesis química [1, 2].

El valor de las plantas como fuentes de agentes medicinales se encuentra asociado a sus constituyentes químicos, específicamente por aquellos metabolitos secundarios que han demostrado poseer actividad biológica. Los alcaloides, terpenos, glucósidos, flavonoides y lignanos son algunos de los grupos de metabolitos secundarios con actividad farmacológica demostrada [3]. La importancia de los productos naturales como agentes medicinales es evidente si se toma en cuenta que en la actualidad existen 120 fármacos comerciales obtenidos de aproximadamente 90 especies vegetales [4].

Existen tres estrategias principales para obtener productos biológicamente activos a partir de plantas: utilizar especies vegetales colectadas al azar, relacionar las plantas teniendo en cuenta sus orígenes quimiotaxonómicos o aprovechar el conocimiento etnobotánico existente [5]. La primera estrategia está basada en el hecho de que una selección aleatoria, combinada con el análisis de un número adecuado de muestras dará como resultado la identificación de extractos o productos eficaces en el tratamiento de una enfermedad en particular. Como ejemplo de lo anterior, se puede citar la estrategia aplicada por el Instituto Nacional del Cáncer el cual, entre 1956 y 1981, analizó 32 000 extractos de especies de plantas de distintas partes del mundo. Como resultado de esta evaluación, se encontró que entre un 2 y un 8% de las especies evaluadas mostraban actividad antitumoral reproducible; lo anterior resultó en el aislamiento del taxol, fármaco de uso actual para el tratamiento del cáncer de ovario y de seno, a partir de la corteza de *Taxus brevifolia* [4, 6].

La estrategia quimiotaxonómica está basada en el hecho de que las plantas relacionadas desde un punto de vista botánico, suelen tener metabolitos secundarios similares. Es de esperarse entonces, que si en una especie vegetal determinada se encuentra un metabolito biológicamente activo, aquellas especies relacionadas filogenéticamente van a producir también metabolitos estructuralmente similares. De esta forma, la búsqueda de acetogeninas bioactivas en la familia Annonaceae ha dado como resultado la identificación de varios géneros que las producen como son: *Annona*, *Asimina*, *Gonsthalamus*, *Rollinia*, *Uvaria* y *Xylopia* [7].

Finalmente, la búsqueda de constituyentes bioactivos tomando en cuenta el conocimiento etnobotánico o etnomédico de las plantas, se basa en el uso tradicional de las mismas por las poblaciones indígenas. Esta estrategia ha sido exitosa en la identificación de fármacos útiles en la medicina moderna; como ejemplo de lo anterior se puede citar el caso de la artemisinina, un agente antipalúdico aislado de *Artemisia*

annua, una planta medicinal usada en Asia por más de dos siglos contra el paludismo [7].

El renovado interés, tanto por parte de instituciones académicas como de la industria farmacéutica, por la identificación de productos naturales con actividad farmacológica, ha resultado en el desarrollo de un número importante de bioensayos, tanto simples como sofisticados, así como generales o altamente específicos. El uso de estas técnicas de bioensayo ha permitido la detección de metabolitos bioactivos en extractos vegetales y ha simplificado los procesos de purificación.

Los productos naturales de origen vegetal con actividad biológica, pueden ser utilizados clínicamente como productos puros o como extractos vegetales estandarizados conocidos como fitofármacos (i.e. material vegetal pulverizado, tinturas, infusiones, etc.) [4]. Por lo anterior, en la actualidad, para el procesamiento de plantas consideradas como medicinales, es indispensable contar con una materia prima uniforme en cuanto a su contenido de metabolitos bioactivos, ya sea para el aislamiento de una cantidad adecuada de los mismos o para la obtención de preparaciones estandarizadas.

La producción de metabolitos secundarios en plantas está influenciada por tres factores principales: el genotipo (composición genética), la ontogenia (etapa del desarrollo) y el ambiente donde crecen [8]. A menudo estos factores provocan que la cantidad y la naturaleza de los constituyentes químicos en una especie dada, varíen considerablemente en el tiempo y en el espacio; lo anterior resulta en una falta de homogeneidad en las poblaciones naturales de una misma especie, hecho que se refleja como una variabilidad en cuanto a la concentración de los diferentes metabolitos. Por esta razón, el estudio de la influencia de factores tales como el genotipo, la ontogenia y el ambiente, en el contenido de productos naturales con actividad biológica de una especie particular, puede permitir el establecimiento de las condiciones óptimas de cultivo o la posibilidad de encontrar poblaciones con alto contenido de metabolitos de interés.

En la actualidad se estima que de las 250 000 a 750 000 especies de plantas superiores consideradas como existentes, sólo del 10 al 15% de ellas han sido estudiadas científicamente en cuanto a su composición química y un porcentaje aún menor ha sido evaluado en cuanto a las propiedades farmacológicas de sus metabolitos secundarios. Es evidente entonces que la posibilidad de encontrar nuevos fármacos a partir de plantas es enorme [4].

En el caso particular de las plantas utilizadas para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos protozoarios (paludismo, amebiasis, tripanosomiasis, leishmaniasis), la base de datos NAPRALERT recopila 152 géneros que se utilizan en la medicina tradicional para el tratamiento del paludismo y 139 géneros que poseen actividad amebicida. Por otra parte, más de 20 especies vegetales de diferentes familias taxonómicas, se han reportado como poseedoras de productos con actividad significativa contra diferentes especies de *Leishmania* [9, 10]. En los países en desarrollo, donde este tipo de enfermedades representa un problema

serio, y donde los fármacos para su tratamiento son muy costosos e incluso ineficaces, la población, en gran medida, depende de la medicina tradicional, donde se destaca el uso de extractos vegetales, para combatir estos problemas de salud [1].

México es uno de los ochenta países afectados por la leishmaniasis. Debido al clima tropical que prevalece en la región selvática de la Península de Yucatán, ésta reúne las condiciones propicias para la existencia de la enfermedad. La forma clínica de leishmaniasis detectada en esta región es la cutánea localizada, enfermedad causada pricipalmente por *Leishmania mexicana* y comúnmente conocida como úlcera del chiclero o picadura de la mala mosca [11].

Hasta la fecha, se desconoce el número de especies vegetales utilizadas para el tratamiento de la leishmaniasis en la República Mexicana. En la medicina tradicional del estado de Quintana Roo se ha documentado el uso de cinco plantas para el tratamiento de esta enfermedad [12]. Una de estas especies, *Urechites andrieuxii* Muell. Arg., pertenece a la familia Apocynaceae y es conocida comúnmente como bejuco guaco, cantibteac o contrayerba. En un estudio preliminar llevado a cabo con extractos orgánicos y acuosos de las raíces de *Urechites andrieuxii*, éstos mostraron actividad tóxica contra promastigotes de *Leishmania mexicana*, lo cual sugiere una interesante expectativa para el uso de esta especie [13].

Con base en lo anterior, y dada la importancia que representa *Urechites andrieuxii* como alternativa terapéutica para el tratamiento de la leishmaniasis en la región, se planteó en este trabajo la posibilidad de determinar la variabilidad en el contenido de metabolitos con actividad leishmanicida en raíces de poblaciones naturales de esta especie.

Referencias

1. **Phillipson, J. D. and O'Neill, M. J.** (1989) New Leads to the Treatment of Protozoal Infections Based on Natural Product Molecules. *Acta Pharmaceutica Nordica* **1**, 131.

2. **Méndez, M. y Durán R.** (1997) Diagnóstico del Conocimiento Etnobotánico Actual de las Plantas Medicinales de la Península de Yucatán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **60**, 15.

3. **Bye, R., Estrada, E., y Linares, E.** (1991) Recursos Genéticos en Plantas Medicinales. En *Avances en el Estudio de los Recursos Fitogenéticos de México* (Ortega, R., Palomillo, G., Castillo, F., González, V. y Livera, M., eds), pp. 341-359. SOMEFI. Chapingo, México.

4. **Douglas, A. and Seo, E.** (1996) Cultivating the Pharmacopoeia. *Chemtech* **26**, 46.

5. **Hamburger, M. and Hostettmann, K.** (1991) Bioactivity in Plants: The Link Between Phytochemistry and Medicine. *Phytochemistry* **30**, 3864.

6. **OMS** (1991) Análisis *in vitro* para Detectar Actividad anti-VIH en los Remedios Tradicionales. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* **111**, 35.

7. **Espinosa, F. and Delgado, G.** (1998) Relationship Between Ecology of Plant Defense and the Prospection of Secondary Metabolites with Potencial Medicinal or Agricultural Application. *Revista Latinoamericana de Química* **26**, 13.

8. **Trease, G. E. y Evans, W. C.** (1991) *Farmacognosia.* Doceava edición. Interamericana, México, p. 86.

9. **Phillipson, J. D. and Wright, C. W.** (1991) Antiprotozoal Agents from Plant Sources. *Planta Medica* **57**, S53.

10. **Iwu, M. M., Jackson, J. E. and Schuster, B. G.** (1994) Medicinal Plants in the Fight against Leishmaniasis. *Parasitology Today* **10**, 65.

11. **Albertos-Alpuche, N. E., Andrade-Narváez, F. J., Burgos-Patrón, J. P. y Vázquez-Pérez, A.** (1996) Leishmaniasis Cutánea Localizada: Indice Alérgico en la Comunidad de Becanchén, Tekax, Yucatán, México. *Revista Biomédica* **7**, 11.

12. **Pulido, M. T. y Serralta, L.** (1993) *Lista Anotada de las Plantas Medicinales de Uso Actual en el Estado de Quintana Roo.* Centro de Investigaciones de Quintana Roo. Chetumal, Quintana Roo, pp. 7, 8, 29, 59, 69.

13. **Viscencio de la R., G., Tamay, P., Issac, A., y Lezama, C.** (1995) Toxicidad *in vitro* de Extractos de *Urechites andrieuxii* en contra de *Leishmania mexicana.* Memorias de la III Reunión de Investigación Química del Sureste de México. Mérida, Yucatán, p. 93.

Capítulo I

Antecedentes

Leishmaniasis.

Los parásitos protozoarios se encuentran entre los patógenos con una mayor incidencia a nivel mundial, siendo la causa de algunas de las enfermedades tropicales más devastadoras para el hombre y los animales domésticos. El paludismo, la amebiasis, la toxoplasmosis, la tripanosomiasis y la leishmaniasis son enfermedades causadas por parásitos protozoarios que afectan aproximadamente a un 25% de la población mundial, provocando pérdida de vidas y de productividad, principalmente, en países en desarrollo. Por esta razón, el paludismo, así como la tripanosomiasis africana, la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis son consideradas, por la Organización Mundial de la Salud, entre las seis enfermedades tropicales de mayor importancia [1, 2].

La leishmaniasis es un conjunto de enfermedades tropicales causadas por especies de parásitos protozoarios del género *Leishmania*. Este padecimiento afecta alrededor de 12 millones de personas en 80 países y se estima que hay de dos a tres millones de nuevos casos cada año. Se considera también que existe actualmente una población de 350 millones de personas bajo riesgo de infección [3].

En el Viejo Mundo la leishmaniasis se distribuye alrededor del Mar Mediterráneo, en el este y oeste de Africa, así como en Afganistán, India, China y varias Repúblicas Soviéticas de Asia. En el Nuevo Mundo, la leishmaniasis se encuentra desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina y Paraguay, exceptuando las Repúblicas de Chile y Uruguay [4].

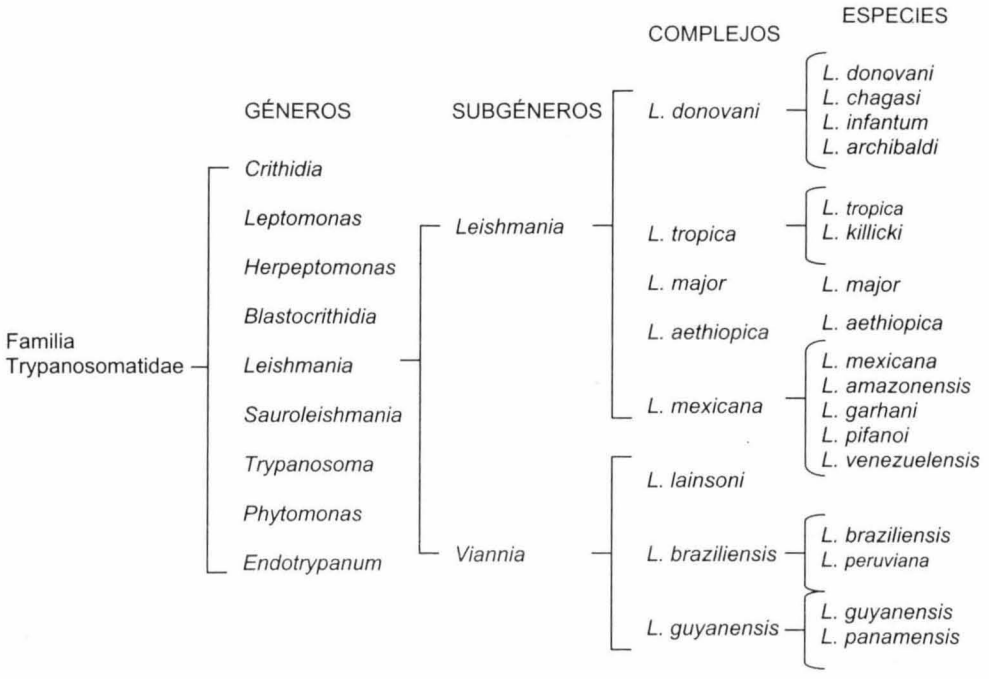
En la mayoría de los casos, la transmisión de la leishmaniasis es de tipo zoonótico; aunque, cuando no se conoce la existencia de un reservorio animal, se sospecha de una transmisión antroponótica. Entre los principales reservorios de la leishmaniasis se encuentran tanto animales domésticos como animales silvestres, en tanto que los vectores han sido caracterizados como las hembras de insectos voladores de los géneros *Phlebotomus* (leishmaniasis del Viejo Mundo) y *Lutzomyia* (leishmaniasis del Nuevo Mundo) [5].

Los miembros del género *Leishmania* son un grupo biológicamente diverso de parásitos flagelados pertenecientes a la familia Trypanosomatidae. La mayoría de las especies son patógenas al hombre y a vertebrados inferiores. Estas especies han sido diferenciadas por medio de estudios genéticos, bioquímicos e inmunológicos [6] y agrupadas en diversos complejos (Tabla 1).

En el ser humano, las especies de *Leishmania* causan una variedad de enfermedades clínicas según la capacidad del organismo para proliferar en tejido

profundo (37 °C) o cerca de la superficie de la piel a menores temperaturas (25 °C) [7]. Las diferentes manifestaciones de la enfermedad han sido utilizadas por la Organización Mundial de la Salud como base para clasificar la leishmaniasis en cuatro formas clínicas: a) visceral, b) mucocutánea, c) cutánea difusa o diseminada y d) cutánea. Ciertas especies del parásito se han asociado con las diferentes formas clínicas de la enfermedad; así el complejo de *Leishmania donovani* ocasiona la leishmaniasis visceral, en tanto que el complejo de *Leishmania tropica* es el causante de las lesiones cutáneas en el Viejo Mundo y el complejo de *Leishmania braziliensis* causa la leishmaniasis mucocutánea en el Nuevo Mundo; finalmente el complejo de *Leishmania mexicana* ocasiona la leishmaniasis cutánea y cutánea difusa en los países de América Latina [5, 8].

Tabla 1.- Taxonomía de especies patogénicas de *Leishmania*.



Lezama, C. e Issac, A. (1995) *La Inmunobiología de las Leishmaniosis*. p. 25.

La leishmaniasis visceral o "kala azar" es la forma clínica más severa de la enfermedad, siendo por lo general mortal si no se trata. Se caracteriza por la afección de los órganos internos, pero en especial el hígado y el bazo, donde provoca hepatoesplenomegalia. La leishmaniasis mucocutánea a menudo provoca una desfiguración facial causada por la erosión de los sitios mucocutáneos de la boca, la

nariz y el tabique nasal. Por otra parte, la leishmaniasis cutánea difusa o diseminada se caracteriza por la formación de nódulos, placas o pápulas múltiples, especialmente en la cara y sobre la superficie exterior de los miembros. Por último, la leishmaniasis cutánea es la forma menos severa de la leishmaniasis y, por lo general, es una infección autolimitada [9].

Durante su ciclo biológico, los parásitos del género *Leishmania* presentan dos formas que se desarrollan en huéspedes distintos: una extracelular flagelada denominada promastigote y otra intracelular conocida como amastigote (Fig. 1). La forma que infecta al hombre y a otros huéspedes vertebrados es el promastigote, que mide entre 15 y 20 μm de largo, presenta un flagelo en su parte anterior y vive en el tracto digestivo del insecto transmisor de la enfermedad. El amastigote, la forma parasitaria, mide alrededor de 2.3 μm de diámetro, tiene un flagelo rudimentario y se encuentra dentro de los macrófagos del huésped [8].

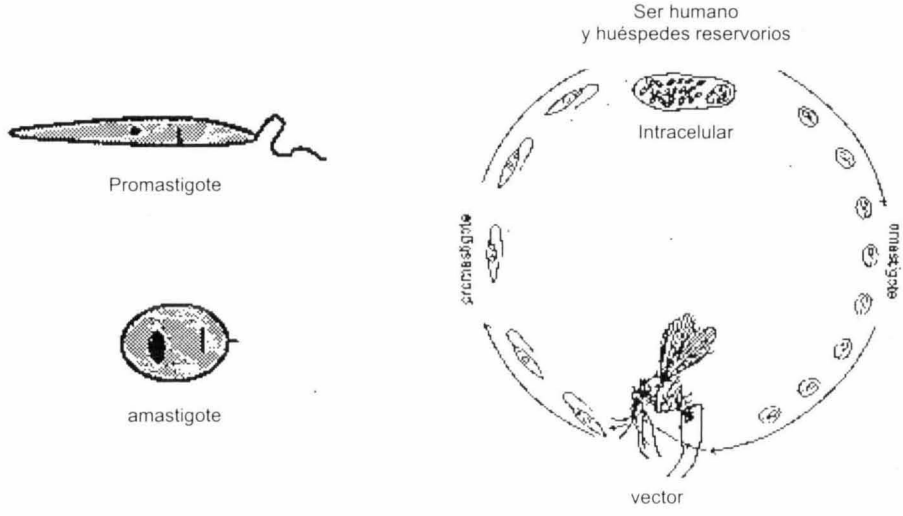


Fig. 1. Formas del parásito de *Leishmania* (Según Lezama *et al.* 1995) y su ciclo biológico (Según Beaver *et al.* 1986).

El huésped vertebrado es infectado con la forma promastigote del parásito como resultado de la picadura del vector. Después de esto los promastigotes son rápidamente fagocitados por los macrófagos del huésped y dentro de ellos los promastigotes se transforman en amastigotes. La manifestación clínica de la enfermedad es consecuencia de la multiplicación de los amastigotes dentro de los macrófagos [10].

Históricamente, la quimioterapia de la leishmaniasis se ha centrado en el uso de metales pesados tóxicos, particularmente compuestos de antimonio. Cuando este tipo

de tratamiento no es efectivo, otros medicamentos utilizados incluyen a la pentamidina y a la anfotericina B. Todos estos fármacos requieren de una administración parenteral y de una supervisión clínica u hospitalización durante el tratamiento, debido a la severidad de los posibles efectos secundarios [11].

Los agentes leishmanicidas con el índice terapéutico más favorable son los compuestos de antimonio pentavalente conocidos como antimoniales: el estibogluconato de sodio (Pentostam®) y el antimoniato de meglumina (Glucantime®). Sin embargo, las formulaciones clínicas de estos productos contienen múltiples estructuras moleculares no caracterizadas; el Pentostam®, por ejemplo, ha sido descrito como un número desconocido de complejos de antimonio con carbohidratos derivados del ácido glucónico; en tanto que en el caso del Glucantime®, sus constituyentes han sido identificados como derivados de la N-metilglucamina.

El mecanismo de acción de los antimoniales se basa en su interferencia en los procesos bioenergéticos de los amastigotes de *Leishmania*. Estos productos se unen e inhiben a diferentes proteínas del parásito, principalmente a las enzimas involucradas en los procesos de glucólisis y oxidación de ácidos grasos, y esto se acompaña de una reducción neta en la producción de ATP y GTP [12].

Sin embargo, los antimoniales causan efectos colaterales serios que incluyen dolor en el sitio de la inyección después de la administración, rigidez articular, malestar gastrointestinal, cardiotoxicidad y, en algunos casos, insuficiencia hepática y renal. Además, estos productos requieren de ciclos de tratamiento prolongados y sus costos son relativamente elevados [9, 13]. Por último, existen reportes que señalan que la eficiencia de los antimoniales para el tratamiento de la leishmaniasis asciende a un 85% de los pacientes tratados [14].

La pentamidina es un derivado aromático de la diamidina, tóxica para diferentes protozoarios y útil para el tratamiento de los casos de leishmaniasis visceral que no responden a los antimoniales. Hasta ahora el mecanismo de acción de la pentamidina contra los protozoarios no ha sido establecido claramente. A nivel intracelular, la pentamidina se une al DNA del parásito, pero aún no se establece un vínculo claro entre la unión del producto con el DNA y su eficacia. Se ha sugerido que la pentamidina interfiere también con la captación o la función de las poliaminas. Entre los efectos adversos asociados con la administración intravenosa de la pentamidina se tiene a la hipotensión, la taquicardia, los mareos, los vómitos y las cefaleas. Otras reacciones adversas incluyen también eritema, anormalidades de la función hepática, hipoglucemia y disfunción renal [9].

La anfotericina B es un antibiótico poliénico antifúngico que representa un tratamiento adecuado y diferente de los antimoniales pentavalentes. Su mecanismo de acción consiste en unirse a la fracción de ergosterol de la membrana celular del parásito, aumentando así su permeabilidad. Sin embargo, este fármaco se asocia también con un número importante de efectos adversos, incluyendo la alteración de la función renal en aproximadamente el 80% de los individuos tratados [9, 15].

Aunque existen diferentes productos en vías de desarrollo, hasta ahora ninguno de ellos ha demostrado ser completamente efectivo contra los parásitos de *Leishmania*. Estos fármacos experimentales incluyen el alupurinol, los antidepresivos imipramina y 3-cloroimipramina, la primaquina y el compuesto WR6062 [9, 16].

Debido a la falta de disponibilidad de fármacos efectivos, la mayor parte de los pobladores en áreas endémicas de leishmaniasis depende de los métodos populares y de la medicina tradicional para su tratamiento [17]. Entre los métodos más populares para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea destacan los procedimientos de cauterización utilizando el sulfato de cobre, el ácido sulfúrico de las baterías o la aplicación de una fuente calor como agua caliente u objetos metálicos calentados al fuego (al rojo vivo) (Tabla 2).

Algunos de estos métodos, aunque severos, tienen valor terapéutico. Por ejemplo, se ha reportado que los amastigotes de *Leishmania* son termosensibles y que el aplicar calor localmente para lograr una temperatura cutánea de 40 a 41 °C, o usar ultrasonido con el fin de inducir temperaturas más altas, son formas eficaces de acelerar la curación de las úlceras. En algunos casos, se ha reportado que el tratamiento térmico es tan eficaz como el de Glucantime®. Sin embargo, estas alternativas terapéuticas también presentan efectos secundarios indeseables; los métodos basados en el uso de ácidos fuertes, sustancias caústicas y objetos de metal calientes pueden provocar cicatrices permanentes y de mayor gravedad que las causadas por las úlceras mismas. En casos extremos, estos tratamientos pueden causar una necrosis tisular extensa, un mayor riesgo a infecciones secundarias y un retraso de la curación de las úlceras [18].

Además de los métodos alternativos ya mencionados, en la medicina tradicional de diferentes culturas destaca también el uso de plantas autóctonas para el tratamiento de la leishmaniasis (Tabla 3). En la práctica de la medicina tradicional, el tratamiento de la leishmaniasis consiste en la administración oral de extractos vegetales para la forma sistémica de la enfermedad y como preparaciones tópicas de los mismos para las infecciones cutáneas [3]. Tomando en cuenta este conocimiento, y en su búsqueda de nuevos fármacos con mayor efectividad, fácil disponibilidad y baja toxicidad, el Programa de Enfermedades Tropicales de la Organización Mundial de la Salud ha considerado prioritaria e indispensable la investigación de plantas utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de la leishmaniasis.

Metabolitos con actividad leishmanicida.

La evaluación científica de las plantas medicinales utilizadas en la preparación de los remedios populares ha proporcionado a la medicina moderna fármacos efectivos para el tratamiento de enfermedades causadas por parásitos protozoarios. Entre los metabolitos obtenidos de plantas utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de las enfermedades causadas por parásitos protozoarios destacan las quinonas, los alcaloides y los terpenos. Como ejemplo de lo anterior, puede citarse el hecho de que los primeros fármacos desarrollados para el tratamiento del paludismo causado por *Plasmodium falciparum* y la amebiasis causada por *Entamoeba histolytica*,

Tabla 2.- Métodos populares utilizados para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea.

Acidos
Acido acético
Acido bórico
Acido sulfúrico (usado en baterías)

Antibióticos
Penicilina
Ungüentos

Sustancias químicas
Agua oxígenada
Alcohol
Alumbre
Azufre
Cloro
Carbonato de calcio
Sulfato de cobre
Cloruro de sodio
Eter
Formalina
Mercurio
Permanganato de potasio
Plomo para baterías
Sulfato ferroso líquido
Yodo

Tratamiento a base de calor
Huesos de animal calientes
Utensilios de comer calientes
Grasa caliente (sebo, tocino)
Miel caliente
Navajas calientes
Baterías de radio calientes
Agua caliente/compresas de agua caliente
Madera caliente
Fósforos encendidos

Derivados del Petróleo
Creosota
Gasolina
Queroseno

Otros
Conchas marinas pulverizadas
Esmaltes para uñas
Cenizas (de tabaco, de madera)
Licor
Huesos de animal pulverizados
Talco
Jabón sólido y en polvo
Pólvora

Weigel, M.M. et al. (1994) *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* **117**, 408.

Tabla 3.- Ejemplo de plantas medicinales para el tratamiento de la leishmaniasis

Nombre común	Nombre científico	Parte utilizada
Achiote	*Bixa orellana*	hojas
Calaguala	*Polypodium calaguala*	savia
Escobilla	*Sida rhombifolia*	hojas
Guayaba	*Psidium guajava*	jugo, pulpa
Llantén	*Plantago major*	hojas
Matapalo	*Ficus dendrocida*	savia
Matico	*Piper angustifolium*	hojas
Plátano	*Musa paradisiaca*	cáscara, savia, fruto
Tauri	*Lupinus tauris*	hojas
Yerba mora	*Solanum nigra*	fruto, hojas

Weigel. M.M. et al. (1994) *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* **117**, 407.

fueron los alcaloides vegetales quinina y emetina, aislados de diferentes especies de los géneros *Cinchona* y de *Cephaelis*, respectivamente. Recientemente, el uso clínico de la artemisinina, una sesquiterpenlactona producida por *Artemisia annua*, para el tratamiento del paludismo ha impulsado el interés por descubrir nuevos fármacos de origen vegetal con actividad antiprotozaria [19]. Por esta razón, la mayoría de los trabajos de investigación dirigidos hacia la obtención de productos naturales poseedores de actividad biológica contra especies de parásitos protozoarios, se han enfocado principalmente a la búsqueda de metabolitos con actividad antipalúdica y amebicida y poco se ha avanzado en la búsqueda de metabolitos de origen vegetal activos contra especies de *Leishmania* y *Trypanosoma* [20].

La mayor parte de los estudios dirigidos hacia la detección de metabolitos secundarios con actividad leishmanicida han sido realizados utilizando la forma promastigote del parásito (Tabla 4), la cual es fácil de mantener en condiciones *in vitro*. Sin embargo, debido a que el promastigote no es la forma del parásito que provoca la enfermedad en el huésped vertebrado, la prueba con promastigotes solamente tiene un valor indicativo de la posible actividad leishmanicida del metabolito evaluado. Por esta razón, la evaluación preliminar antes mencionada se debe complementar con una prueba utilizando amastigotes intracelulares en macrófagos. Al mismo tiempo, se debe llevar a cabo la evaluación de la citotoxicidad del metabolito en macrófagos no parasitados, con el fin de establecer si la actividad *in vitro* del metabolito evaluado se debe a su propiedad citotóxica general o éste posee una actividad selectiva hacia el parásito de *Leishmania* [21].

Entre los productos naturales vegetales que se han reportado como poseedores de actividad leishmanicida se encuentra la diospirina (**1**), un derivado de bis-naftoquinona aislado de la corteza de *Diospyros montana* (Ebenaceae). Para este metabolito se reporta actividad contra promastigotes de *L. donovani* a una Concentración Mínima Inhibitoria (MCI) de 1 μg/ml, aunque esta actividad no es selectiva contra los amastigotes de *L. donovani* en macrófagos. Por otra parte, al evaluar el correspondiente derivado hidroxilado de diospirina (**2**), a una concentración de 3 μM, se observa la eliminación de un 73.8% de amastigotes en macrófagos infectados. El aparente mecanismo de acción de esta hidroxinaftoquinona, radica en su capacidad para causar una perturbación en la cadena de transporte de electrones mitocondriales del parásito o en la generación de radicales libres durante la interacción del fármaco con la cadena respiratoria del mismo [22-23].

La plumbagina (**3**), una naftoquinona aislada de especies del género *Plumbago*, se reporta con una actividad (IC_{50}) de 0.42 y 1.1 μg/ml contra amastigotes de *L. donovani* y *L. amazonensis*, respectivamente [24]. Tanto la plumbagina como los productos diméricos 3,3'-biplumbagina (**4**) y 8,8'-biplumbagina (**5**) se han aislado de la corteza de *Pera benensis* (Euphorbiaceae), una planta usada en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea en Bolivia. Mientras que la plumbagina y la 8,8'-biplumbagina muestran actividad contra los promastigotes de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. donovani* a una IC_{90} de 5 μg/ml, la 3,3'-biplumbagina muestra una menor actividad (IC_{90}= 50 μg/ml) contra las mismas especies de *Leishmania*. La actividad leishmanicida de la plumbagina contra las formas amastigotes de *L. amazonensis* se observa a 10

μg/ml, mostrando un índice de sobreviviencia (SI) de amastigotes de 16.5% y una ausencia de efectos tóxicos contra los macrófagos. Finalmente, la actividad *in vivo* de la plumbagina se detecta a concentraciones de 2.5 mg/kg/día contra *L. amazonensis* y de 5 mg/kg/día contra *L. venezuelensis*. El mecanismo de acción de la plumbagina, al igual que el propuesto para la diospirina, se basa en la generación de radicales libres de oxígeno, contra los cuales los parásitos carecen de un mecanismo de defensa [25, 26].

Tabla 4.- Actividad leishmanicida de grupos de productos naturales.

Quinonas
diospirina (1)[a,b]
hidroxidiospirina (2)[b]
plumbagina (3)[a,b,c]
3,3'-biplumbagina (4)[a]
8,8'-biplumbagina (5)[a]
lapachol (6)[b]
4-hidroxitetralona (7)[a,c]
jacaranona (8)[a,c]
hidropiperona (9)[a]

Terpenos
arbortristósido A (26)[b,c]
arbortristósido B (27)[b]
arbortristósido C (28)[b]
6-β-hidroxiloganina (29)[b]
picrósido I (30)[d]
kutkósido (31)[d]
amarogentina (32)[e]
espintanol (33)[a,c]
grifolina (34)[a]
piperogalina (35)[a]
deshidrozaluzanina C (36)[a,c]
13-hidroxi-12-O-tetradecanoilo de forbol (37)[a,b]
jatrogrossidiona (38)[a]
jatrofona (39)[a]
éster 15-monometílico del ácido deshidropinifólico (40)[a]
ribenol (41)[a,b]
ácido ursólico (42)[b,c]
betulinaldehído (43)[b]
simalikalactona D (44)[a]
15-β-heptilchaparrinona (45)[a]
α-hederina (46)[a]
β-hederina (47)[a]
hederagenina (48)[a,b]
mimengósido A (49)[a]
muzanzagenina (50)[a]

Alcaloides
berberina (10)[b,c]
isoguattouregidina(11)[a]
dafnandrina (12)[a]
obaberina (13)[a]
girocarpina (14)[a,c]
limacina (15)[a]
isotetrandrina (16)[a,c]
chimanina B (17)[a]
chimanina D (18)[a,c]
2-*n*-propilquinolina (19)[a,c]
dictiolomida A (20)[a]
dictiolomida B (21)[a]
harrmalina (22)[b]
gabunina (23)[a,b]
piperina (24)[a]
2-benzoxazolinona (25)[a]

Productos fenólicos
5,7,4'-trihidroxiflavano (51)[b]
(E)-1-[2,4-dihidroxi-3-(3-metil-2-butenil) fenil]-3-[-4-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil) fenil]-2-propen-1-ona (52)[a]
(+)medioresinol (53)[b]
(-)lirioresinol B (54)[b]
(+)nyasol (55)[a]
epóxido de 2-epiciclobraquicumarinona (56)[a]
epóxido de 2-ciclobraquicumarinona (57)[a]

Otros metabolitos
senegalena (58)[a]
esquamocina (59)[a]
asimicina (60)[a]
molvizarina (61)[a]
argenilactona (62)[b,c]

[a]actividad *in vitro* contra promastigotes; [b]actividad *in vitro* contra amastigotes; [c]actividad *in vivo*; [d]actividad inmunoestimulante; [e]actividad inhibitoria de la topoisomerasa I.

Otro metabolito con un mecanismo de acción similar al de la diospirina y la plumbagina es el lapachol (**6**), una hidroxinaftoquinona prenilada obtenida de especies de *Tecoma* (Bignoniaceae), el cual es débilmente activo contra amastigotes de *L. donovani* en macrófagos peritoneales de ratón [27].

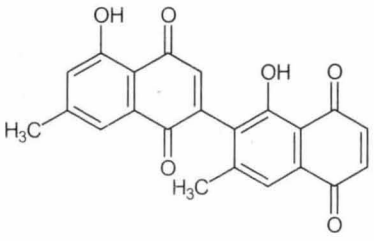
La 4-hidroxi-1-tetralona (**7**), un metabolito aislado de la corteza de *Ampelocera edentula* (Ulmaceae) y reconocido como intermediario en la biosíntesis de las 1,4-naftoquinonas, muestra actividad contra promastigotes de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. donovani* a una IC_{90} de 10 μg/ml. En estudios realizados *in vivo* con ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis* o *L. venezuelensis*, este metabolito muestra una actividad similar al Glucantime® (25 mg/kg/día vs. 56 mg/Sb^{v}/kg/día) al ser administrado por vía subcutánea. Sin embargo, y aun cuando la 4-hidroxi-1-tetralona posee una mayor actividad que el Glucantime® (50 mg/kg/día vs. 112 mg/Sb^{v}/kg/día) al administrarse cerca del sitio de una infección con *L. amazonensis*, las tetralonas han sido reportadas como agentes citotóxicos, carcinogénicos y mutagénicos en animales de laboratorio, por lo que su utilización es limitada [28].

El derivado quinónico jacaranona (**8**), aislado de las hojas de *Jacaranda copaia* (Bignoniaceae), muestra una marcada actividad contra promastigotes de *L. amazonensis* a una ED_{50} de 0.02 mM, aunque a esta concentración el metabolito es tóxico a los macrófagos peritoneales de ratón. La jacaranona muestra una débil actividad *in vivo* al ser administrada por vía subcutánea a ratones infectados con *L. amazonensis* y una marcada toxicidad cutánea al aplicarla dentro de la lesión [21].

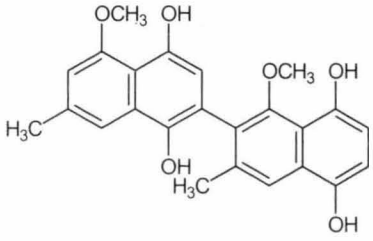
La dihidroquinona prenilada hidropiperona (**9**), aislada de *Peperomia galioides* (Piperaceae), muestra actividad tóxica contra las formas promastigotes de *L. braziliensis*, *L. donovani* y *L. amazonensis* a una concentración de 25 μg/ml y causa una lisis total de los parásitos a 100 μg/ml [29].

Entre los alcaloides con mayor actividad leishmanicida se encuentra la berberina (**10**), un alcaloide isoquinolínico cuaternario, distribuido de manera abundante en 9 familias vegetales (e.g. Annonaceae, Berberidaceae, Menispermaceae, etc.). Este metabolito es un constituyente principal en los remedios tradicionales utilizados para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea, el paludismo y la amebiasis [30]. La berberina ha sido usada clínicamente para el tratamiento de la leishmaniasis desde hace más de 50 años y se ha demostrado que posee actividad significativa *in vitro* e *in vivo* contra varias especies de *Leishmania*. A una concentración de 10 μg/ml, la berberina elimina de manera efectiva los parásitos de *L. major* en macrófagos peritoneales de ratón. Sin embargo, este producto muestra una actividad mínima al aplicarse tópicamente en lesiones cutáneas causadas por *L. major* en ratones. De igual forma, aun cuando la berberina es efectiva contra las úlceras cutáneas causadas por *L. panamensis* en ratas, se ha observado que en estos casos persisten amastigotes viables en la piel, por lo que la lesión reaparece [3, 31].

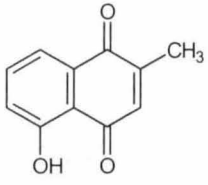
Otro alcaloide isoquinolínico, la isoguattouregidina (**11**), aislado de la corteza de *Guatteria foliosa* (Annonaceae), causa una lisis total de los parásitos de *L. donovani* y *L. amazonensis* al ser evaluado a una concentración de 100 μg/ml [32].


OH
O
OH
O
H3C
O
H3C
O

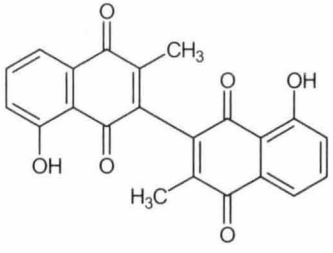
1


OCH3
OH
OCH3
OH
H3C
OH
H3C
OH

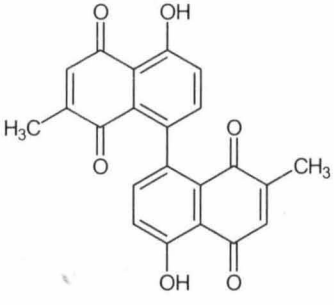
2


O
CH3
OH
O

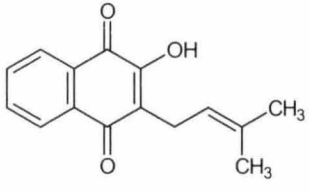
3


O
CH3
O
OH
OH
O
H3C
O

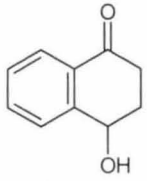
4


O
OH
H3C
O
O
CH3
OH
O

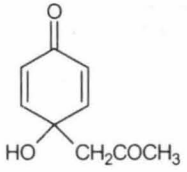
5


O
OH
CH3
O
CH3

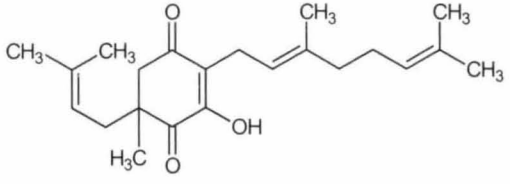
6


O
OH

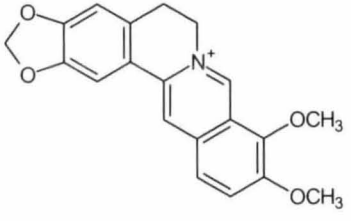
7


O
HO
CH2COCH3

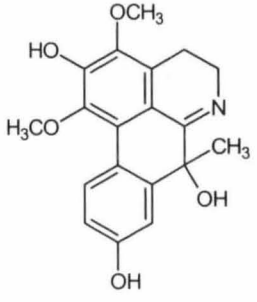
8


O
CH3
CH3
CH3
CH3
CH3
OH
H3C
O

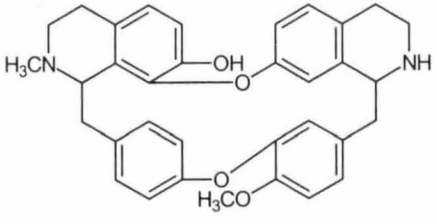
9


O
O
N+
OCH3
OCH3

10


OCH3
HO
H3CO
N
CH3
OH
OH

11


H3CN
OH
O
NH
O
H3CO

12

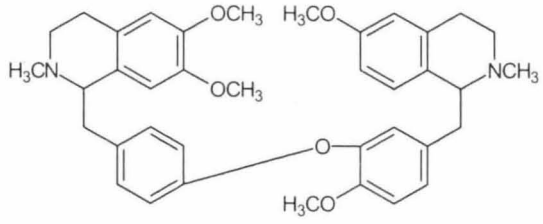
Los alcaloides bencilisoquinolínicos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y han sido aislados de diferentes plantas usadas en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades parasitarias. En una evaluación de catorce alcaloides bisbencilisoquinolínicos, se encontró una notable actividad sobre los promastigotes de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. donovani* en cuatro de ellos. La dafnandrina (**12**), aislada de *Albertisia papuana* (Menispermaceae); la obaberina (**13**), obtenida de *Pseudoxandra sclerocarpa* (Annonaceae); la girocarpina (**14**), producida por *Gyrocarpus americanus* (Hernandiaceae); y la limacina (**15**), aislada de *Caryomene olivascens* (Menispermaceae); muestran actividad leishmanicida a una IC_{100} aproximada de 50 μg/ml [33]. La girocarpina muestra también actividad *in vitro*, a 10 μg/ml, contra las formas promastigotes de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. donovani*. Sin embargo, en la prueba *in vivo* contra *L. amazonensis*, este metabolito es menos efectivo que el Glucantime® (100 mg/kg/día vs. 56 mg/Sb^v/kg/día) [34].

Otro alcaloide bisbencilisoquinolínico, que muestra actividad leishmanicida a 10 μg/ml contra las formas promastigotes de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. donovani* es la isotetrandrina (**16**), un metabolito aislado de *Limaciopsis loangensis* (Menispermaceae). La actividad *in vivo* de este producto, a 100 mg/kg/día en ratones BALB/c, es comparable a la del Glucantime® (56 mg/Sb^v/kg) al ser evaluado contra *L. amazonensis* y ligeramente menos efectivo contra *L. venezuelensis* [34].

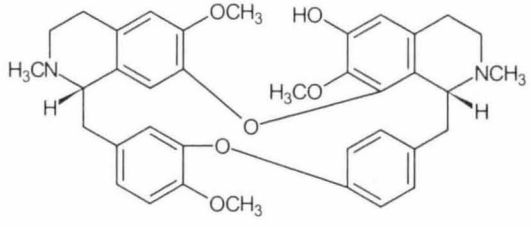
Los alcaloides derivados de la 2-alquil quinolina, chimanina B (**17**) y chimanina D (**18**), aislados de las hojas de *Galipea longiflora* (Rutaceae), muestran actividad a una IC_{90} de 25 μg/ml contra promastigotes de *L. braziliensis*, en tanto que la 2-*n*-propilquinolina (**19**) muestra actividad a una IC_{90} de 50 μg/ml. En pruebas *in vivo*, en lesiones cutáneas causadas por *L. amazonensis* y *L. venezuelensis*, la 2-*n*-propilquinolina es activa a una concentración de 100 mg/kg/día. Este metabolito, al ser administrado por vía oral (0.54 mmol/kg), suprime en un 99.9% la presencia de parásitos de *L. donovani* en el hígado de ratones BALB/c a los diez días de tratamiento. Finalmente, la chimanina D también posee actividad *in vivo* contra los parásitos de *L. amazonensis* y *L. donovani* [35-37].

Las dictiolomida A (**20**) y dictiolomida B (**21**), alcaloides derivados de la 4-quinolina aislados de la corteza de *Dictyoloma peruviana* (Rutaceae), causan una lisis total de los promastigotes de *L. amazonensis* a 100 μg/ml y muestran una menor actividad sobre promastigotes de *L. braziliensis* a la misma concentración [38].

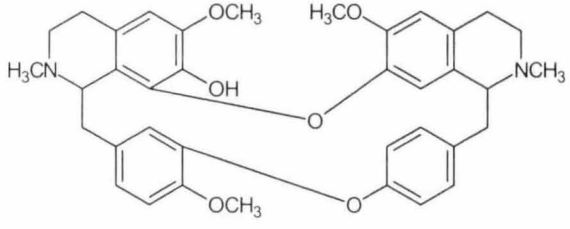
Existen diferentes alcaloides indólicos que poseen actividad antiprotozoaria. Uno de ellos, la harmalina (**22**), constituyente principal de diferentes plantas utilizadas en medicina tradicional entre las que se incluyen *Peganum harmala* y *Passiflora incarnata*, tiene actividad *in vitro* contra amastigotes de *L. amazonensis* a una ED_{50} de 24 μg/ml. Como posible mecanismo de acción antiprotozaria de este metabolito se ha postulado su intercalación en el ADN del parásito o la interferencia en el metabolismo de los aminoácidos aromáticos del mismo. Sin embargo, debido a su actividad como inhibidor de la monoamino oxidasa A, la harmalina produce efectos psicopáticos, por lo que su utilidad como agente terapéutico no es adecuada [31, 39].


OCH3
H3CO
H3CN
NCH3
OCH3
O
H3CO

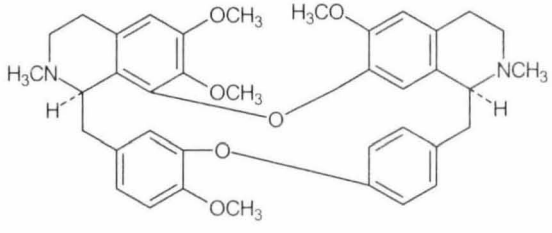
13


OCH3
HO
H3CN
NCH3
H3CO
H
H
O
O
OCH3

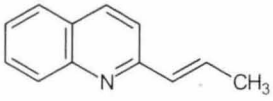
14


OCH3
H3CO
H3CN
NCH3
OH
O
OCH3
O

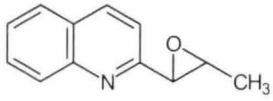
15


OCH3
H3CO
H3CN
NCH3
OCH3
H
O
H
O
OCH3

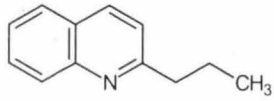
16



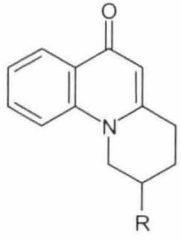
17



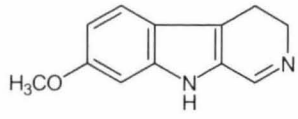
18



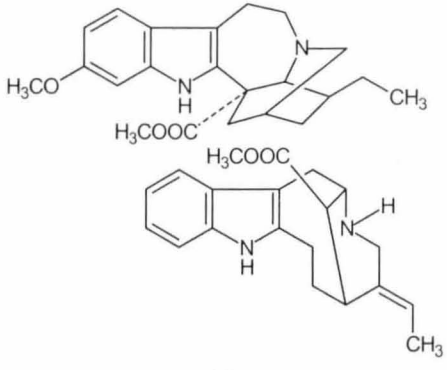
19



20 R= -CH_2-CH_2-CH=CH-CH_2-CH_3
21 R= -CHOH-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_3



22



23

El alcaloide bis-indólico, gabunina (**23**), aislado de la corteza de *Peschiera van heurkii* (Syn. *Tabernaemontana van heurkii*; Apocynaceae), muestra actividad *in vitro* contra promastigotes de *L. amazonensis* y *L. braziliensis*. Sin embargo, y aun cuando la gabunina exhibe una fuerte actividad *in vitro* sobre amastigotes de *L. amazonensis*, con un índice de sobrevivencia (SI) de amastigotes de un 3% a 25 μg/ml, este metabolito no tiene actividad en el ensayo *in vivo*, posiblemente debido a su inactivación dentro del huésped [40].

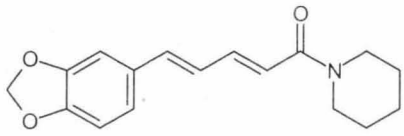
El bien conocido componente principal de las especies de *Piper*, el alcaloide piperina (1-piperoilpiperidina) (**24**), y la 2-benzoxazolinona (**25**) obtenida de las hojas de *Acanthus illicifolius* (Acanthaceae), muestran actividad contra promastigotes de *L. donovani* y sus actividades son comparativamente similares a la pentamidina [41, 42].

Otra clase de metabolitos vegetales que han mostrado actividad leishmanicida son los iridoides, un grupo de monoterpenos glucosídicos con esqueleto de ciclopentan [*c*] pirano, reconocidos como precursores biosintéticos de los alcaloides indólicos. Entre estos metabolitos, los arbortristósidos A (**26**), B (**27**), C (**28**) y la 6-β-hidroxiloganina (**29**), aislados de las semillas de *Nyctanthes arbortristis* (Rubiaceae), poseen actividad *in vitro* contra amastigotes de *L. donovani*. En la prueba *in vivo* con hámsters infectados con *L. donovani*, el arbortristósido A presenta actividad leishmanicida a una concentración de 10 mg/kg/día por vía intraperitoneal y a 100 mg/kg/día por vía oral [43].

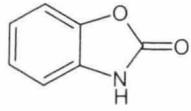
Por otra parte, el Picroliv, una fracción estandarizada obtenida de las raíces y rizomas de *Picrorhiza kurroa* que contiene principalmente una mezcla de los glicósidos iridoides, picrósido I (**30**) y kutkósido (**31**), aumenta la respuesta inmune no específica e induce una alto grado de protección a hámsters contra la infección de promastigotes de *L. donovani*. Esta actividad es notable debido a que la leishmaniasis visceral (causada por *L. donovani*) se acompaña de la supresión de la respuesta inmune, por lo que la enfermedad no puede ser erradicada completamente sólo por tratamiento quimioterapéutico. Con base en lo anterior, el Picroliv se ha propuesto como un adyuvante para potenciar la eficacia de los fármacos leishmanicidas [44].

La amarogentina (**32**), un secoiridoide glucosídico aislado de *Swertia chirata* (Gentiaceae), inhibe la actividad catalítica de la topoisomerasa I de *L. donovani* a una concentración mayor de 60 μM. La topoisomerasa I cataliza la relajación del superenrrollamiento del ADN y, por lo tanto, tiene un papel importante en el mantenimiento de las funciones celulares del parásito. Aparentemente, la amarogentina ejerce su efecto inhibitorio uniéndose a la enzima y previniendo con esto, la formación del complejo binario entre la topoisomerasa I y el ADN. Cabe mencionar, que este mecanismo de acción es similar al del estibogluconato de sodio (Pentostam®) [45].

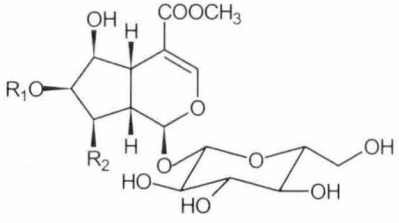
El espintanol (**33**), un monoterpeno aislado de la corteza de *Oxandra espintana* (Annonaceae), exhibe actividad contra los promastigotes de doce especies de *Leishmania*. Contra los promastigotes de *L. mexicana*, el espintanol muestra una IC_{90} de 25 μg/ml, pero aun cuando este metabolito posee una alta toxicidad hacia



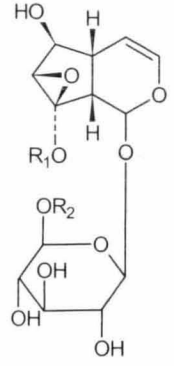
24



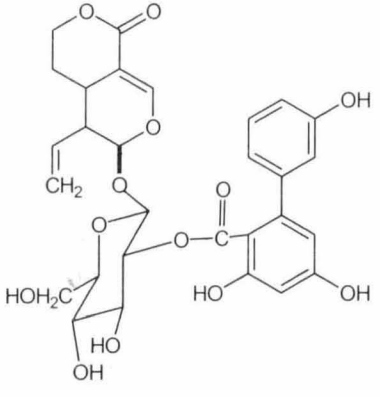
25



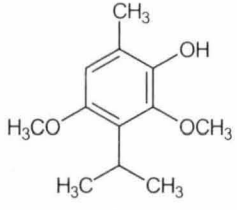
26 R_1= *p*-metoxi cinamoilo, R_2= CH_3
27 R_1=cafeoilo, R_2=CH_2OH
28 R_1=cumaroilo, R_2= CH_3
29 R_1= H, R_2= CH_3



30 R_1= vanilloilo, R_2= H
31 R_1= H, R_2= cinamoilo



32



33

macrófagos, en la prueba *in vivo* en ratones infectados con *L. amazonensis* únicamente muestra una débil actividad [46].

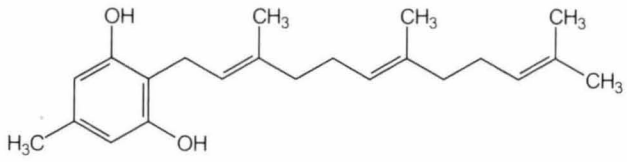
Dos terpenos obtenidos de *Peperomia galioides*, grifolina (**34**) y piperogalina (**35**), poseen actividad tóxica contra las formas promastigotes de *L. braziliensis*, *L. donovani* y *L. amazonensis* a una concentración de 100 μg/ml, provocando una lisis total de los parásitos. La piperogalina, a 10 μg/ml, causa la lisis de más del 90% de los promastigotes de las especies de *Leishmania* ya mencionadas [47].

La deshidrozaluzanina C (**36**), una sesquiterpenlactona aislada de las hojas de *Munnozia maronii* (Asteraceae), inhibe el crecimiento de once especies de promastigotes de *Leishmania* a concentraciones entre 2.5 μg/ml y 10 μg/ml. La actividad contra los parásitos de *L. mexicana* y *L. amazonensis* se observa a una IC_{90} de 25 μg/ml, en tanto que en la prueba *in vivo*, este metabolito reduce la severidad de las lesiones causadas por *L. amazonensis* en ratones BALB/c [48].

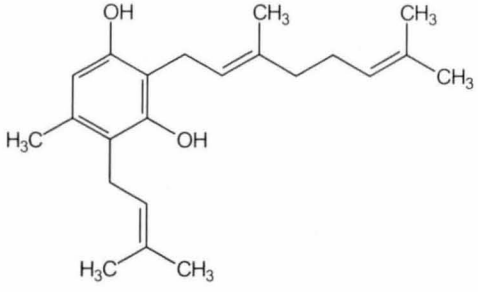
Las especies de la familia Euphorbiaceae se caracterizan por contener ésteres de forbol diterpénicos, los cuales son promotores de tumores y altamente citotóxicos. En especial, el acetato del 13-hidroxi-12-O-tetradecanoilo de forbol (TPA) (**37**) ha demostrado ser activo contra promastigotes y amastigotes de *L. amazonensis*. Este metabolito, a una concentración de 20 ng/ml, causa una variedad de cambios estructurales en los parásitos de *L. amazonensis*, siendo la forma amastigote más sensible que la forma promastigote. El probable mecanismo de acción del TPA involucra la activación de la proteína cinasa C, una enzima importante en el desarrollo de varias funciones celulares [31, 49]. Otros diterpenos con actividad leishmanicida aislados de especies de la familia Euphorbiaceae son la jatrogrossidiona (**38**) y la jatrofona (**39**). Estos metabolitos poseen actividad tóxica contra las formas promastigotes de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* y *L. chagasi* y aun cuando la actividad de la jatrogrossidiona es mayor que la de la jatrofona (IC_{100}= 0.75 y 5 μg/ml, respectivamente), la jatrogrossidiona es también tóxica a los macrófagos y no posee actividad *in vivo* [50].

Tanto el éster 15-monometílico del ácido deshidropinifólico (**40**), un diterpeno labdánico obtenido de la corteza de *Polyalthia macropoda* (Annonaceae), como el ribenol (**41**), un derivado de *ent*-manoilo aislado de *Sideritis varoi* (Lamiaceae), muestran actividad *in vitro* contra promastigotes de *L. donovani* [51-52]. Es notable señalar que mientras que el ribenol posee también actividad sobre los amastigotes de *L. donovani*, diferentes derivados de este metabolito, obtenidos mediante reacciones químicas y biotransformaciones, exhiben una actividad leishmanicida ligeramente mayor.

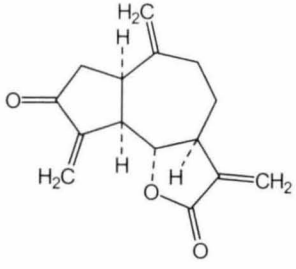
Otro grupo de metabolitos que también exhiben actividad leishmanicida es el de los triterpenos, entre los cuales se encuentran el ácido ursólico (**42**) y el betulinaldehído (**43**), obtenidos de la corteza de *Jacaranda copaia* y del tallo de *Doliocarpus dentatus* (Dilleniaceae), respectivamente. Ambos metabolitos son activos sobre los amastigotes de *L. amazonensis*, aunque el betulinaldehído es tóxico a los macrófagos peritoneales de ratón y el ácido ursólico exhibe una actividad poco significativa *in vivo* [21, 53].


OH
CH3
CH3
CH3
CH3
H3C
OH

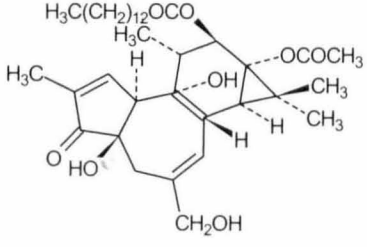
34


OH
CH3
CH3
CH3
H3C
OH
H3C
CH3

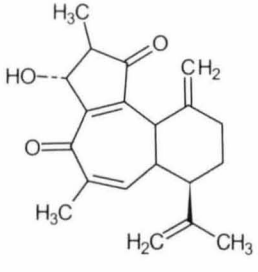
35


H2C
H
O
H2C
H
H
O
CH2
O

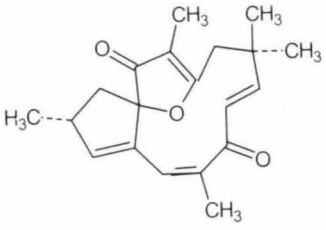
36


H3C(CH2)12OCO
H3C
H
H3C
OCOCH3
OH
CH3
H
CH3
O
HO
H
CH2OH

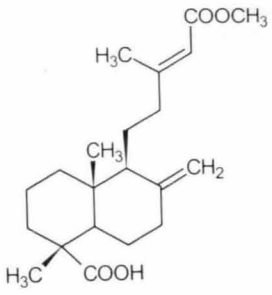
37


H3C
O
HO
CH2
O
H3C
H2C
CH3

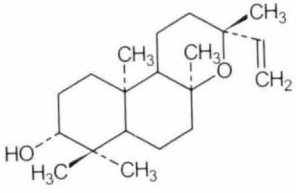
38



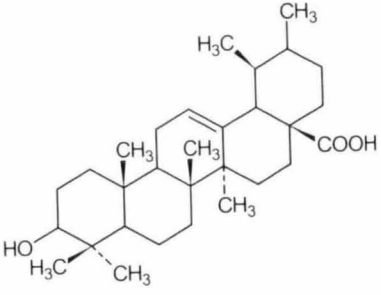
39



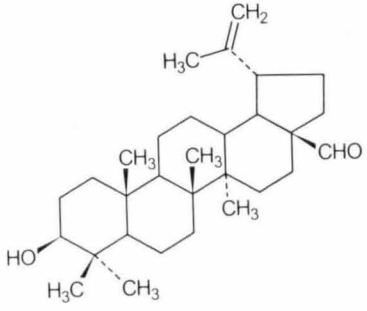
40



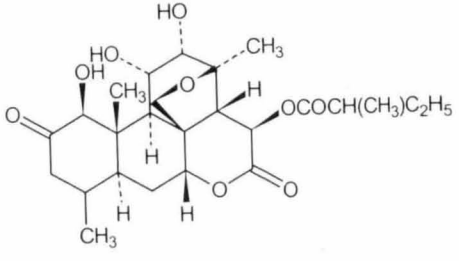
41



42



43



44

También los quassinoides, una clase de triterpenos degradados que se encuentran en diferentes especies de la familia Simaroubaceae, poseen actividad leishmanicida. Entre estos metabolitos, la simalikalactona D (**44**) y la 15-β-heptilchaparrinona (**45**), muestran actividad contra promastigotes de *L. donovani*. Sin embargo, como sucede con otros triterpenos, éstos también son tóxicos a los macrófagos [31].

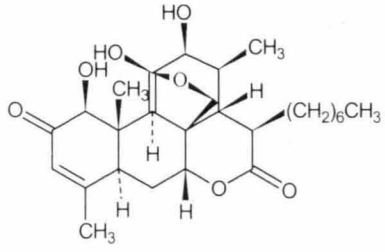
Entre las saponinas que poseen actividad tóxica contra promastigotes de *L. infantum* y *L. tropica*, se encuentran la α-hederina (**46**), la β-hederina (**47**) y la hederagenina (**48**), obtenidas todas de las hojas de *Hedera helix* (Araliaceae). De estos metabolitos, sólo la hederagenina muestra una notable actividad contra las formas amastigotes de las mismas especies de *Leishmania* [54]. Otra saponina que demuestra también actividad contra promastigotes de *L. infantum* es el mimengósido A (**49**), aislada de las hojas de *Buddleja madagascariensis* (Loganiaceae) [55].

La muzanzagenina (**50**), una sapogenina obtenida de las raíces de *Asparagus africanus* (Liliaceae), muestra actividad contra promastigotes de *L. major* a una IC_{50} de 31 μg/ml. Esta sapogenina también inhibe la proliferación de linfocitos humanos, indicando que no posee una toxicidad selectiva contra los parásitos de *Leishmania* [56].

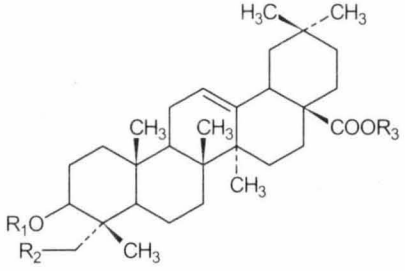
Los productos fenólicos como el 5,7,4'-trihidroxiflavano (**51**) y la chalcona, (E)-1-[2,4-dihidroxi-3-(3-metil-2-butenil)fenil]-3-[4-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)fenil]-2-propen-1-ona (**52**), exhiben actividad tóxica sobre amastigotes de *L. amazonensis* y promastigotes de *L. donovani*, respectivamente [57-58]. De igual forma los lignanos (+)medioresinol (**53**) y (-)lirioresinol B (**54**), son activos contra amastigotes de *L. amazonensis*; en tanto que el (+)nyasol (**55**) muestra una alta actividad selectiva sobre promastigotes de *L. major* [53, 56]. Finalmente, los isómeros cumarínicos como el epóxido de 2-epicicloisobraquicumarinona (**56**) y el epóxido de cicloisobraquicumarinona (**57**), aislados de *Vernonia brachycalyx* (Asteraceae), también poseen actividad selectiva contra promastigotes de *L. major* [59].

Algunas acetogeninas como la senegalena (**58**), la esquamocina (**59**), la asimicina (**60**) y la molvizarina (**61**), aisladas de las semillas de *Annona senegalensis* (Annonaceae), muestran actividad contra promastigotes de *L. major* y *L. donovani* a concentraciones que varían entre 25 y 100 μg/ml. Sin embargo, estos metabolitos muestran también una mayor citotoxicidad que la vinblastina contra las células KB y VERO [60]. Por otra parte, la argentilactona, una δ-lactona α,β-insaturada (**62**) obtenida de las raíces de *Annona haemantantha* (Annonaceae) posee actividad contra promastigotes de *L. donovani*, *L. major* y *L. amazonensis*. La administración subcutánea de este metabolito, reduce el tamaño de la lesión causada por *L. amazonensis* y disminuye el número de parásitos en el bazo de ratones BALB/c [61].

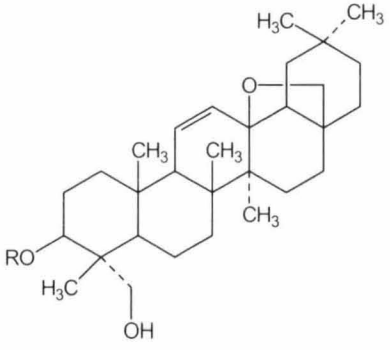
Diferentes proteínas tóxicas de origen vegetal tales como la PAP-S y la PAP-R, proteínas antivirales obtenidas de semillas y raíces de *Phytolacca americana*, y la ricina, producida por *Ricinus communis*, tienen la capacidad de inhibir la función de ribosomas aislados de *L. infantum*. Sin embargo, estas proteínas resultan ser inactivas contra los parásitos intactos debido a su falta de capacidad para penetrar la membrana celular [31].



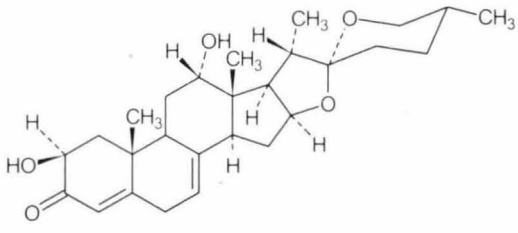
45



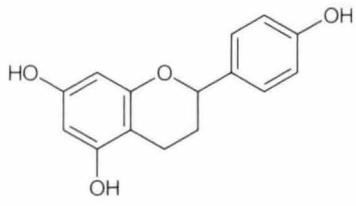
46 R_1= α-L-ramnopiranosilo (1 → 2) α-L-arabinopiranosilo (1 → , R_2= OH, R_3= H
47 R_1= α-L-ramnopiranosilo (1 → 2) α-L-arabinopiranosilo (1 → , R_2=H, R_3= H
48 R_1= H, R_2=OH, R_3=H



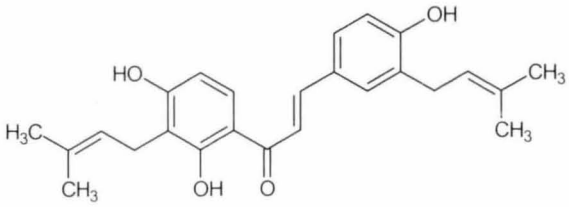
49 R= 3-*O*-α-L-ramnopiranosilo-(1 → 4)-β-D-glucopiranosilo- (1 → 3)-β-D-glucopiranosilo- (1 → 2) -β-D-fucopiranósido.



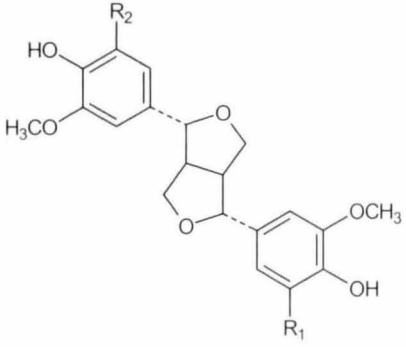
50



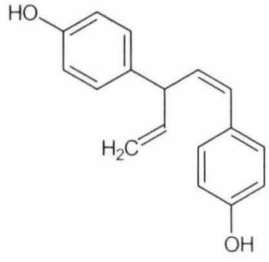
51



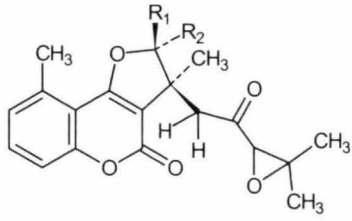
52



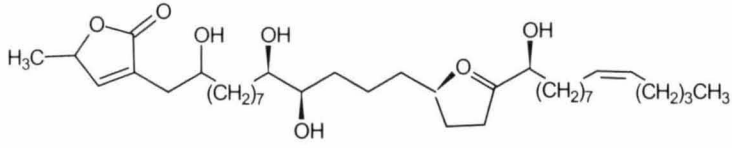
53 $R_1=R_2=CH_30$
54 $R_1=R_2=CH_3$



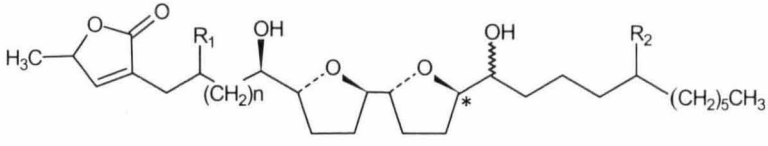
55



56 R_1= CH_3, R_2= H
57 R_1= H, R_2= CH_3

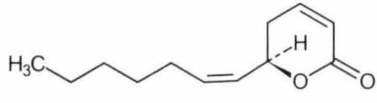


58



threo-trans-threo-trans-*

59 **R_1= H, R_2= OH, n= 10, *= *erythro***
60 R_1= OH, R_2= H, n= 10, *= *threo*
61 R_1= OH, R_2= H, n= 8, *= erythro



62

Aun cuando existe un número importante de productos naturales de origen vegetal, que han demostrado potencial como posibles agentes leishmanicidas, la mayor de ellos no reúne las características consideradas como esenciales para su desarrollo y aplicación: ser administrado por vía oral, ser efectivo después de un número moderado de dosis y no provocar efectos secundarios severos [62]. Hasta ahora únicamente la berberina, aplicada por vía parenteral, es usada clínicamente para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea [3, 27]; en tanto que la chimanina D y la 2-*n*-propilquinolina han alcanzado la fase de evaluación clínica para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea [63]; ambos metabolitos también han mostrado actividad al ser evaluados por vía oral contra la leishmaniasis visceral en ratones.

Una de las causas principales por la que los diferentes metabolitos de origen vegetal con actividad leishmanicida no han alcanzado la etapa de evaluación clínica es su alta citotoxicidad. Como ejemplo de esta clase de productos se puede citar a los ésteres de forbol, los quassinoides y las acetogeninas. Por otra parte, existen metabolitos como la gabunina y el ácido ursólico que carecen de citotoxicidad; sin embargo estos productos no muestran, o lo hacen débilmente, actividad leishmanicida *in vivo*.

La falta de una adecuada correlación entre los resultados obtenidos con los bioensayos *in vitro* y los correspondientes en las evaluaciones *in vivo*, así como la necesidad de contar con procedimientos de evaluación simples y rápidos en los que se puedan incluir todas las especies y cepas de *Leishmania*, ha motivado la búsqueda de nuevas metodologías de bioensayo para la detección de actividad leishmanicida. Una de las pruebas desarrolladas recientemente se conoce como microtécnica radiorespirométrica (RAM) la cual, utilizando promastigotes, ha demostrado una buena correlación entre sus resultados y la respuesta de los pacientes a la terapia con antimonio pentavalente. Esta técnica está basada en la capacidad que posee el producto evaluado para inhibir, en el parásito, el catabolismo de diferentes sustratos marcados. RAM ha sido empleada para evaluar la actividad leishmanicida de extractos de plantas utilizadas como medicinales en Nigeria y los resultados obtenidos mostraron que de los once extractos evaluados, cinco inhibían el catabolismo de dos o más sustratos (e.g. aminoácidos, azúcares y ácidos grasos) en el parásito [64].

Otra de las técnicas utilizadas recientemente para detectar actividad leishmanicida en extractos vegetales, es el bioensayo de inhibición del consumo de timidina marcada por parte de los parásitos de *Leishmania*. Este método ha sido utilizado exitosamente en la detección de actividad leishmanicida del (+)nyasol y del epóxido de cicloisobraquicumarionona, metabolitos reportados como poseedores de actividad selectiva sobre parásitos de *L. major* [56, 58, 59].

Por otra parte, como resultado de la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos contra enfermedades causadas por parásitos protozoarios, y ante el desconocimiento, en la mayoría de los casos, de los mecanismos de acción de los productos de origen vegetal con actividad leishmanicida, se ha propuesto la detección de blancos bioquímicos donde éstos pudiesen actuar [31, 65]. Hasta ahora, el número de trabajos dirigidos hacia la detección de productos naturales con capacidad para inhibir enzimas

claves de los parásitos de *Leishmania* es limitado, únicamente se ha reportado la amarogentina como inhibidor de la topoisomerasa I, enzima reconocida como el blanco ideal para el desarrollo de fármacos con actividad tripanosomicida [66].

Finalmente, es importante tener en cuenta que actividades como la inmunoestimulante de los iridoides contenidos en el Picroliv o la antiinflamatoria del ácido ursólico, pueden contribuir al tratamiento de la leishmaniasis, potenciando la actividad de otros fármacos.

Factores que provocan variabilidad en el contenido de metabolitos secundarios en plantas.

Durante mucho tiempo, se ha considerado que la composición química, i.e. el tipo de metabolitos secundarios de las diferentes especies vegetales, se mantiene relativamente estable. Frecuentemente esto es así, razón por la cual los caracteres químicos de las plantas han podido ser utilizados con éxito en la separación taxonómica de especies, géneros o familias botánicas.

Sin embargo, la idea de estabilidad química en una especie vegetal fue cuestionada en el primer tercio del presente siglo como resultado de los trabajos realizados con *Eucalyptus dives*; observándose, en este caso, la presencia de variedades químicas al tomar en cuenta la composición de los aceites esenciales de diferentes poblaciones de esta especie [67].

Actualmente, se conoce que los tres factores principales que provocan que la cantidad y la naturaleza de los constituyentes químicos en una especie vegetal dada varíen considerablemente son: el genotipo (composición genética), la ontogenia (etapa de desarrollo) y el medio ambiente [68].

Un número importante de trabajos dirigidos al estudio de la influencia de estos factores sobre la composición química en diferentes especies vegetales ha dado como resultado el hallazgo de razas químicas o quimiotipos en diferentes taxa de plantas medicinales. Las razas químicas se han definido como poblaciones de una especie, las cuales poseen fenotipos semejantes pero genotipos distintos, por lo que son idénticas en apariencia externa, pero diferentes en sus constituyentes químicos [68]. Como ejemplo de lo anterior se puede citar la existencia de 7 quimiotipos de *Thymus vulgaris*, una especie que posee una amplia distribución en el Mediterráneo y cuya esencia es de interés por su contenido de fenoles. Las diferentes razas químicas de *Thymus vulgaris* han sido agrupadas en base a su componente mayoritario y se denominan como quimiotipos 1,8-cineol, geraniol, linalol, α-terpineol, *trans*-tuyan-4-ol/terpinen-4-ol, carvacol y timol. Estas razas químicas son de origen genético, ya que se ha podido establecer que una serie de pares de genes determinan la naturaleza no fenólica (dominante) o fenólica (recesiva) de la esencia. En el caso de la naturaleza fenólica de la esencia, otro par de genes determina si el producto fenólico principal es carvacol (dominante) o timol (recesivo) [67].

La ontogenia es también un factor importante en la expresión de la concentración de los metabolitos secundarios de plantas. Según la etapa de desarrollo de la planta, la concentración de los metabolitos varía debido a los cambios fisiológicos que ésta experimenta. Por lo general, se ha observado que las concentraciones de los constituyentes químicos en especies vegetales son más altas durante los periodos de crecimiento vigoroso. Por ejemplo, se ha detectado un contenido superior de saponinas en *Phytolacca dodecandra* en inflorescencias muy jóvenes. Por otra parte, las variaciones diurnas y temporales en la producción de metabolitos secundarios se han atribuido a los cambios que experimenta la planta en demanda de nutrientes para mantener el crecimiento [69]. En relación a esto último, se ha determinado que existen variaciones diurnas en el contenido de cardenólidos en *Digitalis purpurea* y *Digitalis lanata*, en tanto que existen variaciones temporales en la concentración de taxanos en *Taxus brevifolia* [68, 70].

Entre los factores ambientales capaces de inducir variación en los metabolitos secundarios en plantas figuran el suelo (tipo, textura, pH, drenaje), el clima (temperatura, intensidad de luz y régimenes de humedad) y la altitud. Debido a que existe una interrelación estrecha entre todos estos factores, es difícil evaluar cada uno de manera individual [71]. Se ha observado, por ejemplo, la influencia de la altitud en la producción de alcaloides en especies de *Cinchona*; aun cuando *Cinchona succirubra*, crece adecuadamente a bajas altitudes, su producción de alcaloides en estas condiciones es prácticamente nula. De la misma forma, durante la época de lluvias, se ha encontrado que las diferentes especies de *Cinchona* no sintetizan quinina [72].

Factores bióticos como las infecciones fúngicas, bacterianas y virales, así como el ataque de insectos y la competencia con otras especies vegetales, también provocan variaciones en la producción de metabolitos secundarios en plantas. Así *Larrea tridentata* acumula metabolitos antimicrobianos en altas concentraciones en o alrededor de las células dañadas por insectos. Otro ejemplo que puede mencionarse es la pérdida observada de vinblastina y de alcaloides totales en *Catharanthus roseus* debido a infecciones virales [71, 72].

Actualmente, estos factores son tomados en cuenta para seleccionar poblaciones o individuos con alto contenido de metabolitos secundarios de interés, así como para establecer condiciones óptimas de cultivo, la parte de la planta y el momento adecuado para la colecta del material vegetal. De esta manera se tendrá un mejor aprovechamiento de los metabolitos secundarios con actividad biológica en plantas.

Leishmaniasis en México.

En México se han reportado, distribuidas en 19 estados del país, todas las formas clínicas de leishmaniasis que se describen a nivel mundial [74]. La leishmaniasis cutánea localizada en el sureste de México, conocida también comúnmente como úlcera del chiclero, fue descrita en 1912 por Seidelin y en 1953 por

Biagi, y desde entonces se ha señalado a la región selvática de la Península de Yucatán como un área endémica [75-77].

En un estudio realizado en la región endémica del estado de Campeche se observó una tasa de incidencia anual de casos de la enfermedad de 5.08 por cada mil habitantes [78]. La leishmaniasis cutánea localizada es considerada una enfermedad ocupacional, ya que afecta a grupos de trabajadores que realizan sus labores en el campo (chicleros, agricultores, madereros y cazadores) y las personas afectadas por esta enfermedad, por lo general, se ven en la necesidad de abandonar temporalmente su trabajo debido a que la exposición de la lesión al calor del sol y al sudor provoca ardor y dolor [79].

En la Península de Yucatán, se ha demostrado que la leishmaniasis cutánea localizada es causada principalmente por el parásito protozoario *Leishmania mexicana* y, en un bajo porcentaje, por *Leishmania braziliensis* [80]. Asimismo, entre los posibles vectores se encuentran los insectos voladores, conocidos comúnmente como papalotillas, mala mosca o mosca chiclera, pertenecientes a las especies *Lutzomyia olmeca* y *Lutzomyia cruciata* [81-83]. Como posibles reservorios del parásito se han descrito cuatro especies de pequeños roedores silvestres: *Ototylomys phyllotis*, *Peromyscus yucatanicus*, *Oryzomys melanotis* y *Sigmodon hispidus* [84].

La leishmaniasis cutánea localizada se caracteriza por la formación de lesiones en la piel, principalmente en la cara, orejas, brazos y piernas. El cuadro clínico de la enfermedad se caracteriza por la presencia de una lesión ulcerada, indolora y de bordes elevados y endurecidos que dura desde seis meses y hasta cuatro años en sanar [5, 76].

Hasta ahora, el único tratamiento quimioterapéutico para el control de la leishmaniasis cutánea localizada, en la Península de Yucatán, consiste en la inyección, por vía intramuscular, de una ampolleta diaria por tres semanas de antimoniato de meglumina (Glucantime®). Sin embargo, aun cuando la eficacia de este medicamento ha sido demostrada, existe una pobre aceptación del tratamiento por parte de los pacientes debido a su duración (21 días) y al tipo de aplicación (parenteral), además debido a su baja disponibilidad, ya que por tratarse de un medicamento importado, en ocasiones, su suministro a los pacientes es limitado [85].

Entre los métodos alternativos para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea localizada se encuentran la termoterapia (utilizada por la Secretaría de Salud en el estado de Campeche) y una gran cantidad de remedios utilizados en las poblaciones afectadas; entre estos últimos destacan el uso de sustancias cauterizantes como el ácido sulfúrico de las baterías, ácido muriático y la gasolina; así como el uso de pomadas antisépticas y antibióticos [79].

En la medicina tradicional de la Península de Yucatán se reportan seis especies de plantas utilizadas en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea localizada: *Clusia salvinii* (Guttiferae), *Scoparia dulcis* (Scophalariaceae), *Vitex gaumeri* (Verbenaceae), *Asclepias curassavica* (Asclepiadaceae), *Zamia loddigesii* (Cycadaceae) y *Urechites*

andrieuxii (Apocynaceae), esta última se utiliza ampliamente en los estados de Campeche y Quintana Roo [85-87].

Objetivos

Objetivo General

Detectar la variabilidad en la producción de metabolitos secundarios con propiedad leishmanicida en diferentes poblaciones de *Urechites andrieuxii* Muell. Arg. de la Península de Yucatán.

Objetivos Particulares

Determinar la distribución de *Urechites andrieuxii* Muell. Arg. en la Península de Yucatán.

Utilizar una metodología de bioensayo que permita detectar actividad leishmanicida en los extractos de las diferentes poblaciones.

Aplicar una metodología que permita conocer de manera preliminar la naturaleza química de los metabolitos bioactivos.

Referencias

1. **Borst, P. and Ouellette, M.** (1995) New Mechanisms of Drugs Resistence in Parasitic Protozoa. *Annual Review of Microbiology* **49**, 427.

2. **Gallagher, R. B., Marx, J. and Hines, P. J.** (1994) Progress in Parasitology. *Science* **264**, 1827.

3. **Iwu, M. M., Jackson, J. E. and Schuster, B. G.** (1994) Medicinal Plants in the Fight against Leishmaniasis. *Parasitology Today* **10**, 65.

4. **Beaver, P. Ch., Jung, R. C. y Cupp, E. W.** (1986) *Parasitología Clínica*. Segunda edición. Salvat, Barcelona. pp. 65-112.

5. **WHO** (1984) The Leishmaniasis. In *Technical Report Series, No. 701* (Report of a WHO Expert Commitee), pp. 10-14. Geneva.

6. **Chang, K., Chaudhuri, G. and Fong, D.** (1990) Molecular Determinants of *Leishmania* virulance. *Annual Review of Microbiology* **44**, 499.

7. **Krogstad, D. J., Visvesvara, G. S., Walls, K. W. y Smith, J. W.** (1987) Enfermedades Parasitarias. En *Manual de Microbiología Clínica* (Lennette, E. H.,

Balows, A., Hausler, W. J. y Shadomy, H. J. eds), pp. 777-778. Médica Panamericana, Argentina.

8. **Argüello, C.** (1995) Leishmaniasis en México. *Avance y Perspectiva* **14**, 21.

9. **Vande Waa, E. A. y Tracy, J. W.** (1993) Agentes Antiparasitarios. En *Farmacología* (Smith, C. D. y Reynard, A. M. eds), pp. 875-877. Médica Panamericana, Argentina.

10. **Berman, J. D. and Wyler, D. J.** (1980) An *in Vitro* Model for Investigation of Chemotherapy Agents in Leishmaniasis. *Journal of Infectious Disease* **142**, 83.

11. **Berman, J. D. and Lee, L. S.** (1983) Activity of Oral Drugs against *Leishmania tropica* in Human Macrophages. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **32**, 947.

12. **Berman, J. D.** (1988) Chemotherapy for Leishmaniasis: Biochemical Mechanisms, Clinical Efficacy, and Future Strategies. *Review of Infectious Disease* **10**, 560.

13. **Webster, L. T.** (1991) Fármacos Usados en la Quimioterapia de las Infeccioness por Protozoarios. En *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica* (Godman y Gilman, A., Rall, T. W., Nies, A. S. y Taylor, P. eds), pp. 982-987. Médica Panamericana, México.

14. **Goodwin, L. G.** (1989) Chemotherapy-Overview. In *Leishmaniasis, the current status and new strategies for control* (Hart, D. T., ed.), pp. 693-697. Plenum Press, New York.

15. **Olliaro, P. L. and Bryceson, A. D. M.** (1993) Practical Progress and New Drugs for Changing Patterns of Leishmaniasis. *Parasitology Today* **9**, 323.

16. **Croft, S. L.** (1988) Recent Development in the Chemotherapy of Leishmaniasis. *Trends Pharmacology Science* **9**, 376.

17. **Phillipson, J. D. and O'Neill, M. J.** (1989) New Leads to the Treatment of Protozoal Infections Based on Natural Product Molecules. *Acta Pharmaceutica Nordica* **1**, 131.

18. **Weigel, M. M., Armijos, R. X., Racines, R. J., Zurita, C., Izurieta, R., Herrera, E. e Hinojosa, E.** (1994) La Leishmaniasis Cutánea en la Región Subtropical del Ecuador: Percepciones, Conocimientos y Tratamientos Populares. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* **117**, 400.

19. **Phillipson, J. D. and Wright, C. W.** (1991) Antiprotozoal Agents from Plant Sources. *Planta Medica* **57**, S53.

20. **Phillipson, J. D., Wright, C. W., Kirby, G. C. and Warhurst, D. C.** (1993) Phytochemical Potencial of Tropical Plants. In *Recent Advances in Phytochemistry* (Downum, K. R., Romeo, J. T. and Stafford, H. A. eds), pp. 1-25. Plenum Press, New York.

21. **Sauvain, M., Dedet, J., Kunesch, N., Poisson, J., Gantier, J., Gayral, P. and Kunesch, G.** (1993) *In Vitro* and *in Vivo* Leishmanicidal Activities of Natural and Syntetic Quinoids. *Phytotherapy Research* **7**, 167.

22. **Hazra, B., Saha, A. K., Ray, R., Roy, D. K., Sur, P. and Banerjee, A.** (1987) Antiprotozoal Activity of Diospyrin toward *Leishmania donovani* Promastigotes *in Vitro*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **81**, 738.

23. **Yardley, V., Showdon, D., Croft, S. and Hazra, B.** (1996) *In Vitro* Activity of Diospyrin and Derivatives against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Phytotherapy Research* **10**, 559.

24. **Croft, S. L., Evans, A. T. and Neal, R. A.** (1985) The Activity of Plumbagin and other Electron Carriers against *Leishmania donovani* and *Leishmania mexicana amazonensis*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **79**, 651.

25. **Fournet, A., Angelo, A., Muñoz, V., Roblot, F., Hocquemiller, R. and Cavé, A.** (1992) Biological and Chemical Studies of *Pera benensis*, a Bolivian Plant used in Folk Medicine as a Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Ethnopharmacology* **37**, 159.

26. **Fournet, A., Angelo, A., Muñoz, V., Hocquemiller, R. and Cavé, A.** (1992) Effect of Natural Naphthoquinones in BALB/c Mice Infected with *Leishmania amazonensis* and *Leishmania venezuelensis*. *Tropical Medicine and Parasitology* **43**, 219.

27. **Borris, R. P. and Schaeffer, J. M.** (1992) Antiparasitic Agents from Plants. In *Phytochemical Resources for Medicine and Agriculture* (Nigg, H. N. and Seigler, D., eds), pp.117-158. Plenum Press, New York.

28. **Fournet, A., Angelo, A., Muñoz, V., Hocquemiller, R., Roblot, F. and Cavé, A.** (1994) Antileishmanial Activity of a Tetralone Isolated from *Ampelocera edentula*, a Bolivian Plant used as a Treatment for Cutaneous Leishmaniasis. *Planta Medica* **60**, 8.

29. **Mahiou, V., Roblot, F., Hocquemiller, R., and Cavé, A.** (1996) New Prenylated Quinones from *Peperomia galioides*. *Journal of Natural Products* **59**, 694.

30. **Phillipson, J. D. and Wright, C. W.** (1991) Medicinal Plants in Tropical Medicine. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **85**,18.

31. **Wright, C. W. and Phillipson, J. D.** (1990) Natural Products and the Development of Selective Antiprotozoal Drugs. *Phytotherapy Research* **4**, 127.

32.**Mahiou, V., Roblot, F., Hocquemiller, R., Cavé, A., Rojas de Arias, A., Yaluff, G., Fournet, A., and Angelo, A.** (1994) New Aporphine Alkaloids from *Guatteria foliosa*. *Journal of Natural Products* **57**, 890.

33.**Fournet, A., Muñoz, V., Manjon, A. M., Angelo, A., Hocquemiller, R., Cortés, D., Cavé, A. and Bruneton, J.** (1988) Activité Antiparasitaire D'alcaloïdes Bisbenzylisoquinoleiques. I: Activité *in vitro* sur des Promastigotes de Trois Souches de *Leishmania*. *Journal of Ethnopharmacology* **24**, 327.

34.**Fournet, A., Angelo, A., Muñoz, V., Hocquemiller, R. and Cavé, A.** (1993) Effect of some Bisbenzylisoquinoline Alkaloids on American *Leishmania* spp. in BALB/c mice. *Phytotherapy Research* **7**, 281.

35.**Fournet, A., Hocquemiller, R., Roblot, F., Cavé, A., Richomme, P. et Bruneton, J.** (1993) Les Chimanines, Nouvelles Quinoleines Substituees en 2, Isolees D'une Plante Bolivienne Antiparasitaire: *Galipea longiflora*. *Journal of Natural Products* **56**, 1547.

36.**Fournet, A., Angelo, A., Muñoz, V., Hocquemiller, R., Cavé, A. and Bruneton, J.** (1993) 2-Substituted Quinoline Alkaloids as Potencial Antileishmanial Drugs. *Antimicrobiology Agents and Chemotheraphy* **37**, 859.

37.**Fournet, A., Gantier, J. C., Gautheret, A., Leysalles, L., Munos, M. H., Mayrargue, Moskowitz, H., Cavé, A. and Hocquemiller, R.** (1994) The Activity of 2-Substituted Quinoline Alkaloids in BALB/c Mice Infected with *Leishmania donovani*. *Journal of Antimicrobial Chemotheraphy* **33**, 537.

38.**Lavaud, C., Massiot, G., Vasquez, C., Moretti, C., Sauvain, M. and Balderrama, L.** (1995) 4-Quinolinone Alkaloids from *Dictyloma peruviana*. *Phytochemistry* **40**, 317.

39.**Evans, A. T. and Croft, S. L.** (1987) Antileishmanial Activity of Harmalina and other Trypatamine Derivatives. *Phytotherapy Research* **1**, 25.

40.**Muñoz, V., Morretti, C., Sauvain, M., Caron, C., Porzel, A., Massiot, G., Richard, B. and Le Men-Oliver, L.** (1994) Isolation of Bis-Indole Alkaloids with Antileishmanial and Antibacterial Activities from *Peschiera van heurkii* (Syn. *Tabernamontana van heurkii*). *Planta Medica* **60**, 455.

41.**Kapil, A.** (1993) Piperine: A Potent Inhibitor of *Leishmania donovani* Promastigotes *in Vitro*. *Planta Medica* **59**, 474.

42.**Kapil, A., Sharma, S. and Wahidulla, S.** (1994) Leishmanicidal Activity of 2-Benzoxazolinone from *Acanthus illicifoliuss in Vitro*. *Planta Medica* **60**, 187.

43.**Tandon, J. S., Srivastava, V. and Guru, P. Y.** (1991) Iridoids: A New Class of Leishmanicidal Agents from *Nyctanthes arbortristis*. *Journal of Natural Products* **54**, 1102.

44.**Puri, A., Saxena, R. P., Sumanti, Guru, P. V., Kulshreshtha, D. K., Saxena, K. C. and Dhawan, B. W.** (1992) Immunostimulant Activity of Picroliv, the Iridoid Glycoside Fraccion of *Picrorhiza kurroa*, and its Protective Action against *Leishmania donovani* Infections in Hamsters. *Planta Medica* **58**, 528.

45.**Ray, S., Majumder, H. K., Chakravarty, A. K., Mukhopadhyay, S., Gil, R. R. and Cordell, G. A.** (1996) Amarogentina, a Naturally Ocurring Secoiridoids Glycoside and a Newly Recognized Inhibithor of Topoisomerase I from *Leishmania donovani*. *Journal of Natural Products* **59**, 27.

46.**Hocquemiller, R., Cortés, D., Arango, G. J., Myint, S. H., Cavé, A., Angelo, A., Muñoz, V. et Fournet, A.** (1991) Isolement et Synthese de L'espintaanol, Noveau Monoterpene Antiparasitaire. *Journal of Natural Products* **54**, 445.

47.**Mahiou, V., Roblot, F., Hocquemiller, R., Cavé, A., Angelo, A., Fournet, A. and Ducrot, P.** (1995) Piperogalin, a New Prenylated Diphenol from *Peperomia galoides*. *Journal of Natural Products* **58**, 324.

48.**Fournet, A., Muñoz, V., Roblot, F., Hocquemiller, R., Cavé, A. and Gantier, J.** (1993) Antiprotozoal Activity of Dehydrozaluzanin C, a Sesquiterpene Lactone Isolated from *Munnozia maronii* (Asteraceae). *Phytotherapy Research* **7**, 111.

49.**Vannier-Santos, M. A., Pimenta, P. F. O. and Souza, W.** (1988) Effect of Phorbol Ester on Leishmaniasis: An Ultrastructural and Cytochemical Study. *Journal of Submicroscopic Cytolology and Pathology* **20**, 583.

50.**Schmeda-Hirschmann, G., Razmilic, I., Sauvain, M., Morretti, C., Muñoz, V., Ruiz, E., Balanza, E. and Fournet, A.** (1996) Antiprotozoal Activity of Jatrogrossidione from *Jatropha grossidentata* and Jatrophone from *Jatropha isabelli*. *Phytotherapy Research* **10**, 375.

51.**Richomme, P., Godet, M., Foussard, F., Toupet, L., Sévenet, T. and Bruneton, J.** (1991) A Novel Leishmanicidal Labdane from *Pollyalthia macropoda*. *Planta Medica* **57**, 552.

52.**García-Granados, A., Liñán, E., Martínez, A., Rivas, F., Mesa-Valle, C. M., Castilla-Calvente, J. J. and Osuna, A.** (1997) *In Vitro* Action of *ent*-Manoyl Oxides against *Leishmania donovani*. *Journal of Natural Products* **60**, 13.

53.**Sauvain, M., Kunesch, N., Poisson, J., Gantier, J., Gayral, P. and Dedet, J.** (1996) Isolation of Leishmanicidal Triterpenes and Lignans from the Amazonian Liana *Dolicarrpus dentatus* (Dilleniaceae). *Phytotherapy Research* **10**, 1.

54. **Majester-Savornin, B., Elias, R., Diaz-Lanza, A. M., Balansard, G., Gasquet, M. and Delmas, F.** (1991) Saponins of the Ivy Plant, *Hedera helix*, and their Leishmanicidal Activity. *Planta Medica* **57**, 260.

55. **Emam, A. M., Moussa, A. M., Faure, R., Favel, A., Delmas, F., Elias, R. and Balansard, G.** (1996) Isolation and Biological Study of a Triterpenoid Saponin, Mimengoside A, from the leaves of *Buddleja madagascariensis*. *Planta Medica* **62**, 92.

56. **Oketch-Rabah, H. A., Dossaji, S. F., Christensen, S. B., Frydenvang, K., Lemmich, E., Cornett, C., Olsen, C. E., Chen, M., Kharazmi, A. and Theander, T.** (1997) Antiprotozoal Compounds from *Asparagus africanus*. *Journal of Natural Products* **60**, 1017.

57. **Sauvain, M., Dedet, J., Kunesch, N., and Poisson, J.** (1994) Isolation of Flavans from the Amazonian Srub *Faramea guianensis*. *Journal of Natural Products* **57**, 403.

58. **Christensen, S. B., Ming, Ch., Andersen, L., Hjorne, U., Olsen, C. E., Cornett, C., Theander, T. G. and Kharazmi, A.** (1994) An Antileishmanial Chalcone from Chinese Licorice Roots. *Planta Medica* **60**, 121.

59. **Oketch-Rabah, H. A., Lemmich, E., Dossaji, S. F., Theander, T. G., Olsen, C. E., Cornett, C., Kharazmi, A. and Christenesen, S. B.** (1997) Two New Antiprotozoal 5-methylcoumarins from *Vernonia brachycalyx*. *Journal of Natural Products* **60**, 458.

60. **Shapaz, S., Bories, Ch., Loiseau, P. M., Cortés, D., Hocquemiller, R., Laurens, A. and Cavé, A.** (1994) Cytotoxic and Antiparasitic Activity from *Annona senegalensis*. *Planta Medica* **60**, 538.

61. **Waechter, A. I, Ferreira, M. E., Fournet, A., Rojas de Arias, A., Nakayama, H., Torres, S., Hocquemiller, R., and Cavé, A.** (1997) Experimental Treatment of Cutaneous Leishmaniasis with Argentilactone Isolated from *Annona haematantha*. *Planta Medica* **63**, 433.

62. **Berman, J. D.** (1985) Experimental Chemotherapy of Leishmaniasis - A Critical Review. In *Leishmaniasis* (Chang, K. P. and Bray, R. S., eds), pp. 111-138. Elsevier Science Publishers. B. V.

63. **Fournet, A., Hocquemiller, R., et Gantier, J.** (1995) Combatre la leishmaniose. *La Recherche* **26**, 424.

64. **Iwu, M. M., Jackson, J. E., Tally, J. D. and Klayman, D. L.** (1992) Evaluation of Plant Extracts for Antileishmanial Activity Using a Mechanism-Based Radiorespirometric Microtechnique (RAM). *Planta Medica* **58**, 436.

65. **Sepúlveda-Boza, S. and Cassels, B. K.** (1996) Plant Metabolites Active against *Trypanosoma cruzi*. *Planta Medica* **62**, 98.

66.**Shapiro, T. A. and Englud, P. T.** (1990) Selective cleavage of Kinetoplast DNA Minicircles Promoted by Antitrypanosomal drugs. *Proccedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 950.

67.**Cañigueral, S.** (1994) *Significación biológica de los aceites esenciales y su variabilidad infraespecífica.* Actas del II Simposio Internacional de productos naturales y sus aplicaciones. Concepción, Chile. pp. 66-74.

68.**Trease, G. E. and Evans, W. C.** (1993) *Farmacognosia.* Doceava edición. Interamericana, México. pp. 89-117.

69.**Ndamba, J., Lemmich, E. and Molgaard, P.** (1994) Investigation of a Diurna, Ontogenic and Seasonal variation in the Molluscicidal Saponin Content of *Phytolacca dodecandra*. *Phytochemistry* **35**, 95.

70.**Vance, N. C. Kelsey, R. G. and Sabin, T. E.** (1994) Seasonal and Tissue Variation in Taxane Concentrations of *Taxus brevifolia*. *Phytochemistry* **36**, 1241.

71.**Bye, R., Estrada, E. y Linares, E.** (1991) Recursos Genéticos en Plantas Medicinales de México. En *Avances en el estudio de los recursos fitogenéticos de México* (Ortega, R., Palomillo, G., Castillo, F., González, V. y Livera, M., eds), pp. 341-359. SOMEFI. Chapingo, México.

72.**Vanhalen, M. Lejoly, J., Hanocq, M. and Molle, L.** (1991) Climatic and Geographical Aspects of Medicinal Plant Constituyents. In *The Medicinal Plant Industry* (Wijesekera, R. O. B., ed.), pp.59-76. CRC Press, Florida.

73.**Wheeler, N. C., Jech, K., Masters, S., Brobst, S.W., Alvarado, A. B., Hoover, A. J. and Snader, K. M.** (1992) Effects of Genetic, Epigenetic, and Enviromental Factors on Taxol Content in *Taxus brevifolia* and related species. *Journal of Natural Products* **55**, 432.

74.**Tellaeche, M.** (1993) *Informe relativo a prevención y control de las leishmaniasis en México.* México: Secretaría de Salud, Dirección de Prevención y Control de Enfermedades Transmitidas por Vectores.

75.**Seidelin, H.** (1912) Leishmaniasis and babesiasis in Yucatan. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **6**, 295.

76.**Biagi, F.** (1953) Algunos comentarios sobre la leishmaniasis y sus agentes etiológicos. *Leishmania tropica mexicana* nueva subespecie. *Medicina* **33**, 1.

77.**Andrade-Narváez, F. J., García-Miss, M, R., Cruz Ruiz, A. L., Canto-Lara, S. B. and Simmonds-Díaz, E.** (1984) Preliminary study of clinical, histopathological and imunological correlation of Mexican cutaneous leishmaniasis in man. *Archivos de Investigación Medica* **15**, 267.

78.**Andrade-Narváez, F. J., Simmons-Diaz, E., Rico-Aguilar, S., Andrade-Narváez, M., Palomo-Cetina. A., Canto-Lara, S., García-Miss, M., Madera-Sevilla. M. and Albertos-Alpuche, N.** (1990) Incidence of Localized Cutaneous Leishmaniasis (Chiclero's Ulcer) in Mexico. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **84**, 219.

79.**Ortega, J., Hoil, J. y Lendechy, A.** (1996) *Leishmaniasis en milperos de Campeche (una aproximación médico-antropológica).* Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán.

80.**Pérez-Mutul, J., Balam-Tzeek, L. y Canto-Lara, S.** (1994) Identificación de Protozoarios del Género *Leishmania* con Sondas Biotinadas de kDNA en la Península de Yucatán. *Revista Biomédica* **5**, 60.

81. **Rebollar-Téllez, E., Ramírez-Fraire, A. and Andrade-Narváez, F. J.** (1996) A two year study of cutaneous leishmaniasis. Evidance for sylvatic transmission cycle in the State of Campeche, México. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **91**, 555.

82.**Rebollar-Téllez, E., Reyes-Villanueva, F., Fernández-Salas, I. and Andrade-Narváez, F. J.** (1996) Abundance and parity rate of *Lutzomyia cruciata* (Diptera: Psychodidae) in an endemic focus of localized cutaneous leishmaniasis in southern Mexico. *Journal of Medical Entomolology* **33**, 683.

83.**Lezama, C. M. e Issac, A. P.** (1995) *Inmunobiología de las Leishmaniosis.* Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales. Universidad Autónoma de Campeche. Campeche, Campeche.

84.**Chablé-Santos, J., Van Wynsberghe, N. R., Canto-Lara, S. B. and Andrade-Narváez, F. J.** (1995) Isolation of *Leishmania* (*L.*) *mexicana* from wild rodents and their possible role in the transmission of localized cutaneous leishmaniasis in the State of Campeche, México. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **53**, 141.

85.**Andrade-Narváez, F.** (1997) *Efecto Directo de Extractos de* Zamia Loddigesii *Miq. sobre Promastigotes y Amastigotes de* Leishmania (L.) mexicana. Proyecto de Investigación. Mérida, Yucatán.

86.**Albertos-Alpuche, N. E., Andrade-Narváez, F. J., Burgos-Patrón, J. P. y Vázquez-Pérez, A.** (1996) Leishmanisis Cutánea Localizada: Indice Alérgico en la Comunidad de Becanchén, Tekax, Yucatán, México. *Revista Biomédica* **7**, 11.

87.**Pulido, M. T. y Serralta, L.** (1993) *Lista Anotada de las Plantas Medicinales de Uso Actual en el Estado de Quintana Roo*, México. Centro de Investigaciones de Quintana Roo. Chetumal, Quintana Roo.

Capítulo II

Materiales y Métodos

La especie.

Urechites andrieuxii Muell. Arg. es una planta trepadora perteneciente a la familia Apocynaceae, conocida comúnmente como bejuco guaco, cantibteac o contrayerba. Es un bejuco de tamaño variable, usualmente leñoso, con hojas ligeramente anchas, hasta de 12 cm de largo. Las inflorescencias son de color amarillo, en forma de trompeta y escasas. Los frutos son alargados, semejando arcos sin flecha [1].

La distribución de *Urechites andrieuxii* en el Continente Americano incluye desde la Florida, México y las Antillas hasta el norte de Colombia. En la República Mexicana se encuentra en la vertiente del Pacífico desde Michoacán hasta Chiapas y en la vertiente del Golfo de México desde Veracruz hasta Yucatán y Quintana Roo [1, 2].

Urechites andrieuxii es utilizada en la medicina tradicional de la Península de Yucatán contra la mordedura de serpientes, para aliviar el dolor de cabeza, contra los trastornos nerviosos y para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea localizada. Contra la mordedura de serpientes se recomienda masticar la raíz o las hojas frescas y aplicarlas a manera de cataplasma. El látex se utiliza para aliviar el dolor de cabeza y las hojas secas y molidas para el tratamiento de la leishmaniasis [1, 3]. En el caso de la leishmaniasis, la medicina tradicional también recomienda una infusión a partir de raíces frescas de *Urechites andrieuxii* para lavar la lesión y la utilización de raíz seca pulverizada para aplicar sobre la lesión después del lavado [4].

Hasta la fecha, sólo dos estudios se han realizado para detectar actividad biológica en *Urechites andrieuxii*. En uno de los estudios se determinó que el extracto hidroalcohólico de las raíces de *Urechites andrieuxii* posee actividad sedante y antiinflamatoria [5]. En el otro estudio, llevado a cabo con extractos orgánicos y acuosos de las raíces de esta planta, se detectó actividad tóxica contra promastigotes de *Leishmania mexicana*. Asimismo, se encontró que el extracto clorofórmico de la raíz eliminaba totalmente al parásito a las 72 horas, mientras que los extractos alcohólicos y acuosos inhibía notablemente su crecimiento en el mismo periodo de tiempo [6].

El género *Urechites* ha recibido poca atención en cuanto a su composición química y en la literatura se reporta únicamente su producción de cardenólidos y alcaloides pirrolizidínicos. Estos últimos metabolitos son reconocidos como agentes hepatotóxicos, pero en algunos casos se han usados para el tratamiento de la hipertensión, las úlceras internas y se ha descrito su actividad antitumoral [7].

Distribución de la especie en estudio.

La distribución geográfica de *Urechites andrieuxii* en la Península de Yucatán fue establecida a partir de los datos de ubicación, encontrados en las fichas de colecta de los ejemplares botánicos existentes en el herbario del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). Con ayuda del Sistema de Información Geográfica IDRISI, los sitios de colecta fueron ubicados cartográficamente, lo que permitió el desarrollo del mapa de distribución de la especie en la región.

Selección de los sitios de colecta.

Para llevar a cabo el estudio de variabilidad, se seleccionaron cuatro poblaciones de *Urechites andrieuxii*. Las poblaciones de estudio fueron seleccionadas con base en la distribución de la especie, tratando de ubicar cada una en un tipo de vegetación o en condiciones ambientales diferentes.

Material vegetal.

Para las pruebas preliminares se colectaron plantas completas de *Urechites andrieuxii* cerca del poblado de Chiná, Campeche, durante el mes de Septiembre de 1996. Para los estudios de variabilidad, se colectaron las raíces de siete individuos en etapa reproductiva por cada población seleccionada de *Urechites andrieuxii*. La colecta se realizó durante los meses de Septiembre y Noviembre de 1997, depositándose un ejemplar de cada población en el herbario del CICY.

La población I (F. May s/n) fue colectada a 13 kilómetros al sur de Moquel, a orillas del río Champotón. La población II (con número de colecta P. Simá 2245) fue colectada en el kilómetro 3.5, al noreste de Campeche, camino a Chiná. La población III (con número de colecta F. May 1129) fue colectada a 2 kilómetros al norte de Moctezuma cerca de El Cuyo en Yucatán. La población IV (con número de colecta P. Simá 2220) fue colectada a 11 kilómetros al oeste de Hunucmá camino a Sisal en Yucatán.

Procedimientos de extracción.

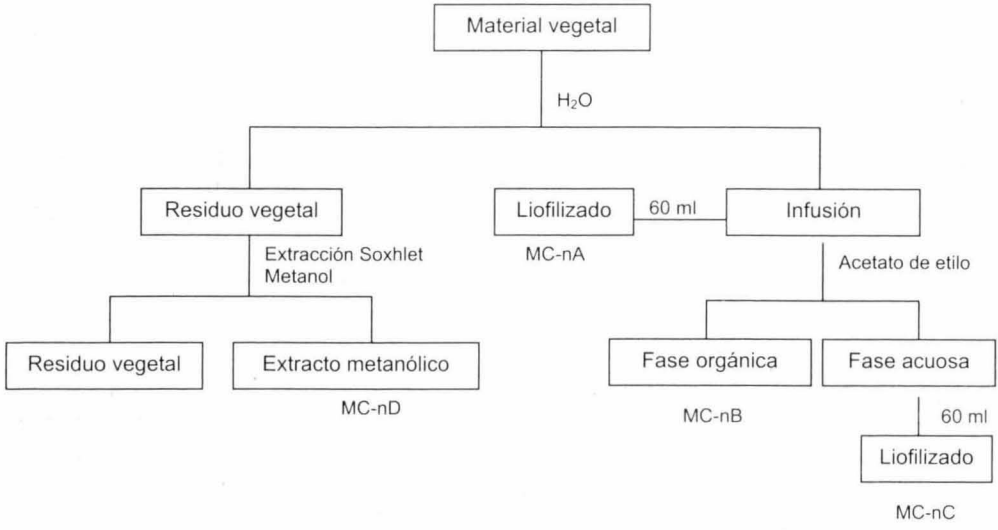
Estudios preliminares.

Preparación del material vegetal.

El material vegetal fue cortado en trozos pequeños, secado a temperatura ambiente por tres días y colocado en un horno a 50 °C por dos días. Las muestras secas (raíces, tallos y hojas) fueron utilizadas para la preparación de infusiones y la obtención de los extractos metanólicos crudos correspondientes.

Infusión.

Para la preparación de la infusión, se agregaron 30 g de material vegetal a un litro de agua destilada en ebullición. La infusión se dejó reposar hasta alcanzar la temperatura ambiente y enseguida fue filtrada a través de gasa. Una parte de la infusión (60 ml) fue liofilizada (MC-nA) y la otra (940 ml) fue extraída con acetato de etilo (3x, relación disolvente:infusión 2:1, 1:1, 1:1) obteniéndose las correspondientes fases orgánicas y acuosas residuales de la infusión. El disolvente de la fase orgánica (MC-nB) fue eliminado *in vacuo* y una parte de la fase acuosa (60 ml) fue liofilizada (MC-nC) [8]. El procedimiento antes mencionado se muestra en el Esquema 1 y los rendimientos obtenidos se incluyen en la Tabla 1.



Esquema 1.- Procedimiento de extracción del material vegetal de *Urechites andrieuxii*.

Tabla 1.- Rendimientos de los extractos obtenidos de las infusiones de raíz, tallos y hojas de *Urechites andrieuxii*.

Extracto de raíz	mg/g[a]	Extracto de tallos	mg/g	Extractos de hojas	mg/g
MC-1A	38.4	MC-2A	30.9	MC-3A	102.1
MC-1B	1.4	MC-2B	1.9	MC-3B	17.2
MC-1C	34.3	MC-2C	26.5	MC-3C	77.4

[a] miligramos de extracto por gramo de material vegetal seco.

Extracto metanólico.

El residuo vegetal (material vegetal utilizado para la infusión) fue secado, molido y sometido a una extracción Soxhlet con metanol durante 24 horas. Al término de la extracción, el disolvente fue evaporado a presión reducida, obteniéndose los extractos metanólicos crudos de raíz (MC-1D, 107.6 mg/g de material vegetal seco), tallos (MC-2D, 80.8 mg/g) y hojas (MC-3D, 153.24 mg/g) (Esquema 1) [8].

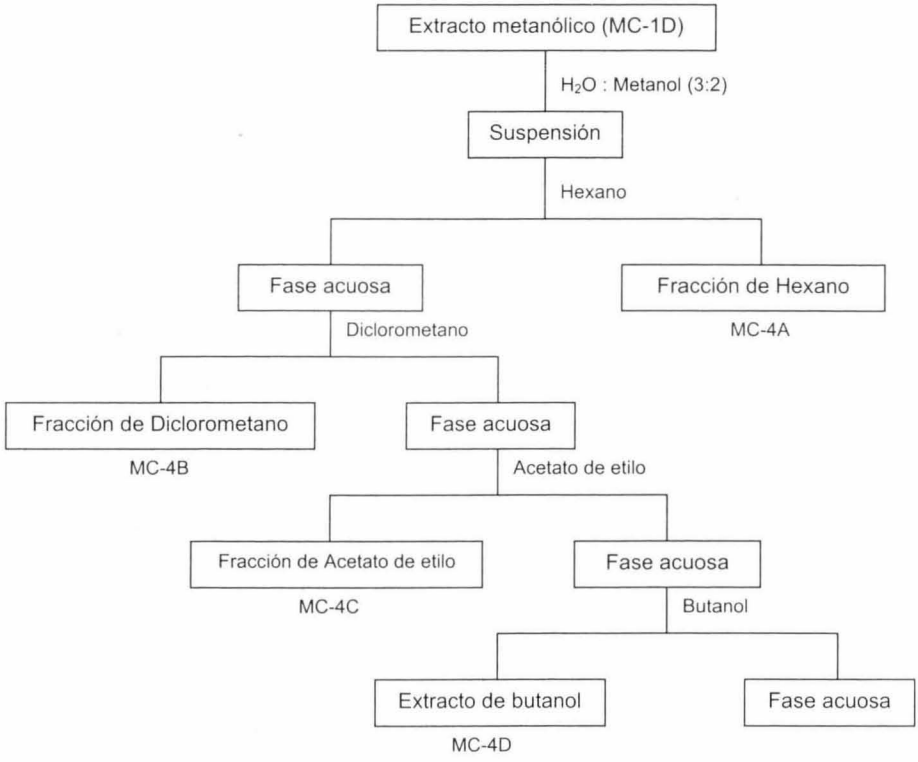
Estudios de naturaleza química

Partición con disolventes orgánicos.

El extracto metanólico crudo de la raíz (MC-1D) fue suspendido en una mezcla de agua-metanol 3:2 (*ca.* 57.3 mg/ml de solución) y la suspensión resultante fue sometida a un proceso de partición con disolventes de polaridad ascendente utilizando extracciones sucesivas con hexano, diclorometano, acetato de etilo (relación disolvente:suspensión, 2:1, 1:1, 1:1) y butanol (1:1). Después de evaporar los disolventes a presión reducida, se obtuvieron las fracciones de polaridad baja (hexano, MC-4A, 6.7 mg/g), media baja (diclorometano, MC-4B, 19.53 mg/g), media alta (acetato de etilo, MC-4A, 5.7 mg/g) y alta (butanol, MC-4D, 3.2 mg/g) (Esquema 2) [8].

Extracción ácido-base.

El extracto metanólico crudo de raíz (MC-1D) fue suspendido en una mezcla de agua-metanol 9:1 (*ca.* 14.21 mg/ml de solución). El pH de la suspensión resultante (pH= 4.5) fue ajustado a pH 2, añadiendo una solución de HCl 4N. Extracciones sucesivas de la fase acuosa con CH_2Cl_2 (2x, 2:1, 1:1) permitieron la separación de las fracciones neutra y ácida (fase orgánica) de la fracción básica (fase acuosa). El pH de la fase acuosa fue ajustado a pH 12, añadiendo una solución de NaOH 2.5N y la fase acuosa alcalinizada fue sometida a extracciones sucesivas con CH_2Cl_2 (2x, 2:1, 1:1), obteniéndose, después de evaporar el disolvente a presión reducida, la fracción básica (MC-5A, 7.61 mg/g). A la fase orgánica conteniendo las fracciones neutra y ácida, se le añadió una solución de NaOH 2.5N, formándose dos fases; la fase orgánica conteniendo la fracción neutra (MC-5B, 11.2 mg/g), misma que se obtuvo después de evaporar el disolvente a presión reducida, y la fase acuosa conteniendo la fracción ácida. El pH de la fase acuosa fue ajustado a un pH 2 con una solución de HCl 4N y sometida a extracciones sucesivas con CH_2Cl_2 (2x, 2:1, 1:1), obteniéndose, después de evaporar el disolvente, la fracción ácida (MC-5C, 1.5 mg/g) (Esquema 3) [9].



Esquema 2.- Partición del extracto metanólico de raíz (MC-1D).

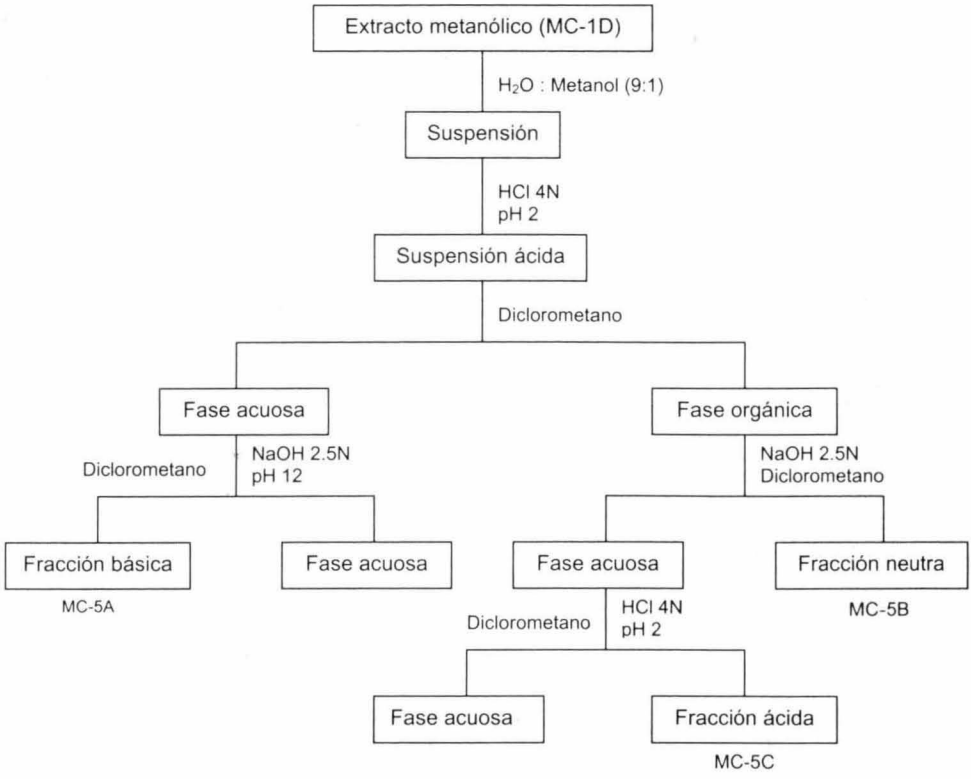
Estudio de variabilidad.

Preparación del material vegetal.

Las raíces fueron lavadas, cortadas en trozos pequeños, secadas a temperatura ambiente por tres días y colocadas en un horno a 50 °C por dos días. Finalmente, el material seco fue triturado en un molino eléctrico para café de la marca Regal Ware INC.

Extracto metanólico.

Las raíces secas y molidas (25 g) de cada individuo de las cuatro poblaciones fueron extraídas con metanol por 24 horas en un aparato Soxhlet. Al término de la extracción, el disolvente fue evaporado a presión reducida. De este procedimiento se obtuvieron los extractos MC-6A a MC-12A (Población I), MC-13A a MC-19A (Población II), MC-20A a MC-26A (Población III) y MC-27A a MC-33A (Población IV), cuyos rendimientos se muestran en la Tabla 2.



Esquema 3.- Extracción ácido-base del extracto metanólico de raíz (MC-1D).

Tabla 2.- Rendimientos de los extractos obtenidos de las raíces de la cuatro poblaciones de *Urechites andrieuxii*.

Población I	mg/g[a]	Población II	mg/g	Población III	mg/g	Población IV	mg/g
MC-6A	120.9	MC-13A	132.7	MC-20A	101.5	MC-27A	111.9
MC-7A	137.1	MC-14A	83.2	MC-21A	138.7	MC-28A	102.2
MC-8A	125.4	MC-15A	80.2	MC-22A	114.5	MC-29A	93.4
MC-9A	102.5	MC-16A	134.5	MC-23A	124.6	MC-30A	88.4
MC-10A	142.7	MC-17A	101.7	MC-24A	109.8	MC-31A	102.4
MC-11A	100.8	MC-18A	101.1	MC-25A	124.6	MC-32A	80.5
MC-12A	124.2	MC-19A	108.6	MC-26A	101.2	MC-33A	123.3

[a]miligramos de extracto por gramo de material vegetal seco.

Actividad biológica.

Bioensayo de letalidad contra *Artemia salina*.

Los quistes de *Artemia salina*, obtenidos del laboratorio de Recursos del Mar de la Unidad Mérida del Cinvestav, después de un procedimiento de descapsulación [8], fueron incubados en agua de mar, obtenida del Puerto de Progreso, durante 48 horas a temperatura ambiente con iluminación y oxigenación constantes.

Las muestras fueron disueltas en disolventes orgánicos a una concentración de 1% y de esta dilución se transfirieron 500 y 50 μl a viales, dejando evaporar el disolvente a temperatura ambiente. Para cada concentración se prepararon 5 réplicas.

A cada uno de los viales con muestra de los extractos se le agregaron 50 μl de dimetilsulfóxido (DMSO), 10 nauplios de *Artemia salina* y agua de mar hasta un volumen final de 5 ml (concentración final de los extractos: 1000 y 100 ppm), incluyéndose controles de DMSO al 1% en cada experimento. Los viales se mantuvieron durante 24 horas con iluminación constante, a temperatura ambiente. Al término de este periodo se contaron el número de nauplios muertos y los datos obtenidos fueron analizados por medio del programa Finney para determinar la Concentración Letal Media (LC_{50}) de cada extracto [8, 10].

Prueba de inhibición del desarrollo de promastigotes de *Leishmania* spp.

Los estudios de inhibición del desarrollo de promastigotes fueron llevados a cabo con cepas de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH 8), *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/75/M 2903) y *Leishmania donovani* (MHOM/BR/74/PP 75). Los parásitos de *Leishmania* fueron mantenidos en medio de cultivo de Schneider de la marca Sigma, suplementado con 10% de suero fetal de bovino, penicilina (100 UI/ml), estreptomicina (100 μg/ml), $CaCl_2$ (0.6 mg/ml) y NaOH (0.4 mg/ml).

La prueba se realizó en una placa de 96 micropozos de la marca Costar, evaluándose todos los extractos por duplicado. Los extractos crudos y las fracciones de *Urechites andrieuxii* fueron disueltos en DMSO y diluidos con medio líquido a una concentración de 400 μg/ml. En cada pozo se añadieron 100 μl de la solución del extracto a evaluar y 100 ml de medio de cultivo conteniendo 100 000 parásitos; teniéndose de esta manera una concentración final del extracto de 200 μg/ml y de DMSO igual o menor al 0.5%. El fármaco pentamidina fue utilizado como control positivo a una concentración final de 5 μg/ml, y se incluyeron controles conteniendo parásitos sin extracto. La placa fue incubada a 25 °C durante 72 horas y la actividad de las muestras evaluadas se determinó por observación directa de cada pozo con un microscopio de fase invertida [11]. La medición de la actividad se realizó cualitativamente de la siguiente manera:

0 parásitos con movimiento igual al control sin extracto
\+ parásitos móviles y algunos muertos
++ parásitos con ligero movimiento, la mayoría inmóviles
+++ todos los parásitos muertos, actividad igual a la pentamidina

Para determinar la concentración mínima leishmanicida de los extractos que desarrollaron mayor actividad, éstos fueron evaluados a concentraciones finales de 200, 100, 50, 25 y 12.5 μg/ml.

Referencias

1. **Argüeta, A. , Cano, L. y Rodarte, M.** (1994) *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana.* Vol. 2, Instituto Nacional Indigenista. México, p. 204.

2. **Castillo, O.** (1993) *Estudio Taxonómico de las Apocynaceas.* Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F.

3. **Pulido, M. T. y Serralta, L.** (1993) *Lista Anotada de las Plantas Medicinales de Uso Actual en el Estado de Quintana Roo, México.* Centro de Investigaciones de Quintana Roo. Chetumal, Quintana Roo.

4. **Lezama, C. M. e Isaac, A. P.** (1994) Las Plantas Medicinales y su Posible Utilidad en el Tratamiento de las Leishmaniosis en México. Estudios Preliminares con *Urechites andrieuxii* Muell. Arg. *Divulgación Biomédica* **2**, 13.

5. **Jiu, J.** (1996) A Survey of Some Medicinal Plants of Mexico for Selected Biological Activities. *Lloydia* **29**, 250.

6. **Viscencio de la R. G., Tamay, P., Isaac, A. y Lezama, C.** (1995) Toxicidad *in vitro* de extractos de *Urechites andrieuxii* en contra de *L. mexicana. Memorias de la III Reunión de Investigación Química en el Sureste de México.* Mérida, Yucatán, p. 93.

7. **Tillequin, F., Michael, S. and Seguín, I.** (1993) Pirrolizidine Alkaloids. In *Alkaloids and Sulphur Compounds* (Waterman, P. G. ed.), pp. 333-336. Academic press, San Diego.

8. **Borges, R. L.** (1991) *Detección y Purificación de Principios Activos Presentes en la Raíz de* Chiococca alba *(L.) Hitch.* Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán. Yucatán, México.

9. **Peña-Rodríguez, L. M. and Chilton, W. S.** (1989) Vicotoxinine and Prehelminthosporolactone, Two Minor Phytotoxic Metabolites Produced by *Bipolaris*, Sp., A Pathogen of Johnson Grass. *Journal of Natural Products* **52**, 899.

10. **Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnam, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., and Mclaughlin, J. L.** (1982) Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica* **45**, 31.

11. **Inchausti, A., Yaluff, G., Rojas de Arias, A., Torres, S., Ferreira, M. A., Nakayama, H., Schinini, A., Lorenzen, K., Anke, T. and Fournet, A.** (1997)

Leishmanicidal and Tripanocidal Activity of Extracts and Secondary Metabolites from Basidiomicetes. *Phytotherapy Research* **11**, 193.

Capítulo III

Resultados y Discusión

Considerando que factores como el ambiente, el genotipo y la ontogenia afectan de manera cuantitativa y cualitativa el contenido de metabolitos secundarios en plantas [1], el objetivo general del trabajo fue determinar el efecto de la variabilidad geográfica sobre la actividad leishmanicida en cuatro poblaciones de *Urechites andrieuxii* colectadas, en un mismo estado fenológico, en diferentes áreas de la Península de Yucatán.

Para validar las propiedades curativas que se atribuyen a *U. andrieuxii* en la medicina tradicional, inicialmente el material vegetal seco (raíz, tallo y hojas) fue preparado de acuerdo al procedimiento popular. Para esto, el material vegetal fue agregado a un volumen de agua en ebullición obteniéndose las correspondientes infusiones. Una parte de cada infusión fue liofilizada y la otra parte fue extraída con acetato de etilo para separar los metabolitos hidrofóbicos de los hidrofílicos. Tomando en cuenta que en diferentes trabajos sobre plantas medicinales, se describe que el proceso de preparación de una infusión resulta en una extracción parcial de los metabolitos contenidos en el material vegetal [4], los residuos del material vegetal utilizado para la preparación de las correspondientes infusiones fueron sometidos a extracciones exhaustivas con metanol.

La presencia de metabolitos con actividad leishmanicida en los extractos obtenidos fue evaluada de manera preliminar mediante el bioensayo de letalidad contra *Artemia salina*. Este bioensayo fue selecciondo tomando en cuenta que en la literatura ha sido reportado como un método adecuado para detectar metabolitos con actividad citotóxica, antipalúdica y leishmanicida [3, 4]. Asimismo, el bioensayo de letalidad contra *Artemia salina* se ha propuesto como un sistema de monitoreo para la detección de metabolitos con actividad contra el *Trypanosoma cruzi*, un parásito protozoario causante de la enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana) y relacionado filogenéticamente con los parásitos del género *Leishmania* [5].

Al evaluar tanto las infusiones como sus correspondientes extractos orgánicos y fases acuosas residuales, así como los diferentes extractos metanólicos en el bioensayo de letalidad contra *Artemia salina*, se observó que únicamente los extractos obtenidos a partir de la raíz mostraban actividad tóxica contra los nauplios de *Artemia salina*. La mayor actividad se observó en el extracto orgánico crudo (MC-1B), seguida de la actividad presente en el extracto metanólico del material vegetal residual (MC-1D) y la de la fase liofilizada de la infusión (MC-1A), mientras que la fase acuosa residual (MC-1C) no mostró actividad significativa (Tabla 1). Estos resultados indican claramente que los metabolitos responsables de la actividad biológica observada son de naturaleza hidrofóbica, confirmándose lo anterior por la ausencia de actividad tóxica en la fracción que contiene los metabolitos hidrofílicos. Asimismo, la presencia de actividad en el extracto del material vegetal residual confirma el hecho de que la

preparación de la infusión a partir del material vegetal resulta en una extracción parcial de los productos responsables de la actividad. Estos resultados permitieron validar de manera preliminar las propiedades medicinales que se le atribuyen en la medicina popular a la raíz de *U. andrieuxii* para el tratamiento de la leishmaniasis y confirmaron los resultados obtenidos en un estudio anterior, donde se observó actividad tóxica contra promastigotes de *Leishmania mexicana* en extractos orgánicos y acuosos de la raíz de la planta [6]. Con base en estos resultados, se consideró adecuado realizar el estudio de variabilidad y la determinación de la naturaleza química de los metabolitos con actividad leishmanicida utilizando extractos metanólicos obtenidos a partir de raíces de *U. andrieuxii*.

Tabla 1.- Actividad de los extractos obtenidos de las infusiones de raíz, tallo y hojas y los correspondientes extractos metanólicos de *Urechites andrieuxii* en el bioensayo de letalidad contra *Artemia salina*.

Extractos	Porcentaje de larvas muertas en 24 horas 1000 µg/ml	100 µg/ml	LC_{50} µg/ml
Raíz			
MC-1A	60	0	721.63
MC-1B	100	25	122.41
MC-1C	37	0	3876.95
MC-1D	78	30	253.76
Tallo			
MC-2A	6.6	0	---
MC-2B	50	0	999.99
MC-2C	13	0	---
MC-2D	32	6	2698.07
Hojas			
MC-3A	0	0	---
MC-3B	0	0	---
MC-3C	0	0	---
MC-3D	0	0	---

Con el fin de establecer la naturaleza química de los metabolitos con actividad leishmanicida, el extracto metanólico de la raíz (MC-1D) fue particionado con disolventes de polaridad ascendente. Cada una de las diferentes fracciones obtenidas fueron evaluadas en el bioensayo de letalidad contra *Artemia salina*, observándose la presencia de una mayor actividad tóxica en la fracción de polaridad baja (MC-4A) seguido de las fracciones de polaridad media alta (MC-4C) y polaridad media baja (MC-4B) (Tabla 2). Lo anterior permitió establecer que los metabolitos responsables de la actividad en el extracto de la raíz son de naturaleza hidrofóbica y de baja polaridad.

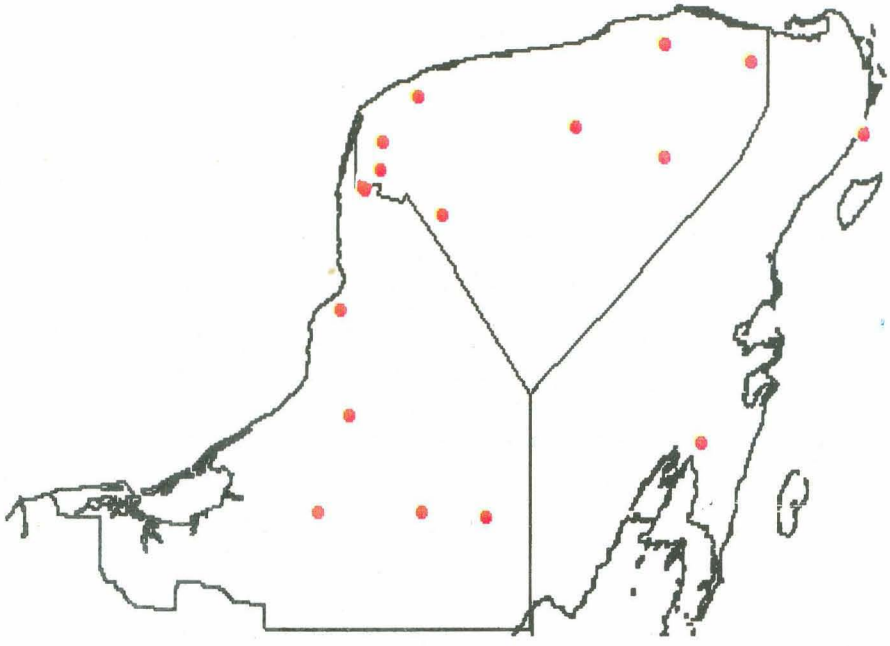
En forma paralela a las evaluaciones preliminares ya mencionadas, y con el fin de seleccionar las poblaciones de *U. andrieuxii* para el estudio de variabilidad, se

determinó la distribución de esta especie en la Península de Yucatán (Mapa 1). La amplia distribución mostrada por esta especie permitió considerar como primer criterio para la selección de las poblaciones de estudio el que éstas se encontraran en diferentes tipos de vegetación y como segundo criterio el tamaño de la población natural. De esta manera, la población I fue colectada en una región de vegetación riparia que se caracteriza por condiciones de alta humedad, mientras que las poblaciones II y III fueron localizadas en un tipo de vegetación conocido como selva mediana subcaducifolia que presenta un clima cálido húmedo, con una larga temporada seca y suelos esporádicamente inundables. Aunque éstas dos últimas poblaciones pertenecen al mismo tipo de vegetación, la población III se encuentra en la porción norte de la Península de Yucatán mientras que la población II se encuentra en la parte oeste de la Península de Yucatán. Finalmente, la población IV fue colectada en un ambiente conocido como selva baja caducifolia caracterizado por un clima seco con suelos bien drenados y con baja retención de humedad (Mapa 2) [7].

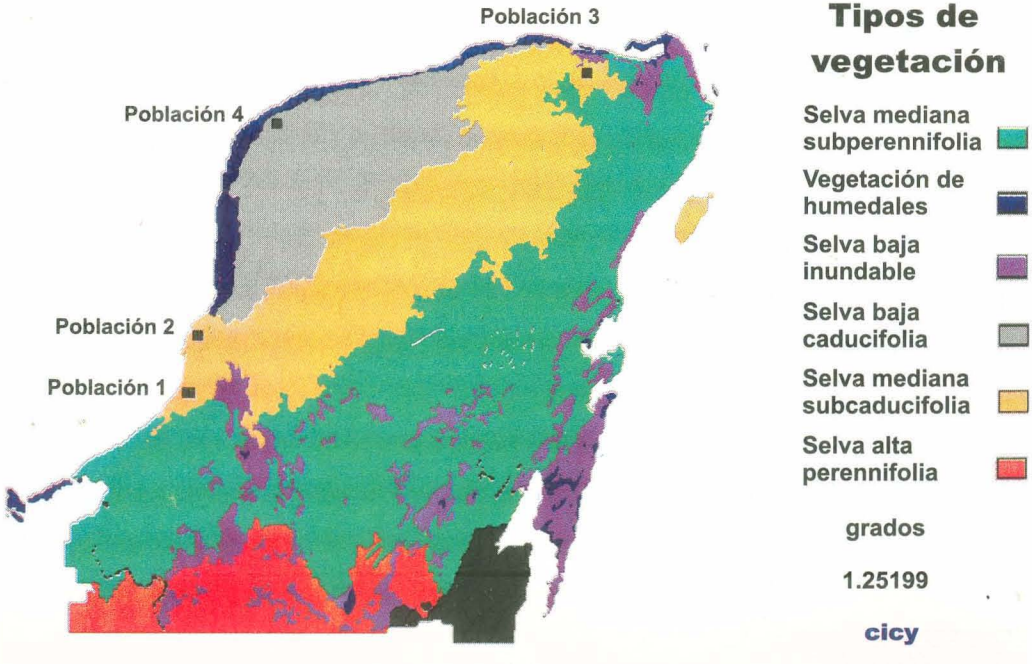
Tabla 2.- Actividad de las fracciones de diferentes polaridades obtenidas del extracto MC-1D en el bioensayo de letalidad contra *Artemia salina*.

Fracción	Porcentaje de larvas muertas en 24 horas 1000 µg/ml	100 µg/ml	LC_{50} µg/ml
MC-4A	98	80	20.15
MC-4B	96	25	100.00
MC-4C	96	64	55.16
MC-4D	44	8	1321.00

El estudio de variabilidad en la actividad leishmanicida fue llevado a cabo con extractos metanólicos de las raíces de siete individuos de cada población, utilizando la prueba de inhibición del desarrollo de promastigotes de *Leishmania* spp. Este método de bioensayo, utilizado en la mayoría de los estudios realizados acerca de la bioquímica del parásito y el efecto de fármacos sobre su metabolismo, es el más simple y el más comúnmente usado para la detección de actividad leishmanicida, ya que las formas promastigotes de *Leishmania* pueden ser mantenidas fácilmente en condiciones *in vitro* [8]. Las tres especies de *Leishmania* utilizadas en esta prueba, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania braziliensis* y *Leishmania donovani*, fueron seleccionadas tomando en cuenta que cada una de ellas causa una forma clínica diferente de leishmaniasis. Los parásitos de *Leishmania amazonensis* causan las leishmaniasis cutánea y cutánea difusa, mientras que los de *Leishmania braziliensis* y *Leishmania donovani* se reconocen como responsables de las leishmaniasis mucocutánea y visceral, respectivamente [9].



Mapa 1.- Distribución de *Urechites andrieuxii* Muell. Arg. en la Península de Yucatán.



Mapa 2.- Sitios de colecta de las poblaciones de estudio de *Urechites andrieuxii.*

Al evaluar los extractos metanólicos de las raíces de los individuos de las cuatro poblaciones en la prueba de inhibición del desarrollo de promastigotes de *Leishmania*, se observó que la mayor actividad leishmanicida contra las tres especies de prueba se encontraba en los extractos de los individuos pertenecientes a la población I, seguida por la de los individuos de la población II, mientras que los individuos de las poblaciones III y IV mostraron una actividad comparable y débil contra las tres mismas especies de *Leishmania* (Tabla 3). Los resultados obtenidos permiten establecer la existencia de variabilidad en el contenido de metabolitos con actividad leishmanicida en poblaciones naturales de *U. andrieuxii*. Tomando en cuenta que los individuos con mayor actividad leishmanicida pertenecen a la población I y que ésta fue colectada en una zona caracterizada por condiciones de alta humedad, en tanto que los individuos con la menor actividad pertencen a las poblaciones III y IV, ubicadas en áreas de baja humedad, es posible argumentar que la actividad leishmanicida de *U. andrieuxii* posee una relación directa con la humedad y, por lo tanto, se puede afirmar que la variabilidad en la actividad leishmanicida en las poblaciones de *U. andrieuxii* analizadas se encuentra influenciada por el ambiente. Esta variabilidad fenotípica coincide con lo reportado en la literatura, donde en un estudio similar se encontró que la humedad es responsable de las variaciones en el contenido de alcaloides en poblaciones naturales de *Tabernamontana pachysiphon* [10].

Con el fin de establecer la naturaleza química de los metabolitos con actividad leishmanicida, las fracciones de la partición y de la extracción ácido-base del extracto metanólico obtenido del material vegetal residual de la raíz (MC-1D), se evaluaron contra los promastigotes de *Leishmania* spp. En esta evaluación se observó que en las fracciones de la partición la mayor actividad leishmanicida contra las tres especies de *Leishmania* se encontraba en las fracciones de polaridad baja (MC-4A) y media baja (MC-4B), en tanto que la fracción de la extracción ácido-base más activa fue la fracción ácida (MC-5C) seguida de la fracción básica (MC-5A) (Tabla 4). Lo anterior indica que los metabolitos responsables de la actividad leishmanicida en el extracto de raíz son de polaridad baja o media baja y de naturaleza ácida, por lo cual es de esperarse que estos metabolitos posean en su estructura química grupos funcionales del tipo carboxilo o fenólico. Sin embargo, la fuerte actividad leishmanicida mostrada por la fracción básica contra dos de las tres especies de promastigotes de *Leishmania*, sugiere la existencia de metabolitos con estructura química de tipo alcaloidal responsables, en parte, de la actividad leishmanicida observada en los extractos de *U. andrieuxii*.

Con el propósito de confirmar la existencia de alguna correlación entre la actividad tóxica contra *Artemia salina* con la actividad leishmanicida, los extractos metanólicos del material residual, el extracto metanólico de raíz (MC-1D), del tallo (MC-2D) y el de las hojas (MC-3D), se evaluaron en la prueba de inhibición del crecimiento de promastigotes de *Leishmania* spp. El extracto metanólico de las hojas fue el más activo contra las tres especies de promastigotes de *Leishmania*, seguido por el extracto metanólico del tallo y el de la raíz (Tabla 5). Los resultados obtenidos indican claramente que en este caso no existe correlación entre la actividad tóxica contra *Artemia salina*, observada para los diferentes extractos, y la actividad leishmanicida detectada para los mismos. Esto permite sugerir que, contrariamente a lo reportado en

Tabla 3.- Actividad *in vitro* de los extractos metanólicos de las cuatro poblaciones de *Urechites andrieuxii* sobre promastigotes de especies de *Leishmania*.

Extracto (200 μg/ml)	*L. braziliensis* (2903)	*L. amazonensis* (PH8)	*L. donovani* (PP75)
Población I			
MC-6A	++	++	++
MC-7A	++	0	0
MC-8A	+++	++	+++
MC-9A	+++	+++	+++
MC-10A	+	+	0
MC-11A	+++	++	+++
MC-12A	++	0	++
Población II			
MC-13A	0	0	0
MC-14A	+	0	0
MC-15A	+	+	+
MC-16A	++	+	+
MC-17A	+	+	+
MC-18A	++	++	+
MC-19A	+	+	+
Población III			
MC-20A	+	+	+
MC-21A	+	+	+
MC-22A	+	+	+
MC-23A	+	+	+
MC-24A	+	+	+
MC-25A	+	+	+
MC-26A	+	+	+
Población IV			
MC-27A	+	0	+
MC-28A	+	+	+
MC-29A	+	+	+
MC-30A	+	+	+
MC-31A	+	+	+
MC-32A	+	+	+
MC-33A	+	+	+
Pentamidina[a]	+++	+++	+++
Control[b]	0	0	0

0= parásitos con movimiento igual al control; += parásitos móviles y algunos muertos; ++= parásitos con ligero movimiento, la mayoría inmóviles; +++= todos muertos igual que la pentamidina.
[a] evaluado a 5 μg/ml, [b] parásitos en medio de cultivo sin extracto.

la literatura, el bioensayo de letalidad contra *Artemia salina* no representa ser una prueba confiable para detectar de manera preliminar extractos con actividad leishmanicida. La fuerte actividad leishmanicida mostrada por el extracto metanólico de las hojas valida el uso reportado de esta parte de la planta en la medicina tradicional para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea.

Tabla 4.- Actividad *in vitro* de fracciones del extracto MC-1D de *Urechites andrieuxii* sobre promastigotes de *Leishmania*.

Extracto (200 μg/ml)	*L. braziliensis* (2903)	*L. amazonensis* (PH 8)	*L. donovani* (PP75)
Partición			
MC-4A	+++	++	+++
MC-4B	+++	++	+++
MC-4C	+	0	0
MC-4D	0	0	0
Extracción ácido-base			
MC-5A	+++	+	+++
MC-5B	++	+	++
MC-5C	+++	+++	+++
Pentamidina[a]	+++	+++	+++
Contol[b]	0	0	0

0= parásitos con movimiento igual al control; += parásitos móviles y algunos muertos; ++= parásitos con ligero movimiento, la mayoría inmóviles; +++= todos muertos igual que la pentamidina.
[a] evaluado a 5 μg/ml,
[b] parásitos en medio de cultivo sin extracto.

Cada uno de los extractos que mostraron una fuerte actividad leishmanicida contra las tres especies de *Leishmania*, el extracto metánolico de un individuo de la población I (MC-9A), el extracto metanólico del material residual de las hojas (MC-3D) y la fracción ácida (MC-5C), fue evaluado nuevamente para determinar su concentración mínima de actividad leishmanicida. El extracto metanólico de raíz mostró la mayor actividad, siendo activo contra las tres especies de *Leishmania* a una concentración de 50 μg/ml, en tanto que el extracto metanólico de las hojas y la fracción ácida mostraron una moderada actividad a 100 μg/ml (Tabla 6). Lo anterior sugiere que el extracto metanólico de la raíz (MC-9A) contiene una mayor concentración de metabolitos con actividad leishmanicida.

Finalmente, debido a que la mayoría de los metabolitos con actividad leishmanicida reportados en la literatura muestran actividad citotóxica y debido a que la actividad selectiva o índice terapéutico es uno de los parámetros principales en la búsqueda de metabolitos con actividad antiprotozoaria porque permite distinguir entre la especificidad de la acción y la toxicidad no selectiva de un producto [11], se

Tabla 5.- Actividad *in vitro* de extractos metanólicos de *Urechites andrieuxii* sobre promastigotes de *Leishmania*.

Extracto (200 μg/ml)	*L. braziliensis* (2903)	*L. amazonensis* (PH8)	*L. donovani* (PP75)
MC-1D	+	+	+
MC-2D	+++	+	+++
MC-3D	+++	+++	+++
Pentamidina[a]	+++	+++	+++
Control[b]	0	0	0

0= parásitos con movimiento igual al control; += parásitos móviles y algunos muertos; ++= parásitos con ligero movimiento, la mayoría inmóviles; +++= todos muertos igual que la pentamidina.
[a] evaluado a 5 μg/ml, [b] parásitos en medio de cultivo sin extracto.

Tabla 6.- Concentración mínima leishmanicida de los extractos MC-9A, MC-3D y MC-5C de *Urechites andrieuxii*.

Extracto	Concentración (μg/ml)	*L. braziliensis* (2903)	*L. amazonensis* (PH8)	*L. donovani* (PP75)
MC-9A	200	+++	+++	+++
	100	++	+	++
	50	+	+	+
	25	0	0	0
	12.5	0	0	0
MC-3D	200	+++	+++	+++
	100	++	+	++
	50	0	0	0
	25	0	0	0
	12.5	0	0	0
MC-5C	200	+++	+++	+++
	100	++	++	++
	50	0	0	0
	25	0	0	0
	12.5	0	0	0
Pentamidina	5	+++	+++	+++
Control[a]		0	0	0

0= parásitos con movimiento igual al control; += parásitos móviles y algunos muertos; ++= parásitos con ligero movimiento, la mayoría inmóviles; +++= todos muertos igual que la pentamidina.
[a] parásitos en medio de cultivo sin extracto.

consideró importante el determinar la citotoxicidad de los extractos y las fracciones que mostraron mayor actividad contra las tres especies de promastigotes de *Leishmania*.

Al evaluar los diferentes extractos contra cuatro líneas celulares (Tabla 7) se observó que los dos extractos que habían mostrado una mayor actividad contra promastigotes de *Leishmania*, i.e. el extracto metanólico del material residual de las hojas (MC-3D) y la fracción de polaridad baja (MC-4A), no desarrollaron una actividad citotóxica significativa, siendo ésta mayor en la fracción de polaridad media baja (MC-4B), seguida de la fracción ácida (MC-5C), la fracción básica (MC-5A) y el extracto metanólico crudo de raíz (MC-9A). Los resultados obtenidos sugieren que la actividad tóxica observada contra los promastigotes de *Leishmania* por parte de la mayoría de los extractos metanólicos y fracciones obtenidos a partir de la raíz de *Urechites andrieuxii*, es consecuencia de la presencia de metabolitos con actividad citotóxica. Sin embargo, y dado que tanto la fracción de polaridad baja (MC-4A) como el extracto metanólico de hojas (MC-3D) no mostraron una alta citotoxicidad y si una presencia de actividad leishmanicida, existe la posibilidad de encontrar en cada uno de ellos metabolitos con una actividad selectiva importante contra los parásitos de *Leishmania*.

Tabla 7.- Actividad citotóxica de los extractos y fracciones con mayor actividad leishmanicida contra cuatro líneas celulares.

Extracto	ED_{50} en μg/ml			
	OVCAR	KB	UISO	COLON
MC-9A	5.4	2.6	1.2	4.6
MC-3D	20.0	20.0	13.8	20.0
MC-4A	20.0	16.6	3.5	20.0
MC-4B	1.1	0.5	<0.1	1.0
MC-5A	5.5	1.7	1.4	3.2
MC-5C	2.9	<1	<1	2.6

OVCAR = células de carcinoma ovario; KB = células de carcinoma de la nasofaringe; UISO = células de carcinoma del cervix; COLON = células de carcinoma del colon.
DE_{50} = Dosis efectiva media.

Referencias.

1. **Vanhalen, M., Lejoly, J., Hanocq, M., and Molle, L.** (1991) Climatic and Geographical Aspects of Medicinal Plant Constituyents. In *The Medicinal Plant Industry* (Wijesekera, R. O. B., ed.), pp. 59-60. CRC Press, Florida.

2.- **Alejos-González, F., Borges-Argáez, R. L., Escalante-Erosa, F., Gamboa-Angulo, M., Medina-Baizabal, L., Ojeda-UC, Y.C., May-Pat, F., Pérez-Rodríguez,**

M., Peraza-Sánchez, S. R., Salazar-Aguilar, N. E. y Peña-Rodríguez, L. M. (1996) Metabolitos Bioactivos Producido por Hongos y Plantas. *Revista Latinoamericana de Química* **24**, 162.

3. **Solis, P. N., Wright, C. W., Anderson, M. M., Gupta, M. P. and Phillipson, J. D.** (1993) A Microwell Cytotoxicity Assay Using *Artemia salina* (Brine Shrimp). *Planta Medica* **59**, 250.

4. **Shapaz, S., Bories, Ch., Loiseau, P. M., Cortés, D., Hocquemiller, R., Laurens, A. and Cavé, A.** (1994) Cytotoxic and Antiparasitic Activity from *Annona senegalensis* Seed. *Planta Medica* **60**, 538.

5. **Chiari, E., Duarte, D. S., Raslan, D. S., Saúde, D. A., Perry, K. S. P., Boaventura, M. A. D., Grandi, T. S. M., Stehmann, J. R., Anjos, A. M. G. and De Oliveira, A. B.** (1996) *In Vitro* Screening of Asteraceae Plant Species Against *Trypanosoma cruzi*. *Phytotherapy Research* **10**, 636.

6. **Viscencio de la R. G., Tamay, P., Isaac, A. y Lezama, C.** (1995) *Toxicidad* In Vitro *de Extractos de* Urechites andrieuxii *Muell. Arg. en contra de* L. mexicana. Memorias de la III Reunión de Investigación Química en el Sureste de México. Mérida, Yucatán. p. 93.

7. **Campos-Ríos, G. y Durán, R. C.** (1991) La Vegetación de la Península de Yucatán. En *Apuntes del Curso-Taller para maestros "El jardín botánico como herramienta didáctica.* Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán. pp. 23-35.

8. **Berman, J.D.** (1985) Experimental Chemotherapy of Leishmaniasis- A Critical Review. In *Leishmaniasis* (Chang, K. P. and Bray, R. S., eds.), pp. 111-138. Elsevier Science Publishers. B. V.

9. **Argüello, C.** (1995) Leishmaniasis en México. *Avance y Perspectivas* **14**, 21.

10. **Höft, M., Verpoorte, R. and Beck, E.** (1998) Leaf Alkaloid Contents of *Tabernaemontana pachysiphon* as Influenced by Endogenous and Enviromental Factors in the Natural Habitat. *Planta Medica* **64**,148.

11. **Anderson, M. M., O'Neill, M., Phillipson, J. D. and Warhurst, D. C.** (1991) *In Vitro* Cytotoxicity of a Series of Quassinoids from *Brucea javanica* Fruits Against KB Cells. *Planta Medica* **57**, 62.

Capítulo IV

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES.

Indudablemente, las técnicas de bioensayo representan herramientas útiles para complementar y/o guiar los estudios fitoquímicos de plantas medicinales. Pueden utilizarse para validar las propiedades medicinales de una planta, así como para simplificar el aislamiento de los metabolitos biológicamente activos que contienen. En el presente trabajo, la prueba de inhibición del desarrollo de promastigotes de *Leishmania* spp. permitió detectar, en extractos de *Urechites andrieuxii* Muell. Arg., metabolitos con actividad tóxica contra estos parásitos, validando de esta forma las propiedades medicinales que se les atribuyen a la raíz y las hojas de esta planta. Además, este bioensayo permitió también establecer la existencia de variabilidad geográfica en el contenido de metabolitos con actividad leishmanicida en poblaciones naturales de esta especie, así como determinar la naturaleza química de los metabolitos responsables de esta actividad.

La existencia de variabilidad geográfica en la actividad leishmanicida en poblaciones naturales de *U. andrieuxii* fue notable; la actividad biológica mostrada por los extractos de los individuos de la población I, colectada en una región caracterizada por un clima cálido con alta humedad (vegetación riparia), fue muy superior a la actividad mostrada por las otras tres poblaciones restantes. El hecho de que la población I haya sido colectada en una región de alta humedad y las otras tres poblaciones se ubicaron en zonas de menor humedad, sugiere que la concentración de metabolitos con actividad leishmanicida puede estar relacionada con la humedad del ambiente. Esta observación confirma resultados similares, previamente descritos en la literatura, donde el entorno ecológico que rodea a una población en particular es determinante para la producción de metabolitos bioactivos.

Los resultados obtenidos permiten establecer que los metabolitos con actividad leishmanicida presentes en los extractos de la raíz de *U. andrieuxii* son de polaridad baja o media baja, y de naturaleza ácida o básica, pero no neutra. Asimismo, se logró determinar que los extractos orgánicos crudos del tallo y de las hojas contienen también metabolitos con actividad tóxica contra los parásitos de *Leishmania*.

La fuerte actividad citotóxica mostrada, contra cuatro líneas celulares (OVCAR, KB, UISO y COLON), por los extractos orgánicos crudos de la raíz y del tallo, así como las fracciones de polaridad media baja, ácida y básica de la raíz, sugiere que la actividad leishmanicida expresada por estos extractos y fracciones se debe a la presencia de metabolitos con actividad citotóxica. Por el contrario, la fracción de baja polaridad y el extracto orgánico crudo de las hojas de *U. andrieuxii*, que mostraron una débil actividad citotóxica, probablemente deben su actividad a que contienen metabolitos con actividad leishmanicida selectivos a los parásitos de *Leishmania*.

En este trabajo se confirmó la utilidad del bioensayo de letalidad contra *Artemia salina* para la detección de metabolitos con actividad citotóxica; sin embargo se estableció que este bioensayo no es un método confiable para detectar actividad leishmanicida, de manera preliminar, en extractos orgánicos crudos, al observar extractos sin actividad tóxica contra los nauplios de *Artemia salina*, pero con una fuerte actividad leishmanicida.

PERSPECTIVAS.

La variabilidad en la actividad leishmanicida detectada en *Urechites andrieuxii*, así como la posible presencia de metabolitos con actividad selectiva contra parásitos de *Leishmania* contenidos en extractos de esta especie, permiten plantear dos principales perspectivas a corto y mediano plazo, mismas que podrían realizarse en forma paralela. La primera estaría encaminada al estudio del genotipo como un factor determinante en la expresión de los metabolitos bioactivos en *U. andrieuxii*. Para realizar este estudio es conveniente cultivar bajo las mismas condiciones ambientales diferentes poblaciones de *U. andrieuxii*. De esta manera, al observar diferencias en el contenido de metabolitos con actividad leishmanicida en extractos de las diferentes poblaciones, se podría establecer si el genotipo es el principal factor responsable de esta variabilidad. Si no existiera variabilidad en el contenido de estos metabolitos, sería indispensable definir cuales son los factores ambientales que influyen de manera específica en el contenido de metabolitos con actividad leishmanicida en *U. andrieuxii*. Para llevar a cabo lo anterior, será necesario realizar, en diferentes etapas fenológicas de la planta, estudios que permitan evaluar la influencia de factores ambientales tales como suelo, luz, humedad, etc. sobre la producción de estos metabolitos. Lo anterior permitirá establecer el cultivo de una población con un determinado genotipo en condiciones ambientales óptimas y la colección del material vegetal en el momento adecuado.

La segunda perspectiva implicaría el llevar a cabo la purificación biodirigida de los metabolitos responsables de la actividad leishmanicida. Las fracciones activas de *U. andrieuxii* serían procesadas mediante técnicas cromatográficas para el aislamiento de los metabolios bioactivos, en tanto que el bioensayo de inhibición del desarrollo de promastigotes de *Leishmania* spp., en primera instancia, permitirá la detección de los metabolitos con actividad leishmanicida y guiará de esta forma la purificación de los mismos. Una vez aislados e identificados los metabolitos con actividad leishmanicida deberán ser evaluados contra las formas amastigotes del parásito de *Leishmania* en macrófagos. Posteriormente, sería conveniente determinar el índice de selectividad de los metabolitos que muestren actividad tóxica contra las formas amastigotes de *Leishmania* Los metabolitos que presenten un índice de selectividad óptimo deberán probar su efectividad para combatir la enfermedad *in vivo*, para ser considerados, a futuro, como posibles fármacos, los cuales deberán ser sometidos a las diferentes etapas clínicas, así como establecer sus mecanismos de acción.